

GENSKI ELEKTROPRENOS VNETNIH KEMOKINOV CCL5 IN CCL17 V MIŠJE TUMORJE VPLIVA NA IZRAŽANJE CITOKINOV IN VODI DO POPOLNIH ODGOVOROV V KOMBINACIJI Z OBSEVANJEM

Tim Božič^{1,2}, Simona Kranjc Brezar^{1,2}, Gregor Serša^{1,3}, Maja Čemažar^{1,4}, Boštjan Markelc^{1,3}

¹ Oddelek za eksperimentalno onkologijo, Onkološki inštitut Ljubljana, Zaloška cesta 2, 1000 Ljubljana, Slovenija

² Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Vrazov trg 2, 1000 Ljubljana, Slovenija

³ Zdravstvena fakulteta, Univerza v Ljubljani, Zdravstvena pot 5, 1000 Ljubljana, Slovenija

⁴ Fakulteta za vede o zdravju, Univerza na Primorskem, Polje 42, 6310 Izola, Slovenija

Email: tbozic@onko-i.si

Izveček

Raziskava kemokinov CCL5 in CCL17 po GET v mišja tumorska modela raka dojke, 4T1 in E0771, in debelega črevesa, CT26 in MC38, je pokazala, da terapija poveča izražanje vnetnih citokinov in, v kombinaciji z obsevanjem, vodi do popolnih odgovorov.

Ključne besede: Genski elektroprenos, CCL5, CCL17, mišji tumorji, izražanje citokinov

Uvod

Učinek imunoterapij korelira s stopnjo in tipom infiltracije imunskih celic v tumorsko tkivo, zato imunoterapije, ki vplivajo na infiltracijo specifičnih imunskih celic v tumorje dobivajo vedno več pozornosti (1). Eden izmed potencialnih pristopov v imunoterapiji raka je tako genska terapija, ki z namenom povečanja infiltracije efektorskih imunskih celic v tumorsko mikrookolje izkorišča kemokine. Kemokini so majhni signalni proteini (~10 kDa) iz družine citokinov, njihova glavna funkcija pa je uravnavanje migracije različnih celic, vključno imunskih celic, vzdolž kemokinskega gradienta (2). Izmed vnetnih kemokinov, ki lahko sprožijo imunski odziv sta kemokina CCL5 in CCL17 v literaturi povezana s povečano infiltracijo citotoksičnih (CD8+) T limfocitov v tumorsko tkivo (3, 4). Povečana infiltracija imunskih celic v tumor pa sama po sebi ne vodi vedno v aktivacijo imunskega odziva in posledično protitumorskega učinka (5). Genska terapija s kemokinoma je zato lahko učinkovita le v kombinaciji s terapijo, ki aktivira imunski odziv. Ena izmed terapij pri kateri zaradi njenega delovanja pride do sproščanja vnetnih citokinov in drugih signalnih molekul, ki vodijo v aktivacijo imunskih celic je radioterapija. Poleg tega se radioterapija v kombinaciji z imunoterapijami inhibitorjev kontrolnih točk zaradi potencialnih sinergističnih učinkov že uporablja v klinični praksi (6). Kombinacija genskega elektroprenosa (GET) plazmidne DNA z zapisom za kemokina CCL5 in CCL17 in radioterapije bi torej lahko privabila imunske celice v tumorje, kjer bi se potem aktivirale zaradi delovanja radioterapije. Na tak način bi lahko aktivirali imunski sistem, ter s tem povečali protitumorsko učinkovitost v primerjavi s samostojnima terapijama.

Materiali in metode

V *in vitro* delu raziskave smo z uporabo reagenta Lipofectamine 2000 (TF) transfecirali dve mišji celični liniji raka dojke 4T1 in E0771, ter dve mišji celični liniji raka debelega črevesja, CT26 in MC38 s komercialno dostopnimi plazmidi pUNO1 (kontrolni plazmid (pDNA Ctrl) in plazmida z zapisom za CCL5 in CCL17). Po 48 h smo določili viabilnost celic s testom PrestoBlue, izražanje 11 vnetnih citokinov pa z metodo kvantitativni PCR v realnem času (qRT-PCR). V *in vivo* poskusih smo se osredotočili na tumorska modela 4T1 in CT26, ki se razlikujeta v imunskem statusu, oba pa rasteta na mišjem singenskem sevu Balb/c. Ko so tumorji preseglj volumen 50 mm³ smo izvedli terapijo z intratumorskim injiciranjem 25 ali 50 µg plazmidne DNA, po 5 min pa je sledil genski elektroprenos (GET), pri katerem smo tumorjem z uporabo 6 mm ploščatih elektrod aplicirali električne pulze. V primeru kombinirane terapije smo tumorje po GET obsevali z enkratno (10 Gy) ali frakcionirano dozo (3 × 5 Gy). Miši smo evtanizirali, ko je volumen tumorjev dosegel 500 mm³. Rast tumorjev smo trikrat tedensko merili s kljunastim merilom (Caliper), izražanje 9 vnetnih citokinov tretji in sedmi dan po terapiji pa smo določili z metodo qRT-PCR. Vse raziskave so potekale v skladu z navodili in dovoljenjem Ministrstva za kmetijstvo, gozdarstvo in prehrano Republike Slovenije (št. dovoljenja: U34401-1/2015/43).

