

Streszczenie rozprawy doktorskiej pod tytułem: Opracowanie mysiego modelu heteroprzeszczepu na przykładzie raka jelita grubego

Zrozumienie molekularnych mechanizmów kancerogenezy stanowi obecnie podstawę leczenia chorób nowotworowych. Onkologia molekularna umożliwia projektowanie leków o działaniu selektywnym, skierowanych przeciwko precyzyjnie zdefiniowanym celom. Znajomość charakterystyki molekularnej nowotworu poddawanego działaniu leku oraz wykorzystanie w badaniach przedklinicznych modelu, który wiernie i kompletnie naśladuje tę charakterystykę, winny stanowić nieodzowny element poszukiwań nowych terapii.

W mysim modelu heteroprzeszczepu nowotwór rozwija się z materiału pochodzącego od człowieka, który wszczepia się zwierzęciu o obniżonej odporności. Przez kilkadziesiąt lat modele heteroprzeszczepów tworzono w oparciu o linie komórkowe hodowane *in vitro* i wykorzystywano w badaniach przesiewowych bibliotek związków o potencjalnym działaniu przeciwnowotworowym. Guzy powstające z linii komórkowych cechuje jednak szereg ograniczeń, które utrudniają prawidłowe przewidywanie klinicznej skuteczności leczenia, co wymusza nieustanne poszukiwanie doskonalszych modeli. Obecnie coraz większą rolę w onkologicznych badaniach przedklinicznych na świecie odgrywają heteroprzeszczepy tkanek nowotworowych pochodzących bezpośrednio od pacjentów (ang. PDX – patient-derived xenografts). PDX w szerszym zakresie zachowują heterogenną budowę histologiczną i molekularną guzów ludzkich, umożliwiając nie tylko badania przesiewowe bibliotek związków chemicznych, ale także badania przedkliniczne, a nawet projektowanie indywidualnych terapii dla poszczególnego pacjenta.

Rak jelita grubego jest heterogenną chorobą o złożonym podłożu genetycznym i molekularnym, do rozwoju której prowadzą mutacje w określonych onkogenach oraz mutacje

lub zmiany epigenetyczne wpływające na ekspresję w genach supresorowych i genach powiązanych z mechanizmami naprawy DNA. W ostatnich latach wyodrębniono 4 podtypy molekularne raka jelita grubego (ang. CMS – consensus molecular subtypes), które uznaje się za najpełniejsze dotąd scharakteryzowanie heterogeniczności tego nowotworu na poziomie zmian genetycznych i transkryptomocnych. Przewiduje się że CMS mogą być pomocne w poszukiwaniu i rozwijaniu nowych terapii celowanych, a także w kwalifikacji chorych do badań klinicznych. Możliwość ich odtworzenia w modelach przedklinicznych zdaje się pilną koniecznością.

Cel pracy

Celem mojej pracy było wyprowadzenie mysich modeli heteroprzeszczepów raka jelita grubego z tkanek nowotworowych pochodzących bezpośrednio od pacjentów. Uzyskane PDX poddano szczegółowej analizie, a następnie zestawiono z heteroprzeszczepami rozwiniętymi z linii komórkowych raka jelita grubego oraz z tkanką nowotworową pacjentów, która nie wykazała wzrostu u myszy. Jako zwieńczenie realizacji pracy doktorskiej, utworzono pierwszy w Polsce biobank PDX, na potrzeby badań przedklinicznych nowych leków przeciwnowotworowych.

Material i metody

Wycinki raka jelita grubego i innych typów nowotworów pobrano śródoperacyjnie od pacjentów Centrum Onkologii – Instytutu im. Marii Skłodowskiej-Curie w Warszawie i wszczepiono podskórnie myszom szczepów NU/J i NSG/J. 20 PDX raka jelita grubego, 5 heteroprzeszczepów z linii komórkowych raka jelita grubego oraz tkankę nowotworową pacjentów, która nie wykazała wzrostu u myszy, poddano analizie obejmującej badanie histopatologiczne, immunohistochemiczne oraz badaniu wariantów genetycznych i badaniu transkryptomocnemu wykorzystującym sekwencjonowanie następnej generacji DNA i RNA. Uzyskane heteroprzeszczepy zabankowano w ciekłym azocie.

Wyniki

Wyprowadzono 51 stabilnych PDX, w tym 32 PDX raka jelita grubego ze średnim odsetkiem przyjmowania 51%. Analiza histopatologiczna potwierdziła utrzymanie charakterystyki tkanki nowotworowej pacjenta po wszczepieniu do myszy, w tym zachowanie stopnia złośliwości histologicznej oraz odsetka zrębu w guzie. Barwienie immunohistochemiczne wykazało zastępowanie zrębu ludzkiego zrębem mysim w PDX oraz potwierdziło ludzkie pochodzenie komórek nowotworowych. Analiza wariantów genetycznych wykazała utrzymanie w PDX stwierdzonych w tkance pacjenta mutacji typu „driver”, ujawniła jednak również wzrost nabywanych odczytów niereferencyjnych po wszczepieniu do myszy. Wyniki profili ekspresji stanowiły podstawę próby przypisania heteroprzeszczepów do CMS. Zgodnie z oczekiwaniem, przy użyciu obecnie dostępnych klasyfikatorów nie udało się uzyskać pełnej zgodności dopasowania poszczególnych PDX i odpowiadającej im tkanki nowotworowej pacjenta. Nie wykazano istotnych różnic histologicznych i molekularnych między tkankami, z których wyprowadzono heteroprzeszczepy, a tymi, które nie wykazały wzrostu u myszy. Potwierdzono skuteczność zastosowanych metod krioprezerwacji i możliwość odzyskiwania heteroprzeszczepów z bankowanego materiału.

