

Influence of Melanoma Cells and Cancer-associated Fibroblasts on (Lymph-)angiogenesis in Conjunctival Melanoma

Zusammenfassung

Das okuläre Melanom ist der häufigste primäre bösartige Tumor des Auges im Erwachsenenalter, wobei zwischen zwei Entitäten unterschieden wird. Das intraokuläre uveale Melanom (UM), welches in der Aderhaut, dem Ziliarkörper und/oder der Iris lokalisiert ist, und das extraokuläre konjunktivale Melanom (CM), welches an der Augenoberfläche auftritt. Typische Treibermutationen treten bei UMs in den *GNAQ* oder *GNA11* Genen auf, während CMs häufig *BRAF*-, *NRAS*- oder *NF1*-Mutationen aufweisen. In Deutschland ist jährlich mit etwa 400 neuen UM und 100 neuen CM zu rechnen. Die Metastasierung erfolgt beim UM nahezu ausschließlich hämatogen mit starkem Tropismus zur Leber, während das CM initial überwiegend lymphogen in die regionalen Lymphknoten streut. Trotz erfolgreicher Behandlung des Primärtumors verstirbt nahezu jeder zweite Patient mit UM und fast jeder dritte Patient mit CM langfristig an Metastasen. Sowohl für das UM als auch das CM existieren gegenwärtig im Falle einer Metastasierung keine klinisch greifenden Therapiemöglichkeiten. Das bisherige Scheitern bei der Behandlung von metastasierten UMs und CMs könnte darauf zurückzuführen sein, dass keiner der aktuellen Ansätze die komplexen Wechselwirkungen innerhalb des *Tumormicroenvironments* (TME) beachtet. Das TME, ein heterogener und dynamischer Komplex, der stetig mit Tumorzellen interagiert, ist beim CM bisher noch nicht untersucht worden. Tumor-assoziierte Fibroblasten (CAFs) stellen eine prominente und heterogene Zellpopulation des TME dar, welche die Tumorprogression und Metastasierung bei vielen Tumoren fördern können, indem sie gleichzeitig Tumorzellen und benachbarte, nicht-tumorale Zellen des TMEs, wie Lymph- oder Blutendothelzellen (LECs und BECs) stimulieren und die anti-tumorale Funktion von Immunzellen schwächen.

Die vorliegende Arbeit stellt die erste Untersuchung zu humanen konjunktivalen Melanom-Fibroblasten (HCMFs), den CAFs des CMs, dar. Hierbei fokussierten wir uns auf die Funktionalität und den Einfluss von HCMFs - sowie von konjunktivalen Melanomzellen (CMCs) - auf die Tumor-assoziierte Lymph- und Hämangiogenese, auf das Tumorwachstum und die Metastasierung. Die Charakterisierung von HCMFs in Abgrenzung von konjunktivalen Fibroblasten ohne Tumorbezug ergab keinen eindeutigen Phänotyp. Eine ähnliche Heterogenität bzw. Inkonsistenz von CAF-Markern wurde auch für andere Tumorentitäten beschrieben. Bei den SILAC- (stabile Isotopenmarkierung mit Aminosäuren in der Zellkultur) basierten quantitativen Proteomik-Analysen von HCMFs und CMCs im Vergleich zu den jeweiligen gesunden Kontrollen konnten signifikant regulierte Proteine im Proteom und Sekretom nachgewiesen werden. Darüber hinaus identifizierten wir Untergruppen von signifikant regulierten Proteinen in HCMFs sowie in CMCs, die mit Lymph- und

Hämangiogenese, sowie Proliferation und Migration assoziiert sind. Unter diesen von HCMFs besonders übermäßig sezernierten und bekanntermaßen in die (Lymph-)angiogenese einwirkenden Proteinen imponierte sFLT1 (löslicher VEGFR-1). Während sFLT1 in funktionellen Assays keinen steigernden Effekt auf die Proliferation von LECs, BECs und CMCs aufwies, konnte eine sFLT1-vermittelte Stimulierung des MAPK-Signalwegs in CMCs nachgewiesen werden. Durch Stimulation mit HCMF-konditioniertem Medium wurde die Proliferation von LECs und CMCs signifikant gesteigert und die Migration von LECs und BECs erhöht. Es konnte jedoch nur geringe Auswirkungen auf die Vaskularisierungseigenschaften festgestellt werden. Neben der Proliferation von LECs und BECs wurde durch Stimulation mit CMC-konditioniertem Medium auch die Proliferation von CMCs selbst signifikant gesteigert, was auf einen autokrinen Effekt schließen lässt. Beim Phosphoproteomics-Screen der CMCs unter Verwendung einer Kinase-Substrat-Anreicherungsanalyse (KSEA) detektierten wir in CMCs eine hohe Anzahl an aktivierten Kinasen, die an den MAPK- und PI3K/AKT/mTOR-Signalwegen beteiligt sind. Die CMCs zeigten eine verstärkte Phosphorylierung an typischen Aktivierungsstellen des dem MAPK-Signalwegs nachgeschalteten Substrats ERK und des AKT nachgeschalteten Substrates TSC2, was zu einer Hemmung des Tumorsuppressor-Komplexes bestehend aus TSC1 und TSC2 führt und so die Aktivierung von mTOR bedingt. Die aktivierende Phosphorylierungsstelle des dem PI3K/AKT/mTOR-Signalwegs nachgeschalteten Substrats RPS6 waren in CMCs mit *BRAF*-Mutation erhöht, was auf einen möglichen Zusammenhang zwischen PI3K/AKT/mTOR-Signalweg und *BRAF*-Mutation hinweist. Unsere Daten zeigten insgesamt, dass sowohl der MAPK-, als auch der PI3K/AKT/mTOR-Signalweg unabhängig vom Mutationsstatus der CMCs (*BRAF* oder *NRAS*) aktiviert sind.

Zusammenfassend sollten bei CMs unabhängig vom Mutationsstatus eine Hemmung von MAPK- und PI3K/AKT/mTOR-Signalweg sowie von CAFs als essentieller Komponente des TME als zukünftige, gegebenenfalls kombinierbare CM-Behandlungsstrategien angesehen werden. Weitere experimentelle Studien werden erforderlich sein, um mögliche Kombinationstherapien zunächst *in vitro* und dann *in vivo* zu evaluieren.