

Title: Wie beeinflussen Zuckermoleküle die Entwicklung von Hautkrebs?**Antragssteller:** PD Dr. Christian Gorzelanny, Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Venerologie**1. Zusammenfassung**

Polymere Zuckermoleküle an der Oberfläche von Krebszellen regulieren die Wechselwirkung der Zelle mit ihrer Umgebung. Eines der häufigsten Zuckermoleküle, welches von Melanomzellen produziert wird, ist das Heparansulfat. Dieses Polymere beeinflusst z.B. die Wirkung von Signalmolekülen und reguliert daher viele Signalwege innerhalb und außerhalb der Zelle. Im Tumormikromilieu ist das Heparansulfat daher maßgeblich für die Bildung neuer Blutgefäße und die Rekrutierung von Immunzellen verantwortlich. Genaue Einblicke in die Funktionsbeziehung zwischen der Struktur des Heparansulfates und der biologischen Wirkung fehlen allerdings. Die Infiltration tumorunterdrückender Immunzellen ist essentiell für den Erfolg aktueller Immuntherapien. In etwa der Hälfte der Melanompatienten ist die Rekrutierung dieser Immunzellen allerdings unzureichend und verhindert ein Ansprechen auf die Therapie. Ziel des hier vorgeschlagenen Forschungsprojektes ist daher ein besseres Verständnis wie Heparansulfat das Tumormikromilieu reguliert und so z.B. die Infiltration zytotoxischer T Zellen steuert. Basis für die geplanten *in vitro* und *in vivo* Versuche sind verschiedene Melanomzellen mit einer genetisch definierten Heparansulfate-Biosynthese. Tumor-on-Chip Experimente und histologische Analysen von Tumorgewebe werden genutzt, um die Menge und Struktur des Heparansulfates im Tumor mit der Bildung neuer Blutgefäße und der Rekrutierung von Immunzellen zu korrelieren. Durch die erzielten Daten werden neue molekulare Ziele identifizieren werden, die zur Verbesserung gegenwärtige Krebstherapien beitragen können.

2. Stand der Forschung

Prokaryotische und –eukariotische Zelle sind in der Regel von einer Hülle aus verschiedenen Glykanen umgeben. Glykane sind polymere Zuckermoleküle, die maßgeblich die Wechselwirkung zwischen der Zelle mit ihrer Umgebung regulieren. Häufige Glykane, die von Säugetierzellen gebildet werden, sind Glykosaminoglykane (GAGs). GAGs umfassen das nicht sulfatierte Hyaluronan und sulfatierte Polysaccharide wie das Heparansulfat (HS), Chondroitinsulfat oder Dermatan-sulfat. HS ist besonders häufig. Aktuelle Studien deuten darauf hin, dass HS die Funktion von über 2000 Proteinen regulieren kann und daher auch an vielen biologischen Signalwegen aktiv beteiligt ist.¹ HS spielt in vielen unterschiedlichen Prozessen eine zentrale Rolle. Es koordiniert z.B. das Wachstum von Neuriten, ist aber, sobald es übermäßig sulfatiert ist, auch maßgeblich an der Aggregation von beta-Amyloid und somit an der Entwicklung von Alzheimer beteiligt^{2,3}. HS reguliert auch das Mikrobiome im Gastrointestinaltrakt, kann aber auch als Eintrittspforte für Viren wie z.B. SARS-CoV dienen^{4,5}. HS scheint aber auch eine relevante Rolle bei der Tumorentstehung und Metastasierung zu spielen.^{6,7} Wichtig für die biologische Funktion des HS ist der Sulfatisierungsgrad und das Sulfatisierungsmuster. Nach neusten Erkenntnissen unterstützt dieser molekulare Code z.B. Zellen dabei Signale von Wachstumsfaktoren oder entzündlichen Zytokine eindeutig zu verarbeiten⁸. HS reguliert verschiedene Mitglieder der *fibroblast growth factor* (FGF) Familie, wie FGF-2 und FGF-10⁸. Wir und andere konnten zeigen, dass HS auch die biologische Aktivität der Zytokine CCL-2, CCL-5 und CXCL-9 steuern kann⁹⁻¹¹. Diese Zytokine sind unter anderem an der Geweberekrutierung von Immunzellen beteiligt.

