

Una guida pratica per la generazione di organoidi tumorali come modello per la medicina di precisione in ambito oncologico

Il manuale tecnico del progetto PreCanMed

Interreg

Italia-Österreich

European Regional Development Fund



EUROPEAN UNION



Una guida pratica per la generazione di organoidi tumorali come modello per la medicina di precisione in ambito oncologico

Il manuale tecnico del progetto PreCanMed

Design: Promoscience srl

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

Autori: **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).

Stampato in Giugno 2019



PreCanMed è un progetto finanziato dall'Unione Europea, Fondo Europeo di Sviluppo Regionale e Interreg V-A Italia-Austria 2014-2020

Prefazione



Prof. Stefan Schoeftner
Coordinatore di progetto

Rendere l'assistenza sanitaria accessibile e sempre più efficiente rappresenta un obiettivo fondamentale per l'Unione Europea per promuovere la crescita inclusiva dei cittadini negli Stati Membri. I progressi raggiunti nell'assistenza medica negli ultimi 40 anni hanno notevolmente migliorato l'aspettativa di vita nella società occidentale. Tuttavia, l'aumentata aspettativa di vita è correlata ad un progressivo incremento di patologie legate all'invecchiamento come il cancro.

Le statistiche riportate dal sistema sanitario nel 2012 hanno rivelato che un cittadino su 4 è a rischio di sviluppare il cancro. Negli Stati Membri dell'Unione Europea, ci si aspetta che i nuovi casi di cancro passino dai 2,6 milioni all'anno nel 2012 ai 3,1 milioni nel 2025. Queste previsioni suggeriscono che la sostenibilità dell'assistenza sanitaria gestita dai sistemi pubblici si trova in una situazione di rischio. Al fine di assicurare un'efficace ed inclusiva gestione dei pazienti, l'Unione Europea ha lanciato diverse iniziative per incoraggiare l'innovazione in campo sanitario. La condivisione delle risorse e lo scambio delle conoscenze tra i membri dell'Unione Europea e le regioni transfrontaliere costituiscono un pilastro per sostenere le strategie di innovazione.

Il progetto Interreg V-A Italia-Austria 2014-2020 'PreCanMed', sostenuto dal fondo Europeo per lo sviluppo regionale, è promosso da un team di

5 eccellenti istituti di ricerca situati in Tirolo e in Friuli Venezia Giulia, e ha come scopo lo sviluppo di tecnologie per la medicina anti-cancro di precisione nelle regioni interessate dal programma attraverso la cooperazione e la condivisione di competenze tra i gruppi coinvolti. Il team 'Pre-CanMed' ha sviluppato una tecnologia innovativa nella regione transfrontaliera Italia-Austria, in grado di riprodurre in vitro il tumore del paziente. Analisi dettagliate di questi modelli tumorali, noti come organoidi tumorali, permettono l'identificazione di approcci terapeutici paziente-specifici, un importante passo per lo sviluppo di terapie anti-cancro sempre più efficienti.

Il gruppo 'PreCanMed' ha stilato protocolli sperimentali accessibili a tutti, ha generato importanti risorse per la medicina anti-cancro di precisione, ha formato nuovi esperti nel settore, ha creato una rete stabile di contatti tra le parti interessate e ha diffuso questa nuova tecnologia, utile per accelerare lo sviluppo e la sperimentazione di terapie personalizzate, utilizzabile anche oltre i confini del programma regionale Interreg V-A Italia Austria.

Grazie a questo progetto, le tecnologie relative alla medicina anti-cancro di precisione diventano accessibili a tutti gli esperti nel settore e ai cittadini della regione, fornendo così un importante contributo per migliorare la salute dei pazienti e la futura sostenibilità dei sistemi sanitari pubblici.

sintesi dei contenuti

La medicina personalizzata è una strategia medica volta alla prevenzione, diagnosi e cura di patologie umane che si basa sulle caratteristiche cliniche, genetiche e fenotipiche (ambiente e stili di vita) del singolo individuo. Questo approccio risulta particolarmente utile per la malattia oncologica, una patologia eterogenea caratterizzata dalla presenza di specifiche mutazioni che contraddistinguono ogni paziente.

I modelli tumorali *in vitro*, utilizzati in laboratorio per riprodurre le caratteristiche del cancro, hanno il vantaggio di catturare la complessità tumorale. Tra questi, gli organoidi tumorali assumono un ruolo fondamentale per lo sviluppo di una medicina anti-cancro di precisione. Gli organoidi tumorali sono infatti modelli cellulari 3D, originati dal tessuto tumorale del paziente, prelevato durante l'intervento chirurgico. Questo modello ricapitola le caratteristiche del tumore da cui origina, rappresentando quindi un promettente strumento capace di ricapitolare le caratteristiche del tessuto tumorale. L'analisi genomica condotta sul tessuto tumorale d'origine e sugli organoidi da esso generati consente di svelare, per ogni singolo paziente, set specifici di mutazioni geniche o alterazioni nell'espressione genica, che possono essere d'aiuto nell'identificazione di nuovi bersagli molecolari. Grazie a questo tipo di approccio è possibile testare in laboratorio, sugli organoidi tumorali, terapie specifiche per ogni paziente e comparare la loro efficacia rispetto alle terapie anti-tumorali convenzionali. Pertanto gli organoidi tumorali possono fornire agli oncologi informazioni utili per il disegno di nuove terapie anti-cancro sempre più efficaci.

L'introduzione della medicina di precisione in ambito sanitario richiede conoscenze multidisciplinari in differenti campi della ricerca oncologica che possono essere sostenute solo attraverso la collaborazione tra diversi istituti di ricerca. Il progetto Interreg V-A Italia-Austria 2014-2020 'PreCanMed' (Creazione di una piattaforma per la medicina anti-cancro di precisione) è stato condotto da un team di 5 istituti di ricerca nella regione transfrontaliera Italia-Austria, al fine di sviluppare tecnologie per la medicina anti-cancro di precisione per i carcinomi più frequenti in questa regione, ovvero quelli che colpiscono il colon-retto, il polmone e il seno.

Il team 'PreCanMed' ha stilato e perfezionato protocolli per i) la generazione e la crioconservazione di modelli organotipici 3D, originati dal tessuto tumorale del paziente, ii) lo studio di dati genomici al fine di identificare nuove vulnerabilità e bersagli molecolari del tumore, iii) l'analisi dell'effetto di

nuove terapie utilizzando gli organoidi tumorali, e iv) la gestione condivisa delle risorse e dei dati generati per la medicina anti-cancro di precisione.

Il nostro manuale tecnico per la medicina anti-cancro di precisione contiene una guida dettagliata per lo sviluppo della tecnologia degli organoidi tumorali ed è stata redatta da ricercatori che operano nell'ambito accademico e farmaceutico. Il manuale tecnico descrive procedure, strategie ed esperienze sviluppate nel corso del progetto e fornisce dettagliati protocolli operativi standardizzati (SOPs). Questo manuale fornisce, ai laboratori che si occupano di ricerca in ambito oncologico, le competenze necessarie per lo sviluppo della tecnologia degli organoidi da carcinomi al polmone, al colon-retto e al seno.

Il manuale tecnico del progetto PreCanMed contiene 11 paragrafi, con relativi protocolli, che descrivono le fasi fondamentali per lo sviluppo della tecnologia degli organoidi tumorali:

1. Approvazione etica del progetto PreCanMed
2. Metodi di comunicazione attuati per la gestione del trasferimento del materiale biologico dalle strutture ospedaliere ai laboratori di ricerca
3. Selezione del materiale biologico per la generazione di organoidi da tessuto normale e tumorale
4. Processamento dei tessuti per la generazione di organoidi
5. Coltura di organoidi tumorali in Matrigel
6. Espansione delle colture organotipiche
7. Crioconservazione delle colture organotipiche
8. Validazione delle caratteristiche istopatologiche delle colture organotipiche tumorali
9. Caratterizzazione genomica degli organoidi
10. Trattamento farmacologico degli organoidi tumorali
11. Database PreCanMed

I contenuti elencati, insieme alle procedure operative descritte nel dettaglio, sono disponibili al sito internet del progetto PreCanMed www.precanmed.eu.

In sintesi, questo manuale tecnico punta a rendere accessibile ai ricercatori che fanno parte della regione transfrontaliera Italia-Austria, e non solo, la tecnologia degli organoidi tumorali al fine di poter sviluppare e sperimentare terapie personalizzate per i pazienti oncologici.

11
17
29

31

35

37

41

45

61

65

69

75

85

89

IL PROGETTO

IL TEAM DI PROGETTO

ISTRUZIONI PER
L'IMPLEMENTAZIONE
DELLA TECNOLOGIA DEGLI
ORGANOIDI TUMORALI

Introduzione

1. Approvazione etica del
progetto PreCanMed

2. Metodi di comunicazione attuati
per la gestione del trasferimento del
materiale biologico dalle strutture
ospedaliere ai laboratori di ricerca

3. Selezione del materiale biologico
per la generazione di organoidi
da tessuto normale e tumorale

4. Processamento dei tessuti per
la generazione di organoidi

5. Coltura di organoidi
tumorali in Matrigel

6. Espansione delle colture
organotipiche

7. Crioconservazione delle
colture organotipiche

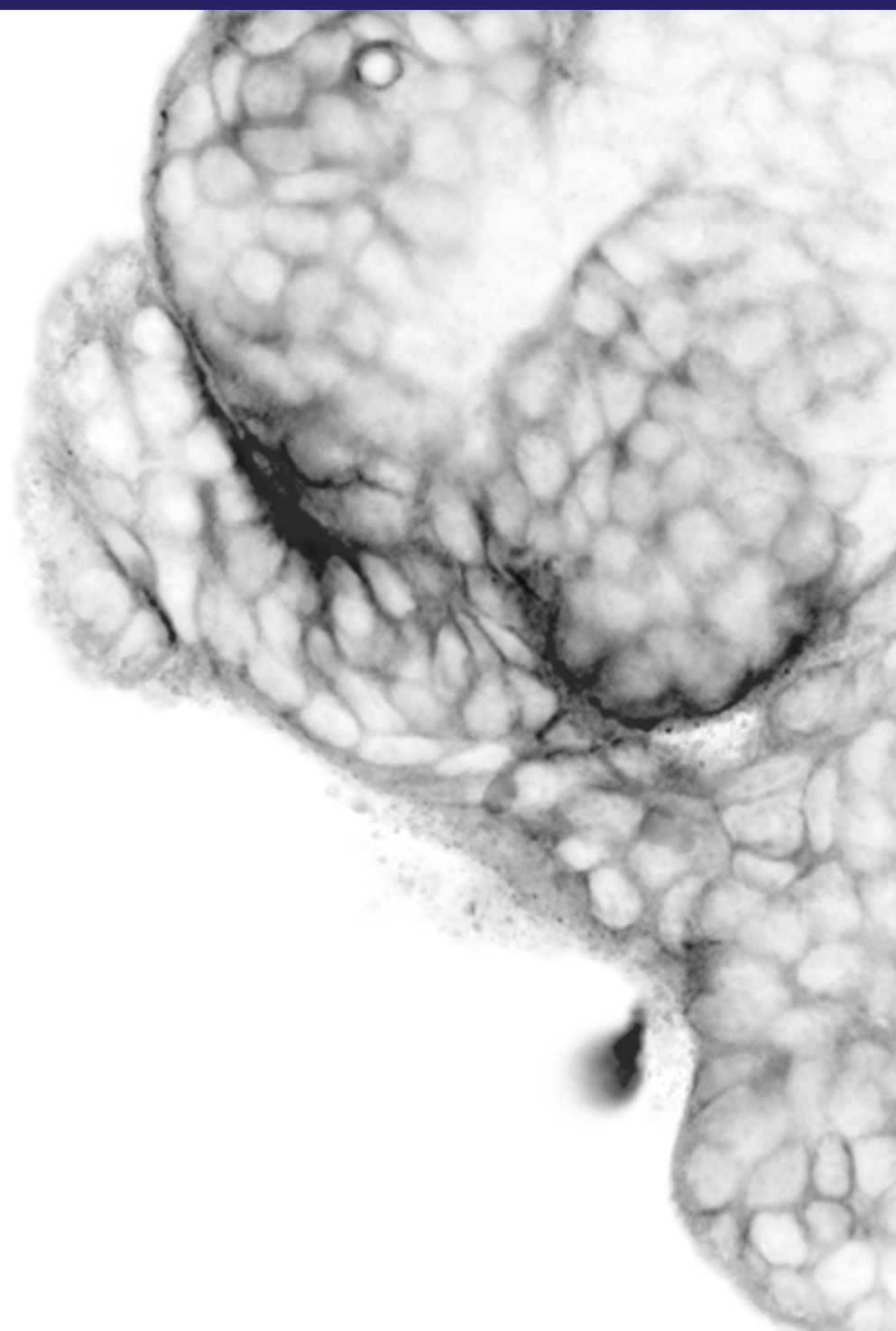
8. Validazione delle caratteristiche
istopatologiche delle colture
organotipiche tumorali

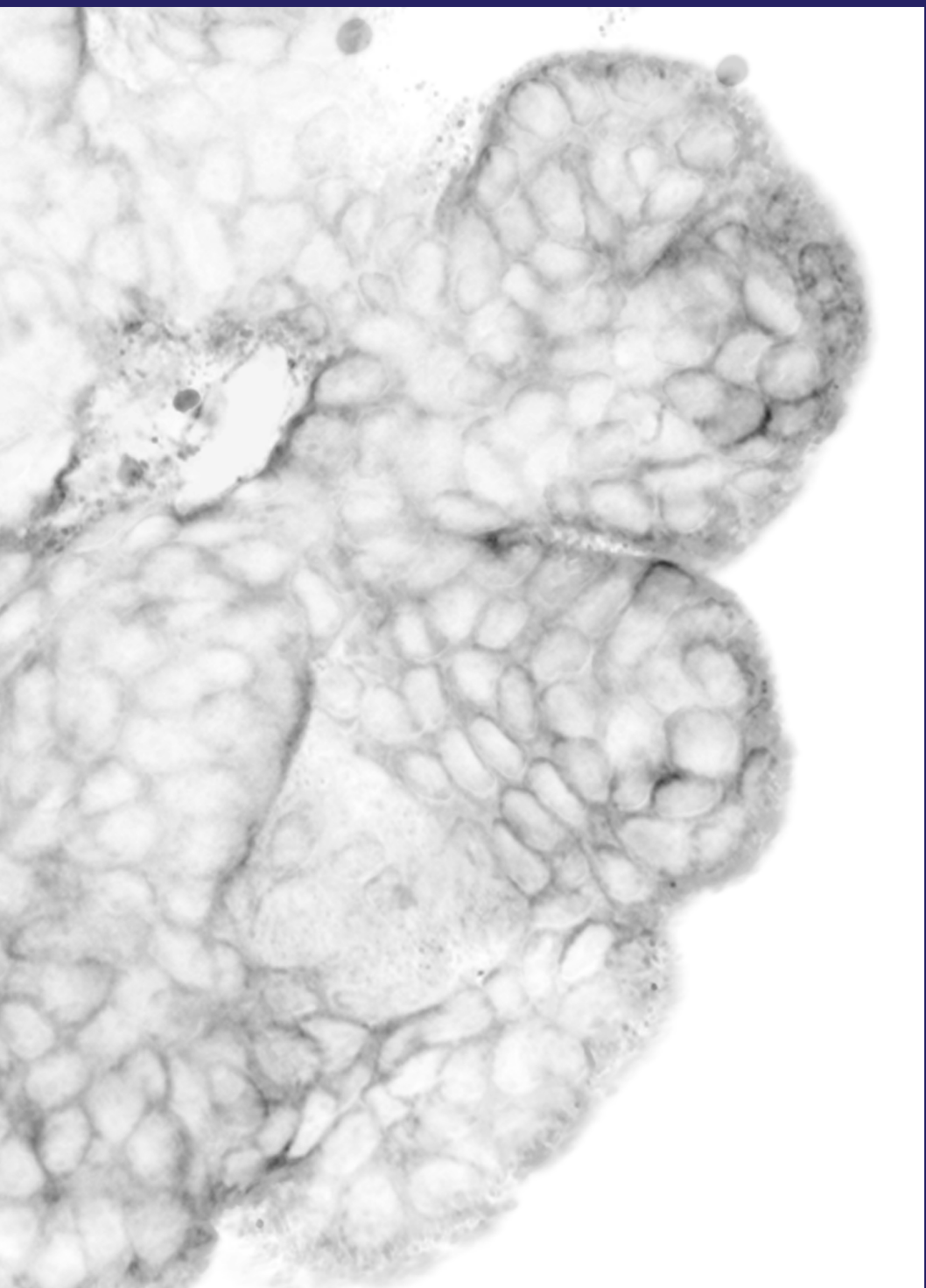
9. Caratterizzazione genomica
degli organoidi

10. Trattamento farmacologico
degli organoidi tumorali

11. Database PreCanMed

indice







Il Progetto

PreCanMed è un progetto strategico finanziato dall'Unione Europea, Fondo Europeo di Sviluppo Regionale e Interreg V-A Italia-Austria 2014-2020.

I partner di questo progetto lavorano insieme per implementare a livello interregionale la tecnologia degli organoidi tumorali da paziente, un nuovo potente strumento d'indagine che permette di studiare i tessuti sani e malati di pazienti con neoplasie, allo scopo di sviluppare trattamenti innovativi e personalizzati.

PreCanMed, che ha ottenuto l'approvazione dei comitati etici italiani e austriaci competenti, si propone di gettare solide basi per un'ampia diffusione di questa tecnologia in futuro.

Risultati attesi

- una migliore e più rapida acquisizione di nuove conoscenze su molteplici aspetti delle malattie tumorali,
- nuove scoperte fondamentali,
- contributi decisivi per la piena realizzazione delle potenzialità e delle promesse della medicina personalizzata.

La tecnologia degli organoidi tumorali

La tecnologia degli organoidi tumorali è un particolare sistema per la coltura funzionale e tridimensionale di cellule tumorali prelevate da pazienti con neoplasie.

Definiti veri e propri avatar del tumore che cresce all'interno dell'organismo, questi sistemi rappresentano uno dei modelli più avanzati della malattia e uno strumento d'indagine molto promettente per studiare i tumori in laboratorio, in condizioni 'quasi' fisiologiche.

Organi in miniatura in provetta

Il termine 'organoide' significa 'che somiglia a un organo' e si riferisce a una struttura tridimensionale che, in particolari condizioni, gli scienziati riescono a far crescere e auto-organizzare in laboratorio, a partire da frammenti di tessuto prelevati dall'organismo e contenenti cellule staminali.

Un 'tumoroide' o 'organoide tumorale' è qualcosa di analogo, ma deriva da campioni di tessuto tumorale prelevati da un paziente oncologico durante l'asportazione chirurgica del tumore o durante una biopsia. Organoidi e organoidi tumorali rappresentano sistemi in vitro che rispecchiano e ricapitolano l'organizzazione spaziale e le modalità di differenziamento che il tessuto d'origine ha in vivo.

Questi sistemi, poiché contengono una popolazione attiva di cellule staminali (normali o tumorali), possono essere propagati ed espansi enormemente, permettendo così una vasta gamma di ricerche.

Coltivare organoidi

Le specifiche per lo sviluppo di organoidi variano da tessuto a tessuto. Per ottenere questi sistemi, infatti, è essenziale lavorare in condizioni di coltura che mimino le informazioni necessarie alle cellule per organizzarsi in tessuto. Inoltre, è importante riprodurre i segnali fondamentali per il mantenimento delle cellule staminali. Solo in presenza di queste condizioni, le cellule sono in grado di proliferare in coltura e di auto-organizzarsi in strutture 3D che possono essere propagate e mantenute per un tempo indefinito.