Rezultati

Viabilnost vseh celičnih linij je bila po 48 h od lipofekcije nad 80 %. Analiza izražanja genov 11 citokinov 48 h po lipofekciji celic je pokazala značilno višje izražanje kemokinov CCL5, CCL17 ter s tem uspešno transfekcijo, hkrati pa tudi povišano raven izražanja IL-6 in CXCL10. Genska terapija z GET po intratumorskim injiciranjem plazmidne DNA z zapisom za CCL5 ali CCL17 v tumorje CT26 in 4T1 je privedla do majhnega zaostanka v rasti tumorjev. Analiza 7 citokinov v tumorjih tretji in sedmi dan po GET je pokazala povečano izražanje obeh kemokinov, ter v tumorjih CT26 tudi povišano raven izražanja vnetnih citokinov IL-6, IL-12, CXCL9 in IFN γ . Spremenjeno izražanje citokinov *in vitro* in *in vivo* je tako značilno za vnetje. Genska terapija kemokinov CCL5 in CCL17 v kombinaciji z enkratnim in frakcioniranim obsevanjem na mišjih tumorjih CT26 vodi v značilno višji zaostanek v rasti tumorjev in v nekaterih primerih celo do popolnih odgovorov. Kombinirana terapija ni imela značilnega vpliva na rast tumorjev 4T1, poleg tega pa pri zdravljenju ni prišlo do popolnih odgovorov. Glede na rezultate sprememb v tumorskem mikrookolju kot posledica terapije bodo nadaljnji poskusi usmerjeni k določevanju mehanizmov imunskega odziva in optimalnega časovnega okna v primeru kombinacije obsevanja in GET plazmidne DNA z zapisom za kemokina CCL5 in CCL17.

Razprava

Raziskava je pokazala, da z lipofekcijo dosežemo visoko izražanje kemokinov CCL5 in CCL17 v vseh štirih celičnih linijah ter spremenjeno izražanje vnetnih citokinov. Enake spremembe so bile opažene tudi po lipofekciji s kontrolnim plazmidom, kar nakazuje, da so spremembe v izražanju posledica vnosa tuje DNA v citoplazmo. Rezultati *in vivo* dela študije kažejo, da lahko z uporabo standardnega pulznega protokola, ki se uporablja v kliniki pri elektrokemoterapiji, dosežemo visoko izražanje vnesenih transgenov

(CCL5 in CCL17), pri tem pa tudi CXCL9 in IFN γ , dveh ključnih aktivatorjev imunskega odziva. Kljub temu GET kemokinov CCL5 in CCL17 vodi do popolnih odgovorov le v kombinaciji z obsevanjem v primeru tumorskega modela CT26.

Zahvala

Raziskava je bila izvedena v okviru Agencije za raziskovalno dejavnost Republike Slovenije (ARRS) in raziskovalnih programov J3-8202 in P3-0003. Sredstva so bila financirana s strani Republike Slovenije in Evropskega sklada za regionalni razvoj v okviru projekta SmartGene.Si.

Literatura

1. Bruni D, Angell HK, Galon J. The immune contexture and immunoscore in cancer prognosis and therapeutic efficacy. *Nat Rev Cancer* 2020; 20(11): 662-680.
2. Chen K, Bao Z, Tang P, et al. Chemokines in homeostasis and diseases. *Cell Mol Immunol* 2018; 15(4): 324-34.
3. Dangaj D, Bruand M, Grimm AJ, et al. Cooperation between constitutive and inducible chemokines enables T cell engraftment and immune attack in solid tumors. *Cancer Cell* 2019; 35(6): 885-900.e10.
4. Semmling V, Lukacs-Kornek V, Thaiss CA, et al. Alternative cross-priming through CCL17-CCR4-mediated attraction of CTLs toward NKT cell-licensed DCs. *Nat Immunol* 2010; 11(4): 313-20.
5. Anandappa AJ, Wu CJ, Ott PA. Directing Traffic: How to effectively drive T cells into tumors. *Cancer Discov* 2020; 10(2): 185-97.
6. Thangamathesvaran L, Shah R, Verma R, et al. Immune checkpoint inhibitors and radiotherapy-concept and review of current literature. *Ann Transl Med* 2018; 6(8): 155.

