

Aus dem

Department für Frauengesundheit  
Universitäts-Frauenklinik

**Etablierung eines patientenabgeleiteten 3D-Tumormodells  
für Brustkrebspatientinnen**

**Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät  
der Eberhard Karls Universität  
zu Tübingen**

**vorgelegt von  
Wagner, Anna  
2023**

Dekan: Professor Dr. B. Pichler

1. Berichterstatter: Professor Dr. A. Hartkopf

2. Berichterstatter: Professor Dr. P. M. Loskill

Tag der Disputation: 04.04.2023

Für meine Eltern,  
Georg,  
meine Geschwister und  
meine allerliebsten Cousinen





# I. Inhaltsverzeichnis

<b>I. Inhaltsverzeichnis.....</b>	<b>IV</b>
<b>II. Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>IX</b>
<b>III. Tabellenverzeichnis .....</b>	<b>XI</b>
<b>IV. Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>XII</b>
<b>1 Einleitung .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Das Mammakarzinom .....</b>	<b>1</b>
1.1.1 Epidemiologie .....	1
1.1.2 Ätiologie .....	3
1.1.3 Diagnostik .....	4
1.1.3.1 Apparative Diagnostik/Diagnosesicherung.....	4
1.1.3.2 Histopathologische Typisierung und Grading.....	4
1.1.3.3 Immunhistochemie .....	5
1.1.3.4 Molekulare Klassifikation .....	7
1.1.3.5 Staging .....	10
1.1.4 Therapie.....	10
1.1.5 Prognose .....	11
<b>1.2 Organoide .....</b>	<b>12</b>
1.2.1 Geschichte des Organoidmodells .....	12
1.2.2 Anwendungsgebiete des Organoidmodells .....	14
1.2.3 Vor- und Nachteile des Organoidmodells .....	17
1.2.4 Organoide in der Krebsforschung.....	21
1.2.4.1 Mammakarzinom-Organoide .....	22
<b>1.3 Zielsetzung .....</b>	<b>28</b>
<b>2 Material und Methoden.....</b>	<b>29</b>
<b>2.1 Einverständniserklärung und Ethikvotum.....</b>	<b>29</b>

<b>2.2</b>	<b>Aufbau einer Tumorzellbank für die Erstellung verschiedener Brustkrebs-Organoidmodelle aus Patientengewebe .....</b>	<b>29</b>
2.2.1	Verarbeitung des Patientengewebes.....	29
2.2.2	Einfrieren und Auftauen der Modelle .....	30
2.2.3	Erstellung einer Mastertabelle mit relevanten Tumor- und Patientendaten .....	31
<b>2.3</b>	<b>Ansatz und Etablierung der Organoidmodelle.....</b>	<b>31</b>
2.3.1	Anlegen der Organoidkulturen.....	31
2.3.2	Nährmedium .....	31
2.3.3	Passagierung der Organoidkulturen .....	32
2.3.4	Etablierung der Organoidkulturen.....	33
2.3.5	Dokumentation des Wachstums .....	33
<b>2.4</b>	<b>Versuch zur Optimierung des Nährmediums für Organoidmodelle triple negativer Originaltumoren .....</b>	<b>33</b>
2.4.1	Auswahl der Organoidkulturen .....	33
2.4.2	Anlegen der Organoidkulturen.....	34
2.4.3	Nährmedium .....	34
2.4.4	Dokumentation des Wachstums .....	36
<b>2.5</b>	<b>Vergleich der Organoidmodelle mit dem ursprünglichen Tumor .....</b>	<b>37</b>
2.5.1	Auswahl der Organoidmodelle.....	37
2.5.2	Konservierung der Organoidmodelle .....	37
2.5.3	Anfertigung von Paraffinschnitten der Organoidmodelle .....	38
2.5.4	Färbung der Schnitte .....	39
2.5.5	Gewinnung der gefärbten Schnitte des Originaltumorgewebes .....	39
2.5.6	Anfertigung von Fotografien der Schnitte des Tumorgewebes und der Organoidmodelle zur Gegenüberstellung .....	39
<b>2.6</b>	<b>Versuch zur Wirkung von Nutlin auf das Wachstum etablierter Organoidmodelle .....</b>	<b>39</b>
2.6.1	Auswahl der Organoidkulturen .....	39

2.6.2	Anlegen der Organoidkulturen.....	40
2.6.3	Nährmedium .....	40
2.6.4	Dokumentation des Wachstums .....	41
<b>3</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>42</b>
<b>3.1</b>	<b>Merkmale der Patientenzellproben in der Tumorzellbank .....</b>	<b>42</b>
3.1.1	Übersicht.....	42
3.1.2	Zusammenfassung der Merkmale .....	43
<b>3.2</b>	<b>Etablierung der Organoidmodelle .....</b>	<b>45</b>
3.2.1	Übersicht.....	45
3.2.2	Wachstum etablierter Organoidmodelle .....	46
3.2.3	Potenzielle Einflussfaktoren auf den Etablierungserfolg.....	50
3.2.3.1	Patientenalter bei OP .....	50
3.2.3.2	Patientengeschlecht .....	51
3.2.3.3	Histopathologischer Typus .....	53
3.2.3.4	Histopathologisches Grading.....	55
3.2.3.5	Rezeptorstatus .....	56
3.2.3.6	Ki-67-Status.....	57
3.2.3.7	Tumorgröße.....	59
3.2.3.8	Tumorstadium.....	61
3.2.3.9	Größe des verarbeiteten Tumorgewebestücks .....	63
3.2.3.10	Neoadjuvante Chemotherapie.....	64
3.2.3.11	Neoadjuvante antihormonelle Therapie.....	65
<b>3.3</b>	<b>Versuch zur Optimierung des Nährmediums für Organoidmodelle triple negativer Originaltumoren .....</b>	<b>67</b>
3.3.1	Übersicht.....	67
3.3.2	Einzelne Modelle .....	68
3.3.2.1	Organoidmodell Nr. 56 .....	68
3.3.2.2	Organoidmodell Nr. 100 .....	73
3.3.2.3	Organoidmodell Nr. 105 .....	78
3.3.2.4	Organoidmodell Nr. 136 .....	82
3.3.2.5	Organoidmodell Nr. 147 .....	84

3.3.3	Zusammenfassung .....	85
<b>3.4</b>	<b>Vergleich der Organoidmodelle mit dem ursprünglichen Tumor .....</b>	<b>86</b>
3.4.1	Übersicht.....	86
3.4.2	Beispiele .....	86
<b>3.5</b>	<b>Versuch zur Wirkung von Nutlin-3a auf das Wachstum etablierter Organoidmodelle .....</b>	<b>88</b>
3.5.1	Versuchsteil 1 .....	89
3.5.2	Versuchsteil 2 .....	90
<b>4</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>91</b>
<b>4.1</b>	<b>Repräsentativität der Biobank .....</b>	<b>91</b>
4.1.1	Patientenalter bei OP.....	91
4.1.2	Patientengeschlecht .....	91
4.1.3	Tumorstatus.....	91
4.1.4	Histopathologie .....	92
4.1.5	Rezeptorstatus.....	93
4.1.6	Ki-67-Status .....	94
4.1.7	Tumorgröße .....	94
4.1.8	Tumorstadium.....	95
4.1.9	Neoadjuvante Vorbehandlung .....	96
4.1.10	Zusammenfassung .....	97
<b>4.2</b>	<b>Potenzielle Einflussfaktoren auf den Etablierungserfolg der Organoidmodelle .....</b>	<b>97</b>
4.2.1	Vergleich mit anderen Studien.....	98
4.2.2	Methodische Unterschiede .....	100
4.2.3	Unterschiedliche Eigenschaften der Originaltumoren.....	103
4.2.3.1	Patientenalter bei OP .....	104
4.2.3.2	Patientengeschlecht .....	104
4.2.3.3	Histopathologischer Typus .....	105
4.2.3.4	Histopathologisches Grading.....	106

4.2.3.5	Rezeptorstatus .....	106
4.2.3.6	Ki-67-Status .....	108
4.2.3.7	Tumorgröße und Tumorstadium .....	109
4.2.3.8	Größe des verarbeiteten Tumorstücks .....	109
4.2.3.9	Neoadjuvante Therapie .....	109
4.2.3.10	Zusammenfassung .....	110
<b>4.3</b>	<b>Versuch zur Optimierung des Nährmediums für Organoidmodelle triple negativer Originaltumoren .....</b>	<b>112</b>
4.3.1	Problematik .....	112
4.3.2	Mediumversuche .....	114
4.3.2.1	Faktoren des Wnt-Signaling-Pathways: Wnt3a und R-Spondin1 bzw. 3	114
4.3.2.2	Inhibitor des TGF $\beta$ /BMP-Signaling-Pathways: Noggin .....	115
4.3.3	Resultate .....	117
4.3.4	Ausblick .....	119
<b>4.4</b>	<b>Konservierung der Tumormerkmale in Mammakarzinom-Organoidmodellen .....</b>	<b>121</b>
4.4.1	Vergleich der Organoidmodelle mit dem ursprünglichen Tumor .....	121
4.4.2	Versuch zur Wirkung von Nutlin-3a auf das Wachstum etablierter Organoidmodelle .....	122
4.4.3	Mögliche Gründe für die Resultate .....	124
4.4.4	Ausblick .....	127
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>129</b>
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>131</b>
<b>7</b>	<b>Erklärung zum Eigenanteil der Dissertationsschrift .....</b>	<b>143</b>
<b>8</b>	<b>Danksagung .....</b>	<b>144</b>

## II. Abkürzungsverzeichnis

adDMEM/F12	Advanced DMEM/F12; 1:1-Mischung aus Dulbecco's Modified Eagle Medium und Ham's F12
adDMEM/F12+++	Advanced DMEM/F12 mit Zusatz von je 5mL GlutaMAX, HEPES Buffer Solution und Penicillin/Streptomycin
ALK5	Aktivin A Receptor Type II-Like Kinase 5
BME	Basement Membrane Extract
BMP	Bone Morphogenetic Protein
BRCA1/2	BReast CAncer Syndromgen 1/2
BSA	Bovine Serum Albumin
DCIS	duktales Carcinoma in situ
DNA	Deoxyribonucleic Acid
DPBS	Dulbecco's Phosphate Buffered Saline
EGF	Human Epidermal Growth Factor
EGFR	Human Epidermal Growth Factor Receptor
ER	Östrogenrezeptor
FACS	Fluorescence-activated Cell Sorting
FCS	Fetal Calf Serum
FGF7	Human Fibroblast Growth Factor 7
FGF10	Human Fibroblast Growth Factor 10
FGFR	Human Fibroblast Growth Factor Receptor
GlutaMAX	L-Alanin-L-Glutamin
HE-Färbung	Hämatoxylin-Eosin-Färbung
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
LGR4/5	Leucine-rich repeat containing G-protein-coupled Receptor 4/5
LK	Lymphknoten
LRP	Low Density Lipoprotein Receptor-

	related Protein
L-WRN	Wnt3a, R-Spondin3 und Noggin sezernierende Zellen
MAP	Mitogen-activated Protein
MDM2	Mouse Double Minute 2 Homolog
mRNA	messenger RNA
NAD <sup>+</sup>	Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid <sup>+</sup>
NST	no special type
PARP	Poly(ADP-Ribose)-Polymerase
pCR	pathologic Complete Response
PDX	Patient-derived Tumor Xenografts
PR	Progesteronrezeptor
RNA	Ribonucleic Acid
ROCK	Rho-associated Protein Kinase
shRNA	small hairpin RNA
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
TGF- $\beta$	Transforming Growth Factor $\beta$

### III. Tabellenverzeichnis

<b>Tabelle 1:</b> Bestimmung der intrinsischen Mammakarzinom-Subtypen	S. 08
<b>Tabelle 2:</b> Zusammensetzung des Brustkrebs-Organoid-Nährmediums	S. 31
<b>Tabelle 3:</b> Eigenschaften der triple negativen Organoidmodelle im Mediumversuch	S. 33
<b>Tabelle 4:</b> Zusammensetzung Nährmedium Nr. 1 Mediumversuch	S. 34
<b>Tabelle 5:</b> Zusammensetzung Nährmedium Nr. 2 Mediumversuch	S. 35
<b>Tabelle 6:</b> Zusammensetzung Nährmedium Nr. 3 Mediumversuch	S. 35
<b>Tabelle 7:</b> Zusammensetzung Nährmedium Nr. 4 Mediumversuch	S. 35
<b>Tabelle 8:</b> Zusammensetzung Nährmedium Nr. 5 Mediumversuch	S. 36
<b>Tabelle 9:</b> Eigenschaften der Organoidmodelle zum Vergleich mit dem Originaltumor	S. 37
<b>Tabelle 10:</b> Eigenschaften der Organoidmodelle im Nutin-Versuch	S. 40
<b>Tabelle 11:</b> Zusammenfassung der Tumor- und Patientendaten	S. 44
<b>Tabelle 12:</b> Eigenschaften der etablierten Organoidmodelle	S. 46



## IV. Abbildungsverzeichnis

<b>Abbildung 1:</b> Verteilung der Fall- und Todeszahlen für die zehn häufigsten Krebsformen unter Frauen weltweit 2018	S. 1
<b>Abbildung 2:</b> Prozentualer Anteil der häufigsten Tumorlokalisationen an allen Krebsneuerkrankungen in Deutschland 2016	S. 2
<b>Abbildung 3:</b> Prozentualer Anteil der häufigsten Tumorlokalisationen an allen Krebssterbefällen in Deutschland 2016	S. 3
<b>Abbildung 4:</b> Übersicht, von wie vielen Tumorzellproben Organoidkulturen angelegt wurden	S. 45
<b>Abbildung 5:</b> Übersicht, wie viele der angelegten Organoidmodelle etabliert werden konnten	S. 46
<b>Abbildung 6:</b> Wachstum des Organoidmodells BC-ORG #66	S. 47
<b>Abbildung 7:</b> Wachstum des Organoidmodells BC-ORG #158	S. 47
<b>Abbildung 8:</b> Wachstum des Organoidmodells BC-ORG #68	S. 48
<b>Abbildung 9:</b> Wachstum des Organoidmodells BC-ORG #159	S. 48
<b>Abbildung 10:</b> Wachstum des Organoidmodells BC-ORG #109	S. 49
<b>Abbildung 11:</b> Patientenalter und Organoidwachstum	S. 51
<b>Abbildung 12:</b> Patientengeschlecht und Organoidwachstum	S. 52
<b>Abbildung 13:</b> Wachstum des Organoidmodells BC-ORG #13 in Passage 12	S. 53

<b>Abbildung 14:</b> Histopathologischer Typ und Organoidwachstum	S. 54
<b>Abbildung 15:</b> Histopathologisches Grading und Organoidwachstum	S. 55
<b>Abbildung 16:</b> Rezeptorstatus und Organoidwachstum	S. 57
<b>Abbildung 17:</b> Proliferationsrate und Organoidwachstum	S. 58
<b>Abbildung 18:</b> Größe/Ausdehnung des Originaltumors und Organoidwachstum	S. 60
<b>Abbildung 19:</b> Tumorstadium und Organoidwachstum	S. 62
<b>Abbildung 20:</b> Größe des verarbeiteten Tumorgewebestücks und Organoidwachstum	S. 64
<b>Abbildung 21:</b> Neoadjuvante Chemotherapie und Organoidwachstum	S. 65
<b>Abbildung 22:</b> Neoadjuvante antihormonelle Therapie und Organoidwachstum	S. 66
<b>Abbildung 23:</b> Organoidmodell BC-ORG #56, erster Ansatz Mediumversuch	S. 68
<b>Abbildung 24:</b> Organoidmodell BC-ORG #56, Passage 1 Mediumversuch	S. 70
<b>Abbildung 25:</b> Organoidmodell BC-ORG #56, Passage 2 und 3 Mediumversuch	S. 71
<b>Abbildung 26:</b> Organoidmodell BC-ORG #100, erster Ansatz Mediumversuch	S. 73
<b>Abbildung 27:</b> Organoidmodell BC-ORG #100, Passage 1 Mediumversuch	S. 75

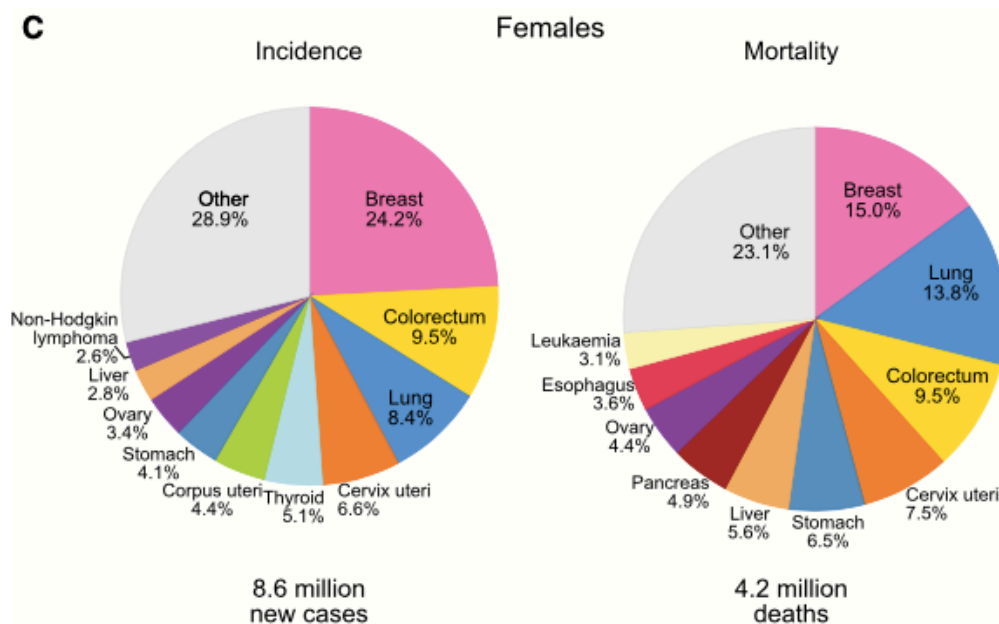
<b>Abbildung 28:</b> Organoidmodell BC-ORG #100, Passage 2 und 3 Mediumversuch	S. 76
<b>Abbildung 29:</b> Organoidmodell BC-ORG #105, erster Ansatz Mediumversuch	S. 78
<b>Abbildung 30:</b> Organoidmodell BC-ORG #105, Passage 1 Mediumversuch	S. 80
<b>Abbildung 31:</b> Organoidmodell BC-ORG #105, Passage 2 Mediumversuch	S. 81
<b>Abbildung 32:</b> Organoidmodell BC-ORG #136, erster Ansatz Mediumversuch	S. 82
<b>Abbildung 33:</b> Organoidmodell BC-ORG #146, erster Ansatz Mediumversuch	S. 84
<b>Abbildung 34:</b> Vergleich des Organoidmodells BC-ORG #91 mit dem Originaltumor	S. 87
<b>Abbildung 35:</b> Vergleich des Organoidmodells BC-ORG #102 mit dem Originaltumor	S. 87
<b>Abbildung 36:</b> Vergleich des Organoidmodells BC-ORG #97 mit dem Originaltumor	S. 87
<b>Abbildung 37:</b> Versuch zur Wirkung von Nutlin3a auf das Organoidwachstum, Teil 1	S. 89
<b>Abbildung 38:</b> Versuch zur Wirkung von Nutlin3a auf das Organoidwachstum, Teil 2	S. 90

# 1 Einleitung

## 1.1 Das Mammakarzinom

### 1.1.1 Epidemiologie

Das maligne Mammakarzinom ist weltweit die am häufigsten diagnostizierte Krebserkrankung der Frau und auch für den größten Teil der weiblichen Krebstodesfälle verantwortlich (Bray et al., 2018; siehe Abbildung 1).

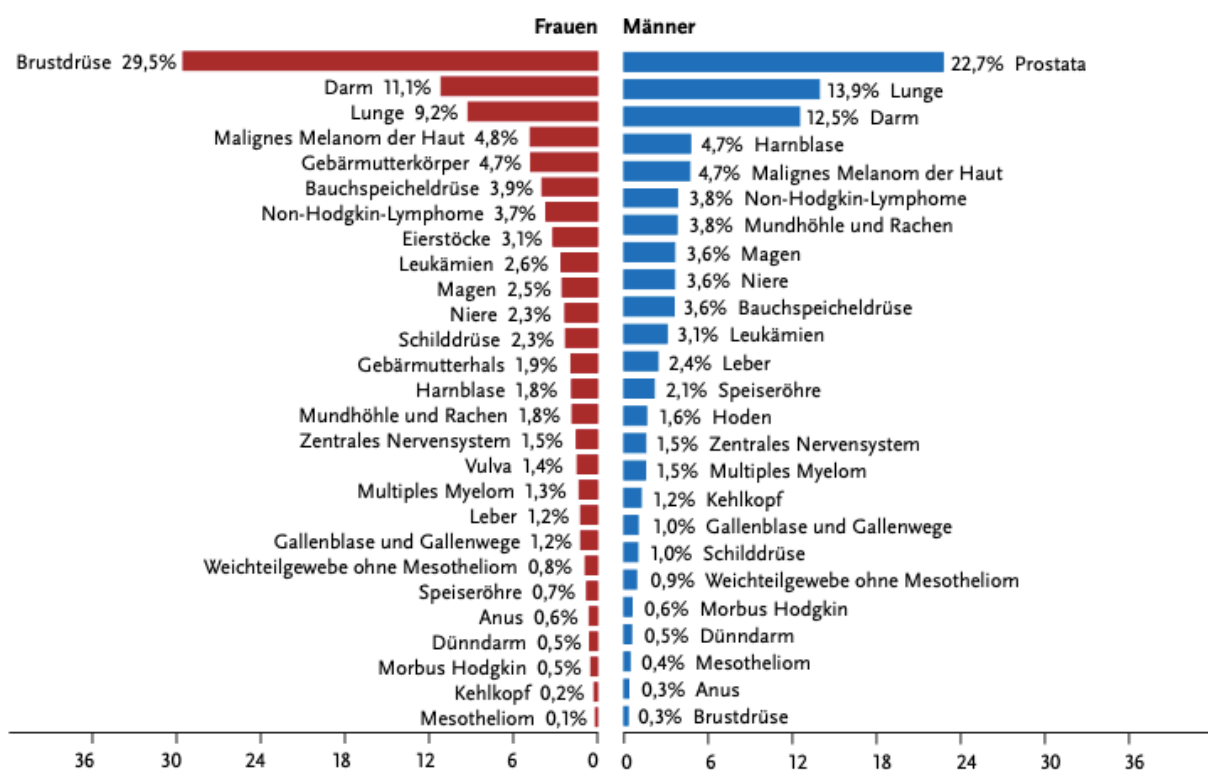


**Abbildung 1:** Verteilung der Fall- und Todeszahlen für die zehn häufigsten Krebsformen unter Frauen weltweit im Jahr 2018 (Bray et al., Global Cancer Statistics 2018: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin*, 68, 394–424.)

Die Inzidenz ist besonders hoch in Erste-Welt-Regionen wie Australien/Neuseeland, Nordeuropa, Westeuropa und Nordamerika (Bray et al., 2018). Dieser Umstand wird einer höheren Prävalenz einiger bekannter Risikofaktoren in solch hochentwickelten Ländern zugeschrieben. Bei diesen Faktoren handelt es sich um eine frühe Menarche und späte Menopause, Kinderlosigkeit oder höheres Alter bei der ersten Geburt, verkürzte Stillperioden, Nutzung oraler Kontrazeptiva, Übergewicht und Bewegungsmangel, sowie Genuss von Alkohol und Rauchen (Brinton et al., 2018). Obwohl weiterhin hoch, begannen die Inzidenzraten in solch wohlhabenden Ländern in den 2000er Jahren jedoch leicht zu sinken, was teilweise der Abkehr von der postmenopausalen Hormonersatztherapie zugeschrieben wird, nachdem die Women's Health Initiative diese mit einem erhöhten Erkrankungsrisiko für

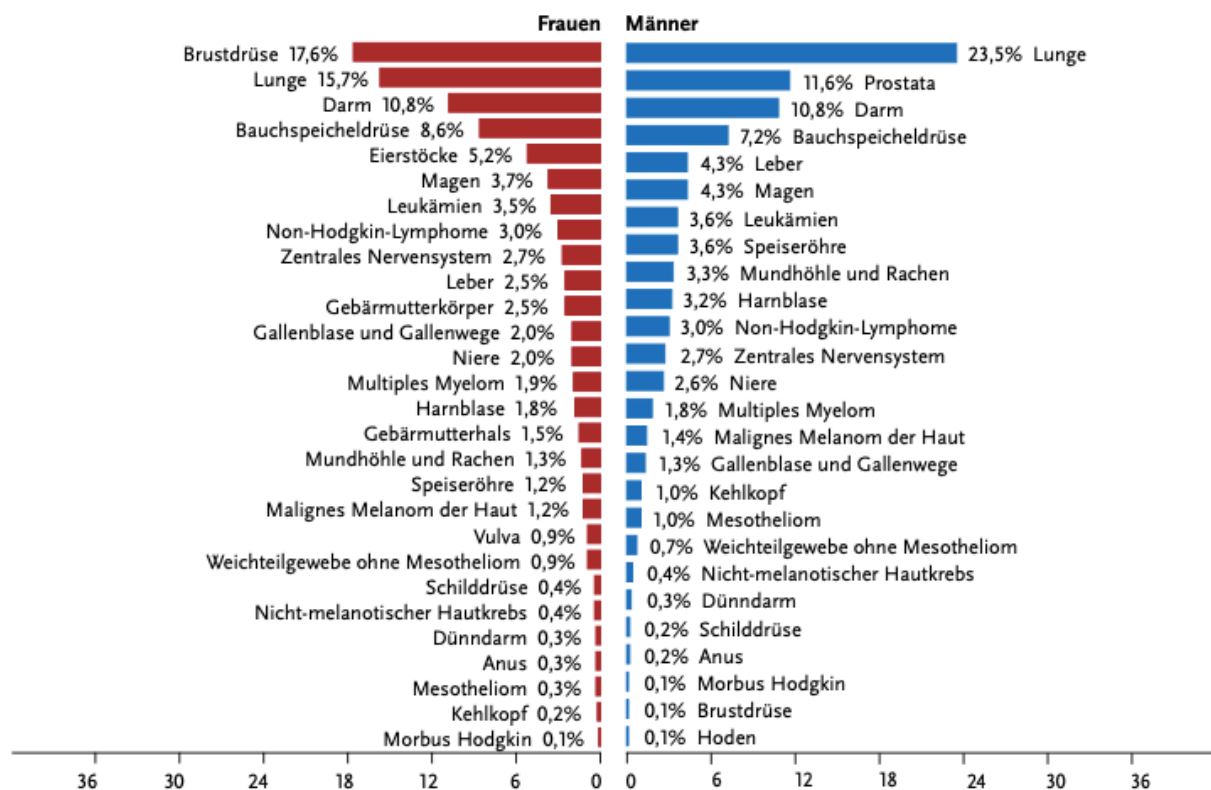
Mammakarzinome in Verbindung gebracht hatte (Zbuk et al., 2012 und Rossouw et al., 2002.). Erfreulicherweise sinken auch die Brustkrebs-Mortalitätsraten in diesen Ländern; dank des oft frühen Stadiums bei Entdeckung durch Screening-Programme und des Zugangs zu modernen, effektiven Behandlungsmethoden (Youlden et al., 2012).

Auch in Deutschland stellt das Mammakarzinom mit zuletzt rund 69.000 Neuerkrankungen pro Jahr die mit Abstand häufigste Krebserkrankung der Frau dar (Barnes et al., 2019; siehe Abbildung 2).



**Abbildung 2:** Prozentualer Anteil der häufigsten Tumorlokalisationen an allen Krebsneuerkrankungen in Deutschland 2016 (ohne nicht-melanotischen Hautkrebs) (Barnes et al., Krebs in Deutschland für 2015/2016. 12. Ausgabe. Robert Koch-Institut (Hrsg.) und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (Hrsg.), Berlin, 2019. 78-81.)

Das Mammakarzinom ist des Weiteren auch in Deutschland die prozentual häufigste Krebstodesursache der Frau (Barnes et al., 2019, siehe Abbildung 3).



**Abbildung 3:** Prozentualer Anteil der häufigsten Tumorlokalisationen an allen Krebssterbefällen in Deutschland 2016 (Barnes et al., Krebs in Deutschland für 2015/2016. 12. Ausgabe. Robert Koch-Institut (Hrsg.) und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (Hrsg.), Berlin, 2019. 78-81.)

### 1.1.2 Ätiologie

Neben den bereits unter Punkt 1.1.1 aufgelisteten Risikofaktoren, die mit einem westlichen Lebensstil assoziiert sind, gelten als weitere wichtige Risikofaktoren für die Entstehung eines Mammakarzinoms noch das Alter und die genetische Prädisposition. Das Risiko, an Brustkrebs zu erkranken, nimmt mit dem Alter vor der Menopause stärker zu als nach der Menopause (ca. 8% pro Jahr vs. ca. 2% pro Jahr), da nach der Menopause die natürliche Geschlechtshormonproduktion des weiblichen Körpers stark abnimmt (Colditz et al., 2000). Der Brustkrebs zeigt darüber hinaus eine höhere Tendenz zur familiären Häufung als andere maligne Neubildungen des Menschen (Rakha et al., 2019/1). Als Gründe hierfür sind besonders die beiden hochpenetranten Gene BRCA (BReast CAncer) 1 und 2 zu nennen, die das Risiko der Entwicklung eines Mammakarzinoms stark erhöhen. Es

wurden in den letzten Jahren jedoch zusätzlich viele weitere Gene und Polymorphismen identifiziert, die mit einem erhöhten Brustkrebsrisiko assoziiert sind und es wird von einer polygenetischen Ätiologie dieser Krankheit ausgegangen (Rakha et al., 2019/1).

### **1.1.3 Diagnostik**

#### ***1.1.3.1 Apparative Diagnostik/Diagnosesicherung***

Laut der aktuellen S3-Leitlinie zur Früherkennung, Diagnose, Therapie und Nachsorge des Mammakarzinoms soll Frauen zwischen dem 50. und 69. Lebensjahr die Teilnahme am Nationalen Mammographie Screening Programm empfohlen werden. Bei nicht klar sichtbaren Befunden oder hoher Dichte des Brustgewebes kann eine zusätzliche Mammasonographie die Sensitivität erhöhen. Dies ist auch die Methode der Wahl zur Abklärung von Verdachtsfällen bei Frauen unter 40 Jahren. Das MRT als sensitivste, aber nicht spezifischste Methode bleibt meist der Diagnostik bei Hochrisikopatientinnen vorbehalten (Rakha et al., 2019/1). Solange in der Bildgebung kein eindeutig benigner Befund wie z.B. bei einer Zyste vorliegt, ist die histologische Abklärung per minimalinvasiver Hochgeschwindigkeits-Stanzbiopsie oder Vakuumbiopsie indiziert (Rakha et al., 2019/1 und Hellerhoff et al., 2019).

#### ***1.1.3.2 Histopathologische Typisierung und Grading***

Mammakarzinome können nach ihrem histopathologischen Muster in verschiedene histopathologische Untergruppen unterteilt werden (Rakha et al., 2019/1). Am häufigsten ist hierbei das invasive breast carcinoma of no special type (NST), das 40-75% aller Mammakarzinome ausmacht (Mayr et al., 2019). Es handelt sich hierbei um eine große, heterogene Gruppe von Karzinomen, die morphologisch keinem bestimmten histopathologischen Typus zugeteilt werden können (Rakha et al., 2019/2). Des Weiteren gibt es den invasiv-lobulären Typus, dem 5-15% der Mammakarzinome zuzuordnen sind, das medulläre Karzinom mit 1-7% und das tubuläre, das muzinöse und das mikropapilläre Karzinom (jeweils 1-2% aller Mammakarzinome). Zusätzlich gibt es noch ein paar weitere, seltene histopathologische Typen, die jeweils unter 1% der Mammakarzinome ausmachen (Mayr et al., 2019). Der histopathologische Typus eines Karzinoms korreliert meist

mit anderen Tumormerkmalen wie der molekularen Klassifikation, dem Rezeptorstatus, bestimmten Mutationen im Erbgut des Tumors, dem histopathologischen Grading, dem Wachstums- und Metastasierungsverhalten oder auch dem Patientenalter bei Manifestation. Daher hat der histopathologische Typus eines Mammakarzinoms durchaus relevante prognostische und prädiktive Implikationen (Rakha et al., 2019/2, Shin et al., 2019, van Deurzen et al., 2019, Wen et al., 2019 und Marchiò et al., 2019).

Ein weiteres wichtiges Werkzeug zur histopathologischen Klassifikation von Mammakarzinomen stellt das histopathologische Grading dar. Dieses teilt die Karzinome je nach ihrem Differenzierungsgrad mit Hilfe des nach Elston und Ellis modifizierten BRE-Scores in drei Gruppen ein, von gut differenziert (low grade, G1) über mäßig differenziert (intermediate grade, G2) bis schlecht differenziert (high grade, G3). Das Grading richtet sich dabei nach drei Merkmalen des Tumorgewebes: Bildung tubulärer Strukturen, Kernpleomorphie und Mitoserate (Elston und Ellis, 1991). Auch der histopathologische Grad ist ein wichtiger Prognosefaktor, da er signifikant mit dem Rezeptorstatus, dem Lymphknotenstatus und der Rezidiv- und Mortalitätsrate korreliert (Mayr et al., 2019).

### **1.1.3.3 Immunhistochemie**

Bei allen Mammakarzinomen wird routinemäßig von Seiten der Pathologie der Rezeptorstatus mit Hilfe des operativ entfernten Tumorgewebes oder der Stanzbiopsien bestimmt (Hammond et al., 2010 und Wolff et al., 2013). Es handelt sich hierbei um die Hormonrezeptoren für Östrogen bzw. Progesteron und den Wachstumsfaktorrezeptor Her2/neu (ERBB2).