La ricerca scientifica in questo ambito ha portato alla definizione delle condizioni di coltura per lo sviluppo di organoidi da una varietà di organi umani, in condizioni sia normali sia di malattia.

I partner del progetto PreCanMed lavorano in sinergia per integrare le conoscenze generate finora, per farle avanzare e per crearne di nuove, al fine di sviluppare organoidi tumorali derivati da pazienti con tumori al seno, al polmone e al colon e con mesotelioma. Campioni da questo tipo di tumori verranno prelevati durante gli interventi chirurgici o le biopsie e saranno processati con diversi metodi, al fine di stabilire le condizioni migliori per garantire la crescita e l'espansione degli organoidi.

Supersistemi modello

Gli organoidi tumorali da paziente rappresentano modelli pre-clinici relativamente nuovi nello studio delle malattie tumorali.

Altri sistemi più comuni e più a lungo utilizzati in questo ambito sono le linee cellulari tumorali e i modelli animali. Questi permettono di realizzare studi approfonditi, ma entrambi non sono sufficientemente rappresentativi delle malattie neoplastiche umane, della loro eterogeneità e dei processi oncogenici che le caratterizzano.

Un'alternativa che sta emergendo è il trapianto di tessuti tumorali umani nel topo (i cosiddetti xenotrapianti tumorali da paziente). Questo modello manifesta tratti fisiologici più simili al tumore d'origine e permette di fare predizioni sulla risposta clinica del paziente alle terapie. L'efficienza di realizzazione degli impianti di tessuto tumorale, però, è bassa; la procedura è molto dispendiosa da un punto di vista economico e prevede tempi lunghi di attuazione.

Gli organoidi tumorali da paziente, invece, rappresentano uno dei sistemi più promettenti per mimare il tessuto tumorale d'origine. Ne ricapitolano, infatti, gli aspetti istologici, il sottotipo tumorale e la risposta ai trattamenti. Si possono generare e propagare con grande efficienza. Possono essere crioconservati in azoto liquido e, dopo scongelamento, possono essere nuovamente utilizzati in ricerca. Potendoli sviluppare a partire da frammenti biotici o chirurgici di tessuto sia sano sia malato, gli organoidi permettono di realizzare importanti analisi comparative dei tessuti del paziente oncologico.

Questo è ciò che PreCanMed sta realizzando.

Gli organoidi costituiscono modelli che incorporano tratti fondamentali dei tumori da cui originano. In PreCanMed, ogni organoide verrà caratterizzato da un punto di vista molecolare utilizzando diverse tecnologie omiche. Inoltre, verrà sottoposto a vari trattamenti farmacologici al fine di costruire un database di informazi-

**Profili molecolari e di
sensibilità ai farmaci**

oni che permetterà di associare particolari profili di espressione dei geni alla risposta ai farmaci.

Le analisi molecolari

I partner del progetto PreCanMed concentreranno le proprie analisi su quella parte del genoma tumorale che contiene le informazioni necessarie alla sintesi delle proteine.

Il metodo del sequenziamento dell'intero corredo di esoni verrà utilizzato con l'obiettivo di rilevare la presenza di varianti del DNA genico in grado di influenzare la progressione della malattia e la risposta alle terapie.

I dati genomici degli organoidi verranno confrontati con i rispettivi profili di espressione genica, ottenuti tramite la tecnologia dei microarray a DNA.

Impronte genetiche e firme molecolari di espressione genica, infine, verranno messe in relazione ai dati clinici dei pazienti.

Farmaci candidati

L'analisi bioinformatica dell'impronta genetica degli organoidi tumorali può portare all'identificazione di particolari vie molecolari coinvolte in aspetti specifici della malattia. Proprio per questo motivo, le vie molecolari individuate potrebbero rappresentare nuovi talloni d'Achille del tumore e, quindi, potenziali bersagli di strategie terapeutiche disegnate sulla base delle caratteristiche molecolari del paziente.

Per ogni organoide tumorale, i partner del progetto PreCanMed identificheranno, prima in silico sulla base delle analisi bioinformatiche, una serie di farmaci potenzialmente efficaci. Poi, verrà testata l'effettiva capacità di questi farmaci di limitare la crescita dell'organoide tumorale.

La Biobanca

Uno degli obiettivi principali di PreCanMed è la creazione di una biobanca di organoidi tumorali da paziente. La nostra biobanca è il frutto dello sforzo congiunto di clinici, oncologi, esperti di analisi omiche e nuove tecnologie e bioinformatici, impegnati nell'armonizzazione e nella standardizzazione delle procedure di raccolta, processamento, conservazione e analisi degli organoidi tumorali.

I campioni collezionati

I campioni tumorali raccolti provengono da pazienti reclutati nello studio osservazionale di PreCanMed, dopo aver ottenuto il loro consenso informato e sulla base di specifici criteri di inclusione.

La collezione comprende frammenti di tessuto malato e di tessuto sano corrispondente, prelevati durante il trattamento chirurgico di pazienti con tumori al seno, ai polmoni e al colon e con mesotelioma.

Set di dati anonimizzati associati ai campioni

La biobanca di PreCanMed colleziona tre diverse categorie di dati relativi agli organoidi derivati da pazienti oncologici:

- i dati clinici dei pazienti contenenti informazioni sulla diagnosi, sulle analisi molecolari e istopatologiche effettuate, sulle terapie farmacologiche prescritte o su altri interventi ai quali i pazienti si sono sottoposti, e sulla loro risposta ai trattamenti;
- i dati genomici degli organoidi derivati dai pazienti;
- i profili di espressione genica degli organoidi derivati dai pazienti.

I dati clinici collezionati da PreCanMed sono in forma criptata, in modo da tutelare l'identità e la privacy del paziente.

Ogni organoide tumorale rappresenta un modello personale e dinamico della malattia e consente di condurre indagini che prima era impossibile realizzare a livello di singolo paziente. Ogni singolo organoide tumorale, infatti, permette:

- di caratterizzare tratti molecolari specifici,
- di testare chemioterapici e farmaci mirati e di effettuare screening di composti (possono essere testati combinazioni di più farmaci e/o dosaggi diversi),
- di identificare farmaci ad azione anti-tumorale specifica in un particolare tipo di tumore e di caratterizzarne il meccanismo d'azione,
- di identificare nuovi bersagli terapeutici e biomarcatori che permettono di seguire la progressione della malattia e la risposta alle terapie,
- di predire la risposta clinica ai trattamenti.

Grazie anche al contributo di PreCanMed, l'impiego di questa tecnologia, in ultima analisi, accelererà lo sviluppo di approcci terapeutici personalizzati.

Verso la
personalizzazione
delle terapie



Il team di progetto



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



CONSORZIO
INTERUNIVERSITARIO
BIOTECNOLOGIE

LNCIB

Consorzio Interuniversitario per le Biotecnologie – Laboratorio Nazionale CIB

Trieste, Italia -

Coordinatore della ricerca

Il Consorzio Interuniversitario per le Biotecnologie - Laboratorio Nazionale CIB (LNCIB) nasce nel 1992 come istituto dedicato allo studio dei meccanismi biologici di formazione e sviluppo dei tumori, e si insedia a Padriciano all'interno del parco scientifico e tecnologico Area Science Park di Trieste.

Competitivo e internazionalmente riconosciuto, LNCIB si configura come un importante Centro di Eccellenza nel campo delle Biotecnologie ed ha ricevuto dalla Regione Friuli Venezia Giulia la certificazione di "Laboratorio Altamente Qualificato per la Ricerca Applicata e per la Genomica Funzionale dei Tumori".

La missione del centro è trasferire alla pratica clinica le conoscenze acquisite con la ricerca di base sui tumori.

LNCIB, però, è anche un centro di formazione e da anni si occupa di preparare le nuove generazioni di ricercatori e di personale tecnico sui temi della biologia del cancro. Ogni anno, LNCIB segue numerosi studenti di Dottorato e fornisce la possibilità di realizzare percorsi sperimentali a studenti dei Corsi di Laurea Magistrale. Inoltre, LNCIB rappresenta un centro di riferimento per il Friuli Venezia Giulia, per lo sviluppo di nuove tecnologie abilitanti per la ricerca sul cancro.

Nell'Istituto si realizza una ricerca scientifica di alto livello nel campo dell'oncologia molecolare grazie al profilo dei suoi ricercatori, alle sinergie messe in atto e alla stretta collaborazione con Università e Istituzioni di Ricerca regionali, nazionali e internazionali.

Su una superficie di oltre 300 metri quadrati di laboratori at-

trezzati, oltre 45 ricercatori di diversa provenienza nazionale e internazionale lavorano presso LNCIB, suddivisi in 5 unità operative e impegnati in 12 diversi programmi di ricerca.

Le linee di ricerca di LNCIB sono tutte dedicate allo studio dei processi biologici che caratterizzano la cellula tumorale. Lo scopo ultimo delle ricerche è sviluppare conoscenze dettagliate dei meccanismi molecolari alla base dell'insorgenza del cancro e della progressione maligna, in modo da individuare possibili "talloni di Achille" della malattia.

Le unità operative impegnate in questo sono:

- l'Unità di Genomica Funzionale,
- l'Unità di Oncologia Molecolare,
- l'Unità di Differenziamento e Oncogenesi,
- l'Unità di Onco-Epigenetica,
- l'Unità di Stabilità Genomica.

Le diverse unità svolgono la propria attività di ricerca grazie a finanziamenti dall'Associazione Italiana per la Ricerca sul Cancro (AIRC), da Telethon, dalla Commissione Europea, dal Ministero Italiano dell'Istruzione, dell'Università e della Ricerca e dalla Regione Friuli Venezia Giulia e da donazioni e fondazioni private.

Il Consorzio Interuniversitario per le Biotecnologie - Laboratorio Nazionale CIB coordina il progetto 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, Italia

L'Università di Trieste (UNITS) è un'università a elevata intensità di ricerca. Conta più di 650 docenti e ricercatori di ruolo e oltre 17000 studenti iscritti ai corsi di laurea, di laurea magistrale e medicina. Ha 10 Dipartimenti, che ricoprono tre principali aree disciplinari: i) le Scienze della Vita e la Salute, ii) le Scienze Sociali e Umanistiche e iii) la Matematica, le Scienze Fisiche, la Chimica, l'Ingegneria e le Scienze della Terra.

Nella classifica delle migliori università italiane, UNITS occupa il quinto posto (U.S. News – Best Global Universities Ranking 2017).

UNITS è una realtà immersa in un ambiente dinamico, fortemente internazionale e high-tech, che comprende anche diverse istituzioni di ricerca locali.

Due sono i dipartimenti di UNITS coinvolti in PreCanMed: il Dipartimento di Scienze della Vita e quello di Scienze Mediche e Chirurgiche e della Salute.

Il Dipartimento di Scienze della Vita (DSV) ha uno staff di 80 docenti di ruolo e circa 200 membri non permanenti. Gli interessi del DSV ricoprono ambiti diversi, che vanno dalla Biomedicina, alla Biologia Ambientale, alla Psicologia e alle Scienze Cognitive. In particolare, il DSV svolge un'intensa attività di ricerca nell'ambito della Biomedicina, nei settori della biochimica del metabolismo, della farmacologia, dell'oncologia molecolare, dei materiali per la bioingegneria dei tessuti, delle malattie neurodegenerative e della farmacogenomica. Il DSV ha una consolidata esperienza nell'attrarre, coordinare e gestire finanziamenti europei e da altri enti finanziatori. Nell'ultimo quadriennio ha partecipato a 14 progetti finanziati o co-finanziati dall'UE, ricoprendo ruoli da coordinatore o partner.

Il Dipartimento di Scienze Mediche e Chirurgiche e della Salute (DSM) svolge funzioni relative alla ricerca scientifica e alle attività formative e assistenziali in diversi ambiti della medicina, promuovendo la massima integrazione tra le discipline. Il DSM conta complessivamente 13 professori ordinari, 41 professori associati, 38 ricercatori e 54 unità di personale tecnico-amministrativo, 47 assegnisti di ricerca e 46 dottorandi di ricerca. Articola le proprie attività su 3 Poli: l'Ospedale di Cattinara, l'Ospedale Maggiore, l'IRCCS Burlo Garofolo.

Le linee di ricerca del DSM coprono lo spettro che va dalla ricerca di base a quella clinica. Le più importanti indagano i meccanismi molecolari, di biologia cellulare e genetici coinvolti nella fisiopatologia e nella patogenesi di un ampio spettro di malattie. Molte comprendono la genetica di popolazione, la biologia molecolare, le colture cellulari, la medicina rigenerativa, le biobanche, i modelli sperimentali di patologia, e sono orientate allo sviluppo di terapie innovative bersaglio-specifiche. In particolare, presso il DSM sono presenti competenze e know-how dedicati alla diagnosi molecolare della patologia tumorale utilizzando piattaforme tecnologiche di ultima generazione. Il DSM ha accesso in convenzione istituzionale a un centro per la realizzazione di studi clinici di Fase I dedicato allo sviluppo di nuovi farmaci nell'ambito dei tumori solidi. Inoltre, ha un'area oncologica e personale dedicato per studi clinici di Fase II e Fase III sempre nell'ambito della neoplasia solida.

I due dipartimenti, di Scienze della Vita e di Scienze Mediche e Chirurgiche e della Salute, hanno ottenuto dal Ministero Italiano dell'Istruzione dell'Università e della Ricerca (MIUR) il riconoscimento di Dipartimenti di Eccellenza. Essi collaborano con diversi istituti di ricerca e scienziati a livello locale, nazionale e internazionale.



Team UNITS

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



**UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
DI UDINE**
hic sunt futura

UNIUD

Università degli studi di Udine

Udine, Italia

L'Università di Udine (UNIUD) è stata fondata nel 1978 nell'ambito di un piano di ricostruzione messo in atto dopo il sisma che nel 1976 colpì Friuli. Lo scopo, allora, era dotare la comunità friulana di una propria università per l'istruzione superiore nelle materie umanistiche e scientifiche.

UNIUD, oggi, è al quinto posto nella classifica delle università italiane elaborata da Censis per gli atenei medi (indagine Censis 2017/2018).

La missione di UNIUD si riassume in quattro punti principali:

- istruzione superiore,
- ricerca e trasferimento tecnologico,
- sinergia con le comunità locali,
- internazionalizzazione.

Queste aree, che rappresentano i principali ambiti di interesse di UNIUD, sono tutte interconnesse tra loro, favorendo così il mutuo scambio di conoscenze, esperienze e progetti.

L'offerta formativa di UNIUD per l'anno accademico 2016/2017 prevede: 36 corsi di laurea triennale e 36 corsi di laurea magistrale. Inoltre, UNIUD offre tutta una serie di programmi post-laurea con lezioni frontali e percorsi di ricerca: scuole di specializzazione (31), master universitari (15) e dottorati (15). Accanto ai suoi 650 docenti e ricercatori, UniUD conta 15.385 studenti.

La Ricerca Scientifica di UNIUD è sviluppata e coordinata da 8 Dipartimenti ed 9 Centri di Ricerca ed è supportata da un ufficio amministrativo centralizzato.

La città e l'università di Udine sono un riferimento nell'ambito di una regione che storicamente rappresenta il crocevia di mondi e culture differenti. Geograficamente situata al centro dell'Unione Europea, UNIUD è molto attiva nel creare network e relazioni e aperta alla condivisione di idee e conoscenze. Sin dalla sua nascita, UNIUD ha perseguito una politica di internalizzazione, volta a formare studenti, creare relazioni e forgiare intese con università e istituzioni, nel panorama europeo e internazionale.

A oggi, numerosi progetti europei hanno visto UNIUD come partner: 19 nell'ambito del programma di finanziamenti HORIZON 2020, 39 nell'ambito del 7th programma quadro. Inoltre, ha preso parte a 20 progetti collaborativi internazionali (coordinandone 7) e 47 progetti interreg (coordinandone 5).

Le collaborazioni di UNIUD non si estendono solo all'Europa, ma da lungo tempo anche all'Africa, all'India e alla Cina.

UNIUD ha forti legami anche con l'Ospedale Universitario di Udine.

UNIUD può contare su personale qualificato nei settori amministrativo, economico, legale e della pianificazione strategica.

Le attività tecniche e scientifiche sono tutte sviluppate con il supporto dell'ufficio ricerca e trasferimento tecnologico, che gestisce progetti complessi, si occupa della protezione della proprietà intellettuale e del trasferimento dei risultati della ricerca a livello locale. L'ufficio si avvale di un team di 13 persone con una lunga esperienza nel coordinamento e nella pianificazione di progetti.

Frutto dell'attività di trasferimento tecnologico di UNIUD sono:

- 57.357 pubblicazioni,
- 100 brevetti (di cui 46 commercializzati)
- 8 spin off,
- 23 start up.

A maggio 2016 UNIUD ha ufficialmente ricevuto dalla Commissione Europea il premio HR Excellence in Research.



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, Austria

Nato nel 2012 come iniziativa imprenditoriale di ricerca dell'Università di Innsbruck (LFU), ADSI offre diversi servizi di ricerca al mondo dell'impresa e dell'accademia nell'ambito dello sviluppo di nuovi farmaci, nel settore fitofarmaceutico, in quello degli integratori alimentari, dei fitocosmetici e della nutrizione.

A dare il via ad ADSI sono stati il Prof. Dott. Günther K. Bonn, chimico analito e Direttore dell'Istituto di Chimica Analitica e Radiochimica dell'Università di Innsbruck, e il Prof. Dott. Lukas A. Huber, biologo cellulare e medico a capo della Divisione di Biologia Cellulare dell'Università Medica di Innsbruck.

A loro è affidata la direzione scientifica di questa impresa, che si contraddistingue per il modo originale con cui combina biologia della cellula e chimica analitica.

La divisione di biologia si occupa di disegnare saggi analitici di grande rilevanza clinica perché basati su sistemi cellulari in grado di imitare il comportamento dei tessuti umani. La divisione analitica, invece, riesce ad analizzare e misurare una vasta gamma di parametri biologici da una varietà di materiali di partenza, siano essi di origine vegetale o animale, al fine di estrarre dalle piante sostanze potenzialmente attive o per indagare nei sovrantanti cellulari i cambiamenti nella regolazione delle citochine. La divisione di bioinformatica di ADSI, infine, è specializzata nell'integrare i complessi risultati di saggi e misurazioni e nell'analizzare i diversi set di dati.

I servizi per la ricerca sviluppati da ADSI sono alla base di tre principali attività strategiche:

1. screening e sviluppo di prodotti,

2. studio dei meccanismi d'azione e conferma dei requisiti dei prodotti cosmetici,
3. analisi di controllo qualità per le industrie del settore dei supplementi nutrizionali e degli integratori alimentari.

ADSI ha circa 25 dipendenti e il suo personale è costituito principalmente da scienziati altamente qualificati.

L'Istituto è dotato di un'infrastruttura tecnologica all'avanguardia e, ben integrato nel panorama austriaco della ricerca, lavora a stretto contatto con numerose università e centri di ricerca e con diversi partner industriali, in Austria e oltre i confini nazionali.

ADSI è finanziato principalmente dallo Stato Austriaco e dal Tirolo, ma sono significativi anche i proventi dei contratti di ricerca.



Team ADSI

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



MEDIZINISCHE
UNIVERSITÄT
INNSBRUCK

MUI

Medizinische Universität Innsbruck

Innsbruck, Austria

L'Università di Medicina di Innsbruck (MUI) è un'università pubblica, nata nel 2004 da una delle quattro facoltà storiche dell'Università Leopoldo-Francesco di Innsbruck. MUI rappresenta una delle più grandi scuole di medicina del paese e la più importante dell'Austria occidentale. Collabora strettamente con le Cliniche Tirolesi, e l'Ospedale Universitario, con i suoi 1600 posti letto, è uno dei più grandi del paese.

