

Wydział Lekarski  
Uniwersytetu Medycznego w Łodzi

*mgr Dominika Piasecka*

# **Wpływ czynników prozapalnych mikrośrodowiska guza na indukcję fenotypu inwazyjnego komórek nabłonkowych gruczołu piersiowego**

Praca przedstawiona Radzie Dyscypliny Nauk Medycznych Uniwersytetu Medycznego w Łodzi celem uzyskania stopnia doktora nauk medycznych

Promotor: dr hab. n. med. Hanna Romańska-Knight, prof. UMED Łódź  
Zakład Patologii Katedry Onkologii Uniwersytetu Medycznego w Łodzi

Praca finansowana z projektów badawczych:

grant OPUS Narodowego Centrum Nauki nr 2013/09/NZ4/02512

grant PRELUDIUM Narodowego Centrum Nauki nr 2018/29/N/NZ3/02407

**Łódź 2020**

## STRESZCZENIE

### 1. Wstęp

Mechanizmy molekularne leżące u podstaw progresji przewodowych raków piersi *in situ* (ang. ductal carcinoma *in situ*, DCIS) do nowotworów inwazyjnych pozostają wciąż niewyjaśnione. Ponieważ ewolucja do fenotypów bardziej złośliwych tj. inwazyjnych raków przewodowych (ang. invasive ductal carcinoma, IDC) związana jest w dużym procencie przypadków z utratą receptora ludzkiego naskórkowego czynnika wzrostu 2 (ang. human epidermal growth factor 2, HER2) (ok. 30-50% DCIS HER2-dodatnich vs 15-25% IDC HER2-dodatnich), uważa się, że dominacja proliferacyjna HER2-ujemnego klonu komórek guza może stanowić jeden z kluczowych mechanizmów progresji DCIS→IDC. Proces ten może być indukowany przez bodźce z mikrośrodowiska guza, w szczególności te o charakterze prozapalnym. Obecne w mikrośrodowisku komórki układu immunologicznego, wydzielające duże ilości czynników wzrostu, chemokin czy cytokin, w tym również cytokin prozapalnych np. interleukiny-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), interleukiny-6 (IL-6) czy czynnika martwicy nowotworów- $\alpha$  (ang. tumour necrosis factor  $\alpha$ , TNF- $\alpha$ ), są głównymi mediatorami stanu zapalnego związanego z procesem transformacji nowotworowej. Co ciekawe, badania prowadzone na liniach komórkowych raka płuc i potrójnie ujemnych (ER-/PR-/HER2-) raków piersi wskazują, że sygnalizacja inicjowana przez IL-1 $\beta$  i TNF- $\alpha$  integruje ścieżkę prozapalną z onkogeną poprzez aktywację osi NF- $\kappa$ B/COX2 (cyklooksyzgenaza2)→HIF1- $\alpha$  (czynnik indukowany hipoksją 1- $\alpha$ ), co prowadzi do progresji choroby nowotworowej.

### 2. Cel pracy

Mając na uwadze powyższe dane literaturowe, w prezentowanym projekcie doktorskim postawiono hipotezę, że wpływ środowiska prozapalnego na ewolucję DCIS jest zależny od statusu receptora HER2 poprzez indukowanie dominacji proliferacyjnej i inwazji HER2-ujemnych klonów komórek. Jako główne cele pracy, pozwalające na jej weryfikację, przyjęto: 1) ocenę zaangażowania HER2 w odpowiedzi komórek DCIS na bodźce środowiska prozapalnego, 2) ocenę roli szlaku sygnałowego NF- $\kappa$ B/COX2→HIF1- $\alpha$  w promowaniu dominacji proliferacyjnej i indukcji fenotypu inwazyjnego komórek DCIS w odpowiedzi na stymulację prozapalną, 3) weryfikację wyników z modelu *in vitro* w materiale tkankowym od chorych z DCIS – ocenę nacieku złożonego z komórek układu immunologicznego w odniesieniu do danych kliniko-patologicznych i czynników rokowniczych.

