

Ein praktischer Leitfaden für die Präzisionskrebsforschung mit Tumor-Organoiden

Das PreCanMed-Handbuch

Interreg

Italia-Österreich

European Regional Development Fund



EUROPEAN UNION



Ein praktischer Leitfaden für die Präzisionskrebsforschung mit Tumor-Organoiden

Das PreCanMed-Handbuch

Design: Promoscience srl

Redaktion: Prof. Stefan Schoeftner, Elena Campaner, PhD; Odessa Schillacci, PhD; Alessandro Zannini, PhD ; Mariangela Santorsola, PhD.

Autoren: **LNCIB** (Prof. Stefan Schoeftner, Odessa Schillacci, Mariangela Santorsola, Michele Scarola, Elisa Commisso, Eleonora Ingallina), **UNITS** (Prof. Giannino Del Sal, Elena Campaner, Alessandro Zannini, Prof. Maurizio Zanconati, Prof. Marina Bortul, Dr. Maurizio Cortale, Dr. Deborah Bonazza, Alessandra Rustighi), **UNIUD** (Prof. Gianluca Tell, Marta Codrich, Chiara Dal Secco, Prof. Claudio Brancolini, Prof. Roberta Benetti, Prof. Carlo Pucillo, Prof. Carla Di Loretto, Prof. Giovanni Terrosu), **ADSI** (Mag. Markus Pasterk, Dr. Laco Kacani, Dr. Ronald Gstir, Iris Krainer, Przemyslaw Filipek, Ruth Joas), **MUI** (Prof. Lukas Huber, Prof. Heinz Zwierzina, Dr. Arno Amann, Dr. Afschin Soleiman, Dr. Stefan Scheidl, Edith Lorenz).

Gedruckt im Juni 2019



PreCanMed ist ein Projekt finanziert durch die Europäische Union, Europäischer Fond für regionale Entwicklung und Programm Interreg V-A Italien-Österreich 2014-2020

Vorwort



Prof. Stefan Schoeftner
Projektkoordinator

Die Bereitstellung einer effizienten und öffentlich zugänglichen Gesundheitsversorgung ist ein zentrales Ziel der Europäischen Union, um integratives Wachstum in den Mitgliedstaaten sicherzustellen. Verbesserungen der medizinischen Versorgung haben die Lebenserwartung in westlichen Gesellschaften während der letzten 40 Jahren erheblich erhöht. Die Verlängerung der Lebensdauer wurde allerdings durch einen starken Anstieg von altersbedingten Krankheiten, wie zum Beispiel Krebs, begleitet.

Gesundheitsstatistiken ergaben, dass 2012 jeder vierte Bürger Gefahr läuft an Krebs zu erkranken. Es wird erwartet, dass die Zahl der neuen Krebsfälle in den Mitgliedstaaten der Europäischen Union von 2,6 Mio. pro Jahr im Jahr 2012 auf 3,1 Mio. im Jahr 2025 zunehmen werden. Diese Dynamik birgt ein erhebliches Risiko für die Nachhaltigkeit der öffentlichen Gesundheitssysteme.

Um eine wirksame und integrative Patientenversorgung gewährleisten zu können, wurden von der Europäischen Union eine Serie von Initiativen zur Förderung von Innovationen im Gesundheitsbereich und Modernisierung der Gesundheitsdienste gestartet. Die Bündelung von Ressourcen und der Austausch von Know-how zwischen EU-Mitgliedstaaten und grenzüberschreitenden Regionen sind zentrale Säulen dieser Innovationsstrategie.

Das vom Europäischen Fond für regionale En-

twicklung finanzierte Interreg V-A Italia-Austria 2014-2020 Projekt „PreCanMed“ unterstützte ein Team von 5 Spitzenforschungseinrichtungen in Tirol und Friaul-Julisch-Venetien bei der Bündelung der Kompetenzen zur Implementierung einer Technologie für Präzisionskrebsmedizin.

Das 'PreCanMed' Team etablierte innovative Technologien in der italienisch-österreichischen Grenzregion, die es ermöglichen, den Tumor eines Patienten detailgetreu im Labor nachzubilden. Die wissenschaftliche Analyse dieser Tumormodelle, auch als "Tumor-Organoid" bezeichnet, ermöglicht die Identifizierung von Therapieansätzen, die auf den einzelnen Patienten zugeschnitten sind. Dies ist ein wichtiger Schritt in Richtung effizienterer Krebstherapien.

'PreCanMed' hat eine Reihe öffentlich zugänglicher Versuchsprotokolle erstellt, Ressourcen für die Präzisionskrebsmedizin gebildet, neue Fachexperten geschult und einen stabilen Kontakt zu Interessengruppen hergestellt, um die Entwicklung und Erforschung personalisierter Therapien innerhalb und außerhalb der Programmregion zu beschleunigen.

Damit wird eine Schlüsseltechnologie der Präzisionskrebsmedizin für Experten und Bürger der Region zugänglich und leistet dadurch einen wichtigen Beitrag zur Verbesserung der Patientenversorgung und zukünftigen Nachhaltigkeit der öffentlichen Gesundheitssysteme.

zusammen- fassung

Präzisionsmedizin ist ein umfassender, prospektiver Ansatz zur Vorbeugung, Diagnose und Behandlung von Krankheiten, bei dem die individuellen klinischen, genetischen, genomischen und umweltbezogenen Informationen der betroffenen Person berücksichtigt werden. Dieser Ansatz hat besondere Bedeutung für Krebs, eine besonders heterogene und dynamische Krankheit, die durch patientenspezifische Genmutationen charakterisiert ist.

Tumormodelle, welche die originalgetreue Rekonstruktion eines Patiententumors im Labor ermöglichen, sind für die Erfassung der Komplexität von Krebserkrankungen von zentraler Bedeutung. Tumor-Organoiden sind ein wesentlicher Baustein dieses Forschungsansatzes. Tumor-Organoiden sind 3D-Zellkulturmodelle, die aus chirurgisch entferntem Tumorgewebe des Patienten gewonnen und im Labor kultiviert werden. Diese Zellkulturen spiegeln genau die Eigenschaften des ursprünglichen Tumors wider und stellen somit ein vielversprechendes Werkzeug dar, um das ursprüngliche Krebsgewebe nachzuahmen. Die Durchführung genomischer Analysen von Tumorgewebe und Tumor-Organoiden ermöglicht die Identifizierung von Tumorabhängigkeiten und -schwachstellen, welche auf patientenspezifischen Genmutationen oder Genexpressionsveränderungen zurückzuführen sind. Dies ermöglicht es, patientenspezifische Therapieansätze an Tumor-Organoiden zu testen und deren Wirksamkeit mit Standardtherapien zu vergleichen. Dadurch können Onkologen zusätzliche Informationen für die Entwicklung effizienter zukünftiger Krebstherapien erhalten.

Die Einführung der Präzisionsmedizin erfordert multidisziplinäres Fachwissen in verschiedenen Bereichen der Krebsforschung, das am besten durch die Zusammenarbeit verschiedener Forschungseinrichtungen abgedeckt werden kann.

Das Interreg V-A Italia-Austria 2014-2020-Projekt 'PreCanMed' (Schaffung einer Plattform für Präzisionskrebsmedizin) koordinierte fünf Exzellenz-Krebsforschungsinstitute in der italienisch-österreichischen Grenzregion, um eine Technologieplattform für die Präzisionsmedizin für Darm-, Brust- und Lungenkrebs zu errichten.

Die Projektpartner von 'PreCanMed' implementierten Protokolle für i) die Erzeugung und Kryokonservierung von Tumor-Organoidmodellen, ii) Genomanalysen, um genetisch bedingte Tumorabhängigkeiten und -schwachstellen aufzudecken und iii) das Ermitteln der Wirksamkeit therapeutischer Ansätze mittels Tumor-Organoiden. Die

Partner stellten auch Ressourcen an biologischem Material und Daten für die Präzisionskrebsmedizin zur Verfügung.

Unser technisches Handbuch enthält einen detaillierten Leitfaden für Forscher, die in der akademischen oder pharmazeutischen Forschung tätig sind. Das Handbuch beschreibt allgemeine Vorgehensweisen, Strategien und Erfahrungen, die während der Projektlaufzeit gesammelt wurden, und stellt zentrale Methoden als Standardarbeitsanweisungen (Standard Operating Procedures, SOPs) zur Verfügung. Dies ermöglicht die effiziente Etablierung von Organoid-Technologie für Lungen-, Brust- und kolorektalem Krebs in einem Krebsforschungslabor.

Das PreCanMed-Handbuch besteht aus 11 Abschnitten und SOPs, welche Schritt für Schritt die Einführung der Tumororganoid-Technologie beschreiben:

1. Bioethik-Zulassung und Patienten-Einverständniserklärung für die PreCanMed-Beobachtungsstudie
2. Kommunikationsmittel für den raschen Transport von Gewebe zu Forschungslabors
3. Beurteilung des Gewebematerials zur Gewinnung von Zellmaterial für die Kultivierung von Organoiden
4. Aufbereitung des Patientengewebes zur Gewinnung von Zellmaterial für die Kultivierung von Organoiden
5. Kultivierung von Tumor-Organoiden in Matrigel
6. Expansion von Organoidenkulturen
7. Kryokonservierung von Organoidkulturen
8. Validierung von histopathologischen Merkmalen an Tumor Organoid Kulturen
9. Genomanalyse von Tumor-Organoiden
10. Medikamententestung an Tumor-Organoiden
11. PreCanMed-Datenbank

Die angeführten Inhalte sowie weitere SOPs sind über die PreCanMed Projektwebsite (www.pre-canmed.eu) erhältlich.

Dieses Handbuch hat das Ziel, die Tumororganoid-Technologie Forschern in und außerhalb der Interreg V-A Italia-Austria Programmregion zugänglich zu machen, um die Entwicklung und Erprobung personalisierter Therapien für Krebspatienten zu beschleunigen.

11
17
29

31

35

37

41

45

61
65

69

75

87

91

DAS PROJEKT

DAS PRECANMED-TEAM

ANLEITUNG ZUR ETABLIERUNG VON
TUMOR-ORGANOID TECHNOLOGIE

Einleitung

1. Bioethik-Zulassung und Patienten-
Einverständniserklärung für die
PreCanMed-Beobachtungsstudie

2. Kommunikationsmittel für
den raschen Transport von
Gewebe zu Forschungslabors

3. Beurteilung des Gewebematerials
zur Erzeugung von Organoiden
aus normalem Gewebe
und Tumorgewebe

4. Aufbereitung des
Patientengewebes zur Gewinnung
von Zellmaterial für die
Kultivierung von Organoiden

5. Kultivierung von Tumor-
Organoiden in Matrigel

6. Expansion von Organoidkulturen

7. Kryokonservierung von
Organoidkulturen

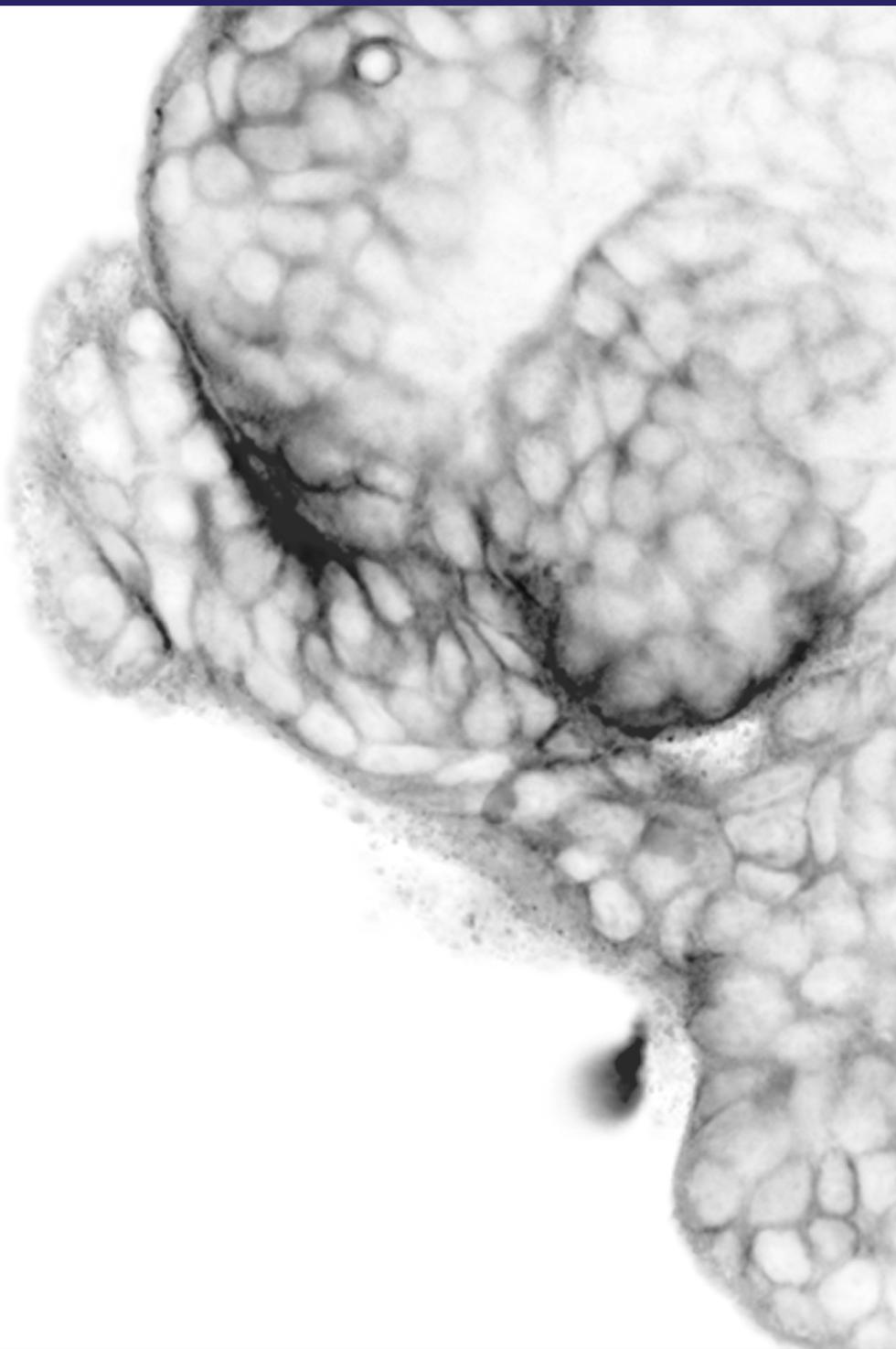
8. Validierung von
histopathologischen Merkmalen
an Tumor Organoid Kulturen

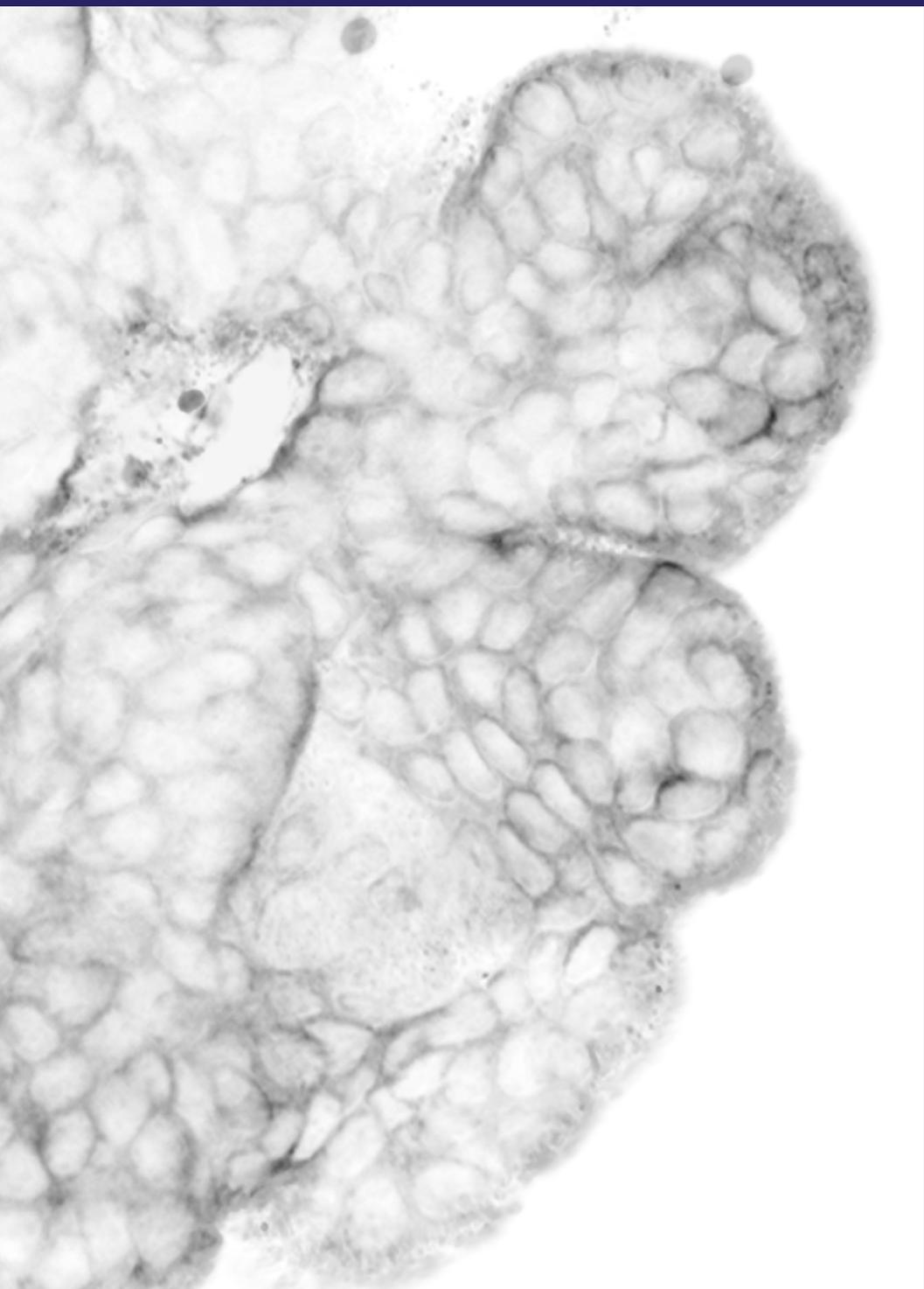
9. Genomanalyse von
Tumor-Organoiden

10. Medikamententestungen
an Tumor-Organoiden

11. PreCanMed Datenbank

inhalt







Das Projekt

PreCanMed ist ein strategisches Projekt, das von der EU, dem europäischen Fonds für regionale Entwicklung und das Interreg V-A Italia-Österreich Programm 2014-2020 gefördert wird. Durch die Zusammenarbeit der PreCanMed Partner wird die Etablierung der Tumor-Organoid-Technologie interregional vorangetrieben. Die vielversprechende neue Technologie ermöglicht es, mit gesundem sowie malignem Gewebe aus Patientenproben direkt an der Entwicklung von maßgeschneiderten Behandlungen zu forschen. Das Projekt - das von den lokalen österreichischen und italienischen Bioethik-Kommissionen bereits bewilligt wurde - zielt darauf ab, ein funktionierendes Netzwerk zu schaffen, damit diese Technologie künftig für eine breite Anwendung zur Verfügung steht.

