

Alexander Olkus

Dr. med.

The role of CKLF-like MARVEL transmembrane domain-containing proteins in liver cancer focussing on CMTM4 – a descriptive and functional analysis

Einrichtung: Deutsches Krebsforschungszentrum (DKFZ)

Doktorvater: Prof. Dr. rer. nat. Mathias Heikenwälder

Leberkarzinome gehören zu den häufigsten Krebserkrankungen und führen weltweit zur vierthöchsten krebssassoziierten Mortalität. Das hepatozelluläre Karzinom ist, gefolgt vom cholangiozellulären Karzinom, der häufigste Lebertumor. Da kurative Therapien nur in frühen Stadien möglich sind, kommt der palliativen Therapie eine große Bedeutung zu. Hierbei nehmen immunmodulierende Therapien, zum Beispiel mittels Immuncheckpoint-Inhibitoren, eine große Rolle ein und stellen derzeit die erste Therapielinie für das hepatozelluläre Karzinom dar. Allerdings kommt es auch unter Immuntherapie zu Tumorprogression oder Rezidiven. Daher ist ein tieferes Verständnis der hepatischen Karzinogenese einerseits, sowie der Interaktion des Tumors mit dem Immunsystem andererseits notwendig. Kürzlich wurden CMTM6 und CMTM4 als Regulatoren der Expression des Immun-Checkpoint-Moleküls PD-L1 identifiziert, was eine onkogene Funktion der CMTM-Genfamilie in der Karzinogenese nahelegt. Ihre genaue Rolle im Rahmen des Leberzellkarzinoms ist jedoch noch nicht abschließend geklärt.

Ein Ziel dieser Arbeit war es daher, die Expression der CMTM-Genfamilie in Leberkarzinomen zu untersuchen. Zu diesem Zweck erfolgte eine Datenbankanalyse der CMTM-Genexpression in humanen hepatozellulären Karzinomen. Diese zeigte eine erhöhte Expression von *CMTM1*, *3*, *4*, *7* und *CMTM8* im Tumorgewebe, sowie eine positive Korrelation der Expression von *CMTM1*, *3*, *4*, *6* und *CMTM7* mit geringer Überlebensdauer. Zum tieferen Verständnis der Expression dieser Genfamilie und um präklinische, funktionelle Experimente zu ermöglichen, war eine Übertragung auf murine Tumormodelle unabdingbar. Daher wurde die Expression der protumorigenen CMTM-Genfamilienmitglieder in verschiedenen murinen Lebertumormodellen untersucht. In der Mehrheit der Leberhomogenate der durch genetische Manipulation oder ernährungsbedingt induzierten cholangio- und hepatozellulären Tumore zeigte sich eine erhöhte Expression von *Cmtm3* und *Cmtm7* auf mRNA-Ebene, sowie eine reduzierte Expression von *Cmtm4*, *6* und *Cmtm8* im Vergleich zu Lebern gesunder Mäuse. Um zu ermitteln, ob es Unterschiede in der räumlichen Expression der CMTM-Genfamilienmitglieder innerhalb der Tumore gibt und welcher Zelltyp diese exprimiert, erfolgte die Untersuchung der Genexpression mittels *in-situ* Hybridisierung. Hierbei zeigte sich sowohl in humanen hepatozellulären, als auch in murinen hepatozellulären und cholangiozellulären Karzinomen

eine erhöhte Expression von *CMTM3*, *4*, *6*, und *CMTM7* sowohl im Vergleich zu paratumorösem als auch zu normalem Lebergewebe. Die Expression muriner Splice-Varianten könnte eine Erklärung der unterschiedlichen Expression von *Cmtm4* und *Cmtm6* innerhalb der verschiedenen RNA-basierten Methoden liefern. Die Expression von *CMTM3*, *4*, *6* und *CMTM7* scheint in Leberkarzinomen onkogene Eigenschaften zu haben, sollte jedoch für jede Tumorentität separat beurteilt werden. In normalem Lebergewebe wurde *Cmtm3* hauptsächlich von nicht-parenchymatösen Zellen und Immunzellen und kaum von Hepatozyten exprimiert. *Cmtm4* und *Cmtm6* dagegen wurden hauptsächlich von Hepatozyten und *Cmtm7* zusätzlich von Immunzellen und nicht-parenchymatösen Zellen exprimiert. In verschiedenen Tumormodellen wurden *Cmtm3*, *4*, *6* und *Cmtm7* von Tumorzellen exprimiert, wohingegen in hepatozellulären Karzinomen *Cmtm3* hauptsächlich von tumorinfiltrierenden Immun- oder nicht-parenchymatösen Zellen exprimiert wurde.