Mammakarzinome gelten als Östrogen- bzw. Progesteronrezeptor-positiv, wenn  $\geq 1\%$  ihrer Zellen in der immunhistochemischen Färbung den Rezeptor exprimieren (ER- bzw. PR-positiv) und als negativ, wenn sie dies nicht tun (ER- bzw. PR-negativ) (Hammond et al., 2010). Allerdings gibt es Hinweise, dass die ER- niedrig positiven Tumoren (1-10% ER-positive Zellen) in ihren biologischen Eigenschaften eher den ER-negativen Mammakarzinomen ähneln (Rakha et al., 2019/1). Auch der Hormonrezeptorstatus stellt einen wichtigen prognostischen und prädiktiven Marker für Mammakarzinome dar. Patientinnen mit Östrogenrezeptor-positiven Tumoren zeigen ein besseres rezidivfreies Überleben und ein besseres Gesamtüberleben als Patientinnen mit ER-negativen Tumoren (Fisher et al., 1988). Auch das



Metastasierungsverhalten von ER-positiven Mammakarzinomen unterscheidet sich von dem ER-negativer Karzinome (Degenhardt et al., 2019). Der Progesteronrezeptorstatus wird hauptsächlich dazu genutzt, ER-positive Tumoren in prognostischer Hinsicht genauer zu kategorisieren (Rakha et al., 2019/1). So scheinen Patientinnen mit ER-positiven, aber PR-negativen Tumoren eine etwas schlechtere Prognose aufzuweisen als Patientinnen, deren Tumoren für beide Hormonrezeptoren positiv sind (Degenhardt et al., 2019). Noch wichtiger ist jedoch die prädiktive Bedeutung des Hormonrezeptorstatus in Hinsicht auf das Ansprechen auf eine antiöstrogene Therapie. Weibliches Östrogen (Estradiol E2) stimuliert das Wachstum von Brustkrebszellen (Stanford et al., 1986). Schon ab 1% ER-positiver Tumorzellen profitieren Patientinnen daher von einer solchen adjuvanten antiendokrinen Therapie mit selektiven Östrogen-Rezeptor Modulatoren wie Tamoxifen oder Aromatasehemmern (Hammond et al., 2010 und Dowsett et al., 2010). Auch solche Patientinnen, deren Tumor Östrogenrezeptor-negativ, aber Progesteronrezeptor-positiv ( $\geq 10\%$  PR-positive Zellen) ist, profitieren davon (Stendahl et al., 2006). Außerdem sinkt das Ansprechen auf eine neoadjuvante Chemotherapie, je höher die Hormonrezeptor-Expression ist (Degenhardt et al., 2019).

Her2/neu ist eine typische Rezeptortyrosinkinase und damit unter anderem ein Wachstumsfaktorrezeptor (Yarden et al., 2001). Mammakarzinome gelten als Her2/neu-positiv, wenn ihre Zellen in der immunhistochemischen Färbung die Rezeptortyrosinkinase Her2/neu überexprimieren oder das ERBB2-Gen in der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung amplifiziert ist (Wolff et al., 2013). Dies ist bei 10-20% aller Mammakarzinome der Fall (Rakha et al., 2019/1). Eine Überexpression von Her2/neu führt zu vermehrter Mitose, Inhibition der Apoptose, Neoangiogenese, Tumorzellmigration und Invasion (Holbro et al., 2003). Dementsprechend zeigten einige Studien eine Korrelation dieser Her2/neu-Überexpression mit einer schlechteren Prognose (Slamon et al., 1987 und Chia et al., 2008) und einem schlechteren Ansprechen auf konventionelle Chemotherapie (Stal et al., 1995 und Miles et al., 1999). Auch bei diesem Biomarker steht jedoch die prädiktive Bedeutung im Vordergrund, und zwar hinsichtlich des Ansprechens auf eine zielgerichtete Anti-Her2/neu-Therapie, z.B. mit Hilfe des Anti-Her2/neu-Antikörpers Trastuzumab (Herceptin) (Rakha et al., 2019/1). Eine Hinzunahme dieses Medikaments zur adjuvanten Chemotherapie führt zu einer Verbesserung des Therapieansprechens

und auch des Outcomes bei Patientinnen mit Her2/neu-positiven Mammakarzinomen (Slamon et al., 2001).

Ein weiterer immunhistochemisch ermittelbarer Biomarker ist der Ki-67-Proliferationsindex. Das nukleäre Protein Ki-67 wird bei Mammakarzinomen als Proliferationsmarker verwendet, da es in proliferierenden Zellen exprimiert wird (Gerdes et al., 1983). Angegeben wird der MIB-1 Labeling Index als Prozentsatz Ki-67 positiver Zellen innerhalb des Tumorgewebes. Bei MIB-1 handelt es sich um den Goldstandard der Anti-Ki-67-Antikörper (Dowsett et al., 2011). Es gibt hierbei keinen international gültigen Standard für die Methodik der Bestimmung des Ki-67-Proliferationsindex, nur Empfehlungen (Dowsett et al., 2011). Genauso wenig gibt es aktuell eine international gültige Antwort auf die Frage, ab wann ein Ki-67-Wert als hoch oder niedrig zu betrachten ist (Degenhardt et al., 2019). In der vorliegenden Arbeit wurden die Cut-off-Werte von  $\leq 10\%$  Ki-67-positiver Zellen und  $>25\%$  Ki-67-positiver Zellen gewählt, da diese laut der St.-Gallen Konsensus Konferenz 2015 als „gering proliferierend“ ( $\leq 10\%$ ) bzw. „hochproliferativ“ ( $>25\%$ ) eingestuft werden sollten (Coates et al., 2015). Die Proliferationsrate ist ein wichtiger Parameter bei der Einschätzung der Aggressivität eines Mammakarzinoms (Rakha et al., 2019/1). Ein hoher Ki-67-Proliferationsindex korreliert mit einem erhöhten Risiko für die Entwicklung von Fernmetastasen (Colzani et al., 2014). In der aktuellen S3-Leitlinie wird außerdem die Hinzunahme von Ki-67 zu den konventionellen Prognosefaktoren empfohlen, da es die Prognoseabschätzung bei Frauen mit histologisch gesichertem Mammakarzinom mit dem häufigen Rezeptorstatus ER+ PR+ Her2/neu- hinsichtlich einer Entscheidung für oder gegen eine adjuvante Chemotherapie verbessert.

### **1.1.3.4 Molekulare Klassifikation**

In den letzten Jahren wurden viele Anstrengungen unternommen, Brustkrebs auch auf molekularer Ebene zu klassifizieren, um eine bessere Personalisierung der Therapie dieser Krankheit erreichen zu können. Die wichtigste Entdeckung war hierbei die Existenz von vier verschiedenen intrinsischen molekularen Brustkrebs-Subtypen: luminal A, luminal B, Her2-enriched und basal-like. Diese lassen sich wiederum teilweise in weitere Subtypen unterteilen (Rakha et al., 2019/1). Die Klassifikation beruht auf der Tatsache, dass menschliches Brustdrüsengewebe aus zwei verschiedenen epithelialen Zelltypen aufgebaut ist; den luminalen Zellen und den basalen oder myoepithelialen Zellen. Diese unterscheiden sich in einigen

immunhistochemischen Markern; so exprimieren die beiden Zelltypen unterschiedliche Zytokeratine und nur die luminalen Zellen tragen Hormonrezeptoren (Kumar und Aggarwal, 2016). Ein Gentest über 50 verschiedene Gene wurde entwickelt, um die Einteilung der Mammakarzinome in diese Kategorien zu vereinheitlichen und zu standardisieren (Parker et al., 2009). Wegen der hohen Kosten und mancherorts mangelnden Verfügbarkeit solcher PCR-Tests (Goldhirsch et al., 2013) und der daraus folgenden geringen klinischen Praktikabilität dieses Klassifikationssystems (Kumar und Aggarwal, 2016) kann man die Einteilung von Mammakarzinomen in die molekularen Subtypen auch mit Hilfe der oben beschriebenen immunhistochemischen Marker annähern (Goldhirsch et al., 2013, siehe Tabelle 1).

Luminal A-like	<ul style="list-style-type: none"> <li>• ER positiv</li> <li>• PR positiv</li> <li>• Her2 negativ</li> <li>• Ki-67 Proliferationsindex niedrig</li> </ul>
Luminal B-like (Her2-negativ)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• ER positiv</li> <li>• Her2 negativ</li> <li>• mindestens eines der folgenden Merkmale: <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Ki-67 Proliferationsindex hoch</li> <li>▪ PR negativ oder niedrig</li> </ul> </li> </ul>
Luminal B-like (Her2-positiv)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• ER positiv</li> <li>• Her2 überexprimiert</li> <li>• jeder Ki-67 Proliferationsindex</li> <li>• PR positiv oder negativ</li> </ul>
Her2-positiv (non-luminal)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Her2 überexprimiert</li> <li>• ER negativ</li> <li>• PR negativ</li> </ul>
Triple-negativ	<ul style="list-style-type: none"> <li>• ER negativ</li> <li>• PR negativ</li> <li>• Her2 negativ</li> </ul>

**Tabelle 1:** Bestimmung der intrinsischen Subtypen von frühen Mammakarzinomen mit Hilfe immunohistochemischer Surrogatparameter nach der 13. St Gallen International Breast Cancer Conference nach Goldhirsch et al., 2013 (Rakha et al., 2019/1).

Des Weiteren gibt es noch den Subtyp des normal-like Brustkrebs (Rakha et al., 2019/1), dem Tumore zuzuordnen sind, die keine der oben genannten Kriterien erfüllen (Kumar und Aggarwal, 2016). Ein paar weitere seltene Subtypen, wie der Claudin-low Subtyp, dem hauptsächlich triple negative Karzinome (ER– PR– Her2/neu–) angehören (Rakha et al., 2019/1) und der vermehrt mesenchymale Marker exprimiert (Kumar und Aggarwal, 2016), wurden nach zusätzlichen Genexpressionsanalysen hinzugefügt (Garrido-Castro et al., 2019).

Der Cut-off Wert, der hier bestimmt, ob der Ki-67-Proliferationsindex als „hoch“ oder „niedrig“ eingestuft wird, liegt bei 14% Ki-67-positiver Zellen (Goldhirsch et al., 2013). Triple negative Mammakarzinome können noch weiter unterteilt werden. Es gibt hierbei zwei verschiedene Vorgehensweisen, die die triple negativen in basal-like 1, basal-like 2, mesenchymal und luminal AR Karzinome (Lehmann et al., 2011) beziehungsweise in basal-like immune-activated, basal-like immunosuppressed, mesenchymal und luminal AR Karzinome (Burstein et al., 2015) einteilen. Für die weitere molekulare Unterteilung triple negativer Mammakarzinome gibt es jedoch noch keinen etablierten internationalen Standard (Rakha et al., 2019/1).

Die Einteilung der Karzinome nach intrinsischen molekularen Subtypen hat ebenfalls sowohl prognostischen als auch prädiktiven Wert. So sind luminal B-like Tumoren beispielsweise deutlich aggressiver als luminal A-like Tumoren und haben eine schlechtere Prognose. Auch die Prognose von Her2/neu-positiven non-luminal und triple negativen Karzinomen ist vergleichsweise schlecht. Luminal A-like Tumoren werden daher meistens mit alleiniger anti-endokriner Therapie behandelt, nur in bestimmten Fällen wird eine Chemotherapie hinzugenommen. Patient\*innen mit luminal-B like Tumoren, die Her2/neu-negativ sind, erhalten dagegen meist eine kombinierte antihormonelle und Chemotherapie und luminal B-like Tumoren, die Her2/neu-positiv sind, werden zusätzlich mit gezielten Anti-Her2/neu-Therapeutika behandelt. Patient\*innen mit Her2/neu-positiven non-luminal Karzinomen erhalten ebenfalls gezielte Anti-Her2/neu-Therapeutika plus Chemotherapie, jedoch wäre eine antihormonelle Therapie bei ihnen wirkungslos. Bei triple negativen Karzinomen hingegen bleiben Chemotherapeutika die einzige wirksame medikamentöse Therapieoption (Goldhirsch et al., 2013).

### **1.1.3.5 Staging**

Das Staging maligner Mammakarzinome erfolgt nach dem TNM-System. Dieses wird regelmäßig überarbeitet und von der Union for International Cancer Control (UICC) (Brierly et al., 2017) und dem American Joint Committee on Cancer (AJCC) (Amin et al., 2017) veröffentlicht. Es wird hierbei die Ausbreitung des Primärtumors (T), das Vorhandensein von Metastasen in regionären Lymphknoten (N) und von Fernmetastasen (M) evaluiert. Die Fernmetastasierung beim Mammakarzinom betrifft am häufigsten periklavikuläre und intrathorakale Lymphknoten, die Knochen, die Lunge/Pleura und die Leber (Hellerhoff et al., 2019). Die TNM-Klassifikation erfolgt sowohl auf klinischem (körperliche Untersuchung, apparative Diagnostik – cT, cN, cM) als auch pathologischem Wege (pathologische Untersuchung von Biopsaten und OP-Präparaten – pT, pN). Mit den Informationen aus diesen Untersuchungen lassen sich Mammakarzinomerkrankungen dann gemäß den Standards des American Joint Committee on Cancer in klinische Stadien einteilen (Stadium 0 bis IV) (Brierly et al., 2017 und Amin et al., 2017). Diese Stadien haben sowohl prognostische Implikationen (siehe Punkt 1.1.5) als auch Auswirkung auf die Therapieentscheidung; beispielsweise was den Stellenwert einer systemischen Therapie in der Behandlung des/r jeweiligen Patient\*in angeht (Rakha et al., 2019/1).

### **1.1.4 Therapie**

Die Standard-Behandlungsmethoden für Brustkrebs sind derzeit operative Tumorentfernung, Radiotherapie, zytotoxische Chemotherapie und/oder Therapien, die gezielt auf bestimmte Eigenschaften des Karzinoms abzielen, wenn die Tumorbiologie dies zulässt (Fisher et al., 2002). Die Entwicklung solcher personalisierter Therapiekonzepte ist besonders wichtig, da die Standardtherapien Radio- und zytotoxische Chemotherapie weiterhin viele schwere Nebenwirkungen verursachen und das Risiko für Zweitkarzinome (wenn auch nur leicht) erhöhen (Ode, 2014). Unter diesen gezielten Therapien sind die antihormonelle und die Anti-Her2/neu-Therapie die am besten evaluierten und am meisten genutzten Optionen (Nagini, 2017). Die antihormonelle Therapie wird angewandt, wenn ein Mammakarzinom Östrogenrezeptor- oder Progesteronrezeptor-positiv ist (Stendahl et al., 2006 und Dowsett et al., 2010, siehe Punkt 1.1.3.3). Es werden hierfür selektive Östrogenrezeptor-Modulatoren wie Tamoxifen oder Raloxifen, reine Östrogenrezeptor-Antagonisten wie Fulvestrant oder Aromatasehemmer eingesetzt.

Mammakarzinome können allerdings Resistenzen gegen diese Therapeutika aufweisen/entwickeln; durch Verlust der Östrogenrezeptorexpression, Mutationen im Östrogenrezeptorgen oder Überaktivierung anderer Signalwege wie des ERBB1/EGFR-Signalwegs (Clarke et al., 2015). Des Weiteren weist auch die antihormonelle Therapie vielfältige, teils schwere Nebenwirkungen auf (Odle, 2014). Her2/neu-positive Tumoren werden mit Anti-Her2/neu-Antikörpern wie Trastuzumab, Pertuzumab oder Neratinib behandelt (Kreutzfeldt et al., 2020). Auch gegen Trastuzumab können Mammakarzinome jedoch resistent sein/werden; durch Dimerisierung mit einem anderen Mitglied der ERBB-Familie oder konstitutive Her2/neu-Aktivierung (Vu et al., 2012). Es gibt zudem zahlreiche neue Ansätze für die personalisierte Brustkrebstherapie, wie etwa PI3K-Inhibitoren, mTOR-Inhibitoren und CDK4/6-Inhibitoren für Hormonrezeptor-positive Karzinome (Parsons et al., 2020), neue Anti-Her2/neu-Rezeptor-Antikörper wie Margetuximab, Tyrosinkinasehemmer wie Tucatinib, panTK-Inhibitoren oder PD-L1-Antikörper für Her2/neu-positive Karzinome (Kreutzfeldt et al., 2020) und PD-1- und PARP-Inhibitoren oder Antikörper-Drug-Konjugate für (bestimmte) triple negative Karzinome (Lyons, 2019). Dennoch variiert das Ansprechen auf solche gezielten Therapien für alle Mammakarzinom-Subtypen zwischen 15 und 40% (Parsons et al., 2020) und trotz aller Innovationen in der Brustkrebstherapie in den letzten Jahren sind die klinischen Verbesserungen besonders bei der Behandlung fortgeschrittener Krankheitsbilder eher dürftig. So ist die Lebenserwartung von Patient\*innen mit fernmetastasierten Karzinomen weiterhin sehr gering (siehe Punkt 1.1.5) und konnte bisher therapeutisch auch nur um ein paar Monate verlängert werden (Anastasiadi et al., 2017 und Parsons et al., 2020). All dies zeigt die Notwendigkeit für weitere Fortschritte in der Entwicklung personalisierter Therapiekonzepte für diese heterogene Krankheit. Die Organoidtechnologie könnte dabei einen Schlüssel zu einer individuelleren, effektiveren Behandlung des malignen Mammakarzinoms darstellen (Sachs et al., 2018).

### 1.1.5 Prognose

Die Prognose bei Erkrankung an einem malignen Mammakarzinom ist stark von den vielen oben genannten (und noch zahlreichen weiteren) Faktoren abhängig. Allgemein liegt die 5-Jahres-Überlebensrate für nicht metastasierte Mammakarzinome (betrifft ca. 60% der Patient\*innen) bei etwa 95%. Bei Metastasen

in regionäre Lymphknoten reduziert sich das 5-Jahres-Überleben auf ca. 85% und beim Vorhandensein von Fernmetastasen auf nur noch ca. 25% (Rakha et al., 2019/1).

## 1.2 Organoide

### 1.2.1 Geschichte des Organoidmodells

Die heutige Definition des Wortes „Organoid“ ist eine dreidimensionale Struktur, die aus Stammzellen erwächst und organspezifische Zelltypen enthält, die sich selbst organisieren, um den Aufbau des Herkunftsorgans zu imitieren (Clevers, 2016). Die drei definierenden Charakteristika sind Selbstorganisation, Multizellularität und Funktionalität (Lancaster und Knoblich, 2014). Organoide können gezüchtet werden aus embryonalen (pluripotenten) Stammzellen, induzierten pluripotenten Stammzellen von Erwachsenen und adulten (multipotenten) Stammzellen (Bartfeld und Clevers, 2017).

Das Konzept der Stammzellen wurde zuerst von Till und McCulloch bereits im Jahre 1961 beschrieben, die ersten humanen embryonalen Stammzellen wurden jedoch erst 1998 von Thomson et al. isoliert. Die Induzierung pluripotenter Stammzellen aus reifen humanen Zellen gelang Takahashi et al. erstmals im Jahre 2007 (Liu et al., 2020). Die ersten dreidimensionalen Organoidkulturen aus embryonalen Stammzellen wurden von Eiraku und Sasai im Jahre 2012 gezüchtet, sie schufen so Organoide aus Zellen des Großhirns, der Retina und der Adenohypophyse. Lancaster und Knoblich gelang es auf Grundlage dieser Arbeit im Jahr 2013, Organoide zu züchten, die mehrere verschiedene Gehirnregionen auf einmal abbildeten; sogenannte „Mini-Gehirne“. Seitdem ist es gelungen, 3D-Organoidmodelle vieler weiterer menschlicher Gewebe aus embryonalen oder induzierten pluripotenten Stammzellen herzustellen, unter anderem weiterer neurologischer Gewebe, Gewebe von Organen des Verdauungstrakts (Magen, Dünndarm und Leber), der Lunge, der Schilddrüse und der Nieren (Clevers, 2016).

Da es sich bei den im Rahmen dieser Arbeit gezüchteten Organoiden jedoch um Organoidkulturen aus adulten Stammzellen handelt, wird hier näher auf diese eingegangen. Um die Proliferation und Differenzierung adulter Stammzellen zu induzieren, muss das verwendete Nährmedium die molekularen Verhältnisse im

Ursprungsgewebe während des Regenerations- und Heilungsprozesses imitieren (Bartfeld und Clevers, 2017). Somit führte erst ein besseres Verständnis der Regulationsprozesse der Proliferation und Differenzierung adulter Stammzellen zur Schaffung des ersten Organoidmodells aus adulten Stammzellen. Im Jahre 2007 wurde der Leucine-rich repeat containing G-protein-coupled Receptor 5 (LGR5) als Stammzellmarker für adulte intestinale Stammzellen identifiziert (Barker et al., 2007). Dieser stellte sich im Folgenden als Stammzellmarker für viele weitere, wenn nicht alle, Epithelien heraus (Clevers et al., 2014). LGR5 ist ein Rezeptor für den Aktivator des Wnt-Signalweges R-Spondin (de Lau et al., 2011). Der Wnt-Signalweg ist entscheidend für die Regulation der Proliferation und Differenzierung adulter Stammzellen (Korinek et al., 1998 und Clevers et al., 2014). Auf Grund dieser Erkenntnisse entwickelten zwei verschiedene Arbeitsgruppen im Jahr 2009 zeitgleich die ersten Organoidkulturen aus adulten Stammzellen des Dünndarms von Mäusen (Sato et al., 2009 und Ootani et al., 2009). Sato et al. verwendeten hierfür epitheliale Krypten und isolierte Stammzellen, die sie als Ersatz für die extrazelluläre Matrix in Matrigel einbetteten und mit einem Cocktail verschiedener Faktoren behandelten. Bei diesen Faktoren handelte es sich um den Wnt-Agonisten R-Spondin1, den Wachstumsfaktor EGF (Epidermal Growth Factor), den Bone Morphogenetic Protein (BMP) Inhibitor Noggin, der sich als wichtiger Faktor für die Aufrechterhaltung der Stammzellnische erwiesen hatte (Haramis et al., 2004) und den Rho-Kinase (ROCK) Inhibitor Y-27632, der die Apoptose von Zellen, die den Zell-Matrix-Kontakt verloren haben, verhindern soll (Hofmann et al., 2007). Im Gegensatz dazu verwendeten Ootani et al. zerkleinerte Gewebestücke der Mäusedärme anstatt isolierter Krypten oder Zellen für das Anlegen ihrer 3D-Organoidkulturen in Kollagen. Auch versuchten sie nicht, die Stammzellen mit Hilfe eines selbst hergestellten Faktorengemischs zum Wachsen zu bringen, sondern nutzten Myofibroblasten als mesenchymale Komponente, die die nötigen Faktoren lieferte. Die Zugabe von Wnt3a zum Kulturmedium erlaubte Sato et al. später auch die Anzucht von Organoiden aus Stammzellen bzw. Krypten des Kolons von Mäusen (Sato et al., 2011). Um schließlich auch aus menschlichem Dün- und Dickdarmgewebe Organoide entstehen zu lassen, brauchte es die zusätzliche Hinzunahme von Nikotinamid, des TGF $\beta$ R1(Transforming Growth Factor  $\beta$  Receptor 1)- bzw. ALK5(Aktivin A Receptor Type II-Like Kinase)-Inhibitors A83-01 und des p38 MAP(Mitogen-activated Protein) Kinase Inhibitors SB202190 zum Organoid-Nährmedium, die alle ebenfalls zur



Aufrechterhaltung der Stammzellnische beitragen (Sato et al., 2011, Jung et al., 2011). Durch weitere Modifikationen der Faktoren im Kulturmedium gelang in den folgenden Jahren auch die Heranzucht von Organoidkulturen aus adulten Stammzellen vieler weiterer menschlicher Organe, wie des Magens, der Leber, des Pankreas, der Lunge, der Prostata, des Eileiters und der Brustdrüse (Kretschmar und Clevers, 2016). Es gelang außerdem, durch Modifikation des Kulturmediums von menschlichen Dünndarmorganoiden und Organoiden aus dem Kolon von Mäusen, die Stammzellen entweder dazu zu bringen, sich klonal zu vermehren, ohne auszudifferenzieren, oder zu bestimmten Zelltypen des jeweiligen Gewebes auszudifferenzieren. Damit konnte gezeigt werden, dass das Differenzierungsverhalten von Stammzellen in Organoidkulturen durch Administration bestimmter Faktoren im Nährmedium gezielt gesteuert werden kann (Yin et al., 2014). Im Gegensatz zu Organoiden aus pluripotenten Stammzellen konnten Organoide aus multipotenten adulten Stammzellen jedoch bisher nur epitheliale Gewebe abbilden, da derzeit noch das nötige Wissen über die Faktoren, die Wachstum und Proliferation der Stammzellnische anderer Gewebe steuern, fehlt (Drost und Clevers, 2017).

### **1.2.2 Anwendungsgebiete des Organoidmodells**

Organoidmodelle werden in der heutigen Forschung für verschiedenste Zwecke eingesetzt. Organoide aus embryonalen oder induzierten pluripotenten Stammzellen sind hierbei geradezu prädisponiert für die Erforschung der Prozesse der Organogenese. So konnte in einer Follow-up Studie zu den von Lancaster und Knoblich geschaffenen „Mini-Gehirnen“ gezeigt werden, dass deren Genexpression der von Zellen des menschlichen fetalen Neokortex ähnelte (Camp et al., 2015). Takasato et al. gelang es 2015 durch Optimierung des Kulturprozesses, aus humanen induzierten pluripotenten Stammzellen Organoide zu schaffen, die die embryonale Nierenentwicklung abbildeten und sowohl Gewebe des metanephrogenen Mesoderms als auch der Ureterknospe enthielten (Takasato et al., 2015). Aber auch Organoide aus adulten multipotenten Stammzellen können die Prozesse der physiologischen Kompartimentalisierung im Körper abbilden, wie bei der Entwicklung von Krypten und Villi in den von Sato et al. 2009 entwickelten Dünndarm-Organoiden aus Mäusegewebe (Kretschmar und Clevers, 2016). Auch die genetische Komponente der Entwicklung verschiedener Gewebe kann mit Hilfe

von Organoiden erforscht werden. So brachten Simmini et al. durch den Knockout des Cdx2-Gens die Stammzellen in Organoiden des Dünndarms von Mäusen dazu, stattdessen gastrale Organoide mit verschiedenen Zelltypen des Magens auszubilden (Simmini et al., 2014). Organoide aus adulten Stammzellen eignen sich des Weiteren sehr gut für die Erforschung der Stammzellnische verschiedener menschlicher Gewebe und der Faktoren, die ihre Proliferation und Differenzierung beeinflussen. Da sie meist keine mesenchymale Komponente beinhalten, bilden sie ein vereinfachtes Modell der Mikroumgebung dieser Stammzellen ab, in dem die Faktoren willkürlich variiert werden können (Kretzschmar und Clevers, 2016). Wie bereits erwähnt, machten Yin et al. sich diesen Umstand zu Nutze, um das Differenzierungsverhalten intestinaler Stammzellen im Organoidmodell beliebig zu steuern (Yin et al., 2014).

Auch in der Erforschung genetischer Erkrankungen werden Organoide eingesetzt. So wurden solche beispielsweise bereits durch Wong et al. aus Zellen der Lunge und durch Dekkers et al. auch des Rektums von Mukoviszidose-Patienten (Bartfeld und Clevers, 2017) und der Leber von Patienten mit  $\alpha$ -1-Antitrypsinmangel und Alagille-Syndrom durch Huch et al. (Drost und Clevers, 2017) gezüchtet und bildeten den kranken Phänotyp ihrer Ursprungsgewebe gut ab. Mit Hilfe der von Lancaster und Knoblich entwickelten „Mini-Gehirne“ ließ sich außerdem auch ein Organoidmodell der Mikrozephalie erstellen (Lancaster et al., 2013). Da Organoide prinzipiell alle Zelltypen eines Organs enthalten können, eignen sie sich zudem sehr gut für die Modellierung von Infektionskrankheiten dieser Organe in vitro. Dies ist besonders hilfreich, wenn die Infektion Spezies-spezifisch ist und somit kein Tiermodell für die Erforschung der Erkrankung zur Verfügung steht (Bartfeld und Clevers, 2017). So wurden bereits Organoid-Infektionsmodelle erstellt für die *Helicobacter pylori* Infektion des Magens, die Norovirus-Infektion des Darms, die Zika-Virus-Infektion des Gehirns (Bartfeld und Clevers, 2017) sowie die *E.coli*-, Salmonellen- und Rotavirusinfektion des Darms und die Salmonelleninfektion der Gallenblase, um die kanzerogenen Effekte infektiöser Pathogene auf diese zu testen (Drost und Clevers, 2017).

Organoide eignen sich jedoch nicht nur für die Nachbildung und Erforschung der Pathogenese bestimmter Krankheiten in vitro, sondern können auch zur Entwicklung neuer Therapieansätze für verschiedene Erkrankungen beitragen. Durch das Biobanking von Organoiden, mit Hilfe dessen die gesamte biologische bzw.

genetische Bandbreite einer Erkrankung abgebildet werden kann, könnten eventuell vielversprechende Wirkstoffe für neue Medikamente identifiziert werden. Anhand sowohl einer Kolonkarzinom-Biobank als auch einer Biobank mit intestinalen Organoiden von Patienten mit Mukoviszidose konnte gezeigt werden, dass die Wirkung verschiedener Medikamente auf die Organoiden der bereits aus der Klinik oder klinischen Studien bekannten Wirkung entsprach und dass sich solche Organoid-Biobanken prinzipiell für Hochdurchsatz-Screenings eignen (Bartfeld und Clevers, 2017). Durch die Möglichkeit, Organoiden aus den Organen Magen, Leber und Nieren zu züchten, ergibt sich außerdem die Überlegung, ob solche nicht zukünftig für die Testung der Toxizität neuer Medikamente genutzt werden könnten (Clevers, 2016). Auch für die personalisierte Medizin ergeben sich durch die Etablierung des Organoidmodells ganz neue Möglichkeiten. Da Organoiden auf relativ einfache Weise aus verschiedenen (epithelialen) Geweben eines/r jeden Patient\*in hergestellt werden können und dann die individuellen biologischen und genetischen Parameter des Gewebes dieses/r Patient\*in abbilden, kann man durch direkte Behandlung dieser Organoiden mit verschiedenen Wirkstoffen theoretisch die perfekte Therapie für jede/n einzelne/n Patient\*in ermitteln. Dass dieses Prinzip funktioniert, konnte bereits von Dekkers et al. am Beispiel einiger Mukoviszidose-Patienten mit seltenen Mutationen, für die es keine Standardtherapie gab, bewiesen werden (Bartfeld und Clevers, 2017). Auch die Organoiden selbst könnten in Zukunft für die Therapie bestimmter Krankheiten genutzt werden, indem sie Zellen oder sogar Gewebe für die autologe Transplantation zur Verfügung stellen könnten (Bartfeld und Clevers, 2017). Dies wurde im Mausmodell bereits mehrmals erfolgreich durchgeführt. Durch Genom-Editing von Organoiden mit Hilfe der CRISPR/Cas9-Technologie könnte dieser regenerative Therapieansatz noch mit dem Prinzip der Gentherapie bestimmter Erkrankungen kombiniert werden. Für dieses Konzept vielversprechende Ergebnisse lieferten Schwank et al. wiederum im Zusammenhang mit der Mukoviszidose (Drost und Clevers, 2017).

Auch in der Krebsforschung gibt es zahlreiche Anwendungsmöglichkeiten für das Organoidmodell. Diese werden unter Punkt 1.2.4 behandelt.

### 1.2.3 Vor- und Nachteile des Organoidmodells

Im Folgenden sollen einige Vor- und Nachteile des Organoidmodells im Vergleich mit anderen Kulturtechniken, insbesondere im Hinblick auf die Anwendung in der Krebsforschung, beleuchtet werden.

Konventionelle 2D-Zellkulturmodelle stellen eine viel genutzte und gut etablierte Methode dar, um Krankheitsprozesse im menschlichen Körper zu simulieren und zu erforschen. Allerdings gelten sie als nicht sonderlich physiologisches Modell, da durch die Zweidimensionalität wichtige Eigenschaften der Gewebestruktur und -funktionen verloren gehen (Corrò et al., 2020). Dies liegt daran, dass die Kombination aus Zell-Zell- und Zell-Matrix-Interaktionen Aspekte wie die Polarität der Zellen, ihre Proliferation, Adhäsion und ihr Überleben beeinflusst; im Falle maligne entarteter Zellen auch die Tumorprogression (Mills Shaw et al., 2004). Immortalisierte zweidimensional kultivierte Krebszelllinien haben in der Vergangenheit einen enormen Beitrag zur Erforschung dieser Krankheit geliefert (Drost und Clevers, 2018). Die Anzucht ist einfach, sie wachsen beinahe unendlich, benötigen nur einfache Nährmedien und eignen sich gut für alle möglichen Experimente inklusive Hochdurchsatz-Wirkstofftests (Sachs und Clevers, 2014). Jedoch ist die Etablierung solcher Linien aus Tumormaterial von Patient\*innen sehr ineffizient (Drost und Clevers, 2018). Für Brustkrebs liegt die Erfolgsquote zwischen 1 und 10% (Lacroix und Leclercq, 2004). Durch die Anpassung an die 2D-Zellkulturbedingungen kommt es außerdem zur Selektionierung bestimmter Klone, sodass die Linien nach mehrmaliger Passagierung die genetische Heterogenität des Originaltumors nicht mehr zuverlässig abbilden können (Drost und Clevers, 2018). Ebenso wenig können die verfügbaren Zelllinien die Heterogenität der jeweiligen Krebserkrankung abbilden, da sie hauptsächlich von schnell wachsenden Originaltumoren in weit fortgeschrittenen Krankheitsstadien abgeleitet sind, sodass langsam wachsende Tumoren und frühe Stadien generell unterrepräsentiert sind. Auch Zelllinien aus gesundem Kontrollgewebe derselben Patient\*innen für z.B. Toxizitätsstudien sind selten (Sachs und Clevers, 2014).

