

**Funktionelle Untersuchungen  
zum Einfluss von FAP-Inhibitoren  
auf die Tumorzellmigration und Invasion**

von Paul Kirchner

Juni 2004

## Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung .....	Seite	1
1.1. Prinzipien der Tumorinvasion .....		1
1.1.1. Allgemeine Prinzipien der Zellmigration .....		1
1.1.2. Tumorzellmigration in dreidimensionaler extrazellulärer Matrix		2
1.1.3. Veränderungen im tumorumgebenden Stroma .....		4
1.2. Vorkommen von FAP .....		5
1.3. Biochemische und molekulare Eigenschaften von FAP .....		5
1.4. FAP als Zielstruktur der Pharmakotherapie von Krebserkrankungen		7
1.5. Ziel der Arbeit .....		7
2. Material und Methoden .....		9
2.1. Reagenzien und Geräte .....		9
2.2. Kultivierung der Zellen .....		10
2.2.1. Flüssigkultur .....		10
2.2.2. Einpolymerisation und Kultur der Zellen im dreidimensionalen Kollagen .....		10
2.3. Nachweis der Vitalität der Zellen .....		11
2.4. Nachweis der oberflächlichen Expression von FAP .....		11
2.4.1. Durchflusszytometrie .....		11
2.4.2. Konfokalmikroskopie .....		12
2.5. Nachweis der Wirkung des Inhibitors bzw. der Kontrollsubstanz .		12
2.5.1. Behandlung der Zellen mit Inhibitor bzw. Kontrollsubstanz.....		13
2.5.2. Nachweis der Migrationshemmung durch BIBX 1899.....		13
2.5.2.1. Zeitraffervideomikroskopie der migrierenden Zellen .....		13
2.5.2.2. Computerassistiertes Zelltracking .....		14
2.5.3. Nachweis der FAP spezifischen Hemmung der Kollagenkontraktion durch BIBX 1899 .....		14

3. Ergebnisse .....	15
3.1. Expression und Verteilung von FAP an der Oberfläche transfizierter HT 1080 Zellen .....	15
3.1.1. Basisexpression .....	15
3.1.2. Aufregulation der Expression durch Kollagen .....	16
3.1.3. Koloalisation von FAP mit $\beta$ 1-Integrinen an Zell-Matrix-Kontaktstellen migrierender Zellen .....	18
3.2. Wirkung der Inhibitoren auf die Zellmigration und Zell-Matrix-Interaktion .....	20
3.2.1. Dosisfindung einer nicht toxischen FAP-Inhibitorkonzentration für in vitro Langzeitversuche .....	20
3.2.2. Bedeutung von FAP für die Migration .....	22
3.2.2.1. Dosisabhängige Migrationshemmung von FAP-positiven Zellen durch BIBX 1899 .....	22
3.2.2.1.1. Verkürzung der Migrationspfade .....	22
3.2.2.1.2. Verringerung der Migrationsgeschwindigkeit .....	25
3.2.2.2. Selektivität der Wirkung für FAP-positive Zellen .....	27
3.2.3. Hemmung der Kollagenkontraktion nach Inhibition .....	28
4. Diskussion .....	30
4.1. Lokalisation von FAP als Oberflächenprotease .....	30
4.2. Beteiligung von FAP an der Migration .....	32
4.3. Ausblick: FAP als Zielstruktur der Pharmakotherapie .....	33
5. Zusammenfassung .....	34
6. Literaturverzeichnis .....	35
7. Verzeichnis verwendeter Abkürzungen .....	39

## 1. Einleitung

Metastasierende Krebserkrankungen gehören zu den häufigsten Todesursachen weltweit. Neben der unkontrollierten Proliferation sind die Invasion und die Metastasierung weitere wichtige biologische Eigenschaften, welche die Malignität von Tumoren bestimmen. Die zellulären und molekularen Ereignisse, die zu Wachstum und Ausbreitung von Tumoren führen, sind bisher unvollständig verstanden. Die Identifikation molekularer Mechanismen, die an Tumorwachstum und -metastasierung beteiligt sind, ist somit eine Voraussetzung für die Entwicklung neuer therapeutischer Ansätze.

### 1.1. Prinzipien der Tumorinvasion

Die Tumorinvasion ist definiert als ein aktives Einwachsen von entarteten Zellen in das normale, nicht neoplastische Gewebe. Die Metastasierung ist die Folge des invasiven Wachstums mit Eindringen der Tumorzellen in Lymphbahnen, Blutwege oder Körperhöhlen mit nachfolgender Streuung in den Organismus, Absiedlung und erneutem Wachstum in anatomisch entferntem Gewebe (Friedl, 2003). Um zu metastasieren, müssen einzelne vom Tumorverband dissoziierte Zellen durch Basalmembranen, interstitielles Bindegewebe und zelluläre Barrieren, zum Beispiel Blutgefäßendothel, migrieren.

#### 1.1.1. Allgemeine Prinzipien der Zellmigration

Unter Migration versteht man die aktive, durch das Aktinfilamentsystem vermittelte Fortbewegung von Zellen. Die Migration nicht entarteter Zellen über zweidimensionales Substrat wurde als Ergebnis eines Drei-Schritt-Modells aus rezeptorvermittelter Anheftung, Zellkontraktion und Loslösung des Hinterendes der Zelle vom Substrat beschrieben (Lauffenburger und Horwitz, 1996). Die Anheftung der Zellen an das Substrat wird von verschiedenen Adhäsionsmolekülen vermittelt. Insbesondere die Klasse der Integrine, die intrazellulär an das Zytoskelett gekoppelt sind, ist für die Adhäsion von

Bedeutung (Friedl, Zänker et al. 1998). Die am vorderen Zellende gelegenen Pseudopodien sind integrin- und zytoskelettabhängig an den Untergrund gebunden, so dass eine Kontraktion des Aktinfilamentsystems zu einem Zug in Richtung dieses Verankerungspunktes führt. Die Veränderungen des Zytoskeletts während der Kontraktion bewirken zusätzlich eine Ablösung des Zellhinterendes vom Substrat und damit eine Vorwärtsbewegung der Zelle. Durch zyklische Wiederholungen dieses Vorgangs gelingt es den Zellen über Oberflächen zu migrieren. Dieses Drei-Schritt-Modell der Zellmotilität wurde jüngst um einen weiteren Prozess, die perizelluläre Proteolyse erweitert, die den Tumorzellen die Überwindung von Matrixbarrieren erleichtert (Friedl und Wolf, 2003). Dieses Grundprinzip der Zellbewegung gilt neben nicht-neoplastischen Zellen auch für Tumorzellen.

#### 1.1.2. Tumorzellmigration in dreidimensionaler extrazellulärer Matrix

Dreidimensionale extrazelluläre Matrix (ECM) wirkt während der Tumordinvasion als wichtiges Substrat, aber auch als Barriere für migrierende Zellen. Im Gegensatz zu der Zellwanderung über eine zweidimensionale (2-D) Ebene, liegen in 3-D ECM biophysikalische Barrieren vor, die durch das Netzwerk von Bindegewebsfasern, insbesondere Kollagen, gebildet werden. Um diese Hindernisse zu überwinden, bedienen sich die Zellen neben den in 2-D beobachteten Adhäsions- und Loslösungsprozessen zusätzlicher zellulärer und molekularer Mechanismen.

Durch Zytoskelett-vermittelte Veränderungen ihrer Morphologie können sich die Zellen dem umgebenden Gewebe anpassen und sich so auf amöboide Weise fortbewegen, ohne dass es zu einem Matrixumbau kommt (Friedl und Bröcker, 2001). Dieser Mechanismus wird insbesondere für kleine und rundliche Zellen beschrieben, wie Leukozyten, Lymphomzellen oder Zellen des kleinzelligen Bronchialkarzinoms (Friedl und Wolf, 2003).

Bei der Migration größerer Zellen, wie Fibroblasten, Keratinozyten oder den meisten Tumorzellen, kann man eine Degradation der ECM beobachten. Mit Hilfe von Proteasen entstehen umschriebene, teils temporäre, teils irreversible

Defekte im Gewebe, die den Zellen die Migration erleichtern (Murphy et al., 1999).

Bei der Kraftübertragung zwischen Zellen und Matrix während der Migration spielen transmembranöse Adhäsionsmoleküle, die sogenannten Integrine, eine wichtige Rolle. Intrazellulär an das Zytoskelett gekoppelt, können Integrine mit ihrer extrazellulären Domäne an Matrixproteine wie Kollagen oder Fibronectin binden. Integrinvermittelte Zell-Zell bzw. Zell-Matrix Interaktionen erfüllen mit Adhäsion und Migration sowohl statische als auch dynamische Funktionen. Die Blockierung der Subfamilie der  $\beta$ 1-Integrine, die den Kollagenrezeptor  $\alpha$ 2 $\beta$ 1 einschließt, inhibiert die Migration von Zellen, auf denen  $\beta$ 1 exprimiert wird, wie Fibroblasten und Tumorzellen (Maaser et al., 1999).

Matrixdegradierende Proteasen sind Enzyme, die in zellgebundener Form oder zellunabhängig zu Matrixumbau führen können. Durch Sekretion freigesetzte und aktivierte Proteasen sorgen für einen diffusen Matrixumbau (Murphy, 1999). Die ungezielte Degradation kann die Zellmigration durch neu entstandene ECM-Fragmente mit chemotaktischen Eigenschaften oder durch die Erweiterung vorbestehender Matrixdefekte generell erleichtern. Im Gegensatz zu den löslichen, ermöglichen die membranständigen Proteasen eine exakt lokalisierte und streng kontrollierte Proteolyse. So entstehen Gewebsdefekte, die in ihrer Ausdehnung dem Durchmesser der migrierenden Zellen und letztlich dem Migrationspfad entsprechen (Wolf et al., 2003). Insbesondere von Tumorzellen exprimierte Oberflächenproteasen, wie zum Beispiel membranständige Matrixmetalloproteinasen (MT-MMP), werden als bedeutend für den gezielten Matrixabbau während der Tumordinvasion diskutiert (Fridman et al., 1995). MMPs verfügen über eine breite Substratspezifität und tragen durch die Spaltung von Kollagen, Laminin und weiteren ECM Proteinen (Stracke et al., 2000) zur Matrixdegradation und Tumorzellmigration bei. Experimentell lässt sich die Tumordinvasion durch Gewebsinhibitoren von MMPs (tissue inhibitors of metalloproteinase, TIMP) hemmen, während eine MMP-Aufregulation mit einer gesteigerten Invasivität korreliert ist (Wick et al., 1998). Unterschiedliche murine Krebsmodelle zeigen, dass die Mehrzahl der MMPs, TIMPs und anderer den Matrixumbau regulierenden Komponenten sowohl von

den Tumorzellen selbst, als auch von Zellen des umgebenden, nicht neoplastischen Tumorstromas exprimiert werden können (Madlener et al., 1998).

### 1.1.3. Veränderungen im tumorumgebenden Stroma

Die Neuformierung eines Gewebes in direkter Umgebung eines primären Tumors ist ein wichtiger Bestandteil der Karzinogenese unterschiedlicher Tumoren (Park et al., 1999). Die Aktivierung der Zellen im reaktiven Stroma induziert charakteristische zelluläre und molekulare Veränderungen, die für verschiedene Tumoren durchaus ähnlich sind, aber keinem spezifisch-neoplastischen Programm folgen, sondern einem Regenerationsprogramm, das Gemeinsamkeiten mit Wundheilungs- oder chronischem Entzündungsgewebe aufweist.

Am Beispiel epithelialer Tumoren wurde die Einsprossung von Blutgefäßen, sowie die Einwanderung und Aktivierung von Gewebsfibroblasten, Lymphozyten und Makrophagen beobachtet (Scanlan et al., 1994). Insbesondere Fibroblasten und aktivierte Makrophagen synthetisieren zahlreiche, auch von Tumorzellen exprimierte und für die Tumordinvasion bedeutsame Proteasen, wie MMP-1, MMP-2, MMP-3 und MMP-11. MT-MMPs, eine Subfamilie der MMPs mit kollagenolytischer und fibrinolytischer Aktivität, werden überwiegend im reaktiven Tumorstroma exprimiert (Murphy et al., 1999).

Die Tumorzellmigration durch biophysikalische Barrieren ist also nicht allein von den morphologischen und proteolytischen Veränderungen der entarteten Zellen selbst, sondern wahrscheinlich auch vom umgebenden reaktiven Tumorstroma abhängig.

Ein neueres, im reaktiven Tumorstroma identifiziertes Protein, überwiegend auf der Oberfläche von aktivierten Fibroblasten exprimiert, wird Fibroblasten Aktivierungs Protein (FAP) genannt (Mathew et al., 1994). FAP weist bezüglich seines Expressionsmusters und seiner molekularen Eigenschaften Besonderheiten auf, die eine spezifische Funktion im Rahmen der Tumordinvasion nahe legen.