PreCanMed soll

- *unser Verständnis von der Vielschichtigkeit der Krankheit verbessern,*
- *neue Durchbrüche in der Krebsmedizin ermöglichen und*
- *dazu beitragen, das vielversprechende Potenzial der personalisierten Medizin zu nutzen.*

Tumor-Organoid Technologie

Als Tumor-Organoid-Technologie bezeichnet man funktionelle 3D-, ex vivo-Zellkultursysteme, die aus Tumorzellen von Patienten gezüchtet werden.

Als effektive "Patienten Avatare", haben sich diese Systeme als eine der modernsten Modelle für Krankheiten herausgestellt. Sie sind eine vielversprechende experimentelle Methode, um einen Tumor im Labor in einem naturgetreuen Zustand wachsen zu lassen und zu untersuchen.

Mini organe aus der schale

Der Begriff 'Organoid' bedeutet 'einem Organ ähnlich' und bezieht sich auf die 3D Struktur, die Wissenschaftler unter speziellen Bedingungen aus Stammzellen wachsen lassen können.

Die Stammzellen werden dafür aus Gewebeproben eines Organismus entnommen. Ein 'Tumoroid' oder ein Tumor-Organoid ist eine ebensolche Struktur und stammt von der Probe eines Krebsgewebes, die während einer Operation oder einer Biopsie entnommen wurde.

Ein Organoid bzw. ein Tumororganoid ist ein in vitro System, aber es ahmt die Situation in vivo und sogar die Differenzierung in mehrere Zelltypen des ursprünglichen Gewebes gut nach. Da es eine aktive (Krebs-) Stammzellen Population enthält, kann ein Organoid gut kultiviert und stark vermehrt werden, was eine Vielzahl an Untersuchungen ermöglicht.

Organoid züchten

Verschiedene Gewebearten brauchen unterschiedliche Voraussetzungen, um die Anzucht von Organoiden zu ermöglichen.

Kulturbedingungen müssen u.a. die in vivo Signale simulieren, die für die Ausbildung des Gewebes und für den Erhalt der Stammzellpopulation erforderlich sind. Nur dann proliferieren Zellen in Kultur und organisieren sich selbst zu 3D-Strukturen, die passagierbar und nahezu unbegrenzt verwendbar sind. Diverse Kulturbedingungen konnten bereits etabliert werden, um Organoiden aus verschiedenen gesunden und kranken humanen Geweben wachsen zu lassen.

Die Kooperation der PreCanMed-Partner sorgt dafür, dass vorhandenes Wissen genutzt und weiteres Know-how für die Entwicklung von Tumororganoiden aus Brust-, Lungen- und Kolonkarzinomen gewonnen wird. Aus Operationen oder Biopsien stammende Tumorproben werden mit verschiedenen Verfahren behandelt, um die besten Bedingungen zu identifizieren, die das Wachstum solcher organoider Systeme ermöglichen.

Leistungsstarke modellsysteme

Von Patientenproben stammende Tumororganoiden sind als präklinische Krebsmodelle relativ neu. Krebszelllinien und Tiermodelle, die schon seit langem als Modellsysteme verwendet werden, erlauben zwar grundlegende Experimente, aber beide Modelle spiegeln menschliche Tumore, ihre onkogenen Prozesse sowie ihre Heterogenität nicht zur Gänze wider.

Implantierte Krebsgewebe-Chips in Mäusen (von Patienten stammendes Tumor-Xenotransplantat) stellte sich ebenfalls als vielversprechendes Modell heraus. Physiologische Merkmale dieses Modells ähneln stark dem Ursprungstumor und klinische Antworten des Tumors auf eine Therapie können gut abgeschätzt werden. Dennoch wird die Xenograft-Transplantation nicht verbreitet verwendet, da das Verfahren teuer und zeitaufwendig ist. Von Patientenproben stammende Tumororganoiden sind daher eine vielversprechende Alternative, um das ursprüngliche Krebsgewebe nachzuahmen. Sie spiegeln Tumormorphologie, molekulare Subtypen und die Reaktion auf Behandlungen gut wider.

Organoiden können mit hoher Effizienz generiert, in flüssigem Stickstoff eingefroren und später zur weiteren Verwendung reaktiviert werden. Organoiden können aus Biopsien bzw. chirurgischen Resektionen sowohl aus gesundem als auch aus malignem Gewebe gezüchtet werden.

Dieser Ansatz wird von den PreCanMed Partnern realisiert.

Entwickelte Organoiden sind Modelle, die wichtige molekulare Merkmale des Ursprungstumors im Patienten enthalten. In PreCanMed wird jedes Organoid mit verschiedenen Omics-Technologien und durch Medikamentenbehandlung beschrieben. So wird eine Datenbank erstellt, die Genexpressionsinformationen des Organoids mit den Wirkungen auf Medikamente verknüpft.

Molekular- und
Arzneimitteltoxizitäts-
profile

Molekulare analysen

PreCanMed-Partner konzentrieren sich auf die Erforschung des proteinkodierenden Teils des Krebsgenoms. Mithilfe der Exomsequenzierungsmethode können Genvarianten nachgewiesen werden, die das Fortschreiten der Krankheit oder das Ansprechen auf eine bestimmte Therapie beeinflussen könnten.

Genomische Daten werden mit den kompletten Genexpressionprofilen verglichen, die durch DNA-Microarray-Analyse von Organoiden erhalten wurden. Die genetische Fingerabdrücke und Expressionssignaturen werden dann mit den klinischen Daten der Patienten zusammengeführt.

Wirkstoffkandidaten

Die bioinformatische Analyse des genetischen Fingerabdrucks von Tumororganoiden ermöglicht es, bestimmte biologische Signalwege zu identifizieren, die eine Tumorstoffwirkung induzieren. So ein Signalweg kann eine unbekannte Achillesferse des Tumors darstellen, welche als Ziel für einen chemischen Wirkstoff eines neuen Medikaments anvisiert werden kann.

Auf der Basis von Bioinformatik-Analysen werden die PreCanMed-Partner für jedes Tumororganoid ein Panel potenzieller Medikamente identifizieren.

Die Medikamente werden dann auf ihr Potenzial, das Wachstum spezifischer Tumororganoiden zu begrenzen, getestet.

Die Biobank

Ein wichtiges Ziel von PreCanMed ist die Schaffung einer Biobank aus Tumor-Organoiden, die von Patientenproben stammen.

Unsere Biobank ist das Ergebnis gemeinsamer Bestrebungen von PreCanMed Klinikern, Onkologen, Omics- bzw. Technologieexperten und Bioinformatikern, eine Harmonisierung und Standardisierung aller Prozesse, von der Entnahme, über die Verarbeitung, der Einlagerung bis hin zur Forschung zu erreichen.

Eingelagerte proben

Nur von jenen Patienten werden Tumorproben gesammelt, die den Einschlusskriterien der PreCanMed-Beobachtungsstudie entsprechen, und die eine Einverständniserklärung unterzeichnet haben.

Die Proben umfassen klinisch überschüssiges erkranktes und dazu passendes gesundes Gewebe aus chirurgischen Resektionen von Brust-, Lungen- und Dickdarmkrebs sowie von Mesotheliom.

Anonymisierte, mit den Proben assoziierte Daten

Die PreCanMed Biobank sammelt drei Kategorien von Daten zu von Patienten abgeleiteten Organoiden:

- klinische Daten der Patienten mit Informationen zur Diagnose, zu den durchgeführten molekularen und histo-pathologischen Analysen, zu den verschriebenen Medikamenten oder Behandlungen und zu den Reaktionen auf die Therapien;
- genomische Daten von den patientenabgeleiteten Organoiden,
- Genexpressionsprofile der Tumor-Organoide.

Die von PreCanMed gesammelten klinischen Daten werden entsprechend dem strengen Datenschutz nur in verschlüsselter Form gespeichert.

Jedes einzelne Tumor-Organoid stellt ein persönliches, dynamisches Krankheitsmodell dar und ermöglicht Experimente auf Patientenebene, wie es bisher nicht möglich war.

Jedes Tumoroid ermöglicht somit:

- die Charakterisierung spezifischer molekularer Merkmale
- das Testen von Chemotherapien und gezielter Therapien sowie das Screening von Wirkstoffen (Kombinationen und unterschiedliche Dosierungen von einem oder mehreren Medikamenten können getestet werden)
- die Identifizierung von Medikamenten, die spezifische Antitumorwirkungen auf einen definierten Tumortyp ausüben und die Mechanismen dahinter
- die Identifizierung neuer therapeutischer Ziele und neuer Biomarker, die den Krankheitsverlauf und die Antwort auf Therapien anzeigen
- die Einschätzung, wie eine Behandlung klinisch wirkt.

Mithilfe der PreCanMed Partner soll diese Technologie vorangetrieben werden, was in Folge die Personalisierung therapeutischer Ansätze weiter beschleunigt.

Wegbereiter für
personalisierte
Therapien



Das PreCanMed-Team



- _ **LNCIB** | Consorzio Interuniversitario per le Biotechnologie – Laboratorio Nazionale CIB
- _ **UNITS** | Università degli studi di Trieste
- _ **UNIUD** | Università degli studi di Udine
- _ **ADSI** | Austrian Drug Screening Institute
- _ **MUI** | Medizinische Universität Innsbruck



LNCIB

Consorzio Interuniversitario per le Biotecnologie – Laboratorio Nazionale CIB

Trieste, Italien -

Forschungsleitung

Das Interuniversitäre Konsortium für Biotechnologie - Nationales Labor CIB (LNCIB) wurde 1992 gegründet und forscht an den biologischen Mechanismen, die zur Entstehung und zum Wachstum von Tumoren führen. Heute ist LNCIB ein etabliertes und international renommiertes Krebsforschungsinstitut, eingebettet in den Area Science Park, den Wissenschafts- und Technologiepark in Padriciano, Triest.

LNCIB ist ein Kompetenzzentrum auf dem Gebiet der Biotechnologie und wurde von der Region Friaul Julisch Venetien als "Hochqualifiziertes Labor für angewandte Forschung und funktionelle Krebsgenomik" zertifiziert.

Ein Hauptziel des Instituts ist es, sowohl die Ergebnisse der Grundlagenforschung in die Klinik zu transferieren, als auch als Zentrum für Know-how und Training zu fungieren. LNCIB bildet so eine neue Generation von Forschern und Technikern für die Krebsforschung aus. Jedes Jahr arbeiten viele Masterstudenten und Doktoranden in den Forschungsprojekten des LNCIB mit.

Das Institut ist auch ein Referenzzentrum in Friaul Julisch Venetien für die Entwicklung neuer Technologien im Bereich der Krebsforschung.

Das hohe Forschungsniveau auf dem Gebiet der molekularen Onkologie wird durch das Profil und die Expertise der LNCIB-Forscher sowie durch das Netzwerk mit regionalen, nationalen und internationalen Forschungseinrichtungen gewährleistet.

LNCIB verfügt über eine Fläche von 300 Quadratmetern gut ausgerüsteter Labore und mehr als 45 nationalen und inter-

nationalen Forschern, die in fünf verschiedenen Forschungsgruppen an zwölf verschiedenen Forschungsprogrammen arbeiten.

Die Forschung am LNCIB konzentriert sich auf die wichtigsten biologischen Mechanismen von Krebszellen. Ziel der Aktivitäten ist es, die molekularen Mechanismen zu untersuchen, die die Entstehung und Progression von Tumoren ermöglichen, um dann "Achillesfersen" der Krankheit zu entdecken.

Folgende operative Einheiten forschen zu diesen Themen:

- Abteilung für funktionelle Genomik,
- Abteilung für Molekulare Onkologie,
- Abteilung für Differenzierung und Ontogenese,
- Abteilung für Onco-Epigenetik und
- Abteilung für genomische Stabilität.

Die Forschungsaktivitäten der einzelnen Abteilungen werden von der Italienischen Gesellschaft für Krebsforschung (AIRC), Telethon, der Europäischen Kommission, dem italienischen Ministerium für Bildung, Universitäten und Forschung, der Region Friaul Julisch Venetien, privaten Stiftungen und Spenden unterstützt.

Das Interuniversitäre Konsortium für Biotechnologie – Nationales Labor CIB ist Konsortialführer von PreCanMed.



Team LNCIB

*Prof. Stefan Schoeftner
Odessa Schillaci
Mariangela Santorsola
Michele Scarola
Elisa Commisso
Eleonora Ingallina*



UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI DI TRIESTE

UNITS

Università degli studi di Trieste

Trieste, Italien

Die Universität Triest (UNITS) ist eine forschungsaktive Universität mit mehr als 17.000 Mitarbeitern in Forschung und Lehre (einschließlich Bachelor-, Master- und Medizinstudenten).

Zehn Abteilungen decken drei disziplinäre Bereiche ab i) Biowissenschaften und Gesundheit, ii) Sozialwissenschaften und Geisteswissenschaften und iii) Mathematik, physikalische Wissenschaften, Chemie, Ingenieurwissenschaften und Geowissenschaften.

UNITS, von US News - Best Global Universities Ranking 2017, als fünftbeste Universität in Italien geehrt, ist eingebettet in eine dynamische, internationale High-Tech-Umgebung, die aus mehreren lokalen, miteinander verbundenen Forschungseinrichtungen besteht.

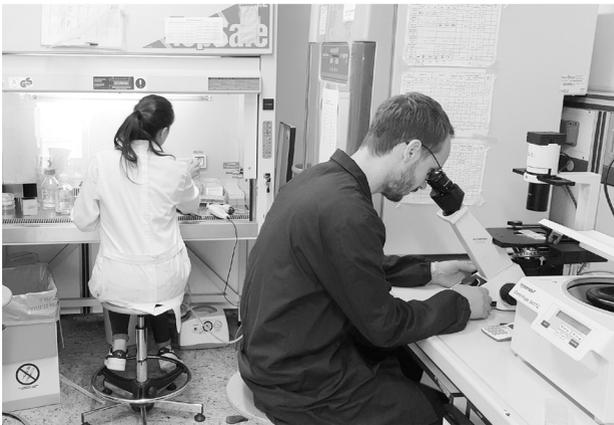
Im Projekt PreCanMed sind zwei Abteilungen von UNITS beteiligt: das Department of Life Sciences und das Department of Medicine, Surgical und Health Sciences. Das Department of Life Sciences (DSV) zählt 80 Dozenten und etwa 200 Mitarbeiter. Die Aktivitäten von DSV reichen von Biomedizin bis zu Umweltbiologie, Psychologie und Kognitionswissenschaften. Der Bereich der Biomedizin ist stark vertreten und umfasst die Biochemie des Stoffwechsels, Pharmakologie, Molekulare Onkologie, Biomaterialien für Tissue Engineering, neurodegenerative Erkrankungen und Pharmakogenomik.

Das DSV hat eine hohe Erfolgsbilanz bei der Rekrutierung, Koordination und Verwaltung von Drittmitteln und bei der Durchführung von Finanz-, Verwaltungs- und Managementaufgaben in europäischen Forschungsprojekten. Das DSV hat in den vergangenen vier Jahren als Koordinator oder als Partner in 14 von der EU (co-)finanzierten Projekten teilgenommen.

Die Medizinische Fakultät (DSM) zählt 13 ordentliche Professuren, 41 außerordentliche Professuren, 38 Forscher und 54 technisch-administrative Mitarbeiter, 47 Forschungsstipendiaten und 46 Doktoranden. DSM führt sowohl wissenschaftliche Forschung und Lehre als auch Healthcare Aktivitäten in verschiedenen Bereichen der Medizin durch und integriert für die Grundlagen- als auch klinisch angewandte Forschung verschiedene Disziplinen. DSM-Aktivitäten werden in Zusammenarbeit mit drei Institutionen durchgeführt: Cattinara Hospital, Maggiore Hospital und IRCCS Burlo Garofolo.

Der wissenschaftliche Fokus liegt dabei auf molekularen, zellbiologischen und genetischen Mechanismen, die der Pathophysiologie und Pathogenese einer Vielzahl von Krankheiten zugrunde liegen. Für das Ziel, innovative zielgerichtete Therapien zu entwickeln, befassen sich mehrere Forschungsrichtungen unter anderem mit Populationsgenetik, Molekularbiologie, Methoden zur Zellkultur, regenerativen Medizin, Biobanken und experimentellen Modellen zur Untersuchung von menschlichen Krankheiten. Das DSM verfügt insbesondere über Kompetenz und Know-how in der Krebs-Molekular Diagnostik, basierend auf den neuesten technologischen Plattformen. Im Rahmen einer spezifischen institutionellen Vereinbarung verfügt das DSM über einen Zugang zu einem klinischen Studienzentrum, in dem Studien für neue Medikamente gegen solide Tumore durchgeführt werden. Im eigenen onkologischen Bereich mit Fachpersonal werden Phase II und III Studien an soliden Tumoren abgewickelt.

DSV und DSM arbeiteten mit verschiedenen Instituten und Wissenschaftlern auf regionaler, nationaler und internationaler Ebene zusammen und sind vom italienischen Ministerium für Bildung, Universität und Forschung (MIUR) als "Exzellenzinststitute" anerkannt.



Team UNITS

*Prof. Giannino Del Sal
Elena Campaner
Alessandro Zannini
Prof. Maurizio Zanconati
Prof. Marina Bortul
Dr. Maurizio Cortale
Dr. Deborah Bonazza
Alessandra Rustighi*



UNIUD

Università degli studi di Udine

Udine, Italien

Die Universität von Udine (UNIUD) wurde 1978 im Rahmen des Wiederaufbauplans von Friaul nach dem Erdbeben 1976 gegründet. Ziel war es, der friulanischen Gemeinde ein unabhängiges Zentrum für kulturelle und wissenschaftliche Studien zur Verfügung zu stellen.

UNIUD belegt mittlerweile den 5. Platz unter den mittelgroßen italienischen Universitäten (Censis-Umfrage 2017/2018). Die Ziele von UNIUD können in vier Punkten zusammengefasst werden:

- höhere Bildung
- Forschung und Technologietransfer
- Verbindung mit lokalen Gemeinschaften
- Internationalisierung.
- Alle Fachgebiete verfolgen diese Ziele durch den gegenseitigen Austausch von Wissen, Erfahrungen und Projekten.

Im Studienjahr 2016/2017 bot UNIUD 36 Bachelor- und 36 Master-Studiengänge an. Darüber hinaus bietet UNIUD postgraduale Lehr- und Forschungsprogramme mit einer breiten Palette von Ausbildungskursen, Graduiertenschulen (31), Masterstudiengängen (15) und Doktoratsprogrammen (15) an. 15.385 Studierende und 650 Professoren und Forscher arbeiten und studieren an der UNIUD. Die wissenschaftliche Forschung wird von 8 Abteilungen und 9 Forschungszentren durchgeführt und von einer zentralen Verwaltungsstelle koordiniert.

Udine und seine Universität sind ein Bezugspunkt in einer Region, die bereits historisch ein Treffpunkt verschiedener Welten

und Kulturen ist. Geografisch im Zentrum der Europäischen Union gelegen, spielt das UNIUD eine aktive Rolle in einem engen Netzwerk, das sich zum Austausch von Wissen und Ideen verpflichtet. Seit seiner Gründung verfolgt UNIUD die Internationalisierungspolitik, die darauf abzielt, Studenten auszubilden und Beziehungen und Partnerschaften mit Universitäten und Institutionen in Europa und dem Rest der Welt aufzubauen.

Bislang war UNIUD als Partner an vielen verschiedenen EU-Forschungsprojekten beteiligt

- HORIZON 2020: 19 Projekte
- FP7: 39 Projekte
- andere internationale: 20 Projekte, davon in 7 als Koordinator
- territoriale Zusammenarbeit (Interreg): 47 geförderte Projekte, von denen 5 koordiniert wurden.

