

Sebastian Dieter

Dr. med.

Unterschiedliche Klassen Tumor-initiierender Zellen bei Tumorbildung und Metastasierung des kolorektalen Karzinoms im Xenotransplantationsmodell

Doktorvater: Prof. Dr. med. Hanno Glimm

Institut: Deutsches Krebsforschungszentrum (DKFZ)

Das kolorektale Karzinom stellt aktuell die häufigste maligne Tumorerkrankung in Deutschland dar. Es gibt zunehmend Hinweise darauf, dass im kolorektalen Karzinom – wie auch in anderen soliden Tumoren und verschiedenen Formen der Leukämie – eine kleine Subfraktion sogenannter Tumor-initiierender Zellen (TIC) existiert. Diese ist im Gegensatz zu allen übrigen Tumorzellen in der Lage, Tumorstammzellen aufrechtzuerhalten und bei Xenotransplantation in immundefiziente Mäuse den Patiententumor identisch nachzubilden. Eine vermehrte Resistenz der TIC gegenüber Chemotherapie und ihre Persistenz werden als mögliche Ursachen dafür vermutet, dass einige Patienten nicht ausreichend auf eine Chemotherapie ansprechen und auch Jahre nach initial erfolgreicher Therapie ein Rezidiv erleiden.

Bislang war völlig unklar, wie kolorektale TIC organisiert sind und ob TIC aus einer homogenen Zellpopulation oder funktionell heterogenen Zellsubfraktionen mit unterschiedlicher Rolle für Tumorstammzellwachstum und Metastasierung bestehen.

In der vorliegenden Arbeit wurden daher zunächst Aufreinigung primärer kolorektaler Tumorzellen aus Patientenproben, deren Kultivierung und Anreicherung in Tumorsphäroidkulturen und die Transplantation unter die Nierenkapsel immundefizienter Mäuse zum Tumorigenitätsnachweis *in vivo* etabliert.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass primäre kolorektale TIC in Tumorsphäroidkulturen funktionell effektiv angereichert werden können und ihr Differenzierungspotential beibehalten. Expressionsanalysen der Tumorsphäroidzellen lieferten neue Hinweise darauf, dass publizierte TIC-Marker wie CD133 nicht universell exprimiert werden und TIC daher nicht auf Grundlage ihres Phänotyps prospektiv angereichert werden können, ohne relevante Subfraktionen auszuschließen. Tumorsphäroidkulturen mit epithelio-mesenchyalem Expressionsprofil zeigten *in vivo* erhöhte TIC-Frequenz und Metastasierungsaktivität gegenüber rein epithelialen Tu-

morsphäroidkulturen, was auf ein Verbindung von epithelio-mesenchymaler Transition (EMT) und TIC-Funktion hindeutet.

Tumorsphäroide beinhalten Sphäroid-bildende Zellen, die sowohl in der Lage waren, sich selbst zu erneuern als auch limitiert und nicht-proliferative Zelltypen hervorzubringen.

Die Xenotransplantation lentiviral markierter, primärer Tumorsphäroidzellen und frisch aufgereinigter kolorektaler Tumorzellen in Verbindung mit hochauflösender Insertionsstellenanalyse und „next generation“-Hochdurchsatz-Sequenzierung wiesen erstmals ausgeprägte funktionelle Unterschiede innerhalb der TIC-Fraktion *in vivo* nach.

Es zeigte sich eine hierarchische Organisation des TIC-Kompartiments in unterschiedliche Zellklassen: An der Spitze eine kleine Subfraktion Langzeit-tumorigener TIC (LT-TIC), die sich selbsterneuert und damit serielles Tumorstadium aufrechterhalten. LT-TIC waren maßgeblich an der Metastasenbildung beteiligt und brachten Transient Tumor-amplifizierende Zellen (T-TAC) hervor. T-TAC dominierten das TIC-Kompartiment, und produzierten die Vielzahl postmitotischer, nicht-tumorigener Tumorzellen. Sie verfügten jedoch über keine oder nur geringe Selbsterneuerungsfähigkeit und stellen somit kein ideales therapeutisches Ziel dar.

LT-TIC konnten verzögert aktiv werden (DC-TIC) und in das Knochenmark streuen. Diese Zellen stellen eine besonders interessante Fraktion dar, da sie durch ihr Proliferationsverhalten chemoresistent sein könnten. Das Knochenmark bildete ein Reservoir tumorigener LT-TIC und damit eine potentielle Quelle für ein Rezidiv.

Die vorliegende Arbeit zeigt, dass kolorektales Tumorstadium somit durch ein Stammzellensystem ähnlich dem normalen hämatopoetischen System und dem intestinalen sowie epidermalen Epithel aufrechterhalten wird. Stochastische Einflüsse und genetische Heterogenität waren nicht für die funktionelle Heterogenität innerhalb der TIC verantwortlich, wenngleich weitere Untersuchungen zum Verhältnis von genetischer und funktioneller Heterogenität notwendig sind.

Die Fähigkeiten zu Tumorbildung, Selbsterneuerung und Metastasierung wurden unabhängig voneinander in den TIC-Subfraktionen gefunden, sodass davon auszugehen ist, dass diese Eigenschaften getrennt voneinander reguliert werden.

Der Ansatz, unterschiedliche Subpopulation der TIC anzureichern, molekular zu markieren und transplantieren, ermöglicht es, TIC *in vivo* zu identifizieren und isolieren. So können die Mechanismen analysiert werden, die den Übergang von selbsterneu-

erndem zu transient proliferierendem und von nicht-metastasierendem zu metastasierendem Phänotyp steuern. Die Ergebnisse zeigen, dass neue Pharmaka mit kurativem Ansatz die Schlüsselstellen dieser regulatorischen Prozesse gezielt angreifen sollten, um Selbsterneuerung und Metastasierung der LT-TIC in kolorektalen Karzinomen zu blockieren.