

- Zusammenfassung -

Niklas Rindtorff
Dr. med.

Image-based profiling of colorectal cancer organoid models

Einrichtung: Deutsches Krebsforschungszentrum (DKFZ)
Doktorvater: Prof. Dr. Michael Boutros

Das kolorektale Karzinom gehört zu den häufigsten und tödlichsten Krebserkrankungen. Organoide sind multizelluläre, dreidimensionale *in-vitro* Modelle, welche die effiziente Kultur von gesundem und malignen adulten Gewebe ermöglichen, unter anderem auch die Kultur von Dickdarmepithel und kolorektalen Karzinomen. *In-vitro* zeigen Organoide eine ausgeprägte morphologische Heterogenität. Die molekularen Faktoren, welche diese Unterschiede in der Organoidarchitektur bedingen, sind jedoch nicht gut verstanden.

Das Ziel dieser Promotion war es (1) molekulare Faktoren, welche die Organoidarchitektur determinieren, zu identifizieren, (2) Faktor-abhängige Unterschiede in der Medikamentensensibilität zu beschreiben, und (3) Medikamente zu charakterisieren, welche die Organoidarchitektur entlang der identifizierten Faktoren verändern können.

Zuerst wurden Organoid Modelle angelegt, welche das kolorektale Karzinom-Stadium sowie die frühe Pathogenese im Adenom-Stadium repräsentieren. Für Modelle des Karzinom-Stadiums wurden endoskopisch isolierte Biopsien von kolorektalen Karzinomen als Grundlage genutzt. Für Modelle des Adenom-Stadiums wurden Organoide aus dem Dickdarmepithel einer *LSL-Kras^{G12D} CreERT2* transgenen Maus gewonnen und mittels CRISPR *Apc* Insertion/Deletions-Mutationen eingefügt.

Daraufhin wurden Organoide mittels bildbasierter Hochdurchsatzmedikamententestung untersucht und insgesamt 2000 Behandlungsbedingungen getestet. Die gesammelten morphologischen Informationen wurden daraufhin zusammen mit unterstützenden multi-omics Daten mittels einer Gruppen-Faktor-Analyse analysiert und Faktoren, welche molekulare und morphologische Unterschiede als auch Unterschiede in der Medikamentensensitivität erklärten, identifiziert.

In patientenstämmigen kolorektalen Organoiden wurden zwei prominente Faktoren identifiziert: Der erste Faktor organisierte Organoide nach ihrer Größe und der Aktivität des IGF-Signalweges. Organoide mit einem größeren Diameter und hoher Aktivität des IGF-Signalweges waren sensitiv gegenüber der Hemmung des IGF1 Rezeptors und resistent gegenüber EGFR-Inhibitoren.

Der zweite Faktor organisierte Organoide nach der Ausprägung der LGR5+ Stammzellen-Identität. Organoide mit einer ausgeprägten LGR5+ Stammzellen-Identität zeichneten sich durch eine sphärische und symmetrische multizelluläre Organisation aus. Diese Organoide zeigten eine hohe relative Sensitivität gegenüber Inhibitoren des Wnt Signalweges und eine relative Resistenz gegenüber Inhibitoren der ERK-MAPK Signalweges.

Mithilfe der gelernten Faktoren konnten auch bekannte nicht letale Medikamenteneffekte systematisch identifiziert werden: Inhibitoren des mTOR-Komplexes zeigten etwa in den Experimenten eine behandlungsinduzierte Morphologie, welcher auf einen positiven Effekt auf Faktor 1 hindeutete. Tatsächlich führte Behandlung von Organoiden mit einem mTOR-Inhibitor in validierenden Experimenten zu einer reaktiven Expression des IGF-Signalwegkomponenten Irs-1. Ein ähnlicher Effekt zeigte sich bei MEK Inhibitoren in Bezug auf Faktor 2. In validierenden Experimenten führte die Behandlung zu einer erhöhten Expression von *LGR5* Transkripten.

In genetisch modifizierten Maus Organoiden wurde ein ähnlicher experimenteller Ansatz verfolgt. Hier wurden drei prominente Faktoren identifiziert: Der erste Faktor unterteilte *Apc* Wildtyp von *Apc*^{-/-} Organoiden. Verlust der *Apc* Funktion führte zu erhöhter Expression von Proliferations- und DNA Reparatur-Markern. Es führte ebenso zu erhöhter Sensibilität gegenüber Perturbationen des Cytoskeletts, zum Beispiel durch Taxane und FAK-Inhibitoren, sowie morphologisch zu einem Verlust der sphärischen und symmetrischen multizellulären Organisation. Organoide mit *Apc*^{-/-} Genotyp zeigten eine Unabhängigkeit von üblicherweise essenziellen Wnt Liganden im Kulturmedium. Mit Bezug auf den zellularen Metabolismus, führte der Verlust von *Apc* zu einer Reduktion von Transkripten der beta-Oxidation, sowie einer Akkumulation von Triacylglycerine und Cholesterolester Speicherlipiden.

Der zweite Faktor unterteilte *Kras*^{G12D/+} Organoide von Wildtyp Organoiden. Organoide mit *Kras*^{G12D/+} Genotyp zeigten Zeichen einer Onkogen-induzierten Seneszenz, reduzierte Expression von Transkripten der beta-Oxidation, eine Akkumulation von Speicherlipiden, sowie eine deutliche Reduktion von Transkripten der oxidativen Phosphorylierung. Es bestand eine hohe relative Sensibilität gegenüber ERK- und MEK-Inhibitoren, und eine geringe relative Sensibilität gegenüber Inhibitoren des EGF Rezeptors.

Der dritte Faktor trennte *Apc*^{-/-} Organoide von *Apc*^{-/-} / *Kras*^{G12D/+} Organoiden. Modelle mit *Apc*^{-/-} / *Kras*^{G12D/+} Genotyp zeigten eine erhöhte Sensitivität gegenüber mTOR-Inhibitoren sowie eine erhöhte Expression einer mTORC1-Aktivierungssignatur.

Wie zuvor konnten die gelernten Faktoren genutzt werden, um nicht letale Medikamenteneffekte systematisch zu identifizieren. Hierbei zeigten Inhibitoren der GSK3-Beta-Kinase einen deutlichen Effekt auf Faktor 1.

Die Ergebnisse dieser Arbeit beleuchten primäre molekulare Faktoren der Organoidarchitektur und ihre molekulare Bedeutung für das kolorektale Karzinom.