## 1.2. Vorkommen von FAP

Immunhistochemische Studien konnten die Expression von FAP in fast allen malignen epithelialen Primärtumoren und teilweise in deren Metastasen nachweisen. Mehr als 90% der untersuchten Mamma-, Lungen- und kolorektalen Karzinome enthalten eine Vielzahl FAP-positiver Fibroblasten im reaktiven Tumorstroma, während die Tumorzellen selbst FAP-negativ sind (Mathew, 1994). Seltener sind Tumoren nicht-epithelialen Ursprungs FAP-positiv. Dagegen zeigt das umgebende Stroma benigner Tumoren epithelialen Ursprungs, wie Fibroadenome der Brust oder kolorektale Adenome, keine Aufregulation von FAP (Garin-Chesa et al., 1990). Somit besteht eine Beziehung zwischen der Aufregulation von FAP und der Malignität epithelialer Tumoren.

FAP-positive Fibroblasten begleiten Blutgefäße, die neu in den Tumor einsprossen, und bilden ein zelluläres Kompartiment zwischen dem Endothel der Tumorkapillaren und der basalen Seite der Tumorzellen (Scanlan et al., 1994). Ausser in Karzinomen wird FAP vorübergehend von Fibroblasten im Granulationsgewebe der Wundheilung und in fetalem Bindegewebe exprimiert. Alle nicht-entzündeten, nicht-entarteten Gewebe des Erwachsenen sind dagegen FAP-negativ. Da FAP nicht nur spezifisch in Tumoren lokalisiert ist, sondern auch eine Funktion im Matrixumbau erfüllt (Park, 1999), könnte FAP eine interessante Zielstruktur zur Hemmung von Tumorinvasion und Entzündungsprozessen darstellen.

## 1.3. Biochemische und molekulare Eigenschaften von FAP

Das für FAP kodierende Gen ist auf Chromosom 2 lokalisiert (Mathew, 1994). FAP ist ein membranständiges Glykoprotein vom Typ II mit einer großen extrazellulären Domäne, einem transmembranösen Segment und einem kurzen zytoplasmatischen Anteil. Nahe dem extrazellulären COOH-Ende konnten drei katalytische Domänen identifiziert werden, die charakteristisch für Serinproteasen sind. FAP weist sequenzielle Homologien zu einer Subfamilie

der Serinproteasen, den Dipeptidylpeptidasen vom Typ IV (DPP-IV) auf. Die Aminosäuresequenzen von FAP und DPP-IV sind zu 48% identisch (Scanlan, 1994).

Neben der strukturellen Homologie zeigt FAP auch eine funktionelle Homologie zu DPP-IV. FAP spaltet *in vitro* prolinhaltige Dipeptide, also typische Substrate von DPP-IV. Der Austausch eines Serinrestes im aktiven Zentrum von FAP gegen Alanin beziehungsweise die Behandlung mit einem spezifischen Serinproteasehemmer führen zum Verlust dieser Dipeptidylpeptidaseaktivität und bestätigen die funktionelle Homologie von FAP zur Familie der Serinproteasen (Park, 1999).

Im Gegensatz zu DPP-IV weist FAP auch kollagenolytische Aktivität auf. Bei der Behandlung unterschiedlicher ECM-Proteine mit Extrakten FAP-haltiger Zellmembranen oder mit rekombinantem FAP kommt es zu einem spezifischen Abbau von Kollagen Typ I, während alle anderen untersuchten Proteine (unter anderem Tenascin, Vitronectin, Kollagen Typ II und V) nicht gespalten werden (Park, 1999). Der Verlust der DPP-Aktivität nach Verdünnung der FAP-haltigen Membranauszügen zeigt bei erhaltener kollagenolytischer Aktivität, dass FAP eine besonders hohe Spezifität für Kollagen hat. Auf Grund der Fähigkeit, selektiv Kollagen Typ I abzubauen, könnte FAP zu der Gruppe der Enzyme zählen, die am Matrixumbau in tumorumgebenden Gewebe beteiligt sind.

Die Identifikation von *in vitro* Substraten von FAP ermöglichte es, die *in vivo* Enzymaktivität von FAP zu untersuchen. In Biopsien aus kolorektalen Karzinomen konnte die FAP-vermittelte Degradation von Gelatin (*in situ* Proteolyse) nachgewiesen werden, während in Gewebeproben aus gesunder Darmschleimhaut desselben Patienten wenig oder keine Aktivität festgestellt wurde (Park, 1999). Neben der Lokalisation der FAP-Expression auf tumornahen Fibroblasten, lassen somit auch die proteolytischen Eigenschaften von FAP *in vitro* und *in situ* auf eine Beteiligung am Invasionsgeschehen epithelialer Tumoren schließen.

#### 1.4. FAP als Zielstruktur der Pharmakotherapie von Krebserkrankungen

Ein aktueller Ansatz die Tumorprogression zu hemmen, ist der Einsatz pharmakologischer Inhibitoren gegen Matrixproteasen (Garin-Chesa, 1990). Die bekannten Eigenschaften von FAP machen es zu einem geeigneten Zielprotein für die Pharmakotherapie von Tumorerkrankungen:

Aufgrund des spezifischen Vorkommens von FAP im reaktiven Tumorstroma könnten im Rahmen einer Therapie mit FAP-Inhibitoren maligne epitheliale Tumoren und deren Metastasen beeinflusst werden, ohne dass Nebenwirkungen auf die sonstige Gewebshomöostase zu erwarten sind. Das konstante Expressionsmuster von FAP auf aktivierten Gewebsfibroblasten und nicht etwa auf genetisch instabilen Tumorzellen macht eine langfristige Wirkung von FAP-Inhibitoren ohne Resistenzentwicklung wahrscheinlich. Die Lokalisation der FAP-positiven Fibroblasten in direkter Nachbarschaft zum Endothel der Tumorkapillaren würde die lokale Wirksamkeit von FAP-Inhibitoren nach intravenöser Applikation gewährleisten (Welt, 1994).

#### 1.5. Ziel der Arbeit

Zur Etablierung von FAP als Zielstruktur der Tumorinvasion ist die Definition der Funktion von FAP in Zell-Matrix-Interaktionen und seine Beteiligung an der Zellmigration notwendig.

In der vorliegenden Arbeit sollte zunächst die Expression und die Lokalisation von FAP auf der Oberfläche von FAP-positiven, fibroblastoiden Zellen untersucht werden. Auf Grund der kollagenolytischen Aktivität von FAP in vitro wurde der Frage nachgegangen, ob und wie sich das Expressionsmuster von FAP bei Kollagenkontakt der FAP-positiven Zellen verändert. Die Darstellung der Lokalisation von FAP im Vergleich zu  $\beta$ 1-Integrinen sollte zeigen, ob FAP Kontakt zu fibrillärem Kollagen, und somit räumlichen Zugriff auf das Substrat erhält.

Das Hauptziel der Arbeit war, die Bedeutung von FAP für die Zellmigration mit Hilfe synthetischer FAP-Inhibitoren darzustellen. Es sollte geklärt werden, ob

die Migration FAP-positiver Zellen in dreidimensionaler Kollagenmatrix durch die Behandlung mit FAP-Inhibitoren gehemmt wird. Um den Mechanismus, mit dem FAP an der Migration beteiligt ist, näher zu definieren, wurde anschließend der Einfluss von FAP-Inhibitoren auf die Kollagenkontraktion, die als Indikator für Zell-vermittelte Traktion und Matrixumbau während der Zellmigration dient, untersucht.

## **2. Material und Methoden**

### **2.1. Reagenzien und Geräte**

Die verwendeten nicht transfizierten Zellen der menschlichen Fibrosarkomzelllinie HT1080 stammten von der American Type Culture Collection (ATCC). Es wurden zwei HT 1080 Klone untersucht, die das humane (Klon 33) oder das murine (Klon 13.8) FAP Gen überexprimierten. Beide Klone wurden von Boehringer Ingelheim, Biberach a. d. Riss, zur Verfügung gestellt. Als Kontrolle diente ein mit Leervektor transfizierter Klon (Klon Neomex). Prof. Dr. Alex Stongin (The Burnham Institute, La Jolla, USA) überließ uns HT 1080 Zellen, die mit einem für MT1-MMP kodierenden Konstrukt transfiziert waren (Klon 23). Für Versuche zur Kollagenkontraktion wurden GM 5387 Zellen (humane Lungenfibroblasten, Boehringer Ingelheim) eingesetzt.

Dulbeccos modifiziertes Eagle Medium (DMEM) (Flow Laboratories, VA, USA) und 10%iges fetales Kälberserum (Hans F12, Boehringer Mannheim) wurde zur Flüssigkultur der Zellen verwendet. Neben Penicillin und Streptomycin (Gibco BRL, Eggenstein-Leopoldshafen) wurde zur Selektion von plasmidpositiven Zellen das Antibiotikum G418 (Calbiochem-Novabiochem GmbH, Bad Soden) hinzugegeben. PBS und HEPES (Sigma, Deisenhofen) dienten als Puffer.

Zur Herstellung des 3-D Matrixmodells wurde in 0,02M HCl gelöstes Rinderhautkollagen (Nutracon BV, Leimuiden, Niederlande) bezogen.

Nach Anfärbung mittels Propidium Iodid (PI) wurden die Vitalität der Zellen mit einem Durchflusszytometer (Becton-Dickinson) geprüft. Auch die quantitative Untersuchung der Oberflächenexpression der Zellen (siehe 2.4.1.) wurde durchflusszytometrisch durchgeführt. Die Oberflächenverteilung der exprimierten Proteine wurde mit einem konfokalen Mikroskop (Leica TC5-4D) dargestellt.

Die Wirkungen des FAP-Inhibitors BIBX 1899 und der Kontrollsubstanz 1954 (beide von Boehringer Ingelheim) auf die Zellmigration wurde mittels

Mikroskopie und Videorecorder visualisiert und anschließend computergesteuert ausgewertet.

## 2.2. Kultivierung der Zellen

Zur Analyse ihrer Viabilität und ihrer Oberflächeneigenschaften mittels Durchflusszytometrie wurden die Zellen in Flüssigkultur angezüchtet. Dagegen wurden zur Darstellung der Oberflächeneigenschaften im konfokalen Mikroskop und zur Funktionstestung hinsichtlich Migration und Kollagenkontraktion in 3-D Kollagenmatrix kultivierte Zellen verwendet.

### 2.2.1. Flüssigkultur

Die Zellen wurden in einer 1:1 Mischung aus DMEM und Hams F12 zusammen mit 200µg G418/ml angezüchtet. Sofern nicht anders angegeben, wurden die Kulturen bei 37°C in befeuchteter Luft mit einem CO<sub>2</sub>-Gehalt von 5% gehalten und alle zwei oder drei Tage nach Ablösung mit Trypsin (100u) und 0,2mM EDTA zentrifugiert und passagiert.

### 2.2.2. Einpolymerisation und Kultur der Zellen in dreidimensionalem Kollagen

Die Lösung des Rinderhautkollagens (750µl) wurde mit zehnfachem DMEM (150µl) vermischt und mit 7,5%igem Natriumbikarbonat (50µl) auf einen pH-Wert von 7,4 neutralisiert. Diese Lösung polymerisierte spontan 30 Minuten bei 37°C in einer selbst konstruierten Kammer. Zu 900µl dieser Kollagenlösung wurden 750µl der Zellsuspension zugegeben. Die Endkonzentration betrug 1,7mg Kollagen/ml und 20.000 Zellen/100µl Endvolumen.

### 2.3. Nachweis der Vitalität der Zellen

Zur Bestimmung ihrer Vitalität wurden die Zellen im Durchflusszytometer auf ihre Größe (FSC), ihre Granulation (SSC) und die Intaktheit ihrer Membran untersucht. Zellen mit nicht intakter Membran wurden mit einer PI-Lösung angefärbt, die bei einem pH von 7,4 in PBS mit einer Konzentration von 50µg PI/ml vorbereitet und bei einer Temperatur von 4°C aufbewahrt wurde. Die Vitalitätsprüfung wurde sowohl vor als auch nach Behandlung der Zellen mit der Inhibitor- bzw. Kontrollsubstanzlösung durchgeführt.

