



PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

IDENTIFICACIÓN DE UNA FIRMA PIROPTOTICA RELACIONADA CON GASDERMINA B (GSDMB) COMO PREDICTOR DE RESPUESTA EN TUMORES DE MAMA HER2 (PIROPTTEST)

MEMORIA CIENTÍFICA

Equipo de Investigación:

- **Gema Moreno Bueno, PhD (PI)**
- Sara Oltra Sanchís, PhD
- David Sarrio López, PhD
- Laura García-Estévez, MD PhD
- Sara Colomo, Bsc
- Eva Díaz, Técnico de lab.

Organismo: Fundación MD Anderson Cancer Center

ANTECEDENTES Y OBJETIVOS:

La familia de proteínas gasderminas (GSDMs) ha adquirido relevancia en diversos contextos patológicos, incluido el cáncer. Dichas proteínas en humanos, seis miembros hasta el momento (GSDMA-E, PJVK), son consideradas como los efectores finales de un tipo de muerte lítica inflamatoria denominada piroptosis (1). Así, la inducción de esta muerte cursa con una morfología

celular muy característica, que implica su hinchazón y posterior lisis, produciendo la liberación de distintos componentes intracelulares que provocan una fuerte reacción inflamatoria. Según estudios, las GSDMs son los efectores finales de esta muerte, de ahí que la piroptosis sea conocida también como muerte celular mediada por gasderminas. Las GSDMs se caracterizan a nivel estructural por presentar dos regiones, un dominio amino (NT) y carboxilo terminal (CT), que interaccionan entre si mediante una región central conocida como bisagra o *linker* (2). En condiciones basales, estas proteínas se encuentran en una conformación cerrada e inactiva, en la que el dominio CT interacciona con el NT impidiendo su función lítica (2). Diversos estímulos y tratamientos antitumorales son capaces de promover que distintas proteasas corten la región *linker*, provocando la liberación de la región NT activa, que ahora es capaz de interaccionar con lípidos de la membrana plasmática y mitocondrial. Una vez en la membrana, esta región NT puede oligomerizar formando poros en la membrana que provocan el intercambio molecular y finalmente la muerte celular (2-5).

Autores han observado que la expresión diferencial de las GSDMs en cáncer; podría relacionarse con el potencial papel dual de piroptosis en este contexto. Así, tanto las GSDMs y por ende la piroptosis podrían tener un papel dual en la progresión tumoral y el tratamiento, pudiendo tanto promover la liberación de factores inflamatorios que estimulan la transformación de la célula normal en tumoral, como promover la muerte de la célula tumoral, pudiendo llegar a ser relevante en cáncer, dado que conseguir la activación de GSDMs intratumoralmente podría provocar una reducción del tumor, considerándose este como un nuevo abordaje terapéutico intrínseco.

En este contexto, nuestro grupo identificó a GSDMB como un nuevo biomarcador de mal pronóstico en cáncer de mama HER2+ (6-8). A nivel cromosómico, GSDMB se localiza cerca del receptor oncogénico HER2, y co-amplifica con este en alrededor del 60% de los tumores de mama HER2. De forma significativa, tras el estudio de más de 300 tumores de mama HER2, comprobamos que la alteración de GSDMB (amplificación génica/sobreexpresión de la proteína) se asocia a progresión tumoral y metástasis tanto en regímenes de adyuvancia como de neoadyuvancia, y a una limitada respuesta a la terapia antiHER2, de forma independiente de la expresión de los receptores hormonales (con una HR en más de 5 en OS y 3,87 en DFS) (8). Nuestros estudios se han centrado en el estudio de la proteína completa, pero datos adicionales del laboratorio nos han permitido identificar un papel diferencial de GSDMB en relación a piroptosis. De hecho, se han identificado 4 isoformas distintas de GSDMB (GSDMB1-4) que difieren en el número de exones, siendo la GSDMB-

3 completa y el resto varían en la presencia/ausencia de los exones alternativos 6 y 7 que forman la bisagra o linker de la proteína (ver **Figura 1**), que como se comentó anteriormente es esencial ya que es diana de las proteasas que activarían a GSDMB. En este sentido, GSDMB tendría un papel diferencial en la muerte por piroptosis que aún hoy no ha sido clarificado.