### 3. Materiały i metody

Model badawczy w realizowanym projekcie doktorskim stanowiły następujące linie komórkowe: i) HB2 i ii) MCF10A – ludzkie, nieinwazyjne linie komórek gruczołu piersiowego (HER2-ujemne), powszechnie przyjęte jako model DCIS oraz ich warianty z nadekspresją HER2, oraz iii) THP-1- ludzka linia monocytów, którą różnicuje się do makrofagów klasy M1 i M2 (wydzielających „naturalne” cytokiny). Komórki DCIS stymulowano oczyszczanymi cytokinami (IL-1 $\beta$  i TNF- $\alpha$ ) oraz kondycjonowaną pożywką makrofagów klasy M1 stanowiącą bogate źródło „naturalnych” cytokin. W badaniach *in vitro* wykorzystano podstawowe techniki biologii molekularnej, komórkowej oraz biochemii, takie jak: elektroforeza SDS-PAGE, Western blotting, immunobarwienie, mikroskopia fluorescencyjna (Zeiss AxioVision 200) i konfokalna (Leica TSC LSI), hodowle 2D, hodowle 3D oraz testy inwazji w komorze Boydena. Analiza materiału klinicznego, który stanowiły próbki tkanki raka piersi przewodowego *in situ* (N=75, bez amplifikacji HER2 i komponentu inwazyjnego) obejmowała ocenę ilościową i jakościową nacieku z komórek układu immunologicznego (subpopulacji limfocytów T (CD4-dodatnich, CD8-dodatnich, FOXP3-dodatnich) i subpopulacji makrofagów (CD68-dodatnich, CD163-dodatnich)) oraz ocenę immunohistochemiczną ekspresji HER2, CK5/6, CAIX w kontekście podstawowych cech kliniko-patologicznych i cech rokowniczych.

#### 4. Wyniki

Uzyskane wyniki badań wykazały, że stymulacja zarówno IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , jak i kondycjonowaną pożywką makrofagów prowadziła do indukcji proliferacji, wzrostu (w hodowlach trójwymiarowych) i inwazji komórek typu dzikiego oraz inhibicji proliferacji komórek z nadekspresją receptora HER2. Ko-hodowle, w których komórki HER2-ujemne wysiewane były razem z komórkami HER2-dodatnimi w środowisku 3D w stosunku 1:1 lub w formie wcześniej formowanych agregatów, pokazały, że stymulacja cytokinami prozapalnymi prowadzi do dominacji proliferacyjnej komórek HER2-ujemnych. Z kolei testy inwazji w komorze Boydena potwierdziły, że środowisko prozapalne wpływa na indukcję inwazji zależnie od statusu receptora HER2, którą zaobserwowano tylko w przypadku komórek HER2-ujemnych. Kolejny etap realizowanego projektu potwierdził, że u podstaw HER2-zależnej odpowiedzi komórek DCIS na środowisko prozapalne leży aktywacja ścieżki sygnalizacyjnej NF- $\kappa$ B/COX2  $\rightarrow$  HIF1 $\alpha$ . Analiza Western blot wykazała, że traktowanie komórek cytokinami prozapalnymi prowadziło do aktywacji NF- $\kappa$ Bp65 w miejscu Ser536 oraz przyrostu poziomu białek COX2 i HIF1- $\alpha$  wyłącznie w komórkach HER2-ujemnych DCIS. Specyficzność obserwowanych zależności potwierdzono stosując następujące inhibitory: lapatinib (inhibitor aktywności HER2 i EGFR), magnolol (inhibitor aktywności NF- $\kappa$ B) i

