

Joachim Carl Philipp Mertens

Dr. med.

Das Tumorstroma epidermaler Plattenepithelcarcinome und die Rolle stromaler Fibroblasten in der Tumorprogression

Geboren am 14. Oktober 1976 in Köln

Staatsexamen am 25.10.2005 an der Universität Heidelberg

Promotionsfach: DKFZ

Doktorvater: Professor Dr. med. Norbert E. Fusenig

Neben den genetisch veränderten Zellen, die den Hauptanteil eines malignen Tumors bilden und ihn charakterisieren, finden sich zahlreiche weitere Zellpopulationen im Tumorgewebe. Die nähere Charakterisierung dieser Zellen, insbesondere der Fibroblasten im Tumorstroma, ist Gegenstand dieser Arbeit. Es soll die Hypothese geprüft werden, dass ein tumorogener Effekt der Fibroblasten auf transformierte, prä-maligne Zellen besteht.

Charakteristika des Tumorstromas und der stromalen Fibroblasten

Das Tumorstroma von Plattenepithelkarzinomen der Haut zeigt hinsichtlich der zellulären und extrazellulären Zusammensetzung in der Immunfluoreszenzuntersuchung Charakteristika eines reaktiv veränderten Gewebes - wie aus der Wundheilung bekannt - mit gesteigerter Angiogenese, Infiltration von Entzündungszellen und deutliche Veränderungen der extrazellulären Matrix. Die wesentlichen Befunde zeigen somit Veränderungen im Stroma als Ausdruck der engen Wechselwirkung des Tumors mit seiner Umgebung. Die aus diesem Tumorstroma isolierten Fibroblasten unterscheiden sich phänotypisch deutlich von Zellen aus normaler Dermis. Teilweise erscheinen die Zellen myofibroblastisch differenziert, teilweise zeigen sie Differenzierung im Sinne eines „fetalen“ Phänotyps mit gesteigerter Migration und veränderter Matrixproduktion bei deutlich reduzierter proliferativer Aktivität. Ein qualitativer Marker der Tumor-assoziierten Fibroblasten war die Expression des Fibroblast Activation Protein (FAP) auf der Zelloberfläche.

Auswirkung von Tumor-Fibroblasten auf prä-maligne Keratinozyten *in vitro*

Es wurden organotypische Kokultur-Experimente mit Fibroblasten und HaCaT Keratinozyten durchgeführt, um mögliche Interaktionen anhand von Markern zu charakterisieren. Die Kokulturen mit Tumorfibroblasten unterschieden sich bereits makroskopisch und in den weiteren Immunfluoreszenz-Untersuchungen deutlich von denen mit Kontroll-Fibroblasten. In den Kokulturen mit Tumorfibroblasten verlief die Epithelbildung und -differenzierung stark verlangsamt. Die üblicherweise einsetzende Stratifizierung und Verhornung wies deutliche Störungen auf. Die

Epithelstruktur war atypisch und zeigte Charakteristika des prämaligen oder malignen Wachstums. Die Basalmembranbildung war in Kokulturen mit Tumorfibroblasten kaum nachweisbar, während sich in den Kontrollen typische Marker für Basalmembranen wie Kollagen IV, Laminin und Nidogen nachweisen ließen. Dieses Fehlen von Basalmembranstrukturen ging mit gesteigerter Proliferation und Invasivität der HaCaT Zellen in die Matrix des Kollagengels einher. Die beschriebenen Effekte waren mit Tumorfibroblasten verschiedener Passagen reproduzierbar. Dies deutet darauf hin, dass die Tumorfibroblasten die Tumorwachstum begünstigenden Eigenschaften über bis zu sieben Passagen in Monokultur als stabile Merkmale beibehalten. Ausgehend von diesen Ergebnissen wurden *in vivo* Experimente im Nacktmaus-Modell durchgeführt. Hierbei wurden zwei experimentelle Ansätze - nämlich die subkutane Injektion sowie die Oberflächentransplantation - gewählt, um verschiedene Aspekte der Interaktion von Tumor-Fibroblasten und HaCaT Zellen *in vivo* untersuchen zu können.

Stimulation von Invasion und Tumorigenität durch Tumor-Fibroblasten

Tierexperimentell konnten die bereits *in vitro* gemachten Beobachtungen größtenteils bestätigt werden. Auch in den *in vivo* Transplantaten war die Differenzierung der Epithelzellen verzögert bzw. aufgehoben. Ebenso war der Aufbau der Basalmembranen gestört, was in den Transplantations-Experimenten mit einer gesteigerten Invasivität verbunden war. Das Tumorwachstum von HaCaT Zellen wurde durch die Zugabe von Tumorfibroblasten im Vergleich zu den Kontrollen signifikant gesteigert, sowohl hinsichtlich der Tumorinzidenz - mit einer Steigerung um das 7fache - als auch des Tumolvolumens. Während die subkutanen Injektionsexperimente einen grundlegenden, das Tumorwachstum fördernden Effekt der TAF zeigen konnten, waren Beobachtungen zur extrazellulären Matrix und zum Aufbau der Basalmembranen vor allem anhand der Oberflächentransplantate möglich. Die Aufklärung der Mechanismen der Interaktion zwischen Tumorfibroblasten und Tumorzellen und deren vielgestaltiger Effekte bleibt eine überaus komplexe Fragestellung und wird Thema weiterer Arbeiten sein. Hier müssen neben den Vorgängen der Angiogenese auch die Interaktion mit inflammatorischen Zellen, die Modulation der ECM und die Sekretion von Enzymen und Wachstumsfaktoren mit in Betracht gezogen werden. Einer der am besten untersuchten Mechanismen ist sicher die Angiogenese. Inzwischen sind die Erkenntnisse zur Tumorangio-genese in zahlreiche klinische Studien eingeflossen und als ein Baustein der Tumorthherapie auf dem Weg in die routinemäßige klinische Anwendung. Einige Überlegungen und Ansätze zur therapeutischen Modulation des Tumormicroenvironments wurden bereits in der Diskussion angesprochen, wie das Fibroblast Activation Protein (FAP) oder die Matrix Metalloproteinasen und andere am Umbau des Stromas beteiligte Enzyme. Die Ergebnisse legen insgesamt die Schlussfolgerung nahe, dass auch im Bereich der Stromafibroblasten ein erhebliches therapeutisches Potential liegt.