

Tillmann Justus Heinrich Pompecki  
Dr. med.

## **The Interaction Between Retinoic Acid Signalling and Kallikrein-Related Peptidase 6 in the Pathogenesis of Head and Neck Squamous Cell Carcinoma**

Fach/Einrichtung: Hals-Nasen-Ohrenheilkunde  
Doktorvater: Prof. Dr.rer.nat. Jochen Hess

In Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereiches wurden sowohl ein niedriger Retinsäurestoffwechsel, als auch geringe KLK6-Expression mit der Ausbildung eines mesenchymalen Phänotyps, erhöhter Proliferationsrate, Resistenz gegenüber Strahlentherapie und einer schlechteren Prognose in Verbindung gebracht. Unveröffentlichte Transkriptomanalysen von FaDu-Zellen mit unterdrückter KLK6-Expression deuteten auf einen verminderten Retinsäurestoffwechsel in diesen Zellen hin. Zielsetzung dieser Arbeit war es, eine Verbindung zwischen KLK6 und dem Retinsäurestoffwechsel-Signalweg zu untersuchen, sowie dessen funktionelle Relevanz zu beleuchten.

Die Haupthypothese dieser Arbeit besagt, dass zwischen KLK6 und ALDH1A3, einem Schlüsselenzym der Retinsäuresynthese, ein bilateraler positiver Rückkopplungsmechanismus auf Transkriptionsebene existiert. In Zellkulturexperimenten konnte mittels quantitativer Echtzeit-PCR-Analyse beobachtet werden, dass eine mittels small-hairpin RNA unterdrückte KLK6-Expression in FaDu-Zellen (FaDu-shKLK6) die Transkription von ALDH1A3 signifikant reduzierte. Im Gegenzug führte eine Hemmung der Retinsäuresynthese bzw. der nukleären Retinsäure-Rezeptoren zur reduzierten KLK6-, sowie ALDH1A3-Genexpression. Zudem zeigten Cal27-Zellen, welche eine niedrige endogene Expression von KLK6 sowie eine niedrige Aktivität des Retinsäure-Signalwegs aufweisen, eine signifikante Steigerung der KLK6-Genexpression nach Behandlung mit Retinsäurederivaten. In-silico-Analysen einer öffentlichen Gendatenbank von Patienten mit Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereiches zeigten, dass eine Gruppe von KLK-Proteasen (KLK5-14) positiv mit einer Subgruppe an Enzymen des Retinsäurestoffwechsels korrelierte. Insgesamt bestätigen diese Ergebnisse die postulierte Hypothese, wobei die verantwortlichen Signalwege unklar bleiben. In vorhergehenden Arbeiten wurde RAR $\beta$ - /RAR $\gamma$ -, PPAR- und  $\Delta$ Np63-abhängige Induktion von KLK6 beschrieben, welche somit mögliche Wege des Retinsäure-Signalwegs darstellen, die KLK6-Expression zu beeinflussen. Umgekehrt bleiben die Mechanismen der Regulation von ALDH1A3 durch KLK6 spekulativ und bedürfen weiterer Forschung.

Um die biologische Relevanz dieser Ergebnisse zu untersuchen, wurden die Auswirkung eines gehemmten Retinsäurestoffwechsels sowie einer unterdrückten KLK6-Expression in FaDu-Zellen auf den zellulären Phänotyp mittels Durchlichtmikroskopie und Immunofluoreszenz-Färbungen von Vimentin, dem Aktin-Zytoskelett und einer DNA-Färbung zur Darstellung der Zellkernmorphologie untersucht. Die zweite Hypothese dieser Arbeit nimmt an, dass der mesenchymale Phänotyp in FaDu-shKLK6-Klonen durch einen beeinträchtigten Retinsäurestoffwechsel vermittelt wird. Im Einklang mit vorhergehenden Arbeiten verursachte die Reduktion des Retinsäurestoffwechsels in FaDu-Zellen einen mesenchymalen Phänotyp mit verminderten Zell-Zell-Kontakten und weniger definierten Grenzen der Zellkolonien. In FaDu-shKLK6-Klonen ließ sich ebenfalls ein mesenchymaler Phänotyp einhergehend mit Vimentin-Expression, reduzierter Größe von Zellen und Nuclei und Bildung von Aktin-Stressfasern beobachten. Durch Behandlung der Zellen mit Retinsäurederivaten konnten diese Veränderungen teilweise rückgängig gemacht werden. Diese Ergebnisse unterstützen die Hypothese, dass ein reduzierter Retinsäurestoffwechsel den mesenchymalen Phänotyp von FaDu-shKLK6-Klonen vermittelt. Hiervon ausgehend sollte das Potential von KLK6 und

