

Henrike Ava Oberlack  
Dr. med.

## ***In vivo* quiescence of delayed-contributing tumor-initiating cells and their role in chemotherapy resistance in colorectal cancer**

Einrichtung: NCT (Nationales Centrum für Tumorerkrankungen)

Doktorvater: Prof. Dr. med. Hanno Glimm

This study aims to improve the understanding of the functional heterogeneity of the human colorectal tumor-initiating cell compartment. Following previous research conducted in this group, this thesis focused on the further characterization of human colorectal delayed-contributing tumor-initiating cells. It was assessed whether delayed-contributing tumor-initiating cells are quiescent *in vivo* and whether they can retain their stem cell capabilities, tumor formation and self-renewal in serial transplantations in mice, after being subjected to chemotherapy. Delayed-contributing tumor-initiating cells are part of the human colorectal cancer tumor-initiating cell compartment and are characterized by their late contribution to tumor growth in serial transplantations (after the first generation). Long-term tumor-initiating cells, which contribute continually to tumor growth in several mice generations, as well as tumor transient-amplifying cells, which form part of the tumor mass in first generation tumors, but cannot be detected in subsequent generations, also form part of the compartment. Initially mitotically quiescent cells may play a major role in mechanisms of therapy resistance, since they may, via their lack of proliferative activity, escape the common mechanisms used e.g. in chemo- and radiotherapy.

A proliferation-sensitive lentiviral vector (H2B-GFP) was used to mark patient-derived colorectal cancer spheroid cultures in serial transplantations and subsequent clonal analysis to determine the contribution of delayed-contributing and long-term tumor-initiating cells to tumor growth after transplanting cell fractions with different proliferative activity. The lentiviral vector was successfully produced, and suitable tumor cultures and concentrations of the vector were determined to reach sufficient transductions efficiencies *in vitro*. After demonstrating a viable transducibility of the cancer spheroids, the concept was translated to the *in vivo* serial transplantations, in which mice were transplanted with H2B-GFP marked tumor spheroid cells. After the growth of the first-generation tumor, it was harvested, purified and cells were sorted according to their mitotic activity (which could be determined using H2B-GFP as a marker). The respective cell fractions (rarely, slowly and fast dividing, as well as bulk tumor cells), were retransplanted serially in two more generations. All ensuing tumors were harvested, purified and clonally analyzed, in order to be able to determine the clonal composition of the tumors.

In a second arm of the experiment, first generation mice were treated with 5-fluorouracil, a cytotoxic drug commonly used in the human colorectal cancer treatment, in order to observe whether quiescent delayed-contributing tumor-initiating cells can retain their stem cell capacities in serial transplantation even after being exposed to cytotoxic medication.

It could be shown that within the fraction of rarely dividing cells, there are cells that act as delayed-contributing tumor-initiating cells, thereby confirming that delayed-contributing tumor-initiating cells can be quiescent *in vivo*. The experiments demonstrated that these cells could retain both the ability to form tumors as well as to self-renew after chemotherapy. When assessing the relative proportions of rarely dividing cells of all tumor cells in chemotherapy-untreated and chemotherapy-treated mice, rarely dividing cells were enriched in chemotherapy-treated mice, pointing to potential survival advantages of such mitotically inactive cells over mitotically more active cell subpopulations. An exception was found in microsatellite-unstable tumor spheroid cultures, in which no enrichment of rarely dividing cells in chemotherapy-treated tumors could be observed. This may be due to the lacking effect of 5-fluorouracil on microsatellite-unstable tumors. In the clonal analysis of the tumors using linear amplification-mediated polymerase chain reaction, limiting dilution effects could be observed when comparing the tumors of mice that were transplanted with a lower cell number to tumors of mice that were transplanted with a higher cell number. In tumors transplanted with lower cell numbers, a higher number of integration sites (and therefore of tumor-

initiating cell clones) relative to the number of transplanted cells could be observed, resulting in a disproportionate relative increase particularly in the number of delayed-contributing tumor-initiating cell integration sites. However, further investigations are needed to fully understand this effect.

In summary, this work contributes to achieve a fuller understanding of the human colorectal cancer tumor-initiating cell compartment. It confirms that initially quiescent tumor-initiating cells exist and persist after being exposed to chemotherapy, while retaining their stem cell capacities. From a clinical perspective, the persistence of these cells translates to frequent treatment failure and relapse. Therefore, when devising strategies for the future therapy of colorectal cancer, initially quiescent delayed-contributing tumor-initiating cells and their properties need to be taken into account. Further research is needed to sufficiently characterize these cells and offer specific targets for the treatments to come.

Das Ziel dieser Arbeit ist es, zu einem besseren Verständnis der funktionellen Heterogenität des Kompartiments der Tumor-initiiierenden Zellen des humanen kolorektalen Karzinoms beizutragen. Nach Vorarbeiten aus dieser Gruppe konzentriert sich diese Arbeit auf die weitere Charakterisierung von humanen kolorektalen verzögert beitragenden Tumor-initiiierenden Zellen. Es wurde beobachtet, ob diese Zellen *in vivo* quieszent sind und ob sie nach der Behandlung mit Chemotherapie weiterhin Stammzeleigenschaften, also die Fähigkeit zur Bildung von Tumoren und zur Selbsterneuerung in seriellen Transplantationen im Tiermodell, aufweisen. Verzögert beitragende Tumor-initiiierende Zellen sind Teil des menschlichen kolorektalen Krebsstammzellkompartiments und spielen erst spät im Tumorwachstum in seriellen Transplantationen (nach der ersten Generation) eine Rolle. Langzeit-Tumor-initiiierende Zellen, die dauerhaft zum Tumorwachstum in mehreren Mausgenerationen beitragen, sowie transient amplifizierende Tumorzellen, die nur in der ersten Generation Teil der Tumormasse sind, aber in folgenden Generationen nicht mehr beobachtet werden, sind ebenfalls Teil des Krebsstammzellkompartiments. Initial mitotisch inaktive Zellen könnten eine wichtige Rolle in Mechanismen der Therapieresistenz spielen, da sie, aufgrund ihrer fehlenden proliferativen Aktivität, möglicherweise den üblichen Mechanismen von Chemo- und Radiotherapie entkommen können.