### 2.4. Nachweis der oberflächlichen Expression von FAP

Um die Oberflächeneigenschaften der Zellen, speziell ihre Expression der Oberflächenproteine FAP und  $\beta$ 1-Integrin, zu definieren, kamen die monoklonalen, mit fluoreszierendem Isothiocyanat (FITC) konjugierten Antikörper 4B4 ( $\beta$ 1-Integrin spezifisch; Immunotech GmbH, Hamburg) und 3D11 (FAP-spezifisch; Dr. Rettig) zum Einsatz. Zur Kontrolle wurde die unspezifische Fluoreszenz mit polyklonalen, FITC-konjugierten IgG1 Antikörpern (Immunotech GmbH, Hamburg) im Medium sowie mit LRSC (Lissamin Rhodamin B Sulfonylchlorid)-konjugierten, affinitätsbefreiten anti-Maus IgG (Fab) Fragmenten der Ziege (Jackson Immuno Research Lab. Inc.-Dianova, Hamburg) im Kollagen dargestellt.

Anschließend wurden die Zellen im Durchflusszytometer auf die Quantität ihrer FAP Expression überprüft beziehungsweise die Oberflächenverteilung von FAP und  $\beta$ 1-Integrin konfokalmikroskopisch veranschaulicht.

#### 2.4.1. Durchflusszytometrie

Zur Gegenüberstellung ihrer unterschiedlichen Oberflächeneigenschaften hinsichtlich der FAP-Expression wurden die Zellen der verschiedenen Zellklone unter Vermeidung von Trypsin - wegen möglicher Degradation von Oberflächenproteinen - durch EDTA (2mM) in PBS von der Kulturplatte

abgelöst. Nach dreimaligem Waschen mit 10%igem FCS-haltigem PBS wurden die Zellen zur Darstellung der unspezifischen Fluoreszenz mit unkonjugierten, primären, monoklonalen Antikörpern mit einer Konzentration von 10µg/ml für 30 Minuten bei 4°C inkubiert und anschließend nach erneutem zweimaligem Waschen mit polyklonalen, fluoreszierenden Antikörpern angefärbt. Die unspezifische Fluoreszenz wurde mit der Fluoreszenz im Durchflusszytometer nach Behandlung der Zellen mit 3D11 bzw. 4B4 verglichen. Die Methode der Ablösung beeinflusst das Expressionsmuster der Oberflächenproteine nicht (Maaser et al., 1999).

#### 2.4.2. Konfokalmikroskopie

Um die Verteilung der Oberflächenproteine FAP-positiver Zellen im Kollagen zu untersuchen, wurden die Zellen in Kollagen einpolymerisiert und für zwölf Stunden bei 37°C kultiviert. Nach kurzem Abspülen mit vorgewärmtem DPBS wurden die Zellen bei 37°C mit 4%igem Paraformaldehyd in DPBS Lösung fixiert. Nach erneutem dreimaligen Waschen mit DPBS wurden die Zellen für 45 Minuten bei Raumtemperatur mit monoklonalen, in PBS mit einer Konzentration von 10µg/ml gelösten 3D11- oder 4B4-Antikörpern in einer befeuchteten Kammer inkubiert. Zur Darstellung der Hintergrundfluoreszenz wurden die Zellen erneut gewaschen und mit LRSC-konjugierten, affinitätsgereinigten anti-Maus IgG (Fab) Fragmenten der Ziege (1µg/ml) angefärbt. Anschließend wurden die Zellen mit einem konfokalen Leica TCS 4D Laserscanningmikroskop (Objektiv 63x; NA 1,4) analysiert.

#### 2.5. Nachweis der Wirkung des Inhibitors bzw. der Kontrollsubstanz

Die beiden zur Verfügung stehenden Stoffe BIBX 1899 und BIBX 1954, von denen initial nicht bekannt war, bei welchem es sich um den Inhibitor bzw. die Kontrollsubstanz handelt, wurden auf die Beeinflussung der Zellmigration und der Kollagenkontraktion untersucht.

### 2.5.1. Behandlung der Zellen mit Inhibitor bzw. Kontrollsubstanz

Um die Wirkungen des Inhibitors BIBX 1899 und der Kontrollsubstanz BIBX 1954 zu vergleichen, wurden jeweils Lösungen mit einer Konzentrationen von 10mM in 90%igem Methanol mit 1M HEPES bei einem pH von 7,4 vorbereitet, auf unterschiedliche Konzentrationen verdünnt und mit Zellen im Kollagengel über 24 Stunden inkubiert.

### 2.5.2. Nachweis der Migrationshemmung durch BIBX 1899

Um die Migration der mit der jeweiligen Substanz behandelten HT 1080 Zellen zu quantifizieren, wurden das Wanderungsverhalten der Zellen mittels Zeitraffervideomikroskopie beobachtet und computergesteuert ausgewertet.

#### 2.5.2.1. Zeitraffervideomikroskopie der migrierenden Zellen

Nach Zugabe des Inhibitors oder der Kontrollsubstanz wurden die Bewegungen der Zellen im Kollagen über 18 Stunden bei konstanten 37°C unter dem Mikroskop mit 100facher Vergrößerung mittels Videorecorder aufgenommen. Sieben Versuchsansätze mit unterschiedlichen Inhibitoren bzw. Konzentrationen, aber mit Zellen aus der identischen Zellkultur wurden gleichzeitig unter je einem Mikroskop beobachtet. So wurde gewährleistet, dass unterschiedliches Migrationsverhalten nicht durch den Zustand der Zellkulturen, sondern ausschließlich durch die Inhibitorwirkung bedingt war. Die entstandenen Filme wurden im Zeitraffer abgespielt, und das Migrationsverhalten von je 30 Zellen pro Film computergesteuert analysiert. Die beobachteten Zellen wurden zufällig, also unabhängig von Morphologie oder Migrationspotential, ausgewählt.

#### 2.5.2.2. Computerassistiertes Zelltracking

Für jede untersuchte Zelle wurde die mittlere Geschwindigkeit über den gesamten Beobachtungszeitraum („speed“) sowie die Geschwindigkeit aktiver Phasen (abzüglich Migrationspausen) ermittelt („velocity“). Weiterhin wurde in 15 Minuten-Intervallen der Prozentsatz der sich bewegenden Zellen definiert („locomotion“). Die Migrationspfade der einzelnen Zellen wurden anhand der x- und y-Position graphisch dargestellt. Für jede Versuchsbedingung wurden mindestens 3 unabhängige Versuche durchgeführt. Die Daten wurden mit dem student-t Test für unabhängige Ereignisse ausgewertet. Unterschiede im Migrationsverhalten wurden für  $p < 0,05$  als signifikant beschrieben.

#### 2.5.3. Nachweis der FAP spezifischen Hemmung der Kollagenkontraktion durch BIBX 1899

Um den Einfluss von FAP auf die Kollagenkontraktion zu untersuchen, wurden in einer 1:1 Mischung aus DMEM und Hams F12 angezüchtete und mit 10%igem fetalem Kälberserum ernährte GM 5387 Zellen in 24-Lochplatten zu einer Kollagenlösung (vorbereitet wie in Kap. 2.2.2. beschrieben) gegeben. Wieder wurde die zellhaltige Kollagenlösung mit unterschiedlichen Konzentrationen des FAP-Inhibitors BIBX 1899 oder der Kontrollsubstanz BIBX 1954 oder mit 0,1%igem Methanol behandelt. Die von der Kollagenlösung bedeckte Fläche wurde digital erfasst und durch die Anzahl der Pixel quantifiziert (NIH Image Software). Die Verkleinerung der Fläche durch die Kollagenkontraktion wurde über 96 Stunden dokumentiert. Die statistische Auswertung wurde erneut mit Hilfe des student-t Tests bei einem Signifikanzniveau von 5% durchgeführt.

### **3. Ergebnisse**

FAP ist eine Oberflächenprotease mit kollagenolytischer Aktivität in vitro, die in vivo spezifisch auf Fibroblasten in der Umgebung maligner epithelialer Tumoren aufreguliert ist und an der Tumorprogression beteiligt sein könnte. Um die Rolle von FAP bei der Tumorausbreitung näher einzugrenzen und so weitere Aufschlüsse über seine Eignung als Zielstruktur pharmakologischer Therapie zu erhalten, wurden in der vorliegenden Studie funktionelle Untersuchungen zu FAP durchgeführt: FAP wurde auf seine Beteiligung an der Migration und am Matrixumbau von FAP-positiven Zellen überprüft.

#### **3.1. Expression und Verteilung von FAP an der Oberfläche transfizierter HT 1080 Zellen**

Zum Nachweis FAP-spezifischer Inhibitorwirkungen wurden fibroblastenartige HT 1080 Fibrosarkomzellen eingesetzt. Es standen zwei unterschiedliche, stabil transfizierte, FAP-positive HT 1080 Zellklone zur Verfügung, die FAP konstant auf ihrer Oberfläche exprimierten: Klon 33, der das humane FAP überexprimierte, sowie Klon 13.8, der murines FAP exprimiert. Zu Kontrollzwecken wurden die FAP-negativen, ebenfalls stabil transfizierten HT 1080 Zelllinien Klon Neomex und Klon 23 verwendet. Klon 23 überexprimierte die membranständige Matrix-Metalloprotease MT1-MMP, Klon Neomex war mit einem Leervektor transfiziert. Zunächst wurde die FAP-Oberflächenexpression auf den Zellen aller eingesetzten Zellklone im Medium und im Kollagen untersucht. Weiterhin wurde die Verteilung von FAP auf der Zellmembran dargestellt und mit Kollagenkontaktstellen verglichen.

##### **3.1.1. Darstellung der Oberflächenexpression mittels FACS**

Um die FAP-Oberflächenexpression der mit einem FAP-Gen transfizierten Zellklone 33 und 13.8 zu beweisen, wurden die Zellen nach der Anzucht im Medium mit fluoreszierenden Antikörpern unterschiedlicher Spezifität behandelt

und nach der Vitalitätsprüfung durchflusszytometrisch auf ihre Fluoreszenz überprüft.

Bei allen Zellklonen ergab sich für sekundäre, polyklonale IgG1 Antikörper eine geringe unspezifische Fluoreszenz als Negativkontrolle (Abbildung 1, linke Spalte). Die stark positive Fluoreszenz nach Markierung von  $\beta$ 1-Integrinen mit dem anti- $\beta$ 1-Integrin Antikörper 4B4 diente als Positivkontrolle (Ergebnisse nicht dargestellt). Die Mittelwerte der Fluoreszenzen nach Behandlung mit dem FAP-spezifischen Antikörper 3D11 (Abb. 1, mittlere Spalte) waren für Klon 13.8 und insbesondere Klon 33 deutlich höher als die unspezifische Fluoreszenz. Für die Klone Neomex und 23 war kein signifikanter Unterschied zwischen unspezifischer und FAP-spezifischer Fluoreszenz festzustellen.

Durch die FACS-Ergebnisse konnte somit für die Zellklone 33 und 13.8 eine deutliche und stabile Oberflächenexpression von FAP nachgewiesen werden, während mit Klon 23 und Klon Neomex zwei FAP-negative Kontrollen zur Verfügung standen.

### 3.1.2. Aufregulation der Expression durch Kollagen

Die FAP-Expression der Klone 33 und 13.8 wurde auch nach der Kultur im 3D-Kollagen überprüft, um eine zuverlässige FAP-Oberflächenexpression für die Migrationsbedingungen in 3D Kollagenmatrices zu bestätigen.

Auch nach einer zwölfstündigen Kultur im Kollagen exprimierten ausschließlich solche Zellen FAP, die mit FAP-Gen tragenden Plasmiden transfiziert waren (Abb. 1 F und I), während Klon Neomex (Abb. 1 C) und Klon 23 (ohne Abbildung) FAP-negativ blieben.

Die Fluoreszenzen der beiden FAP-positiven Zellklone waren nach der Behandlung mit 3D11 im Kollagen signifikant höher als im Medium: der Fluoreszenzmittelwert nahm für Kl. 13.8 um 50% zu (Abb. 1 E und F), für Kl. 33 versiebenfachte er sich (Abb. 1 H, I und L).

Zusammenfassend kam es nach konstitutiver Überexpression in HT1080 Zellen durch Kontakt zum Kollagen vor allem für humanes, aber auch für murines FAP zu einer deutlichen Aufregulation der Oberflächenexpression.