ALDH1A3 als Biomarker für ein Ansprechen auf eine Therapie mit Retinsäure in Patienten mit Kopf-Hals-Plattenepithelkarzinomen untersucht werden.

Induktion der PD-L1-Expression durch epithelial-zu-mesenchymale Transition wurde für diverse Tumoren beschrieben. Die dritte Hypothese dieser Arbeit besagt, dass der mesenchymale Phänotyp von FaDu-shKLK6-Klonen mit einer PD-L1-Induktion einhergeht. Mittels Western Blot und Immunfluoreszenz-Färbungen konnte in dieser Arbeit eine Stabilisierung membranöser PD-L1- Proteinexpression in FaDu-shKLK6 beobachtet werden. Hierbei zeigte sich keine Änderung der Transkription von CD274, dem PD-L1-codierenden Gen, was eine Regulation auf post-transkriptioneller Ebene impliziert. Diese Beobachtungen waren jedoch kontextabhängig und in-vitro-Analysen der o.g. Patientenkohorte erbrachten keine Korrelationen zwischen KLK6 und CD274, bzw. PD-L1. Hierüber hinaus führte fraktionierte Bestrahlung verschiedener Zelllinien von Kopf-Hals-Plattenepithelkarzinomen zu einer Induktion von PD-L1 im entgegengesetzten Muster zum KLK6- Expressionsniveau. Obgleich die zugrunde liegenden Regulationsmechanismen dieser Beobachtungen unbekannt bleiben, deuten diese Ergebnisse darauf hin, dass KLK6 die Fähigkeiten von Tumorzellen beeinflussen könnte, der Immunantwort zu entgehen. Dieser bislang unbekannt Zusammenhang sollte in folgenden Studien weiter untersucht werden. Strahlentherapie stellt eine Kernmodalität in der Therapie von Kopf-Hals-Plattenepithelkarzinomen dar und Patienten mit niedriger KLK6-Expression könnten von einer Kombination mit PD-(L)1-gerichteter Immuntherapie profitieren.

Diese Arbeit beschreibt zum ersten Mal einen bidirektionalen Regelmechanismus zwischen der Proteasenfamilie der Kallikreine und dem Retinsäurestoffwechsel und konnte KLK6 und ALDH1A3 als Schlüsselpunkte dieser Verbindung identifizieren. Zellkulturexperimente und integrative Datenanalyse konnten die funktionelle Relevanz dieser Signalachse hinsichtlich der Erhaltung eines epithelialen Phänotyps betonen. In Zukunft sollte das Potential beider Enzyme als Biomarker untersucht werden, um Vorhersagen über den Erfolg einer Therapie mit Retinsäurederivaten bei Patienten mit Kopf-Hals-Plattenepithelkarzinomen bzw. prämaligen Läsionen treffen zu können. Desweiteren konnte eine bislang unbekannt Verbindung zwischen KLK6 und PD-L1-Expression beschrieben werden, sowie ein Einfluss des KLK6-Expressionsniveaus auf die Strahlentherapie-vermittelte Induktion von PD-L1. Diese neuen Ergebnisse könnten dabei helfen, Patienten zu identifizieren, welche von einer zusätzlichen Therapie mit PD-(L)1-gezielter Immuntherapie profitieren könnten.