MUI conta circa 1800 dipendenti e oltre 3000 studenti. Offre 9 programmi di dottorato, ai quali sono iscritti circa 300 studenti, e un programma part-time, il PhD clinico, che si rivolge in particolare ai laureati in Medicina e Odontoiatria.

Come per ogni altra università, una delle principali attività è la ricerca, nella quale MUI raggiunge risultati eccellenti sia con i dipartimenti che svolgono ricerca teorica sia con quelli clinici. MUI offre ai ricercatori un ambiente stimolante, dove svolgere una ricerca competitiva che attrae finanziamenti sia nazionali sia internazionali. I ricercatori MUI sono coinvolti in diversi progetti cooperativi.

Gli ambiti della ricerca che si realizza alla MUI sono vari, ma l'attività si concentra principalmente su:

- Oncologia
- Neuroscienze
- Genetica, Epigenetica e Genomica
- Infettivologia, Immunologia e Trapianti di organi e tessuti.

La vicinanza, non solo di obiettivi ma anche fisica, della MUI all'Ospedale Universitario e ad altri istituti accademici e di ricer-

ca, come ADSI e Oncotyrol, catalizza sinergie virtuose e semplifica la condivisione di risorse.

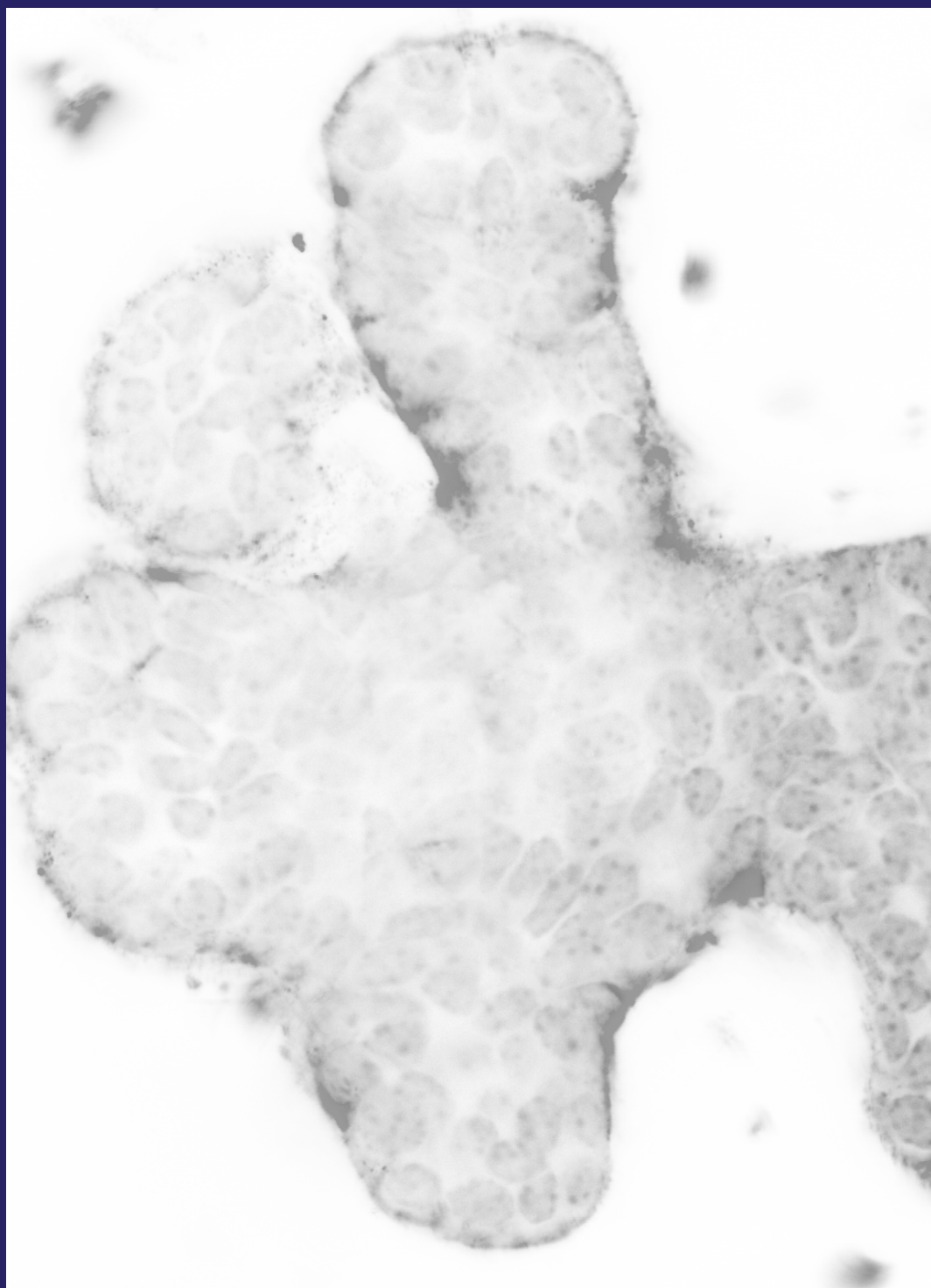
Nel 2016, in partnership con le Cliniche Tirolesi, MUI ha fondato un centro interamente dedicato al cancro, il Comprehensive Cancer Center Innsbruck (CCCI).

CCCI è un centro d'eccellenza dotato delle più moderne tecnologie per la ricerca sul cancro. La sua missione è avvicinare la ricerca interdisciplinare e la pratica clinica e accelerare il trasferimento e la trasformazione delle conoscenze in nuovi trattamenti clinici, nuova ricerca e percorsi formativi.

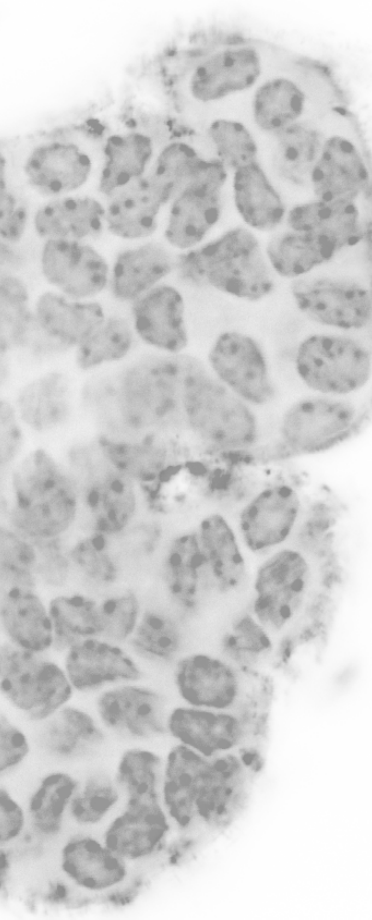


Team MUI

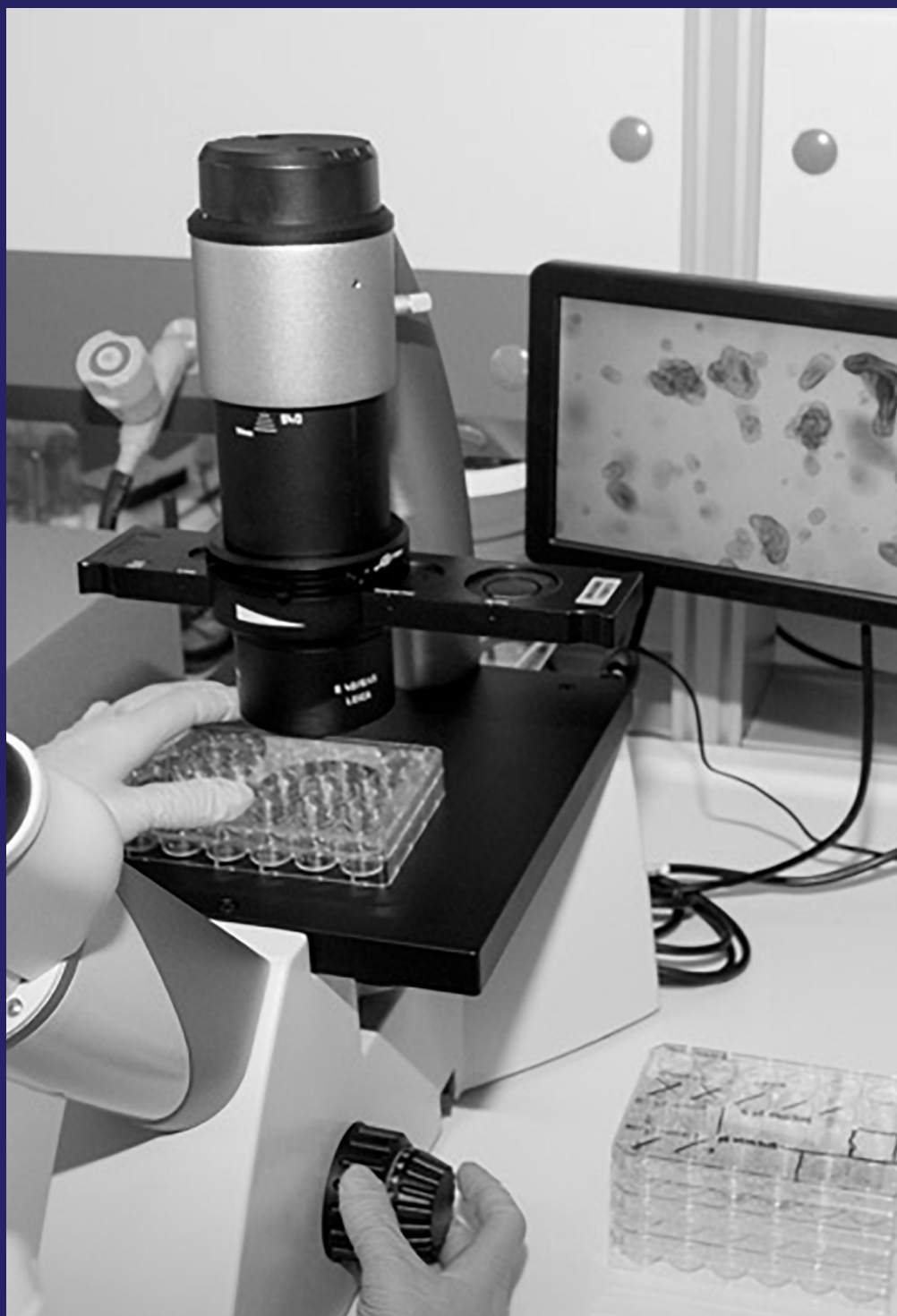
*Prof. Lukas Huber
Prof. Heinz Zwierzina
Dr. Arno Amann
Dr. Afschin Soleiman
Dr. Stefan Scheidl
Edith Lorenz*



Introduzione



La medicina personalizzata è una strategia medica volta alla prevenzione, diagnosi e cura di patologie umane che si basa sulle caratteristiche cliniche, genetiche e fenotipiche (ambiente e stili di vita) del singolo individuo. L'obiettivo del progetto PreCanMed è stato quello di definire una procedura per la generazione di organoidi tumorali derivanti da paziente come modello per la medicina di precisione in ambito oncologico. Il presente manuale tecnico contiene sia le procedure eseguite per l'approvazione bioetica di questo progetto sia i protocolli tecnici utilizzati. In particolare, sono presenti le procedure per la preparazione dei campioni biologici, per la generazione e crioconservazione di colture organotipiche, per la loro analisi genetica attraverso sequenziamento dell'RNA e del DNA, per l'identificazione di bersagli terapeutici attraverso analisi bioinformatiche, così come metodi per studiare l'effetto di farmaci anti-tumorali sulle colture organotipiche.



1. Approvazione etica del progetto PreCanMed

La generazione e la crioconservazione di materiale derivante da pazienti, così come la conservazione di dati genomici, solleva importanti problematiche riguardanti la bioetica e la privacy del paziente. Una fase importante del progetto è stata quella di ottenere l'approvazione per lo svolgimento di questo studio osservazionale da parte dei comitati etici regionali. Le procedure approvate hanno previsto che il materiale biologico fosse ottenuto e utilizzato solo in seguito a consenso informato da parte del paziente e hanno inoltre definito norme per la conservazione dei campioni biologici e dei dati ad essi associati. Secondo queste procedure, i campioni biologici sono stati propriamente conservati e identificati attraverso l'utilizzo di un sistema di riconoscimento con codice a barre che ha permesso di proteggere l'identità del donatore. La documentazione riguardante il consenso informato da parte del paziente ha permesso di utilizzare il materiale biologico raccolto per la ricerca senza scopo di lucro, ha regolato l'utilizzo dei dati genomici e di quelli protetti da privacy, ha specificato il periodo per il quale il materiale bio-

logico può essere conservato e ha permesso inoltre al paziente di poter ritirare il consenso in qualsiasi momento. I pazienti hanno ricevuto informazioni dettagliate sullo studio osservazionale dal medico curante.

- Approvazione dello studio per i partners del progetto Medizinische Universität Innsbruck (**MUI**) e Austrian Drug Screening Institute (**ADSI**): AN2014-0282 341/4.20 342/4.3; Titolo dello studio: *"Entwicklung eines Zytotoxizitätsassays mit primären Zellen aus Operationsmaterial/Biopsien und malignen Ergüssen in einem neuen 3D Zellkultursystem"*
- Approvazione dello studio per il partner del progetto Università degli Studi di Udine (**UNIUD**): Numero di registrazione CEUR-2017-PR-048-UNIUD; Titolo dello studio: *"Sviluppo di metodologie e protocolli per l'isolamento ed il mantenimento di organoidi da campioni di tumore del colon umano"*
- Approvazione dello studio per i partners del progetto Consorzio Interuniversitario per le Biotecnologie, Laboratorio Nazionale (**LNCIB**) e Università degli Studi di Trieste (**UNITS**): Studio Protocollo n.62/2017; Titolo dello studio: *"Sviluppo di metodologie e protocolli per l'isolamento di organoidi da campioni umani di tumore del polmone, mesotelio, mammella"*

Informazioni dettagliate riguardanti le approvazioni da parte del comitato etico per ogni partner possono essere trovate sul sito web del progetto PreCanMed (www.precanmed.eu).





2. Metodi di comunicazione attuati per la gestione del trasferimento del materiale biologico dalle strutture ospedaliere ai laboratori di ricerca

Il trasferimento del materiale chirurgico dalla sala operatoria ai laboratori di ricerca è stato una fase critica per una efficiente generazione di colture organotipiche. Sono stati quindi stabiliti specifici canali di comunicazione compatibili con la routine ospedaliera:

- I Partners di Progetto (PPs) MUI/ADSI hanno assicurato il rapido processamento del materiale biologico grazie alla presenza di personale responsabile della comunicazione e del trasporto dei campioni dall'ospedale al laboratorio di ricerca.
- I PPs LNCIB/UNITS hanno utilizzato un gruppo whatsapp per informare il personale coinvolto sulla programmazione degli interventi chirurgici e per ottimizzare il trasferimento del materiale biologico.
- I chirurghi che hanno collaborato con il PP UNIUD hanno comunicato le tempistiche per il trasferimento del materiale biologico attraverso la comunicazione telefonica.



3. Selezione del materiale biologico per la generazione di organoidi da tessuto normale e tumorale

In seguito al trasferimento del materiale chirurgico presso l'unità di anatomia patologica, i patologi hanno selezionato le regioni di tessuto normale e tumorale sia per eseguire la diagnosi sia per selezionare il materiale biologico destinato alla ricerca. Mediante il raschiamento del tessuto tumorale i patologi hanno ottenuto immediatamente un campione citologico che ha rivelato importanti informazioni riguardanti la qualità e la quantità del tessuto e la morfologia delle cellule tumorali. Durante lo svolgimento del progetto si è stabilito che la dimensione del campione tumorale destinato alla generazione di organoidi dovesse essere compresa tra $0,4\text{-}1\text{cm}^3$, per questo motivo piccole lesioni tumorali non sono state incluse in questo studio. Il campione biologico di tessuto normale è stato ottenuto da regioni di materiale chirurgico prive di lesioni tumorali, la cui morfologia è stata controllata dai patologi. Durante il trasporto ai laboratori di ricerca, i tessuti normali e tumorali sono stati conservati in mezzo di coltura

contenente alte concentrazioni di antibiotici, condizione particolarmente importante per i tessuti provenienti da colon-retto e da polmone che fisiologicamente sono in contatto con batteri e funghi. La conservazione dei tessuti in questo mezzo di coltura per 1-6 ore non ne ha condizionato la vitalità cellulare, ma il tempo che intercorre tra l'intervento chirurgico e la conservazione del tessuto nel mezzo di coltura dovrebbe essere limitato a 25 minuti (**Tabella 1**). Si è inoltre evidenziato che i fattori che influenzano negativamente la generazione di colture organotipiche sono: i) conservazione del tessuto a temperatura ambiente per periodi prolungati, ii) contaminazioni batteriche e fungine e iii) limitata disponibilità di tessuto.

Per questo progetto, delle sezioni di tessuto normale e di lesione tumorale conservate in paraffina sono state riservate per la caratterizzazione mediante analisi immunoistochimica e del DNA.

Tabella 1: Riassunto delle procedure utilizzate per la selezione, la conservazione e il trasporto dei campioni biologici per ogni PP del progetto PreCanMed. Visita il sito www.precanmed.eu per la consultazione dei SOPs.

Procedure post intervento chirurgico	Tessuto mammario (UniTS)	Tessuto polmonare (LNCIB)	Tessuto colorettale (MUI, ADSI, UniUD)
Trasporto dalla sala chirurgica all'unità di anatomia patologica	max. 10 minuti	max. 10 minuti	max. 15 minuti
Selezione dei campioni destinati alla ricerca	max. 10 minuti	max. 10 minuti	max. 10 minuti
Conservazione dei campioni biologici	max. 6 ore senza alterare la qualità del tessuto (4°C)	max. 3 ore senza alterare la qualità del tessuto (4°C)	max. 1 ora senza alterare la qualità del tessuto (4°C)
Trasporto ai laboratori di ricerca	15 minuti	15 minuti	5-15 minuti
Mezzo di coltura per la conservazione dei campioni	Mezzo di coltura + antibiotici	Mezzo di coltura + antibiotici	0.9% NaCl





4.

Processamento dei tessuti per la generazione di organoidi

I tessuti, sia normali che tumorali, sono ricchi di matrice extracellulare contenente fibre reticolari, elastiche e di collagene, le quali vanno digerite al fine di estrarre le cellule dal tessuto. L'estrazione di cellule epiteliali vitali dalla matrice ha rappresentato una fase cruciale per la generazione della coltura organotipica. I PPs hanno eseguito un processamento meccanico al fine di ottenere frammenti di tessuto di dimensioni di 1-3mm³, seguito da una digestione enzimatica di 1-2 ore utilizzando l'enzima collagenasi (**Tabella 2: Figura 1**). È stato notato che l'incubazione prolungata con la collagenasi, o l'utilizzo di altre proteasi, influenza negativamente la vitalità cellulare. In seguito a digestione enzimatica, le cellule sono state separate da eventuali residui di tessuto, utilizzando appositi filtri, e in seguito sono state miscelate con una matrice (Matrigel) che mima la matrice extracellulare del tessuto.