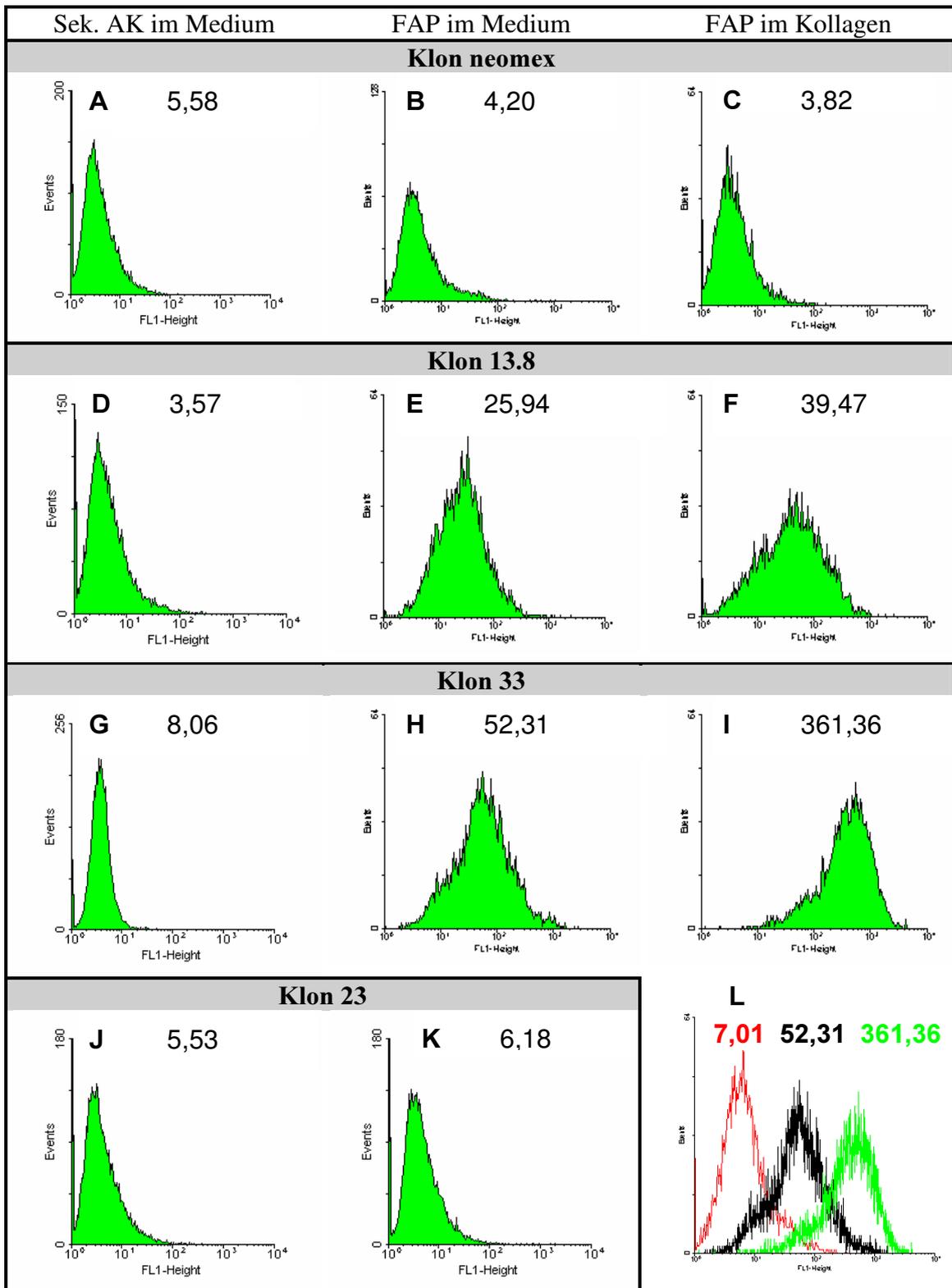


Abbildung 1: FAP-Expression im Medium und Aufregulation von FAP im Kollagen für die transfizierten Zellklone Kl. 33 und Kl. 13.8 im Vergleich zu Kl. Neomex und Kl. 23. Die Daten zeigen den Mittelwert der Fluoreszenz, nachdem die Zellen mit EDTA gelöst, gewaschen und mit IgG1 (sekundärer Ak) bzw. 3D11 (FAP) gefärbt wurden. Von der Messung wurden abgestorbene (PI-positive) Zellen ausgeschlossen. Die unspezifische Fluoreszenz für Zellen aus Kollagen unterschied sich nicht von den Mediumkontrollen (ohne Abbildung). Im Diagramm L wurde zur Verdeutlichung der FAP-Aufregulation nach Kultur in 3D-Kollagenmatrices für Kl. 33 die unspezifische Fluoreszenz im Kollagen (rot), den 3D11 Fluoreszenzen im Medium (schwarz) und im Kollagen (grün) gegenübergestellt.

### 3.1.3. Kolokalisation von FAP mit $\beta$ 1-Integrinen an Zell-Matrix-Kontaktstellen migrierender Zellen

Um zu klären, ob die Lokalisation von FAP an der Zelloberfläche in räumlichen Kontakt zu Kollagenfasern, also an das Substrat von FAP tritt, wurden HT1080/33 Zellen im Kollagen konfokalmikroskopisch untersucht. Hierzu wurden neben FAP auch  $\beta$ 1-Integrine als Kollagenrezeptoren an der Zelloberfläche dargestellt, sowie die Kollagenfasern selbst mittels Reflexionskontrast dreidimensional rekonstruiert.

Für spindelförmige bipolare, also zum Fixierungszeitpunkt wahrscheinlich nicht migrierende Zellen (Abb. 2 A) zeigte sich, insbesondere in direkter Nähe zu Kollagenfasern, Koclustering und eine teilweise Kolokalisation von FAP und  $\beta$ 1-Integrin. Die bevorzugte Lokalisation von FAP und  $\beta$ 1-Integrin an den Polen der jeweils polarisierten Zellen war während der Migration (Abb. 2 B) noch deutlicher zu erkennen als für nicht migrierende Zellen. Am in Wanderungsrichtung hinteren Pol wurde deutlich mehr FAP-Expression als am vorderen nachgewiesen und kleine Mengen wurden vom Hinterende der Zelle ausgehend an Matrixfasern haftend deponiert.

Die besonders stark an den Polen der Zellen vorhandene Kolokalisation von FAP und  $\beta$ 1-Integrin sprach dafür, dass FAP sein physiologisches Substrat Kollagen topographisch erreicht.

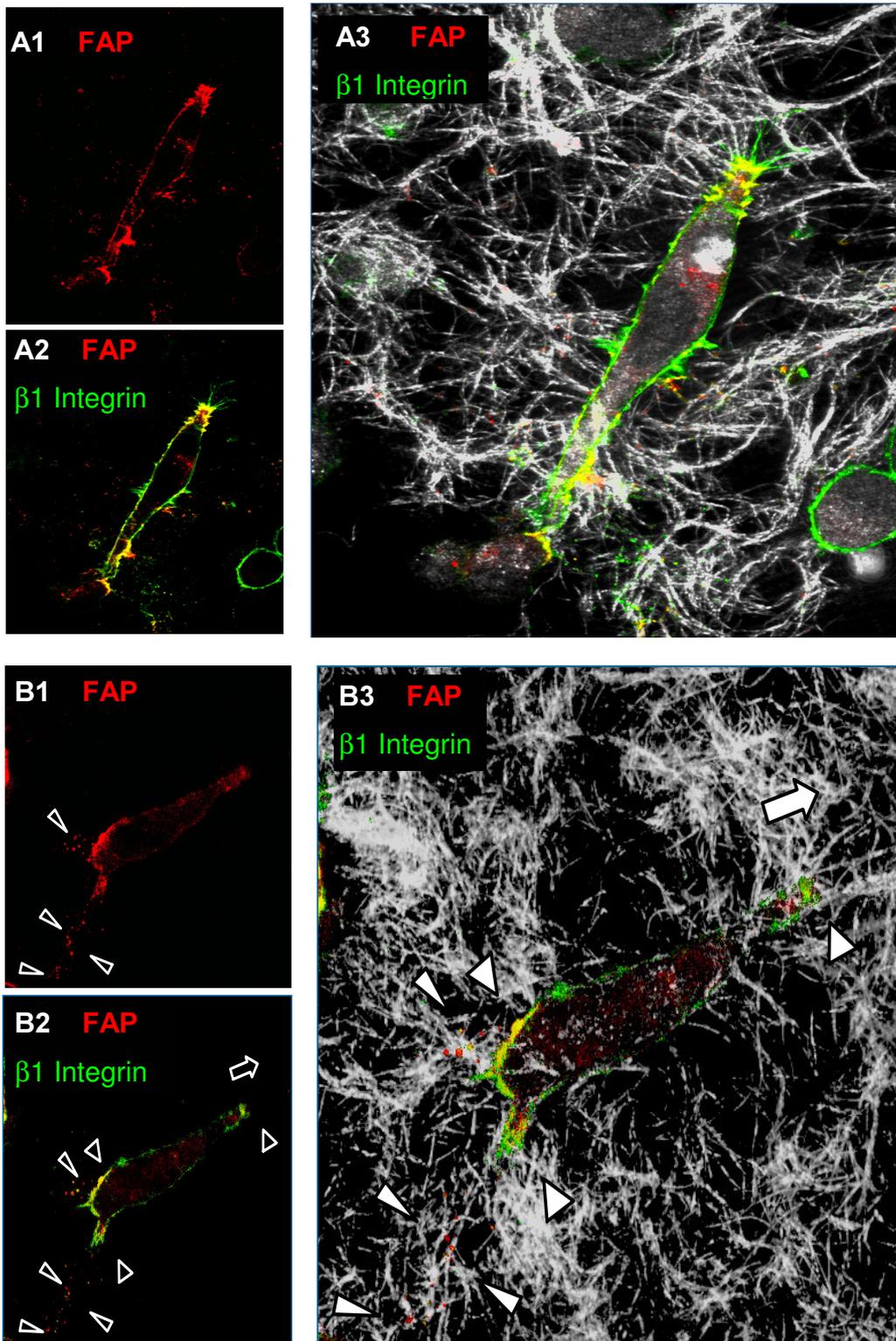


Abbildung 2: Konfokalmikroskopische Detektion der Oberflächenproteine einer nicht migrierenden (A) und einer in Pfeilrichtung migrierenden (B) Zelle des Kl. 33 in der 3D Kollagenmatrix. Nach Anfärbung mit 3D11 (FAP, rot) und 4B4 ( $\beta$ 1-Integrin, grün) wird die Kolokalisation (gelb) deutlich. In A3 und B3 wurde die 3D Kollagenmatrix mittels Reflexionskontrast (grau) dargestellt.

### 3.2. Wirkung der Inhibitoren

Die Wirkung des FAP-Inhibitors BIBX 1899 (und der chemisch ähnlichen Kontrollsubstanz BIBX 1954) auf die Migration von HT1080 Zellen und die Kollagenkontraktion von GM5387 Fibroblasten wurde analysiert um die funktionelle Beteiligung von FAP am Matrixumbau während der Zellmigration aufzuzeigen.

#### 3.2.1. Dosisfindung einer nicht toxischen FAP- Inhibitorkonzentration für in vitro Langzeitversuche

Zur Dosisfindung wurden zunächst mittels Propidiumiodid (PI) die Auswirkungen unterschiedlich konzentrierter Lösungen des Inhibitors bzw. der Kontrollsubstanz auf die Vitalität der Zellen untersucht.

Nach der Behandlung mit dem FAP-Inhibitor BIBX 1899 waren maximal 6% der Zellen PI-positiv (Abb. 3 A), während in der Negativkontrolle mit dem Lösungsmittel MeOH keine PI-positiven Zellen nachweisbar waren. Für zunehmende Konzentrationen des FAP-Inhibitors bestand keine vermehrte Toxizität. Die Kontrollsubstanz (Abb. 3 B) war stärker toxisch und wies bei steigenden Konzentrationen eine Zunahme der PI-positiven Zellen bis zu einem Anteil von etwa 16% bei 50mM BIBX 1954 auf.

Die Migrationsversuche wurden aufgrund des insgesamt vergleichbaren Toxizitätsprofil für beide Substanzen zeitgleich durchgeführt. Nach Inkubation mit steigenden Konzentrationen bis 50  $\mu$ M beider Substanzen zeigte sich kein erkennbarer zunehmender Zellzerfall (visuelle Auswertung der Filme; vgl. 3.2.2.1.1.). Neben Zellen von Klon 33 wurden auch die Zellen der anderen verwendeten Klone in identischen Versuchsanordnungen auf ihre Vitalität nach Inhibitorbehandlung überprüft. Es ergaben sich hier übereinstimmende Ergebnisse, die nicht abgebildet sind.

Mit BIBX 1899 und BIBX 1954 standen somit ein FAP-Inhibitor und eine Kontrollsubstanz für funktionelle Untersuchungen zur Verfügung, die bis zu einer Konzentration von 50 $\mu$ M nur gering toxisch waren.