Die molekulare Komplexität des HS beruht auf seiner sequentiellen Biosynthese im Golgi-Apparat der Zelle.¹² Über zehn Enzyme sind an der Bildung des HS beteiligt, wobei nicht alle Enzyme gleichmäßig an dem Syntheseprozess beteiligt sein müssen. Dies ermöglicht die maßgeschneiderte Synthese

verschiedener HS Varianten. Genetische und epigenetische Prozesse steuern die Expression der jeweiligen Enzyme und ermöglichen die Bildung gewebespezifischer HS-Ketten mit definierten biologischen Funktionen^{13,14}. Eine Dysregulation der HS Biosynthese geht dabei mit einem veränderten Mikromilieu im Gewebe einher. Wir konnten in diesem Zusammenhang bei fast der Hälfte aller Melanompatienten somatische Mutationen in Genen, welche Enzymen der HS-Biosynthese kodieren, nachweisen¹⁵. Dieser Befund deutet darauf hin, dass es in den betroffenen Geweben zu einer veränderten Signalverarbeitung von Wachstumsfaktoren und entzündlicher Mediatoren kommt, welche das Wachstum und Ausbreitung des Tumors unterstützen. Der molekulare Zusammenhang zwischen einer krankhaften Änderung der HS-Biosynthese und dem Tumormikromilieu ist bislang nicht erforscht, könnte aber die Grundlage für eine bessere Tumorthherapie liefern. Der Erfolg moderner Tumorthérapien mittels sogenannter Immune-Checkpoint Inhibitoren beruhen auf der Infiltration zytotoxischer Immunzellen in das Tumorgewebe. Eine unzureichende Infiltration der Immunzellen oder eine Blockade ihrer zytotoxischen Aktivität verhindert ein Ansprechen der Therapie. Laut aktueller Studienlage betrifft das um die 40% der Melanompatienten.¹⁶ Ziel des hier vorgeschlagenen Projektes ist es besser zu verstehen, inwiefern der molekular Code des HS die Rekrutierung therapierelevanter Immunzellen in das Tumorgewebe steuert.

3. Vorarbeiten

In eigenen Vorarbeiten zeigten wir, dass erhöhte Menge HS die Gefäßbildung im Melanom fördert und es somit zu einer besseren Blutversorgung des Tumor kommt. Proteomanalysen deuteten weiterhin darauf hin, dass das Tumormikromilieu die Rekrutierung von Immunzellen begünstigt^{10,17}. In bislang nicht publizierten Daten konnten wir ebenfalls eine vermehrte Infiltration von CD8⁺ T Zellen in das Melanomgewebe nachweisen (Abbildung 1A). Auf diesen Studien aufbauend, generierten wir Melanome mit einer genetisch blockierten HS Biosynthese. Dies wurde durch die CRISPR/Cas9 vermittelte Deletion des initial an der HS-Biosynthese beteiligten Enzymes Exostosin 1 (Ext1) möglich. In guter Übereinstimmung mit unseren früheren Daten¹⁰ zeigte sich, dass ein HS Mangel mit einer drastisch reduzierten Blutgefäßbildung und Tumordinfiltration von CD8⁺ T Zellen einherging (Abbildung 1B, C). Auch fanden wir eine gesteigerte lymphogene und hematogene Metastasierung (Abbildung 1D)¹⁸.

Um die HS-Biosynthese diffiziler auf genetischer Ebene regulieren zu können, haben wir ein CRISPR/Cas9 basiertes Multiplexverfahren entwickelt, welches uns das simultane deletieren mehrerer HS-Biosynthese Enzyme ermöglicht.¹⁹ Auf diese Weise ist es uns gelungen Melanomzelllinie zu generieren, die eine Vielzahl verschiedener HS-Ketten synthetisieren und so ganz unterschiedlich mit z.B. Wachstumsfaktoren oder Zytokinen wechselwirken können. In den geplanten Versuchen möchten wir diese Zelllinien biologisch charakterisieren. Ein wichtiges Ziel ist es herauszufinden welche HS-Strukturen die Tumorprogression steigern oder hemmen können.