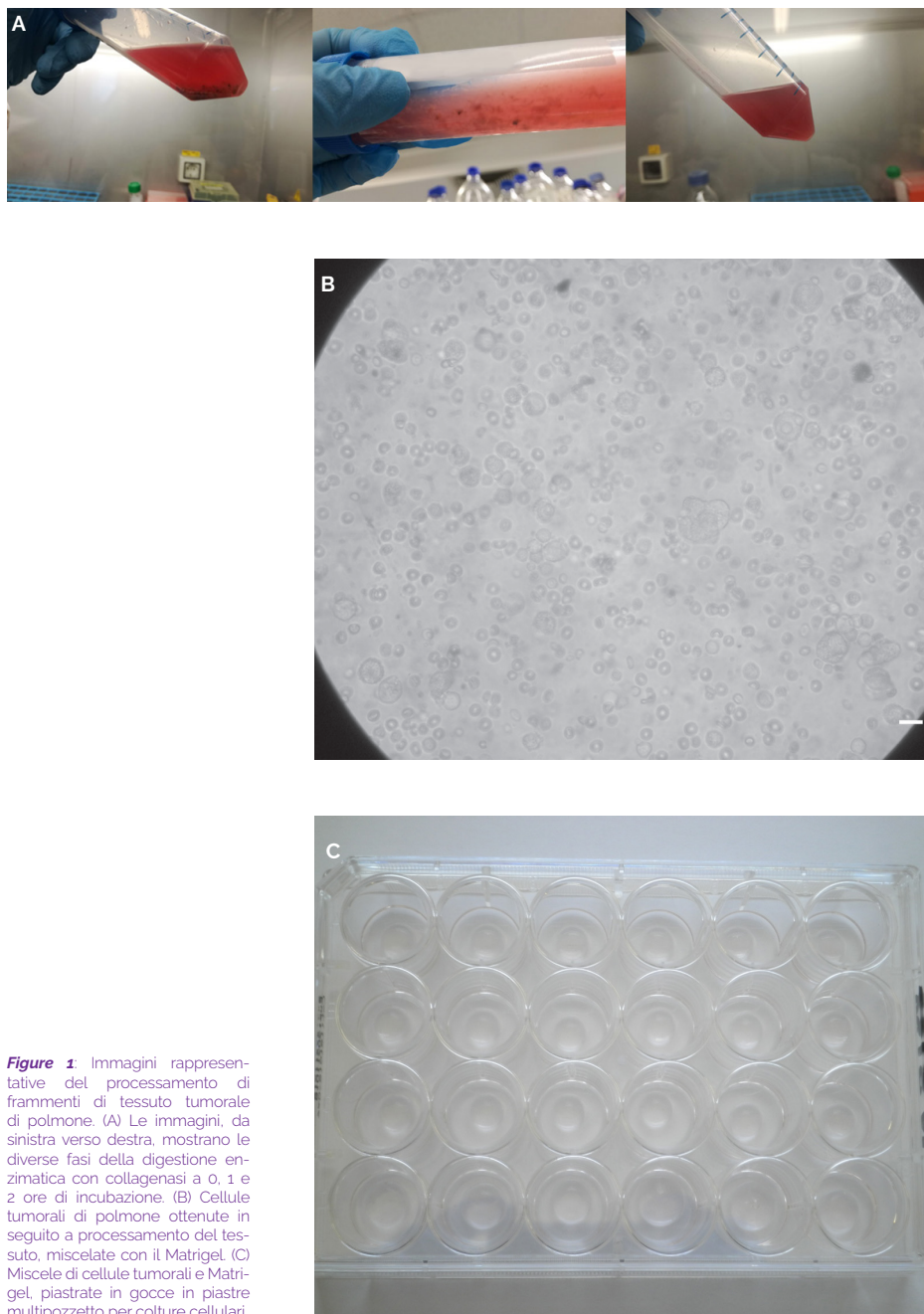


Figure 1: Immagini rappresentative del processingo di frammenti di tessuto tumorale di polmone. (A) Le immagini, da sinistra verso destra, mostrano le diverse fasi della digestione enzimatica con collagenasi a 0, 1 e 2 ore di incubazione. (B) Cellule tumorali di polmone ottenute in seguito a processingo del tessuto, miscelate con il Matrigel. (C) Miscela di cellule tumorali e Matrigel, piastrate in gocce in piastre multipozzetto per colture cellulari.

Processamento del tessuto	Tessuto mammario (UniTS)	Tessuto polmonare (LNCIB)	Tessuto colorettale (MUI, ADSi, UniUD)
Dimensione minima del tessuto	1 cm ³	1 cm ³	<i>Tessuto tumorale:</i> > 0,4 cm ³ <i>Tessuto normale:</i> >0,5 cm ³
Processamento meccanico	<i>Tessuto normale e tumorale:</i> Bisturi, fino all'ottenimento di frammenti di ca. 1 mm ³	<i>Tessuto normale e tumorale:</i> Bisturi, fino all'ottenimento di frammenti di ca. 1 mm ³	<i>Tessuto tumorale:</i> forbici sterili; bisturi e pinze; dimensione dei frammenti ca. 1 mm ³ <i>Tessuto normale:</i> forbici sterili e bisturi; l'epitelio viene estratto dal tessuto connettivo; dimensione dei frammenti ca. 2-3 mm ³
Digestione enzimatica con collagenasi	2g di tessuto incubati con 5 ml di 1,5 mg/ml Collagenasi A, per 2 ore a 37°C in oscillazione a 200 rpm -fino all'ottenimento di gruppi di cellule separati dallo stroma; rimozione dei detriti.	3g di tessuto incubati in 10 ml di 1,5 mg/ml Collagenasi A, per 2 ore a 37°C in oscillazione a 200 rpm -fino all'ottenimento di gruppi di cellule separati dallo stroma; rimozione dei detriti.	<i>Tessuto tumorale (1g):</i> Liberasi (collagenasi I and II); 50 µg/ml (0,26 unità/ml) in 10ml per 1 ora a 37°C in oscillazione a 250 rpm; rimozione dei detriti. <i>Tessuto normale (1g):</i> 10 ml di 10mM EDTA in PBS; rimozione dei detriti.
Piastratura in Matrigel	Frazioni di cellule per ogni goccia da 50 µl di Matrigel.	300.000 cellule per ogni goccia da 30 µl di Matrigel.	<i>Tessuto tumorale:</i> 100.000 - 200.000 cellule per ogni goccia da 30 µl di Matrigel. <i>Tessuto normale:</i> 50-100 cripte per ogni goccia da 30 µl di Matrigel.

Tabella 2: Riassunto delle procedure eseguite dai PPs del progetto PreCanMed per il processamento dei tessuti. Visita il sito www.precanmed.eu per la consultazione dei SOPs.



5. Cultivation of tumor- organoids in Matrigel

La formazione di organoidi tumorali, la cui struttura ricapitola il tumore originario, necessita di particolari caratteristiche della matrice extracellulare e della presenza di specifiche molecole segnale⁴. All'inizio del progetto PreCanMed, in letteratura erano solamente disponibili protocolli per la generazione di colture organotipiche da cancro al colon-retto², al pancreas³, allo stomaco⁴ e da tessuto mammario di topo^{5,6}. Solo in seguito si sono resi disponibili protocolli per la generazione di organoidi di tumore mammario⁷ così come per organoidi di colon⁸ e polmone⁹ da tessuto normale. Per quanto riguarda la generazione di organoidi da tumore al colon-retto, i PPs MUI/ADSI/UNIUD si sono occupati di migliorare i protocolli già disponibili sviluppando una metodologia che prevede la coltivazione di organoidi parallelamente in diversi mezzi di coltura. Per quanto riguarda la generazione di organoidi da carcinomi di mammella⁵⁻⁷ e polmone¹⁰, i PPs LNCIB/UNITS si sono occupati di definire la composizione dei mezzi di coltura, basandosi su protocolli disponibili.

² Xu, H. et al. Organoid technology and applications in cancer research. *J. Hematol. Oncol.* (2018). doi:10.1186/s13045-018-0662-9

³ van de Wetering, M. et al. Prospective Derivation of a Living Organoid Biobank of Colorectal Cancer Patients. *Cell* 161, 933–945 (2015).

⁴ Boj, S. F. et al. Organoid models of human and mouse ductal pancreatic cancer. *Cell* (2015). doi:10.1016/j.cell.2014.12.021

⁵ 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 Shackleton, M. et al. Generation of a functional mammary gland from a single stem cell. *Nature* (2006). doi:10.1038/nature04372

⁶ Jamieson, P. R. et al. Derivation of a robust mouse mammary organoid system for studying tissue dynamics. *Development* (2016). doi:10.1242/dev.145045

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

⁸ 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

⁹ 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.ydbio.2016.10.002

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

5.1 Organoidi di tessuto normale e tumorale di colon-retto ■

Studi presenti in letteratura suggeriscono che il fallimento nella generazione di organoidi tumorali può essere dovuto alla presenza, nei terreni di coltura, di fattori di crescita che non permettono la generazione di organoidi derivati da tumori di pazienti con particolari alterazioni genetiche. Tale difficoltà può essere risolta usando una combinazione di fattori di crescita e/o inibitori che si adatta alle caratteristiche genetiche del tumore d'origine. Dato che il quadro completo delle alterazioni genetiche del tumore primario non era disponibile nel momento in cui sono stati generati degli organoidi, i partners ADSI/MUI/UniUD hanno coltivato organoidi tumorali di colon in terreni con diversa composizione per i) verificare se le combinazioni dei diversi fattori di crescita presenti nel terreno influenzassero la crescita di organoidi con particolari alterazioni genetiche e ii) valutare se l'utilizzo di questa strategia aumentasse l'efficienza nella generazione degli organoidi tumorali.

I PPs ADSI/MUI e UniUD hanno reclutato rispettivamente 19 e 21 pazienti per questo studio. 8 (ADSI, MUI) e 11 (UniUD) organoidi tumorali sono stati coltivati in diversi terreni di coltura per testare l'impatto di Wnt3a, EGF, l'inibitore di ALK5, l'inibitore della MAP chinasi p38 e PGE2 (ProstaglandinE2) sulla formazione degli organoidi (**Figura 2, Tabella 3**).

Tutti gli organoidi tumorali del PP UniUD (11/11) sono cresciuti in terreno completo contenente tutti i fattori di crescita/inibitori (WRENAS/terreno M6); inoltre, il 64% degli organoidi (7/11) è cresciuto in assenza di Wnt3a e solo nel 36% dei casi (4/11) la proliferazione è stata migliorata in presenza di Wnt3a (**Tabella 4**). Ciò ha suggerito che una percentuale significativa di adenocarcinomi ha una composizione genetica che conferisce indipendenza dalla via di segnalazione stimolata da Wnt3a. Tuttavia, il tessuto tumorale può contenere cellule che sono dipendenti o indipendenti dalla presenza Wnt3a, ma solo le cellule tumorali indipendenti da Wnt3a danno origine ad organoidi in terreno privo di questo fattore di crescita (RENAS) (**Tabella 4**). Questa ipotesi "policlonale" delle popolazioni cellulari che compongono gli organoidi tumorali ha un impatto importante per lo sviluppo di approcci terapeutici; questa ipotesi potrà essere confermata dai dati generati dal sequenziamento del DNA di organoidi tumorali cresciuti in terreno WRENAS o RENAS.

Il lavoro svolto da ADSI/MUI ha fornito ulteriori dettagli per l'identificazione della combinazione dei diversi fattori di crescita/inibitori necessari per la crescita degli organoidi tumorali, dimostrando che 5 su 8 organoidi tumorali necessitano di combinazioni di fattori di crescita specifici. Degli 8 carcinomi colorettali processati, 5 hanno prodotto organoidi tumorali solo in seguito

ad aggiunta dell'inibitore di ALK5 (TPIO-16, -17, -18, -19 - 21). È interessante notare che quando l'inibitore di ALK5 non è stato sufficiente per sostenere la coltura degli organoidi tumorali, l'aggiunta di EGF e dell'inibitore della MAP chinasi p38 ha supportato la formazione di organoidi tumorali (TPIO-20, - 22, -23; **Tabella 5**). I risultati dimostrano quindi che la proliferazione di organoidi tumorali può essere sostenuta da un ristretto numero fattori di crescita/inibitori. Da questo si può dedurre che l'aggiunta di componenti non essenziali al terreno di crescita può innescare alterazioni nelle cellule tumorali o promuovere l'espansione di specifiche popolazioni cellulari tumorali. Questo aspetto è da tenere in considerazione nel momento in cui vengono identificate terapie specifiche per un paziente utilizzando come modello gli organoidi.

In linea con i dati del PP UniUD, Wnt3a ha avuto un effetto positivo sulla proliferazione degli organoidi tumorali in solo 3 su 8 colture di organoidi (37.5%).

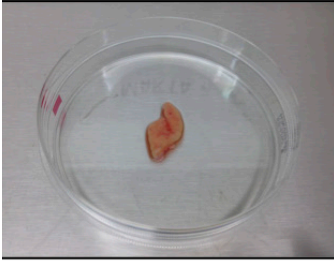
Sia per ADSI/MUI sia per UniUD gli organoidi derivanti dal tessuto normale sono stati generati in tutti i casi processati (WRENAS/terreno M6).

L'utilizzo di una strategia che prevede la coltivazione degli organoidi tumorali in diversi terreni di coltura aumenta però il carico di lavoro e i costi derivanti dall'utilizzo dei reagenti. Per superare queste problematiche, è stato utilizzato un saggio che misura l'attività metabolica degli organoidi (RealTime-Glo™ MT Cell Viability Assay, PROMEGA) come metodo per analizzare in maniera precisa e rapida la vitalità cellulare nelle diverse condizioni di crescita. Ciò ha permesso di identificare la composizione del terreno ideale misurando la vitalità cellulare in un finestra temporale di 24-48 ore dopo la semina (**Figura 3, Figura 4**).

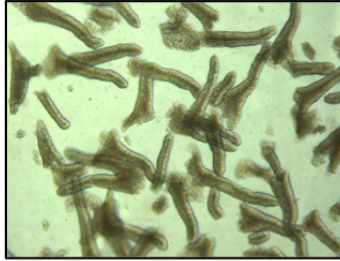
Questi risultati hanno dimostrato che l'approccio eseguito è determinante per la generazione di colture di organoidi tumorali in terreni contenenti i soli fattori essenziali alla crescita, a prescindere dalla conoscenza del profilo genetico del tumore primario.

day 0

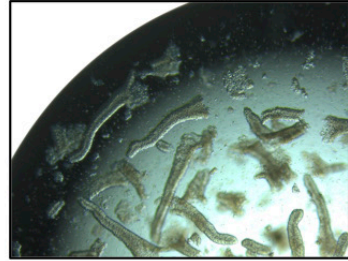
normal tissue



isolated crypts

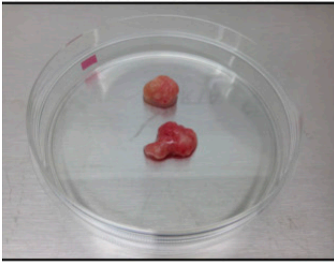


embedded crypts
in Matrigel

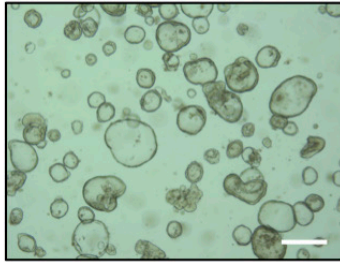


day 7, p1

tumor tissue



+ Wnt3a



- Wnt3a

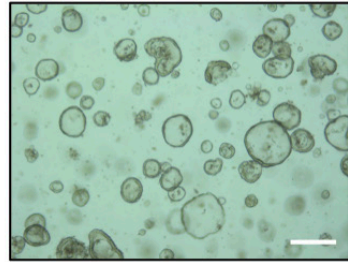
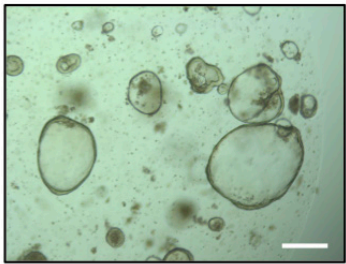


Figura 2. Colture di organoidi derivanti da tessuto normale (pannelli superiori) e da tessuto canceroso coloretale (pannelli inferiori) ottenute dallo stesso paziente. Il tessuto tumorale ha portato alla formazione di organoidi in presenza ed in assenza di Wnt3a. Visita il sito www.precanmed.eu per la consultazione dei SOPs.

day 7, p1



	ADSI/MUI	ADSI/MUI	ADSI/MUI	ADSI/MUI	ADSI/MUI e UniUD	UniUD
Composizione dei terreni	Terreno M2	Terreno M3	Terreno M4	Terreno M5	Terreno M6 o Terreno 'WRENAS'	Terreno 'RENAS'
Terreno di coltura base	x	x	x	x	x	x
Mezzo di coltura condizionato con R-Spondin	x	x	x	x	x	x
Mezzo di coltura condizionato con Noggin	x	x	x	x	x	x
Nicotinammide	x	x	x	x	x	x
N-acetilcisteina	x	x	x	x	x	x
B27 supplemento	x	x	x	x	x	x
Y-27632 (Inibitore di ROCK)	x	x	x	x	x	x
Gastrin	x	x	x	x	x	x
Primocin	x	x	x	x	x	x
Mezzo di coltura condizionato Wnt3a	-	-	-	-	x	-
EGF	-	x	-	x	x	x
A83-01 (inibitore di ALK5)	-	-	x	x	x	x
SB202190 (inibitore di p38 MAP chinasi)	-	x	-	x	x	x
ProstaglandinE2 (PGE2)	-	-	-	-	x	x

Tabella 3. composizione dei terreni utilizzati dai PPs per la coltura di organoidi tumorali di colon-retto. In viola i fattori di crescita/inibitori di cui è stato analizzato l'impatto sulla crescita degli organoidi. Visita il sito www.pre-canmed.eu per la consultazione dei SOPs.

Tabella 4: Potenziale proliferativo degli organoidi tumorali nei terreni W/RENAS e RENAS (PP UniUD).
 Legenda: -, no proliferazione; +, ++ scarsa / buona proliferazione; +++, eccellente capacità di proliferazione/sufficiente per eseguire analisi genomiche e test funzionali. Per informazioni dettagliate consultare www.precanmed.eu.

ID Paziente (UniUD)	Potenziale proliferativo nel terreno W/RENAS (+Wnt3a)	Potenziale proliferativo nel terreno RENAS (-Wnt3a)
P6 - Tubulovillous Adenoma	++	+
P7 - Adenocarcinoma	++	-
P8 - Adenocarcinoma	+++	-
P12 - Adenocarcinoma	+++	+++
P13 - Adenocarcinoma	++	-
P14 - Adenocarcinoma	++	+++
P15 - Adenocarcinoma	+	-
P16 - Adenocarcinoma	++	+++
P17 - Adenocarcinoma	+	++
P20 - Adenocarcinoma	+	+++
P21 - Adenocarcinoma, mixed type	+	+

Tabella 5: Approccio eseguito al fine di valutare i requisiti specifici di ogni paziente per la generazione di organoidi tumorali (PP MUI/ADSI). Sono indicate le combinazioni dei fattori di crescita che supportano la proliferazione di organoidi tumorali. -, nessuna proliferazione efficiente; +, proliferazione efficiente. Per informazioni dettagliate consultare www.precanmed.eu.

