

IV. Summary

Targeted therapies in KRAS-driven non-small cell lung cancer (NSCLC) not only inhibit oncogenic signaling but also actively remodel the tumor surfaceome, thereby presumably shaping tumor-immune interactions.

To characterize this treatment-induced remodeling, we performed a transcriptomic perturbation screen across a panel of lung adenocarcinoma (LUAD) cell lines using a broad range of perturbagens, including MAPK pathway inhibitors. EFNA1 was identified as a robust, highly treatment-responsive cell surface protein that is consistently upregulated following MAPK and KRAS pathway inhibition across multiple LUAD. Although the Eph receptor-ephrin system, particularly EFNA1 and its canonical receptor EPHA2, is a well-established regulator of cell-cell communication, its role in anti-tumor immunity remains poorly defined.

In vitro assays utilizing human primary T cells and a murine antigen-specific co-culture system showed that tumor-expressed and recombinant EFNA1 directly modulated T cell function. EFNA1 attenuated features of T cell overactivation, including cellular clustering and peak CD25 expression, while preserving effector cytokine secretion and reducing activation-induced cell death (AICD).

Mechanistically, we showed that EFNA1 bound preferentially to activated T cells independently of canonical EphA receptors, which were absent or downregulated upon activation. Ligand-guided chemoproteomics approaches combined with genetic KO validation identified the PD-1/PD-L1 axis as a potential non-canonical interaction partner mediating EFNA1-dependent T cell modulation.

In vivo, we found that the ultimate impact of EFNA1 depends on the tumor immune context. In an immune-cold *Kras*^{lox-stop-lox-G12D/+}; *p53*^{flox/flox} (KP) LUAD mouse model, EFNA1^{high} tumors displayed accelerated growth. In contrast, in an immune-rich mouse model, EFNA1 delayed tumor growth, enhanced CD8⁺ T cell infiltration, and tended to increase T cell activation.

Collectively, this work establishes EFNA1 as a robust treatment-induced surface protein with a dual context-dependent role in tumor progression and supports a model in which EFNA1 functions as an immune rheostat that ‘fine-tunes’ T cell activation and sustains a persistent, functionally competent effector T cell population, and thereby potentially enhances anti-tumor immunity.

