

Lars Langeloh
Dr. med.

Expression angiogener Faktoren und ihrer Rezeptoren in Tumor und Stroma während verschiedener Stadien der humanen epithelialen Hautkarzinogenese am Beispiel von Basic Fibroblast Growth Factor [bFGF] und Platelet Derived Growth Factor B [PDGF-B]

Geboren am 29.01.1974 in Ludwigshafen am Rhein.

Reifeprüfung am 18.06.1993 Kurfürst-Ruprecht-Gymnasium Neustadt / Weinstraße.

Studiengang der Fachrichtung Medizin vom WS 94/95 bis WS 01/02.

Physikum am 17.09.1996 an der Universität Heidelberg.

Klinisches Studium in Heidelberg.

Praktisches Jahr in Heidelberg mit Auslandstertialen an der University of the West Indies, Port of Spain, Trinidad, und der University of South Alabama, Mobile, USA.

Staatsexamen am 14.05.2002 an der Universität Heidelberg.

Approbation als Arzt 01.03.2004.

Promotionsfach: Deutsches Krebsforschungszentrum (DKFZ)

Doktorvater: Prof. Dr. med. Norbert E. Fusenig

Ausgangspunkt der vorliegenden Arbeit waren Ergebnisse unserer Arbeitsgruppe, wonach sich der Beginn der Tumor-induzierten Angiogenese, der sog. „angiogenic switch“, gemessen als eine statistisch signifikante Zunahme der Gefäßdichte, im Zuge der humanen kutanen Plattenepithelkarzinogenese erst in einem relativ späten Stadium des SCC [Infiltration der Subkutis und Tumordicke > 2 mm] manifestiert. Nachdem bereits mittels Immunhistochemie und in-situ-Hybridisierung gezeigt werden konnte, daß dies nicht mit einer signifikant veränderten VEGF-Expression assoziiert ist, wurde nun im Rahmen der vorliegenden Arbeit untersucht, ob die verstärkte Angiogenese mit der Expression anderer pro-angiogener Faktoren und deren Rezeptoren assoziiert ist.

Zu diesem Zweck wurde die Lokalisation von Basic Fibroblast Growth Factor [bFGF], Fibroblast Growth Factor-Rezeptor [FGFR], Platelet Derived Growth Factor B [PDGF-B] und Platelet Derived Growth Factor-Rezeptor β [PDGF-R β] mittels Immunhistochemie in verschiedenen Stadien der Hautkarzinogenese analysiert. Die verwendeten Primärantikörper wurden zunächst ausführlich am Paraffin-Schnitt auf Spezifität ihrer Reaktion in der Immunhistochemie getestet. Zur Erfassung der immunhistochemischen Reaktionen wurde ein Auswertungsmodell auf Datenbasis entwickelt, welches von seiner Konzeption her allgemein auf plattenepitheliale Neoplasien inklusive der zugehörigen benignen Vorstufen anwendbar ist. Eine

detaillierter Vergleich der verschiedenen Karzinogenese-Stadien wurde somit möglich.

Die Untersuchungen ergaben, daß bFGF in allen Karzinogenese-Stadien ubiquitär, d.h. epithelial (als membranassoziertes Färbemuster), in Stromazellen sowie in Basalmembranen, nachweisbar war. Während SCC-Spätformen eine der Normalhaut vergleichbare Zahl bFGF-positiver Stromazellen aufwiesen, war deren Anzahl bei den aktinischen Keratosen [AK] sowie den SCC-Frühformen auf dem Niveau von $\alpha = 0,05$ statistisch signifikant gegenüber der Normalhaut erhöht. Die Signalintensität der Basalmembranreaktion war bei den meisten AK im Vergleich zu den Plattenepithelkarzinomen verstärkt. FGFR-positiv Einzelzellen waren in der Normalhaut-Epidermis überwiegend in der Basalzellage, bei den AK gleichermaßen basal wie suprabasal und bei den SCC-Frühformen im wesentlichen am Tumorrand lokalisiert. Einhergehend mit dem Vorhandensein eines Entzündungsinfiltrats, war bei den AK und den SCC-Frühformen im Vergleich zur Normalhaut eine Zunahme der Zahl FGFR-positiver Stromazellen sowie des relativen Anteils FGFR-positiver Gefäße zu verzeichnen.