Um einige dieser Probleme zu umgehen und eine physiologischere Umgebung für das Tumorwachstum zu schaffen, können Tumorzelllinien als sogenannte Xenografts in den Körper von Mäusen eingebracht werden. Jedoch ist die Transplantation von Patientengewebe direkt in den Mäusekörper; sogenannte Patient-derived Tumor Xenografts (PDX), deutlich erfolgversprechender. Da die Gegebenheiten *in vivo* der

physiologischen Tumorumgebung im menschlichen Körper deutlich näherkommen als in einer 2D-Zellkultur, ist die Erfolgsquote der Etablierung solcher PDTX deutlich höher. Auch wird die genetische Heterogenität in diesem Kulturmodell deutlich besser und länger gewahrt, als dies bei Tumorzelllinien der Fall ist. Jedoch gilt auch hier, dass die Etablierung von PDTX für aggressivere Tumoren generell besser funktioniert und diese in diesem Kulturmodell daher überrepräsentiert sind (Sachs und Clevers, 2014). Ein weiterer Nachteil dieses Modells ist die Notwendigkeit, das Immunsystem der verwendeten Mäuse zu kompromittieren, sodass der Faktor der gegenseitigen Beeinflussung von Tumor und Immunsystem nicht abgebildet werden kann bzw. wegfällt. Genetically engineered mouse models (GEMMs) sind hingegen immunkompetente Mäuse, bei denen das Tumorstadium durch Manipulation einzelner Gene induziert wird. Mit Hilfe dieses Modells lassen sich gezielt Gene erforschen, die für die Tumorentstehung und -progression verantwortlich sind (Vargo-Gogola und Rosen, 2007). Durch diese Abhängigkeit von einzelnen Treiber Mutationen lässt sich durch GEMMs natürlich wiederum nicht die gesamte genetische Vielfalt der jeweiligen Tumorerkrankung abbilden (DeRose et al., 2013). Auch das Metastasierungsverhalten und die Hormonabhängigkeit von speziell Brustkrebs unterscheidet sich deutlich zwischen Tumoren der GEMMs und menschlichen Mammakarzinomen (Vargo-Gogola und Rosen, 2007). Letztendlich bleibt zu bedenken, dass es zwischen den Spezies grundlegende Unterschiede gibt, die die Übertragbarkeit der Ergebnisse von Versuchen im Mausmodell auf den Menschen beeinträchtigen. Das Arbeiten mit PDTX und GEMMs ist des Weiteren sehr arbeits-, zeit- und ressourcenaufwendig, sodass sich diese Modelle eher nicht für Hochdurchsatz-Screenings eignen (Sachs und Clevers, 2014 und Drost und Clevers, 2018).

Die Organoidtechnologie verbindet einige der Vorteile der oben beschriebenen Modelle. Um den Zellen eine natürlichere Umgebung zum Wachstum zu geben, als herkömmliche Zellkulturplatten sie bieten können, und ihnen ein dreidimensionales Wachstum zu ermöglichen, werden Substanzen wie basement membrane extract (BME) zu ihrer Kultivierung verwendet. Diese bestehen aus Stromabestandteilen, die von den murinen Engelbreth-Holm-Swarm-Sarkomzellen produziert werden (De Rose et al., 2014). Sie sollen das Mikroenvironment der Tumorzellen imitieren, indem sie den Zellen eine dreidimensionale Wachstumsgrundlage bieten und sie mit wichtigen Nährstoffen versorgen (Yu und Huang et al. 2020). Die Arbeit mit

Organoidkulturen ist zwar aufwendiger und erfordert den Einsatz kostspieligerer Ressourcen (BME, Reagenzien im Nährmedium) als die Arbeit mit 2D-Zellkulturen. Jedoch ist sie deutlich zeit- und ressourcensparender als die Arbeit mit Mausmodellen (Corrò et al, 2020). Organoide eignen sich daher auch für den Einsatz in Hochdurchsatz-Wirkstofftests, was Van de Wetering et al. 2015 in einer proof-of-principle Studie anhand einer Biobank von Organoiden kolorektaler Karzinome bewiesen (Bartfeld und Clevers, 2017). Auch lassen sich Organoide mit hoher Effizienz aus dem Patientengewebe vieler verschiedener (epithelialer) Tumoren etablieren (Sachs und Clevers, 2014). Für Brustkrebs wurde die Erfolgsquote in einzelnen Studien mit über 80% angegeben (Sachs et al., 2018 und Mazzucchelli et al., 2019). Hierbei sind auch Tumoren früher Stadien in einem deutlich höheren Maße repräsentiert, als Tumorzelllinien oder Xenografts dies zulassen, sodass mit Hilfe des Organoidmodells das breite Spektrum der jeweiligen Krebserkrankung deutlich besser abgebildet werden kann (Sachs und Clevers, 2014). Ebenso lassen sich auch Organoidkulturen aus gesundem Kontrollgewebe der jeweiligen Patient\*innen erfolgreich etablieren (Drost und Clevers, 2018). Und nicht zuletzt gelingt die Herstellung von Organoidkulturen auch mit relativ wenig Patientenmaterial; so wurden schon erfolgreich Kulturen aus Gewebe etabliert, welches durch Feinnadelbiopsie oder bronchoalveoläre Lavage oder aus dem Urin von Patienten gewonnen wurde (Corrò et al., 2020). Ein weiterer wichtiger Vorteil des Organoidmodells insbesondere gegenüber Zelllinien ist die Genomstabilität über längere Passagezeiträume, welche für Organoidkulturen aus adulten Stammzellen in mehreren Studien von Sato et al., 2011, Behjati et al., 2014 und Huch et al., 2015 durch Langzeit-Passagierung und Gesamt-Genom-Sequenzierung früher und später Passagen nachgewiesen werden konnte (Drost und Clevers, 2017). Trotz der offensichtlichen Überlegenheit des Organoidmodells gegenüber konventionellen Zellkulturen, was die Abbildung der Gewebearchitektur und -heterogenität betrifft (Corrò et al., 2020), fehlt den epithelialen Organoidkulturen aus adulten Stammzellen doch eine physiologische Mikroumgebung (Muskeln, Nerven, Gefäße und Immunzellen) (Bartfeld und Clevers, 2017). Einerseits kann dies ein Vorteil sein, da durch das reduktionistische Modell Prozesse wie die Zell-Zell-Kommunikation und Tumor-Morphogenese in einem weniger komplexen Umfeld studiert werden können (Yang et al., 2020), andererseits fehlen so natürlich wichtige Einflussfaktoren auf Prozesse der Tumorentwicklung oder auch das Ansprechen auf Medikamente

(Weeber et al., 2017). Ein weiterer Nachteil des Organoidmodells besteht in der Abhängigkeit von Ersatzstoffen der Extrazellulärmatrix, die von Mäusezellen produziert werden (BME) und in manchen Fällen der Benötigung von fetal calf serum (FCS) zur Produktion des Nährmediums. Diese spezie fremden und schlecht regulierbaren Faktoren könnten den Ausgang von Experimenten, so auch von Medikamententests, beeinflussen (Drost und Clevers, 2018). Außerdem variiert die Zusammensetzung dieser Faktoren von Charge zu Charge, da es sich um biologische Produkte handelt, was folglich die experimentellen Bedingungen ebenfalls verändern kann (Lee et al., 2007 und Yang et al., 2020). Des Weiteren stellen sie eine Limitation für die Nutzung von Organoiden in der regenerativen Medizin dar (Bartfeld und Clevers, 2017). Doch für diese Probleme könnte es schon bald Lösungen geben. Wie oben beschrieben, zeigten Ootani et al. schon 2009, dass sich intestinale Organoiden statt in einer künstlichen Mikroumgebung auch mit Hilfe einer mesenchymalen Komponente aus Myofibroblasten anzüchten ließen (Ootani et al., 2009). Auch Campbell et al. kreierten 2011 eine alternative Kulturmethode für Mamma-Organoiden, welche ohne die genannten künstlichen Matrizes auskam. Hierfür verwendeten sie ein definiertes Gemisch aus Kollagen und Hyaluronsäure, das die Ko-Kultivierung von Epithelzellen und Adipozyten erlaubte (Campbell et al., 2011). Darüber hinaus lieferten Versuche mit Ko-Kulturen von murinen Dünndarm-Organoiden durch Nozaki et al. und Organoiden aus menschlichem Brustdrüsengewebe durch Zumwalde et al., beide 2016, gemeinsam mit Immunzellen bereits vielversprechende Ergebnisse (Kretzschmar und Clevers, 2016 und Drost und Clevers, 2017). Es liegen außerdem bereits einige vielversprechende Versuche vor, die darauf abzielen, verlässlichere künstliche Matrizes und FCS-freies Nährmedium für Organoidkulturen zu schaffen (Drost und Clevers, 2018).

Natürlich können auch verschiedene Methoden der Kultivierung von Tumorzellen miteinander kombiniert werden. So transplantierten beispielsweise De Rose et al. und auch Sachs et al. Mammakarzinomorganoiden orthotop als PDTX in Mäuse, um das Medikamentenansprechen *in vitro* mit einem *in vivo* Modell zu vergleichen bzw. um einige der Vorteile der beiden Modelle miteinander zu verbinden (De Rose et al., 2013 und Sachs et al., 2018).

### 1.2.4 Organoide in der Krebsforschung

Sobald es etablierte Protokolle zur Anzucht von Organoiden aus menschlichen epithelialen adulten Stammzellen gab, begannen verschiedene Arbeitsgruppen damit, auch Organoide aus epithelialen Krebszellen zu züchten (Clevers, 2016). Den Anfang machten Sato et al. 2011 mit ihrer Arbeit zu Organoiden aus menschlichen Kolonkarzinom-Zellen (Corrò et al., 2020). Später folgte die Anzucht von Organoiden aus menschlichen Prostata-, Pankreas-, Magen-, hepatozellulären und Cholangio-, Blasen-, Ösophagus-, Lungen-, Nieren-, Ovar-, Mammakarzinom- und Glioblastomzellen (siehe Punkt 1.2.4.1) (Bartfeld und Clevers, 2017 und Corrò et al., 2020).

Anstatt Organoidkulturen direkt aus Tumorzellen zu schaffen, können auch Wildtyp-Organoide mit Hilfe verschiedener Techniken manipuliert werden, zu Krebszell-Organoiden zu entarten. So gelang es Nadauld et al. 2014, mit Hilfe von shRNA-Interferenz in Wildtyp-Organoiden aus Magenschleimhautzellen von Mäusen Malignität zu induzieren. Li et al. konnten im gleichen Jahr mit ähnlichen shRNA-basierten Techniken mehrere verschiedene Mutationen in Wildtyp-Kolonschleimhaut-Organoiden von Mäusen hervorrufen und so ein Modell der progressiven Transformation von Normal- zu Tumorgewebe schaffen. Eine Rekonstruktion der Adenom-Karzinom-Sequenz in Organoiden aus menschlichen intestinalen Zellen gelang auch Drost et al. und Matano et al. im Jahr 2015 mit Hilfe der CRISPR/Cas9-Technologie (Clevers, 2016 und Bartfeld und Clevers, 2017).

Wie bereits angesprochen soll ein wesentlicher Vorteil von Krebszell-Organoidkulturen die Beibehaltung der genetischen und morphologischen Heterogenität des Originaltumors, auch über längere Kulturzeiträume, sein, welche bereits in mehreren Studien nachgewiesen werden konnte (Weeber et al., 2017).

Die Tatsache, dass Organoidkulturen verschiedener menschlicher Tumore bereits mit relativ hohen Erfolgsquoten etabliert werden konnten, prädisponiert das Organoidmodell neben seinem Einsatz in der Krebs-Grundlagenforschung auch zum Aufbau von patientenbasierten Tumor-Organoid-Biobanken. Dank der hohen Anzahl verschiedener Patienten-abgeleiteter Organoidmodelle in einer solchen Biobank erhöht sich die Wahrscheinlichkeit, auch seltene Tumor-Subtypen einzubeziehen und daher das jeweilige Krankheitsbild in seiner ganzen Vielfalt abbilden zu können (Weeber et al, 2017). Daher eignen sich Organoid-Biobanken menschlicher Tumoren besonders gut für Hochdurchsatz-Wirkstofftests, im Rahmen derer in Zukunft auch



vielversprechende neue Agenzien zur Therapie rarer Subtypen der jeweiligen Tumorerkrankung gefunden werden könnten (Bartfeld und Clevers, 2017 und Weeber et al., 2017). Darum wurden in den letzten Jahren vielseitige Anstrengungen zur Etablierung von Tumor-Organoid-Biobanken für verschiedene Krankheitsentitäten unternommen. Dies gelang unter anderem für das Kolorektale-, das Magen-, das Hepatozelluläre-, das Pankreas-, das Mamma-, das Prostata-, das Lungen-, das Blasenkarzinom und das Glioblastom (Corrò et al., 2020).

Die gute Übereinstimmung der Wirkung verschiedener Medikamente auf die Karzinom-Organoiden mit ihren jeweiligen molekularen Eigenschaften konnte bereits in mehreren Studien gezeigt werden (Weeber et al., 2017). Aber auch für die Übereinstimmung des Ansprechens der Karzinom-Organoiden auf verschiedene Wirkstoffe mit dem individuellen klinischen Ansprechen der Patient\*innen, aus deren Gewebe die Organoiden entstanden sind, gibt es bereits erste Hinweise. So verglichen Vlachiogiannis et al. 2018 die Wirkung einiger etablierter Medikamente auf Organoiden bzw. Organoid-abgeleitete orthotope Xenografts verschiedener gastrointestinaler Tumoren mit dem klinischen Ansprechen der jeweiligen Patient\*innen auf diese Medikamente. Sachs et al. taten 2018 dasselbe für Mammakarzinom-Organoiden. Beide Arbeitsgruppen erhielten vielversprechende Ergebnisse für den individuellen prädiktiven Wert der Organoidmodelle, auch wenn angesichts niedriger Stichprobengrößen hier mit Sicherheit weitere Forschung nötig sein wird. Patientenabgeleitete Tumor-Organoiden sind daher auch ein großer Hoffnungsträger der personalisierten Krebsmedizin (Corrò et al., 2020).

### **1.2.4.1 Mammakarzinom-Organoiden**

Schon bevor die Bedingungen ausreichend erforscht waren, unter denen humane adulte Stammzellen in Form von Organoidmodellen erfolgreich kultiviert werden können, begannen einige Arbeitsgruppen, die Vorteile der dreidimensionalen Kultivierung von unter anderem Mammakarzinomzellen zu erkennen. So stellten Mills Shaw et al. bereits 2004 eine Studie vor, im Rahmen derer sie Matrigel-basierte 3D-Kulturen diverser epithelialer Normalgewebe- und Tumorzelllinien der Mamma geschaffen hatten. Unter diesen verbesserten, da natürlicheren Wachstumsbedingungen strebten sie die Erforschung der Wirkung verschiedener Onkogene auf Morphologie und Verhalten der dreidimensionalen Zellkulturen an, namentlich Proliferation, Überleben, Polarität, Größe und Adhäsionsverhalten (Mills

Shaw et al., 2004). Wenig später stellten auch Lee et al. eine Methodik zur Kultivierung normaler und maligner epithelialer Mamma-Zelllinien in Matrigel bzw. BME vor und darüber hinaus auch eine Methodik zur Fixierung und immunhistochemischen Einfärbung dieser „Kolonien“ (Lee et al. 2007).

2013 veröffentlichten De Rose et al. dann ein Verfahren, um Organoidmodelle aus dem Gewebe menschlicher Mammakarzinom-Patientinnen zu schaffen. Die hierfür verwendeten Zellen stammten entweder aus festen Tumoren oder Pleuraergüssen der jeweiligen Patientinnen. Es ist erwähnenswert, dass die Herstellung der Organoidkulturen für die Autoren nur einen Zwischenschritt zur Schaffung patientenspezifischer Tumor-Xenografts darstellte, indem Organoide nach einiger Zeit der Kultivierung orthotop in das Brustfettgewebe immunkompromittierter Mäuse transplantiert wurden. Die Autoren hielten diese sogenannten Tumorgrafts für das ideale Modell, um die Tumorentwicklung *in vivo* verfolgen zu können, da viele wichtige histopathologische, molekulare und genetische Merkmale des Originaltumors erhalten blieben und sogar der Prozess der Metastasierung nachvollzogen werden konnte (De Rose et al., 2011 und De Rose et al., 2013). Die Methodik der mechanischen und enzymatischen Zerkleinerung von Patientengewebe zur Gewinnung von Einzelzellen oder Organoiden und deren dreidimensionale Kultivierung in Matrigel ähnelte bereits sehr der in späteren Studien verwendeten, wenn auch jedes Team die Methodik nach den eigenen Bedürfnissen modifizierte. Das von Rose et al. verwendete BC-Organoid-Kulturmedium dagegen unterschied sich stark von dem, welches in späteren Arbeiten, einschließlich der vorliegenden, Verwendung fand. Es handelte sich hierbei um eine modifizierte Version des M87-Mediums, welches von Garbe et al. 2009 zur Langzeit-Kultivierung humaner nonmaligner Mamma-Epithelzellen vorgestellt worden war. Dieses Medium enthielt neben DMEM/F12, FCS, Penicillin, Streptomycin, Glutamin und EGF, welche auch in dem in dieser Arbeit verwendeten Kulturmedium vertreten sind, noch Insulin-Transferrin-Selenium-X Supplement, Hydrocortison, Cholera-Toxin, 3,3',5-Triiodo-L-thyronine,  $\beta$ -Estradiol, ( $\pm$ )-Isoproterenol Hydrochlorid, Ethanolamin und O-Phosphorylethanolamin (De Rose et al., 2013). Es fällt auf, dass dieses Wachstumsmedium nicht die Aktivatoren des Wnt-Signalweges enthielt, welche Sato et al. als wichtige Faktoren für die Kultivierung von Organoiden aus adulten Stammzellen identifiziert hatte (siehe Punkt 1.2.1). Jedoch zielten De Rose et al. in ihrer Arbeit auch nicht auf eine Langzeit-Kultivierung von Organoiden ab, da diese

ohnehin nach kurzem Wachstum ins Brustfettgewebe von Mäusen verpflanzt wurden, um personalisierte Xenografts zu kreieren.

Als Sachs et al. dann 2018 die erste Brustkrebs-Organoid-Biobank schufen (Yu und Huang, 2020), nutzten sie zwar eine ähnliche Methodik zum Anlegen und zur Passagierung von Organoidkulturen, jedoch verwendeten sie ein völlig anderes Kulturmedium, welches auf dem von Sato et al. 2011 geschaffenen Organoid-Kulturmedium für humane adulte intestinale Stammzellen aufbaute. Fast alle nachfolgenden Studien, welche die Anzucht von Mamma(karzinom)-Organoiden aus Patientengewebe unternahmen, verwendeten fortan dieses Nährmedium, einschließlich der vorliegenden Arbeit. Für die genaue Zusammensetzung dieses Kulturmediums siehe daher Tabelle 2. Bei Wnt3a handelt es sich um einen LRP(Low Density Lipoprotein Receptor-related Protein)-Liganden, der Tumorzellproliferation und -differenzierung reguliert. R-Spondin1 ist ein LGR4/5(Leucine-rich repeat containing G-protein-coupled Receptor 4/5)-Ligand und Agonist des Wnt-Signalweges, der dabei hilft, eine Stammzellpopulation über längere Zeit in vitro aufrecht zu erhalten. Noggin ist ein BMP(Bone Morphogenetic Protein)-Inhibitor, der die Stammzellproliferation fördert und in einer Organoidkultur die Anzahl der initialen Organoide steigern und die Expansionsrate vergrößern kann. FGF7 (Fibroblast Growth Factor 7) fördert das Wachstum von Epithelzellen und die Fähigkeit von Mammakarzinomzellen zur Invasion und Metastasierung; auch dieser Faktor fördert das Wachstum von Mammakarzinom-Organoiden. EGF (Epidermal Growth Factor) fördert die Proliferation der epithelialen Brustkrebszellen und trägt so zur Langzeitproliferation der Organoidkulturen bei. A83-01 ist ein TGF- $\beta$ 1(Transforming Growth Factor  $\beta$  1)-Inhibitor, der die Differenzierung pluripotenter Stammzellen hemmt und ihre Selbstregenerierung fördert; er erhöht die Effizienz des Organoidwachstums. Bei SB202190 handelt es sich um einen MAP(Mitogen-Activated Protein)-Kinase-Inhibitor, der die Stabilität pluripotenter Stammzellen fördert (Yu und Huang, 2020). FGF10 (Fibroblast Growth Factor 10) ist ein weiterer Faktor, der zur Verbesserung des Wachstums und der Kulturbedingungen in Organoidkulturen adulter Stammzellen zahlreicher Gewebe verwendet wird (Sachs et al., 2018). Bei Nikotinamid handelt es sich um einen wichtigen Bestandteil des Enzyms NAD<sup>+</sup>(Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid<sup>+</sup>), welcher sich bereits bei der Anzucht intestinaler Organoide durch Sato et al. als essenziell für das Langzeitwachstum der Organoidkulturen erwies (Sato et al., 2011). Laut Sachs et al.

war ihre wichtigste Neuerung im Vergleich mit vorherigen Versionen dieses Mediums die Hinzunahme von Neuregulin 1, einem EGFR3/4(Epidermal Growth Factor Receptor 3/4)-Liganden, welcher die Langzeit-Kultivierung der Mammakarzinom-Organoide ermöglichte (Sachs et al., 2018). Auch die permanente Hinzugabe des ROCK(Rho-Kinase)-Inhibitors Y-27632 vermochte laut Sachs et al. die Langzeit-Kulturbedingungen zu verbessern. In einigen anderen Arbeiten mit Organoidkulturen adulter Stammzellen war dieser Faktor nur innerhalb der ersten 2-5 Tage zur Verhinderung der Apoptose epithelialer Stammzellen dem Nährmedium zugefügt worden, da es Hinweise darauf gab, dass die langfristige Behandlung mit diesem Faktor der dreidimensionalen Struktur der Kulturen schade (Sato et al., 2011, Linnemann et al., 2015). Sachs et al. schufen mit Hilfe dieser Neuerungen eine Biobank mit knapp 100 Brustkrebs-Organoidmodellen von Primärtumoren und metastatischen Läsionen, die alle wichtigen Subtypen dieser Erkrankung beinhaltet und damit die Vielfalt des Krankheitsbildes abzubilden vermochte. Bei der Etablierung dieser Organoidmodelle konnte eine Erfolgsquote von 80% erreicht werden. Sie zeigten weiterhin, dass die von ihnen entwickelte Methodik auch zur Anzucht von Organoidkulturen normalen tumorfreien Brustgewebes, welches sie aus präventiven Mastektomien gewannen, geeignet ist. Die Organoide stimmten laut den Autoren mit den Originaltumoren, von denen sie abgeleitet waren, in vielen wichtigen Merkmalen überein, darunter dem histopathologischen Typ, dem immunhistochemischen Hormonrezeptor- und Her2/neu-Status, den Kopienzahlvariationen und somatischen Mutationen. Die Organoidmodelle zeigten dabei Mutationen in vielen der relevantesten mit Brustkrebs assoziierten Gene, außerdem repräsentierten sie die meisten Subtypen des RNA-Expressions-basierten Brustkrebs-Klassifikationssystems. Sie ließen sich des Weiteren mit Hilfe der CRISPR/Cas9-Methodik erfolgreich genetisch manipulieren. Zuletzt bewiesen Sachs et al. mit Hilfe einiger Medikamententests mit Her2/neu-Pathway- und PARP(Poly(ADP-Ribose)-Polymerase)-Inhibitoren, dass sich ihre Organoid-Biobank für Hochdurchsatz-Medikamententests eignete und dass das *in vitro* Ansprechen auf solche Medikamente dem *in vivo* Ansprechen bei der Transplantation der Organoidmodelle in immunkompromittierte Mäuse entsprach. Interessant ist außerdem, dass auch das Ansprechen aus Biopsien entstandener Mammakarzinom-Organoidkulturen auf den Östrogenrezeptormodulator Tamoxifen mit dem *in vivo* Ansprechen der Patientinnen auf dieses Medikament übereinstimmte (Sachs et al.,

2018). Diese Ergebnisse schienen die Hoffnung, dass die Organoidtechnologie eines Tages für eine ultimativ personalisierte Medizin des Mammakarzinoms genutzt werden könnte, zu bestärken.

Ebenfalls im Jahr 2018 wurde eine weitere große Arbeit veröffentlicht, die sich mit Mammakarzinom-Organoiden beschäftigte und an der Norman Sachs und Hans Clevers wiederum beteiligt waren. Hierbei wurden Organoidkulturen aus Tumoren genetisch manipulierter Mausmodelle geschaffen, welche eine BRCA1- oder BRCA2-Mutation aufwiesen. Nachdem bestätigt werden konnte, dass diese Organoidmodelle sowohl *in vitro* als auch *in vivo* nach Transplantation in ein anderes Mausmodell wichtige histopathologische und genetische Merkmale des Originaltumors beibehielten, wurde das *in vitro* mit dem *in vivo* Ansprechen der Organoidmodelle auf PARP-Inhibitoren miteinander verglichen. Außerdem zeigte die Arbeitsgruppe, dass sich die Organoidmodelle leicht mit Hilfe der CRISPR/Cas9-Methodik manipulieren ließen, sodass auch der Einfluss anderer Genmutationen auf die Ausbildung von Resistenzen gegenüber den PARP-Inhibitoren in BRCA1/2-defizienten Tumoren getestet werden konnte (Duarte et al., 2018). Da es sich bei dem in dieser Studie verwendeten Gewebe um murine Tumoren handelte, unterschied sich die Zusammensetzung des Kulturmediums in einigen Punkten von dem durch Sachs et al. für ihre humane Mammakarzinom-Biobank eingesetzten. Jedoch war auch hier die vorangegangene Forschung bezüglich der Bedürfnisse adulter Stammzellen in dreidimensionalen Kulturen grundlegend.

Wie bereits erwähnt nutzten in den folgenden Jahren mehrere verschiedene Arbeitsgruppen die von Sachs et al. entwickelte bzw. optimierte Methodik zur Kultivierung von Mamma(karzinom)-Organoiden im Rahmen ihrer eigenen Studien. So versuchten Mazzucchelli et al. in ihrer 2019 veröffentlichten Arbeit, die Vorteile der Methodik von de Rose et al. und Sachs et al. zu verbinden, um den ganzen Prozess der Kultivierung von Brustkrebs-Organoiden schneller und einfacher zu gestalten. Dafür verarbeiteten sie Mammakarzinomgewebe von 33 Patientinnen (24 chirurgisch entfernte Tumoren und 9 Biopsien) und je eine dazugehörige Normalgewebe-Probe, sofern diese verfügbar war. Aus diesen Proben wurden mit unterschiedlichem Erfolg Organoidmodelle geschaffen (ca. 21% Erfolgsrate für Normalgewebe und 88% für Karzinomgewebe). Des Weiteren stellten sie Protokolle zur immunhistochemischen Färbung und elektronenmikroskopischen Begutachtung der Organoidkulturen vor, um den Grad der Übereinstimmung der

histopathologischen und molekularen Merkmale der Organoidmodelle mit ihren jeweiligen Originaltumoren ermitteln zu können (Mazzucchelli et al., 2019). Ein Jahr später stellten Campaner et al. eine Arbeit vor, im Rahmen derer sie chirurgisch entferntes Mammakarzinomgewebe und tumorangrenzendes histologisch normal erscheinendes Mammagewebe von 32 Patientinnen sammelten und daraus Organoidkulturen herstellten. 17 dieser Tumor-Organoidmodelle konnten längerfristig passagiert und damit etabliert werden. Auch hier wurden immunhistochemische und genanalytische Methoden angewandt, um einige wichtige Merkmale der Originaltumoren und der daraus abgeleiteten Organoidmodelle vergleichen zu können. Außerdem wurden auch in dieser Studie einige in der Brustkrebs-Therapie etablierte Medikamente verwendet, um zu testen, ob das Ansprechen der Organoidmodelle den jeweiligen molekularen Merkmalen der Originaltumoren entspräche (Campaner et al., 2020). Zudem sollen noch Goldhammer et al. erwähnt werden, welche die histologische Zusammensetzung von humanen Mammakarzinom-Organoidkulturen etwas genauer überprüfen wollten. Hierfür sammelten sie Tumorgewebe von Biopsien zehn verschiedener Brustkrebs-Patientinnen und gesundes Mammagewebe von sieben Patientinnen, die elektive kosmetische Brustreduktionen vornehmen ließen. Ihr primäres Ziel war, den Anteil histologisch normaler Zellen bzw. Organoidmodelle innerhalb der Mammakarzinom-Organoidkulturen mit Hilfe immunhistochemischer Methoden und des Whole-Genome Sequencing zu ermitteln (Goldhammer et al., 2019).

Aber auch in Studien mit etwas anderer Zielsetzung fand die von Sachs et al. entwickelte Methodik zur Kultivierung von Mamma-Organoiden Verwendung. So schufen Rosenbluth et al. 79 Organoidmodelle aus Mamma-Normalgewebe, welches teilweise durch elektive Mammoplastien und teilweise durch prophylaktische Mastektomien gewonnen wurde. Das Ziel war hier die Differenzierung und Beobachtung einzelner Zelltypen, um ein besseres Verständnis der Entstehungsprozesse verschiedener Mammakarzinom-Subtypen zu erlangen (Rosenbluth et al., 2020). Auch Dekkers et al. schufen mit einer 100-prozentigen Erfolgsquote Organoidkulturen aus Normalgewebe von zwölf elektiven Mammoplastien, um die Wirkung der Abschaltung vier verschiedener Mammakarzinom-assoziiierter Tumorsuppressorgene mit Hilfe der CRISPR/Cas9-Technologie auf diese Organoidmodelle zu erforschen. Hierfür wurden sowohl die Morphologie als auch das Verhalten dieser manipulierten Organoidmodelle *in vitro*

und *in vivo* nach Transplantation in immunkompromittierte Mäuse beobachtet. Diese Arbeitsgruppe praktizierte hierbei interessanterweise eine von De Rose et al. inspirierte Vorgehensweise bei der Gewebeverarbeitung, während das Vorgehen bei der Passagierung der Organoidkulturen sowie die Rezeptur des Nährmediums der von Sachs et al. beschriebenen Methodik entsprach (Dekkers et al., 2020).

### 1.3 Zielsetzung

Das vorrangige Ziel der vorliegenden Arbeit war die Etablierung eines patientenabgeleiteten Organoidmodells für Brustkrebspatientinnen und der Aufbau einer Organoidbank mit den kryokonservierten Zellen möglichst vieler etablierter Organoidmodelle, welche in ihren Merkmalen repräsentativ für dieses Krankheitsbild sein sollte, für die weitere Verwendung in der Brustkrebs- und Organoidforschung der Universitätsfrauenklinik Tübingen nach dem Vorbild der ersten Mammakarzinom-Organoidbank von Sachs et al., 2018. Es sollten außerdem mögliche Einflussfaktoren auf den Etablierungserfolg der Organoidkulturen ermittelt und deren Effekte wenn möglich ausgeglichen werden. So sollte das Nährmedium für Organoidmodelle triple negativer Originaltumoren optimiert werden, um deren Etablierungserfolg zu erhöhen, da sich im Verlauf der vorliegenden Studie eine geringere Erfolgsrate für Organoidkulturen von Originaltumoren dieses Subtyps gezeigt hatte als für Organoidkulturen von Originaltumoren anderer histopathologischer Subtypen. Des Weiteren sollte mit Hilfe immunhistochemischer Methoden und des Faktors Nutlin-3a ohne Einsatz kostenintensiver und aufwendiger Gen- oder Proteinanalysen überprüft werden, ob die Organoidmodelle einige wichtige Merkmale ihrer Originaltumoren auch nach mehrmaliger Passagierung beibehielten. Die von uns erzielten Ergebnisse wurden dabei stetig mit den Ergebnissen früherer Arbeiten verglichen, welche sich mit der Anzucht von Mammakarzinom-Organoidkulturen beschäftigt hatten, um zu sehen, ob es uns gelänge, diese zu reproduzieren und unsere Erkenntnisse in dem noch relativ jungen Feld der Mammakarzinom-Organoidforschung verorten zu können.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Einverständniserklärung und Ethikvotum

Die vorliegende Pilotstudie zur Etablierung eines patientenabgeleiteten Brustkrebs-Organoidmodells wurde durch die Ethikkommission des Universitätsklinikums Tübingen abgesegnet (Ethikvotum 150/2018BO2). Voraussetzung für die Teilnahme an der Studie war die vollständig unterschriebene *Einwilligungserklärung zur Verwendung von Biomaterial und Daten in der Forschungsdatenbank und Biobank der Medizinischen Fakultät & des Universitätsklinikums Tübingen*, Version 9 vom 10.05.2018. Es wurde ausschließlich Tumorgewebe verwendet, welches den Patient\*innen im Rahmen der operativen Therapie ihres Mammakarzinoms entnommen worden war.

### 2.2 Aufbau einer Tumorzellbank für die Erstellung verschiedener Brustkrebs-Organoidmodelle aus Patientengewebe

#### 2.2.1 Verarbeitung des Patientengewebes

Unfixiertes, frisches Tumorgewebe wurde durch die Pathologie des Universitätsklinikums Tübingen zur Verfügung gestellt. Das Gewebe wurde vor der Verarbeitung fotografisch mit Größenmaßstab dokumentiert (Datum, Studien-ID, Initialen des verarbeitenden Personals). Diese Fotos wurden später genutzt, um anhand des Maßstabs die Größe der Tumorstücke abschätzen zu können.

Im Falle, dass das Gewebe nicht sofort weiterverarbeitet werden konnte, wurde es mit Advanced DMEM/F12 (12634010, Gibco, Life Technologies) mit Zusatz von je 5 mL GlutaMAX (35050-038, Gibco, Life Technologies), HEPES Buffer Solution (15630-056, Thermo Fisher Scientific) und Penicillin-Streptomycin (15140-122, Gibco, Life Technologies) bedeckt, um es so vor dem Austrocknen zu bewahren, und anschließend bis zur Verarbeitung bei 4°C aufbewahrt.

Das Gewebe wurde mit Hilfe eines sterilen Skalpells unter der Sterilbank in ca. 1 mm<sup>3</sup> große Stücke zerkleinert. Fettgewebe oder vermutetes Normalgewebe (von einer deutlich weicheren Konsistenz als das Tumorgewebe) wurden bestmöglich entfernt. Die zerkleinerten Gewebestücke wurden mit 300-1000 µL Kollagenase II (17101015, Gibco, Life Technologies) (je nach Festigkeit des Gewebes), der



gleichen Menge adDMEM/F12+++ und 10 µM Y-27632 Dihydrochlorid (TMO-T1725, Hölzel Diagnostika) vermischt und für 1-2,5 h bei 37°C und 1000 rpm auf dem Schütteltisch (Thermomixer comfort, Eppendorf) geschüttelt. Anschließend wurde die Lösung für 5 min bei 478×g zentrifugiert. Nach Abnahme des Überstandes wurde das Pellet in 1 mL TrypLE Express (12604013, Gibco, Life Technologies) resuspendiert, falls sich darin noch sichtbare Gewebestücke befanden. Wenn nicht, so konnte der erneute Verdau des Gewebes in TrypLE übersprungen werden. Nach erneutem Schütteln für 10-15 min bei 37°C und 1000 rpm wurde die TrypLE-Lösung gefiltert (Porengröße 100 µm). Wenn sich noch sichtbare Gewebestücke auf der Filtermembran befanden, so wurden diese noch einmal für 1-2 h in einer 1:1-Mischung aus Kollagenase II und adDMEM/F12+++ bei 37°C und 1000 rpm geschüttelt, für 5 min bei 478×g zentrifugiert, das Pellet in adDMEM/F12+++ resuspendiert und erneut gefiltert (Porengröße 100 µm). Nach erneutem Zentrifugieren (5 min, 478×g) wurde der Überstand abgenommen und das Zellpellet je nach Größe in 100-400 µL adDMEM/F12+++ resuspendiert. Anschließend wurden, wenn sofort Organoidkulturen aus den jeweiligen Tumorzellen angelegt werden sollten, 30-40 µL der Zelllösung zu diesem Zweck entnommen. War dies nicht der Fall, so wurde die gesamte Zelllösung zur späteren Verwendung für Organoidkulturen eingefroren.