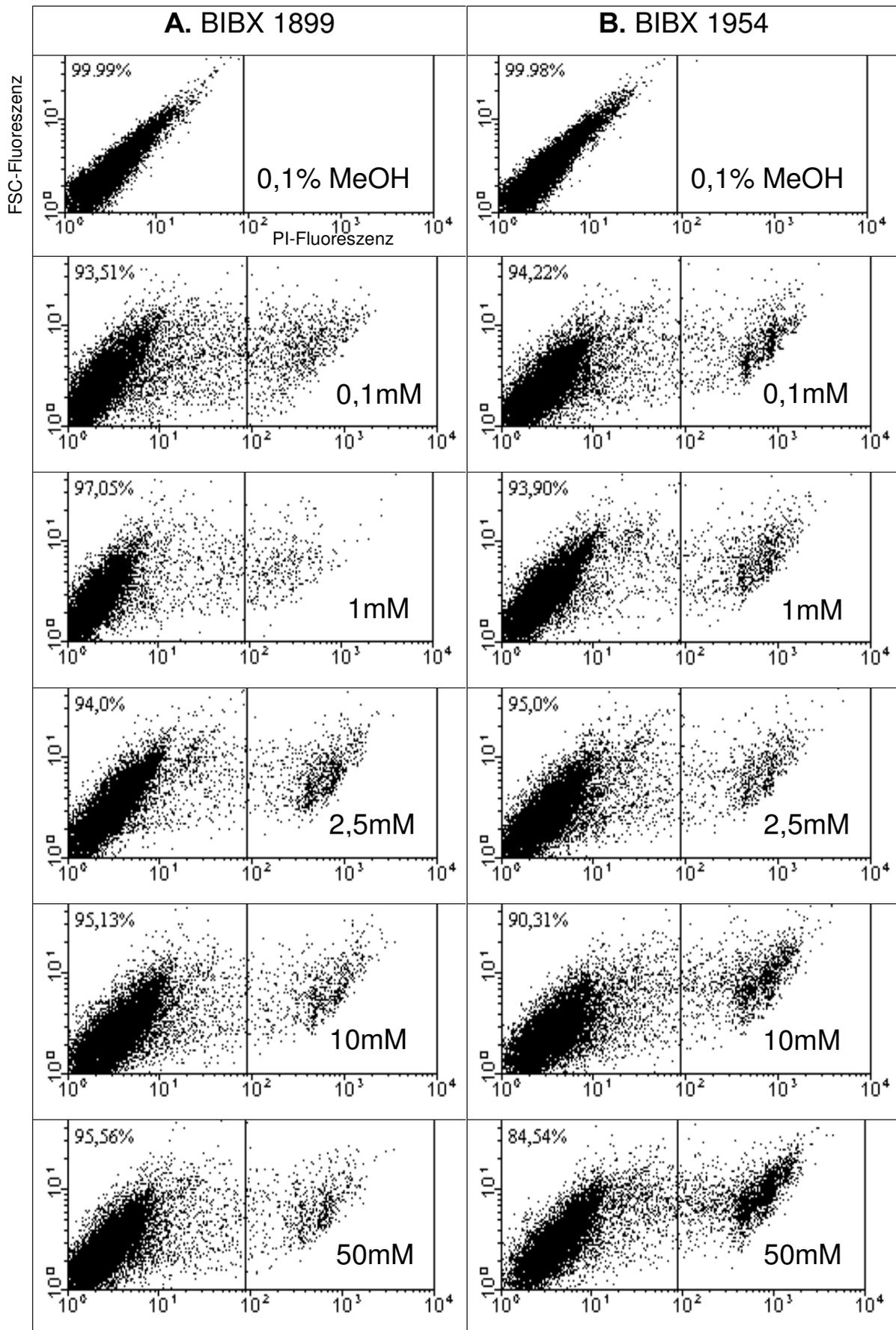


Abbildung 3: Logarithmische Aufzeichnung der Fluoreszenz von KI. 33 Zellen nach Behandlung mit unterschiedlichen Konzentrationen des FAP-Inhibitors BIBX 1899 bzw. der Kontrollsubstanz BIBX 1954 und anschließender Färbung mit Propidium Iodid (x-Achse). Zur Kontrolle sind zwei Ergebnisse nach MeOH-Behandlung dargestellt (Negativkontrolle). Die Prozentangaben geben den Anteil der PI-negativen, also vitalen Zellen an. Die FSC-Fluoreszenz (y-Achse) beschreibt die Zellgröße.

### 3.2.2. Bedeutung des FAP für die Migration

Das Wanderungsverhalten FAP-positiver und FAP-negativer Zellen im Kollagen wurde nach Behandlung mit dem FAP-Inhibitor BIBX 1899 bzw. der Kontrollsubstanz BIBX 1954 mittels Videomikroskopie visualisiert und anschließend computergesteuert ausgewertet, um eine mögliche Beteiligung von FAP an der Zellmigration in vitro zu erfassen.

#### 3.2.2.1. Dosisabhängige Migrationshemmung von FAP-positiven Zellen durch BIBX 1899

Die Migrationspfade und die Migrationsgeschwindigkeit der FAP-positiven Zellen nach Behandlung mit unterschiedlichen Konzentrationen des FAP-Inhibitors zeigten eine dosisabhängige Hemmung der Zellmigration.

##### 3.2.2.1.1. Verkürzung der Migrationspfade

Die Länge der Migrationspfade von 30 beliebig ausgewählten Zellen nahm nach Behandlung mit BIBX 1899 dosisabhängig ab (Abb. 4). Während der von den Zellen zurückgelegte Weg nach Behandlung mit 2,5µM BIBX 1899 nur unwesentlich kürzer war als nach Behandlung mit der Kontrollsubstanz MeOH, verkürzten sich die Migrationspfade bei FAP-Inhibitorkonzentrationen von 10µM und 50µM zunehmend.

Da die Länge der Migrationspfade mit der Migrationseffizienz positiv korreliert und nicht von zunehmender Toxizität des Inhibitors überlagert war, wies dieser Befund auf eine dosisabhängige Hemmung der Migration FAP-positiver Zellen durch den FAP-Inhibitor hin.

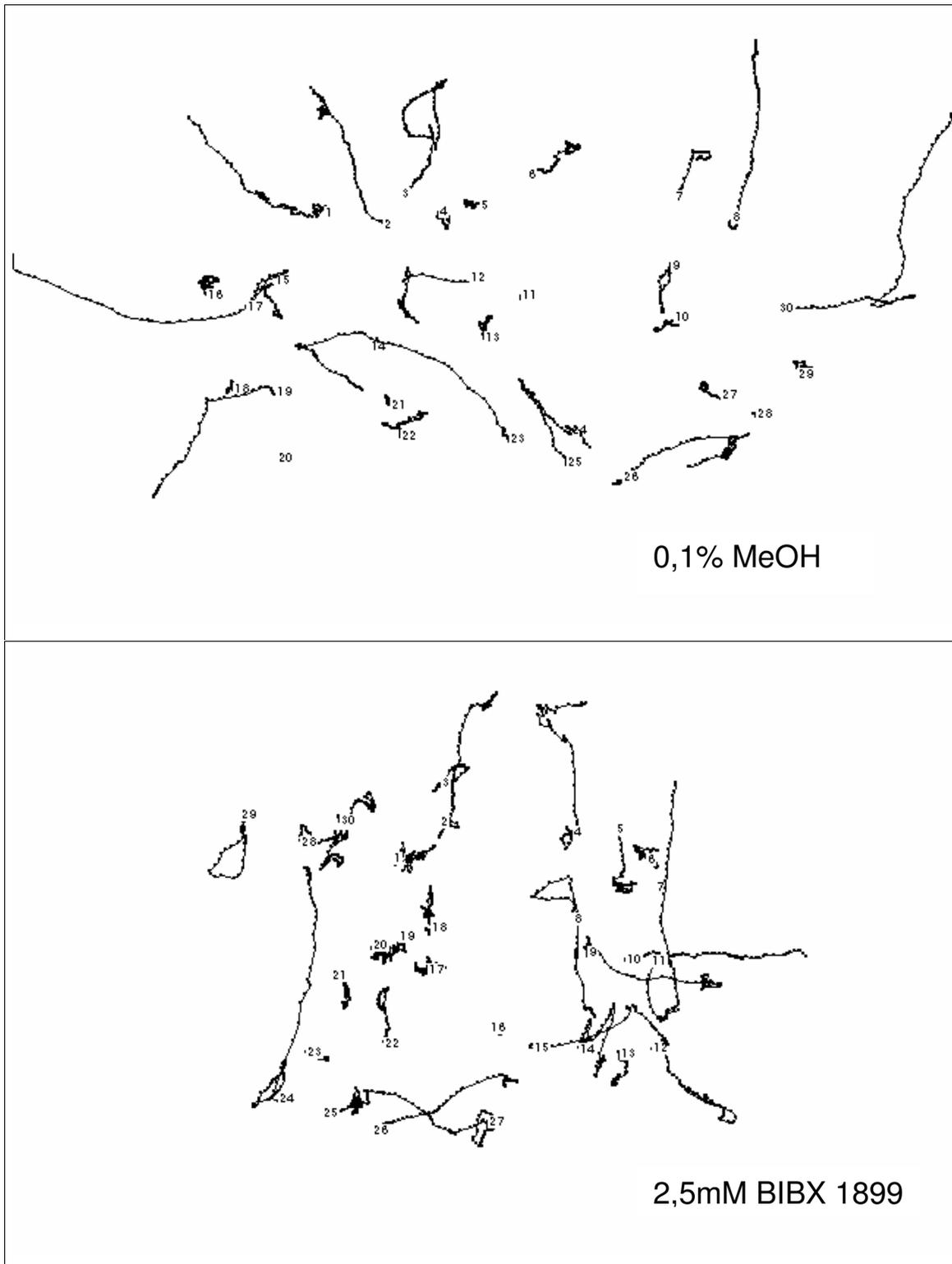
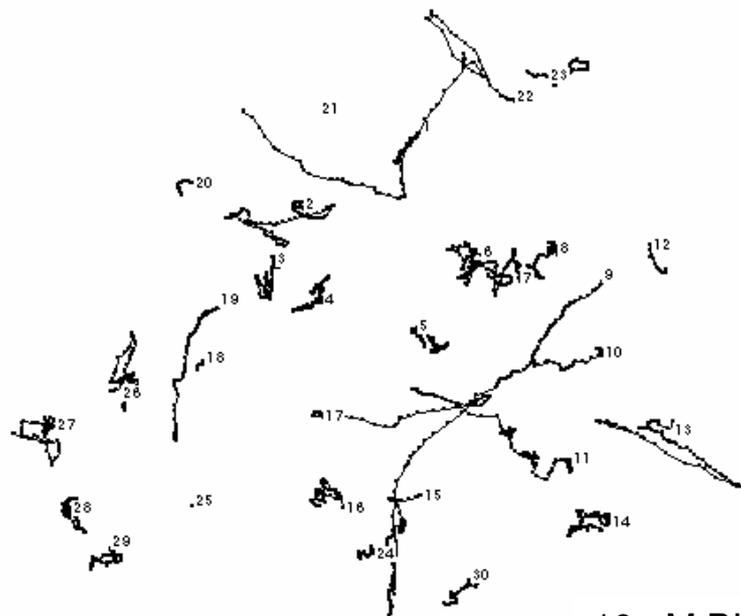
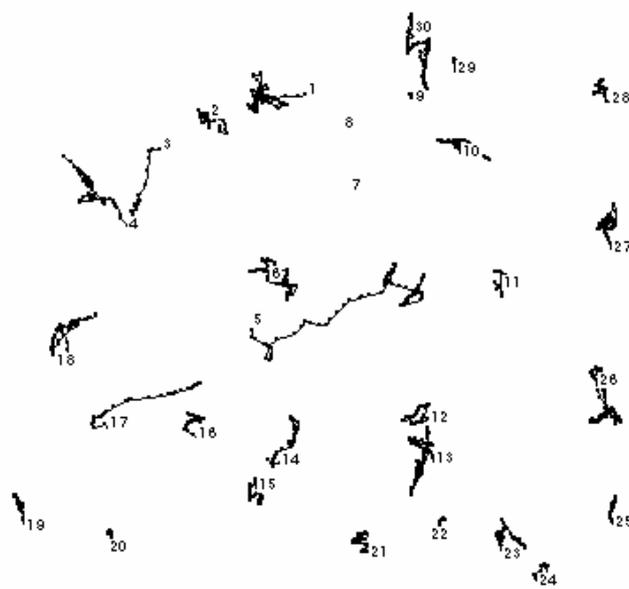


Abbildung 4: Migrationspfade im Kollagen von jeweils 30 zufällig ausgewählten HT1080/33 Zellen nach Behandlung mit unterschiedlichen Konzentrationen des FAP-Inhibitors BIBX 1899 bzw. MeOH (Lösungsmittel) über einen Beobachtungszeitraum von 18 Stunden. Die Pfade sind im Migrationsfeld ortotopisch korrekt abgebildet. Fortsetzung siehe nächste Seite.