ID Paziente (MUI/ADSI)	Potenziale proliferativo nei terreni di cultura
TPIO-16 Adenocarcinoma	M2(no factors) → + M3 → - M4 (A83-01) → + M5 → - M6 → -
TPIO-17 Adenocarcinoma	M2(no factors) → - M3 → - M4 (A83-01) → + M5(EGF, A83-01, SB202190) → + M6 → -
TPIO-18 Adenocarcinoma	M2 (no factors) → + M3 → - M4(A83-01) → + M5 → - M6 (Wnt3a, EGF, A83-01SB202190, PGE2) → +
TPIO-19 Adenocarcinoma	M2 → - M3 → - M4 (A83-01) → + M5 → - M6 (Wnt3a, EGF, A83-01SB202190, PGE2) → +
TPIO-20 Adenocarcinoma	M2 → - M3 → - M4 → - M5(EGF, A83-01, SB202190) → + M5 → - M6 → -
TPIO-21 Adenocarcinoma	M2 → - M3 → - M4(A83-01) → + M5 → - M6 → -
TPIO-22 Adenocarcinoma	M2 → - M3 → - M4 → - M5(EGF, A83-01, SB202190) → + M6 → -
TPIO-23 Adenocarcinoma	M2 → + M3 (EGF, SB202190) → + M4 → - M5 (EGF, A83-01, SB202190) → + M6 (Wnt3a, EGF, A83-01, SB202190, PGE2) → +

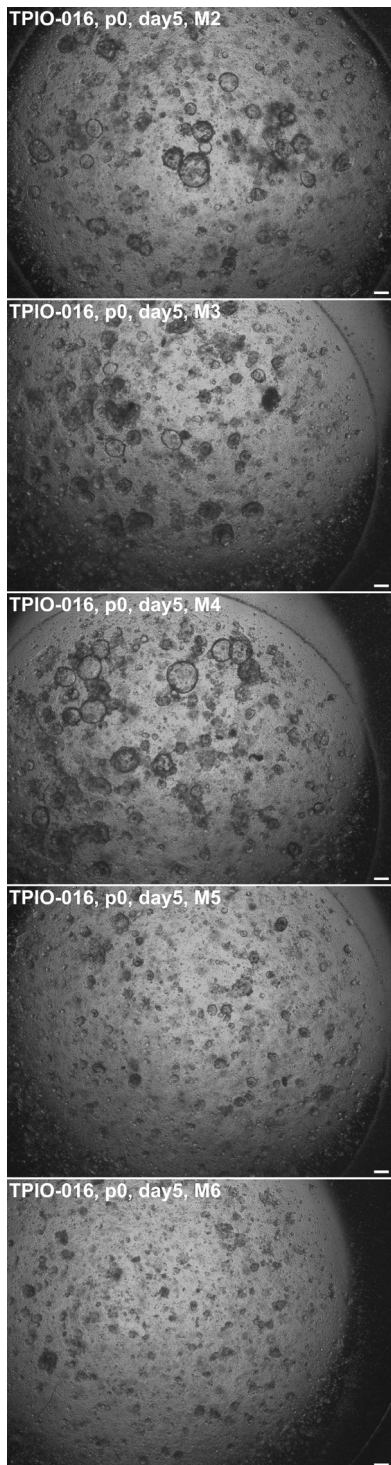
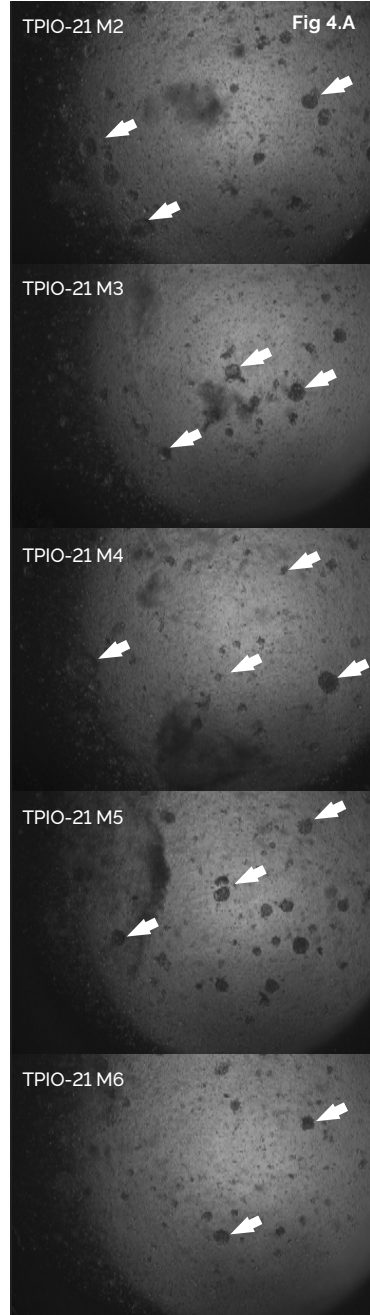
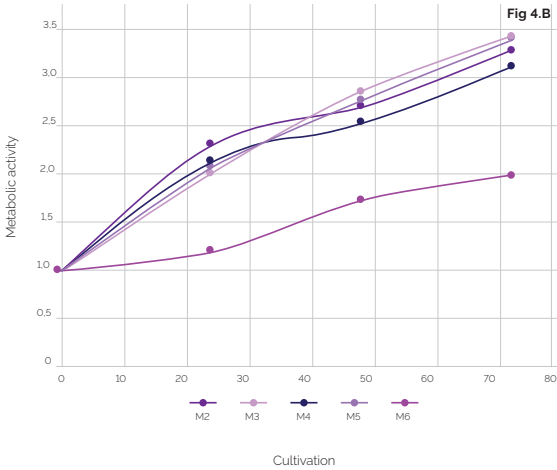


Figura 3: Coltivazione di organoidi tumorali in diversi terreni di coltura. Il tessuto tumorale colorettale di uno stesso paziente è stato utilizzato per generare gli organoidi tumorali in diverse condizioni (terreni da M2 a M6). Le immagini rappresentano gli organoidi tumorali al 5° giorno di coltivazione. I terreni M2 e M4 supportano un'efficiente proliferazione degli organoidi. La barra di scala indica 50 µm.

Figura 4: Misurazione in tempo reale dell'attività metabolica per identificare le condizioni di crescita favorevoli per la coltura di organoidi derivanti da carcinoma colorettale. Gli organoidi ottenuti dal tessuto tumorale crescono nei terreni M2, M3, M4, M5 e M6. (A) Immagini rappresentative di organoidi tumorali dopo 72 ore di coltivazione. La barra di scala indica 50 μ m. (B) Quantificazione dell'attività metabolica ai tempi indicati.



5.2 Efficiency of breast tumor- and normal-tissue organoids (UNITS)

In una fase iniziale, le cellule derivanti da 13 diversi carcinomi mammari, sono state mantenute in coltura organotipica utilizzando il terreno di coltura che supporta la crescita di organoidi di tessuto mammario di topo, strategia che però non si è rivelata valida. È stata quindi modificata la composizione del terreno di coltura aggiungendo specifici fattori di crescita, quali R-Spondin, Heregulin $\beta 1$, Noggin, FGF-7, FGF-10 e specifici inibitori delle chinasi ALK5, p38, ROCK, che hanno notevolmente incrementato l'efficienza nella formazione di organoidi tumorali mammari⁷ (**Tabella 6**). In queste condizioni, cellule derivanti da 33 carcinomi mammari sono state mantenute in coltura organotipica: da essi sono stati generati organoidi tumorali nel 48% dei carcinomi duttali invasivi (13/27) e nel 50% dei carcinomi lobulari invasivi (3/6) (**Figura 5**). Il numero di organoidi con un elevato tasso di crescita è risultato però inferiore, con il 26% di efficienza per i carcinomi duttali invasivi (7/27) e il 16% per i carcinomi lobulari invasivi (1/6).

I carcinomi mammari vengono classificati in base all'espressione di marcatori molecolari in sottotipi tumorali quali lumenali A, lumenali B, tripli negativi e Her2 positivi. Seguendo questa classificazione, su 33 pazienti arruolate, sono stati generati organoidi tumorali dal 47% dei tumori lumenali A, dal 75% dei lumenali B, dal 38% dei tripli negativi e dal 50% degli Her2 positivi. È stato osservato un elevato tasso di proliferazione nel 22% degli organoidi derivanti da tumori lumenali A (2/9), nel 67% dei lumenali B (2/3), nel 100% dei tripli negativi (3/3) e nel 100% degli Her2 positivi (1/1), suggerendo quindi che la proliferazione degli organoidi tumorali sia correlata con l'aggressività del tumore da cui vengono originati. Solo per questi casi è stato possibile effettuare analisi più approfondite, quali il sequenziamento del DNA e la valutazione della risposta al trattamento farmacologico. In generale, le condizioni di coltura utilizzate hanno favorito la crescita degli organoidi da diversi sottotipi di carcinoma mammario. Tuttavia, basandosi sulle informazioni ottenute dalle colture organotipiche di tumore al colon-retto, crediamo che la complessa composizione del terreno di coltura utilizzato possa non essere ottimale per la crescita degli organoidi da alcuni sottotipi tumorali.

Per quanto riguarda la generazione di organoidi da tessuto normale di mammella, la ridotta dimensione del tessuto normale ricevuto e la scarsa presenza di cellule epiteliali rispetto agli adipociti e al tessuto fibroso, hanno reso difficile la generazione di organoidi in elevate quantità. Questa limitazione potrà essere superata attraverso il reclutamento di pazienti che vengono sottoposte a mastoplastica riduttiva o a mastectomia a causa di tumori particolarmente avanzati, casi però non reclutati per questo progetto.

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

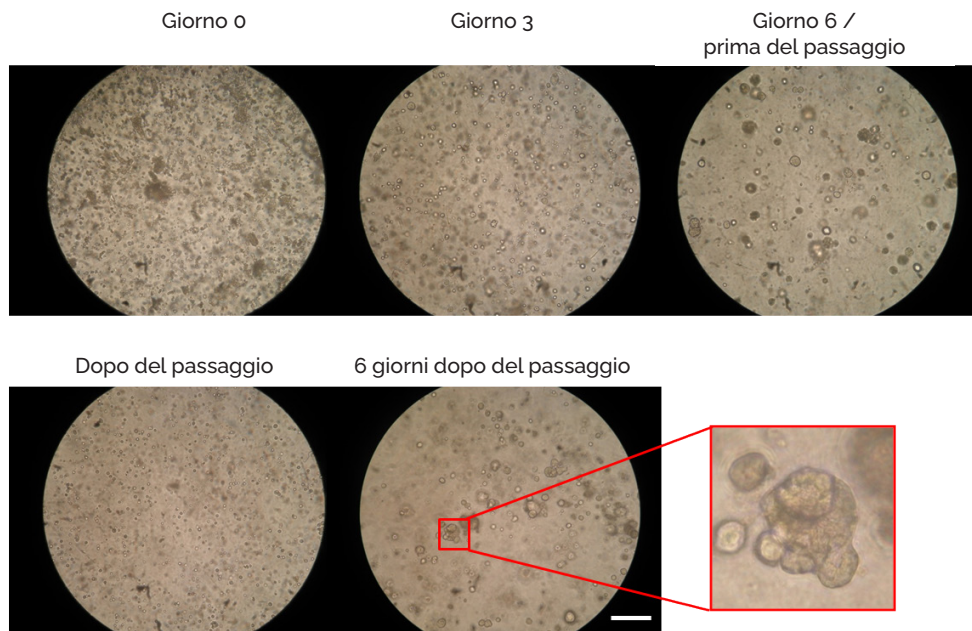


Figura 5: Coltura di organoidi derivanti da carcinoma mammario. Pannelli in alto: immagini di cellule tumorali mammarie (giorno 0) e di organoidi tumorali dopo 3 e 6 giorni in coltura, ottenute al microscopio a contrasto di fase. Pannelli in basso: immagini di organoidi tumorali in seguito a loro digestione (sinistra) e successiva coltivazione per 6 giorni (centro) (la barra di scala indica 200 μm); a destra è mostrato un organoide a maggior ingrandimento. Visita il sito www.precanmed.eu per la consultazione dei SOPs.

Tabella 6: Composizione del terreno di coltura utilizzato per la coltivazione di organoidi derivanti da tessuto mammario normale e tumorale. Visita il sito www.precanmed.eu per la consultazione dei SOPs.

Composizione del terreno di coltura per organoidi di mammella

Terreno DMEM/F-12
B27 supplemento
Nicotinammide
N-Acetilcisteina
R-Spondin 3
Heregulin β -1
Noggin
FGF-7
FGF-10
EGF
A83-01 (Inibitore di ALK5)
SB202190 (Inibitore di p38 MAP chinasi)
Y-27632 (Inibitore di ROCK)
Antibiotici

Paziente	Diagnosi	Potenziale proliferativo
1	Luminale A	-
2	Luminale A	-
3	Luminale A	-
4	Luminale A	-
5	Luminale A	-
6	Luminale A	-
7	Luminale A	++
8	Luminale A	-
9	Luminale A	-
10	Luminale A	+
11	Luminale A	+
12	Luminale A	+
13	Luminale A	-
14	Luminale A	+++
15	Luminale A	++
16	Luminale A	++
17	Luminale A	+
18	Luminale A	+++
19	Luminale A	-
20	Luminale B	-
21	Luminale B	+
22	Luminale B	++
23	Luminale B	+++
24	Triplo negativo	-
25	Triplo negativo	++
26	Triplo negativo	-
27	Triplo negativo	-
28	Triplo negativo	-
29	Triplo negativo	+++
30	Triplo negativo	-
31	Triplo negativo	+++
32	Her-2 positivo	-
33	Her-2 positivo	+++

Tabella 7. Potenziale proliferativo degli organoidi generati da carcinoma mammario per ogni caso selezionato per questo progetto (-, no proliferazione; +, ++ scarsa/buona proliferazione; +++, proliferazione eccellente/sufficiente per l'analisi genomica e per il trattamento farmacologico). Per dettagli visita il sito www.precanmed.eu

5.3 Organoidi di tessuto polmonare normale e tumorale (LNCIB)

I primi protocolli per la generazione e il mantenimento a lungo termine di colture di organoidi di polmone si sono basati su precedenti lavori scientifici per la generazione di strutture cellulari 3D a partire da tessuto polmonare normale. Questi protocolli prevedevano l'uso di fattori di crescita, addizionati al terreno di coltura, la cui combinazione riesce a mimare il microambiente delle cellule epiteliali staminali del polmone, come EGF, FGF10, l'inibitore di Rock e di ALK5, o il fattore inibitorio della leucemia (LIF)^{10,11}. L'utilizzo di questo terreno di coltura ha permesso la generazione di strutture cellulari 3D con una percentuale di successo del 25% rispetto al numero totale di tessuti polmonari processati (4/20). Tuttavia, l'utilizzo del suddetto mezzo di coltura non ha permesso la proliferazione a lungo termine delle colture cellulari. Successivamente, la generazione degli organoidi tumorali ed il loro potenziale proliferativo sono stati notevolmente incrementati grazie all'aggiunta di FGF7, dell'inibitore della MAP chinasi p38, e delle proteine R-Spondin e Noggin, fattori determinati per la crescita di organoidi polmonari come riportato da studi scientifici pubblicati durante il periodo in cui si è lavorato al progetto¹²⁻¹⁴ (**Tabella 8**). In queste condizioni di coltura, solo in 4 casi su 21, non è stato possibile generare colture organotipiche (19%), mentre nel restante 81% dei casi si sono ottenute strutture cellulari 3D (17/21). Il 67% delle colture cellulari ha mostrato inizialmente un buon potenziale proliferativo (14/21) che tuttavia si è ridotto dopo circa 1-2 settimane di coltura, mentre nel 20% dei tessuti tumorali processati (4/21) si

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

Tabella 8: Composizione del terreno di coltura utilizzato per la coltivazione degli organoidi derivanti da tessuto polmonare normale e tumorale. Visita il sito www.precanmed.eu per la consultazione dei SOPs.

Composizione del terreno di coltura per gli organoidi di polmone
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-Acetylcysteine
Nicotinamide
Penicillin / Streptomycin
Antibiotics

sono ottenute colture di organoidi tumorali con un alto potenziale proliferativo, indispensabile per poter effettuare l'analisi genomica e i test funzionali sulle colture cellulari (**Tabella 9, Figura 7**). Purtroppo, la generazione di organoidi derivanti da tessuto polmonare normale è stata possibile solo in un caso. Ad oggi non è stato possibile correlare l'efficienza di formazione di organoidi tumorali agli istotipi di carcinoma polmonare.

Tali dati confermano che FGF7, FGF10, l'inibitore delle MAP chinasi p38, R-Spondin, Noggin, gli inibitori di ROCK e ALK5 rappresentano una buona combinazione di fattori di crescita per la generazione di organoidi tumorali derivanti da tessuto polmonare. In base ai dati relativi alle colture organotipiche di carcinoma coloretale, si può ipotizzare che l'ampia combinazione di fattori crescita e di inibitori presenti nel terreno di coltura non sia compatibile con i diversi sottotipi di carcinoma polmonare, determinando quindi un relativamente alto tasso di fallimento nella generazione degli organoidi tumorali.

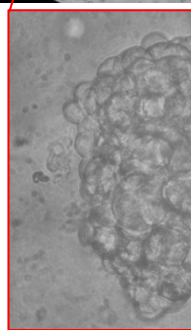
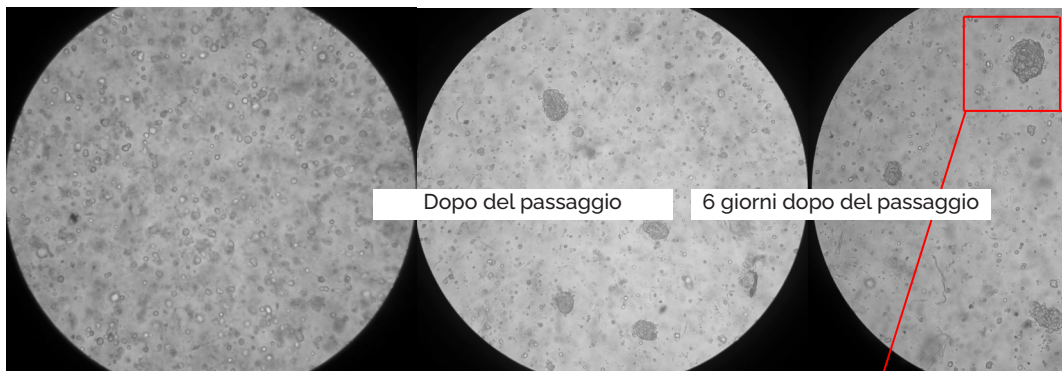
Patient	Diagnosis	Proliferative potential
1	Adenocarcinoma	++
2	Adenosquamous carcinoma	+
3	Adenocarcinoma	+
4	Squamous carcinoma	-
5	Adenocarcinoma	+++
6	Neuroendocrine carcinoma	+
7	Adenocarcinoma	-
8	Adenocarcinoma	+
9	Adenocarcinoma	+++
10	Adenocarcinoma	-
11	Adenocarcinoma	++
12	Squamous carcinoma	+
13	Adenocarcinoma	+
14	Squamous carcinoma	++
15	Mucinous adenocarcinoma	+++
16	Adenocarcinoma	-
17	Squamous carcinoma	-
18	Adenocarcinoma	+
19	Adenocarcinoma	+++
20	Adenocarcinoma	-
21	Squamous carcinoma	+

Tabella 9: Potenziale proliferativo degli organoidi tumorali derivanti dal polmone di diversi pazienti selezionati per lo studio (-, no proliferazione; +, ++ scarsa/buona proliferazione; +++, proliferazione eccellente/sufficiente per l'analisi genomica e per il trattamento farmacologico). Per ulteriori dettagli visita il sito www.precanmed.eu