Es ist bereits bekannt, dass die Interaktion von CMTM6 mit PD-L1 durch einen reduzierten Abbau von PD-L1 in Lysosomen zu einer verlängerten Expression von PD-L1 auf der Zelloberfläche führt. In Abwesenheit von CMTM6 kann CMTM4 diese Funktion übernehmen, was jedoch bisher nicht funktionell validiert wurde. Außerdem ist die Funktion von CMTM4 in Anwesenheit von CMTM6, sowie die Funktion innerhalb der immunologischen Synapse noch ungeklärt. Daher wurde im zweiten Teil dieser Arbeit untersucht, inwiefern die Expression von CMTM4 durch Tumorzellen die zytotoxische T-Zell vermittelte Immunreaktion gegen Tumorzellen *in vitro* beeinflusst. Es erfolgte die Entwicklung eines Echtzeit-T-Zell-Zytotoxizitätsassays mit Hilfe des xCELLigence-Systems. Unter der Annahme, dass die Funktionen der CMTM-Genfamilie evolutionär hoch konserviert sind, wurde die murine Melanomlinie B16-F10-OVA zur Etablierung dieses Assays verwendet. Im Gegensatz zu den Erwartungen wurde jedoch weder in CMTM4- oder CMTM6-defizienten noch überexprimierenden B16-F10-OVA-Zellen eine Veränderung der T-Zell-induzierten Tumorlyse beobachtet. Zum Ausschluss redundanter Funktionen zwischen CMTM4 und CMTM6 wurden zusätzlich CMTM4,6-defiziente Tumorzellen generiert, welche jedoch ebenfalls keine Veränderung der Tumorlyse zeigten. Um den Einfluss der verwendeten B16-F10-OVA-Zelllinie zu untersuchen, wurde der Assay mit einer weiteren, humanen Melanom-Zelllinie (COLO 800) durchgeführt. In CMTM4-defizienten COLO 800 Tumorzellen zeigte sich eine erhöhte T-Zell-vermittelte Zytotoxizität und bestätigte damit erstmals, dass die Expression von CMTM4 durch Tumorzellen unter gewissen Voraussetzungen die zytotoxische T-Zell-Antwort *in vitro* modulieren kann. Das unterschiedliche Verhalten der CMTM4-defizienten B16-F10-OVA und COLO 800 Tumorzellen in der Interaktion mit zytotoxischen T-Zellen im Rahmen dieses Assays könnte durch die notwendige Stimulation der B16-F10-OVA Zellen mit Interferon γ oder durch die Expression unterschiedlicher immunmodulatorischer Moleküle innerhalb der immunologischen Synapse vermittelt worden sein. Der genaue Mechanismus, durch welchen

CMTM4 die T-Zell-Zytotoxizität moduliert und ob dies auch *in vivo* funktionell relevant ist, bleibt jedoch weiterhin ungeklärt und erfordert weitere Untersuchungen.

Zusammenfassend vermittelt diese Arbeit ein tieferes Verständnis der Expression der CMTM-Genfamilie in Lebertumoren. Sie zeigt ein tumorspezifisches CMTM-Expressionsprofil und weist auf eine mögliche onkogene Funktion der Expression von *CMTM3*, *CMTM4*, *CMTM6* und *CMTM7* hin. Außerdem konnte ich zeigen, dass die Expression von CMTM4 durch Tumorzellen unter bestimmten Bedingungen die zytotoxische T-Zell-Antwort modulieren kann, was für die Entwicklung neuer Anti-Tumor-Therapien genutzt werden könnte.