

Katharina Kleinschmidt
Dr. med.

Funktionelle Charakterisierung von Tumorstroma-Fibroblasten und ihrer Rolle in Tumorwachstum und Invasion

Geboren am 26.10.1979 in Heidelberg
Staatsexamen am 4.12.2007 an der Universität Heidelberg

Promotionsfach: DKFZ (Deutsches Krebsforschungszentrum)
Doktorvater: Prof. Dr. med. N. E. Fusenig

Prozesse von Tumorwachstum und -invasion werden zunehmend in funktionellem Zusammenhang mit der Umgebung der Tumoren, insbesondere dem organspezifischen Stroma gesehen. In der vorliegenden Studie sollten Bindegewebszellen (Fibroblasten) unterschiedlicher Herkunft (normale Haut bzw. Tumorumgebung) hinsichtlich ihrer Interaktionsmechanismen mit prämaligen Keratinozyten untersucht werden. Besonderes Interesse galt ihrer tumorfördernden und Stroma aktivierenden Wirkung in Heterotransplantaten mit prämaligen Keratinozyten. In einer dieser Arbeit vorangegangenen Studie (Dissertation Joachim Mertens) waren Tumor-assoziierte Fibroblasten (TAF) aus der Umgebung von Plattenepithelkarzinomen der humanen Haut isoliert und in *in vitro* Studien und *in vivo* Experimenten näher untersucht worden. Die frisch isolierten TAF zeigten im Vergleich zu einer aus normaler Haut isolierten Fibroblastenlinie in Kultur deutliche Veränderungen in ihrem Wachstumsverhalten und verstärkten die tumorigene Konversion der immortalisierten, nicht tumorigenen HaCaT-Keratinozyten, verbunden mit gestörter Epithelbildung. Da in dieser Studie nur eine normale Fibroblasten-Linie als Vergleich verwandt wurde, sollten in der vorliegenden Arbeit weitere normale Fibroblasten-Populationen mit den vorhandenen TAF-Linien bezüglich ihrer Tumor-fördernden Wirkung, aber auch dem hierbei zugrunde liegenden Mechanismus untersucht werden.

Dazu wurde zunächst *in vitro* das Genexpressionsspektrums von einer normalen und zwei TAF-Linien mittels DNA Microarray analysiert. Hierbei konnte in beiden TAF-Linien eine signifikante Überexprimierung zahlreicher Gene gezeigt werden, die als ECM-Komponenten, Wachstumsfaktoren und Protoonkogene wichtige Funktionen in der Entstehung und dem Wachstum von Tumoren besitzen (u.a. Decorin, TGFBI, VEGF). Weiterführende mRNA-Analysen an 4 Tumor- und 7 normal Fibroblasten-Linien durch RT-PCR ergaben ein durchweg hohes Expressionsniveau der Wachstumsfaktoren TGF- β 1, TGFBI, MSF, KGF,

VEGF und IGF-II; jedoch ohne wesentliche Unterschiede zwischen normalen Fibroblasten und TAF. Die *in vitro* Charakterisierung von Proliferation und Proteinexpression bestätigte das verlangsamte Wachstum der TAF und ihre Funktion als „aktivierte“ Fibroblasten, jedoch ohne Unterschiede zu normalen Fibroblasten mit vergleichbarer *in vitro* Lebensdauer. Inwieweit diese Ergebnisse eine generelle Aktivierung der Human-Fibroblasten durch Isolierung und fortlaufende Kultivierung andeuten und welche Auswirkungen dies auf prämaligne Epithelzellen hat, wurde in zwei Tierversuchsmodellen untersucht: durch subkutane Injektion und Oberflächen-Transplantation in Nacktmäusen von 1:1 Zell-Gemischen von HaCaT Zellen mit TAF bzw. normalen Fibroblasten wurde die Interaktion beider Zellarten unter *in vivo* Bedingungen untersucht. Vorangegangene Kontrollstudien (sowohl nach s.c.Injektion als auch Transplantation) hatten den Nachweis darüber erbracht, dass HaCaT-Zellen unter diesen *in vivo* Bedingungen keine Tumore bilden.

