

Hendrik Strakerjahn  
Dr. med.

## **Lokalisation kolorektaler Tumor-initiierender Zellen im Knochenmark**

Einrichtung: DKFZ (Deutsches Krebsforschungszentrum)  
Doktorvater: Prof. Dr. med. Hanno Glimm

Das kolorektale Karzinom ist weltweit eine der häufigsten Tumorerkrankungen und jährlich für ungefähr 700.000 Todesfälle verantwortlich. Trotz guter Prognose in frühen Erkrankungsstadien entwickeln bis zu 50 % aller Patienten Fernmetastasen. Nur die Subpopulation Tumor-initiierender Zellen (TIC) kann das maligne Wachstum dauerhaft aufrechterhalten. Disseminierte Tumorzellen (DTC) können auch in frühen Krankheitsstadien im Knochenmark von Patienten nachgewiesen werden und waren in einigen Studien mit einer schlechten Prognose assoziiert. Disseminierte Tumorzellen mit TIC-Potenzial könnten durch Reaktivierung und erneute Dissemination ursächlich für Rezidiv und Metastasierung sein. Bei einigen Tumorentitäten konnte eine perivaskuläre Lokalisation disseminierter Tumorzellen mit Kontakt zu Endothelzellen nachgewiesen werden. Ein Ziel dieser Arbeit war daher die Etablierung eines *in-vitro* Modells zur Analyse der Interaktionen zwischen Tumorzellen und Endothelzellen. Weiterhin sollte untersucht werden, welche kolorektalen Tumorsphäroidkulturen (TSC) im Xenograftmodell in das Knochenmark disseminieren und wo diese lokalisiert sind.

Ein in dieser Arbeit produzierter lentiviraler Vektor ermöglichte die serumfreie Kultivierung von primären Endothelzellen durch die Expression des adenoviralen *E4ORF1*-Gens. Dabei zeigte sich, dass die korrekte Sequenz der C-terminalen Domäne für die Funktion des Genprodukts essenziell ist, da eine Insertionsmutation im Stoppcodon zum Absterben transduzierter Endothelzellen unter serumfreien Bedingungen führte. Darüber hinaus wurde ein *in-vitro* Modell erfolgreich etabliert, welches die Analyse der Interaktionen von Tumorzellen mit endothelialen Netzwerken ermöglicht. Die Kokultivierung von Endothelzellen mit mesenchymalen Stamm- und Progenitorzellen führte dabei zur Reorganisation und Bildung eines komplexen, röhrenartigen Endothelzellnetzwerkes aus prototypischen Gefäßen. Nach Markierung mit Grün fluoreszierendem Protein (GFP) wurden kolorektale Tumorzellen auf mCherry-markierte Endothelzellnetzwerke gegeben. Dadurch konnte die relative Position zueinander fluoreszenzmikroskopisch erfasst werden. Die Bildgebung des gesamten Netzwerkes ermöglichte die

Auswahl spezifischer Regionen und deren Nachverfolgung im Zeitverlauf. So konnte der qualitative Nachweis erbracht werden, dass einige Tumorzellen in direktem Kontakt zu Endothelzellen stehen und die Fähigkeit zur Migration und Proliferation besitzen. Die Etablierung dieser Kokultivierung ermöglichte aufbauende Arbeiten, die den quantitativen Nachweis der perivaskulären Lokalisation kolorektaler Tumorzellen *in-vitro* erbrachten und zeigten, dass sich Tumorzellen im Zeitverlauf dem Endothel nähern.

Um die Dissemination von Tumorsphäroidkulturen in das Knochenmark *in-vivo* zu analysieren, wurden im Rahmen dieser Arbeit 9 TSC mit GFP markiert und unter die Nierenkapsel immundefizienter Mäuse transplantiert. Dabei konnten Tumor- und Metastasenbildung in dem verwendeten Xenograftmodell nachgewiesen werden. Bei 1 von 9 TSC konnte die Dissemination und das sphäroidbildende-Potential durch Isolierung und Kultivierung GFP-markierter Tumorzellen aus dem Knochenmark nachgewiesen werden. Im Rahmen einer Kooperation gelang dieser Nachweis bei insgesamt 3 von 10 TSC. Im Vergleich dazu konnten bei 8 von 10 TSC disseminierte Tumorzellen konfokalmikroskopisch detektiert werden. Die Differenz könnte darauf zurückzuführen sein, dass nicht alle DTC sphäroidbildendes-Potential besitzen, sich in einem Ruhezustand befinden oder bei Isolierung des Knochenmarks geschädigt werden. Klinische Untersuchungen haben gezeigt, dass nur eine Subfraktion disseminierter Zellen von prognostischem Interesse ist, da nur diese mit einer nachfolgenden Metastasierung einhergehen. Die genauere Charakterisierung unterschiedlicher DTC und ihrer Interaktionen mit der Mikroumgebung könnte die Identifizierung der pathophysiologisch relevanten Zellen und die therapeutische Manipulation von Mechanismen für Ruhezustand und TIC-Potenzial ermöglichen. Das in dieser Arbeit etablierte *in-vitro* Kokultivierungsmodell könnte dabei einen wertvollen Beitrag leisten.