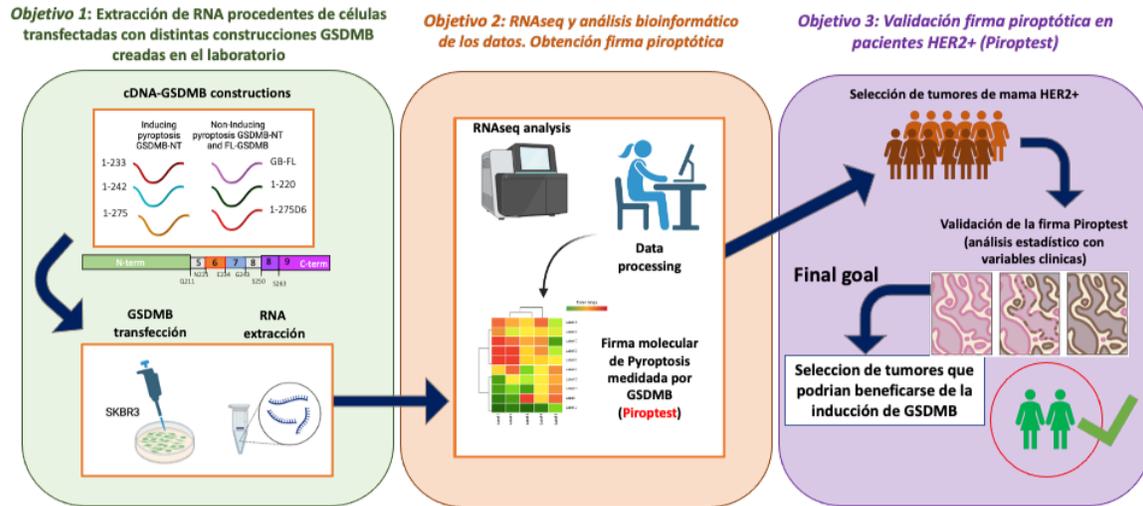
Partiendo de esta premisa, en el laboratorio hemos estado trabajando en la determinación del dominio funcional piroptótico de GSDMB; para ello se han creado distintas construcciones de la proteína truncada (diversos fragmentos que contienen el NT y la región bisagra), y hemos analizado su capacidad de inducir muerte por piroptosis, tanto en células no tumorales como en células de cáncer de mama y endometrio. Estos estudios han permitido identificar una región mínima NT con elevada toxicidad que corresponde con los primeros 233 aminoácidos de la GSDMB. A partir de estos datos, las regiones NT liberadas por las isoformas de GSDMB con ausencia de exón 6 (isoforma 1 y 2) serían incapaces de inducir muerte por piroptosis al contrario que las isoformas con exón 6 (isoforma 3 y 4) que sí lo harían. De forma relevante hemos observado que las diferentes isoformas de GSDMB tienen una expresión diferencial no solo a nivel tisular sino también en condiciones normales y patológicas. En este sentido poder dilucidar qué isoforma expresa cada tumor y qué otros genes ayudarían en la inducción de la piroptosis mediada por GSDMB podría ser considerada como una alternativa terapéutica en cáncer.

En conjunto, la presencia de GSDMB en tumores ofrece una nueva ventana de posibilidades ya que podría considerarse una diana terapéutica cuya activación intratumoral (liberación NT e inducción de la muerte por piroptosis) podría ser considerada como un nuevo tratamiento antitumoral que además no estaría asociado a toxicidad sistémica a diferencia de lo que ocurre con los tratamientos convencionales.

Con objeto de validar una posible firma molecular capaz de ayudar a predecir que tumores podrían beneficiarse del procesamiento/activación de GSDMB como nueva aproximación terapéutica planteamos los siguientes objetivos:

- Identificación, mediante RNAseq, de una firma molecular (**piroptest**) capaz de predecir el beneficio de inducir/activar GSDMB en líneas celulares de cáncer de mama HER2+.
- Validación de la firma identificada **Piroptest** en una serie de tumores HER2+ (n=100) y su estudio con diversas variables clínicas.

ESQUEMA DE TRABAJO (metodología y análisis):



PRESUPUESTO:

SERVICIOS	
-Análisis mediante RNAseq en líneas celulares, análisis estadístico y Validación mediante Proteómica	23.239,9 €
Overhead	4.648,0€
TOTAL	27.887,9 €

REFERENCIAS:

1. Sarrió D, Martínez-Val J, Molina-Crespo Á, Sánchez L, Moreno-Bueno G. The multifaceted roles of gasdermins in cancer biology and oncologic therapies. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer*. 2021;1876(2):188635.
2. Ding J, Wang K, Liu W, She Y, Sun Q, Shi J, et al. Pore-forming activity and structural autoinhibition of the gasdermin family. *Nature*. 2016;535(7610):111-6.
3. Aglietti RA, Estevez A, Gupta A, Ramirez MG, Liu PS, Kayagaki N, et al. GsdmD p30 elicited by caspase-11 during pyroptosis forms pores in membranes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2016;113(28):7858-63.

4. Chen X, He WT, Hu L, Li J, Fang Y, Wang X, et al. Pyroptosis is driven by non-selective gasdermin-D pore and its morphology is different from MLKL channel-mediated necroptosis. *Cell Res.* 2016;26(9):1007-20.
5. Sborgi L, Rühl S, Mulvihill E, Pipercevic J, Heilig R, Stahlberg H, et al. GSDMD membrane pore formation constitutes the mechanism of pyroptotic cell death. *EMBO J.* 2016;35(16):1766-78.
6. Hergueta-Redondo M, Sarrió D, Molina-Crespo Á, Megias D, Mota A, Rojo-Sebastian A, et al. Gasdermin-B promotes invasion and metastasis in breast cancer cells. *PLoS One.* 2014;9(3):e90099.
7. Molina-Crespo Á, Cadete A, Sarrio D, Gámez-Chiachio M, Martinez L, Chao K, et al. Intracellular Delivery of an Antibody Targeting Gasdermin-B Reduces HER2 Breast Cancer Aggressiveness. *Clin Cancer Res.* 2019;25(15):4846-58.
8. Hergueta-Redondo M, Sarrio D, Molina-Crespo Á, Vicario R, Bernadó-Morales C, Martínez L, et al. Gasdermin B expression predicts poor clinical outcome in HER2-positive breast cancer. *Oncotarget.* 2016;7(35):56295-308.