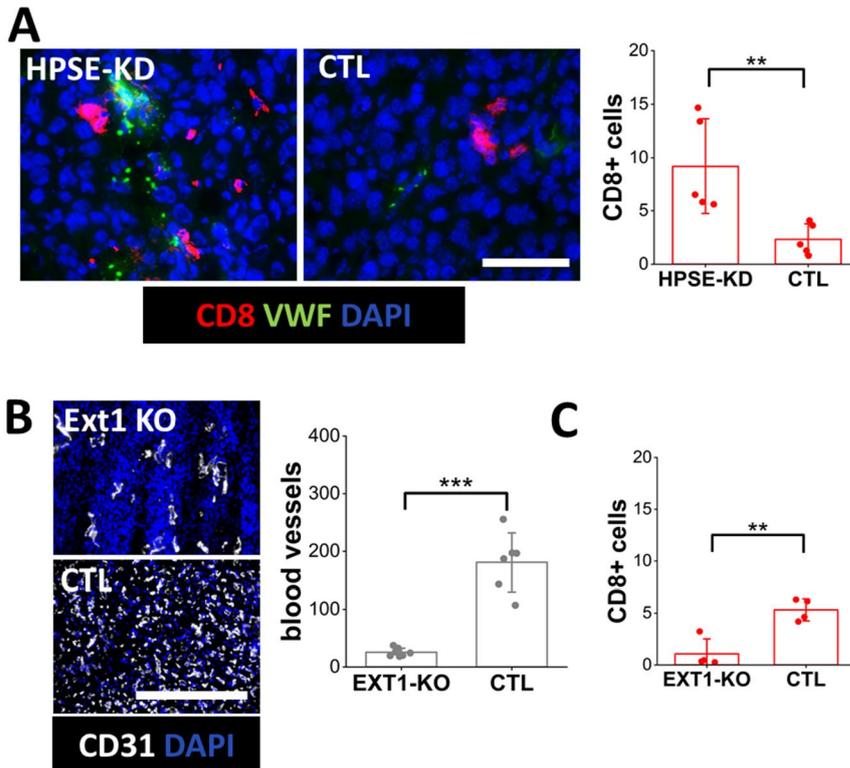


Abbildung 1: Einfluss der HS Expression auf die Rekrutierung von CD8+ T Zellen und Tumervaskularisierung. In Melanomen mit einer hohen HS Menge, durch Knockdown des HS spaltenden Enzymes Heparanase (HPSE-KD), kommt es im Vergleich zum Kontrolltumor (CTL) zu einer vermehrten CD8+ T Zell Infiltration **(A)**. In Melanomen mit einer stark reduzierten HS Menge, durch Knockout des HS synthetisierenden Enzyms EXT1 (EXT1 KO), kommt es im Vergleich zum Kontrolltumor (CTL) zu einer reduzierten Vaskularisierung **(B)** und einer eingeschränkten Rekrutierung von CD8+ T Zellen **(C)**. Größenbalken 100 μm **(A)**, 1000 μm **(B)**. ** $P < 0,01$, *** $P < 0,005$.

4. Projektziele mit Forschungshypothese

Ziel des Projektes ist es zu erforschen wie HS und insbesondere welche HS-Struktur das Mikromilieu in Tumoren reguliert, die Rekrutierung von Immunzellen kontrolliert und die Bildung und Reifung von Blutgefäßen im Tumorgewebe steuert. Die bereits etablierten Melanomzelllinien mit definierten Veränderungen in der HS-Biosynthese sollen in *tumor-on-chip* Modellen und in murinen Melanommodellen charakterisiert werden. Wir postulieren, dass durch eine Modulation der HS-Biosynthese die Rekrutierung tumorsupprimierender Immunzellen gesteigert werden kann.

5. Arbeitsprogramm mit Meilensteinen und Zeitangaben

Das Arbeitsprogramm gliedert sich in drei Arbeitspakete (AP):

AP1: Tumor-on-Chip Modelle zur Charakterisierung der T Zell Rekrutierung *in vitro* (Monat 0-4). In früheren Arbeiten nutzten wir bereits mikrofluidischen Systemen um die vaskuläre Adhäsion von im Blut zirkulierender Immune- oder Tumorzellen zu messen.^{17,18,20,21} In den hier geplanten Arbeiten, möchten wir unsere mikrofluidischen Systeme nutzen, um den Einfluss des Tumormikromilieus auf die Rekrutierung von CD8+ T Zellen in das Tumorgewebe zu untersuchen. Zu diesem Zweck werden wir ein zwei-Kammer System verwenden. In der unteren Kammer werden wir Melanomzellen (wild typ oder mit einer genetisch manipulierten HS-Biosynthese) in einer drei-dimensionalen Matrix