Bedeutende Veränderungen dieses Reaktionsmusters ergaben sich bei den SCC-Spätformen: im Bereich der Tumorsepten wiesen alle Zelltypen (Tumor, Stromazellen, Gefäße) keine FGFR-Reaktion auf, das Vorkommen FGFR-positiver Tumorzellen konzentrierte sich auf den äußeren Tumorrand in der Tiefe und erst mit zunehmendem Abstand vom Tumor waren zur Peripherie hin wieder immunhistochemisch FGFR-positiv Stromazellen und –Gefäße zu erkennen. Die Zahl immunhistochemisch FGFR-positiver Stromazellen im den Tumor umgebenden Entzündungsinfiltrat war statistisch signifikant auf dem Niveau von $\alpha = 0,05$ sowohl gegenüber den AK als auch gegenüber den SCC-Frühformen vermindert. Zudem konnte gezeigt werden, daß bei den SCC-Spätformen im Vergleich zu allen anderen Präparategruppen eine statistisch signifikante Verschiebung des zahlenmäßigen Verhältnisses zwischen bFGF- und FGFR-positiven Stromazellen zugunsten eines Überwiegens bFGF-positiver Stromazellen vorliegt. Das Verhältnis zwischen bFGF- und FGFR-positiven Stromazellen korrelierte leicht zum Vaskularisationsgrad, gemessen an der Gefäßdichte.

Basierend auf dem Wissen um die kompetitiven Bindungseigenschaften des verwendeten Anti-FGFR-Primärantikörpers wurden alle diese Beobachtungen unter Einbeziehung einer Vielzahl von Literaturdaten, u.a. aus in-situ-Hybridisierungen und

Tiermodellen, zusammenfassend als Resultat einer Aktivierung des bFGF-FGFR-Systems interpretiert. Danach könnte das bFGF-FGFR-System eine wesentliche Triebfeder der Angiogenese während der humanen kutanen Plattenepithelkarzinogenese darstellen.

Demgegenüber scheint das PDGF-B-/PDGF-R β -System eher eine untergeordnete Rolle zu spielen. Während PDGF-B-positive Stromazellen und Gefäße zwar in allen Präparaten in variabler Zahl vorhanden waren, enthielt ungefähr nur die Hälfte der untersuchten Präparate jeder Gruppe PDGF-B-positive Keratinozyten bzw. Tumorzellen in nennenswertem Umfang. Die Expression des β -Rezeptors war ausschließlich auf Stromazellen, Gefäße und Hautanhangsgebilde beschränkt. Die aktinischen Keratosen wiesen sowohl im Vergleich zur Normalhaut als auch im Vergleich zu den SCC-Spätformen auf dem Niveau von $\alpha = 0,05$ statistisch signifikant mehr PDGF-R β -positive Stromazellen auf. Zwischen AK und SCC-Spätformen waren morphologische Unterschiede der PDGF-R β -reaktiven Stromazellen festzustellen, was als Hinweis auf eine veränderte (angiogene) Konfiguration des Entzündungsinfiltrats bei den SCC-Spätformen interpretiert wurde. Zusammenfassend scheint das von den Tumorzellen produzierte PDGF-B für die Karzinogenese und Angiogenese des kutanen Plattenepithelkarzinoms keine essentielle, sondern allenfalls eine additive Bedeutung zu haben. Dies schließt jedoch nicht aus, daß auf Ebene des Stromas wichtige Prozesse durch PDGF-B/PDGF-R β -Interaktionen gesteuert werden.

Als weiterer Themenschwerpunkt der vorliegenden Arbeit wurde die Lokalisation von bFGF, FGFR, PDGF-B und PDGF-R β bei Keratoakanthomen [KA] im Vergleich zu den verschiedenen Karzinogenese-Stadien untersucht. Mit Blick auf die Differentialdiagnose KA versus SCC waren keine signifikanten Unterschiede festzustellen. Die bei KA ähnlich hohe Gefäßdichte wie bei SCCs könnte somit ebenfalls über eine Aktivierung des bFGF-FGFR-Systems erklärt werden. Allerdings ist bei den KA mit Zellatypien im Unterschied zu den KA ohne Zellatypien und den Karzinogenese-Stadien die Korrelation zwischen dem Verhältnis von bFGF- zu FGFR-positiven Stromazellen und Vaskularisationsgrad nicht gegeben, was als Hinweis auf das mögliche Einwirken weiterer Faktoren, z.B. PDGF-B, interpretiert wurde.