Giorno 0

Giorno 4

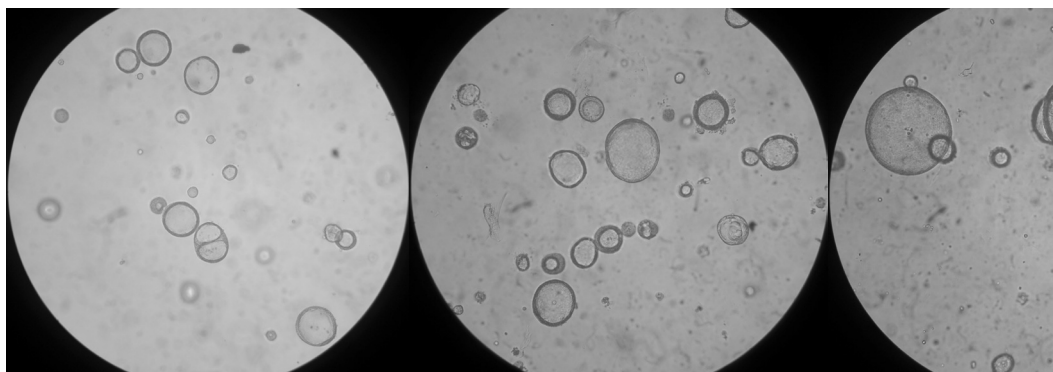
Giorno 6



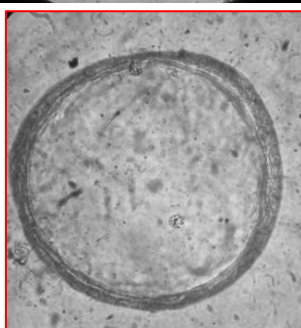
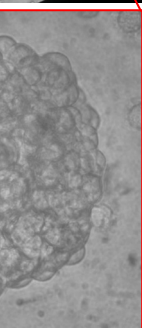
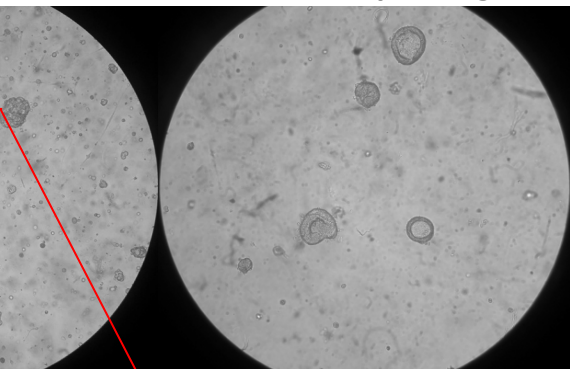
Giorno 15

Giorno 20

Giorno 40



Dopo il passaggio



Giorno 60

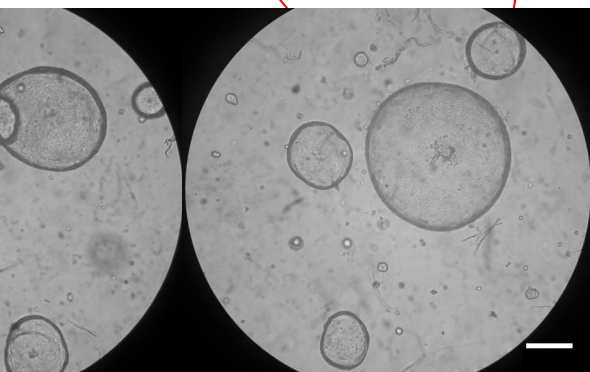


Figura 6: Colture di organoidi derivanti da carcinoma polmonare. Pannelli in alto: immagini di cellule tumorali polmonari (giorno 0) e di organoidi tumorali dopo 4 e 6 giorni in coltura e in seguito a loro digestione e successiva coltivazione, ottenute al microscopio a contrasto di fase. Pannelli in basso, coltivazione di organoidi tumorali fino al giorno 60. N.B., dopo il passaggio cellulare gli aggregati formano strutture sferoidali (ingrandimento al giorno 6 e 60). La barra di scala indica 50 μ m. Visita il sito www.precanmed.eu per la consultazione dei SOPs.



6. Espansione delle colture organotipiche

Gli organoidi sono cluster cellulari che, crescendo come strutture 3D, possono assumere un aspetto tondeggiante e/o acinare (**Figure 3, 5, 6**)^{2,7,14}. La coltivazione a lungo termine degli organoidi determina la formazione di grandi strutture cellulari che possono risultare inaccessibili ai fattori di crescita e ai nutrienti, riducendo così la vitalità degli organoidi tumorali. Per questo motivo, risulta necessario frammentare le strutture organotipiche in aggregati cellulari più piccoli in modo da permettere la propagazione a lungo termine delle colture. A questo fine, sono state testate diverse strategie per la generazione di piccoli aggregati cellulari o cellule singole a partire da organoidi di tessuto mammario, coloretale e polmonare. I migliori risultati sono stati ottenuti grazie alla separazione meccanica degli organoidi, seguita dalla digestione enzimatica delle giunzioni cellula-cellula. Per ulteriori dettagli consultare la **Tabella 10** e i SOPs disponibili sul sito www.precanmed.eu.

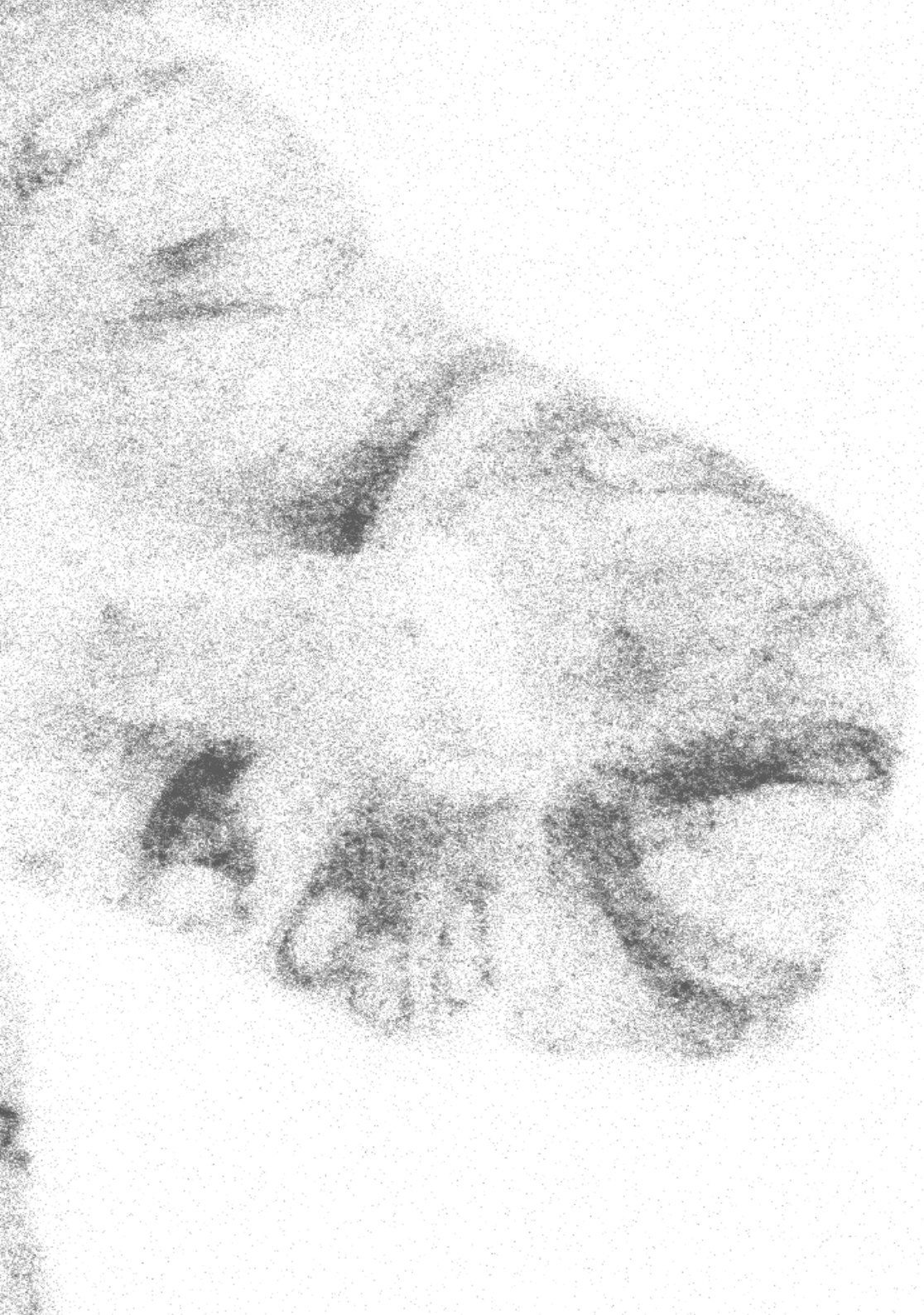
² van de Wetering, M. et al. Prospective Derivation of a Living Organoid Biobank of Colorectal Cancer Patients. *Cell* 161, 933–945 (2015).

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/emboj.2018100300

Procedure di separazione cellulare per l'espansione di colture organotipiche	Tessuto mammario (UniTS)	Tessuto polmonare (LNCIB)	Tessuto coloretale (MUI, ADSI, UniUD)
Condizioni ottimali	Dissoluzione del Matrigel e digestione enzimatica degli organoidi recuperati con tripsina (incubazione di 5 minuti a 37°C)	<i>Organoidi piccoli:</i> Dissoluzione del matrigel e digestione meccanica degli organoidi recuperati, seguita da eliminazione dei residui di Matrigel tramite l'uso di Dispasi. <i>Organoidi grandi:</i> Dissoluzione del Matrigel, eliminazione dei residui di Matrigel utilizzando la Dispasi e digestione enzimatica con tripsina (incubazione di 5 minuti a 37°C)	Dissoluzione del Matrigel e digestione enzimatica degli organoidi recuperati con tripsina. Organoidi con più alto potenziale proliferativo: digestione a singola cellula Organoidi con più basso potenziale proliferativo: digestione in cluster cellulari

Tabella 10: Sintesi delle procedure eseguite per la separazione cellulare degli organoidi derivanti da tessuto polmonare, coloretale e mammario. Visita il sito www.precanmed.eu per la consultazione dei SOPs.





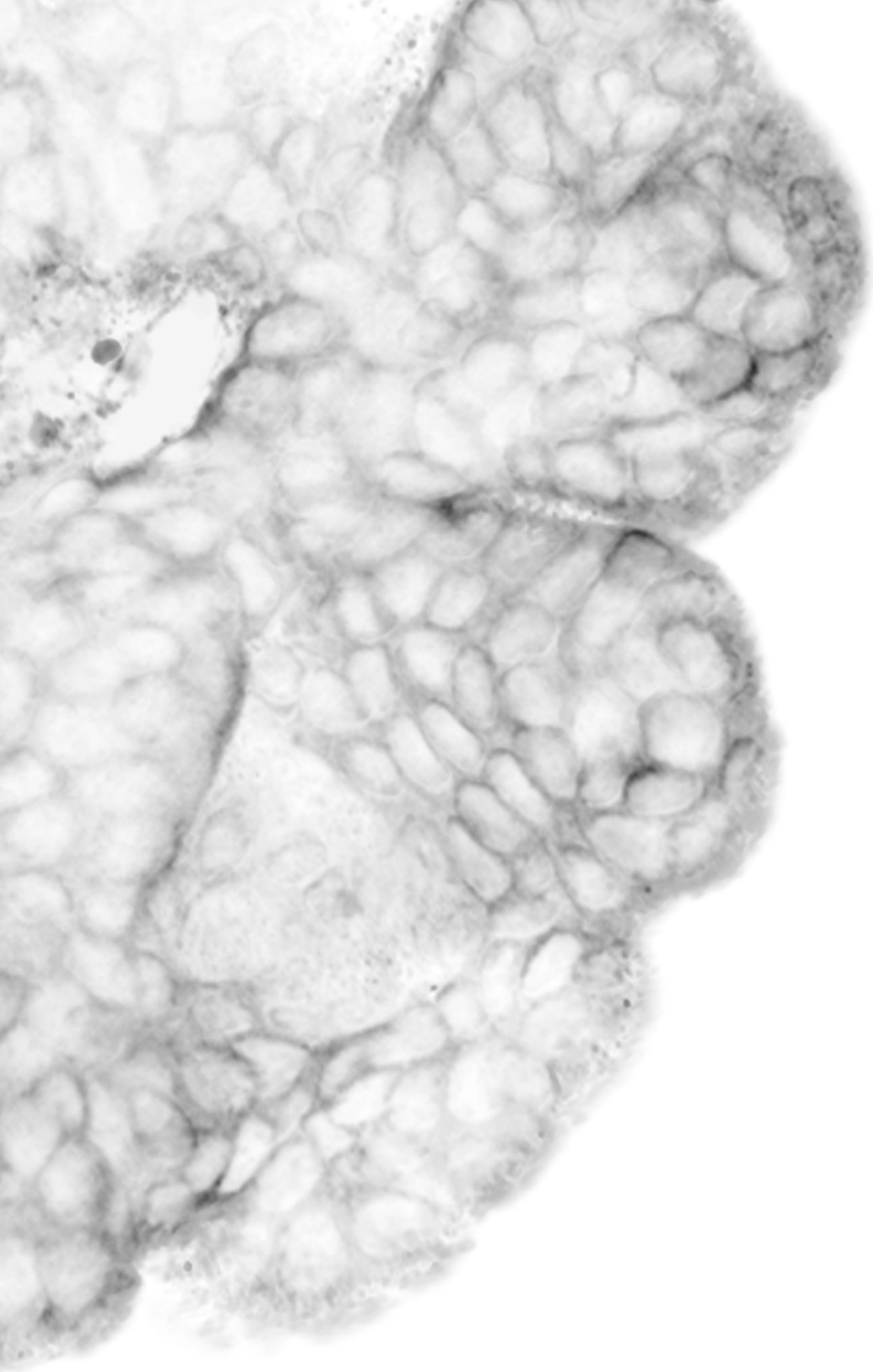
7. Crioconservazione delle colture organotipiche

La crioconservazione delle colture organotipiche derivanti dai tessuti dei pazienti è un elemento chiave per il mantenimento a lungo termine degli organoidi e per il loro utilizzo nella medicina traslazionale e nella ricerca clinica. Durante il corso del progetto è emerso che la vitalità degli organoidi è estremamente dipendente dalle condizioni di congelamento, in particolare dalla composizione del terreno di congelamento e dalla velocità di raffreddamento durante il processo di crioconservazione. Gli organoidi con un alto potenziale proliferativo hanno mostrato una buona tolleranza ai diversi cicli di congelamento-scongelo. Il congelamento di un maggior numero di cellule ha assicurato la propagazione degli organoidi dopo un ciclo di congelamento-scongelo. I migliori risultati sono stati ottenuti facendo in modo che la velocità di congelamento fosse di 1°C/minuto fino al raggiungimento della temperatura di -80°C; successivamente gli organoidi sono stati crioconservati in azoto liq-

uido (**Tabella 11**). Queste procedure hanno assicurato il mantenimento degli organoidi con un tasso di successo del 50-80%. Il tasso di mortalità dovuto al congelamento-scongelamento degli organoidi si è invece aggirato intorno al 20-50% (**Tabella 11**).

Congelamento delle colture organotipiche	Tessuto mammario (UniTS)	Tessuto polmonare (LNCIB)	Tessuto coloretale (MUI, ADSI, UniUD)
Condizioni ottimali	Dissoluzione del matrigel; congelamento degli organoidi in FBS/10% DMSO	Dissoluzione del matrigel; congelamento degli organoidi in FBS/10% DMSO	Opzione 1: Dissoluzione del matrigel; congelamento degli organoidi in Recovery™ Cell Culture Freezing Medium Opzione 2: Dissoluzione del matrigel; digestione a singola cellula degli organoidi con trispina e congelamento in Recovery™ Cell Culture Freezing Medium
Velocità di congelamento	-1°C/minuto fino a -80°C; trasferire in N ₂	-1°C/minuto fino a -80°C; trasferire in N ₂	-1°C/minuto fino a -80°C; trasferire in N ₂
Successo nel congelamento delle colture	50%	50%	80%
Tasso di mortalità degli organoidi dopo lo scongelamento	50%	50%	20%

Tabella 11: Sintesi delle procedure di congelamento degli organoidi derivanti da tessuto polmonare, coloretale e mammario. Visita il sito www.precanmed.eu per la consultazione dei SOPs.





8. Validazione delle caratteristiche istopatologiche delle colture organotipiche tumorali

L'analisi immuno-istopatologica delle sezioni di tumore primario rappresenta un'informazione chiave per la classificazione tumorale e la selezione dei trattamenti terapeutici post-operatori. La **tabella 12** riporta i principali marcatori istologici utilizzati nella classificazione del carcinoma mammario, polmonare e coloretale. È necessario che le colture organotipiche derivanti dal tessuto tumorale mantengano le caratteristiche istopatologiche e molecolari del tumore primario al fine di poterle utilizzare nella medicina di precisione^{2,7-14}. Prima di ottenere informazioni molecolari dettagliate grazie all'analisi genomica, è stata condotta l'analisi immunohistochimica delle colture tumorali al fine di determinare se gli organoidi tumorali mantenessero le caratteristiche del tumore primario. Gli organoidi sono stati fissati in formaldeide e successivamente risospesi in agarosio. I blocchetti di agarosio contenenti gli organoidi sono stati poi inclusi in paraffina e tagliati in diverse sezioni da personale tecnico specializzato. Al

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

fine di poter meglio localizzare gli organoidi inclusi nei blocchi di paraffina si sono effettuate colorazioni delle strutture cellulari con H/E ogni 10 sezioni. Grazie all'analisi immunohistochimica è stato possibile dimostrare che gli organoidi con alto potenziale proliferativo, ottenuti dal tessuto mammario e polmonare, ricapitolano l'espressione dei principali marcatori tumorali del tessuto di provenienza (**Tabella 13, 14**).

Tabella 12. Lista dei marcatori immunohistochimici utilizzati per la diagnosi dei carcinomi polmonari, mammari e coloretali.

Carcinoma coloretale	Carcinoma mammario	Carcinoma polmonare
MLH1	Recettore degli estrogeni	Ki-67
MSH2	Recettore del progesterone	Citocheratina 5/6
MSH6	Her2/neu	Citocheratina 7
PMS2	Ki67	p63
Her2/neu	p53	Napsina A
	E-caderina	TFF-1
	Citocheratina 5/6	p40
	Citocheratina 7	Calretinina
	Citocheratina 14	ESA/ BERP4
	Citocheratina 19	EMA
	p63	CEA
	p63	Desmina
	p120	WT-1
		Vimentina
		Citocheratina AE1/AE3
		CD56
		Cromogranina A
		Sinaptofisina
		panCK
		TG
		ERG
		PSA
		Citocheratina 20
		CDX-2

Paziente	CK5/6	CK7	P40	TTF1	Napsina A	Terapia post-operatoria
Paziente 5 – Adenocarcinoma polmonare	Corrispondente	Corrispondente	Corrispondente	Corrispondente	ND	Nessuna
Paziente 9 – Adenocarcinoma polmonare	ND	Corrispondente	ND	ND	ND	Nessuna
Paziente 15 – Adenocarcinoma mucinoso	ND	Corrispondente	Non corrispondente	NDD	Corrispondente	Nessuna
Paziente 19 – Adenocarcinoma polmonare	NDD	NDD	NDD	NDD	NDD	NDD

Tabella 13: Sommario dei marcatori immunostochimici utilizzati per la caratterizzazione degli organoidi tumorali polmonari e del tessuto primario d'origine. Sono mostrati i campioni selezionati per l'analisi genomica. Corrispondente: la colorazione immunostochimica degli organoidi tumorali corrisponde al tessuto primario d'origine. Non corrispondente: la colorazione immunostochimica degli organoidi tumorali non corrisponde al tessuto primario d'origine. ND: non disponibile. NDD: natura da determinare. Per ulteriori dettagli visita il sito www.precanmed.eu.