10mM BIBX 1899



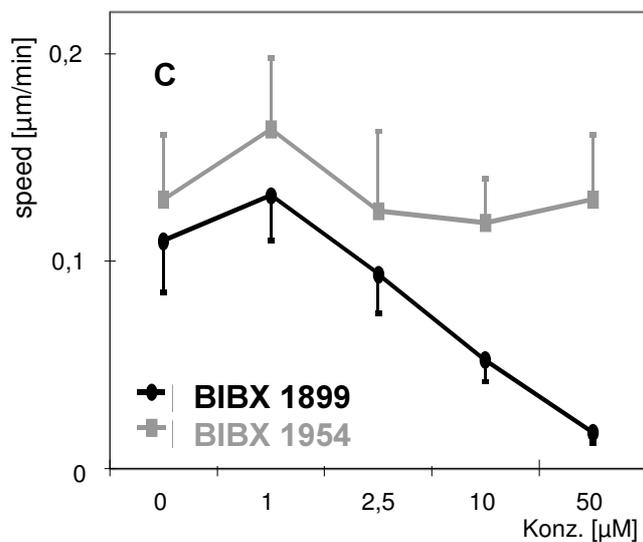
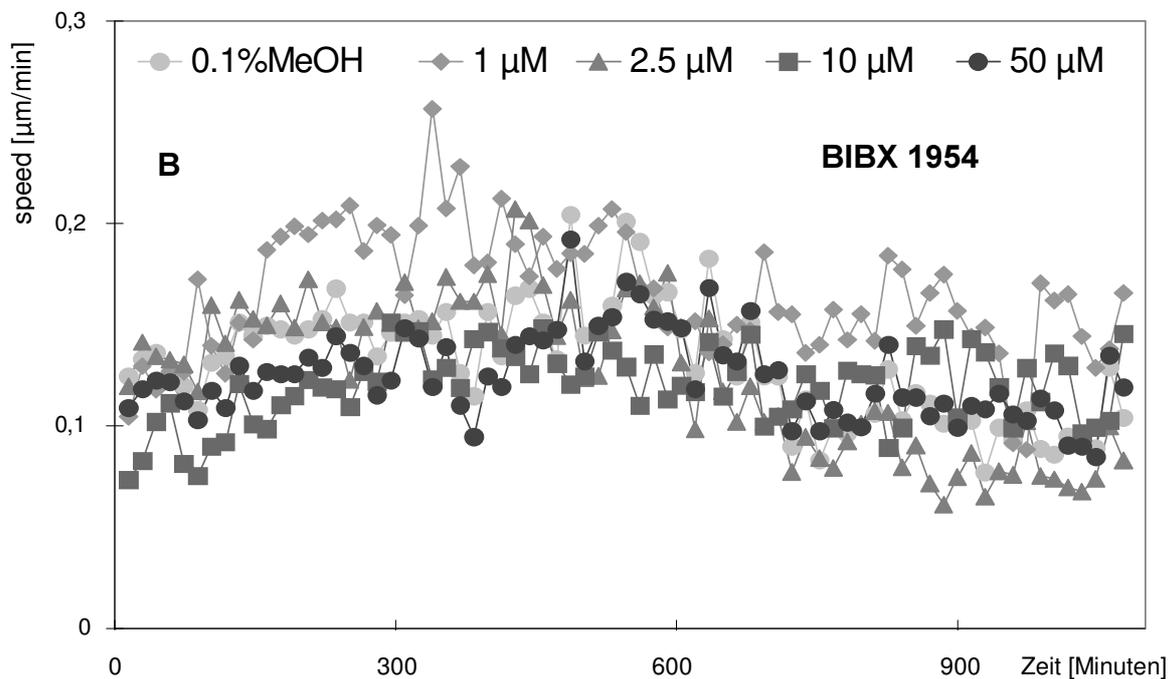
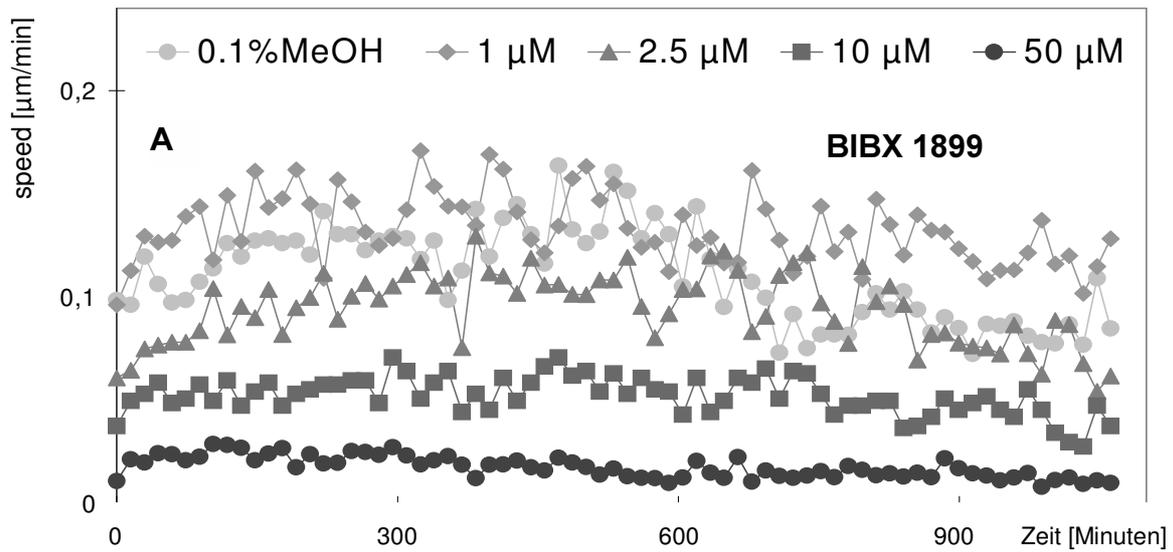
50mM BIBX 1899

### 3.2.2.1.2. Verringerung der Migrationsgeschwindigkeit

Die gewonnenen Daten wurden quantifiziert, um so die Veränderungen im Migrationsverhalten zu objektivieren. Neben der zurückgelegten Strecke wurde die Migration durch drei weitere Werte charakterisiert, die den Zellen zu festen Zeitpunkten in regelmäßigen Abständen zugeordnet wurden: „locomotion“ gab den Anteil der Zellen an, die sich zum jeweiligen Zeitpunkt bewegten, „velocity“ stand für die mittlere Geschwindigkeit der migrierenden Zellen und „speed“ bezeichnete die durchschnittliche Geschwindigkeit der gesamten Zellpopulation, einschließlich ruhender Zellen.

Die Migrationsgeschwindigkeit „speed“ von FAP-positiven HT1080/33 Zellen nahm mit zunehmender Konzentration des FAP-Inhibitors BIBX 1899 kontinuierlich ab (Abb. 5 A und C). Nach der Behandlung mit 50µM BIBX 1899 bewegten sich die Zellen ungefähr fünfmal langsamer fort als nach der Behandlung mit den Kontrollsubstanzen MeOH (helle Punkte in Abb. 5 A) bzw. BIBX 1954 (Abb. 5 B und C). Für BIBX 1954 war bis 50µM kein signifikanter Einfluss auf die Wanderungsgeschwindigkeit der Zellen zu erkennen.

Da neben „speed“ bei ansteigender Inhibitorkonzentration auch die Werte von „velocity“ und „locomotion“ sanken (ohne Abbildung), lag der verringerten Migrationsgeschwindigkeit eine Wirkung von BIBX 1899 auf alle Zellen zugrunde. Der Effekt setzte unmittelbar nach der Behandlung ein und blieb über den Beobachtungszeitraum von 18 Stunden erhalten (Abb. 5 A).



**Abbildung 5: Migrationsgeschwindigkeit „speed“ von HT1080/33 Zellen nach Behandlung mit Inhibitor BIBX 1899 bzw. Kontrollsubstanz BIBX 1954.**

In den Abbildungen A (BIBX 1899) und B (BIBX 1954) wurde jeweils für einen Zeitraum von 15 Minuten die durchschnittliche Migrationsgeschwindigkeit ermittelt.

Abbildung C gibt die durchschnittliche Migrationsgeschwindigkeit der Zellpopulation ( $n=3$ , 90 unabhängige Versuche) über den gesamten Beobachtungszeitraum von 18 Stunden in Abhängigkeit von der Konzentration beider Wirkstoffe an.

### 3.2.2.2. Selektivität der Wirkung für FAP-positive Zellen

Um die FAP-Spezifität der durch BIBX 1899 erzielten Migrationshemmung zu bestätigen, wurde der Einfluss des Inhibitors auf die Migration des Zellklons HT1080/13.8, der murines FAP exprimiert, sowie zweier FAP-negativer HT1080 Klone (Neomex und 23) überprüft.

Die Halbierung der durchschnittlichen Migrationsgeschwindigkeit von HT1080/13.8 Zellen nach Behandlung mit 50  $\mu\text{M}$  BIBX 1899 (Abb. 6) entsprach ebenfalls einer signifikanten Migrationshemmung. Der im Vergleich zu Klon 33 etwas schwächere Effekt könnte durch die niedrigere FAP-Expression in Klon 13.8 (siehe Kapitel 3.1.2.) oder auch durch unterschiedliche Aminosäuresequenzen von murinem und humanem FAP, die nur zu 89% identisch sind (Niedermeyer et al., 1998), bedingt sein.

BIBX 1899 hatte keinen signifikanten Einfluss auf das Wanderungsverhalten der FAP-negativen Zellklone HT1080/Neomex und HT1080/23. HT1080/23 exprimiert die membranständige Protease MT1-MMP, nicht jedoch FAP. Somit konnte eine unspezifische Wirkung des FAP-Inhibitors auf HT1080 Zellen, z. B. durch Interferenz mit anderen Oberflächenmolekülen oder latente Toxizität, als Ursache der Migrationshemmung ausgeschlossen werden.

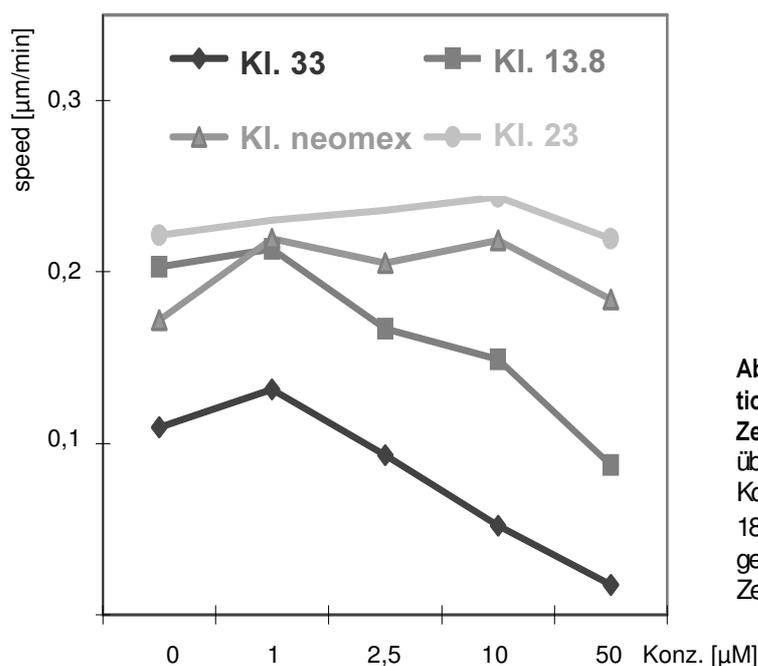


Abbildung 6: Durchschnittliche Migrationsgeschwindigkeit [ $\mu\text{m}/\text{min}$ ] von Zellen der verschiedenen HT 1080 Klone über 18 Stunden in Abhängigkeit von der Konzentration [ $\mu\text{M}$ ] des Inhibitors BIBX 1899. Zellen des Klons 33 zeigen eine geringere Basismotilität als die übrigen Zellen.

### 3.2.3. Hemmung der Kollagenkontraktion durch FAP-Inhibitor BIBX1899

Die Beteiligung von FAP an der Migration von HT1080 Zellen wie auch dessen Kolo-kalisation mit Fokalisierung an Zell-Matrix Kontakten ließen auf eine aktive Rolle von FAP bei adhäsiven und/oder proteolytischen Prozessen schließen. Insbesondere könnte eine Funktion während des Um- und Abbaus von Kollagen vorliegen. Um den Wirkmechanismus von FAP auf die Migration näher zu definieren, wurde der Einfluss des FAP-Inhibitors auf die Kollagenkontraktion durch FAP-positive Fibroblasten (GM5387 Zellen) untersucht. Die Viabilität der Zellen zeigte in Kontrollversuchen hier keine Unterschiede und war nicht beeinträchtigt (ohne Abbildung).