UNIUD arbeitet nicht nur mit Institutionen aus Europa zusammen, sondern hat weltweite Verbindungen, insbesondere nach Afrika, Indien und China. Eine enge Zusammenarbeit besteht mit dem Universitätsklinikum von Udine. UNIUD verfügt auch über kompetente Mitarbeiter in den Bereichen Verwaltung, Wirtschaft, Recht und Planung. Die technischen und wissenschaftlichen Aktivitäten werden mit Unterstützung der Forschungs- und Technologietransferstelle durchgeführt. Diese Stelle verwaltet komplexe Projekte, schützt geistiges Eigentum und bringt Forschungsergebnisse rasch in die lokale Anwendung. Die Struktur wird von einem Team von 13 kompetenten Mitarbeitern unterstützt, die langjährige Erfahrung in der Koordination und Projektplanung haben.

Kennzahlen des Technologietransferbereichs sind:

- 57.357 Publikationen
- 100 Patente (46 vermarktet)
- 8 Spin-off
- 23 Start-ups.

Seit Mai 2016 hat UNIUD offiziell den „HR Excellence in Research Award“ der Europäischen Kommission erhalten.



Team UNIUD

*Prof. Gianluca Tell
Marta Codrich
Chiara Dal Secco
Prof. Claudio Brancolini
Prof. Roberta Benetti
Prof. Carlo Pucillo
Prof. Carla Di Loretto
Prof. Giovanni Terrosu*



ADSI

Austrian Drug Screening Institute

Innsbruck, Österreich

Das Austrian Drug Screening Institute (ADSI) wurde 2012 als Forschungsinstitut der Universität Innsbruck (LFU) gegründet und bietet Forschungsdienstleistungen für Unternehmen sowie akademische Forschungseinrichtungen in den Bereichen Arzneimittelentwicklung, Phytopharma, Nahrungsergänzungsmittel, Phyto-kosmetik, Ernährung und verwandte Branchen an.

Initiiert wurde das ADSI vom analytischen Chemiker Prof. Dr. Günther K. Bonn, Leiter des Instituts für Analytische Chemie und Radiochemie der Universität Innsbruck, sowie vom Zellbiologen und Mediziner Prof. Dr. Lukas A. Huber, Leiter des Forschungszentrums für Chemische Analytik Abteilung Zellbiologie an der Medizinischen Universität Innsbruck. Sowohl Prof. Bonn als auch Prof. Huber sind die wissenschaftlichen Leiter des ADSI.

Im ADSI werden analytische Chemie und Zellbiologie auf einzigartige Weise kombiniert. Die biologische Abteilung entwickelt zellbasierte Assays, die menschliches Gewebe im Labor nachahmen und für die Forschung somit besonders relevant sind. Auf der anderen Seite ist die analytische Abteilung in der Lage, verschiedene Parameter zu detektieren und Gemische zu analysieren. Dabei spielt es keine Rolle, ob das Basismaterial von Pflanzen stammt, um potentielle Wirkstoffe zu extrahieren, oder von Zellüberständen, um Veränderungen in der Zytokinregulation zu erkennen. Darüber hinaus wurde eine Abteilung für Bioinformatik aufgebaut, um die komplexen Informationsmengen zu integrieren und die resultierenden Datensätze zu evaluieren. Die bei ADSI entwickelten Forschungsdienstleistungen bilden die Grundlage für die drei Säulen:

1. Screening und Produktentwicklung,

2. Wirkungsweise und Bestätigung kosmetischer Angaben, und
3. Qualitätskontrollanalysen für die Nahrungsmittel- und Nahrungsergänzungsmittelindustrie.

Das ADSI beschäftigt etwa 25 Personen, hauptsächlich hochqualifizierte Wissenschaftler. Das Institut verfügt über eine hochmoderne Infrastruktur und Gerätepark. Es wurde zu einem festen Bestandteil der österreichischen Forschungslandschaft und arbeitet eng mit zahlreichen Universitäten und Forschungseinrichtungen sowie mit Industriepartnern im In- und Ausland zusammen.

Obwohl das Institut hauptsächlich durch das Land Österreich und das Land Tirol finanziert wird, tragen Einnahmen aus Forschungsaufträgen maßgeblich zur Finanzierung von ADSI bei.



Team ADSI

*Mag. Markus Pasterk
Dr. Laco Kacani
Dr. Ronald Gsir
Iris Krainer
Przemyslaw Filipek
Ruth Joas*



MUI

Medizinische Universität Innsbruck

Innsbruck, Österreich

Die Medizinische Universität Innsbruck (MUI) ist eine öffentliche Hochschule in Innsbruck. Sie war eine der vier historischen Fakultäten der Leopold-Franzens-Universität Innsbruck und wurde erst 2004 zu einer eigenständigen Universität.

Die MUI ist eine der größten Bildungseinrichtungen für Ärzte und medizinische Wissenschaftler in Österreich und die wichtigste in Westösterreich. Die Zusammenarbeit mit den Tiroler Kliniken ist sehr eng, mit 1600 Betten eine der größten Kliniken in Österreich.

Im Durchschnitt arbeiten 1.800 Mitarbeiter an der MUI und über 3.000 Studierende absolvieren hier ihr Studium. Ungefähr 300 Doktoranden nehmen an einem der 9 angebotenen PhD-Programmen teil. Darüber hinaus wird ein Teilzeit-Doktoratsprogramm - der klinische PhD - für Absolventen der Studiengänge Medizin und Zahnmedizin angeboten.

Wie für jede Universität spielt auch für die Medizinische Universität Innsbruck die Forschung eine wichtige Rolle, sie stellt eine ihrer drei Kernaktivitäten dar. Die Forschungsteams erzielen aufsehenerregende Ergebnisse sowohl in den theoretischen Abteilungen als auch in der klinischen Praxis. Die Wissenschaftler behaupten sich in diesem äußerst wettbewerbsintensiven Bereich und erhalten sowohl national als auch international beachtliche Fördermittel. Sie sind an vielen Kooperationsprojekten beteiligt.

Wissenschaftliche Forschung wird in verschiedenen wissenschaftlichen Bereichen durchgeführt. Die Forschungsschwerpunkte liegen in folgenden Bereichen:

- Onkologie,

- Neurowissenschaften,
- Genetik, Epigenetik und Genomik,
- Infektiologie, Immunologie und Organ- und Gewebetransplantation

Die kurzen geografischen Distanzen zwischen der Medizinischen Universität, der Klinik, weiteren akademischen Forschungsinstituten wie ADSI und Oncotyrol ermöglichen eine fruchtbare Zusammenarbeit und vereinfachen den Proben- und Datenaustausch.

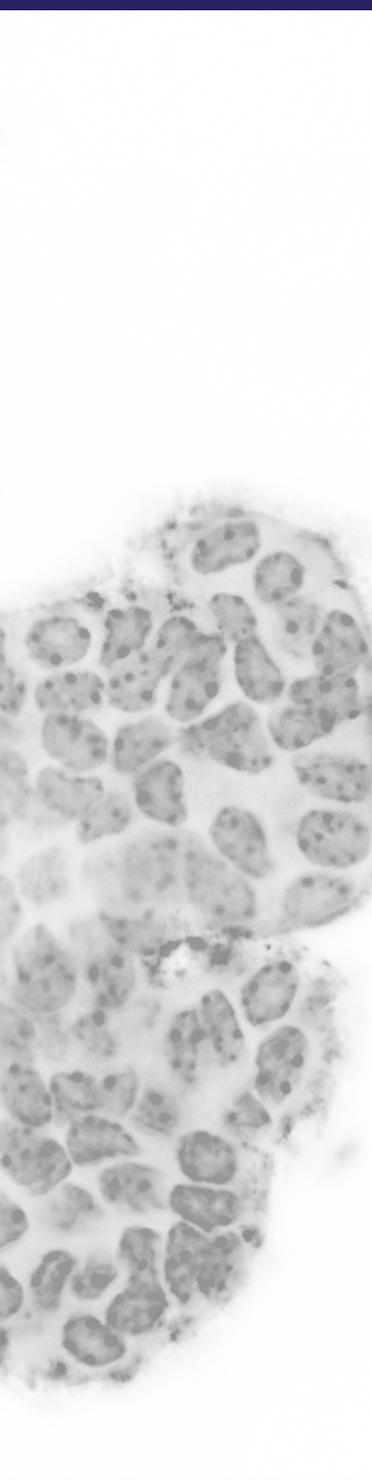
Im Jahr 2016 wurde das Comprehensive Cancer Center Innsbruck (CCCI) als Partnerschaft zwischen MUI und den Tiroler Kliniken gegründet. CCCI ist ein leistungsfähiges Zentrum moderner Technologie in der Krebsforschung und schließt die Lücke zwischen interdisziplinärer Forschung und klinischer Routine und beschleunigt die Umsetzung von Know-how in die klinische Anwendung sowie in Forschung und Lehre.



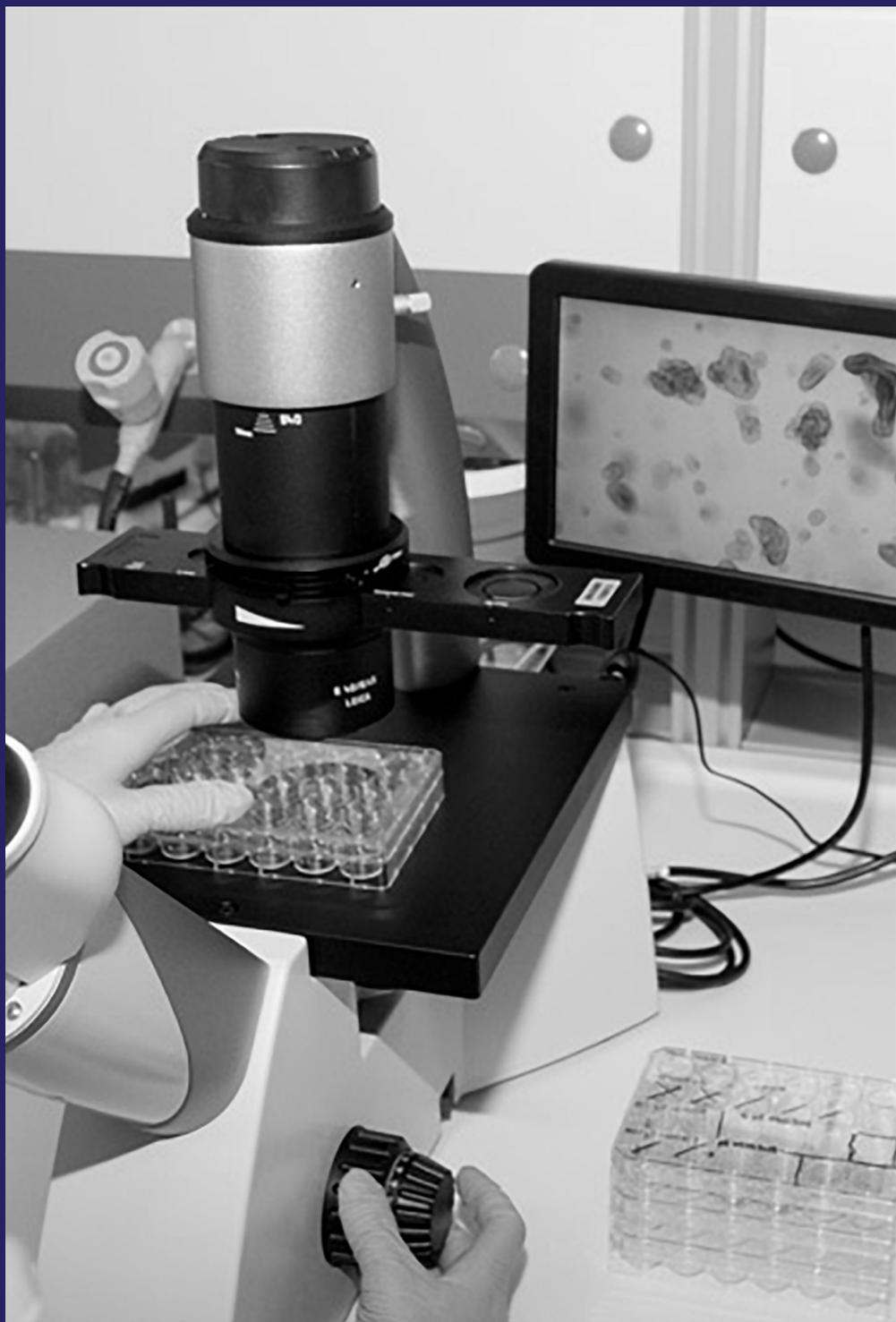
Team MUI

Prof. Lukas Huber
 Prof. Heinz Zwierzina
 Dr. Arno Amann
 Dr. Afschin Soleiman
 Dr. Stefan Scheidl
 Edith Lorenz

Einleitung



Personalisierte Medizin ist ein umfassender, prospektiver Ansatz zur Vorbeugung, Diagnose und Behandlung von Krankheiten, bei dem die individuellen klinischen, genetischen, genomischen und umweltbezogenen Informationen jeder Person verwendet werden. Ziel von PreCanMed war es, eine Pipeline für die Implementierung von Tumor-Organoiden in der Präzisionskrebsmedizin zu etablieren. Dieses technische Handbuch beginnt mit Hinweisen zur Genehmigung der Beobachtungsstudie durch Bioethikkommissionen und umfasst Verfahren, die von der Vorbereitung von Gewebeproben über die Etablierung und Konservierung von Organoid-Kulturen bis hin zu deren Genomanalyse mittels RNA-Sequenzierung und Exom-Sequenzierung, sowie der Identifizierung therapeutischer Ziele durch Bioinformatikanalysen und Arzneimitteltestverfahren reichen.



1. Bioethik-Zulassung und Patienten- Einverständniserklärung für die PreCanMed-Beobachtungsstudie

Die Erzeugung und Kryokonservierung von aus Patientengewebe gewonnenem Zellmaterial und die Speicherung von Genomdaten werfen komplexe Fragen im Zusammenhang mit Bioethik und dem Schutz der Privatsphäre von Patienten auf. Ein wichtiger Schritt des Projekts war es Protokolle für eine Beobachtungsstudie zu entwickeln, die von regionalen Bioethik-Komitees genehmigt wurden. Die Verfahren umfassen Richtlinien für humane biologische Proben und damit zusammenhängende Daten die sicherstellen, dass biologisches Material ausschließlich aus zugelassenen Quellen stammt und deren Eigentümer durch die Unterzeichnung einer Einverständniserklärung mit dem spezifischen Verwendungszweck der biologischen Probe einverstanden sind. Biologische Proben sind mit einem Verwalter verknüpft und deren Verwendung ist jederzeit nachvollziehbar. Ein Kodierungssystem schützt die Identität der Spender. Die Einverständniserklärung ermöglicht die Verwendung des biologischen Materials für gemeinnützige Forschung, gestattet den jederzeitigen Widerruf der Einwilligung, regelt die Verwendung

von Genomdaten und den Schutz der Privatsphäre und gibt an, wie lange das biologische Material aufbewahrt werden kann. Ausführliche Informationen zur Beobachtungsstudie erhielten die Patienten in einem mündlichen Gespräch mit dem behandelnden Arzt.

- Genehmigung der Studie des Projektpartners Medizinische Universität Innsbruck (**MUI**) und des Austrian Drug Screening Institute (**ADSI**): AN2014-0282 341 / 4.20 342 / 4.3; Titel der Studie: *„Entwicklung eines Zytotoxizitätsassays mit primären Zellen aus Operationsmaterial / Biopsien und malignen Ergüssen in einem neuen 3D-Zellkultursystem“*
- Genehmigung der Studie des Projektpartners der Universität Udine (**UniUD**): Registrierungsnummer CEUR-2017-PR-048-UNIUD; Titel der Studie: *„Sviluppo di metodologie e protocolli per l'isolamento ed il mantenimento di organoidi da campioni di tumore del colon umano“*
- Genehmigung der Studie des Projektpartners Consorzio Interuniversitario per le Biotecnologie, des Laboratorio Nazionale und der Universität Triest (**LNCIB, UniTS**): Studio Protocollo n.62 / 2017; Titel der Studie: *„Sviluppo di metodologie e protocolli per l'isolamento di organoidi da campioni umani di tumore del polmone, mesotelio, mammella“*

Detaillierte Informationen zu den jeweiligen Ethik-Zulassungen finden Sie auf der PreCanMed-Website (www.precanmed.eu).





2. Kommunikationsmittel für den raschen Transport von Gewebe zu Forschungslabors

Der rasche Transport von chirurgisch entferntem Patientengewebe aus dem Operationssaal in das Forschungslabor erwies sich als entscheidend für die erfolgreiche Etablierung von Organoid-Kulturen. Es wurden effiziente Kommunikationskanäle eingerichtet, die an die Arbeitsabläufe im Krankenhausalltag angepasst wurden, um die Transportzeiten zu verkürzen:

- Der Projektpartner (PP) MUI/ADSI stellte die schnelle Verarbeitung von Gewebeprobe sicher, indem er Personal einsetzte, das für die Kommunikation und den Probentransport zwischen Krankenhaus und Forschungslabor verantwortlich war.
- Die Projektpartner (PP) LNCIB und UniTS verwendeten eine WhatsApp-Gruppe, um alle beteiligten Forscher und das Krankenhauspersonal über den Zeitpunkt der Operationen und den Transfer von Gewebe in die Pathologieeinheit des Krankenhauses auf dem Laufenden zu halten.
- Chirurgen, die mit Partner UniUD zusammenarbeiten, haben den Zeitpunkt für den Gewebetransport telefonisch mitgeteilt.



3. Beurteilung des Gewebematerials zur Erzeugung von Organoiden aus normalem Gewebe und Tumorgewebe

Unmittelbar nach dem Eintreffen von chirurgisch entferntem Gewebe in der Pathologieeinheit des Krankenhauses wurden von Pathologen relevante Bereiche von Tumor- und Normalgewebe für die Routinediagnose ausgewählt. Gewebeproben für Forschungszwecke wurden zur Verfügung gestellt. Durch Scrape-Biopsies von Tumorgewebsquerschnitten konnten Informationen über die Gewebequalität wie Häufigkeit und Morphologie von Tumorzellen vor der Erzeugung von Tumor-Organoid-Kulturen erhalten werden. Die Größe des Gewebestücks musste im Bereich von 0,4 - 1 cm³ liegen um die Erstellung von Tumor-Organoid-Kulturen zu ermöglichen. Daher wurden besonders kleine Tumoren von der Studie ausgeschlossen, um die Verfügbarkeit von Tumorgewebe für obligatorische klinische Verfahren sicherzustellen. Entferntes Normalgewebe wurde von tumorfreien Operationsrändern gewonnen und die korrekte Morphologie wurde von Pathologen bestätigt. Schnitte in

Paraffin eingebettetem Normal- und Tumorgewebe wurden für die immunhistochemische Charakterisierung und genomische Analysen bereitgestellt. Normales und Tumorgewebe wurden bis zur Übergabe an die Forscher in gekühltem Konservierungsmedium (angereichert mit einer hohen Konzentration an Antibiotika) gelagert. Die Verwendung von Antibiotika in hoher Konzentration war insbesondere wichtig für kolorektales Gewebe und Lungengewebe, da diese aus einem Organkontext stammen der Bakterien und Pilzen ausgesetzt ist. Unter idealen Bedingungen konnte die Zeit von der Operation bis zum Transport zum Forschungslabor auf 25 Minuten begrenzt werden (**Tabelle 1**). Faktoren, die ein hohes Risiko für ein Versagen bei der Etablierung einer Organoid-Kultur darstellen, sind i) verlängerte Bearbeitungszeit von Geweben bei Raumtemperatur, ii) Kontamination durch Bakterien und Pilzen und iii) begrenzte Verfügbarkeit von Tumor/normalem Gewebe.