### 2.2.2 Einfrieren und Auftauen der Modelle

Der Rest der Zelllösung wurde im Verhältnis 1:10 mit Recovery Cell Culture Freezing Medium (12648010, Gibco, Life Technologies) vermischt und in Portionen von 700-1000 µL je Kryoröhrchen bei -80°C eingefroren. Zur langfristigen Lagerung wurden die Röhrchen mit den Tumorzellen schließlich in einen Flüssigstickstoff-Tank überführt.

Um die Zellen wieder aufzutauen und Organoidkulturen damit anzulegen wurden sie für 2 min bei 37°C im Wasserbad erwärmt, in 5 mL adDMEM/F12+++ gelöst und für 5 min bei 478×g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Zellpellet je nach Größe in 50-100 µL adDMEM/F12+++ resuspendiert. Das weitere Vorgehen entsprach dem unter Punkt 2.3.1 beschriebenen Anlegen von Organoidkulturen.

### 2.2.3 Erstellung einer Mastertabelle mit relevanten Tumor- und Patientendaten

Über alle gesammelten Tumorzellmodelle wurde eine Tabelle mit relevanten Krankheits- und Patientendaten erstellt. Alle Daten hierfür wurden der Patientendatenbank der Frauenklinik des Universitätsklinikums Tübingen entnommen.

## 2.3 Ansatz und Etablierung der Organoidmodelle

### 2.3.1 Anlegen der Organoidkulturen

Nach der Verarbeitung des Patientengewebes wie unter Punkt 2.2.1 beschrieben oder nach dem Auftauen bereits im Vorfeld zu Einzelzellen oder kleinen Zellverbänden verarbeiteten Tumorgewebes wie unter Punkt 2.2.2 konnten mit diesen Zellen Organoidkulturen angelegt werden. Dafür wurden 30-40 µL der Zelllösung entnommen und mit 20-30 µL adDMEM/F12+++ (insgesamt 60 µL Flüssigkeit) verdünnt. Diese wurden 1:1 mit 4°C kaltem Corning Matrigel (356231, VWR, Avantor) gemischt und diese Mischung dann in sechs Tropfen à 20 µL in eine 48-Well-Zellkulturplatte (Corning Costar Nr.3548, Thermo Fisher Scientific) ausplattiert. Nach ein paar Sekunden Wartezeit wurde die Platte mit dem Deckel nach unten bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> in den Inkubator gestellt. Nachdem das Matrigel innerhalb von 30 min ausreichend ausgehärtet war, wurden die Matrigeltropfen mit je 250 µL vorgewärmtem (37°C) Brustkrebs-Organoid-Nährmedium bedeckt und die benachbarten Wells gegen Austrocknung der Kulturen je ca. zur Hälfte mit DPBS (D8537, Sigma-Aldrich, Merck) gefüllt. Die Kulturplatte wurde anschließend im Inkubator bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> aufbewahrt.

### 2.3.2 Nährmedium

Das Brustkrebs-Organoid-Nährmedium enthielt folgende Komponenten:

L-WRN konditioniertes Medium (CRL-3276, ATCC)	50%
Neuregulin1 (100-03, PeproTech)	5 nM
FGF7 (100-19, PeproTech)	5 ng/mL

FGF10 (100-26, PeproTech)	20 ng/mL
EGF (AF-100-15, PeproTech)	5 ng/mL
A83-01 (2939, Tocris Bioscience)	500 nM
Y-27632 Dihydrochlorid (TMO-T1725, Hölzel Diagnostika)	5 µM
SB202190 (S7067, Sigma-Aldrich, Merck)	500 nM
B27 Supplement (17504-44, Gibco, Life Technologies)	2%
N-Acetylcystein (A9165, Sigma-Aldrich, Merck)	1,25 mM
Nicotinamid (NO636, Sigma-Aldrich, Merck)	5 mM
Primocin (Ant-pm-1, InvivoGen)	50 µg/mL
adDMEM/F12+++	≈ 47%

**Tabelle 2:** Zusammensetzung des Brustkrebs-Organoid-Nährmediums

Die Faktoren Wnt3a, R-Spondin3 und Noggin wurden in Form von L-WRN konditioniertem Medium hinzugefügt. Da das Nährmedium der L-WRN-Zellen 10% FCS (10270-106, Gibco, Life Technologies) enthielt, war dies auch zu einem kleinen Teil im Brustkrebs-Organoid-Nährmedium enthalten.

Das Nährmedium der Organoidkulturen wurde alle vier Tage gewechselt.

### **2.3.3 Passagierung der Organoidkulturen**

Nach 7-10 Tagen wurden die Organoidkulturen passagiert. Nachdem das Nährmedium abpipettiert und jedes Well mit 200 µL DPBS gewaschen worden war, wurden die Matrigeltropfen in je 200 µL TrypLE Express aufgelöst. Diese Lösung wurde für 5 min bei 37°C und 1400 rpm geschüttelt, viermal durch eine 27G-Nadel gezogen und anschließend zusammen mit dem Nährmedium und dem PBS für 5 min bei 478×g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Zellpellet je nach Größe in 100-300 µL adDMEM/F12+++ resuspendiert. 30-40 µL der Zelllösung wurden entnommen, mit 20-30 µL adDMEM/F12+++ (insgesamt 60 µL Flüssigkeit) verdünnt, 1:1 mit Matrigel (4°C) gemischt und wie bereits unter Punkt 2.3.1 beschrieben in sechs Wells einer 48-Well-Zellkulturplatte ausplattiert. Die Kulturplatte wurde anschließend im Inkubator bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> aufbewahrt. Der Rest der

Zelllösung wurde wie unter Punkt 2.2.2 beschrieben zur zukünftigen Verwendung eingefroren.

### 2.3.4 Etablierung der Organoidkulturen

Etablierung bedeutet im Rahmen dieser Arbeit, dass die Organoide mindestens drei Mal wie unter Punkt 2.3.3 beschrieben passagiert und die Zellen zur zukünftigen Verwendung eingefroren werden konnten. Die Organoidmodelle, die nicht etabliert werden konnten, mussten somit schon vor Erreichen dieses Ziels wegen mangelnden Organoidwachstums final eingefroren werden.

### 2.3.5 Dokumentation des Wachstums

Das Wachstum der Organoide wurde in regelmäßigen Abständen fotografisch mittels des Evos M7000 Imaging System (Thermo Fisher Scientific) in 2-facher Vergrößerung (Ausschnitte der Kulturen) und 10-facher Vergrößerung (einzelne Organoide) dokumentiert. Nach dem ersten Ansatz der Kulturen und nach jeder Passagierung wurde an Tag 1, Tag 4, Tag 7 und Tag 10 je eine Aufnahme desselben Abschnitts der jeweiligen Organoidkultur gemacht. Des Weiteren wurde an Tag 7 und Tag 10 je noch eine Aufnahme desselben ausgewählten Organoids gemacht. Nach den Aufnahmen an Tag 10 wurden die Organoidkulturen dann jeweils passagiert und ein Teil der Zellen eingefroren, während der andere Teil zum Anlegen neuer Organoidkulturen verwendet wurde (siehe Punkt 2.3.3).

## 2.4 Versuch zur Optimierung des Nährmediums für Organoidmodelle triple negativer Originaltumoren

### 2.4.1 Auswahl der Organoidkulturen

Es wurden für diesen Versuch fünf Organoidmodelle von triple negativen Mammakarzinomen mit den folgenden Eigenschaften ausgewählt:

Studien-ID	Nr.56	Nr.100	Nr.105	Nr.136	Nr.147
Geschlecht	w	w	w	w	w
Alter	55	45	75	84	49

Tumorstatus	primär	primär	primär	Zweit- karzinom	primär
Histopathol. Typ	NST	NST	NST	NST	meta- plastisch
Grading	G3	G3	G3	G2	G2
Rezeptorstatus (ER PR Her2/neu)	---	---	---	---	---
Ki-67 Status	50-60%	40%	30%	40%	30-40%
Tumorgroße	pT2	pT2	pT2	pT1b	pT2
LK-Status	pN0	pN1	pN0	pN0	pN0
Fernmetastasen	cM0	cM0	cM0	cM0	cM0
Neoadjuvanz	-	-	-	-	-

**Tabelle 3:** Eigenschaften der triple negativen Organoidmodelle im Mediumversuch

#### 2.4.2 Anlegen der Organoidkulturen

Beim Auftauen der Zellen aus dem primären Tumorverdau und Anlegen von Organoidkulturen entsprach das Vorgehen dem unter Punkt 2.2.2 beschriebenen. Es wurden pro Modell 10 Wells mit Organoidkulturen auf 48-Well-Zellkulturplatten angelegt.

#### 2.4.3 Nährmedium

Es wurden fünf verschiedene Nährmedien mit unterschiedlichen Kombinationen der Faktoren Wnt3a, R-Spondin und Noggin hergestellt.

<b>L-WRN konditioniertes Medium</b>	<b>50%</b>
Neuregulin1	5 nM
FGF7	5 ng/mL
FGF10	20 ng/mL
EGF	5 ng/mL
A83-01	500 nM
Y-27632 Dihydrochlorid	5 µM
SB202190	500 nM
B27 Supplement	2%
N-Acetylcystein	1,25 mM
Nicotinamid	5 mM
Primocin	50 µg/mL
adDMEM/F12+++	≈ 47%

**Tabelle 4:** Zusammensetzung Nährmedium Nr. 1 (entspricht dem Standard-Nährmedium)

<b>R-Spondin1 konditioniertes Medium</b> (Cultrex R-Spo1 Cells, 3710-001-K, Trevigen)	<b>10%</b>
<b>Noggin</b> (120-10C, Peprotech)	<b>100 ng/mL</b>
Neuregulin1	5 nM
FGF7	5 ng/mL
FGF10	20 ng/mL
EGF	5 ng/mL
A83-01	500 nM
Y-27632 Dihydrochlorid	5 µM
SB202190	500 nM
B27 Supplement	2%
N-Acetylcystein	1,25 mM
Nicotinamid	5 mM
Primocin	50 µg/mL
adDMEM/F12+++	≈ 87%

**Tabelle 5:** Zusammensetzung Nährmedium Nr. 2

<b>R-Spondin1 konditioniertes Medium</b> (Cultrex R-Spo1 Cells, 3710-001-K, Trevigen)	<b>10%</b>
Neuregulin1	5 nM
FGF7	5 ng/mL
FGF10	20 ng/mL
EGF	5 ng/mL
A83-01	500 nM
Y-27632 Dihydrochlorid	5 µM
SB202190	500 nM
B27 Supplement	2%
N-Acetylcystein	1,25 mM
Nicotinamid	5 mM
Primocin	50 µg/mL
adDMEM/F12+++	≈ 87%

**Tabelle 6:** Zusammensetzung Nährmedium Nr. 3

<b>Noggin</b> (120-10C, Peprotech)	<b>100 ng/mL</b>
Neuregulin1	5 nM
FGF7	5 ng/mL
FGF10	20 ng/mL
EGF	5 ng/mL
A83-01	500 nM
Y-27632 Dihydrochlorid	5 µM
SB202190	500 nM
B27 Supplement	2%
N-Acetylcystein	1,25 mM

Nicotinamid	5 mM
Primocin	50 µg/mL
adDMEM/F12+++	≈ 97%

**Tabelle 7:** Zusammensetzung Nährmedium Nr. 4

Neuregulin1	5 nM
FGF7	5 ng/mL
FGF10	20 ng/mL
EGF	5 ng/mL
A83-01	500 nM
Y-27632 Dihydrochlorid	5 µM
SB202190	500 nM
B27 Supplement	2%
N-Acetylcystein	1,25 mM
Nicotinamid	5 mM
Primocin	50 µg/mL
adDMEM/F12+++	≈ 97%

**Tabelle 8:** Zusammensetzung Nährmedium Nr. 5

Die verschiedenen Nährmedien wurden so verteilt, dass je 2 der 10 Wells mit Organoidkulturen pro Modell dasselbe Medium erhielten.

Das Nährmedium wurde alle vier Tage gewechselt.

#### 2.4.4 Dokumentation des Wachstums

Das Wachstum der Zellen unter Einfluss der verschiedenen Nährmedien wurde in regelmäßigen Abständen fotografisch mittels des Evos M7000 Imaging System in 2-facher Vergrößerung (Ausschnitte der Kulturen) und 10-facher Vergrößerung (einzelne Organoide) dokumentiert. Nach dem ersten Ansatz der Kulturen und nach jeder Passagierung wurde an Tag 0, Tag 4, Tag 7 und, wenn die Organoide so lange weiterwuchsen, Tag 10, je eine Aufnahme desselben Abschnitts der jeweiligen Organoidkultur gemacht. Des Weiteren wurde an Tag 7 und Tag 10 je noch eine Aufnahme einiger gut gewachsener Organoide gemacht (jeweils desselben Organoids an beiden Tagen). Nach den Aufnahmen am jeweils letzten Tag wurden die Organoidkulturen dann passagiert (siehe Punkt 2.3.3).

## 2.5 Vergleich der Organoidmodelle mit dem ursprünglichen Tumor

### 2.5.1 Auswahl der Organoidmodelle

Es wurden für diesen Teil der vorliegenden Arbeit zehn etablierte Organoidmodelle von Originaltumoren mit den folgenden Eigenschaften verwendet:

Studien-ID	Nr.36	Nr.66	Nr.91	Nr.97	Nr.101	Nr.102	Nr.107	Nr.109	Nr.115	Nr.159
Geschlecht	w	w	w	w	w	m	w	w	w	w
Alter	51	51	48	69	35	85	89	78	57	74
Tumorstatus	primär	primär	primär	primär	primär	primär	primär	primär	primär	Zweitkarzinom
Histopathol. Typ	NST	invasivlobulär	NST	invasivlobulär	NST	NST	NST	NST	NST	muzinös
Grading	G1	G3	G2	G2	G2	G2	G2	G3	G2	G2
Rezeptorstatus (ER PR Her2/neu)	++-	+++	++-	++-	++-	++-	++-	+++	+-	++-
Ki-67 Status	5%	25-30%	5%	17%	<5%	20%	30%	30%	25-30%	15-20%
Tumorgroße	pT1c	pT2	pT1a	pT1c	pT4	pT4	pT2	pT2	pT3	pT2
LK-Status	pN0	pN0	pN0	pN0	pN0	pN2a	pN1	pN1	pN3a	pN0
Fernmetastasen	cM0	cM0	cM0	cM0	cM0	cM0	cM0	cM0	cM1	cMx
Neoadjuvanz	-	-	-	-	Tamoxifen	-	-	-	-	-

**Tabelle 9:** Eigenschaften der Organoidmodelle zum Vergleich mit dem Originaltumor

### 2.5.2 Konservierung der Organoidmodelle

Die folgenden Mengenangaben gelten für 48-Well-Zellkulturplatten. Nach Abpipettieren des Nährmediums aus jedem Well und Waschen mit je 300 µL DPBS wurden die Matrigeltropfen in je 250 µL Dispase II (D4693, Sigma-Aldrich, Merck), Konzentration 1 mg/mL, aufgelöst. Die Platte wurde für 15 min bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> in den Inkubator gestellt. In der Zwischenzeit wurden 3 mL DPBS mit 1% BSA (05488, Sigma-Aldrich, Merck) in ein Zentrifugenröhrchen gefüllt. Nach Ablauf der 15 min wurden auch in jedes der Wells je ca. 200 µL DPBS mit 1% BSA pipettiert. Mit derselben nun mit BSA bedeckten Pipettenspitze wurde der gesamte Inhalt der Wells in das mit DPBS/1% BSA gefüllte Zentrifugenröhrchen überführt. Dieses wurde für 10 min bei 250×g zentrifugiert. Währenddessen wurde ein Reaktionsgefäß bis zum Rand mit DPBS/1% BSA gefüllt und 1 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Ende der Zentrifugation wurde der Überstand abgenommen und anschließend das



DPBS/1% BSA aus dem Reaktionsgefäß abpipettiert und verworfen. Mit derselben nun mit BSA bedeckten Pipettenspitze wurde das Organoidpellet in 1 mL 4% Formalin resuspendiert, diese Lösung in dasselbe Reaktionsgefäß überführt und für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Ablauf dieser Zeit wurde so viel PBS/1% BSA hinzugegeben wie nötig, um das Reaktionsgefäß bis zum Rand zu füllen. Es wurde dann für 3 min bei 2470×g zentrifugiert. Nach Abnahme des Überstandes wurde das Organoidpellet in 1 mL PBS/1% BSA resuspendiert, das Reaktionsgefäß erneut bis zum Rand damit gefüllt und für 3 min bei 2470×g zentrifugiert. Der Überstand wurde erneut abgenommen, das Pellet in 250 µL 25% Ethanol resuspendiert und danach 10 min auf das Absetzen der Organoide am Boden des Reaktionsgefäßes gewartet. Als nächstes wurden 300 µL 70% Ethanol hinzugefügt und das Pellet darin resuspendiert. Nach weiteren 10 min wurden schließlich 600 µL 96% Ethanol hinzugefügt und das Pellet erneut darin resuspendiert. Das Reaktionsgefäß mit den in Ethanol konservierten Organoiden wurde bis zur weiteren Verarbeitung dieser bei 4°C aufbewahrt.

### 2.5.3 Anfertigung von Paraffinschnitten der Organoidmodelle

Die Organoide mussten zunächst in einen sehr kleinen HistoGel-Block (12006679, Thermo Fisher Scientific) eingebettet werden. Hierfür wurde eine 200 µL-Pipettenspitze verwendet. Der Plastikring am proximalen Ende der Pipettenspitze wurde abgetrennt, auf ein Stück Parafilm gelegt und fest angedrückt. Der Parafilm wurde dann auf einen vorgekühlten (-20°C) Metallblock gelegt. Nach Abnahme des Ethanol-Überstandes aus dem Reaktionsgefäß mit den konservierten Organoiden wurde das Organoidpellet mit einer vorgewärmten Pipettenspitze in 100 µL 65°C warmem HistoGel resuspendiert und dieses in den kleinen Plastikring auf dem Parafilm gefüllt. Der HistoGel-Zylinder mitsamt seinem Behältnis wurde umgehend für 5 min bei -20°C gekühlt, um ihn aushärten zu lassen. Nach Ablauf dieser Zeit wurde er aus dem Plastikring in eine Einbettkassette gedrückt und diese verschlossen. Er wurde mit Hilfe einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert, mit Xylol behandelt und in Paraffin eingebettet. Im Anschluss wurden mit Hilfe eines Mikrotoms Schnitte davon angefertigt, die auf Objektträger aufgezogen wurden.

### 2.5.4 Färbung der Schnitte

Die fertigen Paraffinschnitte der Organoidmodelle wurden an das Pathologische Institut der Universität Tübingen gegeben. Dort wurden nach den dort verwendeten Standard-Färbeprotokollen jeweils eine Hämatoxylin-Eosin-Färbung angefertigt und der Östrogen- und Progesteronrezeptor, der EGF-Rezeptor Her2/neu und das Ki-67-Antigen immunhistochemisch angefärbt.

### 2.5.5 Gewinnung der gefärbten Schnitte des Originaltumorgewebes

Die Nummern der benötigten Schnitte des Originaltumorgewebes wurden aus den Pathologieberichten entnommen, die die histopathologische Aufarbeitung des für die Generierung der Organoidmodelle verwendeten Tumorgewebes nach Entnahme beschrieben. So konnten zu jedem Organoidmodell die HE-Färbung, die ER-, PR-, Her2/neu- und die Ki-67-Färbung der entsprechenden Originaltumorschnitte aus der Tumorschnittsammlung des Pathologischen Instituts der Universität Tübingen entliehen werden.

### 2.5.6 Anfertigung von Fotografien der Schnitte des Tumorgewebes und der Organoidmodelle zur Gegenüberstellung

Mit Hilfe des Evos M7000 Imaging System (Thermo Fisher Scientific) wurden ausschnittshafte Bilder der eingefärbten Organoidschnitte (20-fache Vergrößerung) und der Originaltumorschnitte (10-fache Vergrößerung) angefertigt. Die Fotografien der Organoidschnitte wurden dann mit den Fotografien der Schnitte des Originaltumors in Bezug auf die Morphologie (HE-Färbung), den Hormonrezeptor-(ER und PR) und Her2/neu-Status und den Ki-67-Status verglichen.

## 2.6 Versuch zur Wirkung von Nutlin auf das Wachstum etablierter Organoidmodelle

### 2.6.1 Auswahl der Organoidkulturen

In Teil 1 des Versuchs wurde die Wirkung von Nutlin-3a auf Organoidkulturen aus tumorfreiem Brust-Kontrollgewebe einer Mammareduktionsplastik mit seiner Wirkung auf das Brustkrebs-Organoidmodell Nr. 13 verglichen.

## Material und Methoden

Im zweiten Teil des Versuchs wurde die Wirkung von Nutlin-3a auf das Wachstum zehn weiterer bereits etablierter Organoidmodelle getestet.

Im Folgenden sind die wichtigsten Eigenschaften der für diesen Versuch verwendeten Mammakarzinom-Organoidmodelle dargestellt:

Studien-ID	Nr.13	Nr.36	Nr.66	Nr.68	Nr.91	Nr.97	Nr.101	Nr.107	Nr.109	Nr.115	Nr.159
Geschlecht	m	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w
Alter	75	51	51	80	48	69	35	78	78	57	74
Tumorstatus	primär	primär	primär	Zweitkarzinom	primär	primär	primär	primär	primär	primär	Zweitkarzinom
Histopathol. Typ	NST	NST	invasivlobulär	NST	NST	invasivlobulär	NST	NST	NST	NST	muzinös
Grading	G3	G1	G3	G2	G2	G2	G2	G3	G3	G2	G2
Rezeptorstatus (ER PR Her2/neu)	++-	++-	+++	++-	++-	++-	++-	+++	+++	+-	++-
Ki-67 Status	40%	5%	25-30%	15-20%	5%	17%	<5%	30%	30%	25-30%	15-20%
Tumorgroße	pT4	pT1c	pT2	pT1c	pT1a	pT1c	pT4	pT2	pT2	pT3	pT2
LK-Status	pN1	pN0	pN0	pN0	pN0	pN0	pN0	pN1	pN1	pN3a	pN0
Fernmetastasen	cM1	cM0	cM0	cM0	cM0	cM0	cM0	cM0	cM0	cM1	cMx
Neoadjuvanz	-	-	-	-	-	-	Tamoxifen	-	-	-	-

**Tabelle 10:** Eigenschaften der Organoidmodelle im Nutlin-Versuch

### 2.6.2 Anlegen der Organoidkulturen

Von den verwendeten Brustkrebs-Organoidkulturen wurde je ein Well einer 48-Well-Zellkulturplatte passagiert, wie unter Punkt 2.3.3 beschrieben, nachdem die Organoidmodelle darin groß genug geworden waren. Aus den dadurch gewonnenen Zellen wurden dann pro Modell vier neue Wells mit Organoidkulturen auf einer 48-Well-Zellkulturplatte angelegt. Das tumorfremde Kontrollgewebe wurde analog zum Tumorgewebe (siehe Punkt 2.2.1) verarbeitet und mit den gewonnenen Zellen Organoidkulturen angelegt, wie unter Punkt 2.3.1 beschrieben.

### 2.6.3 Nährmedium

In die ersten beiden Wells jedes Modells wurden je 250 µL Standard-Brustkrebs-Organoid-Nährmedium (Zusammensetzung s. Tabelle 2) pipettiert, in das dritte und

vierte Well je 250  $\mu$ L Standard-Brustkrebs-Organoid-Nährmedium, das außerdem 5  $\mu$ M Nutlin-3a (18585, Cayman Chemical) enthielt.

### 2.6.4 Dokumentation des Wachstums

Das Wachstum der Organoide mit und ohne den Einfluss von Nutlin-3a wurde an Tag 1, 4, 7 und 10 nach Anlegen der Kulturen mittels des Evos M7000 Imaging System in 2-facher Vergrößerung fotografisch dokumentiert.

### 3 Ergebnisse

Im Folgenden soll gelten: Alle Prozentangaben sind auf die erste Vorkommastelle gerundet. Die Angabe „unklar“ zu Tumormerkmalen in Tabellen und Schaubildern bedeutet entweder, dass es bei dem/der jeweiligen Patient\*in mehrere Tumorherde mit unterschiedlichen Gewebemerkmale gab und es nicht nachvollziehbar war, von welchem Herd das von der Pathologie zur Verfügung gestellte Gewebe stammte oder die entsprechende Klassifizierung bei dem jeweiligen Tumor irrelevant bzw. nicht möglich war (z. B. TNM-Klassifikation beim Borderline-Phylloides tumor).

#### 3.1 Merkmale der Patientenzellproben in der Tumorzellbank

##### 3.1.1 Übersicht

Über alle gesammelten Tumorzellproben wurde eine Tabelle mit relevanten Krankheits- und Patientendaten erstellt. Es waren bis zum Abschluss der vorliegenden Arbeit laut Nummerierung 183 verschiedene Proben vorhanden. Allerdings waren es eigentlich 184, da zwei histopathologisch komplett verschiedene Proben aus den zwei verschiedenen Mammae derselben Patientin stammten und daher dieselbe Studien-ID erhalten hatten. Außerdem erwiesen sich sechs der gesammelten Gewebeproben als unbrauchbar für die weitere Verwendung zum Anlegen von Organoidkulturen. Bei zwei der besagten Proben war das Tumorstück, das die Pathologie zur Verfügung stellte, so klein, dass die daraus gewonnenen Zellen für den Ansatz von Organoidkulturen nicht ausreichten. Eines der Gewebe war deutlich zu lange (7h) in Kollagenase II verdaut worden (s. Punkt 2.2.1) und daher erwiesen sich die daraus gewonnenen Tumorzellen unbrauchbar für den Ansatz von Organoidkulturen. Bei den drei anderen unbrauchbaren Gewebeproben handelte es sich um Tumorgewebe, das seit 2011 bzw. 2012 in Flüssigstickstoff eingefroren gewesen war und sich auf Grund des Alters ebenfalls ungeeignet für den Ansatz von Organoidkulturen zeigte. Für die vorliegende Arbeit wurden daher nur die Daten der 178 verbleibenden brauchbaren Tumorzellproben in der Tumorzellbank ausgewertet.

### 3.1.2 Zusammenfassung der Merkmale

Im Folgenden ist eine Zusammenfassung der wichtigsten Tumor- und Patientendaten aller Tumorzellproben, die sich bis zum Abschluss der vorliegenden Studie in der Tumorzellbank befanden, dargestellt.

Alter	< 50	≥ 50									
	28%	72%									
Geschlecht	w	m									
	98%	2%									
Tumorstatus	Primärtumor	Rezidiv	Zweitkarzinom								
	89%	5%	6%								
Histopathologischer Typ	NST	invasiv-lobulär	DCIS	tubulär	mikropapillär	cribriform	muzinös	metaplastisch	NST/muzinös (Mischtumor)	maligner Phylloides tumor	Borderline-Phylloides tumor
	72%	18%	< 1%	1%	1%	< 1%	2%	2%	< 1%	< 1%	< 1%
Grade	G1	G2	G3								
	8%	58%	34%								
Rezeptorstatus (ER PR Her2)	+++	++-	+ - +	+ - -	- + -	- - +	- - -	unklar			
	6%	69%	2%	5%	1%	2%	12%	3%			
Ki-67 Status	≤ 10%	11-25%	> 25%		unklar						
	21%	33%	42%		4%						
Tumorgröße <sup>1</sup>	pTis	pT1mi	pT1a	pT1b	pT1c	pT2	pT3	pT4	unklar		
	< 1%	< 1%	2%	7%	35%	45%	5%	4%	1%		
Lymphknotenstatus <sup>1</sup>	pN0	N1 <sup>2</sup>	pN1a	pN1b	pN2a	pN2b	pN3a	pN3b	pN1c/pN3c	pNX	
	54%	7%	22%	< 1%	6%	0%	3%	< 1%	0%	6%	
Fernmetastasen <sup>1</sup>	cM0	cM1	cMX								
	85%	3%	12%								
neoadjuvante Chemotherapie	ja	nein									
	6%	94%									
neoadjuvant Tamoxifen	ja	nein									
	6%	94%									
vorbehandelt <sup>3</sup>	ja	nein									
	12%	88%									

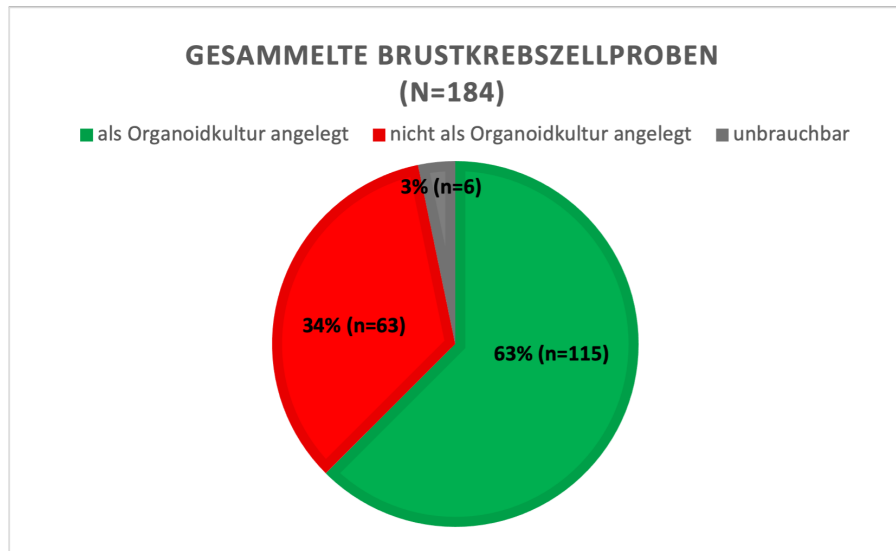
**Tabelle 11:** Zusammenfassung der wichtigsten Tumor- und Patientendaten aller Tumorproben in der Tumorzellbank

- 1) Alle Angaben nach: Brierly et al, 2017.
- 2) Keine Axilladissektion erfolgt.
- 3) Angabe „vorbehandelt“: Mit neoadjuvanter Chemotherapie oder neoadjuvanter antihormoneller Tamoxifen-Therapie vorbehandelte Tumoren zusammengenommen.

## 3.2 Etablierung der Organoidmodelle

### 3.2.1 Übersicht

Von den 178 gesammelten brauchbaren Patienten-Tumorzellproben wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit 115 Proben zum Anlegen von Organoidkulturen genutzt (siehe Abbildung 4).

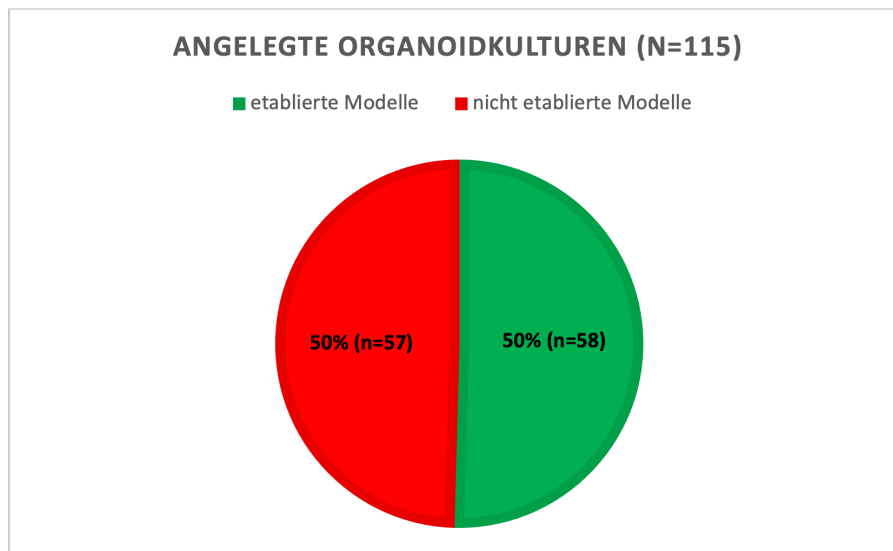


**Abbildung 4:** Übersicht, von wie vielen der gesammelten Tumorzellproben Organoidkulturen angelegt wurden.

Von diesen 115 angelegten Organoidmodellen konnten 58 etabliert werden, was einer Erfolgsquote von 50% entspricht (siehe Abbildung 5).

Wie bereits unter Punkt 2.3.4 erklärt, bedeutet die „Etablierung“ eines Organoidmodells im Rahmen dieser Arbeit eine mindestens dreimalige Passagierung mit jeweils erfolgreichem Einfrieren von ausreichend Zellmaterial zur zukünftigen Verwendung.





**Abbildung 5:** Übersicht, wie viele der angelegten Organoidmodelle etabliert, d. h. mindestens dreimal eingefroren werden konnten.

