

Abschlussbericht

Exploring the melanoma transcriptional landscape by spatial transcriptomics

Dr. Xiaobo Liu und PD Dr. Christian Gorzelanny

Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Venerologie, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf

In den letzten Jahren hat der Einsatz moderner Immuntherapien, wie z.B. der Inhibition der sogenannten Immuncheckpoints, die Therapie des Melanoms revolutioniert. Allerdings profitieren nur ca. 50% der Patienten und eine verbesserte Ansprechrate ist gegenwärtig Gegenstand der aktuellen Forschung [1]. Eine wichtige Voraussetzung für den Erfolg der Immuntherapien ist die Infiltration von zytotoxischen Immunzellen in den Tumor und die damit verbundene Elimination der Krebszellen. Verhindert ein immunsuppressives Tumormikromilieu die Infiltration der Immunzellen ist das Therapieansprechen reduziert [2]. In unseren früheren Arbeiten konnten wir zeigen, dass das Tumormikromilieu und die Infiltration von Immunzellen in den Tumor durch das vaskuläre Endothel im Tumorgewebe maßgeblich reguliert wird [3, 4, 5]. Insbesondere scheint die Zahl der funktionellen Blutgefäße im Tumor unmittelbar mit der Menge an tumorinfiltrierenden Immunzellen einherzugehen. Die Bildung von Blutgefäßen in Tumoren ist ein zweischneidiges Schwert, da die Versorgung des Tumors mit Sauerstoff und Nährstoffen eine wichtige Voraussetzung für das Tumorwachstum darstellt, es aber auch die Infiltration von tumorsupprimierenden Immunzellen ermöglicht [6].

Zum besseren Verständnis der agierenden molekularen Mechanismen analysierten wir repräsentative Gewebeschnitte des Melanoms mittels räumlicher Transkriptomik. Die analysierten Gewebe unterschieden sich deutlich in der Zahl der infiltrierten Immunzellen, wie immunhistologische Analysen zeigten. Die im Folgenden als Referenztumore bezeichneten Gewebe waren durch eine sehr geringe Zahl von infiltrierten Immunzellen charakterisiert (neutrophile Granulozyten: $9 \pm 1,2 \text{ mm}^{-2}$; tumorassoziierte Makrophagen: $63 \pm 4,7 \text{ mm}^{-2}$; zytotoxische T-Zellen: $10 \pm 1,3 \text{ mm}^{-2}$). Die Vergleichstumore zeichneten sich durch eine signifikant erhöhte Zahl von Immunzellen aus (neutrophile Granulozyten; $21 \pm 4,9 \text{ mm}^{-2}$; tumorassoziierte Makrophagen: $141 \pm 16,7 \text{ mm}^{-2}$; zytotoxische T-Zellen: $94 \pm 14,2 \text{ mm}^{-2}$). Im Einklang mit unseren früheren Daten zeigte sich auch eine klare Korrelation zwischen der Zahl der infiltrierten Zellen und der Menge der funktionellen Blutgefäße. Die Transkriptomanalyse untermauerte die histologischen Ergebnisse. Eine detailliertere Analyse der infiltrierten T-Zellen zeigt zudem, dass die Zahl der zytotoxischen T-Zellen in den Vergleichstumoren höher war; die Zahl der regulatorischen und der erschöpften T-Zellen unterschieden sich nicht signifikant zwischen den Referenz- und Vergleichstumoren. Frühere Arbeiten haben gezeigt, dass das Chemokine *chemokine (C-X-C motif) ligand 9* (CXCL9) einen wesentlichen Beitrag bei der Infiltration von Immunzellen in Tumore spielt [2]. Im Einklang damit fanden wir in Clustern mit einer immunzellassozierten Gensignatur ebenfalls eine vermehrte Expression des CXCL9. Auffällig und entgegen unseren Erwartungen fanden sich keine signifikanten Unterschiede bei der Expression proangiogenen Faktoren wie dem *vascular endothelial growth factor-A* (VEGFA) oder dem *fibroblast growth factor 2* (FGF2). Dies deutet daraufhin, dass die Regulation der Blutgefäßneubildung in den Tumoren nicht wesentlich auf eine transkriptionelle