Tabella 14: Sommario dei marcatori immunostochimici utilizzati per la caratterizzazione degli organoidi tumorali mammari e del tessuto primario d'origine. Sono mostrati i campioni selezionati per l'analisi genomica. Corrispondente: la colorazione immunostochimica degli organoidi tumorali corrisponde al tessuto primario d'origine. Non corrispondente: la colorazione immunostochimica degli organoidi tumorali non corrisponde al tessuto primario d'origine. ND: non disponibile. NDD: natura da determinare. Per ulteriori dettagli visita il sito www.precanmed.eu.

Paziente	ER	PR	Citocheratina	E-caderina	Terapia post-operatoria
Paziente 14 – Carcinoma mammario Luminale A	Corrispondente	Corrispondente	Corrispondente	Corrispondente	Ormonale
Paziente 23 – Carcinoma mammario Luminale B	Corrispondente	Corrispondente	Corrispondente	Corrispondente	Epirubicina + Ciclofosfamide + paclitaxel + ormonale
Paziente 29 – Carcinoma mammario Triplo negativo	Corrispondente	Corrispondente	Corrispondente	Non corrispondente	Nessuna
Paziente 31 – Carcinoma mammario Triplo negativo	Corrispondente	Corrispondente	Corrispondente	Corrispondente	Nessuna
Paziente 33 – Carcinoma mammario Her2 positivo	Non corrispondente	Corrispondente	Corrispondente	Corrispondente	Docetaxel + Ciclofosfamide + Trastuzumab

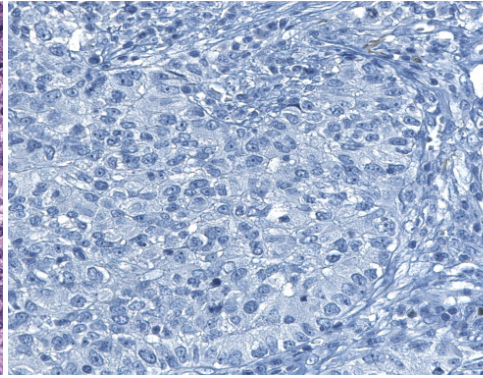
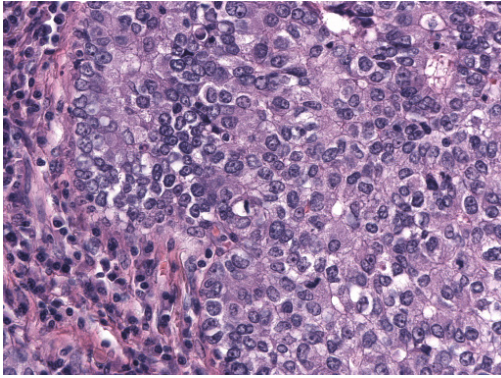
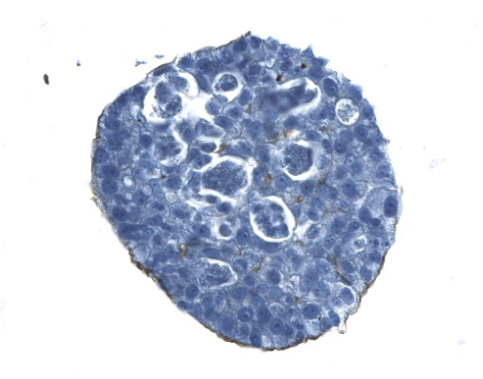
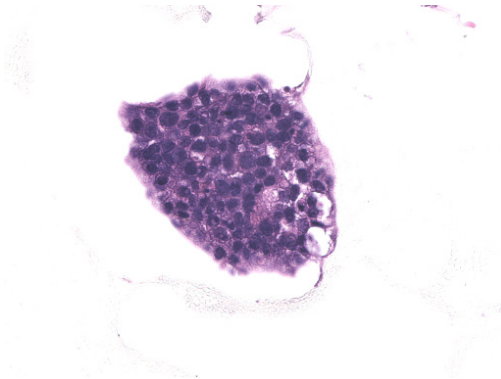
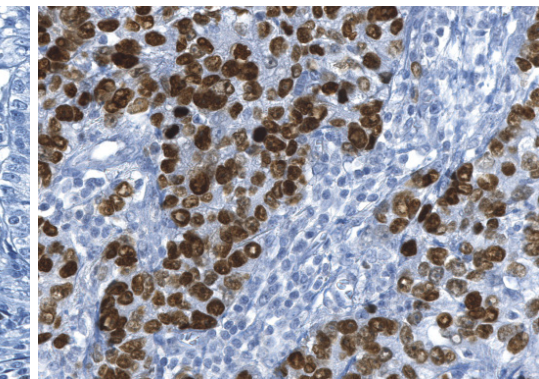
H/E**P63****TISSUE****ORGANOIDS**

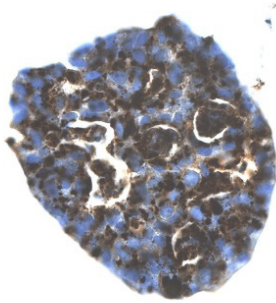
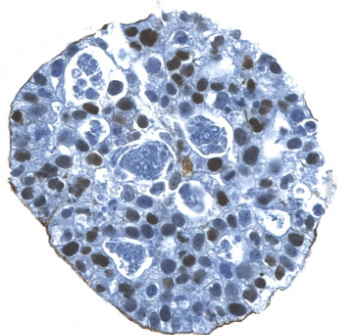
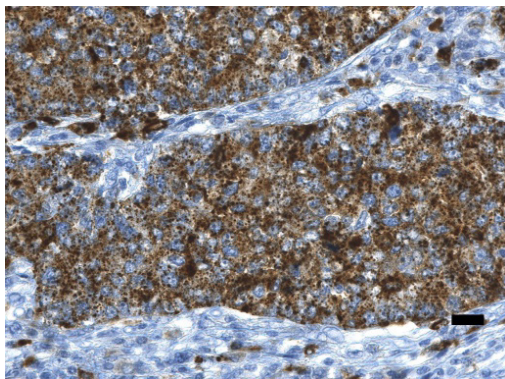
Figura 7. Gli organoidi ricapitolano le caratteristiche del carcinoma polmonare d'origine. Esempio di colorazione ematossilina/eosina ed immunohistochimica su sezioni di tumore primario (pannello superiore) e corrispondenti organoidi (pannello inferiore). L'immunohistochimica è stata condotta utilizzando anticorpi che riconoscono i marcatori P63, TTF1 e Napsina A. Lo status dell'adenocarcinoma polmonare d'origine è mantenuto nella coltura organotipica. La barra di scala indicata è 50 μ m.

Figura 8. Gli organoidi ricapitolano le caratteristiche del carcinoma mammario d'origine. Esempio di colorazione con ematossilina/eosina (H&E) ed immunohistochimica su sezioni di carcinoma duttale invasivo di tipo Luminale A (pannelli superiori) e di organoidi da esso derivati (pannelli inferiori). L'immunohistochimica è stata condotta utilizzando anticorpi che riconoscono i seguenti marcatori: Recettore degli Estrogeni (ER), Citocheratina 7 ed E-caderina. Lo status del carcinoma mammario d'origine è mantenuto nella coltura organotipica. La barra di scala indicata è 10 μ m.

TTF1



NAPSIN A



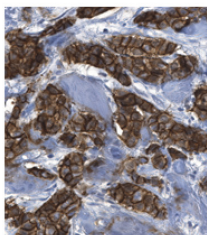
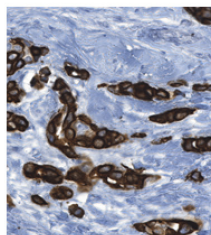
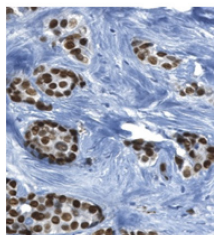
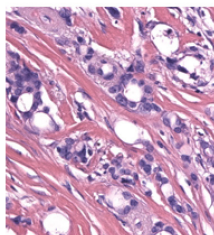
H&E

ER

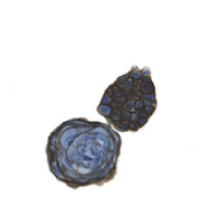
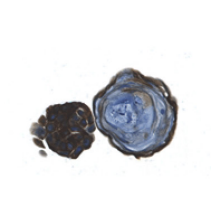
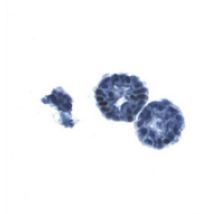
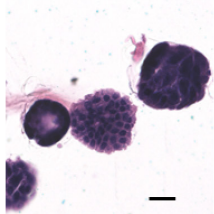
Cytokeratin 7

E-cadherin

Tissue



Organoid





9. Caratterizzazione genomica degli organoidi

Lo studio del profilo genetico del tumore è essenziale per l'identificazione di bersagli molecolari su cui testare nuovi farmaci specifici. Nel progetto PreCanMed, per un numero limitato di casi di carcinoma polmonare, mammario e coloretale i tessuti e gli organoidi da essi derivati, sono stati caratterizzati mediante le tecnologie Next Generation Sequencing (NGS), in particolare "Whole Exome" (WES) e "RNA sequencing" (RNA-seq), per testare la stabilità degli organoidi in coltura ed eseguire la predizione in silico di farmaci candidati per una terapia personalizzata.

9.1 RNA-seq degli organoidi tumorali

Le colture di organoidi da tessuto tumorale e normale di un paziente affetto da cancro al colon-retto (UniUD), sono state raccolte a un diverso numero di passaggi in coltura ("Early", "Late" e "Freeze/Thaw", **Tabella 15**). L'RNA estratto dagli organoidi (ciascuno in tre repliche), è stato sottoposto a sequenziamento mediante la generazione di librerie "TruSeq 2x100bp stranded". Un minimo di trenta milioni di "read" è stato richiesto per ciascun campione. La successiva analisi dei dati di sequenziamento del trascrittoma ha incluso il controllo della qualità delle read ottenute, l'allineamento di queste sul genoma umano di riferimento, la quantificazione dell'espressione genica e il test di espressione differenziale dei geni negli organoidi tumorali rispetto al corrispondente normale (false discovery rate=0.01) (per maggiori dettagli consultare il sito www.precanmed.eu) (**Figura 9**). Il grafico MDS (Multi Dimensional Scaling) delle librerie RNA-seq mostra le distanze tra i profili di espressione degli organoidi normali e tumorali in due dimensioni (**Figura 10**). La dimensione uno separa gli organoidi tumorali dai corrispondenti normali, confermando la doppia natura (normale e tumorale) dei tessuti da cui derivano. La dimensione due separa in base al diverso numero di passaggi in coltura. Le tre repliche degli organoidi sia tumorali sia normali, allo stesso numero di passaggi, tendono a raggrupparsi insieme (coefficienti di correlazione ρ di Spearman > 0.92), mentre i campioni "Late" e "Freeze/Thaw" sono più simili nei loro profili di espressione rispetto agli "Early" (**Figura 10**). Queste osservazioni potrebbero indicare alterazioni dell'espressione genica rispetto al tessuto di origine, dovuti a periodi prolungati di coltivazione. L'analisi di espressione differenziale ha rivelato il numero di geni differenzialmente espressi negli organoidi tumorali (DEG, Differential Expressed Genes), per ciascun numero di passaggi in coltura (**Tabella 16**). Tali DEGs sostengono "pathway" note coinvolte nell'insorgenza e progressione del cancro al colon-retto, tra cui 'Wnt signalling pathway' e 'Signaling pathways regulating pluripotency of stem cells', condivise dagli organoidi tumorali a tutti i passaggi, "Early, Late e Freeze/Thaw". Al fine di valutare eventuali adattamenti trascrittomici nel tempo, è stato eseguito il confronto delle espressioni tra i diversi numeri di passaggi. Sono stati osservati un totale di 1101 geni "up-regolati" e 1326 "down-regolati" confrontando "Late" vs. "Early" e 1254 e 935 in "Freeze/Thaw" vs. "Late" (**Tabella 16, Figura 11**). In particolare, confrontando "Late" vs. "Early" (FDR ≤ 5%), l'analisi funzionale dei DEGs ha rivelato pathway biologicamente rilevanti per la progressione del cancro del colon-retto, tra cui 'PI3K-Akt signalling pathway' e 'TNF signalling pathway' (**Tabella 17**). Complessivamente, questi risultati suggeriscono che la coltivazione a lungo termine potrebbe causare alterazioni nell'espressione genica e nelle pathway coinvolte, imputabili a effetti intrinseci delle cellule o ad una potenziale selezione di sottopopolazioni cellulari duran-

te la coltivazione a lungo termine. Allo scopo di determinare se tali differenze siano biologicamente rilevanti, i dati RNA-seq saranno integrati con i dati WES riguardanti le mutazioni in geni associati allo sviluppo neoplastico.

Infine, per identificare potenziali nuove strategie terapeutiche per ciascun paziente, i profili di espressione genica sono stati utilizzati come input per lo screening computazionale dei farmaci, mediante il metodo CMap (Connectivity Map)¹⁵. Lo scopo è identificare i farmaci che potrebbero bloccare la proliferazione delle cellule tumorali. I top 100 geni up- e down-regolati negli organoidi tumorali al passaggio "Early" (potenzialmente più simili nei loro profili di espressione al tumore primitivo di origine), sono stati utilizzati come query per l'analisi CMap. Tale analisi ha portato all'identificazione di un gruppo di farmaci candidati per test successivi sugli organoidi tumorali, inclusi inibitori della chinasi RAF, EGFR e della chinasi MAP (**Tabella 18**).

Paziente 12 (Adeno- carcinoma-MSS stabili)	Early Passage (3 settimane di coltura)	Late Passage (13-14 settimane di coltura)	Freeze/ Thaw
Organoidi di tessuto normale di colon	3° passaggio	12° passaggio	Congelamento al 3° passaggio e successiva coltura per 7 settimane
Organoidi di tumore colorettale	3° passaggio	12° passaggio	Congelamento al 3° passaggio e successiva coltura per 7 settimane

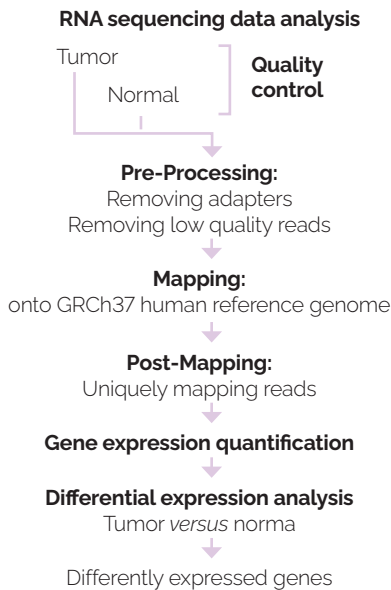


Tabella 15: Organoidi di tessuto normale e tumorale, derivati da un paziente affetto da cancro al colon-retto e prelevati a un diverso numero di passaggi in coltura e dopo congelamento/scongelamento. MSS, microsatelliti stabili (PP UniUD).

Figura 9: Pipeline per l'analisi dei dati derivanti dal sequenziamento dell'RNA degli organoidi generati da pazienti affetti da cancro al colon-retto.

Figura 10 Il grafico MDS (Multi Dimensional Scaling) delle librerie di RNA-seq da organoidi tumorali (-TO) e normali (-NO) a diverso numero di passaggi in coltura e dopo congelamento/scongela-mento. Le lettere in maiuscolo in-dicano le tre repliche per ciascun organoide.

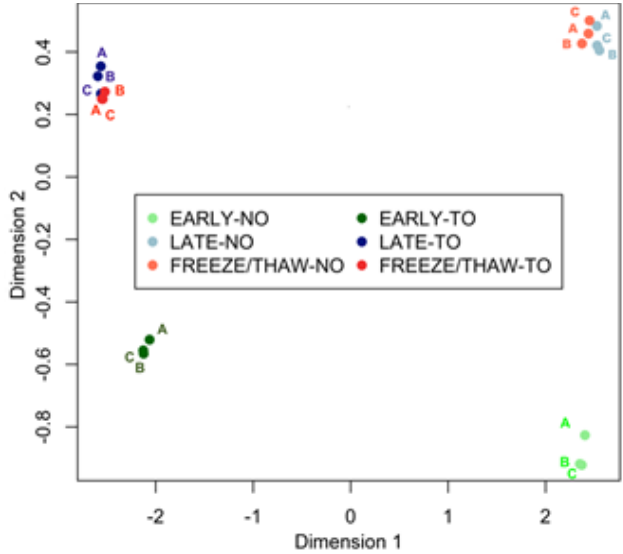
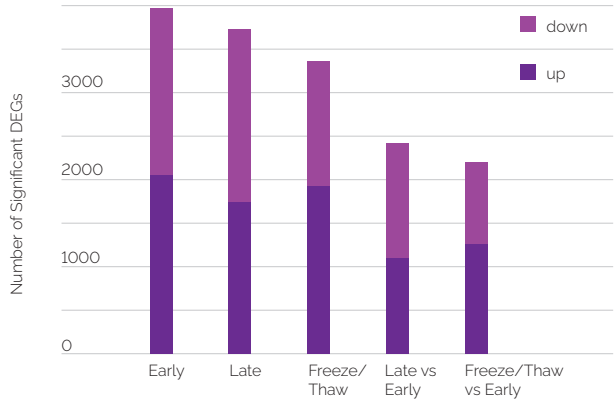


Figura 11: Numero dei geni up- e down-regolati negli organoidi tumorali rispetto ai normali e tra i diversi passaggi in coltura e dopo congelamento/scongela-mento (fold-change $\geq$ 2, adjusted FDR $\leq$ 0.01).



Condizione sperimentale	Geni up-regolati	Geni down-regolati
EARLY	2022	1955
LATE	1737	2000
FREEZE/THAW	1909	1443
LATE vs. EARLY	1101	1326
FREEZE/THAW vs. EARLY	1254	935

Table 16: The number of the significant up- and down-regulated genes in tumor organoids versus the normal tissue organoids, at and between each time point (fold-change $\geq$ 2, adjusted FDR $\leq$ 0.01). 'LATE'; late passage organoids; 'EARLY', early passage organoids; 'FREEZE/THAW', organoids after freeze-thaw cycle.

Tabella 17 Lista delle pathway KEGG arricchite nel confronto dell'espressione genica tra le diverse condizioni sperimentali. Identificativo (ID) e descrizione KEGG (Descrizione), numero di geni inclusi nella pathway (Conta) e valore di FDR sono riportati per ogni pathway.

Condizioni sperimentali a confronto	Espressione genica	ID	Descrizione	Conta	FDR
LATE vs. EARLY	Up-regolati	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
		hsa05200	Pathways in cancer	41	1.16
		hsa05132	Salmonella infection	14	1.89
		hsa04512	ECM-receptor interaction	14	2.91
	Down-regolati	hsa05162	Measles	20	0.35
		hsa04068	FoxO signaling pathway	18	2.74
FREEZE/THAW vs. EARLY	Up-regolati	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
		hsa05200	Pathways in cancer	45	0.73
		hsa05166	HTLV-I infection	32	1.18
		hsa04320	Dorso-ventral axis formation	8	2.19
	Down-regolati	hsa03030	DNA replication	13	0.00
			Cell cycle	23	0.00

Tabella 18: Lista dei composti in grado di revertire (punteggio negativo) l'espressione genica degli organoidi tumorali al passaggio 1 mediante metodo CMap. Il valore del punteggio, il nome, la descrizione e il bersaglio molecolare sono riportati per ciascun composto.

