

# J3-8196 - Medcelični prenos signalnega kompleksa z zunajceličnimi vezikli, ki se sproščajo iz celic, ki nosijo z WM-povezано mutacijo v MyD88

## Vodja projekta:

Dr. Mateja Manček Keber

## 1. VSEBINSKI OPIS PROJEKTA:

Prirojen imunski sistem ščiti pred patogenimi organizmi in endogeno škodo. Vendar je to dvorezen meč, kajti neustrezen vnetni odgovor lahko vodi do bolezni, kot so avtoimunske bolezni in celo rak. Tollu-podobni receptorji in receptor za interlevkin-1 so ključnega pomena v naravni imunosti in posredujejo svoj učinek preko adapterskega proteina MyD88. Po aktivaciji TLR in IL-1R se MyD88 veže na njune domene TIR in tvori velike komplekse z IRAK4 in IRAK2 kinazami, ki jih imenujemo midosomi. Pacienti, ki imajo izvorno okvarjen gen *MYD88*, preživijo do odrasle dobe samo na močni antibiotični terapiji. Po drugi strani so že odkrili somatske mutacije v *MYD88*, kjer protein pridobi aktivnost. Mutacije znotraj domene TIR (npr. MyD88 Leu265Pro – MyD88L265P) omogočijo njegovo spontano oligomerizacijo, kar vodi v konstitutivno aktivacijo vnetnih poti. Ta mutacija je pogosta pri različnih vrstah limfomov, predvsem pri DLBCL (diffused large B cell lymphoma), kronični limfocitni levkemiji in pri več kot 90% pacientov z WM (Waldenström macroglobulinemijo).

V zadnjem času so pokazali na pomembno vlogo zunajceličnih veziklov (extracellular vesicles - EVs; mikrovezikli in eksosomi) pri razvoju raka in komunikaciji z okoliškim tkivom. EV so membranski delci manjši od 1  $\mu\text{m}$ , ki jih najdemo v krvi in drugih telesnih tekočinah. Sproščajo se iz celic v različnih fizioloških pogojih, kot so aktivacija celic, rast ali stres. Količina EV se poveča pri pacientih s kroničnimi vnetnimi boleznimi, z rakom ali okužbami. EV vsebujejo komponente celic, kot so proteini ali RNA, npr. miRNA. Fuzija ali drugi načini vnosa v tarčno celico omogočajo intercelično komunikacijo. Njihova vloga pri raku je do sedaj bila opisana predvsem pri prenosu miRNA, čeprav lahko tudi proteini signalnih poti močno vplivajo na fenotip celic.

Aktivirane celice limfoma vplivajo na druge netransformirane celice v organizmu z izločanjem vnetnih citokinov. To lahko vpliva na razvoj raka po več poteh, preko supresije imunskega odgovora ali povečanega razmnoževanja rakastih celic. Predlagamo alternativni mehanizem preko EV. EV ne zajamejo naključne citosolne vsebine, ampak so obogateni zlasti v agregatih, ki so asociirani z membrano. Zato ker MyD88 tvori midosomske komplekse, ki so asociirani z membrano, predvidevamo, da bi se MyD88 lahko obogatil v EV. Proteomska analiza EV je pokazala, da EV vsebujejo tudi MyD88, zato predlagamo, da bi lahko ujeli MyD88L265P midosome.

V projektu predpostavljamo, da se signalni kompleks, ki vsebuje MyD88L265P lahko prenese iz aktiviranih celic preko EV na druge celice, kjer lahko sprožijo aktivacijo vnetne poti ter tako pospešijo vnetje in inducirajo preživetveni signal. Prenos komponent aktivnega signalnega kompleksa z EV predstavlja nov mehanizem medcelične komunikacije. Ta mehanizem naj bi bil najbolj pomemben za B celične limfome, kjer se mutiran konstitutivno aktiven MyD88L265P pogosto pojavlja in je sposoben celične aktivacije brez ligandov TLR. Projekt želi potrditi sposobnost midosoma, ki se prenese z EV, da aktivira signaliziranje ter prisotnost tega procesa v človeških primarnih rakastih celicah.

