

Ann-Kathrin Daum
Dr.sc.hum.

The influence of cancer-associated fibroblasts on drug resistance of *anaplastic lymphoma kinase*-mutated lung adenocarcinoma cells

Fach/Einrichtung: Deutsches Krebsforschungszentrum (DKFZ)

Doktorvater: Prof. Dr. rer. nat Holger Sültmann

Adenokarzinome der Lunge repräsentieren den am häufigsten vorkommenden histologischen Subtyp aller diagnostizierten Bronchialkarzinome und sind häufig durch das Auftreten wiederkehrender molekularer Veränderungen gekennzeichnet. Die Identifizierung und das Verständnis solcher onkogenen Treibermutationen hat das klinische Management von Lungenkrebspatienten maßgeblich verändert. Trotz vielversprechender Ansprechraten unter zielgerichteter Therapie, ist das Auftreten eines Rezidivs durch Therapieresistenzen nahezu unausweichlich und stellt eine entscheidende klinische Herausforderung dar. Neben intrinsischen Resistenzmechanismen hat das ausgesprochen heterogene Tumormikromilieu zunehmend an Bedeutung in Bezug auf eine Einflussnahme der Therapieempfindlichkeit von Lungenkrebszellen gewonnen. Zahlreiche Hinweise schreiben insbesondere den tumorassoziierten Fibroblasten (CAFs) eine zentrale Rolle in dieser Hinsicht zu. Basierend auf diesem Sachverhalt zielte die vorliegende Arbeit darauf ab, die höchst komplexen sowie dynamischen molekularen Vernetzungen aufzudecken, die dem Einfluss des Tumormikromilieus auf die Therapieanfälligkeit zielgerichteter molekularer Therapien von Lungenadenokarzinomzellen zugrunde liegen. Die hierbei verwendeten Zelllinien sind durch eine abnormale Fusion der Gene *echinoderm microtubule-associated protein-like 4 (EML4)* und Anaplastische Lymphomkinase (*ALK*) charakterisiert.

Im Bestreben einer Erhöhung der pathophysiologische Relevanz einer *in vitro* Modellierung, sowie zur Abbildung der räumlichen Anordnung des Tumormikromilieus, wurden *ALK*-getriebene Lungenkrebszelllinien (H2228 und H3122) sowie CAFs unter drei-dimensionalen (3D) Bedingungen kultiviert. Eine Nachahmung der Aktivierung von Fibroblasten wurde vorangehend einer Ko-Kultivierung durch die Stimulation mittels des Transformierenden Wachstumsfaktor beta-1 (*TGF-β1*) erzielt. Die erfolgreiche Aktivierung von CAFs konnte sowohl auf phänotypischer als auch auf molekularer Ebene bestätigt werden. Dies basierte jeweils auf einer Sternzell-ähnlichen Morphologie und einer erhöhten Expression von *alpha-smooth muscle actin* (*αSMA*) und dem Fibroblasten-Aktivierungs-Protein (*FAP*). Mono- sowie Ko-Kulturen multizellulärer Tumorsphäroide wurden erfolgreich etabliert und ihre Sensitivität gegenüber zweier zugelassener Tyrosine-Kinase-Inhibitoren (*TKI*; Brigatinib und Lorlatinib) mittels Dosis-Wirkungs-Kurven ermittelt. Funktionelle Analysen im Anschluss einer Behandlung mit *ALK*-Inhibitoren bewiesen, dass eine Ko-Kultivierung mit CAFs eine Therapieresistenz in H2228 und H3122 Tumorsphäroiden auslöste. Dies wurde durch ein vermehrtes Tumorsphäroidwachstum und einer reduzierten Zelltod- sowie einer erhöhten Proliferationsrate unter Inhibierung von *ALK* begründet.

