

Katrin Stempel

Dr. med.

Hemmung der Tumorprogression in vitro durch spezifische Blockade des Fibroblast activation protein aktivierter Fibroblasten unter hypoxischen Bedingungen

Fach/Einrichtung: NCT (Nationales Centrum für Tumorerkrankungen)

Doktorvater: Prof. Dr. med. Dirk Jäger

Das Tumorstroma nimmt bei vielen soliden Tumoren einen Großteil der Tumormasse ein und weist im Vergleich zum Stroma des Ursprungsgewebes wesentliche Unterschiede auf. Unter anderem finden sich häufig hypoxische Areale, wobei die reduzierte Sauerstoffverfügbarkeit einen erheblichen Einfluss auf die sich dort befindlichen Zellen ausübt und tumorfördernde Veränderungen induziert.

Weiterhin findet sich ein modifizierter Phänotyp von Fibroblasten, sogenannte *cancer associated fibroblasts* (CAF), die als Hauptmerkmal das *fibroblast activation protein- α* (FAP- α) überexprimieren. FAP- α ist eine an der Zelloberfläche lokalisierte Serinprotease, die als Gelatinase und N-terminale Post-Prolylaminopeptidase fungiert. Die genaue Funktion und der Wirkmechanismus von FAP- α sind jedoch noch weitgehend unbekannt. Das selektive Auftreten in fast ausschließlich pathologischen Gewebeprozessen macht es zu einem vielversprechenden therapeutischen Ziel. Je nach Erkrankung kann sich eine FAP- α -Überexpression oder gesteigerte Enzymaktivität negativ oder positiv auf das klinische Outcome auswirken. Das Pankreaskarzinom und das nicht-kleinzellige Lungenkarzinom sind aggressive epitheliale Tumoren mit schlechter Prognose und unzureichenden Therapiemöglichkeiten. Im Pankreaskarzinom geht eine FAP- α -Überexpression mit einem hohen Risiko für frühe Progression und insgesamt schlechteren klinischen Outcome einher. Im nicht-kleinzelligen Lungenkarzinom ist die Bedeutung von FAP- α bisher zwar weniger gut beschrieben, allerdings konnte gezeigt werden, dass eine hohe Anzahl an FAP- α -exprimierenden CAF in diesen Karzinomen mit einem erhöhten Risiko für Frührezidive einhergeht. Somit ist bei diesen beiden Krebserkrankungen von einem tumorfördernden Effekt von FAP- α auszugehen.

Das Ziel dieser Arbeit war es, das Migrations- und Invasionsverhalten von CAF unter Depletion des FAP- α in Normoxie und Hypoxie zu vergleichen. Dies sollte an *in vitro*-Tumormodellen für das Pankreaskarzinom und für das nicht-kleinzellige Lungenkarzinom durchgeführt werden. Hierfür wurden primäre Fibroblasten aus murinem Pankreas- und Lungengewebe isoliert und mit der entsprechenden Krebszelllinie in Kokultur gebracht, wodurch die Fibroblasten in den aktivierten Phänotyp (CAF) überführt wurden.

Für die Ansätze unter hypoxischen Bedingungen wurden eine Sauerstoffkonzentration von 1 % und eine Kohlenstoffdioxidkonzentration von 5 % festgelegt. In Vorversuchen wurde der

hypoxische Zustand der Zellen unter diesen Bedingungen anhand ihrer Hif1- α - und GAPDH-Expression belegt.

Die Depletion von FAP- α erfolgte einerseits über dessen Internalisierung mittels des neuen anti-FAP- α -Antikörpers ESC11 und andererseits über mRNA-Silencing mittels siRNA.

Die Zellmigration wurde anhand eines zweidimensionalen Scratch-Assays im Lungenkrebsmodell untersucht. Hierbei wurden die CAF und die Krebszellen in unterschiedlichen Zellzahlverhältnissen, zum einen mit den Krebszellen, zum anderen mit den CAF in Überzahl, miteinander in Kokultur gebracht. Durch vorherige Transfektion der Lungenkrebszellen mit dem grün fluoreszierenden Protein konnte die Migration der Fibroblasten und der Krebszellen differenziert betrachtet werden. Mit den CAF in starker Überzahl (Zellzahlverhältnis 100:1) wurde in Normoxie unter FAP- α -Depletion mittels ESC11 eine signifikante Reduktion der Migration erzielt. Da das Tumorstroma häufig den größten Teil der Tumormasse einnimmt, kommt dieses Zellzahlverhältnis der *in vivo*-Situation am nächsten. Nur in diesem Zellzahlverhältnis migrierten auch die Krebszellen weniger, wohingegen die CAF nahezu immer eine Reduktion der Migration unter FAP- α -Depletion zeigten. In allen anderen Zellzahlverhältnissen wurde keine signifikante Migrationsreduktion durch FAP- α -Depletion erreicht. In Hypoxie zeigten weder CAF noch Tumorzellen eine wesentliche Migrationsreduktion durch die FAP- α -Depletion.

Die Zellinvasion der mit den Krebszellen in Kokultur gehaltenen CAF wurde anhand von Matrigel Invasion Chambers untersucht. Im Lungenkrebsmodell invadierten die CAF unter hypoxischen Bedingungen, unabhängig von einer FAP- α -Depletion, signifikant weniger, wohingegen im Pankreaskrebsmodell die Hypoxie keinen Einfluss auf das Invasionsverhalten der Zellen hatte. Durch FAP- α -Depletion mittels ESC11 und auch mittels mRNA-Silencing von FAP- α konnte im Lungenkrebsmodell in Normoxie eine signifikante Reduktion der Invasion erreicht werden. In Hypoxie zeigten die Zellen kein verändertes Invasionsverhalten unter FAP- α -Depletion. Im Pankreaskrebsmodell konnte weder in Normoxie noch in Hypoxie eine Reduktion der Zellinvasion durch FAP- α -Depletion festgestellt werden.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse einen vielversprechenden Nutzen der FAP- α -Depletion im normoxischen Lungenkrebsmodell. Der ausbleibende Effekt der FAP- α -Depletion im hypoxischen Tumormilieu könnte durch einen Funktionsverlust oder eine Funktionsverringering von FAP- α in Hypoxie verursacht sein. Die dahinter stehenden Mechanismen bleiben ungeklärt und müssten in weiteren Forschungsarbeiten untersucht werden. Der Nutzen einer FAP- α -Depletion mittels ESC11 im Pankreaskrebsmodell bleibt aktuell unklar.