Ein proliferationssensitiver lentiviraler Vektor (H2B-GFP) wurde genutzt, um primäre kolorektale Karzinomspheroiden in seriellen Transplantationen und in der darauffolgenden klonalen Analyse zu markieren und so nach der Transplantation mit unterschiedlicher proliferativer Aktivität den Beitrag von verzögert beitragenden und Langzeit-Tumor-initiiierenden Zellen zum Tumorwachstum zu beurteilen. Nach der erfolgreichen Produktion des lentiviralen Vektors wurden passende Tumorkulturen und Vektorkonzentrationen bestimmt, um ausreichende Transduktionseffizienzen *in vitro* zu erreichen. Nachdem die Transduzierbarkeit der Spheroidkulturen gezeigt wurde, konnte dieses Konzept in seriellen Transplantationen *in vivo* angewendet werden, indem Mäuse mit H2B-GFP-markierten Tumorzellen transplantiert wurden. Die Zellen der Tumore der ersten Generation wurden nach mitotischer Aktivität durchflusszytometrisch sortiert, indem H2B-GFP als Marker verwendet wurde. Die entsprechenden Zellfraktionen (selten, langsam und schnell teilende Zellen) wurden seriell über zwei weitere Generationen transplantiert. Alle daraus resultierenden Tumore wurden vereinzelt und klonal analysiert, um die Zusammensetzung der Tumoren zu untersuchen.

In einem zweiten Teil des Experiments wurden die Mäuse der ersten Generation mit 5-Fluoruracil behandelt, einem häufig in der Darmkrebstherapie verwendeten, zytotoxischen Medikament. Es wurde beobachtet, ob mitotisch inaktive verzögert beitragende Tumor-initiiierende Zellen ihre Stammzeleigenschaften, d.h. die Fähigkeiten zur Tumorbildung und Selbsterneuerung, auch nach einer Chemotherapie behalten.

Durch die Experimente konnte gezeigt werden, dass sich in der Fraktion der selten teilenden Zellen verzögert-beitragende Tumor-initiiierende Zellen befinden. Dies bestätigt, dass verzögert-beitragende Tumor-initiiierende Zellen *in vivo* quieszent sein können. Weiterhin wiesen diese selten teilenden Zellen ihre Stammzeleigenschaften auch nach der Behandlung mit Chemotherapie noch auf. In der Analyse der relativen Anteile von selten teilenden Zellen an allen Tumorzellen in Chemotherapie-unbehandelten und -behandelten Mäusen waren die selten teilenden Zellen in den Tumoren der Chemotherapie-behandelten Mäuse angereichert. Dies weist auf einen möglichen Überlebensvorteil von solch mitotisch inaktiven Zellen gegenüber mitotisch aktiveren

Zellpopulationen hin. Eine Ausnahme wurde bei Mikrosatelliten-instabilen Tumorspheroidkulturen gefunden, bei denen keine Anreicherung von selten teilenden Zellen in mit Chemotherapie behandelten Tumoren beobachtet werden konnte. Dies könnte am bereits beschriebenen mangelnden Effekt von 5-Fluoruracil auf Mikrosatelliten-instabile Tumore liegen. In der klonalen Analyse der Tumore mit *linear amplification-mediated polymerase chain reaction*, konnten Effekte der limitierenden Verdünnung beobachtet werden im Vergleich zwischen Tumoren von Mäusen, die mit niedrigeren Zellzahlen transplantiert wurden und Tumoren von Mäusen, die mit höheren Zellzahlen transplantiert wurden. In Tumoren, die aus einer niedrigeren Zellzahl hervorgingen, konnte eine höhere Zahl von klonalen Integrationsstellen (und daher von Tumor-initiiierenden Zellklonen) im Verhältnis zur Anzahl der transplantierten Zellen beobachtet werden. Daraus resultierte insbesondere ein unproportionaler relativer Zuwachs in der Zahl von Integrationsstellen von verzögert-beitragenden Tumor-initiiierenden Zellen. Zur Erklärung dieses Effektes sind jedoch weiterführende Experimente notwendig.

Zusammenfassend trägt diese Arbeit zu einem besseren Verständnis des humanen kolorektalen Krebsstammzellkompartiments bei. Sie bestätigt, dass initial quieszente Tumor-initiiierende Zellen existieren sowie nach der Behandlung mit Chemotherapie weiterhin persistieren können und ihre Stammzeleigenschaften behalten. Aus einer klinischen Perspektive stellt das Fortbestehen dieser Zellen möglicherweise den Grund für das häufige Therapieversagen und Krankheitsrezidive beim kolorektalen Karzinom dar. Daher muss, wenn Strategien für neue Therapien dieser Erkrankung entwickelt werden sollen, diese Zellfraktion und ihre Eigenschaften berücksichtigt werden. Weitere Forschung ist nötig, um diese Zellen besser zu charakterisieren und dadurch sinnvolle Ziele für zukünftige Therapieregimes dieser Erkrankung zu finden.