kultivieren. In der darüber liegenden Flusskammer kultivieren wir vaskuläre humane Endothelzellen (z.B. *Human Dermal Microvascular Endothelial Cell*). Diese werden dann im Verlauf entweder mit Vollblut oder mit isolierten Lymphozyten überströmt. Die Rekrutierung der Immunzellen und deren Infiltration in den Tumor werden in Echtzeit mittels Fluoreszenzmikroskopie und Interferenzkontrastmikroskopie gemessen. Zu definierten Endpunkten (1h, 4h, 8h, 12h und 24h nach Start des Experiments) werden die Kammern fixiert und immunhistologisch analysiert, um die Zahl und Aktivierung CD8⁺ T Zellen zu quantifizieren. **Meilenstein 1:** Identifikation relevanter Melanomzelllinien für die Versuche in AP2

AP2: Murine Melanommodelle (Monat 5-8). Aufbauend auf den in AP2 beschriebenen *Tumor-on-Chip* Modellen sollen ausgewählte Melanomzelllinien mit einer definierten HS-Biosynthese in entsprechenden Tiermodellen untersucht werden. Diese Modelle sind etabliert und die behördliche Zustimmung liegt vor. Die Melanomzellen (B16F10, 0.75×10^6) werden in die Haut der Tiere intradermal appliziert. Das Wachstum des Tumors wird täglich vermessen. Drei Wochen nach Applikation der Zellen wird die Zahl lymphogener und hematogener Metastasen quantifiziert und der Primärtumor für weitere Analysen (AP3) entnommen. **Meilenstein 2:** Korrelation der HS-Struktur mit dem Tumorwachstum und der Metastasierungsneigung.

AP3: Histologische Analysen des Tumorgewebes und Kinome Profiling (Monat 9-12). Die in AP2 generierten Melanome werden weiter histologisch analysiert. In Analogie zu AP1 wird insbesondere die Vaskularisierung des Tumors (CD31-Färbung) und das T Zell Infiltrat (CD8 Färbung) quantifiziert. Für eine weiterführende Analyse der infiltrierten Immunzellpopulationen werden ebenfalls durchflusszytometrische Messungen in der Core Facility des UKE durchgeführt. In Zusammenarbeit mit PD Dr. Malte Kriegs (Zentrum für Onkologie, UKE) werden umfangreiche Kinome Analysen im Tumorgewebe genutzt, um den Einfluss der zellulären HS Konfiguration auf intrazelluläre Signalwege zu messen. **Meilenstein 3:** Korrelation der HS-Struktur mit intrazellulären Signalwegen und der Rekrutierung zytotoxischer T Zellen in das Tumorgewebe.

6. Voraussichtliche Dauer

Die Laufzeit des Projektes beträgt voraussichtlich 12 Monate. Der mögliche Startpunkt des Projektes ist der 01.10.2023.