celecoxib (inhibitor aktywności COX2). Analiza nacieku z komórek układu immunologicznego wykazała, że niższy stopień zróżnicowania komórek DCIS (ang. high grade) wiązał się z wyższym odsetkiem TIICs (ang. tumour-infiltrating inflammatory cells) i z większą liczbą CD4-dodatnich TILs (ang. tumour-infiltrating lymphocytes) co dało podstawy dla dalszej oceny materiału przez współpracujących w projekcie patologów. Analizy te wykazały, że u 9% pacjentów z podgrupy z HER2-ujemnym DCIS występują skupiska komórek nowotworowych (tzw. „hot-spoty”) o bardziej agresywnych cechach morfologicznych i fenotypowych (w stosunku do innych obszarów tego samego guza), do których przylegają gęste gniazda komórek układu immunologicznego zdominowane przez populacje CD4-dodatnich leukocytów i CD68-dodatnich makrofagów mikrośrodowiska guza. Co ważne, komórki te wykazywały również ekspresję anhidrazy węglanowej IX (CAIX), uważanej za marker aktywności HIF1- $\alpha$  w komórce.

## 5. Wnioski

Podsumowując, uzyskane wyniki badań *in vitro* po raz pierwszy pokazują, że środowisko prozapalne aktywuje szlak NF- $\kappa$ B/COX2  $\rightarrow$  HIF1- $\alpha$  zależnie od statusu receptora HER2, co z kolei prowadzi do dominacji proliferacyjnej i indukcji inwazji HER2-ujemnych komórek DCIS. Wyniki badań realizowanego projektu doktorskiego sugerują, że prozapalne mikrośrodowisko guza może być czynnikiem selekcyjnym prowadzącym do HER2-zależnej ewolucji DCIS, poprzez promowanie dominacji proliferacyjnej i inwazji komórek HER2-ujemnych. Uzyskane wyniki podkreślają również znaczenie kliniczne heterogenności DCIS oraz sugerują, że w wybranych podtypach DCIS HIF1- $\alpha$  może mieć istotne znaczenie jako marker predykcyjny progresji choroby.

## ABSTRACT

### 1. Background

The molecular mechanisms underlying invasive progression of ductal carcinoma *in situ* (DCIS) are still poorly understood. As evolution to invasive phenotype of breast cancer (BCa) i.e. invasive ductal carcinoma (IDC) is associated with loss of HER2 expression (approximately 30-50% of DCIS HER2+ vs 15-25% of IDC HER2+), it has been proposed that DCIS→IDC development involves emergence of the proliferative dominance of HER2-negative subclones existing within the tumour. This might be induced by stimuli derived from the tumour microenvironment, and in particular, lesions rich in inflammatory infiltrates. Infiltrating immune cells, the orchestrators of tumour-associated inflammation, secrete cytokines, chemokines and growth factors. These comprise main pro-inflammatory cytokines such as interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), interleukin-6 (IL-6) and tumour necrosis factor  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ). Interestingly, the evidence provided by recent studies carried out in lung cancer and triple-negative (ER-/PR-/HER2-) BCa cell lines indicates that IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  might be a link between inflammatory and oncogenic pathways via activation of the NF- $\kappa$ B/COX2→HIF1- $\alpha$  axis which contributes to the evolution of the disease.

### 2. Aim of the study

Based on the existing evidence it has been postulated that inflammatory stimuli mediate the response of DCIS cells in a HER2-dependent manner via induction of proliferative dominance and invasiveness of HER2-negative DCIS cells. The aims of the project were, therefore: i) to analyse a relationship between the HER2 status and response of DCIS cells to inflammatory stimulation, and ii) to assess an involvement of the NF- $\kappa$ B/COX2→HIF1- $\alpha$  axis in the proliferative dominance and invasiveness of DCIS cells stimulated with inflammatory cytokines and iii) to verify obtained *in vitro* results in clinical material from patients with DCIS by quantitative and qualitative evaluation of inflammatory infiltrate in relation to clinicopathological features and, in particular, the HER2 status.