Tabelle 1: Zusammenfassung der von PreCanMed-Projektpartnern erstellten Verfahren zur Bereitstellung von Gewebe aus chirurgisch entfernten Tumoren. Für Details siehe auch SOPs auf www.precanmed.eu

Post-operative verfahren	Brustgewebe (UniTS)	Lungengewebe (LNCIB)	Kolorektal-Gewebe (MUI, ADSI, UniUD)
Transport von Operationsaal zur Pathologie-Abteilung	max. 10 Minuten	max. 10 Minuten	max. 15 Minuten
Auswahl von Gewebebereichen	max. 10 Minuten	max. 10 Minuten	max. 10 Minuten
Lagerung von Gewebeproben	max. 6 Stunden, ohne Verlust von Zellvitalität (4°C)	max. 3 Stunden, ohne Verlust von Zellvitalität (4°C)	max. 1 Stunde, ohne Verlust von Zellvitalität (4°C)
Transport zum Forschungslabor	15 Minuten	15 Minuten	5-15 Minuten
Gewebe-Konservierungsmedium	Medium + Antibiotika	Medium + Antibiotika	0,9 % NaCl





CO₂ 0.1M

100 mM
1 mM

45
35
30
25
20

4. Aufbereitung des Patientengewebes zur Gewinnung von Zellmaterial für die Kultivierung von Organoiden

Die extrazelluläre Matrix von normalem Gewebe und Tumorgewebe enthält einen hohen Anteil an Kollagenfasern, retikulären und andere elastische Fasern. Ein wichtiger Schritt für die Etablierung von Organoid-Kulturen besteht in der Freisetzung von Normal- und Tumorzellen aus Bindefasern ohne die Lebensfähigkeit der Zellen zu beeinträchtigen. Eine mechanisches Zerkleinern (Zerteilen von Gewebe mit Pinzetten, Skalpell-Klingen oder Scheren) gefolgt von einer streng kontrollierten Kollagenasebehandlung der 1-3 mm³ großen Gewebefragmenten für 1-2 Stunden brachte die besten Ergebnisse (**Tabelle 2; Abbildung 1**). Eine längere Behandlung mit Kollagenase oder die Verwendung allgemeiner Proteasen (z.B.: Protease XIV von Streptococcus) beeinträchtigten die Lebensfähigkeit der behandelten Zellen erheblich. Nach der enzymatischen Behandlung wurden die Zellen unter Verwendung von Zellsieben von den verbliebenen Gewebefragmenten getrennt und in handelsüblicher Matrix (Martigel), eine rekonstituierte, gelöste Basalmembranvorbereitung, die beschrieben ist eine Tumorumgebung nachzuzahmen, ausplattiert.

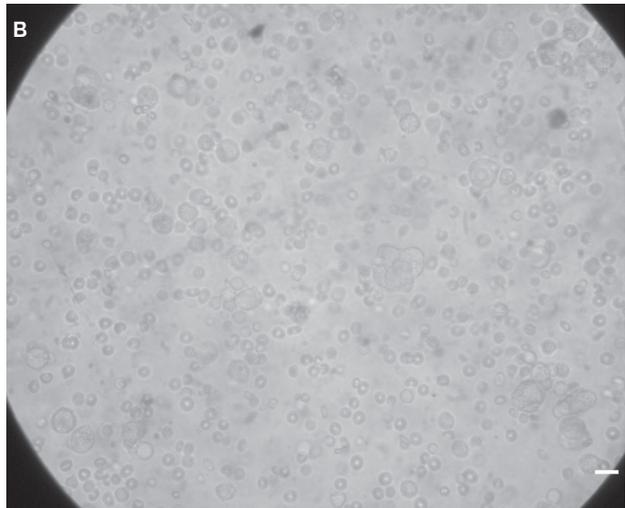
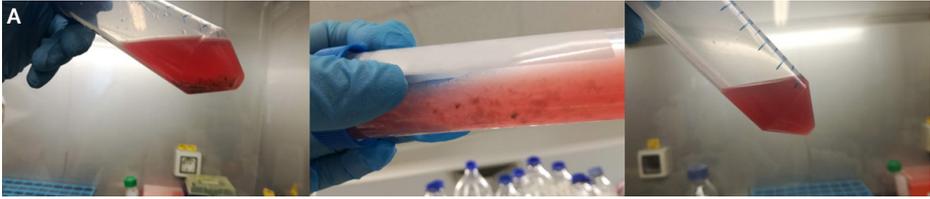


Abbildung 1: Repräsentative Bilder zur Behandlung von mechanisch präpariertem Lungentumorgewebe. Die Bilder zeigen eine progressive Kollagenasebehandlung für 0, 1 und 2 Stunden (von links nach rechts). (B) Erhaltenes Zellmaterial, plattiert in Matrigel. (C) Matrigel Tropfen mit Tumorzellen in einer 24-Well Zellkulturschale.

Gewebeverarbeitung	Breast (UniTS)	Lungengewebe (LNCIB)	Kolorektal-Gewebe (MUI, ADSI, UniUD)
Minimale Gewebegröße	1 cm ³	1 cm ³	<i>Tumorgewebe:</i> > 0,4 cm ³ <i>Normalgewebe:</i> > 0,5 cm ³
Mechanische Zerkleinerung	<i>Normal- und Tumorgewebe:</i> Skalpell Klängen; Endgröße: ca. 1 mm ³	<i>Normal- und Tumorgewebe:</i> Skalpell Klängen; Endgröße: ca. 1 mm ³	<i>Tumorgewebe:</i> sterile Scheren, Skalpell Klängen und Pinzetten; Endgröße: ca. 1 mm ³ <i>Normalgewebe:</i> sterile Pinzetten und Skalpell Klängen; Epithel wird vom Bindegewebe ab- getrennt. Endgröße: ca. 2-3 mm ³
Kollagenasebehandlung	2g Gewebe wurden mit 1,5 mg/ml Kollagenase A in 5 ml behandelt. Dauer: 2 Stunden bei 37°C mit 200 rpm schütteln bis sich Zellagregate vom Stroma ablösen; Bruchstücke entfernen	3g Gewebe wurden mit 1,5 mg/ml Kollagenase A in 5 ml behandelt. Dauer: 2 Stunden bei 37°C mit 250 rpm schütteln bis sich Zellagregate vom Stroma ablösen; Bruchstücke entfernen	<i>Tumorgewebe (1g):</i> Liberase (Kollagenase I and II); 50 µg/ml (0,26 units/ml) in 10ml; für 1 Stunde bei 37°C mit 250 rpm schütteln; Bruchstücke entfernen. <i>Normalgewebe (1g):</i> 10 ml 10mM EDTA in PBS; Bruchstücke entfernen
Aussäen in Matrigel	Zellen wurden in 50 µl Matrigel-Tropfen ausgesät.	300.000 Zellen pro 30 µl Matrigel-Tropfen	<i>Tumorgewebe:</i> 100.000 – 200.000 Zellen pro 30 µl Matrigel-Tropfen <i>Normalgewebe:</i> 50-100 crypts pro 30 µl Matrigel-Tropfen

Tabelle 2 Übersicht über die Gewebebehandlungsverfahren, die von PreCanMed Projektpartner entwickelt wurden (für SOPs siehe: www.precanmed.e)



5. Kultivierung von Tumor-Organoiden in Matrigel

Spezifische Signalmoleküle und eine spezielle Zusammensetzung der extrazellulären Matrix (EZM) sind der Schlüssel für die Bildung von sich selbstorganisierenden 3D-Tumor-Organoiden welche die Architektur des ursprünglichen Tumors rekapitulieren¹. Zu Beginn des PreCanMed-Projekts standen in der Literatur Protokolle für Dickdarmkrebs², Bauchspeicheldrüsenkrebs³ und Magenkrebs⁴ zur Verfügung. Protokolle für die Etablierung von 3D-Organoidkulturen aus normalem Gewebe sind für Dickdarm⁵-, Brust⁶- und Lungengewebe⁷ zur Verfügung gestanden. Die Projektpartner, die an Darmkrebs arbeiteten, erweiterten und verbesserten die verfügbaren Protokolle durch die Entwicklung mehrerer Medien für parallel kultivierte Tumororganoidkulturen. Die Projektpartner, die an Brust- und Lungenkrebs arbeiteten, konzentrierten sich auf die Definition der Medienzusammensetzung für die Kultivierung von Organoiden von Brustgewebe in Mäusen (normales / Tumor-Gewebe)^{8,9} und die Kultivierung von Lungen-Organoiden aus normalem Gewebe¹⁰.

¹ Xu, H. et al. Organoid technology and applications in cancer research. *J. Hematol. Oncol.* (2018). doi:10.1186/s13045-018-0662-9

² van de Wetering, M. et al. Prospective Derivation of a Living Organoid Biobank of Colorectal Cancer Patients. *Cell* 161, 933–945 (2015).

³ Boj, S. F. et al. Organoid models of human and mouse ductal pancreatic cancer. *Cell* (2015). doi:10.1016/j.cell.2014.12.021

⁴ Yan, H. H. N. et al. A Comprehensive Human Gastric Cancer Organoid Biobank Captures Tumor Subtype Heterogeneity and Enables Therapeutic Screening. *Cell Stem Cell*. (2018). doi:10.1016/j.stem.2018.09.016

⁵ Crespo, M. et al. Colonic organoids derived from human induced pluripotent stem cells for modeling colorectal cancer and drug testing. *Nat. Med.* (2017). doi:10.1038/nm.4355

⁶ Sachs, N. et al. A Living Biobank of Breast Cancer Organoids Captures Disease Heterogeneity. *Cell*. (2018). doi:10.1016/j.cell.2017.11.010

⁷ Choi, J., Ilich, E. & Lee, J. H. Organogenesis of adult lung in a dish: Differentiation, disease and therapy. *Developmental Biology* (2016). doi:10.1016/j.jydbio.2016.10.002

⁸ Shackleton, M. et al. Generation of a functional mammary gland from a single stem cell. *Nature* (2006). doi:10.1038/nature04372

⁹ Jamieson, P. R. et al. Derivation of a robust mouse mammary organoid system for studying tissue dynamics. *Development* (2016). doi:10.1242/dev.145045

¹⁰ Barkauskas, C. E. et al. Lung organoids: current uses and future promise. *Development* (2017). doi:10.1242/dev.140103

5.1 Tumor-Organoid (CRC) und normale Organoid des Dickdarmgewebes (MUI, ADSI, UniUD)

Erfahrungen der PP UniUD / ADSI / MUI und Daten publizierter Literatur legen nahe, dass ein Scheitern bei der Etablierung von Tumor-Organoiden auf patientenspezifische genetische Faktoren zurückzuführen sind, welche im Widerspruch zu den Wachstumsfaktoren im Standard-Organoidmedium stehen. Dementsprechend sollten diese Probleme durch die Verwendung von speziellen Kombinationen aus Wachstumsfaktoren, welche an das Erbgut des Primärtumors angepasst sind, gelöst werden. Da zu Beginn der Organoid-Kultivierung kein vollständiges Bild der genetischen Veränderungen des resezierten Tumors verfügbar ist, wurde ein paralleler Multi-Medien-Ansatz entwickelt, um i) die patientenspezifischen Anforderungen an Wachstumsfaktorkombinationen zu demonstrieren und ii) zu beweisen, dass diese Strategie die Effizienz der Tumor-Organoidetablierung erhöht.

Bei den Projektpartnern ADSI/MUI und UniUD nahmen 19 bzw. 21 PatientInnen an der Studie teil. Patientengewebe von insgesamt 8 (ADSI, MUI) und 11 (UniUD) PatientInnen wurden einem Multi-Medien-Ansatz unterzogen, um die Auswirkung, von Wnt3a (WCM), EGF, ALK5-Inhibitor (A83-01) und p38 MAP Kinase-Inhibitor (SB202190) sowie PGE2 (ProstaglandinE2), auf die Tumororganoidbildung zu testen (**Abbildung 2, Tabelle 3**).

Bemerkenswerterweise stellte sich heraus, dass alle UniUD-CRC-Organoide (11/11) im Medium mit allen angeführten Wachstumsfaktoren / Inhibitoren (WRENA = M6-Medium) kultivierbar waren; 64% (7/11) wuchsen in Abwesenheit von Wnt3a und nur in 36% der Fälle (4/11) wurde die Proliferation durch die Ergänzung von Medien mit Wnt3a verbessert (**Tabelle 4**). Dies lässt vermuten, dass ein erheblicher Anteil der CRC-Adenokarzinome eine genetische Ausstattung aufweist, welche eine Unabhängigkeit vom Wnt3a Signalweg verleiht. Das bearbeitete CRC-Gewebe enthält aber wahrscheinlich eine Mischung aus Wnt3a abhängigen und unabhängigen Krebszellen, aber nur Wnt3a unabhängige Tumorzellen führten zu Organoidkulturen in RENAS-Medium ohne Wnt3a (**Tabelle 4**). Diese „polyklonale“ Theorie der Tumororganoidpopulationen hat einen wichtigen Einfluss auf das Design therapeutischer Ansätze, welche dann durch vollständige Exomsequenzierung von Organoiden, die in RENAS- oder WRENAS-Medien gezüchtet wurden, aufgedeckt werden könnte.

Die Arbeit von ADSI / MUI lieferte zusätzliche Belege für die unterschiedlichen Anforderungen an Wachstumsfaktoren für die Tumororganoidkultivierung, indem gezeigt wurde, dass von 8 verarbeiteten CRC-Geweben, 7 Organoid-Kulturen eine spezifische Wachstumsfaktorkombination benötigten. Von den 8

Gewebeproben produzierten 5 Tumor-Organoiden, wenn ausschließlich der ALK5-Inhibitor A83-01 zum Grundmedium (TPIO-16, -17, -18, -19 - 21) zugesetzt wurde. Reichte A83-01 allein nicht aus konnte durch die Zugabe von EGF und p38-MAP-Kinase-Inhibitor (SB202190) die Bildung von Tumor-Organoiden in drei weiteren Fällen ermöglicht werden (TPIO-20, -22, -23; **Abbildung 3; Tabelle 5**).

Die Ergebnisse zeigen, dass die Proliferation von Tumor-Organoiden durch ein minimales Set von Signalstimulatoren und Inhibitoren aufrechterhalten werden kann. Dies erhöht die Wahrscheinlichkeit, dass eine zusätzliche Stimulation durch nicht-essentielle Bestandteile des Mediums, Veränderungen in der Krebszellbiologie auslöst oder auch die Expansion von unterrepräsentierten Tumorzellpopulationen fördert. Dies ist von besonderer Bedeutung für die Identifizierung patientenspezifischer Therapeutika mit Hilfe von Modellen mit Tumor-Organoiden.

In Übereinstimmung mit Daten von UniUD wurde festgestellt, dass Wnt3a in nur 3 von 8 Organoid-Kulturen einen positiven Einfluss auf das Organoidwachstum hatte. Organoiden aus normalem Gewebe wurde von allen Patienten generiert (WRENAS / M6-Medium).

Die Einführung einer Multi-Medien-Strategie erhöht die Arbeitsbelastung und die Kosten für Reagenzien. Um diese negativen „Nebenwirkungen“ zu minimieren, wurde eine Echtzeit-Stoffwechselaktivitätstestung (RealTime-Glo™ MT-Cell Viability Assay, PROMEGA) für die Matrigel-Kulturen adaptiert. Durch die Anwendung des Viabilitätstests konnte die ideale Medienzusammensetzung in einem Zeitfenster von 24-48 Stunden nach Aussaat der Zellen, bestimmt werden (**Abbildung 4**). Dies ermöglichte eine möglichst frühe und gezielte Eliminierung nicht geeigneter Medienstrategien zur weiteren Kultivierung von Organoiden.

Zusammengefasst zeigen diese Ergebnisse, dass ein Multi-Medien-Ansatz für die Etablierung von Tumororganoidkulturen in Medien mit einer „minimal ausreichenden“ Anzahl von Wachstumsfaktoren von entscheidender Bedeutung ist, insbesondere wenn das genetische Profil des Primärtumors vor der Kultivierung noch nicht bekannt ist.

day 0

normal tissue



isolated crypts



embedded crypts
in Matrigel

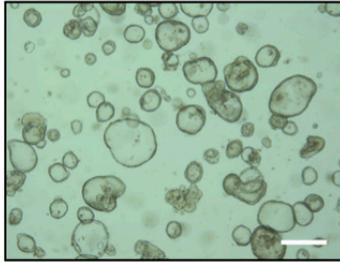


day 7, p1

tumor tissue



+ Wnt3a



- Wnt3a

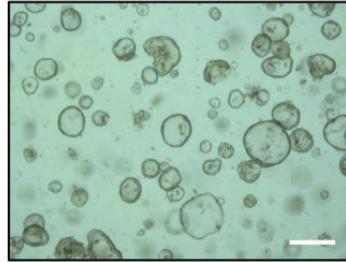
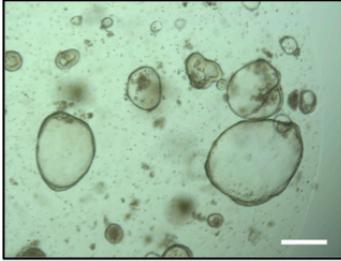


Abbildung 2: Organoide kultiviert aus gesundem Gewebe (obere Reihe) und kolorektalem Krebsgewebe (untere Reihe), erhalten vom gleichen Patienten. Das Tumorgewebe unterstützte die Bildung von Tumor-Organoiden in Gegenwart und Abwesenheit von Wnt3a (untere Reihe); (siehe auch SOPs www.precanmed.eu).

day 7, p1



	ADSI/MUI	ADSI/MUI	ADSI/MUI	ADSI/ MUI	ADSI/MUI oder UniUD	UniUD
Medienzusammensetzung	Medi- umM2	Medium M3	Medium M4	Medium M5	Medium M6 Medium 'WRENAS'	Medium 'RENAS'
Basalmedium	x	x	x	x	x	x
R-Spondin konditioniertes Medium	x	x	x	x	x	x
Noggin konditioniertes Medium	x	x	x	x	x	x
Nicotinamid	x	x	x	x	x	x
N-acetylcystein	x	x	x	x	x	x
B27 supplement	x	x	x	x	x	x
Rock Kinase Inhibitor (Y-27632)	x	x	x	x	x	x
Gastrin	x	x	x	x	x	x
Primocin	x	x	x	x	x	x
Wnt3a konditioniertes Medium	-	-	-	-	x	-
EGF	-	x	-	x	x	x
A83-01 (ALK 5 Inhibitor)	-	-	x	x	x	x
SB202190 (p38 MAP Kinase Inhibitor)	-	x	-	x	x	x
ProstaglandinE2 (PGE2)	-	-	-	-	x	x

Tabelle 3: Zusammensetzung der Medien, welche von den Projektpartnern im Multi-Medien-Ansatz zur Organoidkultivierung verwendet wurden. Hinweis: WRENAs-Medien von UniUD; Violett: Kritische Wachstumsfaktoren / Inhibitoren, welche in der Multi-Medien Strategie diskutiert werden (siehe auch SOPs auf www.precanmed.eu).

Tabelle 4: Effizienz der Tumor-Organoid Kultivierung in WRENA- und RENA-Medium (Projektpartner UniUD) - keine Proliferation; +, ++ schlechte / gute Proliferation; +++, ausgezeichnete Proliferationskapazität - ausreichend für Genomanalysen und Funktionstests. Detaillierte Informationen unter www.precanmed.eu.