Mit Inhibitorkonzentrationen von 10 und 30 $\mu$ M wurde eine vollständige Hemmung der Kontraktion des Kollagens erzielt, während geringere Konzentrationen von BIBX 1899 zu keiner Hemmung der Kontraktion im Vergleich zu den Kontrollsubstanzen BIBX 1954 und dem Lösungsmittel MeOH führten (Abb. 7 A). Zur Quantifizierung der Kollagenkontraktion wurde die Größe der von Kollagen bedeckte Fläche über 96 Stunden dokumentiert (Abbildung 7 B). Während die Ausdehnung der Fläche unter dem Einfluss von 10 $\mu$ M BIBX 1899 nur geringfügig abnahm, hatten die Kontrollsubstanzen MeOH bzw. BIBX 1954 der gleichen Konzentration keine signifikante Auswirkung auf die Verkleinerung der Fläche durch Kollagenkontraktion.

Die durch den FAP-Inhibitor verringerte Kapazität zum Umbau der Kollagenmatrix ließ eine Beteiligung von FAP an der Stabilität von Zell-Matrix-Kontakten bzw. der zelluläre Kontraktilität vermuten.

**A****Methanol****BIBX 1899****BIBX 1954**

30

10

2,5

1

0,1

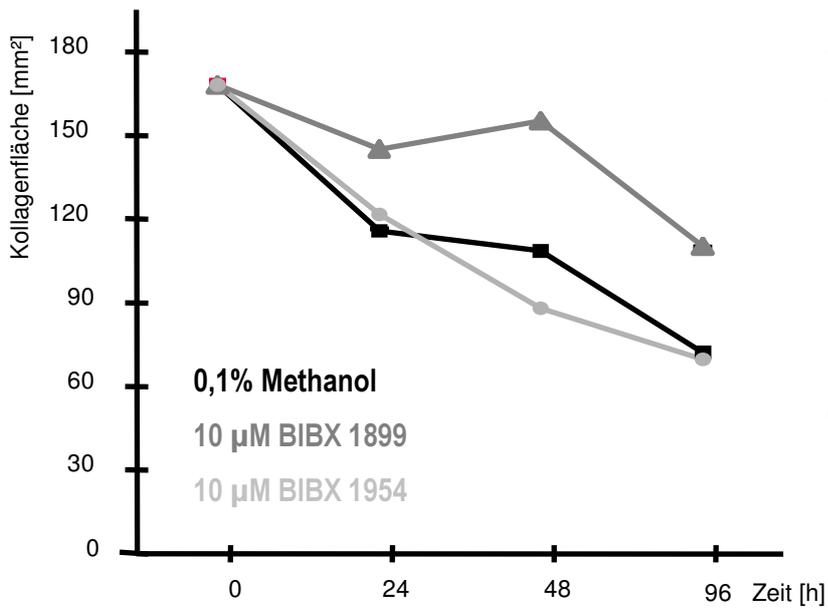
Konzentration [ $\mu\text{M}$ ]**B**

Abbildung 7: Kontraktion der Kollagenmatrix durch GM 5387 Zellen nach Behandlung mit FAP-Inhibitor BIBX 1899 bzw. Kontrollsubstanz BIBX 1954. (A) Kontraktionszustand des Kollagens 96 Stunden nach Behandlung mit unterschiedlichen Konzentrationen der Wirkstoffe. (B) Verringerung der von Kollagen bedeckten Fläche über den gesamten Beobachtungszeitraum ( $n=2$  unabhängige Versuche).

## **4. Diskussion**

Für das in vivo spezifisch in der Umgebung epithelialer Tumoren exprimierte Protein FAP konnte nachgewiesen werden, dass es als Oberflächenprotease an Zell-Matrix-Kontakten vorliegt, zum Matrixumbau beiträgt und die Migration FAP-positiver, fibroblastoider HT1080 Zellen fördert. Ein spezifischer Inhibitor der Enzymfunktion, nicht jedoch eine strukturverwandte Vergleichssubstanz, hemmt die Zellmigration von FAP-positiven HT1080 Zellen sowie die Kollagenkontraktion von GM5387 Zellen. Diese Befunde weisen auf die Eignung von FAP als Zielstruktur einer möglichen Pharmakotherapie von Tumorerkrankungen hin. Zur weiteren Charakterisierung des Beteiligungsmechanismus von FAP an der Tumorzellausbreitung sowie dem Nachweis der Effizienz des Inhibitors in vivo sind weitere Versuche in einem Mausmodell notwendig.

### **4.1. Lokalisation von FAP als Oberflächenprotease**

Mehrere untersuchte Parameter zeigen eine Beteiligung von FAP am Umbau fibrillären Kollagens und an der Migration von fibroblastoiden HT1080 Zellen in 3D Kollagenmatrices: (a) die Aufregulation und Stabilisierung von FAP auf der Oberfläche migrierender HT1080 Zellen im Kollagen (Kap. 3.1.2.); (b) die Kolokalisation („Clustering“) von FAP mit  $\beta$ 1-Integrinen an zellulären Kontakten mit Kollagenfasern (Kap. 3.1.3.); (c) die durch den FAP-Hemmstoff BIBX 1899 erzielte Inhibition der Zellmigration (Kap. 3.2.2.); (d) die Hemmung der Kollagenkontraktion durch den FAP-Inhibitor BIBX 1899 (Kap. 3.2.3.) und somit des Kollagenumbaus.

Im Gegensatz zu zahlreichen anderen in der Umgebung von Tumoren identifizierten Proteinen, die häufig in löslicher Form oder als inaktive Vorstufen exprimiert werden, ist FAP in aktiver Form auf der Oberfläche von Fibroblasten lokalisiert. Die Oberflächenexpression und -lokalisation wurde durchflusszytometrisch (Kap. 3.1.1. und 3.1.2.) wie auch konfokalmikroskopisch (Kap. 3.1.3.) dargestellt. FAP war insbesondere auf wandernden Zellen mit  $\beta$ 1-

Integrinen, die den wichtigsten Kollagenrezeptor  $\alpha 2\beta 1$  einschließen, benachbart und in geclusteter Form an Zell-Matrix-Kontakten kolokalisiert.

Mehrere Befunde legen nahe, dass Funktionen von FAP an dessen fokale Kolokalisation mit Kollagenrezeptoren gebunden sind: die Aufregulation von FAP nach Kultur und Zellmigration in Kollagenmatrices (Kap. 3.1.2.) lässt eine Oberflächenstabilisierung vermuten, da FAP auf HT1080 Zellen, die mit dem FAP-Gen transfiziert wurden, ohne weitere transkriptionelle Regulation konstitutiv exprimiert wird.

Auch die Hemmwirkung des FAP-Inhibitors auf die Kollagenkontraktion (Kap. 3.2.3.) ist möglicherweise durch die topographische Nähe von FAP und  $\beta 1$ -Integrinen erklärbar. Die verminderte Matrixkontraktion nach der Behandlung mit BIBX 1899 könnte durch dessen Hemmung der Integrin-vermittelten Kraftübertragung bedingt sein. Alternativ könnte FAP selbst eine adhäsive Kraftübertragung vermitteln, die der Inhibitor abschwächt. Schließlich könnte eine abgeschwächte proteolytische Aktivität zu einem verringerten Umbau des Kollagens führen. Die Hemmung der Kollagenkontraktion durch den FAP-Inhibitor stellt eine spezifische, nicht toxische Beeinflussung einer komplexen Zellfunktion dar und legt die therapeutische Erreichbarkeit von FAP durch den Wirkstoff nahe.

Zusammenfassend sprechen diese Befunde für die direkte oder indirekte Beteiligung von FAP an adhäsiven Kontakten zu Kollagenfasern. Auch MT1-MMP, eine transmembrane Kollagenase der MMP-Familie mit einem dem FAP ähnlichen Substratprofil, kolokalisiert mit  $\beta 1$ -Integrinen an Zell-Matrix-Interaktionen migrierender HT1080 Zellen und vermittelt fokalisierte, kontaktabhängige Kollagenolyse (Wolf et al., 2003). Die gezeigte Fokalisierung von FAP an Zellkontakten mit Kollagenfasern auf wandernden Zellen spricht für eine mögliche Beteiligung von FAP am Kollagenab- und umbau während der Migration. Dies stellt eine potentielle Funktion dar, über die FAP die Zellmigration beeinflusst.

#### 4.2. Beteiligung von FAP an der Migration

Der Einfluss von FAP auf die Migration FAP-positiver fibroblastenartiger HT1080 Zellen im dreidimensionalen Kollagen wurde mittels selektiver Migrationshemmung durch den FAP-spezifischen Inhibitor BIBX 1899 nachgewiesen, während die strukturähnliche Kontrollsubstanz BIBX 1954 die Migration nicht veränderte (Kap. 3.2.2.). Der Effekt war dosisabhängig. Die für eine optimale Hemmwirkung benötigte Konzentration von BIBX 1899 war unerwartet hoch, möglicherweise aufgrund von Absorption des Inhibitors durch die Kollagenfasern, hatte aber dennoch, wie alle verwendeten Konzentrationen, keine dosisabhängige zytotoxische Wirkung.

Auch wenn eine völlige Inhibition der Migration selbst mit noch höheren Konzentrationen nicht möglich war, zeigt dieser Befund, dass FAP-vermittelte Effekte einen wichtigen Ko-Faktor der Zellmigration darstellen. Kontrollzellen (HT1080/Neomex) mit ansonsten ähnlichen migratorischen Eigenschaften, die allerdings FAP nicht überexprimierten, sowie HT1080 Zellen, die MT1-MMP überexprimierten (HT1080/23), wurden durch BIBX 1899 nicht beeinflusst. Hier kann das Fehlen der FAP-vermittelten Proteolyse und ihre promigratorischen Effekte wahrscheinlich durch andere Proteasen (z.B. MMPs) kompensiert werden.

Diese Befunde wurden an FAP-exprimierenden Fibrosarkomzellen in vitro erhoben. In vivo hingegen wird FAP in der Regel auf Fibroblasten des Tumorstromas und nur selten von den Tumorzellen selbst exprimiert. Dennoch ist eine Begünstigung der Migration von Tumorzellen und damit der Metastasierung von Karzinomen durch FAP-vermittelten Matrixumbau denkbar: FAP-positive Fibroblasten könnten durch Kollagenolyse proteolytische Matrixrassen entlang ihrer Migrationspfade bilden, die von anderen Zellen, so auch von FAP-negativen Tumorzellen, zur Bewegung und Positionierung genutzt werden (Abb. 8).

Ob FAP tatsächlich die Ausbreitung epithelialer Tumoren in vivo entscheidend fördert und ob die Tumormetastasierung durch FAP-Inhibitoren hemmbar ist, bleibt offen und müsste im Tierversuch und in multizellulären In-vitro-Modellen

weiter untersucht werden. Alternativ könnten andere Proteasen einen Funktionsverlust von FAP kompensieren und eine therapeutische Kombination von FAP-Inhibitoren und anderen, wie z.B. MMP-Inhibitoren erfordern.

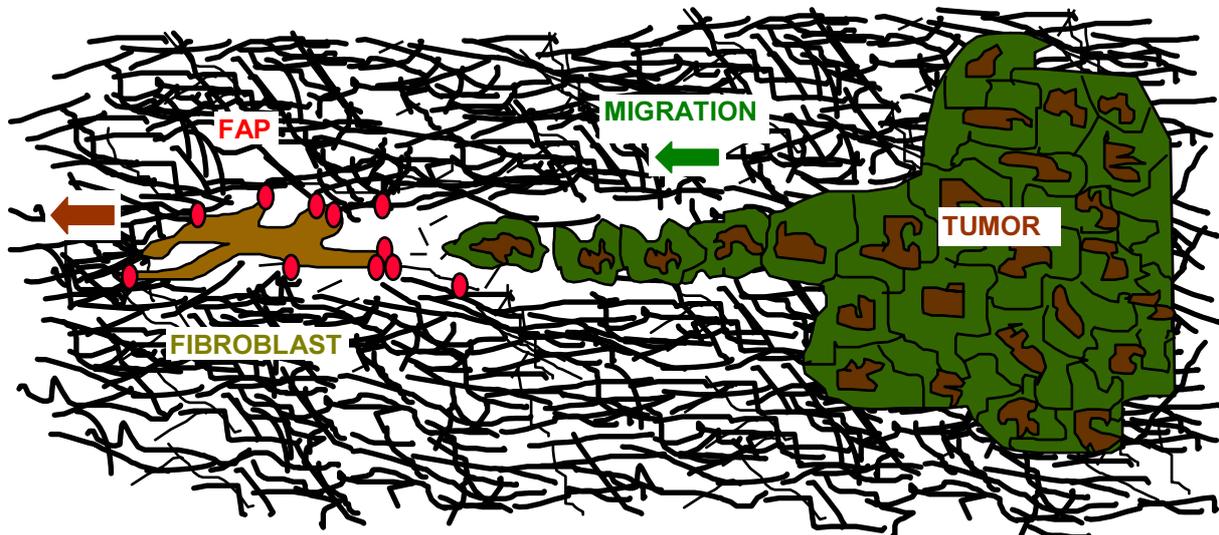


Abbildung 8: Konzept von der Förderung der Tumorzellinvasion durch FAP-positive Fibroblasten. Generierung eines FAP-vermittelten, proteolytischen Matrixdefektes, der von FAP-negativen Tumorzellen zur Migration genutzt wird.