### 3. Material and methods

The study was carried out in two *in vitro* systems, where DCIS cells were stimulated with: 1) soluble synthetic cytokines (IL-1 $\beta$  or TNF- $\alpha$ ), and 2) conditioned medium from human macrophages (the equivalent of an indirect co-culture system). The following cell lines were used: i) HB2 and ii) MCF10A – human non-invasive epithelial BCa cell lines (HER2-negative), commonly used as a DCIS model and their HER2-overexpressing variants, and iii) THP-1 – human monocyte cell line. *In vitro* analyses were based on a number of cell biology and

biochemical techniques, e.g.: SDS-PAGE, Western Blotting, immunostaining, confocal and fluorescent microscopy, 2D- and 3D-cultures, 3D-co-cultures and invasion assays in Boyden chamber. Clinical studies were carried out in formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) tumour samples from patients with DCIS (n=75, without *ERBB2* amplification or invasive component). Evaluation of immune infiltrates in tumour stroma included a panel of markers enabling quantitative and qualitative analysis of subclasses of i) tumour-infiltrating lymphocytes (TILs): CD4, CD8 and FOXP3 and ii) tumour-infiltrating macrophages (TAMs): CD68 and CD163. DCIS tumours were phenotyped by IHC for: HER2, cytokeratin 5/6 and carbonic anhydrase IX (CAIX), as an indicator of HIF-1 $\alpha$  activity, and correlated to clinicopathological features.

#### 4. Results

Obtained results showed that in both cell lines, treatment with both IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  and macrophages-conditioned medium promoted growth of HER2-negative cells (parental), in contrast to the effect exerted on their HER2-positive counterparts. Co-cultures of wild-type cell lines with their HER2-positive variants embedded in Matrigel, as either pre-formed aggregates or single cells (1:1 ratio), confirmed that stimulation with both cytokines led to a significant increase and decrease of HER2-negative and HER2-positive colonies' size, respectively. Invasion assays in Boyden chamber showed that inflammatory stimulation, induced HER2-dependent cell invasion exclusively in HER2-negative DCIS cells. The next stage of the presented project revealed that activation of the NF- $\kappa$ B/COX2 $\rightarrow$ HIF1- $\alpha$  axis was responsible for HER2-dependent response of DCIS cells to inflammatory stimulations. Analyses by western blotting demonstrated that IL1 $\beta$ , TNF $\alpha$  and CM M1 stimulations caused activation of the NF- $\kappa$ B/COX2 $\rightarrow$ HIF1- $\alpha$  signalling pathway, which could be noticed only in HER2-negative cells. In HB2(HER2+) and MCF10A(HER2+) variants, NF- $\kappa$ B phosphorylation was barely seen or delayed in time and no increase in HIF1- $\alpha$  protein level could be detected. The specificity of the observed effects was assessed using the following inhibitors: lapatinib (EGFR and HER2 activity-inhibitor), magnolol (NF- $\kappa$ B activity inhibitor) and celecoxib (COX2 activity inhibitor). Evaluation of tumour-infiltrating immune cells (TIICs) in DCIS samples revealed that poor differentiation of the lesions (high nuclear grade) was associated with a higher percentage of TIICs and a higher number of CD4-positive TILs. Further histopathological analyses identified in 7 (9%) cases, which were almost exclusively in HER2-negative, tumoral foci of basal-like cells with more aggressive morphological and immunophenotypic features. The epithelial cells of these 'hot-spots', positive for cytokeratin 5/6 and CAIX, were tightly

adjacent to dense TIICs infiltration dominated by CD4-positive TILs and CD68-positive TAMs.

## 5. Conclusions

This study showed for the first time that response of DCIS cells to inflammatory stimuli mediated by NF- $\kappa$ B/COX2 $\rightarrow$ HIF1- $\alpha$  activation is HER2-dependent and lead to proliferative dominance and invasion of HER2-negative DCIS cells. The results suggest that the inflammatory microenvironment, as a possible bottleneck in promotion of proliferative dominance and invasion of more responsive tumour subclones, might contribute to DCIS evolution toward HER2-negative IDC. Moreover, these findings highlight the clinical value of the heterogeneity of DCIS lesions and indicate HIF1- $\alpha$  as a possible marker of disease progression in some DCIS subtypes.