Patient-ID (UniUD)	Wachstumspotenzial in WRENAS (+Wnt3a)	Wachstumspotenzial in RENAS (no Wnt3a)
P6 - Tubulovillous Adenom	++	+
P7 - Adenokarzinom	++	-
P8 - Adenokarzinom	+++	-
P12 - Adenokarzinom	+++	+++
P13 - Adenokarzinom	++	-
P14 - Adenokarzinom	++	+++
P15 - Adenokarzinom	+	-
P16 - Adenokarzinom	++	+++
P17 - Adenokarzinom	+	++
P20 - Adenokarzinom	+	+++
P21 - Adenokarzinom, mixed type	+	+

Tabelle 5: Multi-Medien-Ansatz zur Bewertung patientenspezifischer Anforderungen an die Erzeugung von Tumor-Organoiden (Projektpartner MUI / ADSI). Angegeben sind Wachstumsfaktorkombinationen, welche die Tumororganoidproliferation unterstützen. "-", kein effizientes Wachstum; "+" Effiziente Proliferation. Detaillierte Informationen unter www.precanmed.eu.

Patient ID (MUI/ADSI)	Medien die Tumororganoidproliferation unterstützen
TP10-16 Adenokarzinom	M2(no factors) → + M3 → - M4 (A83-01) → + M5 → - M6 → -
TP10-17 Adenokarzinom	M2(no factors) → - M3 → - M4 (A83-01) → + M5(EGF, A83-01, SB202190) → + M6 → -
TP10-18 Adenokarzinom	M2 (no factors) → + M3 → - M4(A83-01) → + M5 → - M6 (Wnt3a, EGF, A83-01,SB202190, PGE2) → +
TP10-19 Adenokarzinom	M2 → - M3 → - M4 (A83-01) → + M5 → - M6 (Wnt3a, EGF, A83-01,SB202190, PGE2) → +
TP10-20 Adenokarzinom	M2 → - M3 → - M4 → - M5(EGF, A83-01, SB202190) → + M5 → - M6 → -
TP10-21 Adenokarzinom	M2 → - M3 → - M4(A83-01) → + M5 → - M6 → -
TP10-22 Adenokarzinom	M2 → - M3 → - M4 → - M5(EGF, A83-01, SB202190) → + M6 → -
TP10-23 Adenokarzinom	M2 → + M3 (EGF, SB202190) → + M4 → - M5 (EGF, A83-01, SB202190) → + M6 (Wnt3a, EGF, A83-01, SB202190, PGE2) → +

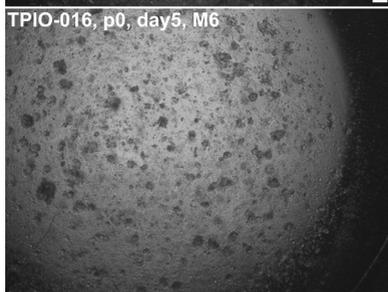
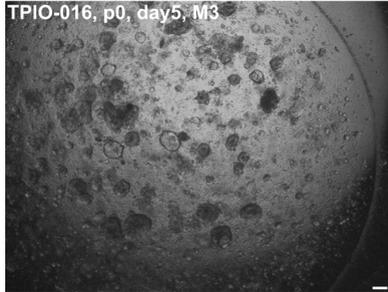
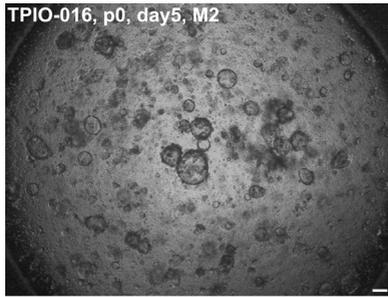
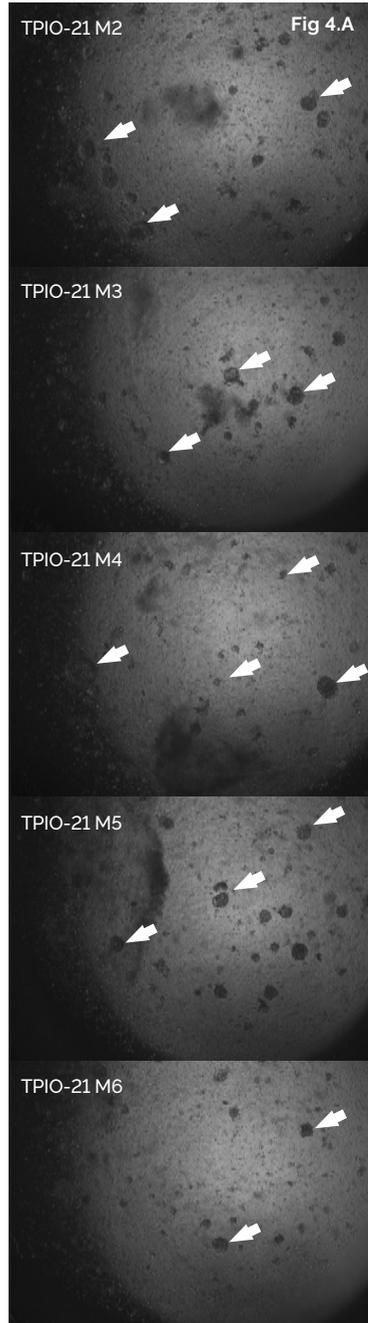
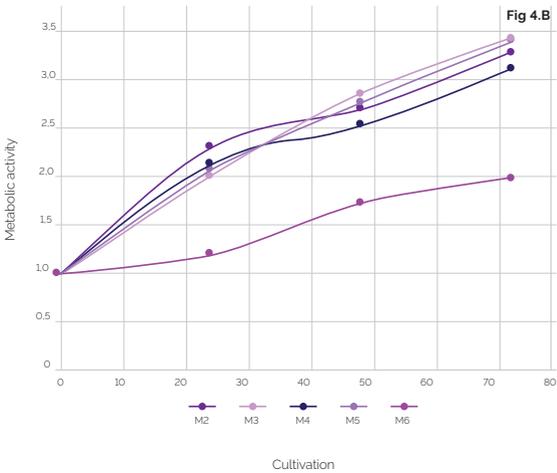


Abbildung 3: Kultivierung von CRC-Organoiden in einem Multi-Medien-Ansatz. Kolorektales Tumorgewebe von einem Patienten wurde mittels Multi-Medien Strategie (M2-M6) kultiviert. Am Tag 5 der Kultivierung wurden repräsentative Aufnahmen der Tumor-Organoiden gemacht. Medium M2 und M4 unterstützten eine effiziente Vermehrung von Organoiden. Die Maßstabsleiste zeigt 50 µm an.

Abbildung 4: Echtzeitmessung der Stoffwechselaktivität zur Identifizierung günstiger Medienbedingungen für die Kultivierung von CRC-Organoiden. Vom Patienten entnommenes Tumorgewebe unterstützt die Bildung von Organoiden in M2, M3, M4, M5, M6. (A) Repräsentative Bilder von Organoiden nach 72-stündiger Kultivierung. (B) Quantifizierung der Stoffwechselaktivität zu angegebenen Zeitpunkten. Der Maßstabsbalken zeigt 50 µm an.



5.2 Effizienz von Brusttumor- und Normalgewebe-Organoiden (UNITS)

Medien, von denen berichtet wurde, dass sie die Etablierung von Organoiden des Brustgewebes von Mäusen unterstützen, waren für menschliches Gewebe nicht anwendbar. Die Bedingungen wurden insgesamt an 13 humanen Brustkrebsgewebeprobe(n) getestet, aber ohne Erfolg. Änderung der Medienzusammensetzung unter Verwendung von R-Spondin, Heregulin β 1, Noggin, FGF-7, FGF-10 sowie ALK5-Inhibitor (A83-01), p38-MAP-Kinase-Inhibitor (SB202190) und Rock-Inhibitor (Y-27632) verbesserten signifikant die Effizienz beim Anlegen der Tumororganoidkulturen⁷ (**Tabelle 6**). Unter diesen Bedingungen wurden 33 Patientengewebeprobe(n) verarbeitet. Dabei führten 48% von invasiven Duktalkarzinomgewebeprobe(n) (13/27) und 50% von invasiven Lobularkarzinome (3/6) zu lebensfähigen Tumororganoidkulturen. Dies weist darauf hin, dass die anfängliche Wachstumsphase bei der Etablierung von Organoidkultur beide histologischen Brustkrebs-Subtypen betrifft. Schlussendlich haben sich 26% aller invasiven Duktalkarzinome (7/27) und 16% der invasiven lobulären Karzinome (1/6) zu Tumor-Organoiden mit starkem Proliferationspotential entwickelt. Neben der histologischen Klassifizierung werden Brustkrebserkrankungen auch anhand der Expression molekularer Marker in Luminal A-, Luminal B-, Triple Negative- und Her2-like Unterklassen unterteilt. Die kritische Anfangsphase der Etablierung von Organoiden hat alle molekularen Brustkrebsklassen (25-50% Ausfallrate) betroffen: insgesamt konnten von 33 Patientinnen lebensfähige Brustkrebs-Organoiden generiert werden. Davon waren 47 % Luminal A, 75% Luminal B, 38 % dreifach negative und 50 % Her2-ähnliche Tumoren. Bemerkenswerterweise schien die Proliferationsrate der lebensfähigen Organoidkulturen dieser Proben mit zunehmender Tumoraggressivität zuzunehmen: 22% von Luminal A (2/9), 67% von Luminal B (2/3), 100% von Triple Negative (3/3) und 100% der Her2-ähnlichen (1/1) Tumoren produzierten effizient proliferierende Organoidkulturen, die für weitere Funktionsanalysen verwendet werden konnten (**Abbildung 5**). Diese Daten bestätigen, dass die verwendeten Wachstumsmedien gute Bedingungen für eine Etablierung von Brust Organoiden darstellen. Aufgrund gewonnener Erkenntnisse aus der CRC-Organoidkultur glauben wir, dass die breite Anwendung an Wachstumsfaktoren und Inhibitoren im Medium möglicherweise mit einem Teil der Brustkrebsetumoren nicht kompatibel ist, und somit die hohe Ausfallrate in der frühen Phase der Etablierung von Tumororganoidkulturen verursacht hat.

Aufgrund der geringen Größe des entnommenen Gewebes und der massiven Überrepräsentation von Adipozyten und fibrotischem Gewebe, im Vergleich zu lobulären und duktalem Gewebe, war es schwierig, eine größere Anzahl von Brust Organoiden von ge-

⁷ Sachs, N. et al. A Living Biobank of Breast Cancer Organoids Captures Disease Heterogeneity. *Cell* (2018). doi:10.1016/j.cell.2017.11.010

sundem Gewebe zu erzeugen. Diese Einschränkung kann nur durch die Rekrutierung von PatientInnen, mit großen Tumoren oder einer Mastektomie, überwunden werden. Es war jedoch nicht möglich, solche PatientInnen während des Projektzeitraums zu rekrutieren.

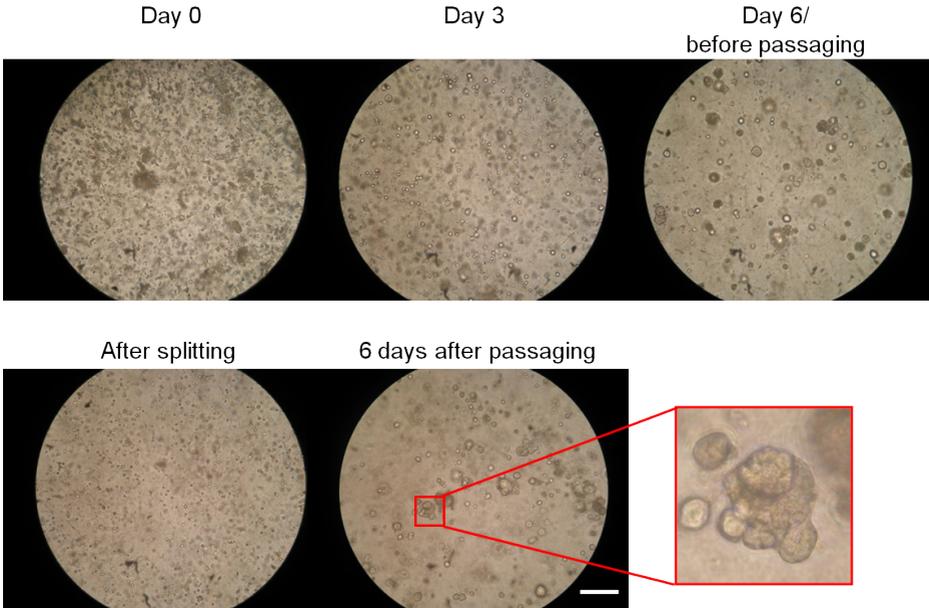


Abbildung 5: Kultivierung von BrustTumor-Organoiden. Obere Tafel: Phasenkontrast-Mikroskopie Aufnahmen von ausgesäten Brusttumorzellen (Tag 0) und Tumor-Organoiden nach drei und sechs Tagen der Kultivierung. Untere Tafel: Tumor-Organoiden nach Passagieren (links) und anschließender Kultivierung für 6 Tage. (Zentrum). Rechte Tafel: Tumororganoidstruktur bei höherer Vergrößerung.

Tabelle 6: Zusammensetzung des Mediums, welches von den Projektpartnern zur Etablierung von Brusttumororganoid-Kulturen verwendet wurde⁶. Siehe auch SOPs auf www.precanmed.eu.

⁶ Sachs, N. et al. A Living Biobank of Breast Cancer Organoids Captures Disease Heterogeneity. *Cell* (2018). doi:10.1016/j.cell.2017.11.010

Medium für BrustTumor-Organoiden Zusammensetzung

Ad-DF Basalmedium
B27 supplement
Nicotinamid
N-Acetylcystein
R-Spondin 3
Heregulin β-1
Noggin
FGF-7
FGF-10
EGF
A83-01 (ALK5 Inhibitor)
SB202190 (p38 MAP Kinase Inhibitor)
Y-27632 (Rock Inhibitor)
Antibiotics

Patient	Diagnose	Proliferationspotential
1	Luminal A	-
2	Luminal A	-
3	Luminal A	-
4	Luminal A	-
5	Luminal A	-
6	Luminal A	-
7	Luminal A	++
8	Luminal A	-
9	Luminal A	-
10	Luminal A	+
11	Luminal A	+
12	Luminal A	+
13	Luminal A	-
14	Luminal A	+++
15	Luminal A	++
16	Luminal A	++
17	Luminal A	+
18	Luminal A	+++
19	Luminal A	-
20	Luminal B	-
21	Luminal B	+
22	Luminal B	++
23	Luminal B	+++
24	Triple negative	-
25	Triple negative	++
26	Triple negative	-
27	Triple negative	-
28	Triple negative	-
29	Triple negative	+++
30	Triple negative	-
31	Triple negative	+++
32	Her-2 like	-
33	Her-2 like	+++

Tabelle 7: Proliferationspotential von Brusttumor-Organoiden, die von in die Studie einbezogenen Patientinnen erhalten wurden (-, keine Proliferation; +, ++ schlechte / gute Proliferation; +++, ausgezeichnete Proliferationskapazität - ausreichend für die Durchführung von Genomanalysen und Funktionstests). Detaillierte Informationen unter www.precanmed.eu.

5.3 Lungentumor- und Normalgewebe-Organoiden (LNCIB) ■

Die ursprünglichen Protokolle zur Kultivierung von Langzeitkulturen von Tumororganoiden basierten auf Medien zur Organoidgenerierung von normalen Lungen- und Atemwegsgewebe, welche ein limitiertes Set an Wachstumsfaktoren wie EGF, Rock Inhibitor (Y-276325), ALK5 Inhibitor (A83-01), LIF (Leukämie Inhibitorischer Faktor) und FGF10 beinhalteten. Es war bekannt, dass diese Kombination an Wachstumsfaktoren die Mikroumgebung von Stammzellen des Lungenepithels nachahmt^{10,11}. Dieses Medium erzeugte in 25% der verarbeiteten Gewebeproben (4/20) lebensfähige 3D-Zellstrukturen. Dieses Medium erfüllte jedoch nicht die Anforderungen an die Proliferationskapazität über einen längeren Zeitraum. Durch die Zugabe von FGF7, p38-MAP-Kinase-Inhibitor (SB202190), R-Spondin3 und Noggin konnte das Wachstumspotenzial von Tumor-Organoiden erheblich verbessert werden. Diese Modifikationen belegten auch Studien, die während des Projektzeitraums veröffentlicht wurden¹²⁻¹⁴ (**Tabelle 8**). Unter diesen Bedingungen bildeten von 21 verarbeiteten Gewebeproben nur 4 keine 3D-Zellaggregate (19 %); 81 % initiierten die Bildung einer 3D-Zellstruktur (17/21). 67% der Organoiden zeigten anfänglich ein gutes Organoidwachstum (14/21), das sich aber nach einer Kultivierungsdauer von 1 bis 2 Wochen einstellte. Schließlich führten 20 % der Tumorgewebeproben (4/21) zu Organoidkulturen mit hohem Proliferationspotential, die zur Initiierung von Genomanalysen und Funktionstests geeignet waren (**Tabelle 9, Abbildung 6**). Bemerkenswerterweise war das Anlegen von Organoiden von gesundem Lungengewebe nur in einem einzigen Fall möglich. Bis jetzt konnten wir keinen bestimmten Lungentumor-Histotypen identifizieren, welcher das

¹⁰ Barkauskas, C. E. et al. Lung organoids: current uses and future promise. *Development* (2017). doi:10.1242/dev.140103

¹¹ Hegab, A. E. et al. Mimicking the niche of lung epithelial stem cells and characterization of several effectors of their in vitro behavior. *Stem Cell Res.* (2015). doi:10.1016/j.scr.2015.05.005

¹² Heo, I. et al. Modelling Cryptosporidium infection in human small intestinal and lung organoids. *Nat. Microbiol.* (2018). doi:10.1038/s41564-018-0177-8

¹³ Dijkstra, K. K. et al. Generation of Tumor-Reactive T Cells by Co-culture of Peripheral Blood Lymphocytes and Tumor Organoids. *Cell* (2018). doi:10.1016/j.cell.2018.07.009

¹⁴ Sachs, N. et al. Long-term expanding human airway organoids for disease modeling. *EMBO J.* (2019). doi:10.15252/embj.2018100300

Tabelle 8. Zusammensetzung der Medien, die von den Projektpartnern zur Etablierung organoide Kulturen von Lungentumorgewebe verwendet wurden. Siehe auch SOPs auf www.precanmed.eu.

Medienzusammensetzung LungenTumor-Organoide

DMEM
Ham's F-12
R-Spondin 1
FGF 7
FGF 10
Noggin
A83-01 (ALK5 inhibitor)
Y-27632 (Rock inhibitor)
SB202190 (p38 MAP Kinase Inhibitor)
B27 supplement
N-Acetylcystein
Nicotinamid
Penicillin / Streptomycin
Antibiotika

Anlegen von Tumororganoidkulturen mit besonders hoher Effizienz ermöglicht.

Diese Daten bestätigen, dass FGF7, FGF10, p38-MAP-Kinase-Inhibitor (SB202190), R-Spondin und Noggin, Rock-Inhibitor (Y-276325) sowie der ALK5-Inhibitor (A83-01) eine gute Wachstumsfaktorkombination für die Etablierung von Lungentumororganoidkulturen ist. Basierend auf den Erkenntnissen aus den CRC-Versuchen zur Organoidkultur glauben wir, dass die breite Kombination aus Wachstumsfaktoren und Inhibitoren möglicherweise mit einem Teil der Brustkrebserkrankungen nicht kompatibel ist, was die relativ hohe Ausfallsrate in der frühen Phase der Etablierung der Organoidkultur erklären würde.