Referenzen

- 1 Vallet, S. D., Berthollier, C. & Ricard-Blum, S. The glycosaminoglycan interactome 2.0. *Am J Physiol Cell Physiol* **322**, C1271-C1278 (2022). <https://doi.org:10.1152/ajpcell.00095.2022>
- 2 Meier, M. *et al.* The dynamic nature of netrin-1 and the structural basis for glycosaminoglycan fragment-induced filament formation. *Nature communications* **14**, 1226 (2023). <https://doi.org:10.1038/s41467-023-36692-w>
- 3 Wang, Z. *et al.* Increased 3-O-sulfated heparan sulfate in Alzheimer's disease brain is associated with genetic risk gene HS3ST1. *Sci Adv* **9**, eadf6232 (2023). <https://doi.org:10.1126/sciadv.adf6232>
- 4 Ulmer, J. E. *et al.* Characterization of glycosaminoglycan (GAG) sulfatases from the human gut symbiont *Bacteroides thetaiotaomicron* reveals the first GAG-specific bacterial endosulfatase. *J Biol Chem* **289**, 24289-24303 (2014). <https://doi.org:10.1074/jbc.M114.573303>
- 5 Clausen, T. M. *et al.* SARS-CoV-2 Infection Depends on Cellular Heparan Sulfate and ACE2. *Cell* **183**, 1043-1057 e1015 (2020). <https://doi.org:10.1016/j.cell.2020.09.033>
- 6 Wang, Y., Schneider, S. W. & Gorzelanny, C. Crosstalk between Circulating Tumor Cells and Plasma Proteins-Impact on Coagulation and Anticoagulation. *Cancers (Basel)* **15** (2023). <https://doi.org:10.3390/cancers15113025>
- 7 Pfeifer, V. *et al.* Exostosin 1 Knockdown Induces Chemoresistance in MV3 Melanoma Cells by Upregulating JNK and MEK/ERK Signaling. *Int J Mol Sci* **24** (2023). <https://doi.org:10.3390/ijms24065452>
- 8 Weiss, R. J. *et al.* Genome-wide screens uncover KDM2B as a modifier of protein binding to heparan sulfate. *Nat Chem Biol* **17**, 684-692 (2021). <https://doi.org:10.1038/s41589-021-00776-9>
- 9 Ramos-Espinosa, G., Wang, Y., Brandner, J. M., Schneider, S. W. & Gorzelanny, C. Melanoma Associated Chitinase 3-Like 1 Promoted Endothelial Cell Activation and Immune Cell Recruitment. *Int J Mol Sci* **22** (2021). <https://doi.org:10.3390/ijms22083912>
- 10 Yang, Y. *et al.* Nuclear heparanase-1 activity suppresses melanoma progression via its DNA-binding affinity. *Oncogene* **34**, 5832-5842 (2015). <https://doi.org:10.1038/onc.2015.40>
- 11 Vanheule, V. *et al.* CXCL9-Derived Peptides Differentially Inhibit Neutrophil Migration In Vivo through Interference with Glycosaminoglycan Interactions. *Front Immunol* **8**, 530 (2017). <https://doi.org:10.3389/fimmu.2017.00530>
- 12 Li, J. P. & Kusche-Gullberg, M. Heparan Sulfate: Biosynthesis, Structure, and Function. *Int Rev Cell Mol Biol* **325**, 215-273 (2016). <https://doi.org:10.1016/bs.ircmb.2016.02.009>
- 13 Weiss, R. J. *et al.* ZNF263 is a transcriptional regulator of heparin and heparan sulfate biosynthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **117**, 9311-9317 (2020). <https://doi.org:10.1073/pnas.1920880117>
- 14 Hull, E. E., Montgomery, M. R. & Leyva, K. J. Epigenetic Regulation of the Biosynthesis & Enzymatic Modification of Heparan Sulfate Proteoglycans: Implications for Tumorigenesis and Cancer Biomarkers. *Int J Mol Sci* **18** (2017). <https://doi.org:10.3390/ijms18071361>
- 15 von Palubitzki, L. *et al.* Differences of the tumour cell glycocalyx affect binding of capsaicin-loaded chitosan nanocapsules. *Sci Rep* **10**, 22443 (2020). <https://doi.org:10.1038/s41598-020-79882-y>
- 16 Bauer, A. T., Gorzelanny, C., Gebhardt, C., Pantel, K. & Schneider, S. W. Interplay between coagulation and inflammation in cancer: Limitations and therapeutic opportunities. *Cancer Treat Rev* **102**, 102322 (2022). <https://doi.org:10.1016/j.ctrv.2021.102322>
- 17 Kalagara, T. *et al.* The endothelial glycocalyx anchors von Willebrand factor fibers to the vascular endothelium. *Blood Adv* **2**, 2347-2357 (2018). <https://doi.org:10.1182/bloodadvances.2017013995>
- 18 Wang, Y. *et al.* Heparan sulfate dependent binding of plasmatic von Willebrand factor to blood circulating melanoma cells attenuates metastasis. *Matrix Biol* **111**, 76-94 (2022). <https://doi.org:10.1016/j.matbio.2022.06.002>
- 19 Zulal, M. *et al.* CRISPR/Cas9-based multiplex gene editing to determine the impact of heparan sulfate on the melanoma microenvironment. *Experimental Dermatology* **31**, E95-E95 (2022).
- 20 John, A. *et al.* Bladder cancer-derived interleukin-1 converts the vascular endothelium into a pro-inflammatory and pro-coagulatory surface. *BMC Cancer* **20**, 1178 (2020). <https://doi.org:10.1186/s12885-020-07548-z>
- 21 Pappelbaum, K. I. *et al.* Ultralarge von Willebrand factor fibers mediate luminal *Staphylococcus aureus* adhesion to an intact endothelial cell layer under shear stress. *Circulation* **128**, 50-59 (2013). <https://doi.org:10.1161/CIRCULATIONAHA.113.002008>