Regulation proangiogener Faktoren zurückzuführen ist. Es ist bekannt, dass die Bildung neuer Blutgefäße auch unabhängig von der transkriptionellen Regulation kontrolliert werden kann. Wichtig ist dabei insbesondere der Gradient aus proangiogenen Faktoren im Gewebe, der das Einwandern von Endothelzellen aus peritumoralen Blutgefäßen steuert. Dieser Gradient basiert auf unterschiedlichen Heparansulfaten, die z.B. das FGF-2 im Gewebe präsentieren und dem Endothel zugänglich machen. Das Heparansulfat ist ein Vielfachzucker, der zur Familie der Glykosaminoglykanen gehört und der aus den alternierend angeordneten Bausteinen N-Acetylglucosamin und Glucuronsäure, die im Verlauf der Heparansulfatsynthese an unterschiedlichen Positionen sulfatiert werden können, besteht. Die Synthese des Heparansulfats involviert die Katalyse von mehr als 20 Enzymen. Im Vergleich zu anderen Biopolymeren wie der DNA oder Proteinen, ist die Synthese des Heparansulfats nicht Template-basiert. Aus diesem Grund ist die Struktur des Heparansulfats sehr heterogen und kann sich innerhalb eines Gewebes beträchtlich unterscheiden. Die Transkriptomanalyse weist daraufhin, dass in Bereichen mit einer erhöhten Zahl von Blutgefäßen und einer entsprechen hohen Infiltrationsrate von Immunzellen, die Expression des an der Heparansulfat-Synthese beteiligten Enzymes *Heparan Sulfate-Glucosamine 3-Sulfotransferase 1 (HS3ST1)* signifikant reduziert war. Das HS3ST1 katalysiert im Rahmen der Heparansulfatsynthese die Sulfatierung des N-Acetylglucosamins und aktuelle Daten deuten darauf hin, dass diese Sulfatierung die Wechselwirkung von Proteinen wie dem FGF2 und dem Heparansulfat entscheidend reguliert [7]. In weiterführenden Arbeiten untersuchen wir gegenwärtig inwiefern das HS3ST1 die Struktur des tumoralen Heparansulfats verändert und wie diese Veränderungen die Funktion von Proteinen im Tumormikromilieu beeinflussen kann. Neben dem bereits erwähnten Einfluss auf proangiogene Faktoren, untersuchen wir ebenfalls die Wechselwirkung des Heparansulfats mit Chemokinen wie dem CXCL9.

Literatur

1. Dobry et al. Management of metastatic melanoma: improved survival in a national cohort following the approvals of checkpoint blockade immunotherapies and targeted therapies. **Cancer Immunol Immunother.** 2018
2. House et al. Macrophage-Derived CXCL9 and CXCL10 Are Required for Antitumor Immune Responses Following Immune Checkpoint Blockade. **Clin Cancer Res.** 2020
3. Kalagara et al. The endothelial glycocalyx anchors von Willebrand factor fibers to the vascular endothelium. **Blood Adv.** 2018
4. Yang et al. Nuclear heparanase-1 activity suppresses melanoma progression via its DNA-binding affinity. **Oncogene.** 2015
5. Liu et al. Neutrophils activated by membrane attack complexes increase the permeability of melanoma blood vessels. **Proc Natl Acad Sci U S A.** 2022
6. Song et al. Anti-angiogenic Agents in Combination With Immune Checkpoint Inhibitors: A Promising Strategy for Cancer Treatment. **Front Immunol.** 2020
7. Chopra et al. The 3- O-sulfation of heparan sulfate modulates protein binding and lyase degradation. **Proc Natl Acad Sci U S A.** 2021