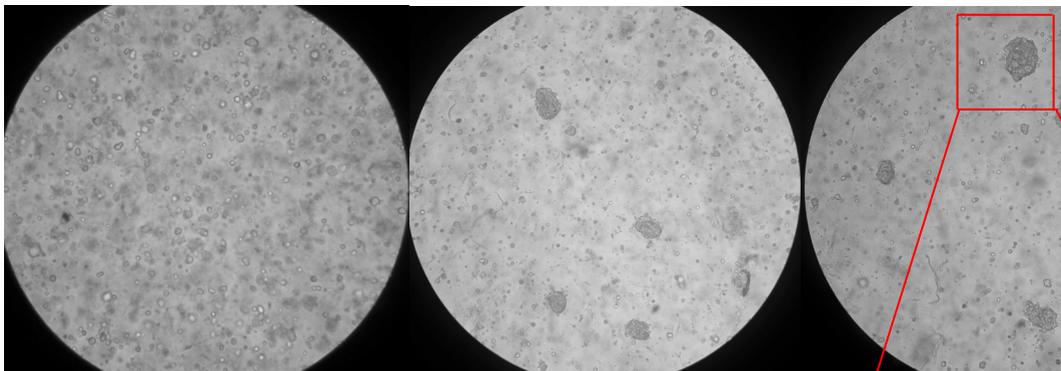
Patient	Diagnosis	Proliferative potential
1	Adenokarzinom	++
2	Adenosquamous carcinoma	+
3	Adenokarzinom	+
4	Plattenepithelkarzinom	-
5	Adenokarzinom	+++
6	Neuroendokrines Karzinom	+
7	Adenokarzinom	-
8	Adenokarzinom	+
9	Adenokarzinom	+++
10	Adenokarzinom	-
11	Adenokarzinom	++
12	Plattenepithelkarzinom	+
13	Adenokarzinom	+
14	Plattenepithelkarzinom	++
15	Muköses Adenokarzinom	+++
16	Adenokarzinom	-
17	Plattenepithelkarzinom	-
18	Adenokarzinom	+
19	Adenokarzinom	+++
20	Adenokarzinom	-
21	Plattenepithelkarzinom	+

Table 9: Proliferative potential of lung tumor-organoid obtained from individual patients enrolled into the study (-, no proliferation; +, ++ poor/good proliferation; +++, excellent proliferation capacity – sufficient to perform genomics analysis and functional tests. For detailed information see www.precanmed.eu.

day 0

day 4

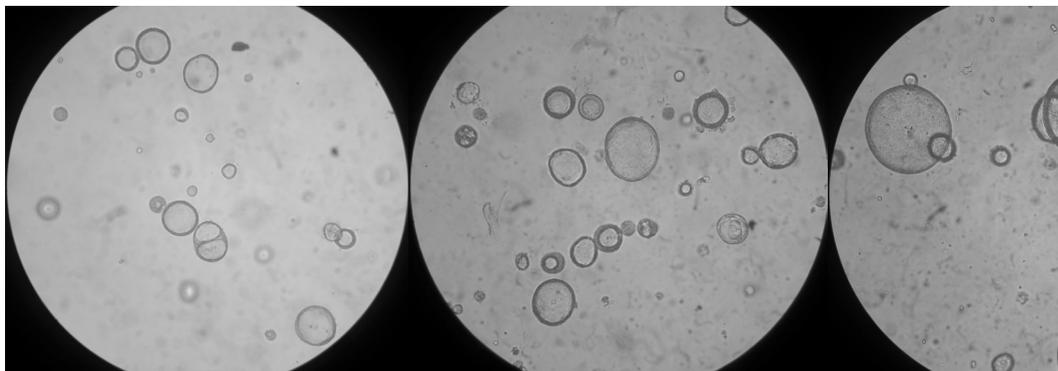
day 6



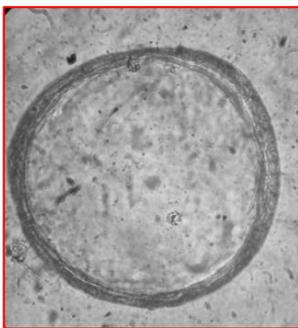
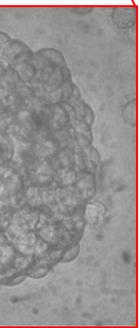
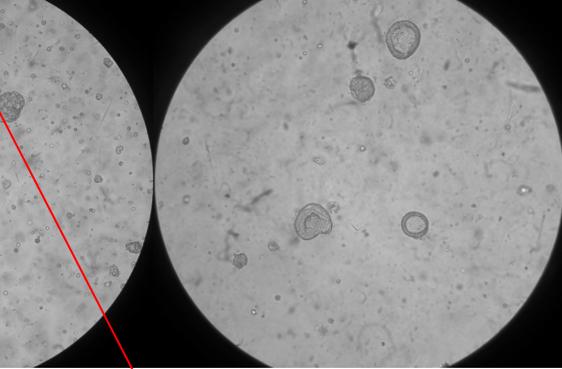
day 15

day 20

day 40



immediately after splitting



0

day 60

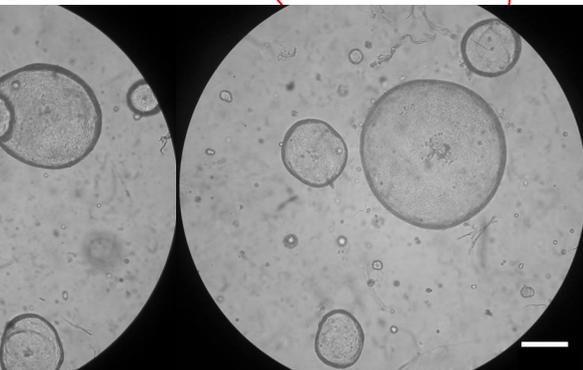


Abbildung 6: Kultivierung von Lungenkrebs-Organoiden. Obere Tafel: Phasenkontrastmikroskopische Aufnahmen von frisch ausgesäten Brusttumorzellen (Tag 0), Tumororganoidkulturen nach vier und sechs Tagen der Kultivierung und am Tag nach dem Passagieren. Untere Tafel: kontinuierliche Kultivierung von Tumor-Organoiden bis Tag 60. Beachten Sie, dass sich nach dem Passagieren von traubenförmigen Organoiden sphäroidische Strukturen bilden (siehe Detailbild am 6. und am 60. Tag). Siehe auch SOPs auf www.precanmed.eu.

6. Expansion von Organoidkulturen

Organotide wachsen in 3D-Zellstrukturen, die sich in runden und/oder traubenartigen Strukturen anordnen (**Abbildungen 3, 5, 6**)^{2,6,14}. Eine längere Kultivierung führt zur Bildung großer Strukturen, die den Zugang von Wachstumsfaktoren und Nährstoffen zu zentral gelegenen Zellen nicht mehr ermöglichen, was zum Zelltod und zu einer verminderten Lebensfähigkeit von Tumor-Organoiden führt. Folglich müssen Organotide in kleinere Zellaggregate zerlegt werden, um die kontinuierliche Vermehrung der Organoidkulturen zu ermöglichen. Es wurden verschiedene Strategien zur Teilung von Organoiden aus Brust-, Darm- und Lungengewebe in kleinere Untereinheiten oder sogar einzelne Zellen getestet, möglichst ohne das Proliferationspotential zu beeinträchtigen. Die besten Ergebnisse wurden mittels einer sanften mechanischen Trennung von organoiden Strukturen in Kombination mit einem enzymatischen Proteinverdau von Zell-Zell-Kontakten erzielt. Eine Übersicht findet sich in **Tabelle 10** und den SOPs auf der Projektwebsite www.precanmed.eu

² van de Wetering, M. et al. Prospective Derivation of a Living Organoid Biobank of Colorectal Cancer Patients. *Cell* 161, 933–945 (2015).

⁶ Sachs, N. et al. A Living Biobank of Breast Cancer Organoids Captures Disease Heterogeneity. *Cell* (2018). doi:10.1016/j.cell.2017.11.010

¹⁴ Sachs, N. et al. Long-term expanding human airway organoids for disease modeling. *EMBO J.* (2019). doi:10.15252/embj.2018100300

Passagieren von Organoiden zur Kultur Vermehrung	Brustgewebe (UniTS)	Lungengewebe (LNCIB)	Dickdarmgewebe (MUI, ADSI, UniUD)
Optimale Bedingungen	Matrigel auflösen, enzymatische Verdauung von wiedergewonnenem Organoiden mit Trypsin Ersatzprotease (5 Minuten bei 37 ° C)	<p><i>Kleine Organoid:</i> Auflösen von Matrigel und mechanischer Zerkleinerung von zurückgewonnenen Organoiden, dann Entfernung von Matrigelresten mit Dispase</p> <p><i>Große Organoid:</i> Auflösung von Matrigel, Entfernung von Matrigelresten aus Organoiden mit Dispase; enzymatischer Verdau mit Trypsin Ersatzprotease (5 Minuten bei 37 ° C)</p>	<p>Auflösen von Matrigel, enzymatischer Verdau von wiedergewonnenem Organoiden mit Trypsin Ersatzprotease</p> <p><i>Schnell wachsende Organoid:</i> Verdau in Einzelzellen</p> <p><i>Langsam wachsende Organoid:</i> Verdau zu Zellhaufen</p>

Tabelle 10: Übersicht der Bedingungen für das Passagieren von Organoiden aus Lungen-, Darm- und Brustgewebe. Siehe auch SOPs auf www.precanmed.eu



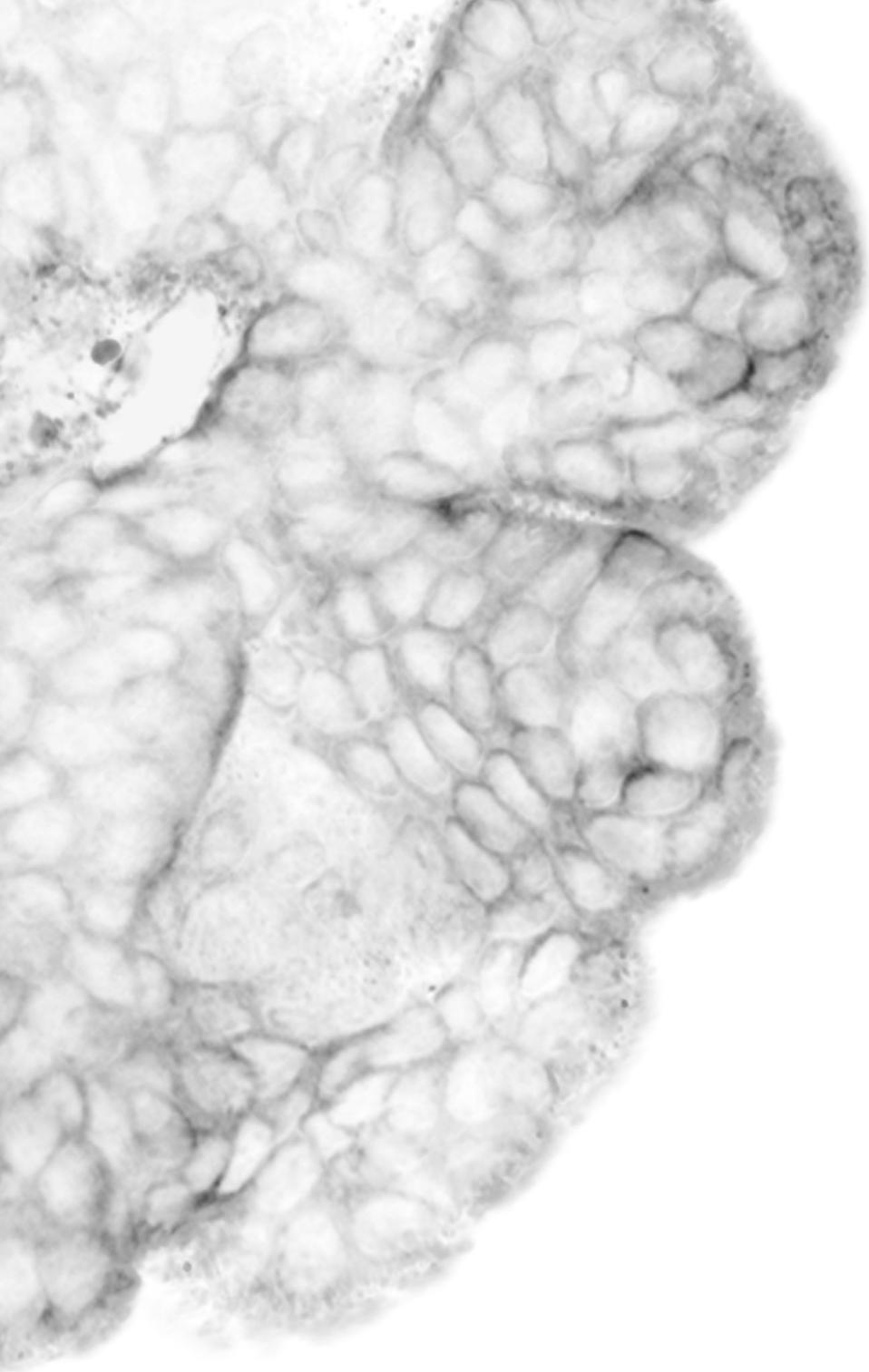


7. Kryokonservierung von Organoidkulturen

Die Kryokonservierung von Organoidkulturen aus Patientenmaterial ist ein zentrales Thema für den langfristigen Einsatz von Tumor-Organoiden in der translationalen und klinischen Forschung. Im Verlauf des Projekts stellte sich heraus, dass die Vitalität von Organoiden stark von den Gefrierbedingungen abhing. Die Gefrierbedingungen hängen stark von der Zusammensetzung des Mediums und auch der Abkühlgeschwindigkeit ab. Organoide mit robustem Proliferationspotential zeigten eine gute Toleranz gegenüber Gefrier-Auftau-Zyklen. Das Einfrieren einer hohen Anzahl von Zellen sicherte die Wiederherstellung von Organoidkulturen nach einem Gefrier-Auftau-Zyklus. Nach gewebetypabhängiger Verarbeitung von Organoiden wurden die besten Ergebnisse durch Einfrieren von Zellen bei einer kontrollierten Gefrierate von 1 °C pro Minute bis auf -80 °C und anschließender Kryokonservierung in flüssigem Stickstoff erzielt. (**Tabelle 11**). Diese Verfahren stellten in 50-80 % der Fälle eine erfolgreiche Aufrechterhaltung der Organoidkulturen sicher. Die durchschnittliche Letalität der Zellen während eines Gefrier-Auftau-Zyklus lag im Bereich von 20-50% (**Tabelle 11**).

Gefrierbedingungen für organoidkulturen	Brustgewebe (UNITS)	Lungengewebe (LNCIB)	Dickdarmgewebe (MUI, ADSI, UNIUD)
Optimale Bedingungen	Auflösen von Matrigel; gewonnene Zellen in FBS/10% DMSO einfrieren	Auflösen von Matrigel; gewonnene Zellen in FBS/10% DMSO einfrieren	<i>Option 1:</i> Auflösen von Matrigel; gewonnene Zellen in Recovery™ Cell Culture Freezing Medium einfrieren <i>Option 2:</i> Auflösen von Matrigel; Verdau mit Trypsin in Einzelzellen; gewonnene Zellen in Recovery™ Cell Culture Freezing Medium einfrieren
Gefrierrate	-1°C/min bis auf -80°C; Transfer in Stickstoff	-1°C/Minute to -80°C; Transfer in Stickstoff	-1°C/Minute to -80°C; Transfer in Stickstoff
Erfolgsrate von Gefrierzyklus	50%	50%	80%
Zelltodrate nach Auftauen	50%	50%	20%

Tabelle 11: Übersicht über die Bedingungen für das Einfrieren von Organoiden aus Lungen-, Darm- und Brustgewebe. Siehe auch verwandte SOPs auf www.precanmed.eu





8. Validierung von histopathologischen Merkmalen an Tumor Organoid Kulturen

Die immunhistopathologische (IHC) Analyse primärer Tumorschnitte ist eine entscheidende Information für die Klassifizierung von Tumoren und die Auswahl von postoperativen therapeutischen Behandlungen. Ein vollständiger Satz der wichtigsten IHC-Marker, die zur Klassifizierung von Brust-, Lungen- und Darmkrebs verwendet werden, ist in **Tabelle 12** aufgeführt. Aus Tumorgewebe stammende Organoid-Kulturen behalten die histopathologischen und molekularen Merkmale des Primärtumors bei ^{2,6,14}. Die Immunhistochemie an Tumoroorganoid-Kulturen wurde durchgeführt, um die primären Tumoreigenschaften in Tumor-Organoiden vor einer detaillierten Genomanalyse zu validieren. Organoiden (z. B. 6 Wells einer Platte mit 24 Wells) wurden mit Formaldehyd fixiert und in Agarose eingebettet. Diese Agarose Plugs wurden in Paraffin eingebettet und von geschultem Personal geschnitten. Die Lokalisierung von Organoidstrukturen in Paraffinblöcken ist schwierig und

² van de Wetering, M. et al. Prospective Derivation of a Living Organoid Biobank of Colorectal Cancer Patients. *Cell* 161, 933–945 (2015).

⁷ Sachs, N. et al. A Living Biobank of Breast Cancer Organoids Captures Disease Heterogeneity. *Cell* (2018). doi:10.1016/j.cell.2017.11.010

¹⁴ Sachs, N. et al. Long-term expanding human airway organoids for disease modeling. *EMBO J.* (2019). doi:10.15252/embj.2018100300

kann am besten durch periodische H & E-Färbung in Abständen von 10 Schnitten erreicht werden. So fanden wir heraus, dass alle hochproliferativen Organoiden, die aus Brust- und Lungengewebe gewonnen wurden, die Expression der IHC-Marker aus der primären Untersuchung rekapitulierten, was darauf hinweist, dass die Tumorklassifizierungsparameter durch die Organoid-Wachstumsbedingungen nicht ausserordentlich stark beeinträchtigt wurden (**Abbildungen 7, 8, Tabellen 13-14**).

Tabelle 12: Liste der immunhistochemischen Marker zur Validierung histopathologischer Merkmale von Lungen-, Brust- und kolorektalen Tumor-Organoiden

Kolorektalkarzinome	Brustkrebs	Lungenkrebs
MLH1	Estrogen receptor	Ki-67
MSH2	Progesteron receptor	CK5/6
MSH6	Her2/neu	CK7
PMS2	Ki67	p63
Her2/neu	p53	Napsin A
	E-cadherin	TFF-1
	Cytokeratin 5/6	p40
	Cytokeratin 7	Calretinin
	Cytokeratin 14	ESA/ BERP4
	Cytokeratin 19	EMA
	p63	CEA
		Desmin
		WT-1
		Vimentin
		CK AE1/ AE3
		CD56
		Cromogranin A
		Synaptophysin
		panCK
		TG
		ERG
		PSA
		CK20
		CDX-2

Patient	CK5/6	CK7	P40	TTF1	Napsin	Post-operative Therapie
Patient 5– Lung Adenocarcinoma	Match	Match	Match	Match	N.A.	None
Patient 9– Lung Adenocarcinoma	N.A.	Match	N.A.	N.A.	N.A.	None
Patient 15 – Mucinous Adenocarcinoma	N.A.	Match	No match	N.A.	Match	None
Patient 19– Lung Adenocarcinoma	TBD	TBD	TBD	TBD	TBD	TBD

Tabelle 13: Überblick über die Übereinstimmung von immunhistochemischen Markern von Lungentumor-Organoiden und ursprünglichen Primärtumor-Geweben. Die für die Genomanalyse ausgewählten Proben werden angezeigt. Match: Die IHC-Färbung des Primärtumors entspricht der von Tumor-Organoiden. No Match: Die IHC von Tumor-Organoiden stimmt nicht mit dem Primärtumor überein. TBD: noch zu bestimmen. N.A.: nicht bestimmt. Detaillierte Daten unter www.precanmed.eu.

