

Carmen Monasterio

Dr. med.

### **Hemmung der Tumorprogression *in vitro* durch spezifische Blockade des *Fibroblast activation protein-alpha***

Fach/Einrichtung: NCT (Nationales Centrum für Tumorerkrankungen)

Doktorvater: Prof. Dr. med. D. Jäger

Solide Tumoren bestehen aus zwei Komponenten, den eigentlichen Tumorzellen und dem sogenannten Tumorstroma. Dieses umfasst neben der extrazellulären Matrix (ECM), Entzündungszellen, Immunzellen und Gefäßen auch aktivierte Fibroblasten oder *cancer associated fibroblasts* (CAFs). Aktivierte Fibroblasten unterscheiden sich aus phenotypischer sowie funktioneller Sicht von herkömmlichen Gewebefibroblasten. Es ist bekannt, dass aktivierte Fibroblasten die Fähigkeit besitzen, die Initiierung eines Tumors sowie dessen Wachstum und die Invasion des umliegenden Gewebes zu begünstigen. Auch bei der Angiogenese des Tumors spielen CAFs eine wichtige Rolle (De Wever, 2003). Ferner versorgen Sie den Tumor mit Wachstumsfaktoren und ECM-abbauenden Enzymen und sind fundamental in die Auf-, Ab- und Umbauprozesse involviert (Mueller, 2004). Aufgrund dieses Aktivitätsprofils sind CAFs verstärkt in den experimentell-therapeutischen Fokus gerückt. Eine Strategie stellt hierbei das Targeting von *fibroblast activation protein-alpha* (FAP- $\alpha$ ) dar, welches auf aktivierten Fibroblasten solider Tumoren in erhöhtem Maße exprimiert wird (Wang, 2005; Cohen, 2008).

FAP- $\alpha$  ist eine aktive Serin Peptidase mit Dipeptidyl Peptidase IV- und Kollagenase-Aktivität, welche auf aktivierten Fibroblasten in 90 % der menschlichen epithelialen Tumoren exprimiert wird (Henry, 2007; Goscinsky, 2008). In gutartigen Tumoren konnte FAP- $\alpha$  bisher nicht detektiert werden (Aertgeerts, 2005). Klinisch ist eine gesteigerte FAP- $\alpha$ -Expression mit einer erhöhten Rezidiv- und Letalitätsrate bei Patienten mit Pankreaskarzinomen assoziiert (Cohen, 2008). Bei Kolonkarzinompatienten war FAP- $\alpha$  als negativer prognostischer Marker zu etablieren (Iwasa, 2005). Aufgrund des restringierten und Zellmembran-assoziierten Expressionsprofils ist FAP- $\alpha$  als Zielantigen für eine Antikörper-gestützte Therapiestrategie prädestiniert. Mit „Sibrotuzumab“ wurde ein humanisierter anti-FAP-Antikörper generiert, dessen exzellentes FAP- $\alpha$ -Targeting im Rahmen einer Phase I/II-Studie an Patienten mit weit

fortgeschrittenem Kolonkarzinom nachgewiesen werden konnte. Dennoch war kein therapeutischer Benefit zu erzielen (Hofheinz, 2003; Scott, 2003).

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, durch Targeting von FAP- $\alpha$  die Aktivität Tumor-assoziiierter Fibroblasten der Lunge und des Pankreas zu hemmen, um dadurch die Tumorprogression zu unterbinden. Hierzu wurden zwei unterschiedliche Ansätze verfolgt. Zum Einen wurde ein neuartiger gegen FAP- $\alpha$  gerichteter humaner Antikörper (ESC11) mit intrinsischer Aktivität eingesetzt, zum Anderen wurden inhibierende Effekte durch Herabregulation von FAP- $\alpha$  mittels siRNA induziert.

Dazu wurden *in vitro*-Versuche mit murinen Fibroblasten im Tumormilieu durchgeführt. Die primären Fibroblasten wurden aus murinem Lungen- und Pankreasgewebe generiert und jeweils durch Ko-Kultivierung mit Tumorzelllinien des entsprechenden Gewebes in den aktivierten Phenotyp überführt.

Die zelluläre Migration wurde anhand von Scratch-Assays analysiert. Dabei konnte festgestellt werden, dass die Migration in Ko-Kultur, das heißt Fibroblasten, welche durch die Anwesenheit von Tumorzellen in den aktivierten Zustand überführt wurden, gegenüber der Mono-Kultur normaler Gewebefibroblasten zunahm. Durch Zugabe des Antikörpers kam es zu einem signifikanten Rückgang der Migration, bei den pankreatischen Zellen war der Rückgang nicht ganz so deutlich.

Die zelluläre Invasion wurde anhand von Versuchen mit Matrigelbeschichteten Boyden-Kammern getestet. Dabei konnte gezeigt werden, dass zum Einen die Invasion in Ko-Kultur im Vergleich zur Mono-Kultur stärker war. Zum Anderen konnte auch hier eine signifikante Hemmung der Invasion durch Zugabe des Antikörpers erzielt werden. Bei Versuchen mit siFAP-transfizierten Fibroblasten, bei welchen FAP- $\alpha$  spezifisch auf mRNA-Ebene herabreguliert war, kam es ebenfalls zu einer signifikanten Reduktion der Invasion.

Die in dem Ko-Kultur-System gewonnenen Ergebnisse zeigen erstmalig einen potenziellen therapeutischen Nutzen durch die Neutralisation von FAP- $\alpha$  mit einem spezifischen Antikörper und siRNA. Dies ist ein vielversprechender Ausgangspunkt für weitere Forschungsarbeiten, mit dem Ziel, durch das anti-FAP-gerichtete Targeting des Tumorstromas eine neue Therapiestrategie für epitheliale Tumoren und insbesondere das aggressiv wachsende Bronchial- und Pankreaskarzinom zu etablieren.