### 3.2.2 Wachstum etablierter Organoidmodelle

Im Folgenden ist beispielhaft das Wachstum fünf verschiedener etablierter Organoidmodelle bildlich dargestellt. Es handelt sich dabei um Organoidmodelle von Mammakarzinomen mit den folgenden Eigenschaften:

Studien-ID	Nr.66	Nr.68	Nr.109	Nr.158	Nr.159
Geschlecht	w	w	w	w	w
Alter	51	80	61	84	74
Tumorstatus	primär	Zweitkarzinom	primär	primär	Zweitkarzinom
Histopathol. Typ	invasivlobulär	NST	NST	NST	muzinös
Grading	G3	G2	G3	G3	G2
Rezeptorstatus (ER PR Her2/neu)	+++	+-	+++	+-	+-
Ki-67 Status	25-30%	15-20%	30%	50%	15-20%
Tumorgröße	pT2	pT1c	pT2	pT4	pT2
LK-Status	pN0	pN0	pN1	pN3b	pN0
Fernmetastasen	cM0	cM0	cM0	cMx	cMx
Neoadjuvanz	-	-	-	-	-

**Tabelle 12:** Eigenschaften der etablierten Organoidmodelle

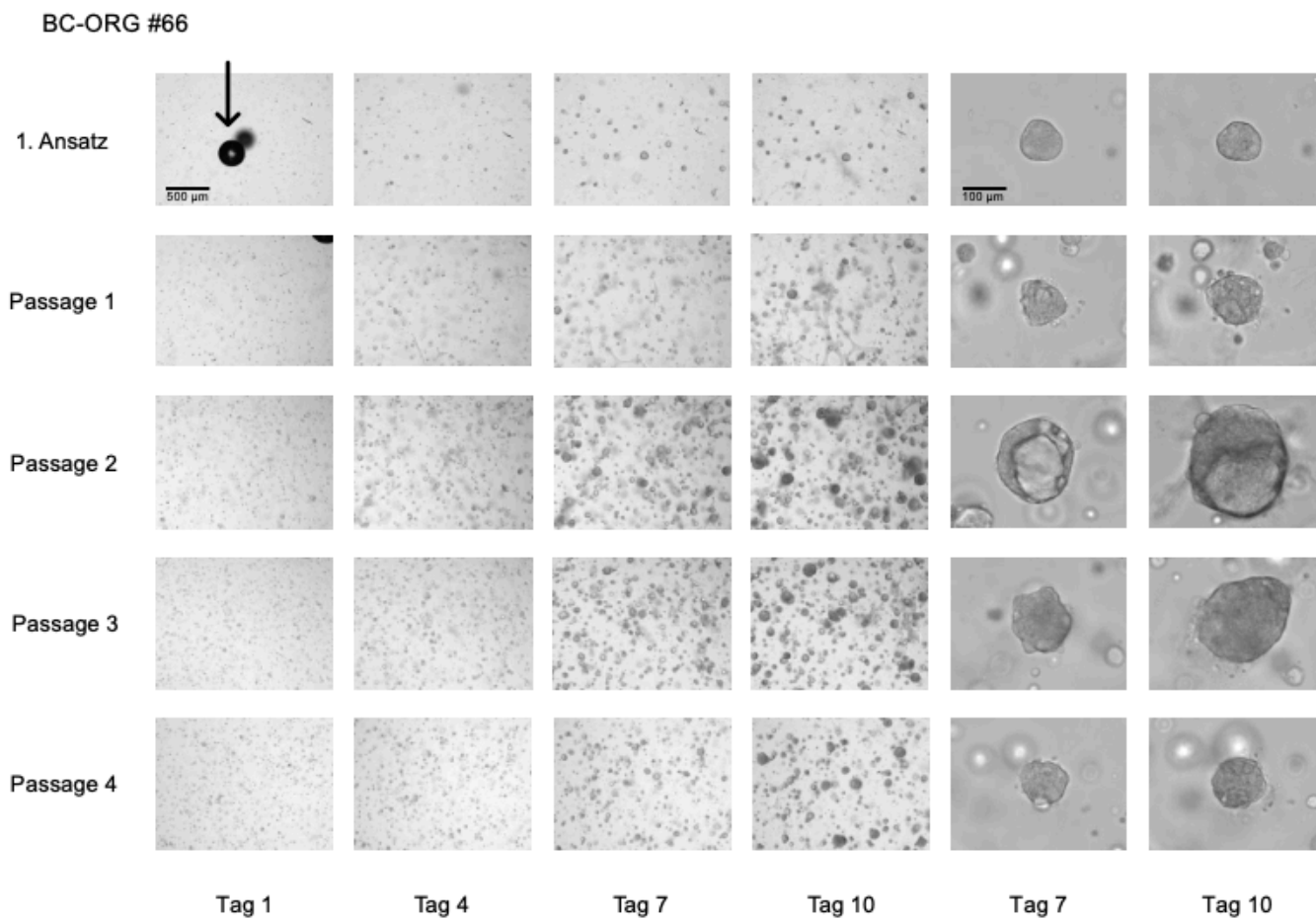


Abbildung 6: Wachstum des Organoidmodells BC-ORG #66 über 4 Passagen

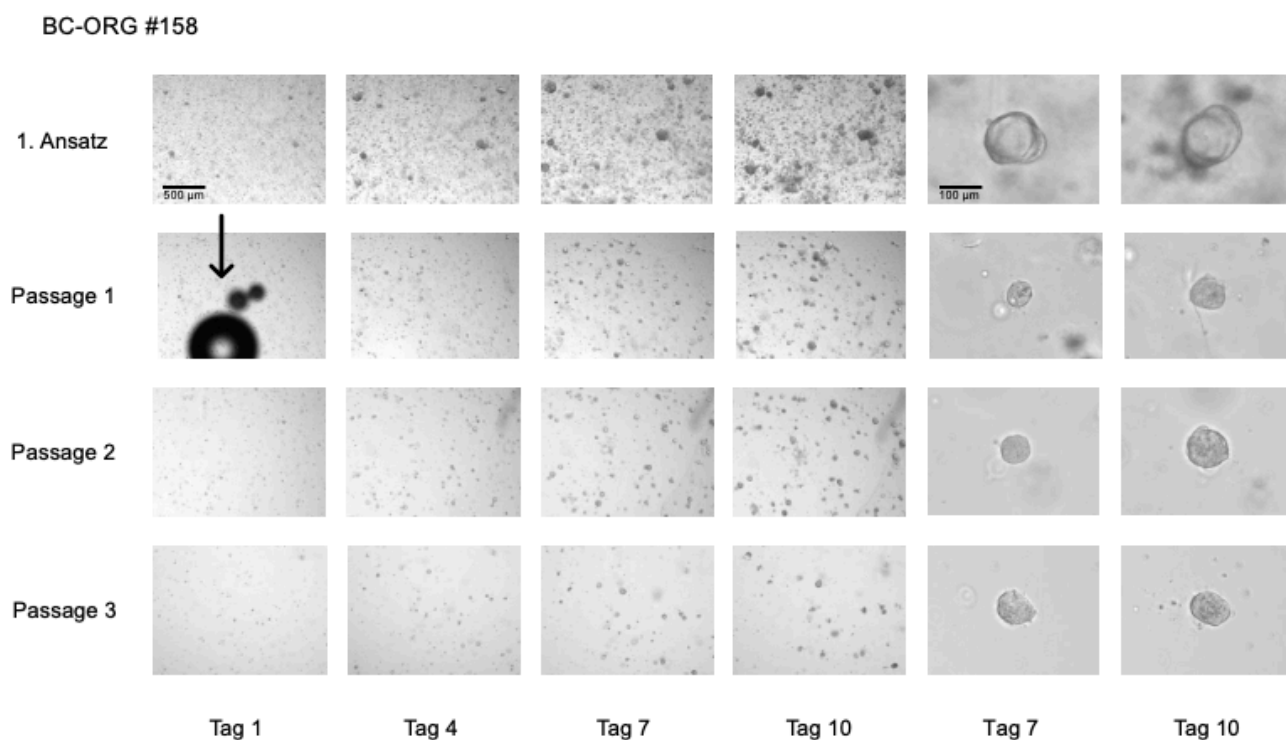


Abbildung 7: Wachstum des Organoidmodells BC-ORG #158 über 3 Passagen

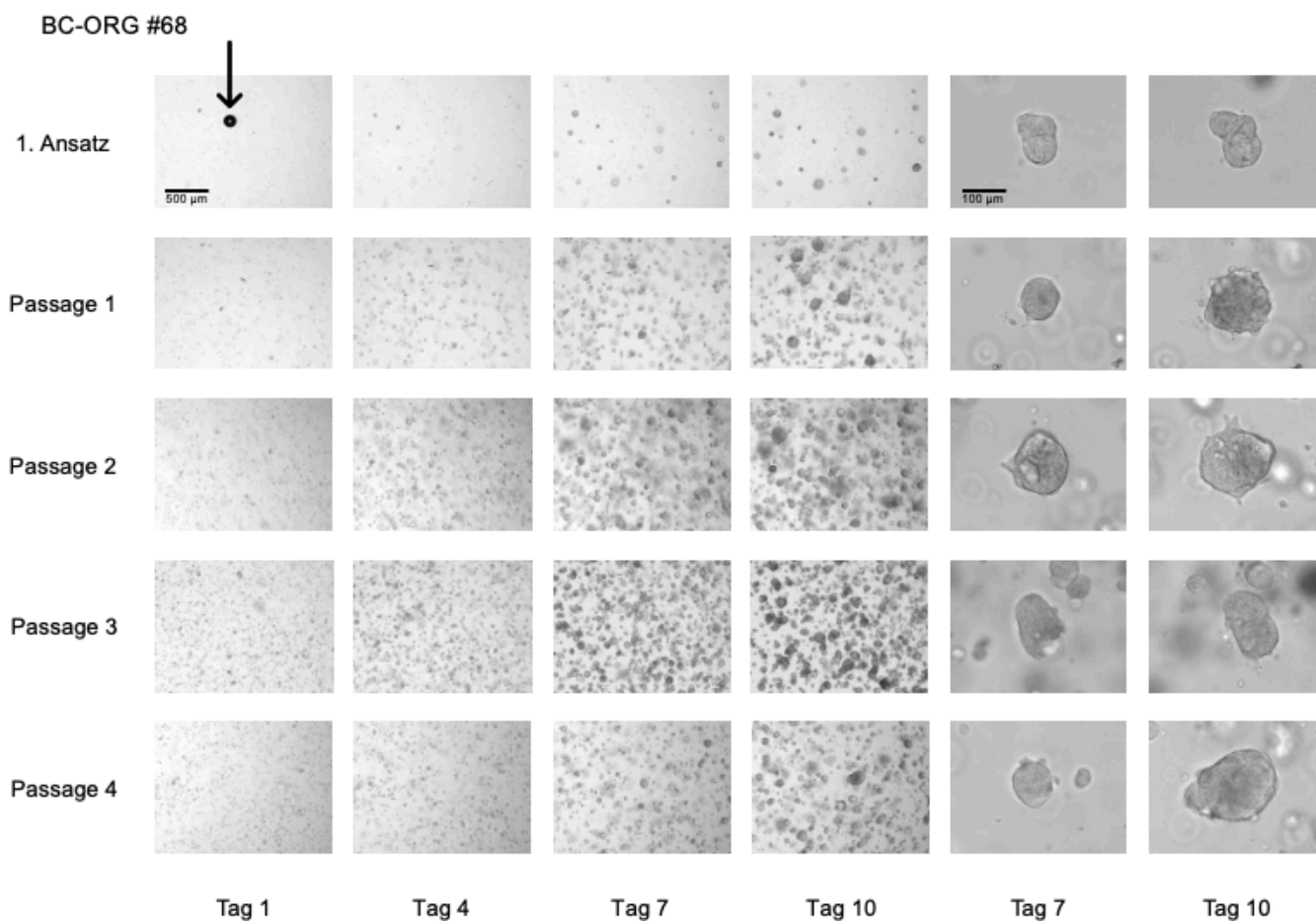


Abbildung 8: Wachstum des Organoidmodells BC-ORG #68 über 4 Passagen

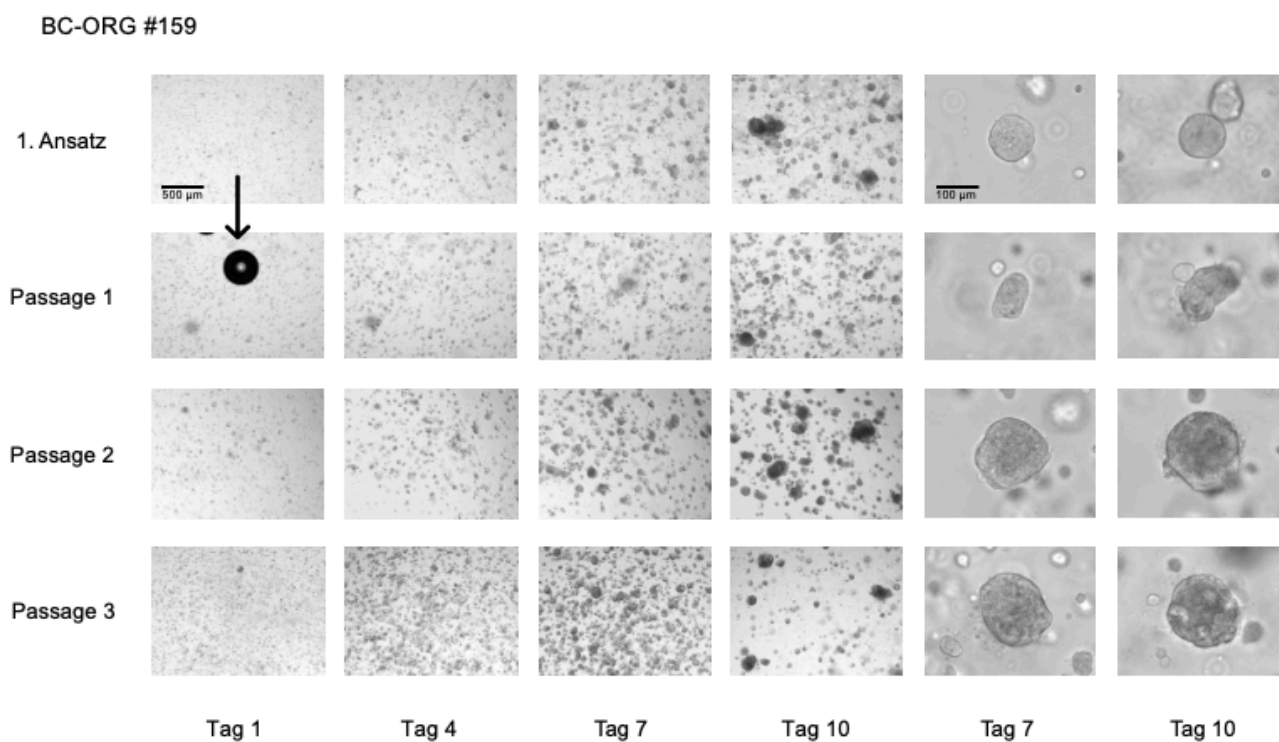
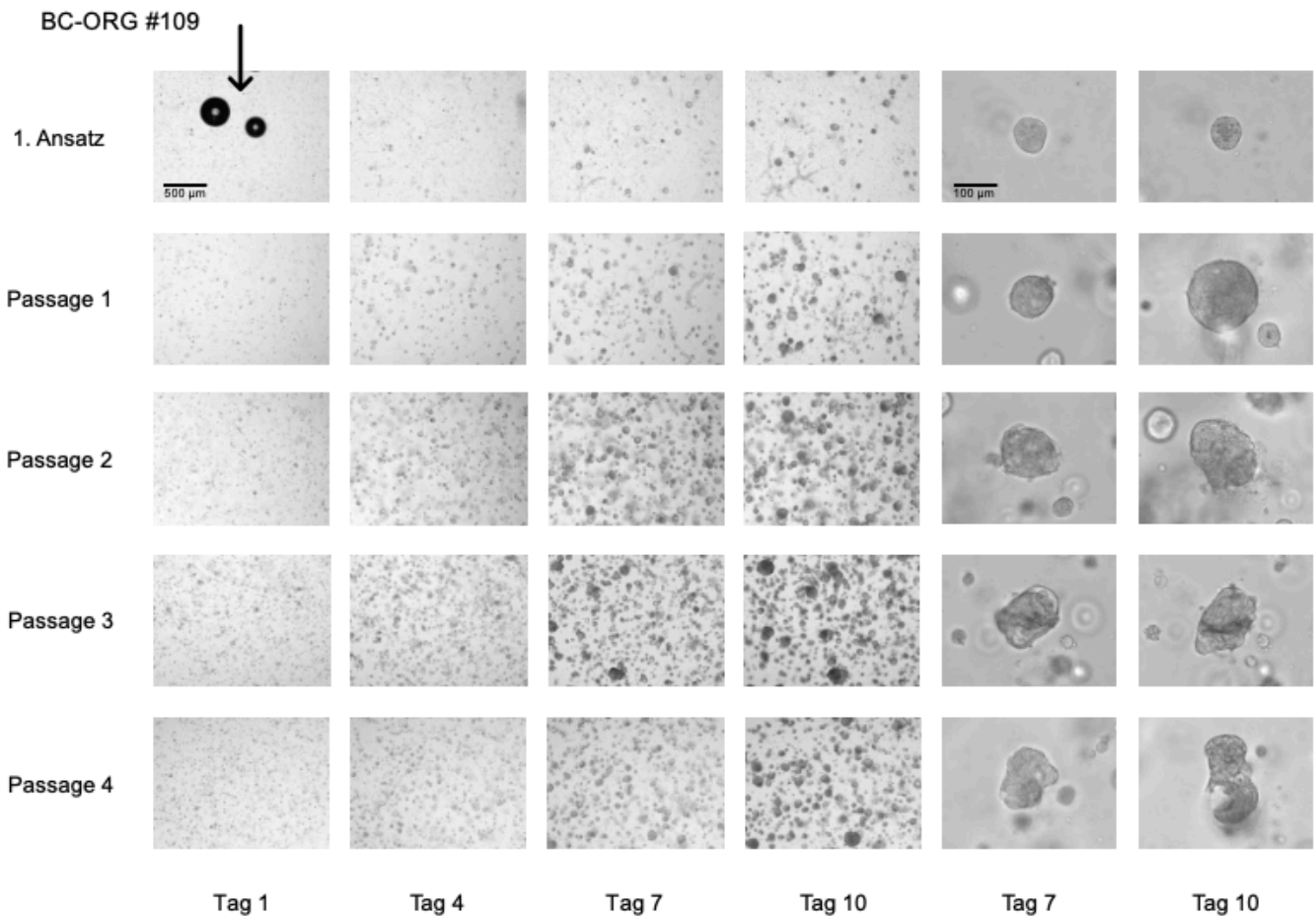


Abbildung 9: Wachstum des Organoidmodells BC-ORG #159 über 3 Passagen



**Abbildung 10:** Wachstum des Organoidmodells BC-ORG #109 über 4 Passagen

Anmerkung zu **Abbildung 6 bis 10**: Bei den mit Pfeilen markierten Artefakten, die gelegentlich an Tag 1 nach Anlegen der Kulturen auf den Bildern zu erkennen sind, handelte es sich um Luftblasen im Matrigel, die sich im Verlauf auflösten.

Wie in Abbildung 6 bis 10 zu erkennen ist, nahmen die Organoide in den Kulturen meist zunächst mit den Passagen an Anzahl und Größe zu, um dann nach weiteren Passagierungen wieder abzunehmen (z. B. Modell Nr. 66; 1. Ansatz ca. 100 µm Ø, Passage 2 ca. 150-200 µm Ø, Passage 4 ca. 100 µm Ø der größten Organoide).

Die Organoidmodelle der Tumoren Nr. 66, Nr. 68 und Nr. 109 stellen Beispiele für Organoidmodelle dar, die selbst nach der vierten Passage noch ein gutes Wachstum an den Tag legten und die somit Potenzial für die weitere Passagierung und das erneute Anlegen von Organoidkulturen ihrer Zellen über die vierte Passage hinaus zeigten (siehe Abbildung 6, 8 und 10).

Das Wachstum der Organoidmodelle der Tumoren Nr. 158 und 159 dagegen hatte schon nach Passage 3 deutlich abgenommen (weniger und zum Großteil kleinere

Organoide, siehe Abbildung 7 und 9), sodass sie schon bei der vierten Passagierung endgültig eingefroren wurden anstatt einen Teil ihrer Zellen erneut zum Anlegen von Organoidkulturen zu nutzen.

Es fällt auf, dass zwischen den Organoiden aus Originaltumorgewebe mit verschiedenem histopathologischen Typus (no special type: Nr. 68, Nr. 109 und Nr. 158; Abbildung 8, 10 und 7, invasiv-lobulär: Nr. 66; Abbildung 6 und muzinös: Nr. 159; Abbildung 9) zumindest in dieser Vergrößerung kein distinkter morphologischer Unterschied erkennbar war.

### **3.2.3 Potenzielle Einflussfaktoren auf den Etablierungserfolg**

Im Folgenden wurden die angelegten Organoidkulturen auf verschiedene Merkmale verglichen, die ihr Wachstum und damit den Etablierungserfolg beeinflusst haben könnten.

#### **3.2.3.1 *Patientenalter bei OP***

Für das Anlegen von Organoidkulturen in der vorliegenden Arbeit wurden zu 33% (38 Modelle) Tumorgewebe von Patient\*innen unter 50 Jahren verwendet, zu 67% (77 Modelle) Tumorgewebe von Patient\*innen über 50 Jahren.

Organoidmodelle aus Mammakarzinomgewebe älterer Patient\*innen ließen sich prozentual häufiger etablieren als Modelle aus dem Gewebe jüngerer Patient\*innen (siehe Abbildung 11).

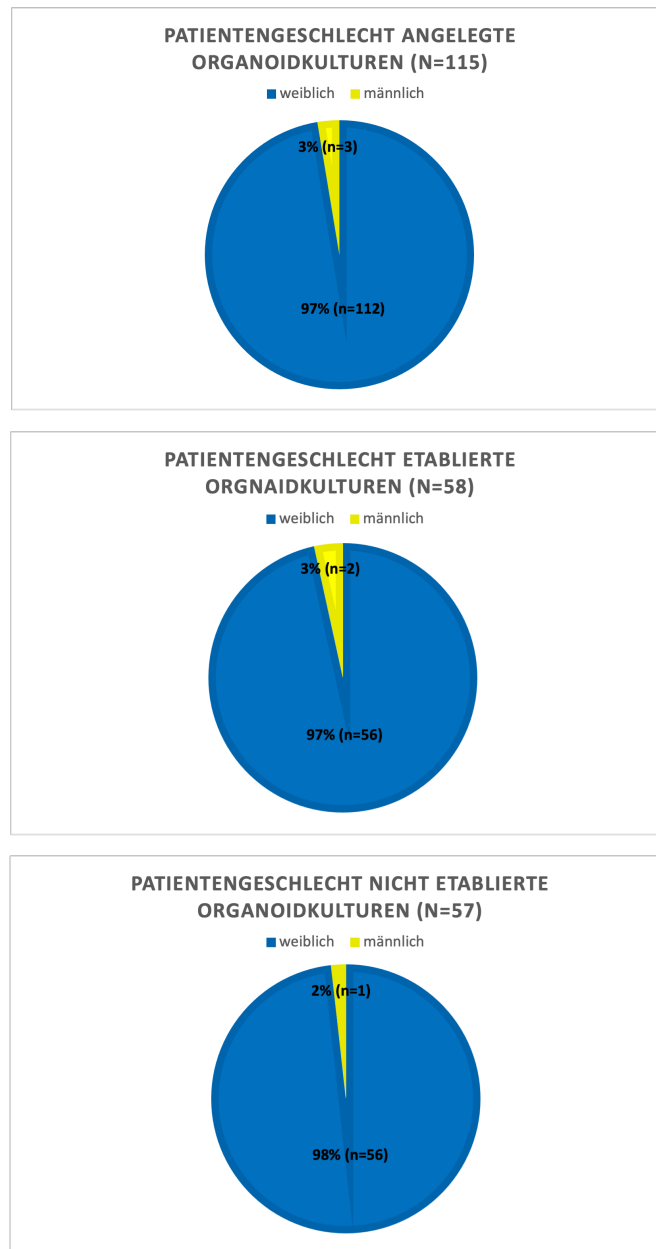


**Abbildung 11:** Patientenalter und Organoidwachstum

Darstellung, wie das Alter der Mammakarzinompatient\*innen mit dem Etablierungserfolg der von ihren Tumoren abgeleiteten Organoidmodelle zusammenhing.

### 3.2.3.2 Patientengeschlecht

Für die vorliegende Arbeit konnten vier Gewebeproben von männlichen Mammakarzinompatienten gesammelt werden. Von diesen vier Proben wurden drei zum Anlegen von Organoidkulturen verwendet. Zwei dieser Organoidmodelle konnten wegen guten Wachstums etabliert werden, das dritte aber nicht (siehe Abbildung 12).

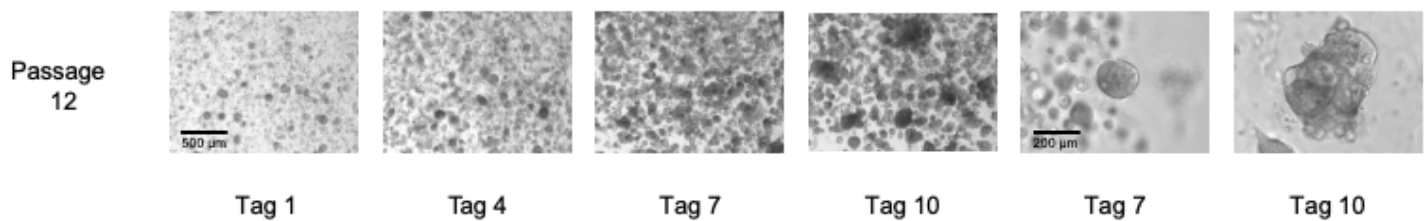


**Abbildung 12:** Patientengeschlecht und Organoidwachstum

Darstellung, wie das Geschlecht der Mammakarzinompatient\*innen mit dem Etablierungserfolg der von ihren Tumoren abgeleiteten Organoidmodelle zusammenhing.

Allerdings ist erwähnenswert, dass die beiden etablierten Modelle aus Tumoren männlicher Patienten ein sehr gutes Wachstum zeigten. Das Modell Nr. 102 ließ sich fünfmal einfrieren und wuchs bis zur letzten Passage kontinuierlich gut. Das Modell Nr. 13 war außerdem das mit Abstand am besten wachsende Organoidmodell der ganzen Studie. Es konnte ebenfalls fünfmal eingefroren werden und ließ sich immer wieder auftauen für neue erfolgreiche Ansätze, zum Beispiel für den Versuch zur Wirkung von Nutlin-3a auf das Wachstum etablierter Organoidmodelle (siehe Punkt

3.5). In einem Ansatz konnte es sogar bis zur 12. Passage gebracht werden und zeigte weiterhin ein unverändert gutes Wachstum (siehe Abbildung 13).



**Abbildung 13:** Wachstum des Organoidmodells BC-ORG #13 in Passage 12

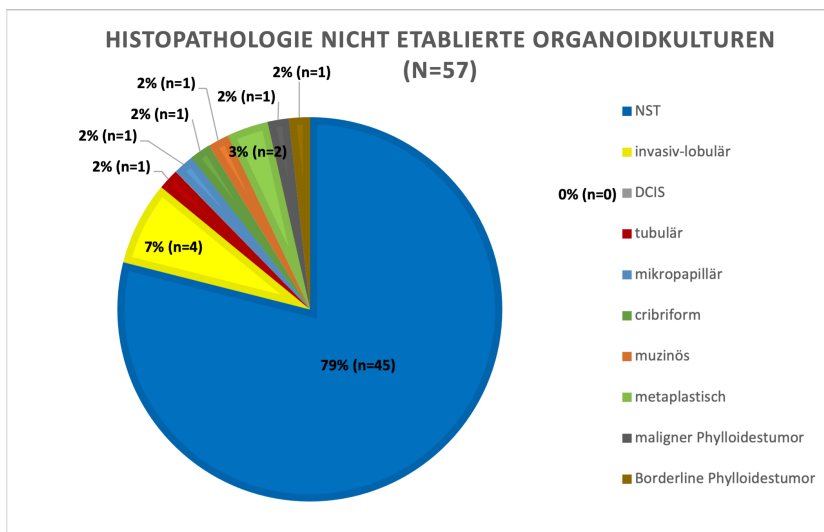
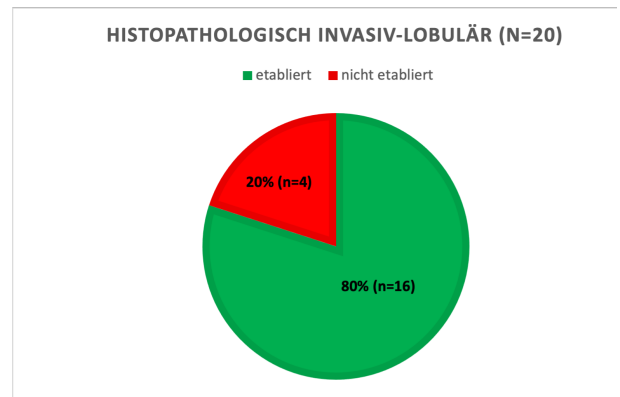
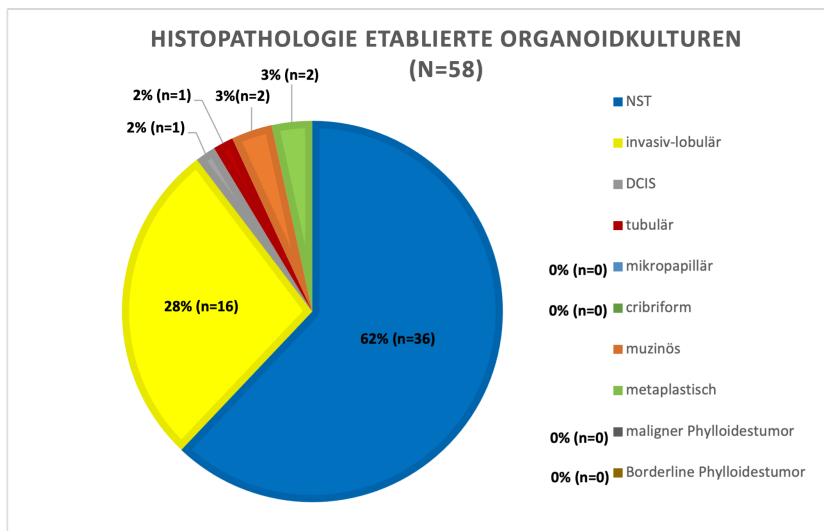
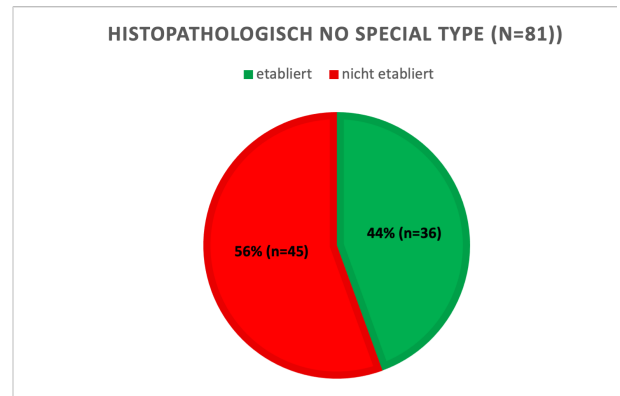
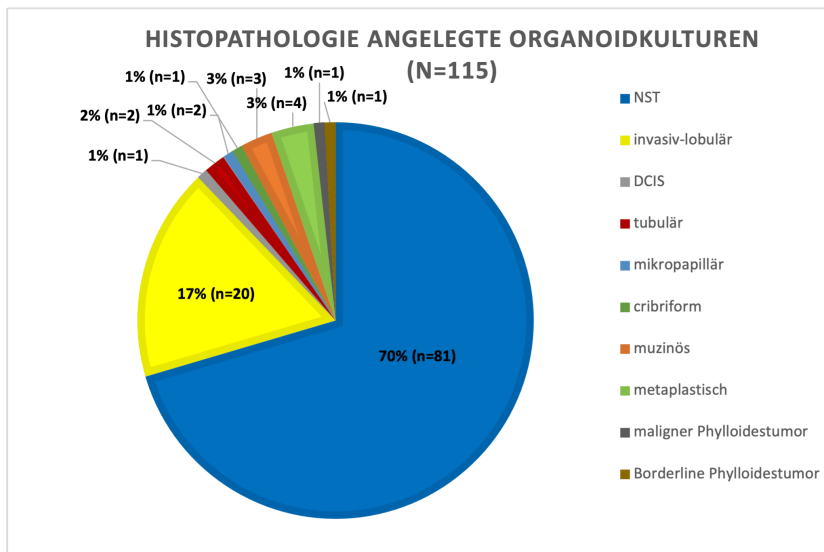
### 3.2.3.3 Histopathologischer Typus

Bei dem histopathologischen Typus des für die Organoidmodelle verwendeten Mammakarzinomgewebes handelte es sich in den meisten Fällen um den invasiv-duktales no special type (NST; 70%, 81 Modelle), gefolgt vom invasiv-lobulären Typ (17%, 20 Modelle). Die histopathologischen Sonderformen waren unter den Originaltumoren der Organoidmodelle zu je viel kleineren Prozentsätzen vertreten (teilweise nur ein Exemplar, siehe Abbildung 14). Auch die nicht-invasive Form des Mammakarzinoms war unter den für die Organoidkulturen verwendeten Tumorgeweben äußerst selten; es gab nur ein duktales Carcinoma in situ. Des Weiteren befanden sich unter den für die Organoidkulturen verwendeten Tumorgeweben zwei fibroepitheliale Phylloides tumoren.

Organoidkulturen aus invasiv-lobulären Mammakarzinomen ließen sich zu einem deutlich höheren Prozentsatz etablieren als Organoidkulturen aus Karzinomen des no special type (80%, 16 Modelle vs. 44%, 36 Modelle; siehe Abbildung 14).

Die Organoidmodelle aus muzinösen, metaplastischen und tubulären Tumoren ließen sich jeweils etwa gleich häufig etablieren wie nicht etablieren. Alle weiteren vertretenen Sonderformen (mikropapilläre und cribriforme Karzinome und die beiden Phylloides tumoren) ließen sich nicht erfolgreich als Organoidmodelle etablieren (siehe Abbildung 14).