Punteggio	Nome	Descrizione	Bersaglio
-99.4	vemurafenib	Inibitore di RAF	BRAF, CYP2C19, CYP3A4, CYP3A5, RAF1
-97.43	PD-198306	Inibitore di MAP chinasi	MAP2K1, MAP2K2, MAPK1, MAPK3
-96.18	brefeldin-a	Inibitore della sintesi proteica	ARF1, ARFGEF1, ARFGEF2, CYTH2, GBF1, SAR1A
-96.05	SA-792709	Agonista del recettore dei retinoidi	RARA, RARB
-95.99	tyrphostin-AG-1478	Inibitore di EGFR	EGFR, MAPK14
-94.82	TPCA-1	Inibitore di IKK	IKKB
-94.76	GSK-3-inhibitor-II	Inibitore di PKC	GSK3B

9.2 Sequenziamento del DNA degli organoidi tumorali

Il sequenziamento del DNA (WES) è stato eseguito su tessuti tumorali e normali primari e su organoidi da essi derivati, per identificare mutazioni specifiche del tumore. Lo scopo è valutare la capacità degli organoidi di ricapitolare le caratteristiche del tessuto tumorale d'origine e successivamente utilizzarli come modello su cui testare nuove terapie anticancro. Inoltre, i dati di sequenziamento possono chiarire l'eventuale selezione di sottopopolazioni cellulari o l'accumulo di mutazioni durante la coltivazione degli organoidi a lungo termine o in terreni di coltura diversi.

Il DNA genomico estratto dagli organoidi e dai tessuti normali e tumorali inclusi in paraffina, è stato sottoposto alla costruzione di librerie 2×150bp (kit SureSelect Human All Exon V6) e sequenziato su piattaforma Illumina NovaSeq. L'analisi dei dati WES ha consentito l'identificazione delle mutazioni somatiche, ovvero specifiche del tumore, con rilevanza clinica (**Figura 12**, per maggiori dettagli consultare il sito www.precanmed.eu). Nello specifico, le read con elevata qualità sono state allineate al genoma umano di riferimento dopo la rimozione degli adattatori e dei duplicati da PCR. Le mutazioni germinali e quelle tumore-specifiche sono state identificate confrontando il tumore con i campioni normali (sia tessuti che colture di organoidi). Qualora predette come potenzialmente deleterie per la funzione proteica e presenti con frazione allelica >0.1, le mutazioni somatiche non-sinonime identificate nei campioni tumorali sono state prioritizzate. Le varianti polimorfiche con una frazione allelica >0.1 in ExAC sono state rimosse dalle analisi¹⁶.

¹⁶ Lek, M. et al. Analysis of protein-coding genetic variation in 60,706 humans. Nature (2016). doi:10.1038/nature19057

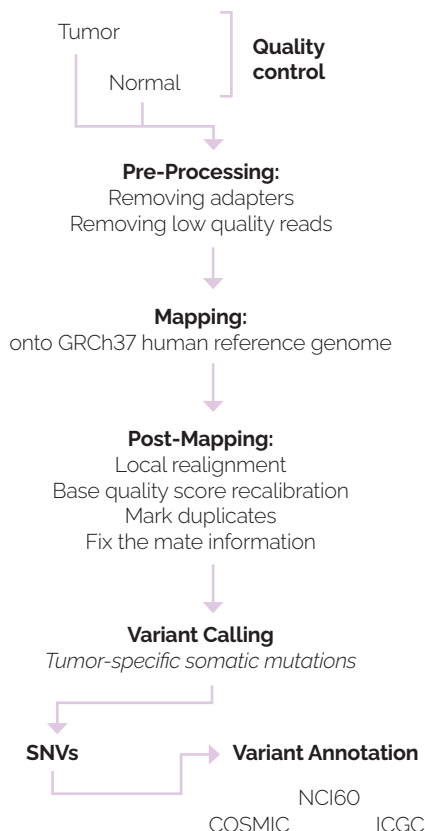


Figura 12: Pipeline per l'analisi dei dati di sequenziamento del DNA degli organoidi generati da pazienti affetti da cancro a colon-retto, mammella e polmone.

Il DNA estratto dai tessuti normali e tumorali e dagli organoidi da essi derivati è stato soggetto al sequenziamento WES (maggiori dettagli nelle **Tabelle 19-22**).

9.2.1 Cancro al polmone, mammella e colon-retto: (UniUD, UniTS, LNCIB): l'obiettivo dell'analisi

è stato quello di identificare mutazioni somatiche tumore-specifiche nei tumori primari e valutare la stabilità di queste mutazioni negli organoidi coltivati a lungo termine (**Tabelle 19-22**). In una fase successiva i dati genomici degli organoidi tumorali saranno utilizzati per identificare nuovi bersagli molecolari per la terapia anti-tumorale su base personalizzata (consultare anche il paragrafo 10. Trattamento farmacologico degli organoidi tumorali).

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

9.2.2 Cancro del colon-retto (ADSI, MUI)

l'obiettivo dell'analisi è stato quello di identificare mutazioni somatiche tumore-specifiche e valutare la stabilità di queste negli organoidi coltivati in mezzi di coltura diversi (**Tabella 22**).

Paziente	Tessuto normale	Tessuto tumorale	Organoidi tumorali
Paziente 14 – Carcinoma mammario Luminale A	Sezioni di tessuto in paraffina	Sezioni di tessuto in paraffina	5° passaggio; 6 settimane di coltura
Paziente 23 – Carcinoma mammario Luminale B	Sezioni di tessuto in paraffina	Sezioni di tessuto in paraffina	8° passaggio; 10 settimane di coltura
Paziente 29 – Carcinoma mammario Triplo negativo	Sezioni di tessuto in paraffina	Sezioni di tessuto in paraffina	5° passaggio; 5 settimane di coltura
Paziente 31 - Carcinoma mammario Triplo negativo	Sezioni di tessuto in paraffina	Sezioni di tessuto in paraffina	6° passaggio; 4 settimane di coltura
Paziente 33 - Carcinoma mammario Her2 positivo	Sezioni di tessuto in paraffina	Sezioni di tessuto in paraffina	4° passaggio; 4 settimane di coltura

Tabella 19: Campioni di tessuto mammario analizzati mediante WES (PP Units).

Paziente	Tessuto normale	Tessuto tumorale	Organoidi tumorali (basso passaggio)	Organoidi tumorali (alto passaggio)
Paziente 5– Adenocarcinoma polmonare	Sezioni di tessuto in paraffina	Sezioni di tessuto in paraffina	2° passaggio; 3 settimane di coltura	3° passaggio; 5 settimane di coltura
Paziente 9– Adenocarcinoma polmonare	Sezioni di tessuto in paraffina	Sezioni di tessuto in paraffina	2° passaggio; 2 settimane di coltura	5° passaggio; 6 settimane di coltura
Paziente 15 – Adenocarcinoma mucinoso	Sezioni di tessuto in paraffina	Sezioni di tessuto in paraffina	ND	6° passaggio; 8 settimane di coltura
Paziente19- Adenocarcinoma polmonare	Sezioni di tessuto in paraffina	Sezioni di tessuto in paraffina	3° passaggio; 7 settimane di coltura	5° passaggio; 11 settimane di coltura

Tabella 20: Campioni di tessuto polmonare analizzati mediante WES (PP LNCIB); ND: non disponibile.

Paziente	Tessuto normale	Organoidi normali	Tessuto tumorale	Organoidi tumorali (WRNAS con Wnt3a)	Organoidi tumorali (RNAS medium; no Wnt3a)
1 – paziente 12; Adenocarcinoma, microsatelliti stabili	Sezioni di tessuto in paraffina	Basso passaggio (p4; 6 settimane di coltura) e alto passaggio (p13; 13 settimane di coltura)	Sezioni di tessuto in paraffina	Basso passaggio (p4; 8 settimane di coltura)	Basso passaggio (p4; 8 settimane di coltura) e alto passaggio (p12; 12 settimane di coltura)
2 – paziente 14; Adenocarcinoma, microsatelliti stabili	Sezioni di tessuto in paraffina	Basso passaggio (p5; 7 settimane di coltura)	Sezioni di tessuto in paraffina	Basso passaggio (p5; 9 settimane di coltura) e alto passaggio (p12; 16 settimane di coltura)	Basso passaggio (p5; 9 settimane di coltura) e alto passaggio (p12; 13 settimane di coltura)

Table 21. Colorectal cancer samples analysed by WES (Project Partner UniUD).

Paziente	Tessuto normale	Organoidi normali	Tessuto tumorale	Organoidi tumorali (Terreno 4)	Organoidi tumorali (Terreno 5)	Organoidi tumorali (Terreno 6)
TP10-19; Adenocarcinoma microsatelliti instabili	Sezioni di tessuto in paraffina	Alto passaggio p11/p3	Sezioni di tessuto in paraffina	Basso passaggio p4/p3/p5 e alto passaggio p5/p10/p3	ND	Basso passaggio p8/p3 e Alto passaggio p13/p4
TP10-18 – paziente 14; Adenocarcinoma microsatelliti stabili	Sezioni di tessuto in paraffina	Basso passaggio p2/p3	Sezioni di tessuto in paraffina	Alto passaggio p9/p4/p2	ND	Basso passaggio p2/p3 e alto passaggio p2/p7/p3
TP10-23 – paziente 14; Adenocarcinoma, microsatelliti stabili	Sezioni di tessuto in paraffina	ND	Sezioni di tessuto in paraffina	ND	ND	Basso passaggio p4

Table 22. Colorectal cancer samples analysed by WES (Project Partner ADSI/MUI). N.A.= not analysed.



10.

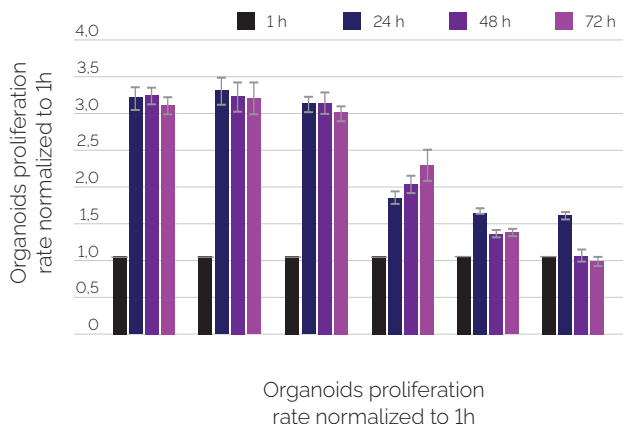
Trattamento farmacologico degli organoidi tumorali

Gli organoidi tumorali hanno la potenzialità di essere un valido strumento per prevedere l'effetto di terapie classiche, così come di strategie terapeutiche alternative, prima che il paziente venga effettivamente sottoposto a tali trattamenti farmacologici. Inoltre, essi possono essere utilizzati come modello preclinico avanzato di patologia tumorale per analizzare l'effetto di nuovi farmaci, spesso identificati mediante attività di ricerca condotta solamente su linee cellulari. Tuttavia, il potenziale proliferativo degli organoidi tumorali derivanti da paziente varia molto tra tumori di tessuto diverso, e anche tra pazienti con lo stesso tipo di tumore, ponendo quindi un freno all'utilizzo di questo nuovo modello per tali scopi. Questa limitazione può essere superata attraverso l'impiego di test che permettano un'analisi rapida e precisa della vitalità cellulare su una piccola quantità di organoidi. Nel corso del progetto PreCanMed, si è ottenuto un rapido riscontro sulla vitalità degli organoidi tumorali in seguito a trat-

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

tamento farmacologico analizzando l'attività metabolica degli stessi. Ad esempio, organoidi generati da tessuto sano o tumorale di paziente affetto da cancro al colon-retto sono stati trattati con inibitori delle chinasi ciclina-dipendenti, ovvero il Dinaciclib e il iCDKu, inibitore ancora in fase di sviluppo. Il Dinaciclib è un composto con potenziale attività anti-tumorale in quanto inibisce le chinasi ciclina-dipendenti CDK1, CDK2, CDK5 e CDK9; in particolare l'inibizione di CDK1 e CDK2 determina il blocco del ciclo cellulare e l'induzione di apoptosi nelle cellule tumorali¹⁷. Il trattamento degli organoidi derivanti da tumore al colon-retto con questi composti ha determinato una riduzione dell'attività metabolica degli stessi (**Figura 13**). L'attività metabolica degli organoidi di tessuto sano trattati con i medesimi composti non ha invece subito variazioni, mostrando quindi un effetto specifico di questi inibitori di chinasi per le cellule tumorali. Per confermare ulteriormente la validità degli organoidi tumorali come modello preclinico per malattia oncologica, è stato valutato l'effetto del Docetaxel su organoidi derivati da carcinoma mammario di tipo triplo negativo. Questo farmaco, un derivato del taxolo, è lo stesso che è stato utilizzato per il trattamento della paziente affetta da tumore triplo negativo da cui sono stati generati gli organoidi. Il trattamento con quantità crescenti di Docetaxel ha effettivamente determinato una riduzione dell'attività metabolica di questi organoidi tumorali (**Figura 14**). Questi esperimenti hanno quindi confermato la validità di questo metodo per determinare la vitalità degli organoidi tumorali in seguito a trattamento farmacologico in maniera rapida e precisa. In futuro, questo metodo potrà essere impiegato per testare l'effetto di farmaci che colpiscono i bersagli molecolari identificati grazie al sequenziamento del DNA per lo sviluppo di terapie personalizzate.

Figura 13: Saggio di analisi dell'attività metabolica per determinare la vitalità degli organoidi derivati da tessuto normale e tumorale di colon-retto in seguito a trattamento farmacologico con inibitori di chinasi ciclina-dipendenti (Dinaciclib e iCDKu). Gli inibitori riducono l'attività metabolica degli organoidi tumorali in maniera specifica (PP ADSU/MUI).



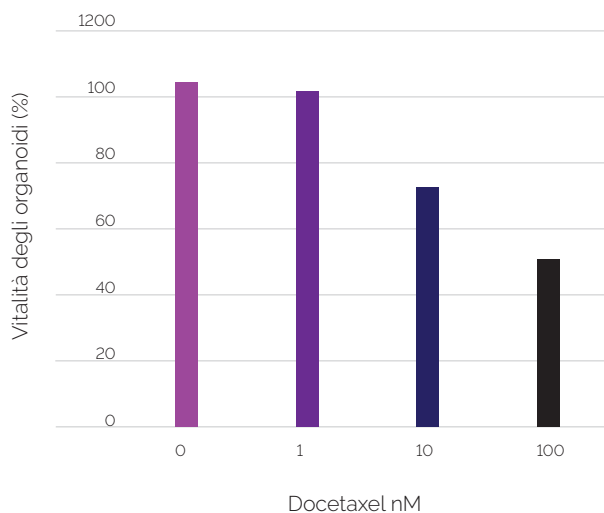


Figura 14: Saggio di analisi dell'attività metabolica per determinare la vitalità degli organoidi derivati da carcinoma mammario triplo negativo in seguito a trattamento farmacologico con Docetaxel. Alla dose di 100 nM, il Docetaxel riduce la vitalità degli organoidi del 50% (PP UniTS).



11. PreCanMed Database

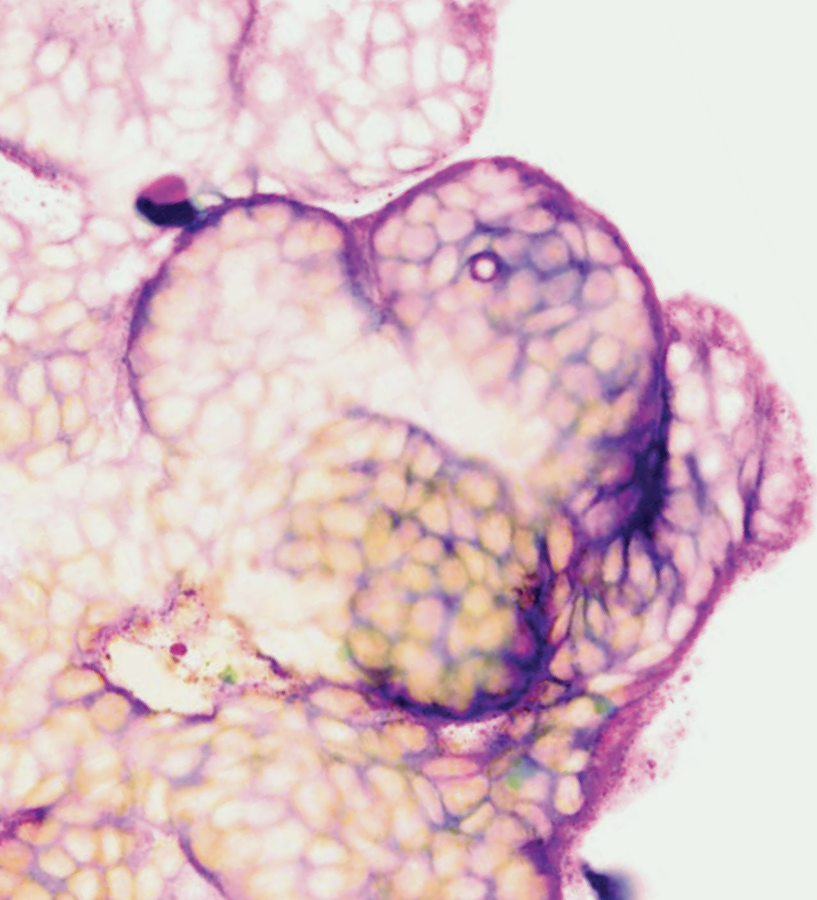
La gestione e l'organizzazione dei dati prodotti nel progetto PreCanMed sono elementi essenziali per supportare i ricercatori nell'interpretazione dei risultati nell'ambito dell'oncologia di precisione. A tal fine, è stata implementata una piattaforma per catalogare e condividere dati genomici, biologici e clinici. 'Informatics for integrating biology and the bedside' (i2b2)^{18,19} è un software open-source sviluppato dal *National Institutes of Health* (NIH), utilizzato in più di 200 siti in tutto il mondo, in grado di supportare i ricercatori nella condivisione dei dati rispettando la natura confidenziale degli stessi. Il database raccoglie i dati sperimentali più rilevanti, i.e. dati immunoistochimici (IHC), mutazioni clinicamente rilevanti (da WES), dati di "computational drug-screening" associati ai profili di espressione (da RNA-seq) e i risultati dei test di farmaci sugli organoidi. L'ontologia di i2b2 è stata opportunamente modificata per l'integrazione dei dati provenienti da fonti diverse, i.e. relativi a paziente, biotipo (tessuto,

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).

organoide), caratterizzazione genomica e drug-screening, con l'obiettivo di fornire i termini per generare le "query". "Biobank", "Drug screening" ("Screening virtuale", "Drug response"), "WES data" e "transcriptomics" sono esempi di termini adattati a un database traslazionale incentrato sul modello degli organoidi. Tale piattaforma traslazionale rappresenta uno strumento accessibile per la condivisione dei dati clinici e biologici tra gli istituti di ricerca, preservandone la loro riservatezza.

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. Shackleton, M. *et al.* Generation of a functional mammary gland from a single stem cell. *Nature* (2006). doi:10.1038/nature04372
6. Jamieson, P. R. *et al.* Derivation of a robust mouse mammary organoid system for studying tissue dynamics. *Development* (2016). doi:10.1242/dev.145045
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
8. 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
9. 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.ydbio.2016.10.002
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
15. Subramanian, A. *et al.* A Next Generation Connectivity Map: L1000 Platform and the First 1,000,000 Profiles. *Cell* (2017). doi:10.1016/j.cell.2017.10.049
16. Lek, M. *et al.* Analysis of protein-coding genetic variation in 60,706 humans. *Nature* (2016). doi:10.1038/nature19057
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
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)



PreCanMed è un progetto finanziato dall'Unione Europea, Fondo Europeo di Sviluppo Regionale e Interreg V-A Italia-Austria 2014-2020

www.precanmed.eu

secreteriat@precnmed.eu

Secretariat PreCanMed, Palazzina F3 - AREA Science Park, Trieste (IT) +39 040 3756805