Graphical summary

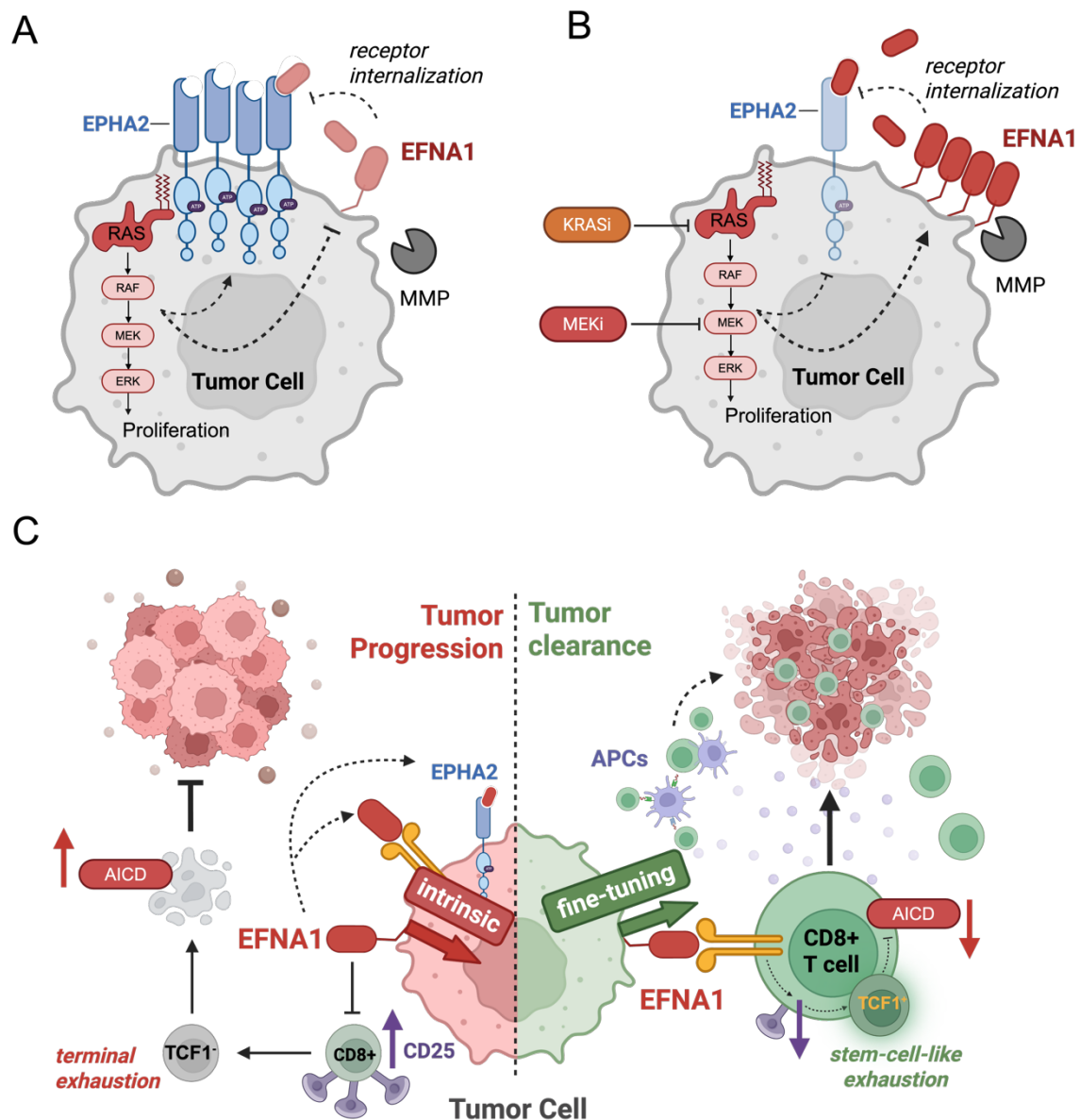


Figure 1 MAPK-pathway inhibition induces EFNA1 surface expression with context dependent effects on tumor-immune interactions

(A) In KRAS-driven LUAD tumors, constitutive activation of MAPK pathway promotes EPHA2 expression while suppressing EFNA1 expression. (B) Treatment inhibition of MEK or KRAS^{G12C} induces EFNA1 expression and a concomitant downregulation of EPHA2. EPHA2 reduction occurs both at the transcriptional level and through EFNA1-dependent receptor internalization and subsequent degradation. (C) The functional consequences of EFNA1 expression are context-dependent. (Left) In an immune cold TME, elevated EFNA1 predominantly exerts tumor-intrinsic effects that support tumor progression. Under these conditions, T cell infiltration is limited, and T cells may become overactivated, differentiate into a terminal exhausted phenotype (TCF1⁻), and ultimately undergo AICD. (Right) In contrast, in an antigen-rich TME, tumor-expressed EFNA1 modulates T cell activation. Increased antigen presentation by APCs promotes the expansion of tumor-reactive T cells. In this context, EFNA1 supports effector T cell persistence by attenuating excessive T cell activation and reducing AICD. This may prevent terminal exhaustion and promote a stem-cell-like TCF1⁺ T cell state with retained proliferative and functional potential, thereby enhancing anti-tumor immunity.

V. Zusammenfassung

Zielgerichtete Therapien beim KRAS-getriebenen nicht-kleinzelligen Lungenkarzinom (NSCLC) hemmen nicht nur onkogene Signalwege, sondern führen auch zu einer aktiven Umgestaltung des tumoralen Oberflächenproteoms und beeinflussen dadurch vermutlich die Interaktion zwischen Tumor und Immunsystem.

Zur Charakterisierung dieser behandlungs-induzierten Veränderungen führten wir einen transkriptomischen Perturbationsscreen in einem Panel von Zelllinien des Lungenadenokarzinoms (LUAD) unter Verwendung einer breiten Palette von Perturbagenzien durch, darunter Inhibitoren des MAPK-Signalwegs. Dabei identifizierten wir EFNA1 als ein robustes, behandlungsansprechendes Oberflächenprotein, das nach Hemmung des MAPK- und KRAS-Signalwegs konsistent in verschiedenen LUAD-Modellen hochreguliert wurde. Obwohl das Eph-Rezeptor/Ephrin-System, insbesondere EFNA1 und sein kanonischer Rezeptor EPHA2, als zentraler Regulator der Zell-Zell-Kommunikation gilt, ist seine Bedeutung für die Antitumorimmunität bislang nur wenig verstanden.

In-vitro-Analysen mit primären humanen T Zellen und einem murinen antigenspezifischen Co-Kultursystem zeigten, dass tumorzellständiges und rekombinantes EFNA1 Protein die Funktion von T Zellen direkt moduliert. EFNA1 schwächte Merkmale einer T Zell-Überaktivierung ab, darunter Zell-Clusterbildung und maximale CD25-Expression, während die Sekretion von Effektor Zytokinen erhalten blieb und führte zu einer Reduktion des aktivierungsinduzierten Zelltods (AICD).

Mechanistisch konnten wir zeigen, dass EFNA1, unabhängig von kanonischen EphA-Rezeptoren, bevorzugt an aktivierte T Zellen bindet. Liganden gestützte chemoproteomische Methoden in Kombination mit genetischer Knockout-Validierung identifizierten die PD-1/PD-L1-Achse als mögliche nicht-kanonischen Interaktionspartner der EFNA1-vermittelten T Zell-Modulation.

In vivo zeigte sich, dass die Funktion von EFNA1 wesentlich vom immunologischen Kontext des Tumormikromilieus abhängt. In einem immunologisch kalten *Kras*^{lox-stop-lox-G12D/+}; *p53*^{flox/flox} (KP) LUAD-Mausmodell wiesen Tumore mit einer hohen EFNA1 Expression ein beschleunigtes Wachstum auf. Dahingegen verzögerte EFNA1 in einem immunologisch stärker infiltrierten Mausmodell das Tumorwachstum, erhöhte die Infiltration von CD8⁺ T Zellen und zeigte eine Tendenz zu verstärkter T Zell-Aktivierung.

Zusammenfassend etabliert diese Arbeit EFNA1 als ein robustes, behandlungs-induziertes Oberflächenprotein mit einer dualen, kontextabhängigen Rolle in der Tumorprogression. Die Ergebnisse unterstützen ein Modell, in dem EFNA1 als immunologischer Regler wirkt, der die T Zell-Aktivierung fein abstimmt, eine persistente und funktionell kompetente Effektor-T Zell-Population aufrechterhält und dadurch potenziell die Antitumorimmunität stärkt.