Prenos MyD88L265P na tarčne celice preko EV, kjer bi ta lahko deloval samostojno ali pa bi lahko bil nukleacijsko jedro za topen MyD88wt in s tem aktiviral imunski odziv neodvisno od celičnih receptorjev, bo naš dokaz principa delovanja. Poleg tega bomo z injiciranjem EV v kostni mozeg, kjer je glavna patologija bolezni WM, poskušali pokazati, da lahko konstitutivno aktivni MyD88, prenesen z EV, zagotavlja preživetveni signal, ki je potreben za razvoj raka in razmnoževanje B celic limfomov. Nenazadnje bo analiza EV iz pacientov pokazala, kako je na nivoju organizma.

### Sodelujoče organizacije:

- EN-FIST center odličnosti

### Osnovni podatki glede financiranja:

Projekt financira ARRS v okviru cenovne kategorije C za obdobje treh let v obsegu 2699 letnimi urami. Trajanje financiranja je 1.5.2017 - 30.4.2020.

### Sestava projektne skupine s povezavami na SICRIS

Na Kemijskem inštitutu v projektni skupini J3-8196 sodelujejo:

38163; Aupič Jana – <http://www.sicris.si/search/rsr.aspx?lang=slv&id=44051>  
14360; Mojca Benčina – <http://www.sicris.si/search/rsr.aspx?lang=slv&id=8380>  
38164; Thai Van Ha – <http://www.sicris.si/search/rsr.aspx?lang=slv&id=44052>  
21426; Mateja Manček Keber – <http://www.sicris.si/search/rsr.aspx?lang=slv&id=13349>  
28881; Karolina Ivičak Kocjan – <http://www.sicris.si/search/rsr.aspx?lang=slv&id=31432>  
34069; Duško Lainšček – <http://www.sicris.si/search/rsr.aspx?lang=slv&id=38518>  
06628; Roman Jerala – <http://www.sicris.si/search/rsr.aspx?lang=slv&id=5855>  
10412; Simon Horvat – <http://www.sicris.si/search/rsr.aspx?lang=slv&id=6972>  
34252; Tina Lebar – <http://www.sicris.si/search/rsr.aspx?lang=slv&id=38797>  
18675; Robert Bremšak – <http://www.sicris.si/search/rsr.aspx?lang=slv&id=10804>

## 2. faze projekta in njihova realizacija

*Projekt je razdeljen na šest delovnih sklopov, ki so:*

- Detekcija mutante MyD88L265P in drugih komponent miosoma (IRAK4, IRAK2) v EV (tudi ločeno v eksosomih in MV), izoliranih iz človeških celic, ki izražajo MyD88L265P in iz B celičnih limfomov.
- Po prenosu z EV pokazati aktivacijo MyD88L265P v različnih tarčnih celicah in primerjati aktivacijo v MyD88wt in MyD88 okvarjenih celicah. Testirali bomo tudi inhibicijo signaliziranja MyD88 z zdravilom ibrutinib (ki je bil pred kratkim potrjen za zdravljenje WM) in z MyD88 inhibirnimi peptidi.
- Raziskati mehanizem prenosa EV in prevzemanja njihove vsebine ter detektirati kolokalizacijo MyD88L265P po prenosu z EV z MyD88wt v tarčnih celicah s konfokalno fluorescentno mikroskopijo.
- Raziskati učinke na tarčne celice ter vpliv EV na mikro okolje tumorja.
- Raziskati učinke in onkogeni potencial EV z MyD88L265P v živalskem modelu z injiciranjem EV v kostni mozeg.
- Pokazati prisotnost MyD88L265P v EV, izoliranih iz kostnega mozga in krvi pacientov z WM, in pokazati potencial teh EV, da sprožijo signalizacijo v tarčnih celicah.

## 3. bibliografske reference, ki izhajajo neposredno iz izvajanja projekta

MANČEK KEBER, Mateja, LAINŠČEK, Duško, BENČINA, Mojca, CHEN, Jiaji G., ROMIH, Rok, HUNTER, Zachary R., TREON, Steven P., JERALA, Roman. Extracellular vesicle-mediated transfer of constitutively active MyD88<sup>L265P</sup> engages MyD88<sup>wt</sup> and activates signaling. *Blood*, 2018, 1-29. [link](https://doi.org/10.1182/blood-2017-09-805499), doi: [10.1182/blood-2017-09-805499](https://doi.org/10.1182/blood-2017-09-805499).

#### 4. logotip ARRS in drugih sofinancerjev



**arrs**

JAVNA AGENCIJA ZA RAZISKOVALNO DEJAVNOST  
REPUBLIKE SLOVENIJE