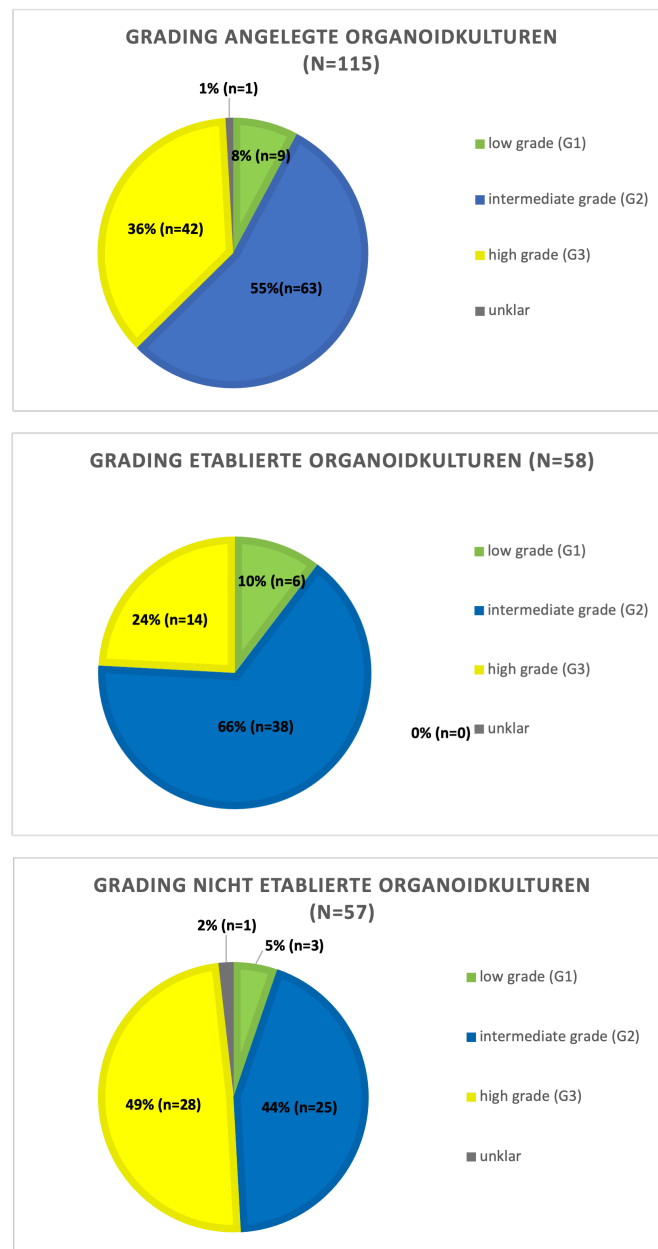
**Abbildung 14:** Histopathologischer Typ und Organoidwachstum

Darstellung, wie der histopathologische Typus der Originaltumoren mit dem Etablierungserfolg der von ihnen abgeleiteten Organoidmodelle zusammenhing.

### 3.2.3.4 Histopathologisches Grading

Unter den Organoidmodellen waren solche, die von intermediate grade (G2) Tumoren abgeleitet waren, am häufigsten (55%, 63 Modelle), gefolgt von high grade (G3) Tumoren (36%, 42 Modelle) und dann low grade (G1) Tumoren (8%, 9 Modelle) (siehe Abbildung 11).

Organoidmodelle aus den Zellen besser differenzierter Tumoren (G1 und G2) ließen sich prozentual häufiger etablieren als Organoidmodelle aus den Zellen schlecht differenzierter (G3) Mammakarzinome (siehe Abbildung 15).



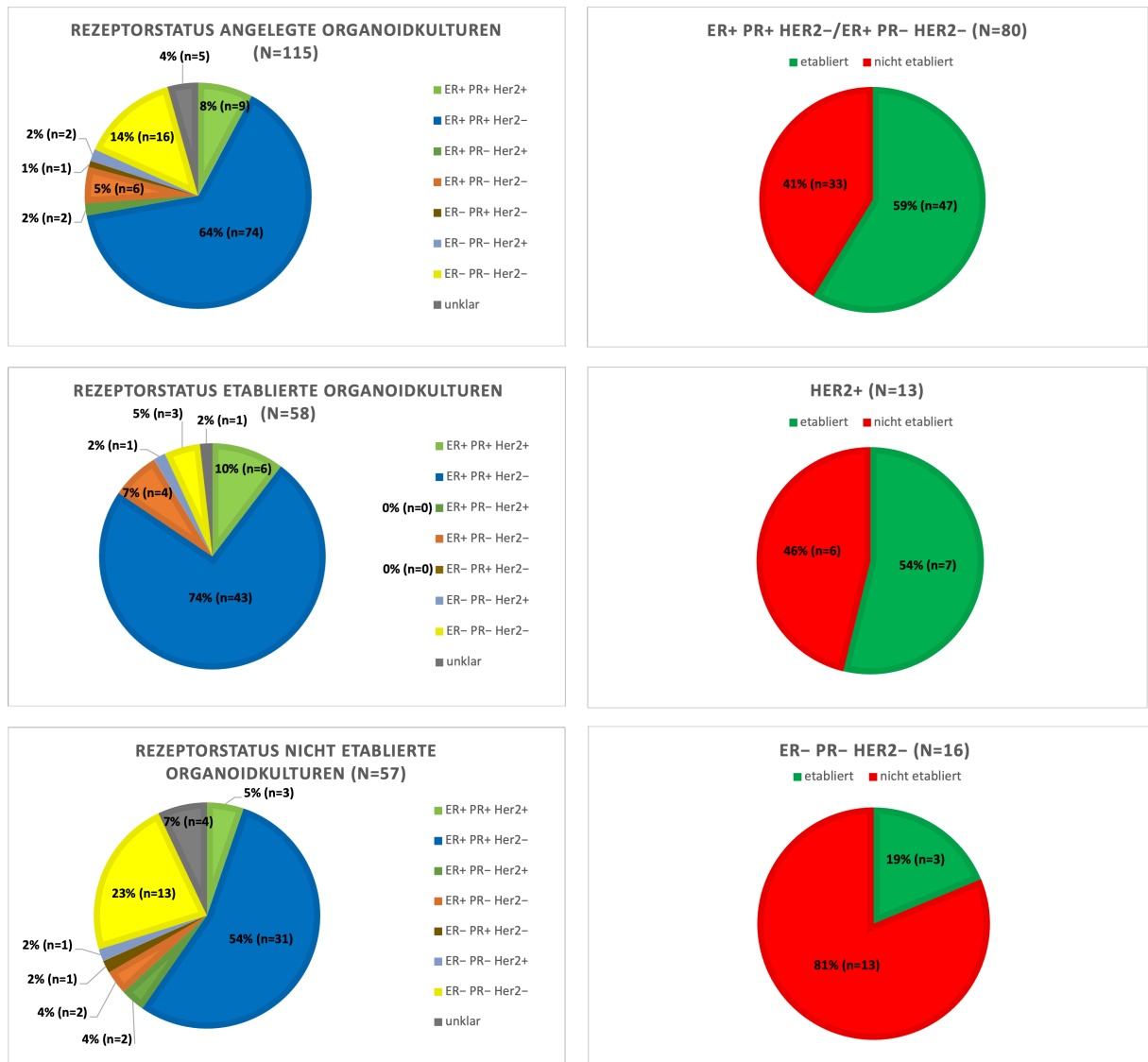
**Abbildung 15:** Histopathologisches Grading und Organoidwachstum

Darstellung, wie das histopathologische Grading der Originaltumoren mit dem Etablierungserfolg der von ihnen abgeleiteten Organoidmodelle zusammenhängt.

### 3.2.3.5 Rezeptorstatus

Unter den zum Anlegen von Organoidkulturen genutzten Tumorgeweben befanden sich zum Großteil solche, die Hormonrezeptor-positiv und Her2/neu-negativ waren (64%, 74 Modelle). Den zweitgrößten Anteil machten Organoidmodelle von sogenannten triple negativen Karzinomen aus, also solchen, die sowohl Hormonrezeptor- als auch Her2/neu-negativ waren (14%, 16 Modelle). Organoidmodelle von Tumoren, die sowohl Hormonrezeptor- als auch Her2/neu-positiv waren, machten 8% der Modelle (9 Modelle) aus und solche, die Östrogenrezeptor-positiv, aber Progesteronrezeptor- und Her2/neu-negativ waren, 5% (6 Modelle). Organoidkulturen aus Tumorgeweben mit allen weiteren Rezeptorkombinationen stellten im Rahmen der vorliegenden Arbeit eine Seltenheit dar; darunter Organoidmodelle, die Hormonrezeptor-negativ und Her2/neu-positiv waren, mit gerade einmal knapp 2% (2 Modelle) (siehe Abbildung 16).

Organoidmodelle von Mammakarzinomen, die Östrogenrezeptor-positiv und Her2/neu-negativ waren, ließen sich etwas häufiger etablieren als nicht etablieren (siehe Abbildung 16). Die Etablierung von Her2/neu-positiven Originaltumoren abgeleiteter Organoidmodelle gelang dagegen nur in etwa der Hälfte der Fälle (siehe Abbildung 16). Auffällig war, dass sich von den Organoidmodellen triple negativer Karzinome nur 3 Modelle (entsprechend 19%) etablieren ließen, 13 Modelle (entsprechend 81%) hingegen nicht (siehe Abbildung 16). Dass die Etablierung von Organoidmodellen aus triple negativen Tumorgeweben deutlich schwerer war, als das bei Organoidmodellen von Originaltumoren mit anderen Rezeptorstatus der Fall war, fiel uns bereits relativ früh beim Versuch der Etablierung der Organoidmodelle auf. Daher wurde auch der Versuch der Optimierung des Mamma(karzinom)-Organoid-Nährmediums für Organoidmodelle triple negativer Originaltumoren unternommen, in der Hoffnung, ihr Wachstum zu verbessern (siehe Punkt 3.4).



**Abbildung 16:** Rezeptorstatus und Organoidwachstum

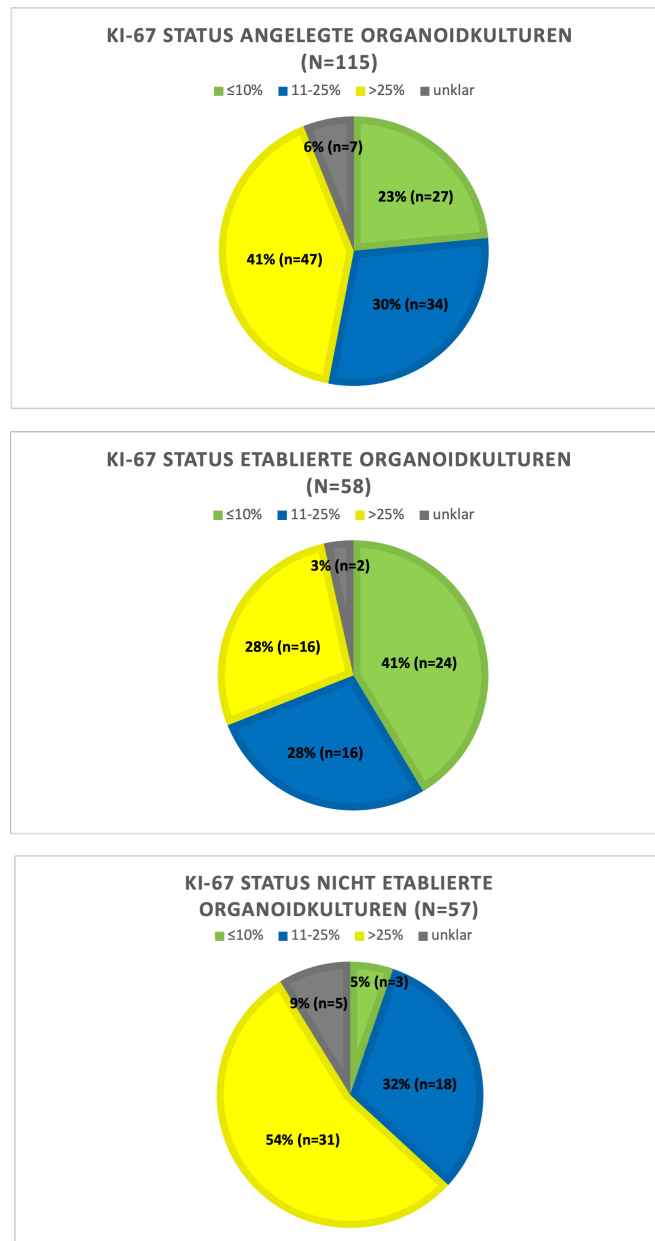
Darstellung, wie der Rezeptorstatus der Originaltumoren mit dem Etablierungserfolg der von ihnen abgeleiteten Organoidmodelle zusammenhing.

### 3.2.3.6 Ki-67-Status

Die meisten im Rahmen der vorliegenden Arbeit zum Anlegen von Organoidkulturen verwendeten Tumorgewebe hatten eine hohe Proliferationsrate mit über 25% Ki-67-positiver Zellen, gefolgt von einer mittleren Proliferationsrate mit 11-25% Ki-67-positiver Zellen und schließlich einer niedrigen Proliferationsrate mit unter 10% Ki-67-positiver Zellen (siehe Abbildung 17).

Organoidmodelle von Originaltumoren mit einem Ki-67-Wert zwischen 11 und 25% ließen sich zu einem in etwa gleichen Prozentsatz etablieren wie nicht etablieren (siehe Abbildung 17). Währenddessen ließen sich die Organoidmodelle, die von Originaltumoren mit niedrigen ( $\leq 10\%$ ) Ki-67-Werten abgeleitet waren, zu einem

deutlich höheren Prozentsatz etablieren als die Organoidmodelle, deren Originaltumoren einen hohen (>25%) Ki-67-Wert aufwiesen (siehe Abbildung 17).



**Abbildung 17:** Proliferationsrate und Organoidwachstum

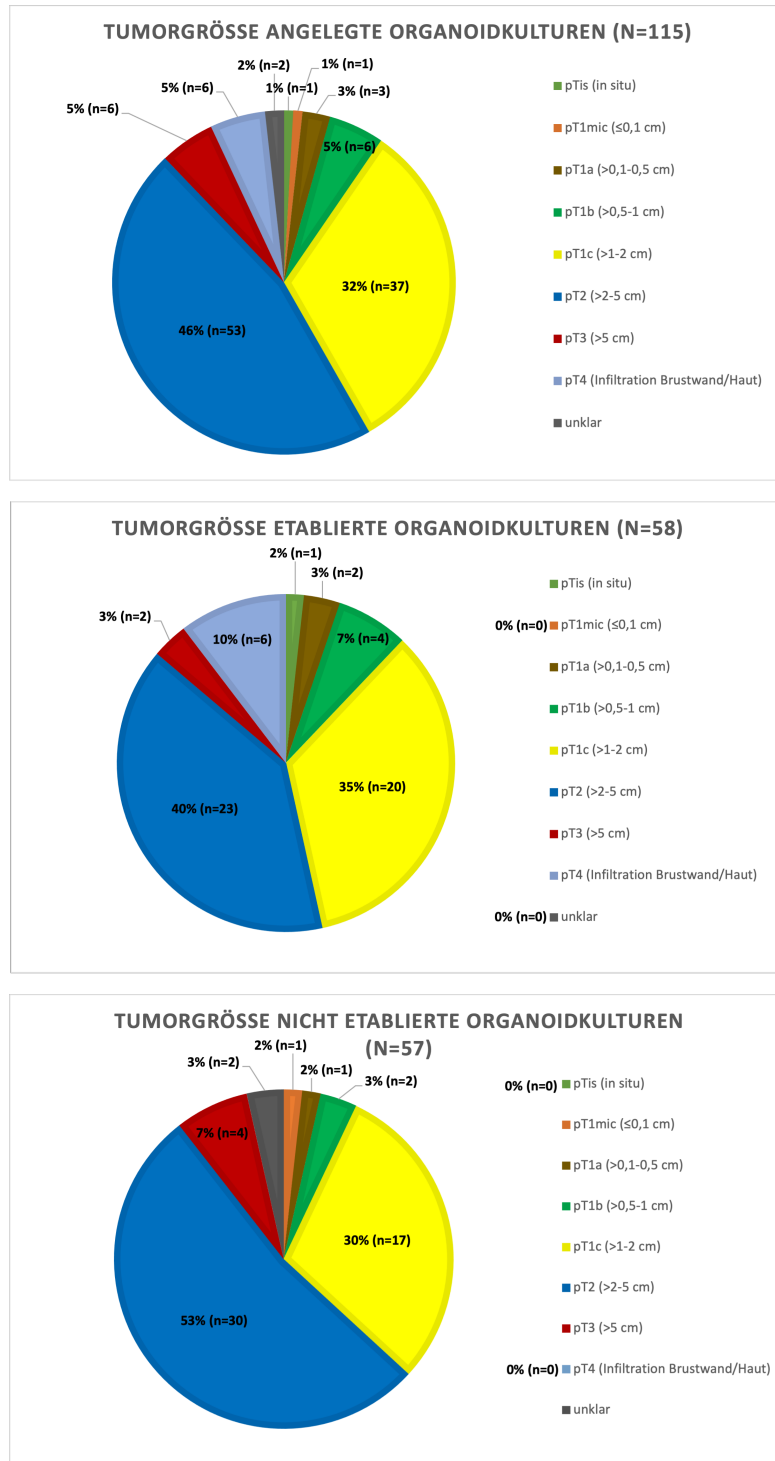
Darstellung, wie der Ki-67 Proliferationsindex der Originaltumoren mit dem Etablierungserfolg der von ihnen abgeleiteten Organoidmodelle zusammenhing.

### **3.2.3.7 Tumorgröße**

In der vorliegenden Arbeit wurde für das Anlegen von Organoidkulturen hauptsächlich Gewebe von etwa mittelgroßen Mammakarzinomen (pT1c; 1-2 cm: 32%, 37 Modelle und pT2; 2-5 cm: 46%, 53 Modelle) verwendet. Die genaue Größenverteilung ist Abbildung 18 zu entnehmen.

Das einzige Organoidmodell, das von einem nicht invasiven in situ Mammakarzinom stammte, wuchs gut und ließ sich etablieren, wohingegen sich das einzige Organoidmodell aus dem Gewebe eines Tumors der Kategorie pTmic ( $\leq 0,1$  cm) nicht etablieren ließ. Organoidmodelle von eher kleineren Tumoren (pT 1a-c; 0,1 bis 2 cm) ließen sich je zu einem höheren Prozentsatz etablieren als nicht etablieren (siehe Abbildung 18). Organoidmodelle, die von eher größeren Tumoren abgeleitet waren (pT2 und pT3; 2 bis  $>5$  cm) ließen sich hingegen etwas weniger oft etablieren als nicht etablieren (siehe Abbildung 18). Auffällig ist, dass alle sechs Organoidmodelle von Originaltumoren, die über die Organgrenzen hinaus gewachsen waren (pT4), erfolgreich etabliert werden konnten.

Natürlich hatte die Größe des Originaltumors auch einen Einfluss auf die Größe des Tumorgewebestücks, das uns von der Pathologie für die Verwendung im Rahmen dieser Arbeit zur Verfügung gestellt werden konnte. Inwiefern die Größe dieses Tumorstücks einen Einflussfaktor auf das Wachstum und damit den Etablierungserfolg der Organoidkulturen dargestellt haben könnte, wird unter Punkt 3.2.3.9 behandelt.



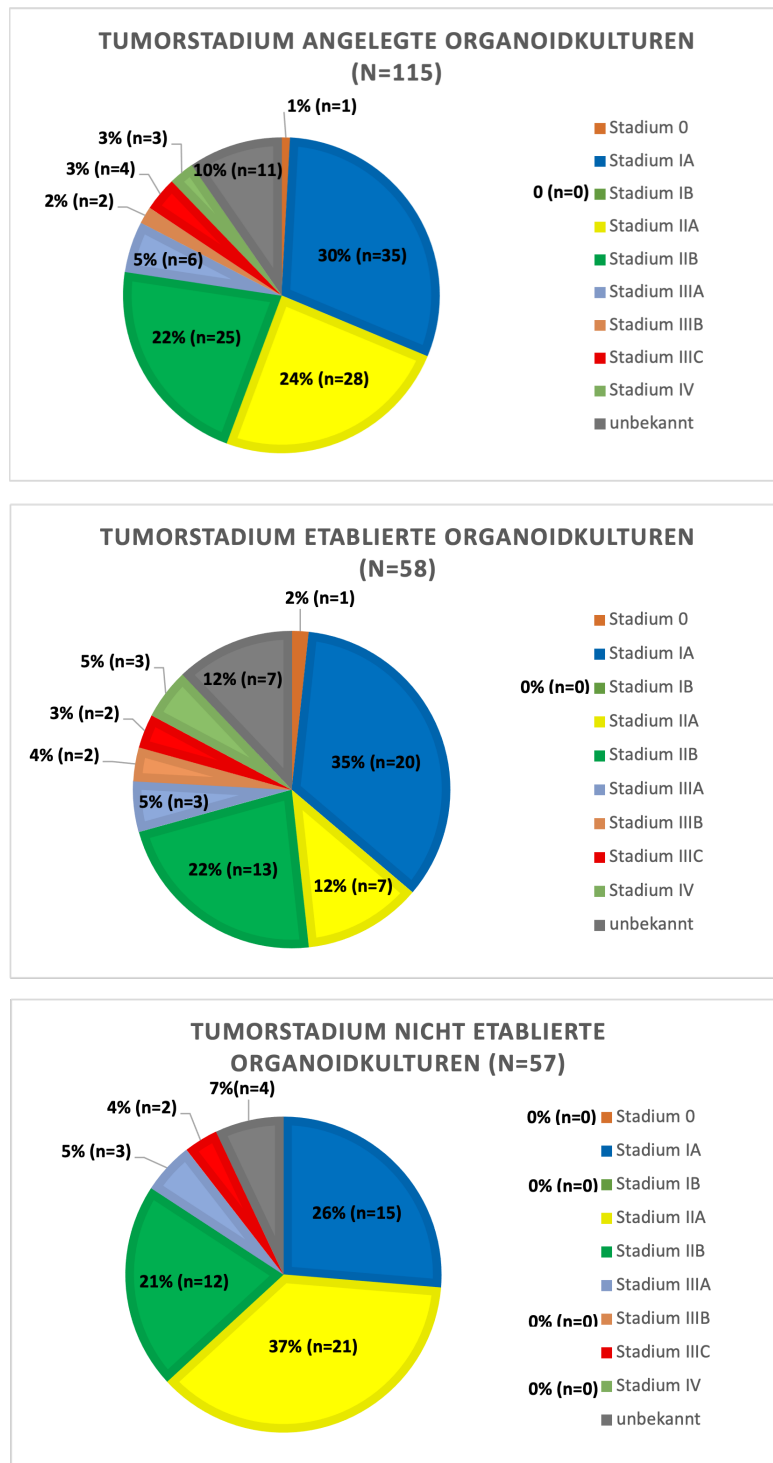
**Abbildung 18:** Größe/Ausdehnung des Originaltumors und Organoidwachstum  
Darstellung, wie die Tumorausdehnung der Originaltumoren bei OP nach der TNM-Klassifikation mit dem Etablierungserfolg der von ihnen abgeleiteten Organoidmodelle zusammenhing.

### **3.2.3.8 Tumorstadium**

Wie in Abbildung 19 zu erkennen ist, stammten die im Rahmen der vorliegenden Studie geschaffenen Organoidmodelle hauptsächlich von Patient\*innen, die sich bei Entdeckung und Therapie der Tumorerkrankung noch in einem relativ frühen Krankheitsstadium befanden (Stadium 0 bis IIB). Tumoren dieser Stadien machten 77% der Originaltumoren aus (89 Modelle), deren Gewebe zum Anlegen von Organoidkulturen verwendet wurde. Weiter fortgeschrittene Tumoren (Stadium IIIA bis IV) waren unter den Organoidmodellen nur zu 13% (15 Modelle) vertreten. Die restlichen 10% (11 Modelle) entfielen auf Tumoren, deren Stadium unklar blieb, da zum Zeitpunkt der Datenerhebung für die vorliegende Studie der Lymphknotenstatus oder das Vorhandensein von Fernmetastasen oder beide Parameter nicht eindeutig bestimmt worden waren.

Organoidmodelle von Tumoren früherer Stadien (Stadium 0 bis IIB) ließen sich insgesamt etwas häufiger nicht etablieren als etablieren (84%, 48 Modelle vs. 71%, 41 Modelle, siehe Abbildung 19). Bei Organoidmodellen von Tumoren weiter fortgeschrittener Stadien (Stadium IIIA bis IV) war dieses Verhältnis genau umgekehrt (9%, 5 Modelle vs. 17%, 10 Modelle, siehe Abbildung 19). Allerdings gab es Unterschiede zwischen den einzelnen Stadien. So gelang die Etablierung von Organoidmodellen von Originaltumoren, die sich zum Behandlungszeitpunkt im Stadium IA befanden deutlich besser als die Etablierung von Organoidmodellen, deren Originaltumoren sich im Stadium IIA befanden (siehe Abbildung 19). Es fällt außerdem auf, dass sich sowohl das Organoidmodell des sich im frühesten Stadium 0 befindlichen Tumors, als auch sämtliche Organoidmodelle, deren Originaltumoren das höchste Stadium IV erreicht hatten, problemlos etablieren ließen.





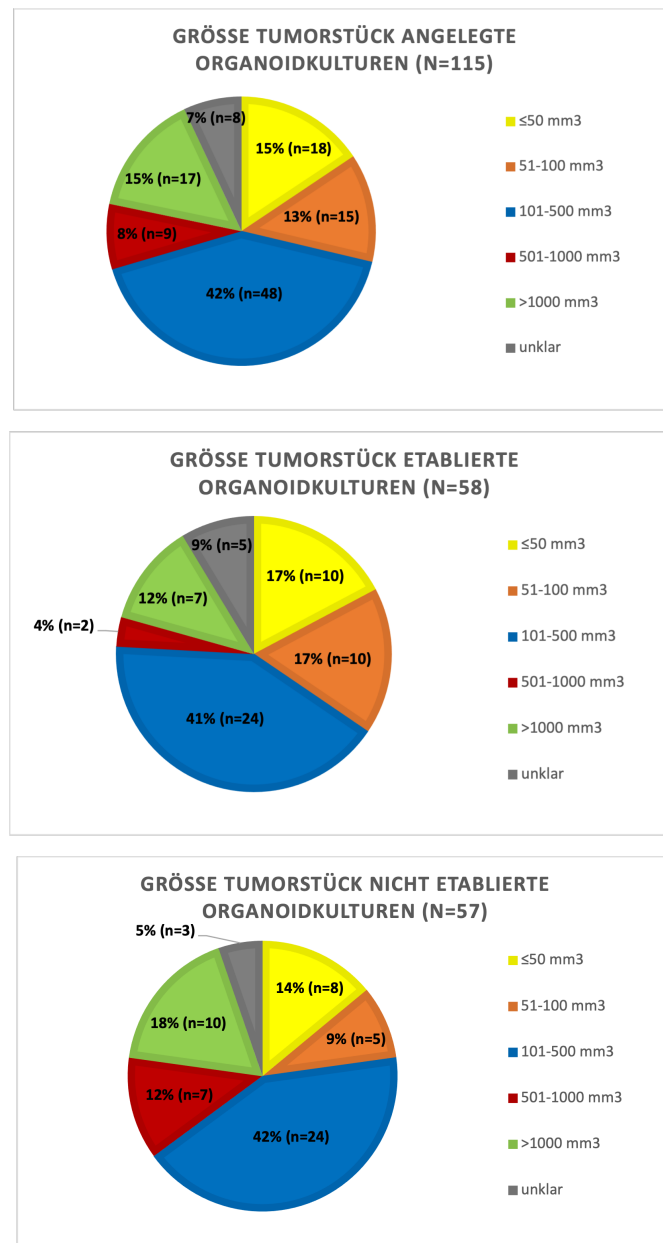
**Abbildung 19:** Tumorstadium und Organoidwachstum  
 Darstellung, wie das AJCC-Stadium der Originaltumoren bei OP mit dem Etablierungserfolg der von ihnen abgeleiteten Organoidmodelle zusammenhing.

### **3.2.3.9 Größe des verarbeiteten Tumorgewebestücks**

Wie unter Punkt 2.2.1 beschrieben, wurde das von der Pathologie zur Verfügung gestellte Mammakarzinomgewebe vor der Verarbeitung fotografisch mit Größenmaßstab dokumentiert und mit Hilfe dieser Fotos später die Größe der Tumorstücke abgeschätzt.

Die meisten Tumorstücke (42%, 48 Modelle) lagen in einem Größenbereich von 100-500 mm<sup>3</sup>; 28% (33 Modelle) lagen darunter und 23% (26 Modelle) darüber (siehe Abbildung 20).

Organoidmodelle aus mittelgroßen Tumorgewebestücken (100-500 mm<sup>3</sup>) ließen sich zu einem etwa gleich großen Prozentsatz etablieren wie nicht etablieren (siehe Abbildung 20). Organoidmodelle aus großen Tumorgewebestücken (500 bis >1000 mm<sup>3</sup>) ließen sich währenddessen prozentual weniger häufig etablieren als Organoidmodelle aus kleinen Tumorgewebestücken ( $\leq 50$  bis 100 mm<sup>3</sup>) (siehe Abbildung 20). Allerdings gilt es zu bedenken, dass das gesamte von der Pathologie zur Verfügung gestellte Tumorgewebestück fotografiert und für diese Klassifikation herangezogen wurde, inklusive des das eigentliche Karzinom umgebenden Fett- und Bindegewebes.

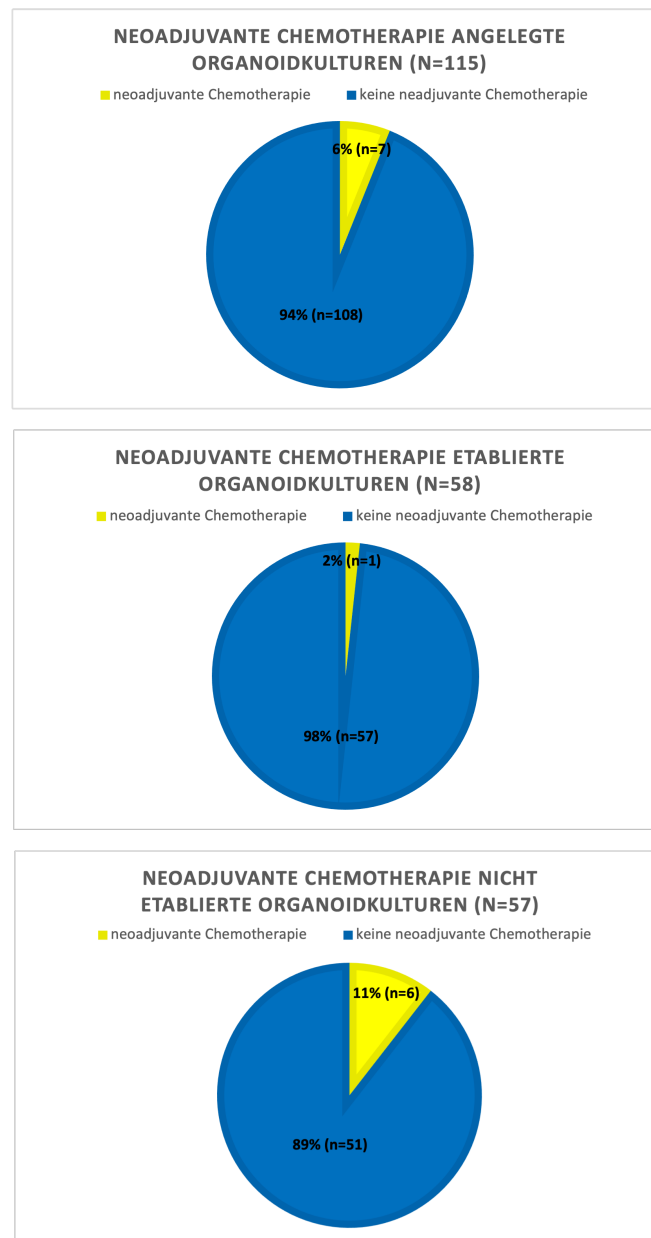


**Abbildung 20:** Größe des verarbeiteten Tumorgewebestücks und Organoidwachstum  
Darstellung, wie die Größe des verarbeiteten Gewebestücks der Originaltumoren mit dem Etablierungserfolg der von ihnen abgeleiteten Organoidmodelle zusammenhing.

### 3.2.3.10 Neoadjuvante Chemotherapie

Sieben (entsprechend 6%) der Mammakarzinome, deren Gewebe im Rahmen der vorliegenden Arbeit für das Anlegen von Organoidkulturen genutzt wurde, waren vor der Operation durch neoadjuvante Chemotherapie vorbehandelt worden.

Nur eines dieser sieben Organoidmodelle von chemotherapeutisch vorbehandelten Tumoren ließ sich erfolgreich etablieren (siehe Abbildung 21).



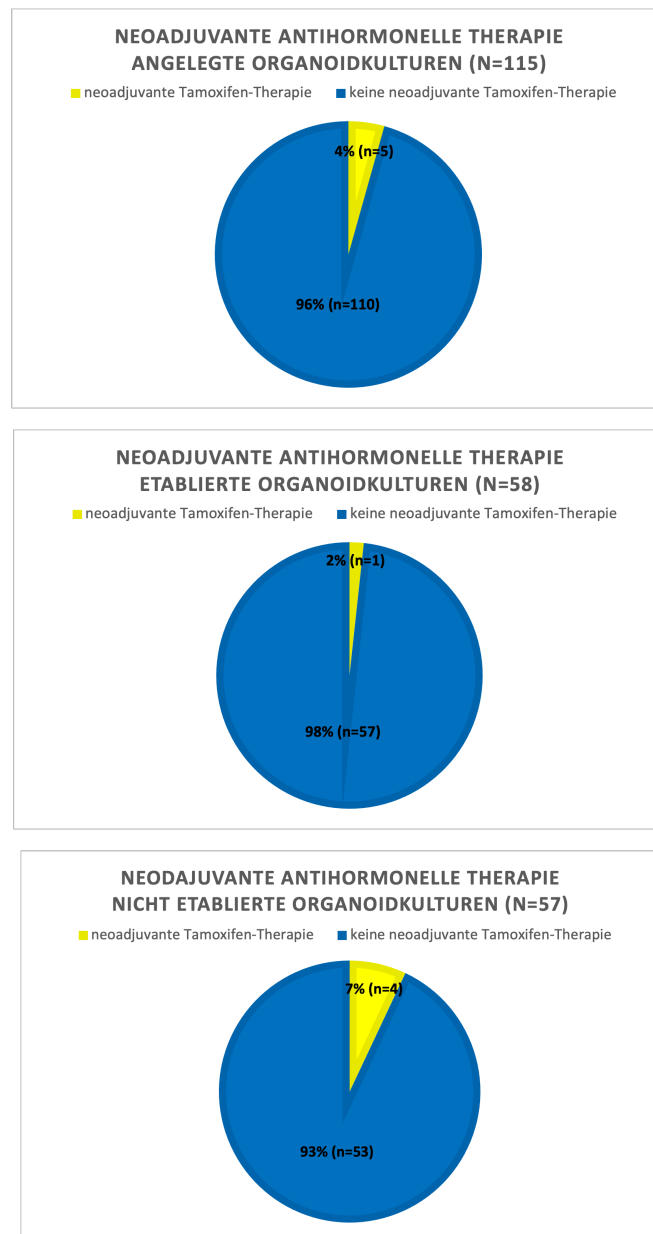
**Abbildung 21:** Neoadjuvante Chemotherapie und Organoidwachstum

Darstellung, wie die neoadjuvante chemotherapeutische Vorbehandlung der Originaltumoren mit dem Etablierungserfolg der von ihnen abgeleiteten Organoidmodelle zusammenhing.