#### 4.3. Ausblick: FAP als Zielstruktur der Pharmakotherapie

Neue Phase-I-Studien mit FAP-spezifischen monoklonalen Antikörpern (Sibrotuzumab) liefern weitere Informationen über FAP. Sibrotuzumab reichert, auch bei wiederholter Gabe, FAP-selektiv in der Umgebung epithelialer Tumoren an (Scott et al., 2003). Unabhängig von dem fehlenden Nachweis der biologischen Wirkung von Sibrotuzumab legen diese Ergebnisse nahe, dass FAP als Kandidatenprotein der Pharmakotherapie von Tumorerkrankungen spezifisch und konstant in der Umgebung epithelialer Tumoren exprimiert wird und für intravenös verabreichte hochmolekulare Substanzen erreichbar ist. Gelingt es in Mehrzellen- und Mausinvasionsmodellen durch FAP-Inhibitoren die Migration und damit die Ausbreitung epithelialer Tumorzellen zu hemmen, stellt FAP auch hinsichtlich seiner funktionellen Bedeutung eine geeignete Zielstruktur der pharmakologischen Tumorthherapie dar.

## **5. Zusammenfassung**

Das Fibroblasten-Aktivierungs-Protein (FAP) ist eine Oberflächenprotease mit kollagenolytischer Aktivität in vitro, die in vivo spezifisch von Fibroblasten in der Umgebung maligner epithelialer Tumoren in der Phase der Invasion und Disseminierung aufreguliert wird. Da Matrixproteasen durch proteolytischen Umbau extrazellulärer Matrix zu Invasion und Metastasierung von Tumoren beitragen, stellen sie interessante Zielstrukturen für die Pharmakotherapie von Tumorerkrankungen dar. Ziel der vorliegenden Arbeit war die Untersuchung der Lokalisation und der Funktion von FAP in migrierenden fibroblastoiden HT1080 Fibrosarkomzellen, die FAP überexprimierten.

FAP war in Zellen, die durch 3D Kollagenmatrices migrieren, an Zellkontakten zu Kollagenfasern geclustert, mit  $\beta$ 1-Integrin kolokalisiert (Konfokalmikroskopie) und wurde im Verlauf der Kultur auf der Zelloberfläche aufreguliert bzw. stabilisiert (Durchflusszytometrie). Ein spezifischer FAP-Inhibitor BIBX1899, nicht jedoch die strukturhomologe Kontrollsubstanz BIBX 1954, führte zu einer subtotalen Inhibition der Zellmigration (Zeitraffervideomikroskopie und Zelltracking). Die Inhibition der Motilität war nicht toxisch, dosisabhängig, spezifisch für FAP-exprimierende Zellen und in der gesamten Zellpopulation nachweisbar. Die Inhibition von FAP führte darüber hinaus zu einer spezifischen, dosisabhängigen Hemmung der Matrixverdichtung und Kontraktion von Kollagenmatrices durch FAP-positive humane Lungenfibroblasten (GM 5387).

Die Befunde zeigen eine Fokalisierung von FAP an Bindungsstellen zu Kollagenfasern, eine Beteiligung an kontraktilen Zell-Matrix Interaktionen und der Zellbewegung in komplexen 3D Matrixkulturen. Somit konnte belegt werden, dass FAP als Zielmolekül für die Hemmung dynamischer Zell-Matrix-Interaktionen mit spezifischen FAP-Inhibitoren geeignet ist.

## **6. Literaturverzeichnis**

Cheng, J. D., Dunbrack, R. L. J., Valianou, M., Rogatko, A., Alpaugh, R. K., Weiner, L. M. 2002. Promotion of tumor growth by murine fibroblast activation protein, a serine protease, in an animal model. *Cancer Res.* 62: 4767-4772.

Fridman, R., Toth, M., Peña, D., Mobashery, S. 1995. Activation of progelatinase B (MMP-9) by gelatinase A (MMP-2). *Cancer Res.* 55: 2548-55.

Friedl, P., Wolf, K. 2003. Tumour cell invasion and migration: Diversity and escape mechanisms. *Nat. Rev. Cancer* 3: 362-374.

Friedl, P., Bröcker, E.-B. 2001. Biological Confocal Reflection Microscopy: Reconstruction of Three-dimensional Extracellular Matrix, Cell Migration, and Matrix Reorganization. *Image Analysis: Methods and Applications, Second Edition herausgegeben von D. P. Häder.*

Friedl, P., Bröcker, E.-B. 2000. The biology of cell migration in three-dimensional extracellular matrix. *Cell. Mol. Life Sci.* 57:41-64.

Friedl, P., Entschladen, F., Conrad, C., Niggemann, B., Zänker, K. S. 1998. T-lymphocytes migrating in 3-D collagen lattices lack focal adhesions and utilize  $\beta 1$  integrin-independent strategies for polarization, interaction with collagen fibers, and migration. *Eur. J. Immunol.* 28:2331-2343.

Friedl, P., Zänker, K.S., Bröcker, E.-B. 1998. Cell migration strategies in three-dimensional extracellular matrix: differences in morphology, cell matrix interactions and integrin function. *Microsc. Res. Techn.* 43:369-378.

Friedl, P., Bröcker, E.-B., Zänker, K. S. 1998. Integrins, cell matrix interactions and cell migration strategies: Fundamental differences in leukocytes and tumor cells. *Cell Adhesion Commun.* 6:225-236.

Garin-Chesa, P., Old, L. J., Rettig, W. J. 1990. Cell surface glycoprotein of reactive stromal fibroblasts as a potential antibody target in human epithelial cancers. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 87:7235-9.

Hofheinz, R.-D., al-Batran, S.-E., Hartmann, F., Hartung, G., Jäger, D., Renner, C., Tanswell, P., Kunz, U., Amelsberg, A., Kuthan, H., Stehle, G. 2003. Stromal Antigen Targeting by a Humanised Monoclonal Antibody: An Early Phase II Trial of Sibrutuzumab in Patients with Metastatic Colorectal Cancer. *Onkologie* 26:44-48.

Huber, M. A., Kraut, N., Park, J. E., Schubert, R. D., Rettig, W. J., Peter, R. U., Garin-Chesa, P. 2003. Fibroblast activation protein: differential expression and serine protease activity in reactive stromal fibroblasts of melanocytic skin tumors. *J. Invest. Dermatol.* 120, 182-188.

Lauffenburger, D. A., Horwitz, A. F. 1996. Cell migration: a physically integrated molecular process. *Cell.*, 84:359-369.

Maaser, K., Wolf, K., Klein, E., Niggemann, B., Zänker, K. S., Bröcker, E.-B., Friedl, P. 1999. Functional Hierarchy of Simultaneously Expressed Adhesion Receptors: Integrin  $\alpha 2\beta 1$  but Not CD44 Mediates MV3 Melanoma Cell Migration and Matrix Reorganization within 3-D Hyaluronan-containing Collagen Matrices. *Mol. Biol. Cell*, 10: 3067-3079.

Madlener M., Parks, W. C., Werner, S. 1998. Matrix metalloproteinases and their physiological inhibitors are differentially expressed during excisional skin wound repair. *Exp. Cell Res.* 10:201-210.

Mathew, S., Scanlan, M. J., Mohan Raj, B. K., Murty, V. V. V. S., Garin-Chesa, P., Old, L. J., Rettig, W. J., Chaganti, R. S. K. 1995. The gene for fibroblast activation protein alpha (FAP), a putative cell surface-bound serine protease expressed in cancer stroma and wound healing, maps to chromosome band 2q23. *Genomics* 25: 335-337.

Murphy, G., Knauper, V., Cowell, S., Hembry, R., Stanton, H., Butler, G., Freije, J., Pendas, A. M., Lopez-Otin, C. 1999. Evaluation of some newer matrix metalloproteinases. *Ann. New York Acad. Sci.* 878:25-39.

Niedermeyer, J., Enenkel, B., Park, J. E., Lenter, M., Rettig, W. J., Damm, K., Schnapp, A. 1998. Mouse fibroblast-activation protein - Conserved Fap gene organization and biochemical function as a serine protease. *Eur. J. Biochem.* 254: 650-654.

Park, J. E., Lenter, M. C., Zimmermann, R. N., Garin-Chesa, P., Old, L. J., Rettig, W. J. 1999. Fibroblast activation protein, a dual specificity serine protease expressed in reactive human tumor stromal fibroblasts. *J. Biol. Chem.* 274: 36505-36512.

Pharmingen, A. 1998. Apoptosis: Applied Reagents and Technologies *Becton Dickinson Company, 2. Auflage.*

Rettig, W. J., Su, S. L., Fortunato, S. R., Scanlan, M. J., Raj, B. K., Garin-Chesa, P., Healey, J. H., Old, L. J. 1994. Fibroblast activation protein: purification, epitope mapping and induction by growth factors. *Int. J. Cancer:* 58:385-392

Scanlan, M. J., Raj, B. K. M., Calvo, B., Garin-Chesa, P., Sanz-Moncasi, M. P., Healey, J. H., Old, L. J., Rettig, W. J. 1994. Molecular cloning of fibroblast activation protein alpha, a member of the serine protease family selectively expressed in stromal fibroblasts of epithelial cancers. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 91: 5657-5661.

Scott, A. M., Wiseman, G., Welt, S., Adjei, A., Lee, F.-T., Hopkins, W., Divgi, C. R., Hanson, L. H., Mitchell, P., Gansen, D. N., Larson, S. M., Ingle, J. N., Hoffman, E. W., Tanswell, P., Ritter, G., Cohen, L. S., Bette, P., Arvay, L., Amelsberg, A., Vlock, D., Rettig, W. J., Old, L. J. 2003. A Phase I Dose-Escalation Study of Sibrotuzumab in Patients with Advanced or Metastatic Fibroblast Activation Protein-positive Cancer. *Clin. Cancer Res.* 9: 1639-1647.

Stracke, J. O., Hutton, M., Stewart, M., Pendás, A. M., Smith, B., López-Otin, C., Murphy, G., Knäuper, V. 2000. Biochemical characterization of the catalytic domain of human matrix metalloproteinase 19 - Evidence for a role as a potent basement membrane degrading enzyme. *J. Biol. Chem.* 275: 14809-14816.

Welt, S., Divgi, C. R., Scott, A.M., Garin-Chesa, P. Finn, R. D., Graham, M., Carswell, E. A., Cohen, A., Larson, S. M., Old, L. J. 1994. Antibody Targeting in Metastatic Colon Cancer: A Phase I Study of Monoclonal Antibody F19 Against a Cell-Surface Protein of Reactive Tumor Stromal Fibroblasts *J. Clin. Onc.* 12: 1193-1203.

Wick, W., Wagner, S., Kerkau, S., Dichgans, J., Tonn, J.-C., Weller, M. 1998. BCL-2 promotes migration and invasiveness of human glioma cells. *FEBS Lett* 440: 419-424.

Wolf, K., Mazo, I., Leung, H., Engelke, K., von Andrian, U. H., Deryugina, E. I., Strongin, A. Y., Bröcker, E.-B., Friedl, P. 2003. Compensation mechanism in tumor cell migration: Mesenchymal-amoeboid transition after blocking of pericellular proteolysis. *J. Cell Biol.* 160:267-277.

## **7. Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen**

Ala	Alanin
ATCC	American Type Culture Collection
DFP	Diisopropylfluorophosphat
DPP	Dipeptidylpeptidase
DMEM	Dulbeccos Modified Eagle Medium
DPBS	Dulbeccos PBS
ECM	Extracelluläre Matrix
EDTA	Ethylene Diamine Tetraacetic Acid
Fab	Fragment antigen binding
FAP	Fibroblasten-Aktivierungs-Protein
FACS	Flow Analysis of Cell Scatter
FITC	Fluoreszierendes Isothiocyanat
FL	Fluoreszenz
FSC	Forward Scatter
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)-Piperazin-N-2-Ethansulfat Säure
IgG	Immunglobuline der Klasse G
Kl.	Klon
LRSC	Lissamin Rhodamin B Sulfonylechlorid
MMP	Matrix-Metalloprotease

MT-MMP	Membrane Type MMP
PS	Phosphatidylserin
PBS	Phosphate Buffered Saline
Pro	Prolin
PI	Propidium Jodid
SPECT	Single Photonen Emissions Computer Tomogramm
SSC	Sideward Scatter
TCS	True Confocal Scanner
TIMP	Tissue Inhibitors of MMPs