Patient	ER	PR	Cytokeratin	E-cadherin	Cancer therapy
Patient 14 – Luminal A breast cancer	Match	Match	Match	Match	Hormonal
Patient 23 – Luminal B breast cancer	Match	Match	Match	Match	Epirubicin + Cyclophosphamide + paclitaxel + hormonal
Patient 29 – TNBC	Match	Match	Match	No match	None
Patient 31 – TNBC	Match	N.A.	Match	Match	None
Patient 33 – Her2 breast cancer	No match	Match	Match	Match	Docetaxel + Cyclophosphamide + Trastuzumab

Tabelle 14: Überblick über die Übereinstimmung von immunhistochemischen Markern von Brusttumor-Organoiden und ursprünglichen Primärtumorgeweben. Die für die Genomanalyse ausgewählten Proben werden angezeigt. Match: Die IHC-Färbung des Primärtumors entspricht der von Tumor-Organoiden. No Match: Die IHC von Tumor-Organoiden stimmt nicht mit dem Primärtumor überein. TBD: noch zu bestimmen. Detaillierte Daten finden Sie auch unter www.precanmed.eu.

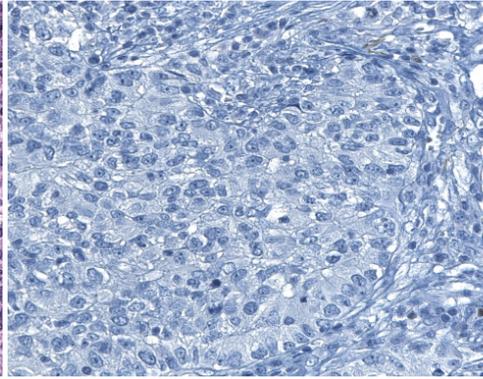
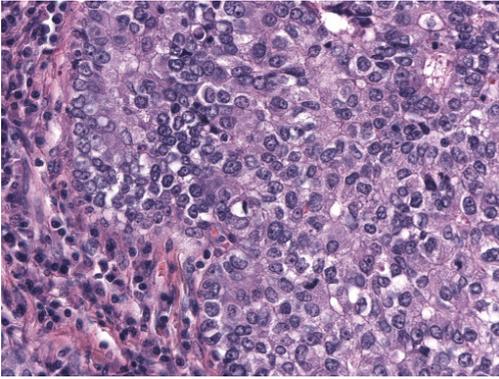
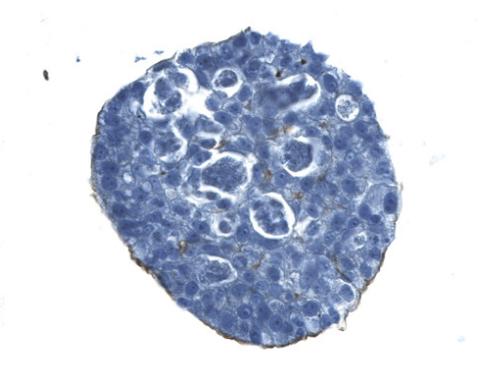
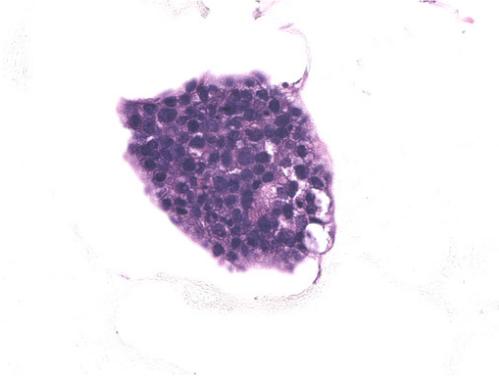
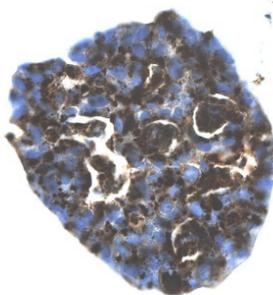
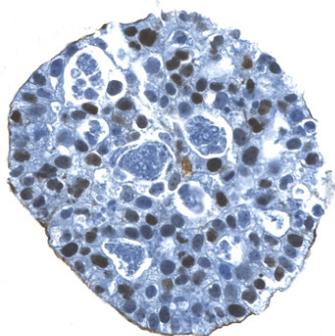
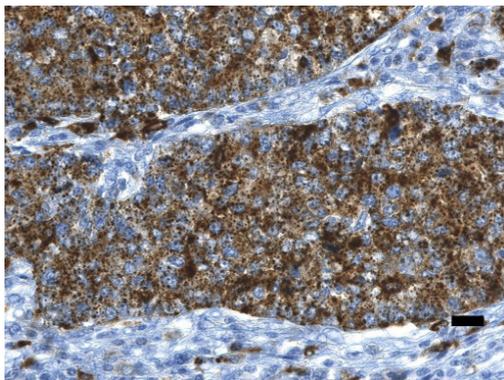
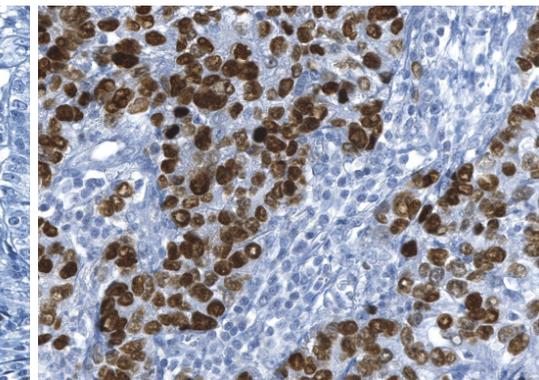
H/E**P63****TISSUE****ORGANOIDS**

Abbildung 7. Organoide rekapitulieren histologische Merkmale von primären Lungentumoren (A) Exemplarische H & E-Färbung und Immunhistochemie an Schnitten des primären Tumors eines Patienten (oberes Feld) und dem entsprechenden Tumor-Organoid (unteres Feld). Die Immunhistochemie wurde unter mit den Antikörpern gegen P63, TTF1 und Napsin A durchgeführt. Der Status des ursprünglichen Lungenkrebs-Adenokarzinoms wird in Tumor-Organoid-Kulturen aufrechterhalten. Maßstabsleiste 50 µm.

Abbildung 8. Organoide zeigen ähnliche histologische Merkmale von primären Brust-Tumoren (A) Exemplarische H & E-Färbung und Immunhistochemie an Schnitten des primären Tumors eines Patienten (oberes Feld) und dem entsprechenden Tumor-Organoid (unteres Feld). Die Immunhistochemie wurde unter mit Antikörpern mit den Antikörpern gegen ER (Östrogenrezeptor), Cytokeratin 7 und E-cadherin durchgeführt. Der Status des ursprünglichen tumors (invasives duktales Karzinom - Luminal A) wird in Tumor-Organoid-Kulturen aufrechterhalten. Maßstabsleiste 10 µm.

TTF1

NAPSIN A



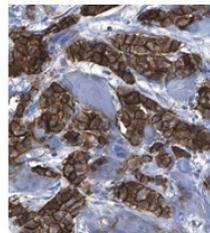
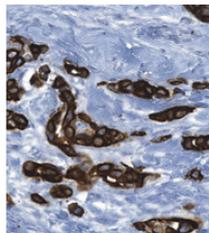
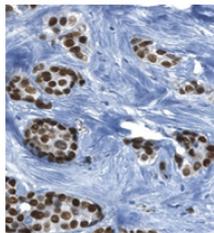
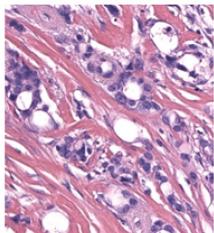
H&E

ER

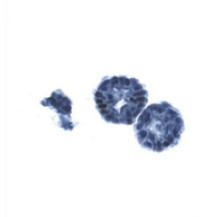
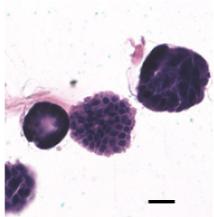
Cytokeratin 7

E-cadherin

Tissue



Organoid





9. Genomanalyse von Tumor-Organoiden

Tumor-Organoiden sind ein wesentlicher Baustein für die Entwicklung der Präzisionskrebsmedizin. Es wird erwartet, dass die Erstellung von Expressions- und Mutationsprofilen aus Tumor-Organoiden und Primärtumoren durch Omics-Technologien die Wirkstoffentdeckung für die Präzisionskrebsmedizin ermöglicht. Hier haben wir eine begrenzte Anzahl von PatientInnen einer RNA- und Ganz-Exom-Sequenzierung unterzogen, um die Stabilität organoider Kulturen zu testen und eine „in silico“-Medikamentenvorhersage für eine personalisierte Therapie durchzuführen.

9.1 RNA sequencing of organoid cultures

RNA aus 3 Replikaten von gepaarten Tumor- und normalen kolorektalen Organoiden (UniUD) wurde verwendet um mittels TruSeq 2 × 100 bp stranded library construction Kit Bibliotheken zu erstellen (**Tabelle 15**). Für die Downstream-Analyse der differentiellen Expression waren mindestens 30 Millionen Lesevorgänge pro Probe erforderlich. Dies umfasste die Qualitätskontrolle der Sequenzierung, das referenzbasierte Alignment und die Quantifizierung der Genexpression (siehe SOP-Sammlung auf www.precanmed.eu) (**Abbildung 9**). Dann wurde ein paarweiser Vergleich der abgelesenen Sequenzstücke zwischen dem passenden Tumor und normalen Organoiden bei unterschiedlicher Passage durchgeführt, unter Verwendung des Likelihood-Ratio-Tests mit einem Schwellenwert für die falsche Entdeckungsrate von (FDR) = 0,01. Das mehrdimensionale Skalierungsdiagramm der RNA-seq-Daten zeigte erwartungsgemäß Unterschiede zwischen den Expressionsprofilen von normalem Gewebe und Tumorgewebe-Organoiden in zwei Dimensionen (**Abbildung 10**). Dimension 1 trennte den Tumor von den normalen Organoidmodellen und bestätigte den gepaarten Ursprung der Proben; Dimension 2 entsprach den unterschiedlichen Passagennummern. Replizierte Proben von Tumor- als auch von normalen Organoiden mit der gleichen Passagezahlen wurden in Gruppen zusammengefasst (Spearman's ρ -Korrelationskoeffizienten > 0,92). Die Proben "späte Passage" und "Einfrieren/Auftauen" waren in ihren Expressionsprofilen zueinander ähnlicher, wenn verglichen zu "Frühe Passage" (**Abbildung 10**). Dies deutete darauf hin, dass die Genexpression während längerer Kultivierungsperioden und Einfrieren / Auftauen-Zyklen einer Veränderung unterworfen war.

Die Analyse ergab die Anzahl signifikant unterschiedlich exprimierter hochregulierter und herunterregulierter Gene (DEGs) zu jedem Zeitpunkt (**Tabelle 16**). Bei der Untersuchung von Genexpressionspfaden im Zusammenhang mit Dickdarmkrebs stellten wir fest, dass eine prominente Gruppe von Signalwegen, einschließlich des „Wnt-Signalwegs“ und des „Signalwegs zur Regulierung der Pluripotenz von Stammzellen“, in „Frühe, Späte und Einfrieren / Auftauen“-Proben im Vergleich zu entsprechenden Dickdarm-Normalgewebe-Organoiden verändert wurde.

Um eine zeitliche Veränderung der Transkriptome zu untersuchen, wurde auch der Expressionsvergleich zwischen den verschiedenen Zeitpunkten durchgeführt. Eine Gesamtzahl von 1101 hochregulierten und 1.326 herunterregulierten Genen wurde beim Vergleich von „Späte Passage“ mit „Frühe Passage“ und 1254 und 935 bei „Einfrieren / Auftauen“ mit „Späte Passage“ beobachtet (**Tabelle 16, Abbildung 11**). Die funktionelle Anreicherungsanalyse zwischen „Späte Passage“ „Frühe Passage“ von DEGs identifizierte, insbesondere für das Fortschreiten von Darmkrebs, biol-

ogisch relevante Signalwege, einschließlich des PI3K-Akt-Signalweg und des TNF α -Signalweges (FDR \leq 5%, **Tabelle 17**).

Insgesamt deuten diese Ergebnisse darauf hin, dass langfristiges Passagieren oder Einfrieren zu Veränderungen der Genexpression führen, die in weiterer Folge zu einer Veränderung von biologischen Signalwegen führen kann. Eine vollständige Exomsequenzierung wird Informationen darüber liefern, ob dies auf zelluläre Effekte oder auf die Selektion von Subpopulationen von Tumorzellen während der Langzeitkultivierung zurückzuführen ist.

Um die spezifischen Genexpressionsprofile von Patienten auf neuartige therapeutische Ansätze zu übertragen, wurde ein rechnergestütztes Screening von Arzneimitteln mit der Konnektivitätsmethode CMap (Connectivity Map) 15 durchgeführt, um Verbindungen zu identifizieren, die den gesuchten Krebsphänotyp umkehren könnten. Die Top 100 hoch- und runter-regulierten Gene von Tumor-Organoiden „frühe Passage“ (die in ihren Expressionsprofilen dem Primärtumor ähnlicher sind) wurden als Abfragesignatur für die CMap-Analyse verwendet. Die durchgeführte Analyse ergab eine Gruppe von therapeutischen Wirkstoffkandidaten für Arzneimittel-Tests in kleinem Maßstab, einschließlich RAF-Kinase-Inhibitoren, EGFR-Inhibitoren und MAP-Kinase-Inhibitoren (**Tabelle 18**).

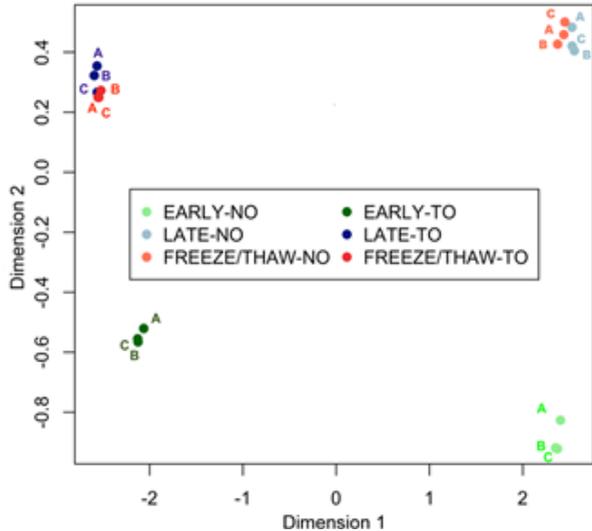
Patient12 (Adenocarcinoma-MSS stable)	Early Passage (3 weeks cultivation)	Late passage (13-14 weeks cultivation)	Freeze /Thaw
Normal colon tissue organoids	Early passage (passage 3)	Late passage (passage 12)	Freeze at p3 + 7 weeks cultivation
Colorectal tumor-tissue organoids	Early passage (passage 3)	Late passage (passage 12)	Freeze at p3 + 7 weeks cultivation

Tabelle 15: RNA Die RNA-Sequenzanalyse wurde an kolorektalen Organoiden von Patient 12 durchgeführt, welche an unterschiedlichen Passagen und nach dem Gefrier-Auftau-Zyklus gesammelt wurden. MSS: Mikrosatelliten stabil (Projektpartner UniUD).

Abbildung 9 Arbeitsdiagramm zur RNA-Seq Analyse von Organoiden, die von Darmkrebspatienten generiert wurden.



Abbildung 10 Mehrdimensionale Skalierung (MDS) der RNA-Sequenzbibliotheken von Tumor- (-TO) und normalen (-NO) Organoiden zu jedem Zeitpunkt (FRÜH, SPÄT und EINFRIEREN / AUFTAUEN). Großbuchstaben markieren die Musterreplikate. 'Late': Organoide mit später Passage; 'EARLY', Organoide mit früher Passage; FREEZE/THAW: Organoide nach dem Einfrieren / Auftauen.



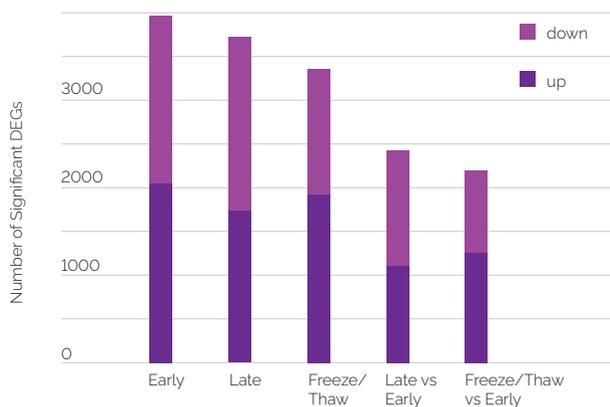


Abbildung 11: Die Anzahl der signifikanten hoch- und runterregulierten Gene im Tumor im Vergleich zu gepaarten Normalorganoiden bei und zwischen ('LATE vs. EARLY' und 'FREEZE / THAW vs. EARLY') den verschiedenen Zeitpunkten (Fold-Change \geq 2, bereinigter FDR \leq 0,01). 'Late': Organoide mit später Passage; 'EARLY', Organoide mit früher Passage; FREEZE/THAW: Organoide nach dem Einfrieren / Auftauen.

Zeitpunkt	hochreguliert	herunterreguliert
EARLY	2022	1955
LATE	1737	2000
FREEZE/THAW	1909	1443
LATE vs. EARLY	1101	1326
FREEZE/THAW vs. EARLY	1254	935

Tabelle 16: Die Anzahl der signifikanten auf- und abregulierten Gene in Tumor-Organoiden im Vergleich zu den normalen Gewebeorganoiden zu und zwischen jedem Zeitpunkt (Fold-Change \geq 2, FDR \leq 0,01 angepasst). 'Late': Organoide mit später Passage; 'EARLY', Organoide mit früher Passage; FREEZE/THAW: Organoide nach dem Einfrieren / Auftauen.

Vergleich	Expression	ID	Beschreibung	Count	FDR
LATE vs. EARLY	hochreguliert	hsa04510	Focal adhesion	33	0.00
		hsa05205	Proteoglycans in cancer	30	0.01
		hsa04360	Axon guidance	22	0.03
		hsa04151	PI3K-Akt signaling pathway	38	0.68
		hsa04668	TNF signaling pathway	17	0.95
	herunterreguliert	hsa05200	Pathways in cancer	41	1.16
		hsa05132	Salmonella infection	14	1.89
		hsa04512	ECM-receptor interaction	14	2.91
		hsa05162	Measles	20	0.35
		hsa04068	FoxO signaling pathway	18	2.74
FREEZE/THAW vs. EARLY	hochreguliert	hsa04360	Axon guidance	24	0.01
		hsa01230	Biosynthesis of amino acids	17	0.02
		hsa05205	Proteoglycans in cancer	29	0.23
		hsa04510	Focal adhesion	29	0.37
		hsa05219	Bladder cancer	11	0.40
	herunterreguliert	hsa05200	Pathways in cancer	45	0.73
		hsa05166	HTLV-I infection	32	1.18
		hsa04320	Dorso-ventral axis formation	8	2.19
		hsa03030	DNA replication	13	0.00
		hsa04110	Cell cycle	23	0.00

Tabelle 17: Liste der signifikant angereicherten KEGG-Signalwege der ebenfalls signifikant hoch- und herunterregulierten Gene beim Vergleich der Genexpression der Späten- und Gefrier / Auftau-Zeitpunkte mit den Frühen-Zeitpunkten. Der KEGG-Identifikator (ID) und die Beschreibung (Description), die Anzahl der Gene in dem analysierten Datensatz, die einem Pfad zugeordnet sind (Count), und der FDR-Wert werden für jeden Pfad angegeben. 'Late': Organoide mit später Passage; 'EARLY', Organoide mit früher Passage; FREEZE/THAW: Organoide nach dem Einfrieren / Auftauen.