### 3.2.3.11 Neoadjuvante antihormonelle Therapie

Fünf der Östrogenrezeptor-positiven Mammakarzinome, deren Gewebe im Rahmen der vorliegenden Arbeit für das Anlegen von Organoidkulturen genutzt wurde, waren vor der Operation im Rahmen einer neoadjuvanten antihormonellen Therapie mit dem Östrogenrezeptormodulator Tamoxifen behandelt worden. Dies entspricht 4% der Originaltumoren, von denen Organoidmodelle abgeleitet wurden.

Nur eines dieser fünf Organoidmodelle von antihormonell vorbehandelten Tumoren konnte erfolgreich etabliert werden (siehe Abbildung 22).



**Abbildung 22:** Neoadjuvante antihormonelle Therapie und Organoidwachstum  
Darstellung, wie die neoadjuvante antihormonelle Vorbehandlung der Originaltumoren mit Tamoxifen mit dem Etablierungserfolg der von ihnen abgeleiteten Organoidmodelle zusammenhing.

### **3.3 Versuch zur Optimierung des Nährmediums für Organoidmodelle triple negativer Originaltumoren**

#### **3.3.1 Übersicht**

Im Folgenden findet sich eine optische Darstellung des Wachstums der ausgewählten triple negativen Organoidmodelle unter Behandlung mit den fünf verschiedenen Nährmedien mit Erläuterungen. Die Angaben in den Abbildungen beziehen sich darauf, welche Wachstumsfaktoren in den jeweiligen Nährmedien vorhanden waren:

**Reihe 1:** L-WRN konditioniertes Medium und damit Wnt3a, R-Spondin3 und Noggin.

**Reihe 2:** R-Spondin1 konditioniertes Medium und Noggin.

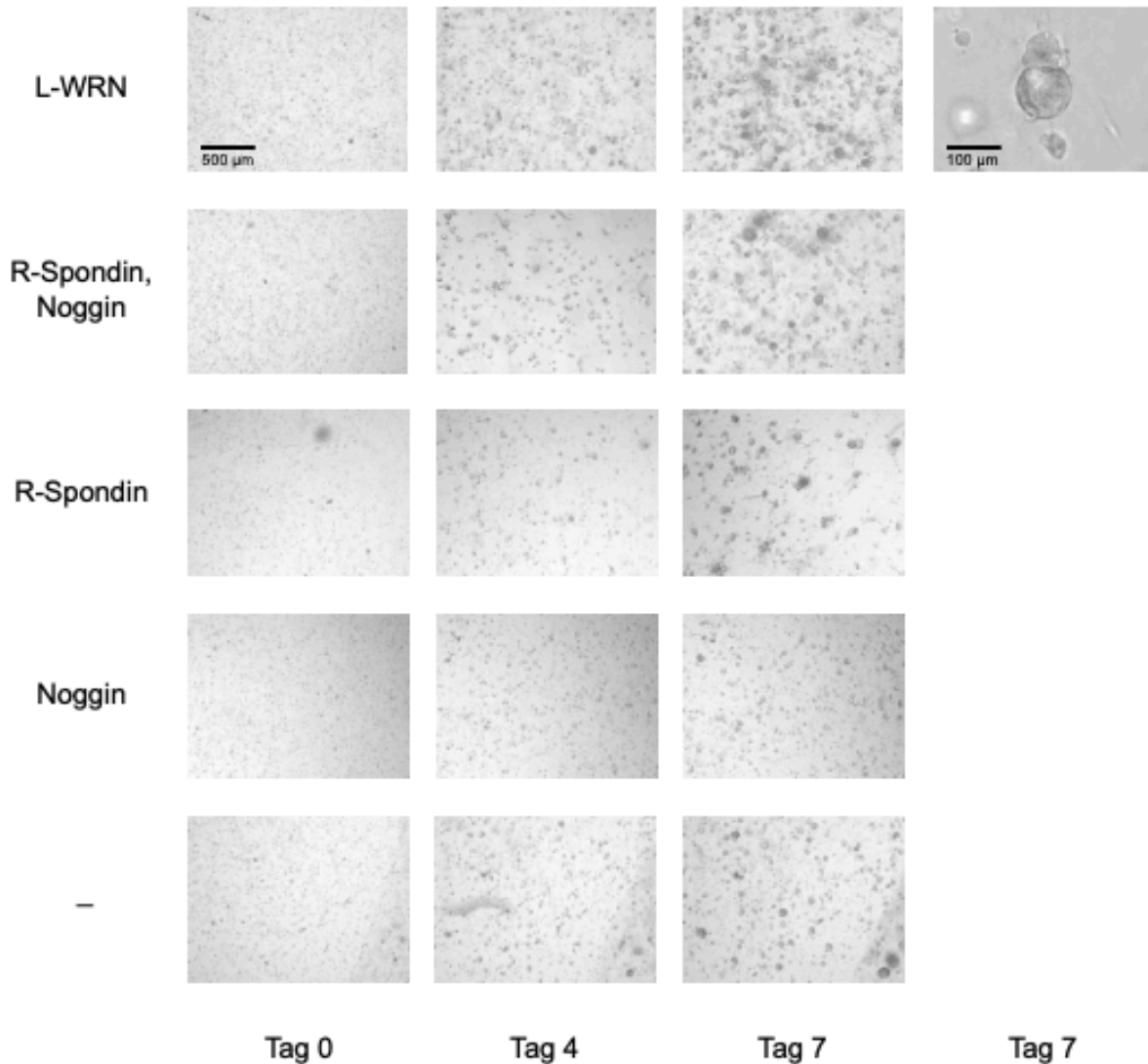
**Reihe 3:** Nur R-Spondin1 konditioniertes Medium.

**Reihe 4:** Nur Noggin.

**Reihe 5:** Keiner der drei Wachstumsfaktoren.

### 3.3.2 Einzelne Modelle

#### 3.3.2.1 Organoidmodell Nr. 56



**Abbildung 23:** Wachstum des Organoidmodells BC-ORG #56 im ersten Ansatz unter Behandlung mit den Nährmedien verschiedener Zusammensetzung der Faktoren Wnt, R-Spondin und Noggin.

Die Zusammensetzung aller weiteren Wachstumsfaktoren ist in jeder der Mediumrezepturen gleich und entspricht dem Mamma(karzinom)-Organoid-Nährmedium nach Sachs et al., 2018.

Zeile 1: Das Nährmedium enthält L-WRN konditioniertes Medium und damit die drei Faktoren Wnt3a, R-Spondin3 und Noggin.

Zeile 2: Das Nährmedium enthält die Faktoren R-Spondin1 und Noggin.

Zeile 3: Das Nährmedium enthält den Faktor R-Spondin1.

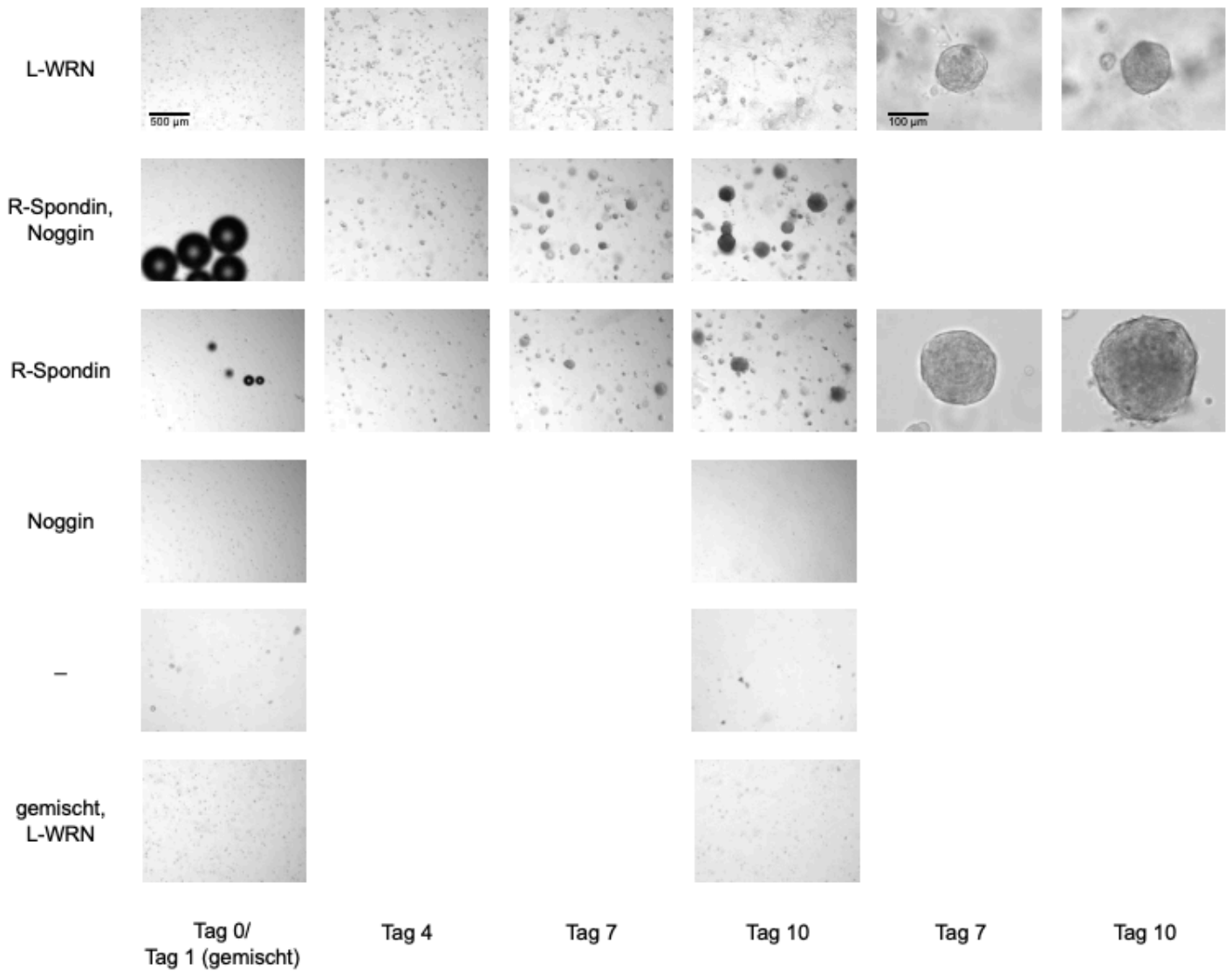
Zeile 4: Das Nährmedium enthält den Faktor Noggin.

Zeile 5: Das Nährmedium enthält keinen der drei Faktoren.

Wie man in Abbildung 23 sehen kann, wuchsen nach dem ersten Ansatz der Kulturen unabhängig von der Zusammensetzung des Nährmediums einige Organoide heran. Allerdings kann man erkennen, dass die Organoide in den ersten drei Reihen, also unter Behandlung mit Nährmedium, das alle drei Wachstumsfaktoren, R-Spondin1 und Noggin oder R-Spondin1 allein enthielt insgesamt etwas größer und dichter wuchsen als unter Behandlung mit Nährmedium, welches nur Noggin oder keinen der drei Wachstumsfaktoren enthielt. Dieses insgesamt schlechtere Wachstum war besonders auffällig bei den Organoidkulturen, deren Nährmedium nur Noggin allein enthielt.

Die mit verschiedenen Nährmedien gewachsenen Organoidkulturen wurden dann getrennt voneinander passagiert, allerdings wurde auch ein Gemisch aller Zellen, die mit den verschiedenen Nährmedien behandelt worden waren, hergestellt und damit wiederum eigene Organoidkulturen angelegt. Auf diese, in Abbildung 24 als „gemischt“ bezeichneten Kulturen, wurde dann das Standard-Brustkrebs-Organoid-Nährmedium gegeben, das L-WRN konditioniertes Medium enthielt.





**Abbildung 24:** Organoidmodell BC-ORG #56 in Passage 1 unter Behandlung mit den Nährmedien verschiedener Zusammensetzung der Faktoren Wnt, R-Spondin und Noggin.

Die Zusammensetzung aller weiteren Wachstumsfaktoren ist in jeder der Mediumrezepturen gleich und entspricht dem Mamma(karzinom)-Organoid-Nährmedium nach Sachs et al., 2018.

Zeile 1: Das Nährmedium enthält L-WRN konditioniertes Medium und damit die drei Faktoren Wnt3a, R-Spondin3 und Noggin.

Zeile 2: Das Nährmedium enthält die Faktoren R-Spondin1 und Noggin.

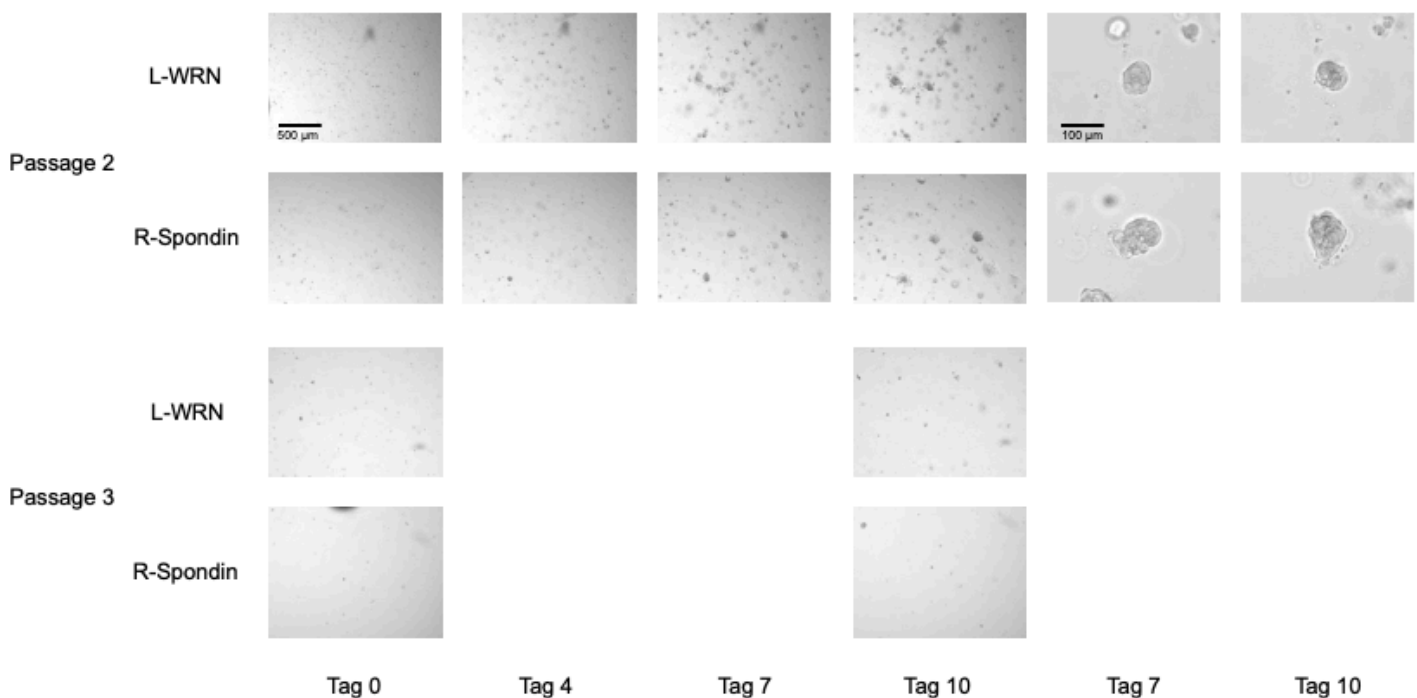
Zeile 3: Das Nährmedium enthält den Faktor R-Spondin1.

Zeile 4: Das Nährmedium enthält den Faktor Noggin.

Zeile 5: Das Nährmedium enthält keinen der drei Faktoren.

Zeile 6: Gemisch von Zellen aller Versuchsgruppen aus dem ersten Ansatz und Behandlung mit Nährmedium, welches alle drei Wachstumsfaktoren enthielt.

Wie in Abbildung 24 zu sehen ist, wuchsen die Organoidkulturen, deren Nährmedium alle drei Wachstumsfaktoren, R-Spondin1 und Noggin oder nur R-Spondin1 enthielt, nach der ersten Passagierung weiter, während die Kulturen, deren Nährmedium nur Noggin oder keinen der drei Wachstumsfaktoren enthielt, kein Wachstum mehr zeigten. Das Zellgemisch, das nun mit Nährmedium behandelt wurde, das alle drei Wachstumsfaktoren enthielt, zeigte ebenfalls keinerlei Organoidwachstum. Daher wurden die Kulturen dieser drei Kategorien verworfen. Des Weiteren wurden die mit Nährmedium, das R-Spondin1 und Noggin enthielt behandelten Zellen und die Zellen, deren Nährmedium nur R-Spondin1 enthielt, nach der zweiten Passagierung vermischt und erhielten fortan Nährmedium, das lediglich R-Spondin1 enthielt. Dieser Schritt wurde durchgeführt, weil kein großer Unterschied im Organoidwachstum dieser Kulturen sichtbar geworden war und es damit so schien, als sei der Faktor Noggin nicht ausschlaggebend für das Wachstum der Organoidkulturen und damit entbehrlich.



**Abbildung 25:** Organoidmodell BC-ORG #56 in Passage 2 und 3 unter Behandlung mit den Nährmedien verschiedener Zusammensetzung der Faktoren Wnt, R-Spondin und Noggin.

Die Zusammensetzung aller weiteren Wachstumsfaktoren ist in jeder der Mediumrezepturen gleich und entspricht dem Mamma(karzinom)-Organoid-Nährmedium nach Sachs et al., 2018.

Zeile 1: Das Nährmedium enthält L-WRN konditioniertes Medium und damit die drei Faktoren Wnt3a, R-Spondin3 und Noggin.

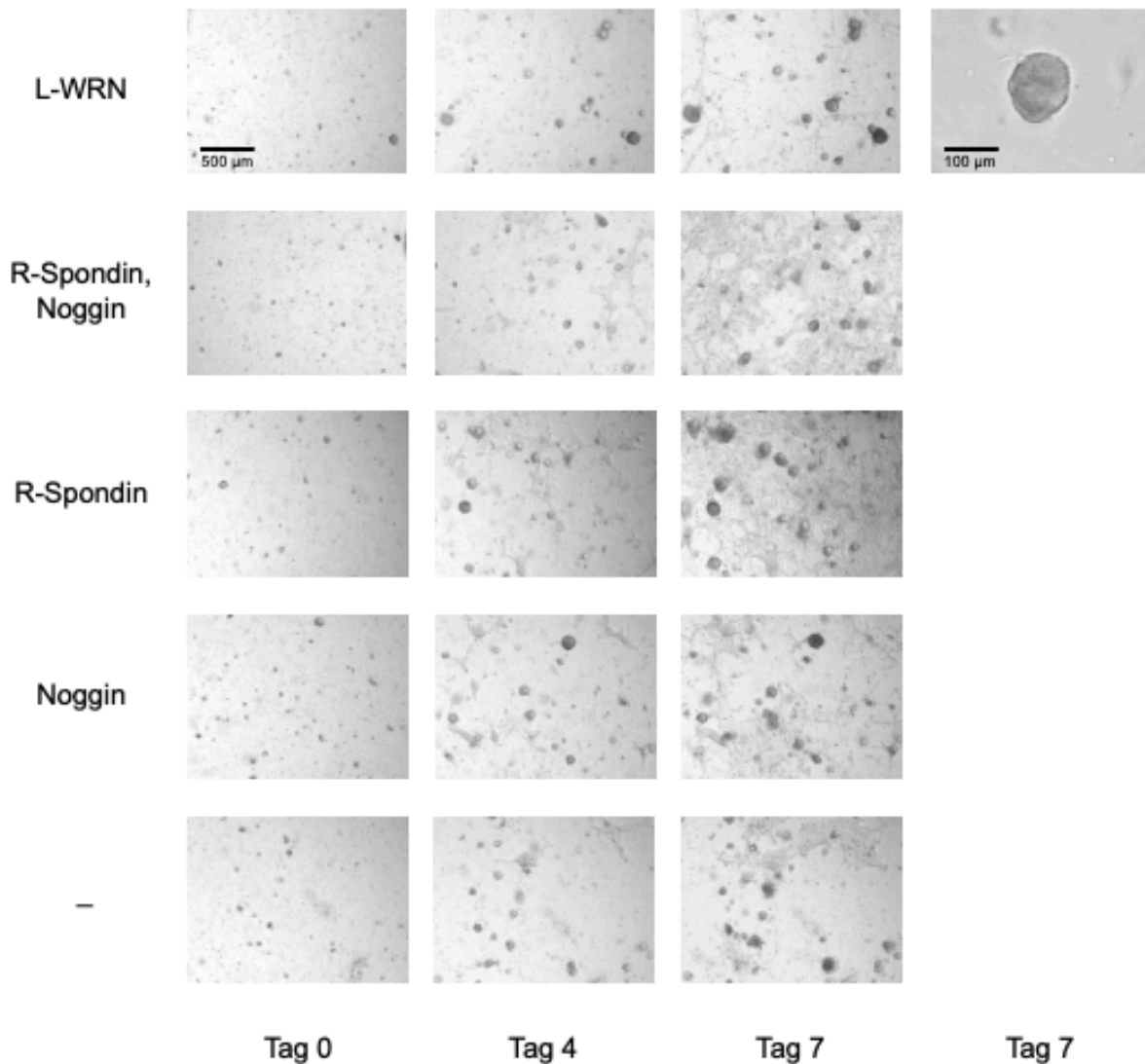
Zeile 2: Das Nährmedium enthält den Faktor R-Spondin1.

Wie in man in Abbildung 25 erkennen kann, ließ das Organoidwachstum sowohl bei den Kulturen, deren Nährmedium L-WRN konditioniertes Medium enthielt als auch bei denen, deren Nährmedium R-Spondin1 konditioniertes Medium enthielt nach der zweiten Passagierung deutlich nach; die Organoide waren spärlicher und kleiner.

Nach der dritten Passagierung schließlich zeigten auch diese Kulturen, unabhängig vom Nährmedium, keinerlei Organoidwachstum mehr und mussten deshalb verworfen werden.

Allgemein war zu beobachten, dass bei Organoidmodell Nr. 56 die Zellen, die mit Nährmedium behandelt wurden, das L-WRN konditioniertes Medium enthielt, stärker dazu tendierten, flächig am Boden der Wells anstatt innerhalb der Matrigel-Domes als dreidimensionale Strukturen zu wachsen als dies bei den Zellen, die mit den anderen Nährmedien behandelt worden waren, der Fall war (siehe v. a. Abbildung 24).

## 3.3.2.2 Organoidmodell Nr. 100



**Abbildung 26:** Organoidmodell BC-ORG #100 im ersten Ansatz unter Behandlung mit den Nährmedien verschiedener Zusammensetzung der Faktoren Wnt, R-Spondin und Noggin.

Die Zusammensetzung aller weiteren Wachstumsfaktoren ist in jeder der Mediumrezepturen gleich und entspricht dem Mamma(karzinom)-Organoid-Nährmedium nach Sachs et al., 2018.

Zeile 1: Das Nährmedium enthält L-WRN konditioniertes Medium und damit die drei Faktoren Wnt3a, R-Spondin3 und Noggin.

Zeile 2: Das Nährmedium enthält die Faktoren R-Spondin1 und Noggin.

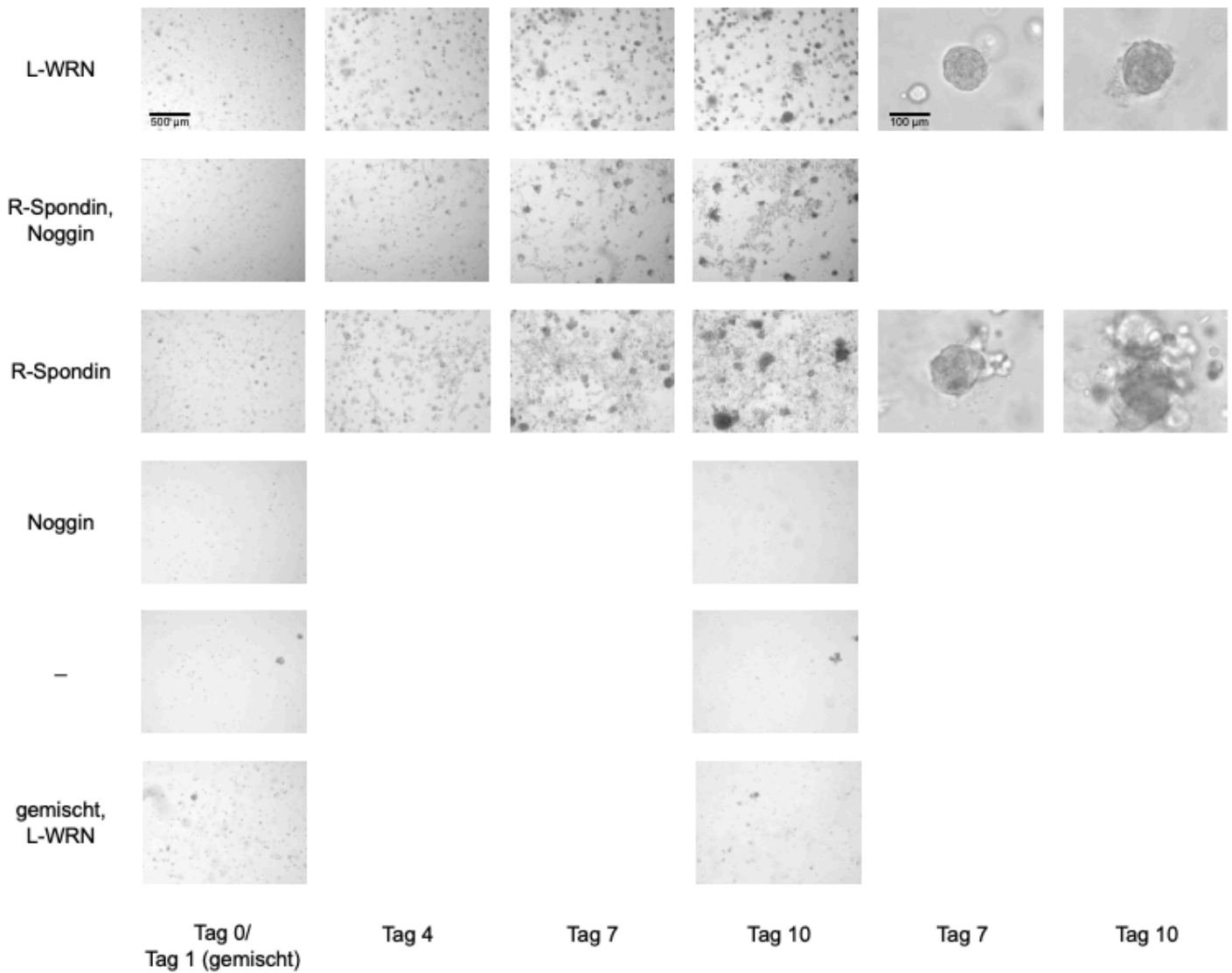
Zeile 3: Das Nährmedium enthält den Faktor R-Spondin1.

Zeile 4: Das Nährmedium enthält den Faktor Noggin.

Zeile 5: Das Nährmedium enthält keinen der drei Faktoren.

Wie in Abbildung 26 zu erkennen ist, ließen sich nach dem ersten Ansatz der Organoidkulturen des Modells Nr. 100 keine allzu großen Unterschiede beim Organoidwachstum unter Behandlung mit den verschiedenen Nährmedien erkennen. Es fällt aber auf, dass besonders die Zellen, die mit Nährmedium behandelt wurden, welches R-Spondin1 und Noggin oder nur R-Spondin1 enthielt, dazu tendierten, flächig am Boden der Wells anstatt als dreidimensionale Organoide innerhalb der Matrigel-Domes zu wachsen. Bei den Zellen, deren Nährmedium ausschließlich Noggin oder keinen der drei Faktoren enthielt, war dieser Effekt auch sichtbar, aber weniger stark ausgeprägt.

Analog zum Organoidmodell Nr. 56 wurde auch beim Modell Nr. 100 bei der ersten Passagierung ein Gemisch aller Zellen, die mit den verschiedenen Nährmedien behandelt worden waren, hergestellt und damit wiederum eigene Organoidkulturen angelegt. Auch hier erhielten diese Kulturen fortan Standard-Nährmedium, das L-WRN konditioniertes Medium enthielt.



**Abbildung 27:** Organoidmodell BC-ORG #100 in Passage 1 unter Behandlung mit den Nährmedien verschiedener Zusammensetzung der Faktoren Wnt, R-Spondin und Noggin.

Die Zusammensetzung aller weiteren Wachstumsfaktoren ist in jeder der Mediumrezepturen gleich und entspricht dem Mamma(karzinom)-Organoid-Nährmedium nach Sachs et al., 2018.

Zeile 1: Das Nährmedium enthält L-WRN konditioniertes Medium und damit die drei Faktoren Wnt3a, R-Spondin3 und Noggin.

Zeile 2: Das Nährmedium enthält die Faktoren R-Spondin1 und Noggin.

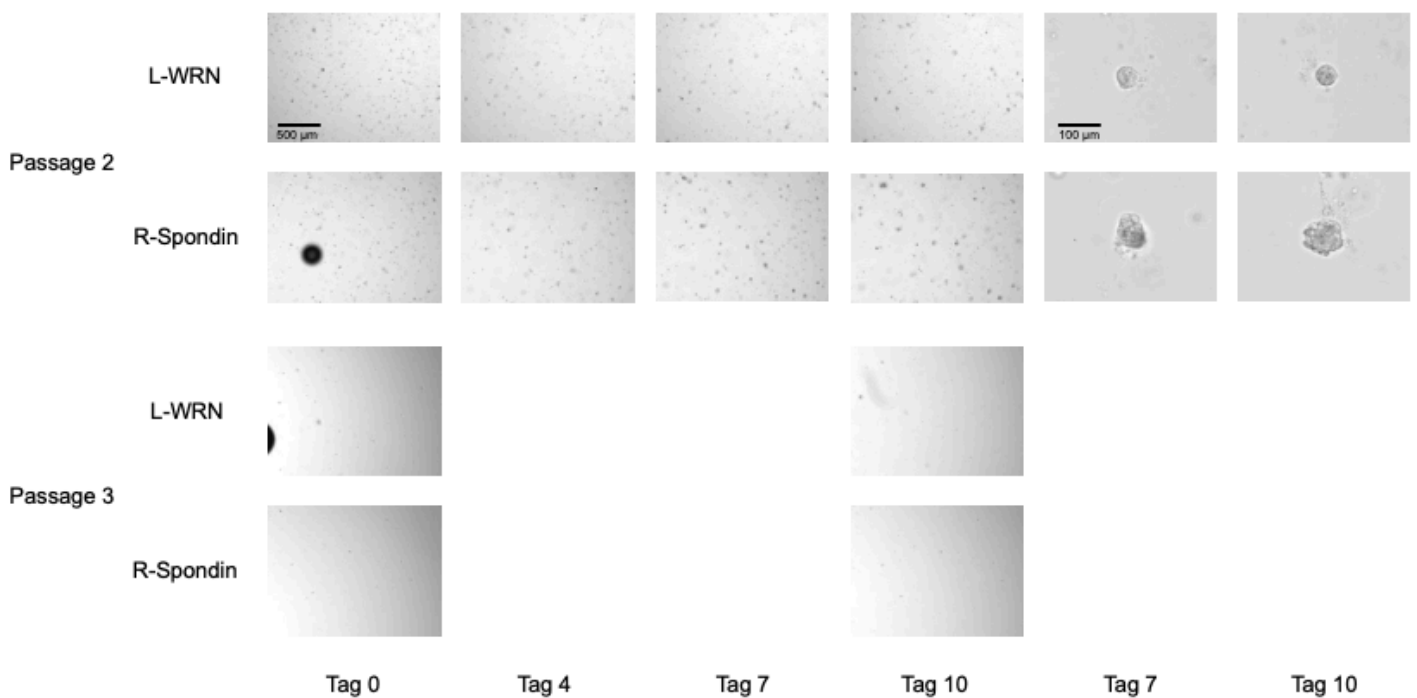
Zeile 3: Das Nährmedium enthält den Faktor R-Spondin1.

Zeile 4: Das Nährmedium enthält den Faktor Noggin.

Zeile 5: Das Nährmedium enthält keinen der drei Faktoren.

Zeile 6: Gemisch von Zellen aller Versuchsgruppen aus dem ersten Ansatz und Behandlung mit Nährmedium, welches alle drei Wachstumsfaktoren enthielt.

Wiederum analog zum Organoidmodell Nr. 56 ist in Abbildung 27 zu sehen, dass die Organoidkulturen, deren Nährmedium alle drei Wachstumsfaktoren, R-Spondin1 und Noggin oder nur R-Spondin1 enthielt, nach der ersten Passagierung weiterwuchsen, während die Kulturen, deren Nährmedium nur Noggin oder keinen der drei Wachstumsfaktoren enthielt, kein Wachstum mehr zeigten. Das Zellgemisch, das nun mit Nährmedium behandelt wurde, das alle drei Wachstumsfaktoren enthielt, zeigte ebenfalls keinerlei Organoidwachstum. Daher wurden die Kulturen dieser drei Kategorien verworfen. Des Weiteren wurden die mit Nährmedium, das R-Spondin1 und Noggin enthielt behandelten Zellen und die Zellen, deren Nährmedium nur R-Spondin1 enthielt, nach der zweiten Passagierung vermischt und erhielten fortan Nährmedium, das lediglich R-Spondin1 enthielt, da auch hier kein wirklicher Unterschied im Organoidwachstum dieser Kulturen sichtbar geworden war. Weiterhin ist die Tendenz zum flächigen Wachstum der Zellen, die mit diesen beiden Nährmedien behandelt wurden, in Abbildung 27 zu erkennen.



**Abbildung 28:** Organoidmodell BC-ORG #100 in Passage 2 und 3 unter Behandlung mit den Nährmedien verschiedener Zusammensetzung der Faktoren Wnt, R-Spondin und Noggin.

Die Zusammensetzung aller weiteren Wachstumsfaktoren ist in jeder der Mediumrezepturen gleich und entspricht dem Mamma(karzinom)-Organoid-Nährmedium nach Sachs et al., 2018.

Zeile 1: Das Nährmedium enthält L-WRN konditioniertes Medium und damit die drei Faktoren Wnt3a, R-Spondin3 und Noggin.