In den nun durchgeführten s.c. Injektionsversuchen konnte gezeigt werden, dass nach Injektion der HaCaT/Fibroblasten Suspensionen Tumorwachstum zu erkennen war, wenn auch in unterschiedlichem Ausmaße und dies sowohl bei Verwendung von TAF wie auch von normalen Fibroblasten. Die Tumore wuchsen nach TAF-Zugabe sogar langsamer und blieben kleiner als diejenigen nach Zugabe von normalen Fibroblasten.

Zur detaillierteren Analyse dieser unerwarteten Befunde wurden Transplantationsstudien durchgeführt, wobei hierbei der Tumor-Randbereich von ganz besonderem Interesse war. Während HaCaT-Zellen ohne Fibroblasten-Beigabe in Transplantaten weitgehend normal strukturierte und differenzierte Epithelien bildeten, wiesen die unter dem Einfluß von Fibroblasten entstandenen Epithelien Areale struktureller Veränderungen und deutlich infiltrativer Bereiche auf, vergleichbar mit prämaligen Läsionen. Letztere waren deutlich stärker ausgeprägt in TAF-Transplantaten, jedoch nur nach 5 Wochen; nach 7 Wochen waren die epithelialen Veränderungen nicht mehr nach einem bestimmten Fibroblasten-Typus zu unterscheiden. Die infiltrativen Bereiche wiesen auch Veränderungen in der Differenzierung auf, wie das Beispiel verstärkter K-19 Expression zeigte. Interessanterweise konzentrierten sich die transplantierten humanen Fibroblasten, eindeutig identifiziert durch Antikörper gegen humanes Vimentin und FAP, in diesen infiltrativen Bereichen, und zwar sowohl normale wie Tumor-assoziierte Fibroblasten. In diesen Bereichen war auch verstärkte Tumorzell-Proliferation und Angiogenese nachweisbar, und die Extrazelluläre Matrix (ECM) war besonders reich an Decorin und Tenascin, beides Komponenten, die auch im Tumorstroma vermehrt nachweisbar sind. Obwohl der histologische Befund im Sinne einer malignen Tumordinvasion zu deuten war, ergaben die Immunfluoreszenz-Analysen von Basalmembran-

Komponenten (Kollagen IV, Laminin5 γ 2 und Integrin α 6) eine durchgehende Ablagerung in allen Bereichen, d.h. eine ununterbrochene Basalmembran.

Diese Befunde lassen den Schluss zu, dass die Anwesenheit von Fibroblasten in unmittelbarer Nachbarschaft zu prämaligen Epithelien diese zu vermehrter Proliferation, gestörter Gewebeorganisation und Stroma-Aktivierung mit Ausdehnung ins benachbarte Gewebe stimulieren, ohne jedoch eindeutig malignes Wachstum zu verursachen. Der unerwartete Befund, dass sowohl Fibroblasten aus normaler Haut wie auch solche aus der Umgebung von Haut-SCCs vergleichbare Veränderungen verursachen, lässt den Schluss zu, dass nach längerer Kultivierung und möglicherweise bedingt durch zwischenzeitliches Einfrieren der Population, ursprünglich stärker in Tumor-Fibroblasten vorhandene Epithel-stimulierende Charakteristika verloren gingen. Die derzeitigen Befunde erlauben keine Schlussfolgerung dahingehend, ob dies durch Verlust von Teil-Populationen (Selektion) oder Verlust von epigenetisch verankerten Eigenschaften erfolgte. Sie legen aber nahe, für weitergehende *in vitro* Untersuchungen zu Mechanismen der Tumor-Stroma-Interaktionen Fibroblasten frühe Passagen zu verwenden und bessere Identifizierungs-Marker dieser TAF zu verwenden, sowie frühzeitig nach ihrer Isolierung aus dem Tumorstroma Subpopulationen zu identifizieren. Eindeutig geht aber aus den Befunden hervor, dass aktivierte Bindegewebszellen (Fibroblasten) durch Zell-Zell-Interaktionen Tumor-promovierende Veränderungen in prämaligen Epithelien induzieren und damit auch interessante Zielzellen für Tumortherapeutische Maßnahmen darstellen.