Wnioski

Utrzymanie w PDX charakterystyki histologicznej tkanki nowotworowej pacjenta oraz stosunkowo pełne zachowanie profili mutacyjnych mogą decydować o zastąpieniu w badaniach przedklinicznych heteroprzeszczepów z linii komórkowych heteroprzeszczepami z guzów ludzkich. Wyprowadzanie heteroprzeszczepów, ich precyzyjne scharakteryzowanie oraz przechowywanie w biobanku, umożliwia dobór odpowiedniego modelu do badań, w oparciu o wybrane parametry. Opracowania metodologiczne w powiązaniu z pracami organizacyjnymi umożliwiły powołanie pierwszej w Polsce pracowni PDX.

Summary

The understanding of the molecular basis of carcinogenesis makes a fundamental contribution to current anticancer treatment, enabling the specific target-based design of selective anticancer agents. Knowledge of the molecular characteristics of cancer subjected to a given therapy along with a reliable preclinical model that closely mimic these characteristics are crucial for successful drug discovery and patient stratification.

In a mouse xenograft model a tumor originating from human cells or tissues grows in an immunocompromised animal. For decades xenograft models were created using *in vitro* cultured cell lines, serving as a tool in screening libraries of compounds with potential anticancer activity. However, tumors arising from cell lines have numerous limitations that hinder accurate prediction of clinical treatment effectiveness emphasizing the urgent need for better models. Therefore in the oncological preclinical studies the cell line xenografts are being gradually replaced with patient-derived xenografts (PDXs) originating directly from human tissues. PDXs better mimic heterogeneous histological and molecular structure of a human tumor, allowing not only for the screening of compound databases but also for preclinical and co-clinical trials, as well as the creation of mouse avatars for personalized cancer therapies.

Colorectal cancer is a heterogeneous disease with a complex genetic and molecular background, which is developed through mutations in specific oncogenes as well as mutations or epigenetic changes affecting the expression of suppressor genes and genes associated with DNA repair mechanisms. In 2015, four consensus, transcriptomics-based, molecular subtypes of colorectal cancer (CMS) have been proposed. This classification is currently considered to be the most complete characterization of the heterogeneity of this tumor type . It is anticipated that CMS may be helpful in discovery and development of new targeted therapies, as well as in

the qualification of patients for clinical trials. The ability to reproduce CMS in preclinical models is expected to be an urgent necessity.

The aim of the study

The aim of my work was to create xenograft models of colorectal cancer that were derived directly from human tissues. The PDXs were subjected to detailed analysis and compared with xenografts developed from colorectal cancer cell lines and tissues from patients that didn't grow in mice. The ultimate goal of this study was to create the first biobank of PDXs in Poland for preclinical studies on new anticancer agents.

Material and methods

Surgical specimens of colorectal cancer and other types of tumors were resected from patients at the Maria Skłodowska-Curie Institute – Oncology Center in Warsaw and implanted subcutaneously into NU/J and NSG/J mouse strains. 20 colorectal cancers PDXs, 5 colorectal cancer cell line xenografts and tumor tissue from patients that didn't grow in mice were subjected to a deep examination including histopathological and immunohistochemical techniques, as well as the genetic variants and the transcriptome analysis using next-generation sequencing. All established xenografts were cryopreserved in liquid nitrogen.

Results

51 PDXs were established, including 32 from colorectal cancer with an average intake rate of 51%. The histopathological examination confirmed the maintenance of the general characteristics of the patient's tumor tissue after engraftment, including the histological grade and the tumor stroma percentage. The immunohistochemical staining showed replacement of the human stroma with the mouse stroma in PDXs and confirmed the human origin of tumor cells. The survey of genetic variants confirmed the maintenance of driver mutations in PDXs but also revealed an increase in acquired non-reference reads in xenografts. The expression profiles were used in an attempt to classify xenografts to CMS. As expected, the currently

available CMS classifiers, didn't succeed in matching all the PDXs and their corresponding patient tumor counterparts. There were neither significant histological nor molecular differences between the tissues from which xenografts were derived and those that didn't grow in mice. The effectiveness of the cryopreservation methods and the ability to recover xenografts from the biobank material were confirmed.

Conclusion

Maintaining of histological characteristics and relatively full reconstitution of mutational profiles of patients' tumors in PDXs may justify the replacement of cell line-based xenografts in preclinical trials. Establishment of PDXs, their detailed molecular and genetic characterization and biobanking, enable the choice of an accurate and tailored model for preclinical studies. The methodology that was developed and applied along with all organizational work led to the creation of the first PDX platform in Poland.