Tumorstroma-abhängige Veränderungen biologischer Prozesse sowie zugrunde liegende molekulare Mechanismen wurden in *ALK*⁺-Lungenadenokarzinomzellen mittels Transkriptionsanalyse auf Einzellzebene untersucht. Einzelzell-RNA-Sequenzierungen

bieten eine noch nie da gewesene Auflösung zellulärer Heterogenität, welche ebenfalls durch die Identifizierung individueller Tumorzell- und Fibroblastenpopulationen und entsprechender Markergene verdeutlicht wurde. Die Abfrage transkriptioneller Unterschiede zwischen mono- und ko-kultivierten Tumorsphäroiden der Lunge nachfolgend einer Inhibierung des ALK-Signalwegs, resultierte in einer Gesamtzahl von 79 differenziell exprimierten Gene in allen getesteten Bedingungen, inklusive beider Zelllinien sowie beider ALK Inhibitoren. Die Analyse überrepräsentativ vorkommender Gengruppen in Bezug auf ihre Funktionalität und Zugehörigkeit zu entsprechenden Signalwegen offenbarte eine Veränderung des metabolischen Profils von Lungenkrebszellen in Abhängigkeit von CAFs. Folgeexperimente bestätigten zusätzlich eine erhöhte mitochondriale Aktivität sowie eine Zunahme der Expression von Regulatoren der Cholesterinhomöostase einhergehend mit einem resistenten Phänotyp ALK-translozierter Lungenkrebszellen gegenüber TKI Behandlung *in vitro*. Die Etablierung einer solchen Metabolismus-erhaltenden Nische konnte durch eine duale, zielgerichtete Therapie gegen ALK und der 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzym-A-Reduktase (HMGCR) überwunden werden. Letzteres stellt das geschwindigkeitsbestimmende Enzym der Cholesterinbiosynthese dar.

Mögliche Routen heterozellulärer Kommunikation zwischen Tumorzellen und dem stromalen Zellkompartiment wurden mittels Ligand-Rezeptor-Interaktionsanalyse und basierend auf den Datensätzen der Einzelzell-RNA-Sequenzierung untersucht. Entsprechend dieser *in silico* Vorhersage wurde die Expression ausgewählter CAF-sekretierter Faktoren in 3D-kultivierten Fibroblasten und dazugehörigen Zellkulturüberständen validiert. Insbesondere der Hepatozyten-Wachstumsfaktor (HGF) und Neuregulin-1 (NRG1), zwei Liganden der Rezeptor-Tyrosinkinasen (RTK), waren in der Lage eine Therapieresistenz in H2228 und H3122 Tumorsphäroiden infolge der Exposition mit Brigatinib oder Lorlatinib zu induzieren. Eine erhöhte Expression von Effektoren der Cholesterinbiosynthese nach Stimulation mit HGF oder NRG1 bot zudem erste Hinweise auf einen molekularen Link zwischen RTK-Aktivierung vermittelt durch CAF-abstammende Liganden und einer metabolischen Umprogrammierung in Lungenkrebszellen.

Zur Detektion epigenetischer Modifikationen als potenziell treibende Kraft einer Resistenz gegenüber ALK-Inhibitoren induziert durch Tumor-Stroma-Interaktionen, wurden Veränderungen der globalen DNA-Methylierung in Abhängigkeit von CAFs in H2228 Tumorsphäroiden untersucht. Während nach Behandlung mit Brigatinib keine bedeutenden Änderungen des DNA-Methylierungsmusters im Vergleich zu Kontrollproben gefunden werden konnten, so wurde doch eine nennenswerte Anzahl an differenziell methylierten CpG-Stellen zwischen mono- und ko-kultivierten H2228 Sphäroiden detektiert. Die biologische Signifikanz solcher Veränderungen des Methylierungsprofils wurde mittels einer Anreicherungsanalyse bewertet, welche eine Deregulierung hypomethylierter CpG-Stellen bzw. entsprechend annotierter Gene zeigte, die eine Rolle in diversen kanzerogenen Prozessen (z.B. Hedgehog-Signalweg, epithelial-mesenchymale Transition, KRAS-Signalweg) spielen. Insgesamt legen die Ergebnisse der vorliegenden Dissertation eine deutliche Beteiligung tumorassoziierter Fibroblasten in der Vermittlung einer erhöhten Tolerierbarkeit gegenüber ALK-gerichteter Therapieinterventionen in Lungenkrebszellen nahe. Die Etablierung einer Metabolismus-förderlichen Nische infolge einer heterozellulären Kommunikation stellt einen Überlebensvorteil für ALK⁺-Lungenkrebszellen dar und bietet diesen einen Ausweg unter Therapiedruck den onkogenen Phänotyps aufrecht zu erhalten.