Tabelle 18: Liste der „Perturbances“, die die Expression der Tumor-Organoide in Passage 1 durch die CMap-Methode umkehren (negativer Score). Der Score-Wert, Name, Beschreibung und Zielgene werden für jede Verbindung angegeben.

Score	Name	Beschreibung	Ziel
-99.4	vemurafenib	RAF inhibitor	BRAF, CYP2C19, CYP3A4, CYP3A5, RAF1
-97.43	PD-198306	MAP kinase inhibitor	MAP2K1, MAP2K2, MAPK1, MAPK3
-96.18	brefeldin-a	Protein synthesis inhibitor	ARF1, ARFGEF1, ARFGEF2, CYTH2, GBF1, SAR1A
-96.05	SA-792709	Retinoid receptor agonist	RARA, RARB
-95.99	tyrphostin-AG-1478	EGFR inhibitor	EGFR, MAPK14
-94.82	TPCA-1	IKK inhibitor	IKKBK
-94.76	GSK-3-inhibitor-II	PKC inhibitor	GSK3B

9.2 Vollständige Exomsequenzierung von Organoid-Kulturen

Whole Exome Sequencing (WES) wurde an normalem Gewebe, primärem Tumorgewebe und Organoiden durchgeführt, um tumorspezifische somatische Mutationen in Protein-kodierenden Regionen zu identifizieren. Dies ermöglicht die Validierung der genetischen Abstammung von Tumor-Organoiden vom primären Tumorgewebe und die Identifizierung genetischer Veränderungen, die Tumoranfälligkeiten und Abhängigkeiten verleihen, welche den Weg für neuartige Therapedesigns ebnen könnten. Schließlich könnte WES eine mögliche Auswahl von Tumor-Organoiden Subpopulationen aufdecken, die durch genetische Varianten definiert sind und sich während der langfristigen Passage oder Kultivierung in verschiedenen Kultivierungsmedien ansammeln. Genomische DNA wurde aus den in Organoiden und Paraffin eingebetteten Normal- und Tumorgeweben extrahiert und dann 2×150 bp-Bibliotheken mittels SureSelect Human All Exon V6-Kit generiert und mit einer Illumina NovaSeq-Plattform sequenziert. Mithilfe einer benutzerdefinierten Pipeline wurden die erhaltenen Daten analysiert, tumorspezifische somatische Mutationen katalogisiert und diejenigen mit klinischer Relevanz identifiziert (**Abbildung 12**; siehe auch SOP-Sammlung www.precanmed.eu). Sequenzstücke mit hoher Qualität wurden nach Entfernung von Adaptoren und PCR Duplikaten mit dem menschlichen GRCh37-Referenzgenom zusammengesetzt. Die Keimbahnmutationen und tumorspezifischen somatischen Mutationen wurden durch Vergleich des Tumors mit den normalen Proben (Gewebe und organoide Kulturen) identifiziert. Die in den Tumorproben identifizierten somatischen nicht-synonymen Mutationen wurden priorisiert, wenn sie eine abweichende Allelfrequenz von $(VAF) > 0,1$ aufwiesen und einen von In-Silico-Pathogenitätsvorhersage-Tools vorhergesagt potenziell schädlichen Einfluss auf die Proteinfunktion hatten. Polymorphe Varianten mit einem $AF > 0,01$ in ExAC16 wurden herausgefiltert.

Abbildung 12: Arbeitsdiagramm zur WES-Analyse von Organoiden von Krebspatienten.



- COSMIC**= Catalogue Of Somatic Domestic Mutations In Cancer
- NCI60**= national Cancer Institute (NCI) 60 human tumour cell
- ICGC**= International Cancer Genome Consortium version 21

DNA von Normal- und Tumorgewebe sowie Normal- und Tumor-Organoiden aus frühen und späten Passagen, wurden einer WES-Sequenzierung unterzogen (weitere Einzelheiten in den **Tabellen 19 bis 22**).

9.2.1. Lungen-, Brust- und Darmkrebs (UniUD, UniTS, LNCIB)

Ziel der Analyse ist es, tumorspezifische somatische Mutationen in Primärtumoren zu identifizieren und das Vorhandensein und die Stabilität dieser Sequenzvarianten über die Zeit in den Organoiden zu validieren (**Tabellen 19-21**). In einem nachfolgenden Schritt werden patientenspezifische Genomdaten verwendet, um Tumoranfälligkeiten und -abhängigkeiten zu identifizieren, die durch In-vitro-Drogentests an Tumor-Organoiden getestet werden (siehe auch 7. Drogentests an Organoiden).

9.2.2. Darmkrebs (ADSI, MUI)

Um Informationen über die Stabilität von kolorektalen Tumor-Organoid Kulturen in multiplen Medienansätzen zu erweitern, wird WES an normalem Gewebe, primärem Tumorgewebe und Tumor-Organoiden durchgeführt, um eine mögliche Selektion von Subpopulationen mit unterschiedlichem genetischen Aufbau zu untersuchen (**Tabelle 22**).

Patient	Normales Gewebe	Primäres Tumorgewebe	Tumororganoid
Patient 14 – Luminal A Brustkrebs	Gewebeschnitte von Paraffinblöcken	Gewebeschnitte von Paraffinblöcken	Passage p5; 6 Wochen Kultivierung
Patient 23 – Luminal B Brustkrebs	Gewebeschnitte von Paraffinblöcken	Gewebeschnitte von Paraffinblöcken	Passage p8; 10 Wochen Kultivierung
Patient 29 – TNBC	Gewebeschnitte von Paraffinblöcken	Gewebeschnitte von Paraffinblöcken	Passage p5; 5 Wochen Kultivierung
Patient 31 – TNBC	Gewebeschnitte von Paraffinblöcken	Gewebeschnitte von Paraffinblöcken	Passage p6; 4 Wochen Kultivierung
Patient 33 – Her2 Brustkrebs	Gewebeschnitte von Paraffinblöcken	Gewebeschnitte von Paraffinblöcken	Passage p4; 4 Wochen Kultivierung

Tabelle 19: Brustkrebsproben analysiert mit WES (Projektpartner UniTS).

Patient	Normales Gewebe	Primäres Tumorgewebe	Tumororganoid (Frühe Passage)	Tumororganoid (Späte Passage)
Patient 5 – Lunge Adenokarzinom	Gewebeschnitte von Paraffinblöcken	Gewebeschnitte von Paraffinblöcken	Passage p2: 3 Wochen Kultivierung	Passage p3; 5 Wochen Kultivierung
Patient 9 – Lunge Adenokarzinom	Gewebeschnitte von Paraffinblöcken	Gewebeschnitte von Paraffinblöcken	Passage p2: 2 Wochen Kultivierung	Passage p5; 6 Wochen Kultivierung
Patient 19 – Lunge Adenokarzinom	Gewebeschnitte von Paraffinblöcken	Gewebeschnitte von Paraffinblöcken	N.A.	Passage p6; 8 Wochen Kultivierung
Patient 15 – Mucinous Adenocarcinoma	Gewebeschnitte von Paraffinblöcken	Gewebeschnitte von Paraffinblöcken	Passage p3: 7 Wochen Kultivierung	Passage p5; 11 Wochen Kultivierung

Tabelle 20: Lungenkrebsproben analysiert mit WES (Projektpartner LNCIB); N. A. = nicht analysiert.

Patient	Normales Gewebe	Organoide von normalem Gewebe	Tumorgewebe	Tumor-tissue organoids (WRNAS medium with Wnt3a)	Tumor-tissue organoids RNAS medium; no Wnt3a)
1 – patient 12; Adenokarzinom, Mikrosatelliten stabil	Gewebeschnitte von Paraffinblöcken	Frühe Passage (p4; 6 Wochen Kultivierung) und Späte Passage (p13; 13 Wochen Kultivierung)	Gewebeschnitte von Paraffinblöcken	Frühe Passage (p4; 8 Wochen Kultivierung)	Frühe Passage (p4; 8 Wochen Kultivierung) und Späte Passage (p12; 12 Wochen Kultivierung)
2 – patient 14; Adenokarzinom, Mikrosatelliten stabil	Gewebeschnitte von Paraffinblöcken	Frühe Passage (p5-7 Wochen Kultivierung)	Gewebeschnitte von Paraffinblöcken	Frühe Passage (p5; 9 Wochen Kultivierung) und Späte Passage (p12; 16 Wochen Kultivierung)	Frühe Passage (p5; 9 Wochen Kultivierung) und Späte Passage (p12; 13 Wochen Kultivierung)

Tabelle 21: Darmkrebsproben analysiert mit WES (Projektpartner UniUD).

Patient	Normales Gewebe	Organoide von normalem Gewebe	Tumorgewebe	Tumor-Organoide (Medium 4)	Tumor-Organoide (Medium 5)	Tumor-Organoide (Medium 6)
TPIO-19 Adenokarzinom Mikrosatellite instabil	Gewebeschnitte von Paraffinblöcken	Späte Passage p11/p3	Gewebeschnitte von Paraffinblöcken	Frühe Passage p4/p3/p5 und späte Passage p5/p10/p3	N.A.	Frühe Passage p8/p3 und Späte Passage p13/p4
TPIO-18 Adenokarzinom Mikrosatellite stabil	Gewebeschnitte von Paraffinblöcken	Frühe Passage p2/p3	Gewebeschnitte von Paraffinblöcken	Späte Passage p9/p4/p2	N.A.	Frühe Passage p2/p3 und Späte Passage p2/p7/p3
TPIO-23 Adenokarzinom Mikrosatellite stabil	Gewebeschnitte von Paraffinblöcken	N.A.	Gewebeschnitte von Paraffinblöcken	N.A.	N.A.	Frühe Passage p4

Table 22. Darmkrebsproben analysiert mit WES (Projektpartner ADSI / MUI). N. A. = nicht analysiert.



10. Medikamententestungen an Tumor-Organoiden

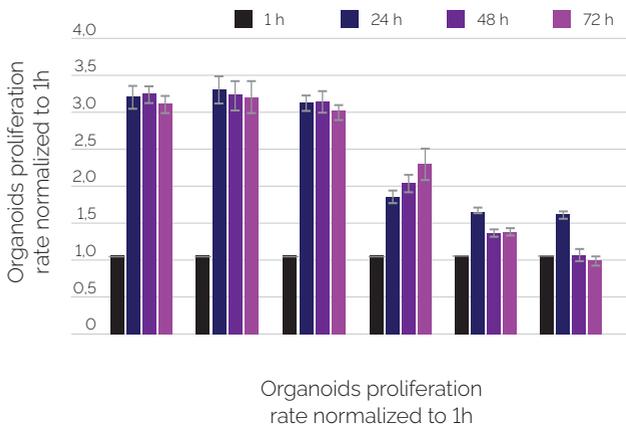
Tumor-Organoiden sind leistungsstarke Modellsysteme, mit denen in Zukunft die Effizienz klassischer therapeutischer Behandlungen getestet und alternative Therapiestrategien vor Beginn der Patiententherapie bewertet werden können. Darüber hinaus können Organoiden als fortgeschrittene präklinische Krebsmodelle dienen, um Arzneimittelkandidaten zu testen, die ursprünglich in monoklonalen Krebszelllinien mit geringer Komplexität identifiziert wurden.

Das proliferative Potenzial von humanen Tumor-Organoiden variiert zwischen den Patienten, wodurch die Verfügbarkeit von geeignetem Zellmaterial für Arzneimitteltests von großer Bedeutung sein wird. Diese Einschränkung könnte durch die Verwendung von Testsystemen ausgeglichen werden, die ein schnelles und präzises experimentelles Auslesen der Lebensfähigkeit von Zellen unter Verwendung einer geringen Menge des Patientenmaterials ermöglichen. Daher ermöglichte die

¹⁷ Kumar, S. K. et al. Dinaciclib, a novel CDK inhibitor, demonstrates encouraging single-agent activity in patients with relapsed multiple myeloma. *Blood* (2015). doi:10.1182/blood-2014-05-573741

Untersuchung der Stoffwechselaktivität von Tumor-Organoiden im Zeitverlauf, eine zuverlässige Messung der Reaktion von Organoiden auf therapeutische Behandlungen in vitro. Kontroll- und Tumor-Organoiden von Darmkrebspatienten, wurden mit Inhibitoren von Cyclin-abhängigen Kinasen (Dinaciclib und einem zusätzlichen, in Entwicklung befindlichen Kinase-Inhibitor (iCDKu)) behandelt. Dinaciclib ist ein zugelassenes Pyrazolo [1,5-a] pyrimidin mit potenzieller antineoplastischer Aktivität, das CDK1, CDK2, CDK5 und CDK9 hemmt. Die Hemmung von CDK1 und CDK2 kann zu einer Unterdrückung des Zellzyklus und einer Tumorzellapoptose führen¹⁷. Die Messung der Stoffwechselaktivität nach 1, 24, 48 und 72 Stunden Behandlung ergab eine verringerte Zellstoffwechselaktivität von Tumor-Organoiden. Bemerkenswerterweise blieb die metabolische Aktivität von Organoiden aus normalem Gewebe unverändert, was auf einen Tumorzellen-spezifischen Effekt hinweist, der von beiden Kinase-Inhibitoren ausgelöst wurde (**Abbildung 13**). Um die Zuverlässigkeit der Organoidkultur als präklinisches Krebsmodellsystem zu bestätigen, wurde die Wirksamkeit von Docetaxel, einer der zugelassenen und etablierten Komponenten des Krebstherapieschemas für dreifach negative Brustkrebspatientinnen, in vitro unter Verwendung entsprechender Brusttumor-Organoiden bewertet. Die Behandlung mit steigenden Konzentrationen von Docetaxel führte zu einer wirksamen Verringerung der Stoffwechselaktivität von Tumor-Organoiden (**Abbildung 14**). Dies bestätigt die Wirksamkeit der Echtzeitmessung der Stoffwechselaktivität als schnelle und einfache Ablesung zur Bestimmung der Effizienz von Therapiestrategien. In zukünftigen Experimenten werden Panels von Wirkstoffen getestet, die durch rechnergestütztes Wirkstoffscreening auf Genomdaten von Organoiden aus Patienten ermittelt wurden.

Abbildung 13 Echtzeit-Testung der Stoffwechselaktivität zur Bestimmung der Lebensfähigkeit von Organoiden aus normalem Gewebe und Tumorgewebe nach pharmakologischer Behandlung mit den Cyclin-abhängigen Kinase (CDK) -Inhibitoren (Dinaciclib und einem derzeit in Entwicklung befindlichen CDK-Inhibitor, iCDKu) bei den angegebenen Endkonzentrationen. CDK-Hemmer reduzieren spezifisch die Stoffwechselaktivität von Dickdarmtumoren, aber nicht die von Organoiden normalen Gewebes. (Projektpartner ADSU / MUI)



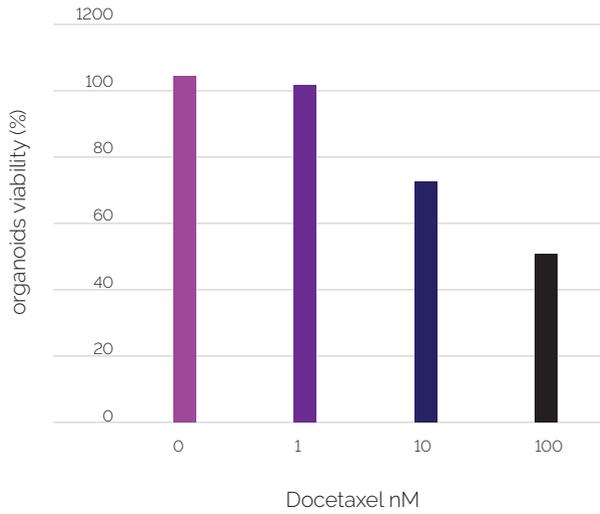


Abbildung 14: Echtzeit-Testung der Stoffwechselaktivität zur Bestimmung der Lebensfähigkeit von Organoiden, die aus Tumorgewebe eines mit TNBC diagnostizierten Patienten gewonnen wurden. Die Behandlung mit Docetaxel wurde an Tumor-Organoiden validiert. 100 nM Docetaxel reduzierte die Lebensfähigkeit der Organoiden auf 50%. (Projektpartner UniTS)



11. PreCanMed Datenbank

Das Management und die Interpretation von Daten aus Organoiden und Omics-Technologien, die in diesem Projekt erstellt und gesammelt wurden, sind für die Unterstützung von Forschern, die an der Präzisionsonkologie arbeiten, von großer Bedeutung. Zu diesem Zweck wurde eine Plattform zum Katalogisieren und Teilen der kuratierten Multi-Omics-, Biobank- und klinischen Anmerkungen implementiert. Die von NIH finanzierte Open-Source-Plattform „Informatics for Integrating Biology and the Bedside“ (i2b2) ^{18,19}, die an mehr als 200 Standorten weltweit eingesetzt wird, war die ausgewählte Software für das Hosting von Daten aus mehreren Quellen. Es unterstützt Ermittler bei der Abfrage von Daten und bei der Wahrung der Privatsphäre. Die Plattform umfasst insbesondere i) eine Datenbank, die Daten von mehreren experimentellen Plattformen speichert, dh immunhistochemische Daten (IHC), klinisch relevante Mutationen (von WES), ii) die in silico Wirkstoffsensitivitätsdaten, die

¹⁸ Murphy, S. N. et al. Serving the enterprise and beyond with informatics for integrating biology and the bedside (i2b2). *J. Am. Med. Informatics Assoc.* (2010). doi:10.1136/jamia.2009.000893

¹⁹ Murphy, S. et al. Architecture of the open-source clinical research chart from Informatics for Integrating Biology and the Bedside. *Symp. A Q. J. Mod. Foreign Lit.* (2007).

mit Expressionsprofilen der krebsrelevanten Signalwege (von RNA-seq assoziiert sind und iii) die Ergebnisse der Medikamententestungen mit Organoiden. Die i2b2-Ontologie, ein hierarchische Vokabular, das die mehrstufigen Daten beschreibt, (z.B. Patienten, Biotyp (Gewebe, Organoid), Omics oder Medikamentenwirksamkeit), wird an Organoidenmodelle angepasst, um die Abfragerterme bereitzustellen. Die Begriffe „Biobank“, „Drug Screening“ („Virtuelles Screening“, „Drug Response“), „WES-Daten“ und „Transkriptomik“ sind Beispiele für Begriffe, die an eine organoidzentrierte translationale Datenbank angepasst sind. Die mit diesem Projekt implementierte Übersetzungsplattform ermöglicht die umfassende Zusammenfassung der relevanten klinischen und medizinischen Informationen und stellt ein zugängliches Werkzeug für den Datenaustausch zwischen Krankenhäusern und Forschungseinrichtungen dar, wobei deren Vertraulichkeit gewahrt bleibt.