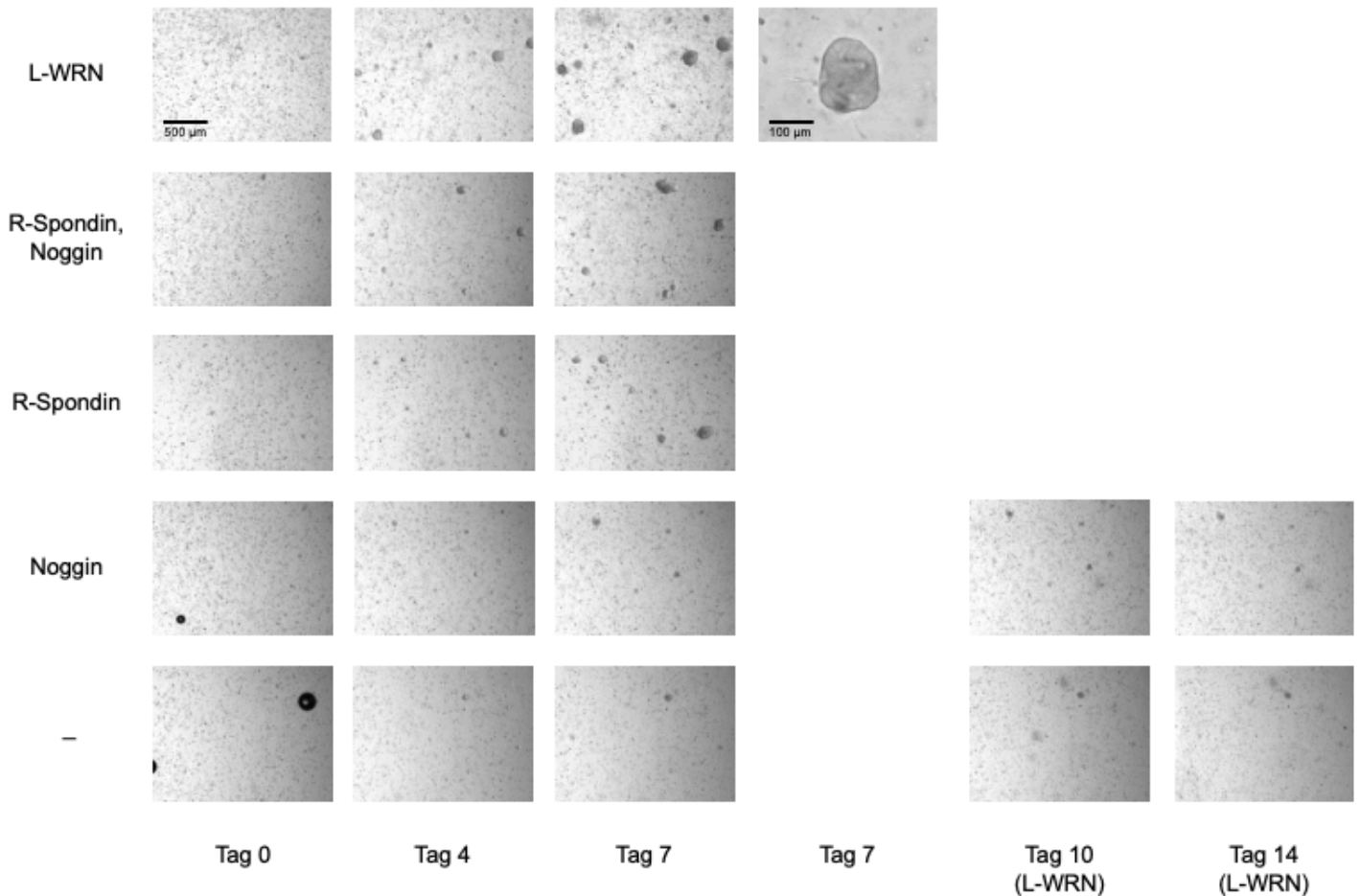
Zeile 2: Das Nährmedium enthält den Faktor R-Spondin1.

Noch stärker als bei Modell Nr. 56 fällt bei Modell Nr. 100 in Abbildung 28 auf, dass das Organoidwachstum sowohl bei den Kulturen, deren Nährmedium L-WRN konditioniertes Medium enthielt als auch bei denen, deren Nährmedium R-Spondin1 konditioniertes Medium enthielt nach der zweiten Passagierung deutlich nachließ; die Organoide waren spärlicher und deutlich kleiner.

Nach der dritten Passagierung schließlich zeigten auch diese Kulturen, unabhängig von der Rezeptur des Nährmediums, keinerlei Organoidwachstum mehr und mussten deshalb verworfen werden.



## 3.3.2.3 Organoidmodell Nr. 105



**Abbildung 29:** Organoidmodell BC-ORG #105 im ersten Ansatz unter Behandlung mit den Nährmedien verschiedener Zusammensetzung der Faktoren Wnt, R-Spondin und Noggin.

Die Zusammensetzung aller weiteren Wachstumsfaktoren ist in jeder der Mediumrezepturen gleich und entspricht dem Mamma(karzinom)-Organoid-Nährmedium nach Sachs et al., 2018.

Zeile 1: Das Nährmedium enthält L-WRN konditioniertes Medium und damit die drei Faktoren Wnt3a, R-Spondin3 und Noggin.

Zeile 2: Das Nährmedium enthält die Faktoren R-Spondin1 und Noggin.

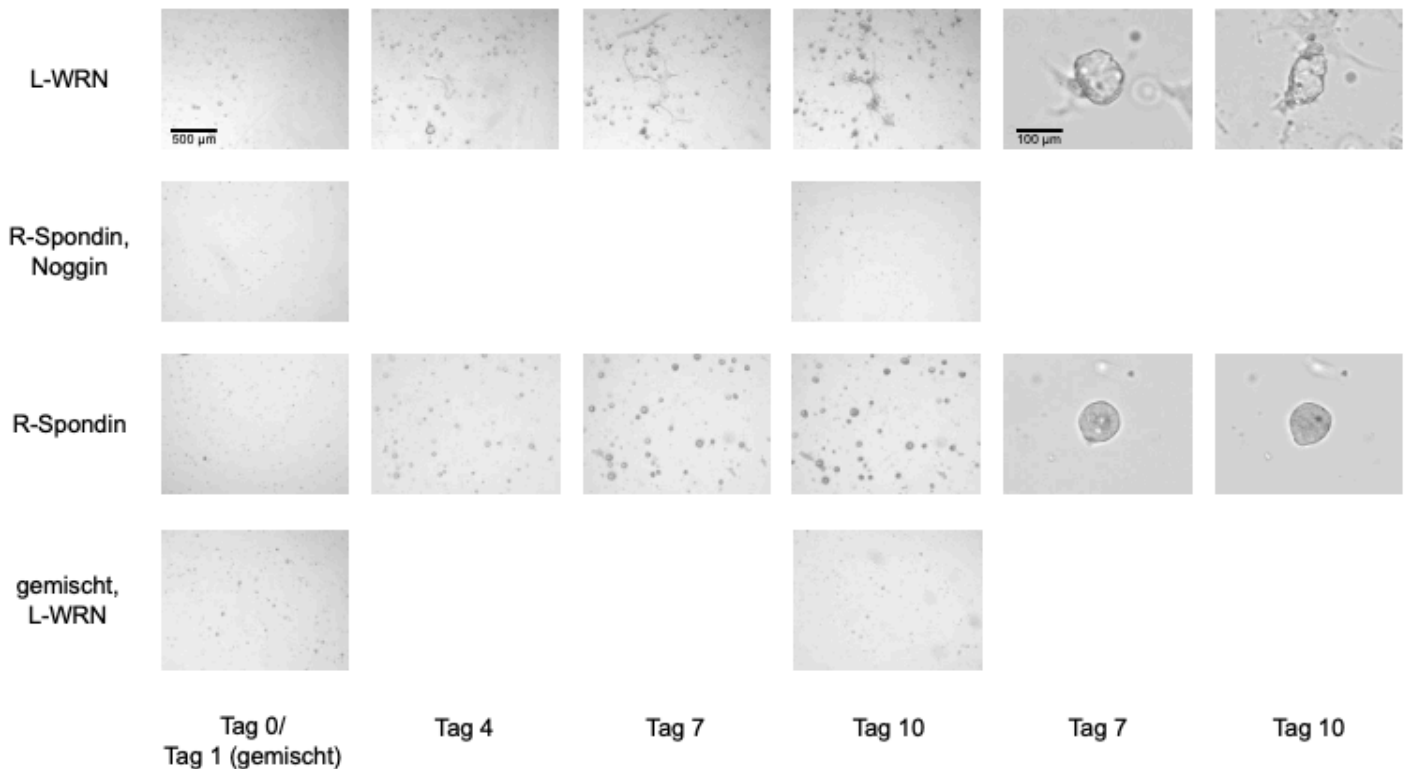
Zeile 3: Das Nährmedium enthält den Faktor R-Spondin1.

Zeile 4: Das Nährmedium enthält den Faktor Noggin.

Zeile 5: Das Nährmedium enthält keinen der drei Faktoren.

Die letzten beiden Versuchsgruppen wurde ab Tag 7 stattdessen mit Nährmedium behandelt, welches alle drei Wachstumsfaktoren enthielt.

In Abbildung 29 kann man erkennen, dass lediglich in den Kulturen, deren Nährmedium L-WRN konditioniertes Medium, R-Spondin1 konditioniertes Medium und Noggin oder R-Spondin1 konditioniertes Medium allein enthielt, in nennenswertem Ausmaß Organoide heranwuchsen. Die Kulturen, die mit Nährmedium behandelt wurden, das L-WRN konditioniertes Medium enthielt, zeigten hierbei das beste Organoidwachstum. Sie zeigten aber auch, analog zum Modell Nr. 56, eine leichte Tendenz zum flächigen Wachstum auf dem Boden der Wells. Die Kulturen, deren Nährmedium lediglich Noggin oder keinen der drei Faktoren enthielt, zeigten dagegen ein sehr spärliches Wachstum sehr kleiner Organoide. Daran konnte auch der Versuch nichts ändern, ihr Wachstum dadurch zu verbessern, dass ab dem siebten Tag nachträglich Standard-Mamma(karzinom)-Organoid-Nährmedium mit L-WRN konditioniertem Medium auf diese Kulturen gegeben wurde (siehe Abbildung 29). Da die Erfahrung gezeigt hatte, dass sich das Wachstum solcher Kulturen auch nach einer Passagierung nicht verbessern würde, wurden diese Kulturen bereits vor der ersten Passagierung verworfen. Aus den Kulturen der restlichen drei Kategorien wurde auch beim Modell Nr. 105 ein Zellgemisch hergestellt, mit welchem Organoidkulturen angelegt wurden, die fortan Nährmedium erhielten, das L-WRN konditioniertes Medium enthielt.



**Abbildung 30:** Organoidmodell BC-ORG #105 in Passage 1 unter Behandlung mit den Nährmedien verschiedener Zusammensetzung der Faktoren Wnt, R-Spondin und Noggin.

Die Zusammensetzung aller weiteren Wachstumsfaktoren ist in jeder der Mediumrezepturen gleich und entspricht dem Mamma(karzinom)-Organoid-Nährmedium nach Sachs et al., 2018.

Zeile 1: Das Nährmedium enthält L-WRN konditioniertes Medium und damit die drei Faktoren Wnt3a, R-Spondin3 und Noggin.

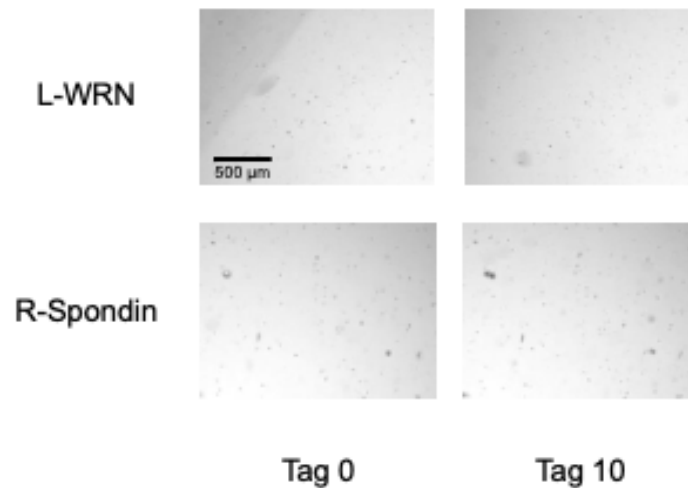
Zeile 2: Das Nährmedium enthält die Faktoren R-Spondin1 und Noggin.

Zeile 3: Das Nährmedium enthält den Faktor R-Spondin1.

Zeile 4: Gemisch von Zellen dieser drei Versuchsgruppen aus dem ersten Ansatz und Behandlung mit Nährmedium, welches alle drei Wachstumsfaktoren enthielt.

Wie in Abbildung 30 zu sehen ist, zeigten auch hier die Kulturen mit diesem Zellgemisch keinerlei Organoidwachstum. Anders als bei Modell Nr. 56 und Nr. 100 zeigten beim Modell Nr. 105 allerdings auch die Kulturen, deren Nährmedium die Faktoren R-Spondin1 und Noggin enthielt, schon nach der ersten Passagierung keinerlei Organoidwachstum mehr. Die Kulturen dieser beiden Kategorien wurden daher verworfen. Die Organoide in den Kulturen, deren Nährmedium alle drei Wachstumsfaktoren oder R-Spondin1 allein enthielt, wuchsen etwa gleich stark weiter, allerdings waren sie spärlicher und kleiner, als dies bei den Organoiden dieser beiden Kategorien bei Modell Nr. 56 und Nr. 100 nach der ersten

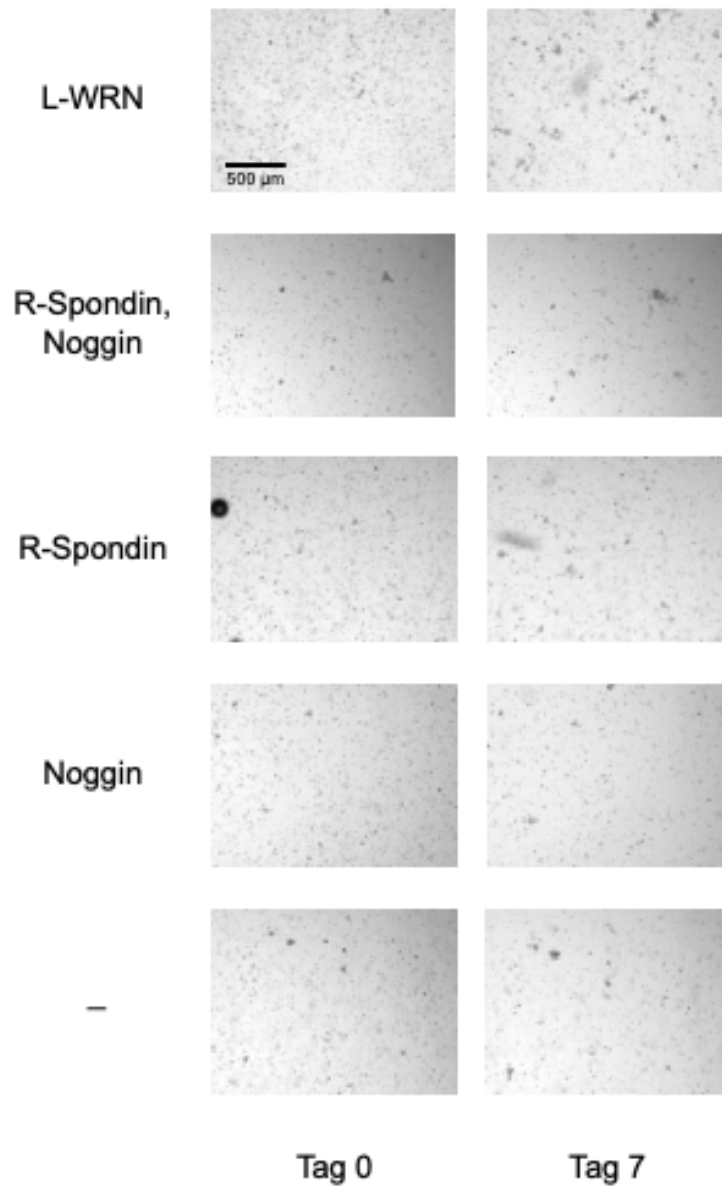
Passagierung der Fall war. In Abbildung 30 kann man erneut die leichte Tendenz der Zellen, die mit Medium behandelt wurden, das L-WRN konditioniertes Medium enthielt, zum flächigen Wachstum auf dem Boden der Wells erkennen.



**Abbildung 31:** Organoidmodell BC-ORG #105 in Passage 2 unter Behandlung mit den Nährmedien verschiedener Zusammensetzung der Faktoren Wnt, R-Spondin und Noggin. Die Zusammensetzung aller weiteren Wachstumsfaktoren ist in jeder der Mediumrezepturen gleich und entspricht dem Mamma(karzinom)-Organoid-Nährmedium nach Sachs et al., 2018. Zeile 1: Das Nährmedium enthält L-WRN konditioniertes Medium und damit die drei Faktoren Wnt3a, R-Spondin3 und Noggin. Zeile 2: Das Nährmedium enthält den Faktor R-Spondin1.

Nach der zweiten Passagierung des Modells Nr. 105 zeigten auch die Kulturen, deren Nährmedium L-WRN konditioniertes Medium oder R-Spondin1 konditioniertes Medium enthielt keinerlei Organoidwachstum mehr (siehe Abbildung 31). Sie mussten daher verworfen werden.

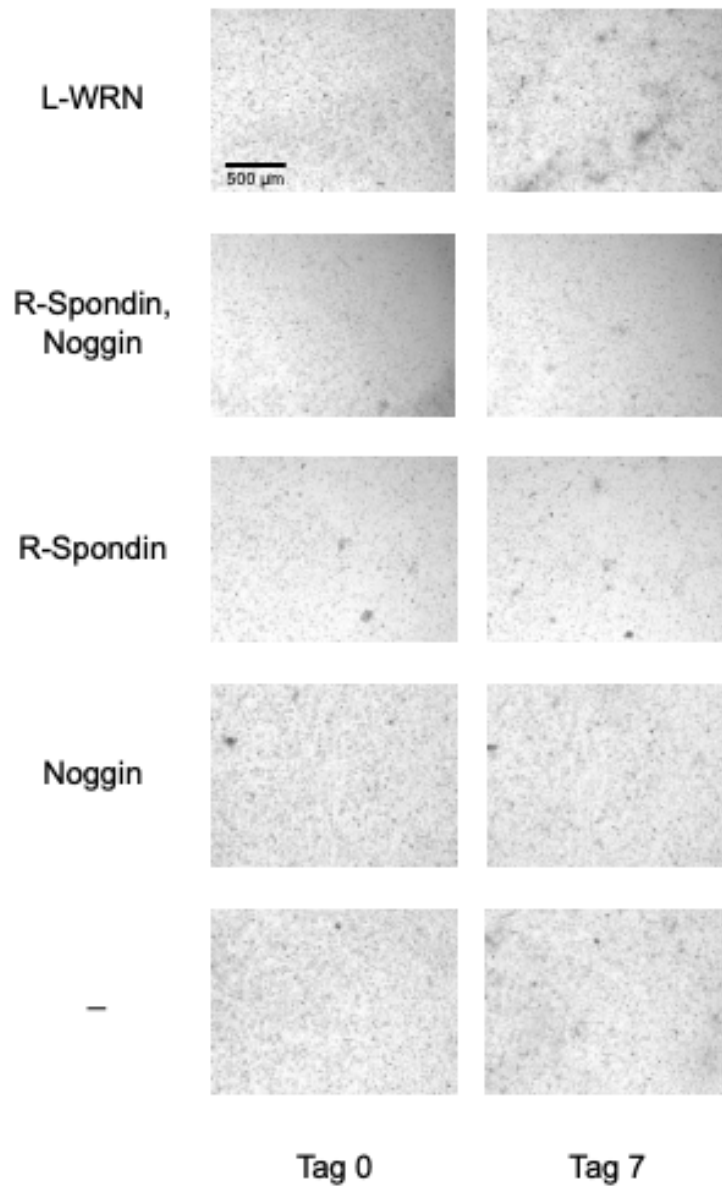
## 3.3.2.4 Organoidmodell Nr. 136



**Abbildung 32:** Organoidmodell BC-ORG #136 im ersten Ansatz unter Behandlung mit den Nährmedien verschiedener Zusammensetzung der Faktoren Wnt, R-Spondin und Noggin. Die Zusammensetzung aller weiteren Wachstumsfaktoren ist in jeder der Mediumrezepturen gleich und entspricht dem Mamma(karzinom)-Organoid-Nährmedium nach Sachs et al., 2018. Zeile 1: Das Nährmedium enthält L-WRN konditioniertes Medium und damit die drei Faktoren Wnt3a, R-Spondin3 und Noggin. Zeile 2: Das Nährmedium enthält die Faktoren R-Spondin1 und Noggin. Zeile 3: Das Nährmedium enthält den Faktor R-Spondin1. Zeile 4: Das Nährmedium enthält den Faktor Noggin. Zeile 5: Das Nährmedium enthält keinen der drei Faktoren.

Beim Organoidmodell Nr. 136 war, wie in Abbildung 32 zu sehen, nur bei den Kulturen, deren Nährmedium L-WRN konditioniertes Medium enthielt, ein leichtes Wachstum einiger Organoide zu erkennen. Alle anderen Organoidkulturen zeigten keinerlei nennenswertes Wachstum. Da die Erfahrung gezeigt hatte, dass sich das Wachstum solcher Kulturen auch nach einer Passagierung nicht verbessern würde, wurden alle Zellen des Modells Nr. 136 nach der ersten Passagierung gemeinsam final eingefroren und nicht zum Anlegen neuer Organoidkulturen verwendet.

## 3.3.2.5 Organoidmodell Nr. 147



**Abbildung 33:** Organoidmodell BC-ORG #147 im ersten Ansatz unter Behandlung mit den Nährmedien verschiedener Zusammensetzung der Faktoren Wnt, R-Spondin und Noggin. Die Zusammensetzung aller weiteren Wachstumsfaktoren ist in jeder der Mediumrezepturen gleich und entspricht dem Mamma(karzinom)-Organoid-Nährmedium nach Sachs et al., 2018. Zeile 1: Das Nährmedium enthält L-WRN konditioniertes Medium und damit die drei Faktoren Wnt3a, R-Spondin3 und Noggin. Zeile 2: Das Nährmedium enthält die Faktoren R-Spondin1 und Noggin. Zeile 3: Das Nährmedium enthält den Faktor R-Spondin1. Zeile 4: Das Nährmedium enthält den Faktor Noggin. Zeile 5: Das Nährmedium enthält keinen der drei Faktoren.

Wie man in Abbildung 33 erkennen kann, war beim Organoidmodell Nr. 147, analog zum Modell Nr. 136, nur bei den Kulturen, deren Nährmedium L-WRN konditioniertes Medium enthielt, ein leichtes Wachstum einiger Organoide zu erkennen, wobei sich hier, wie bei Modell Nr. 56 und Nr. 105, auch eine Tendenz der Zellen zum flächigen Anwachsen auf dem Boden der Wells zeigte. Alle anderen Organoidkulturen zeigten keinerlei nennenswertes Wachstum. Da die Erfahrung gezeigt hatte, dass sich das Wachstum solcher Kulturen auch nach einer Passagierung nicht verbessern würde, wurden alle Zellen des Modells Nr. 147 analog zum Modell Nr. 136 nach der ersten Passagierung gemeinsam final eingefroren und nicht zum Anlegen neuer Organoidkulturen verwendet.

### 3.3.3 Zusammenfassung

Es gelang uns im Zuge der vorliegenden Studie nicht, das Mamma(karzinom)-Organoid-Nährmedium für Organoidmodelle aus triple negativen Originaltumoren durch das Weglassen der Faktoren Wnt3a, R-Spondin und/oder Noggin zu optimieren. Zwar wäre bei den Modellen Nr. 56 und Nr. 105 ein dreimaliges Einfrieren kleiner Zellmengen und damit definitionsgemäß eine Etablierung möglich gewesen; nach der dritten Passagierung zeigten auch diese Kulturen jedoch keinerlei Organoidwachstum mehr. Die Organoidmodelle Nr. 105, Nr. 136 und Nr. 147 konnten dagegen nicht einmal bis zur dritten bzw. zweiten Passagierung gebracht werden.

Die Wachstumsfaktoren Wnt3a und Noggin im Nährmedium schienen im Rahmen dieses Versuchs für das Wachstum von Organoidkulturen aus triple negativen Tumorgeweben jedoch nicht essenziell zu sein. Es war bei allen drei Modellen, die überhaupt ein signifikantes Organoidwachstum zeigten (Nr. 56, Nr. 100 und Nr. 105) kein Unterschied zu erkennen, was die Anzahl und Größe der Organoide in den Kulturen anging, wenn sie mit Nährmedium, das L-WRN konditioniertes Medium oder R-Spondin1 konditioniertes Medium ohne Zusatz der beiden anderen Wachstumsfaktoren enthielt, behandelt wurden. In einem Fall (siehe Abbildung 30: Nr. 105, Passage 1) schien die zusätzliche Zugabe von Noggin zum R-Spondin1 konditionierten Medium sich sogar negativ auf das Organoidwachstum auszuwirken. Allerdings kann es sich hier natürlich auch um einen methodischen Fehler beim Anlegen bzw. der Passagierung dieser individuellen Organoidkultur gehandelt haben.



Des Weiteren brachte es nichts, Organoidkulturen, die mit einem „falschen“ Nährmedium behandelt worden waren, nachträglich zur Förderung ihres Wachstums mit dem „richtigen“ Nährmedium zu behandeln (siehe Abbildung 29: Nr. 105, erster Ansatz). Ein Wechsel zu einem anderen Nährmedium mit anderer Zusammensetzung von Wachstumsfaktoren konnte sogar dazu führen, dass Zellen, die vorher erfolgreich Organoide ausbildeten, dies nicht mehr taten (siehe „gemischte“ Kulturen in Abbildung 24; Nr. 56, Passage 1, Abbildung 27; Nr. 100, Passage 1 und Abbildung 30; Nr. 105, Passage 1).

Das Wachstumsverhalten als Reaktion auf eine unterschiedliche Zusammensetzung des Nährmediums unterschied sich außerdem für einzelne Organoidmodelle. Bei den Modellen Nr. 56, Nr. 105, Nr. 136 und Nr. 147 zeigte sich jeweils eine Tendenz zum Absinken und flächigen Wachstum der Zellen auf dem Boden der Wells anstatt dreidimensional in Organoidform innerhalb der Matrigel-Domes, wenn die Kulturen Nährmedium erhielten, das L-WRN konditioniertes Medium enthielt. Beim Modell Nr. 100 hingegen war diese Tendenz gerade bei den Zellen aller Kulturen sichtbar, deren Nährmedium kein L-WRN konditioniertes Medium enthielt.

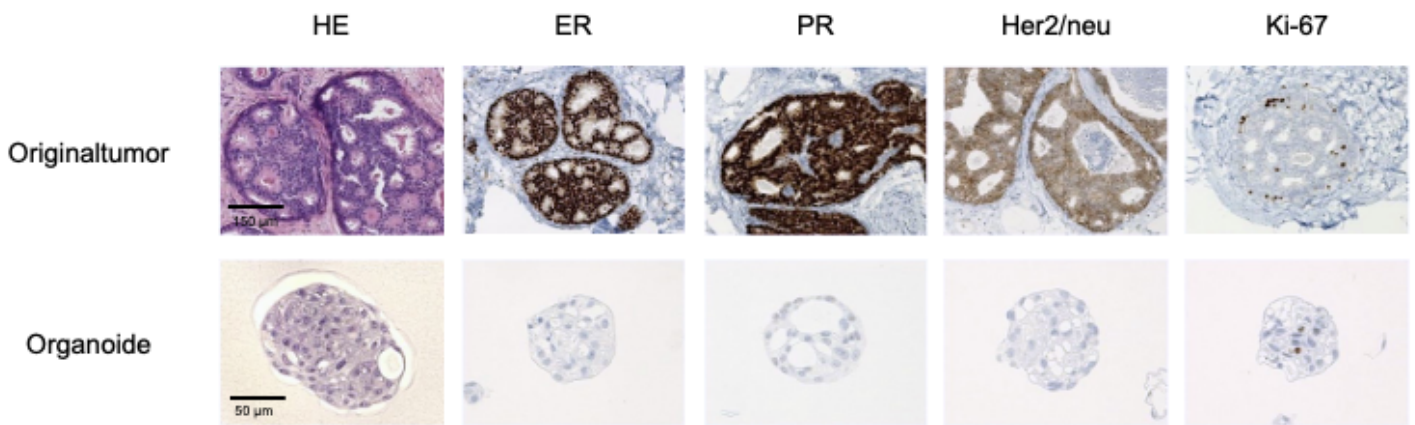
### **3.4 Vergleich der Organoidmodelle mit dem ursprünglichen Tumor**

#### **3.4.1 Übersicht**

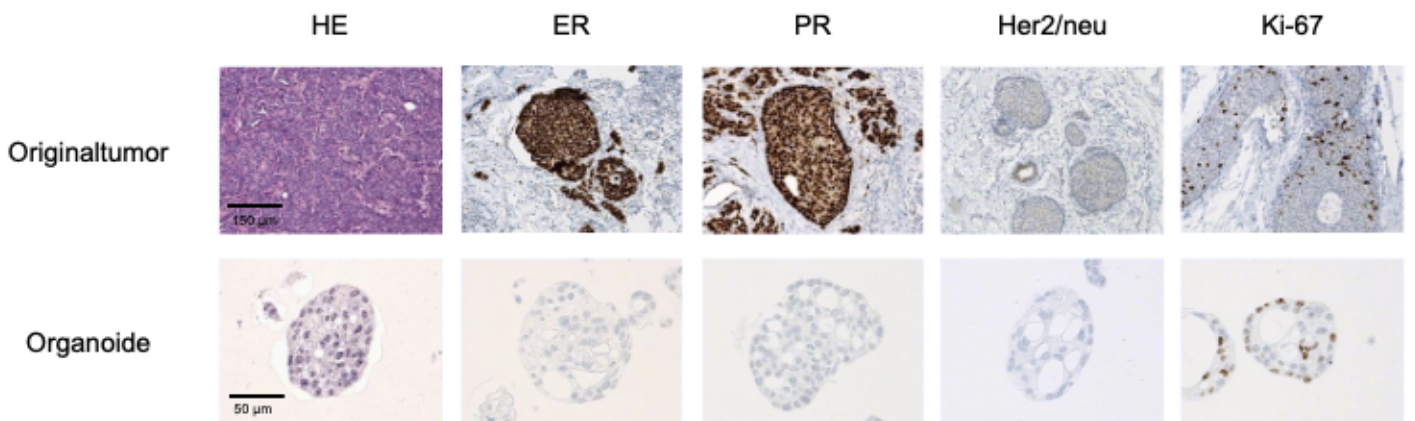
Kein einziges der zehn ausgewählten Organoidmodelle stellte sich in der immunhistochemischen Färbung Östrogenrezeptor-, Progesteronrezeptor- oder Her2/neu-positiv dar. Die Kontrollfärbungen für diese drei Rezeptoren waren derweil positiv, sodass es sich nicht um einen methodischen Fehler bei der Färbung gehandelt haben konnte. Lediglich der Proliferationsmarker Ki-67 ließ sich bei allen Organoidmodellen anfärben und entsprach in seiner prozentualen Ausprägung augenscheinlich in etwa dem Originaltumor.

#### **3.4.2 Beispiele**

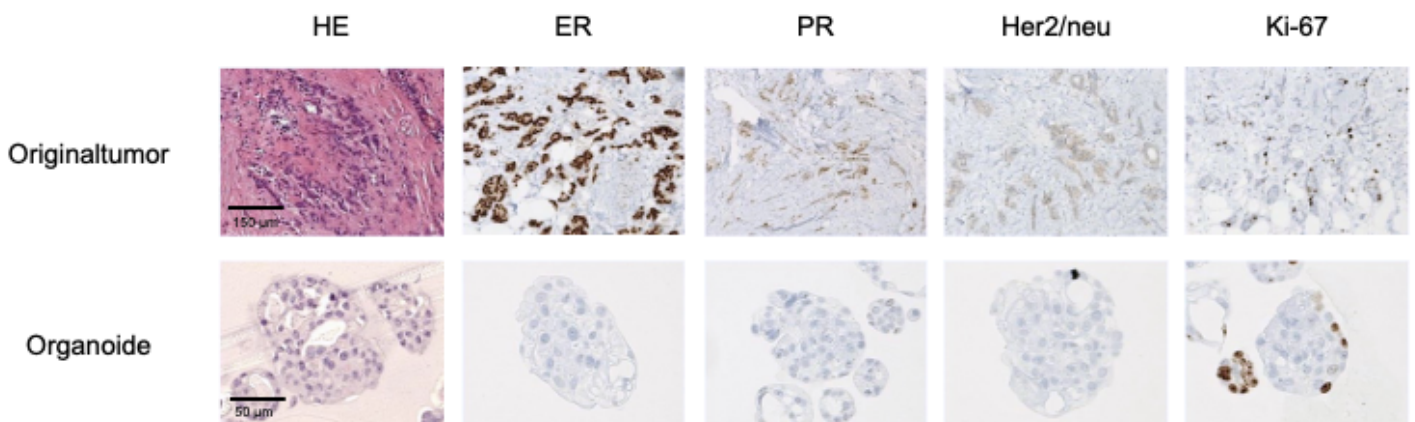
Im Folgenden sind drei Beispiele der gefärbten Organoid-Schnitte in Gegenüberstellung mit dem Originaltumor, von dem sie abgeleitet waren, dargestellt. Anhand dieser Abbildungen lassen sich die oben beschriebenen Phänomene visualisieren.



**Abbildung 34:** Vergleich des Organoidmodells BC-ORG #91 mit dem Originaltumor anhand der immunhistochemischen Faktoren Östrogenrezeptor- (Spalte 2), Progesteronrezeptor- (Spalte 3), Her2/neu- (Spalte 4) und Ki-67 Status (Spalte 5).



**Abbildung 35:** Vergleich des Organoidmodells BC-ORG #102 mit dem Originaltumor anhand der immunhistochemischen Faktoren Östrogenrezeptor- (Spalte 2), Progesteronrezeptor- (Spalte 3), Her2/neu- (Spalte 4) und Ki-67 Status (Spalte 5).



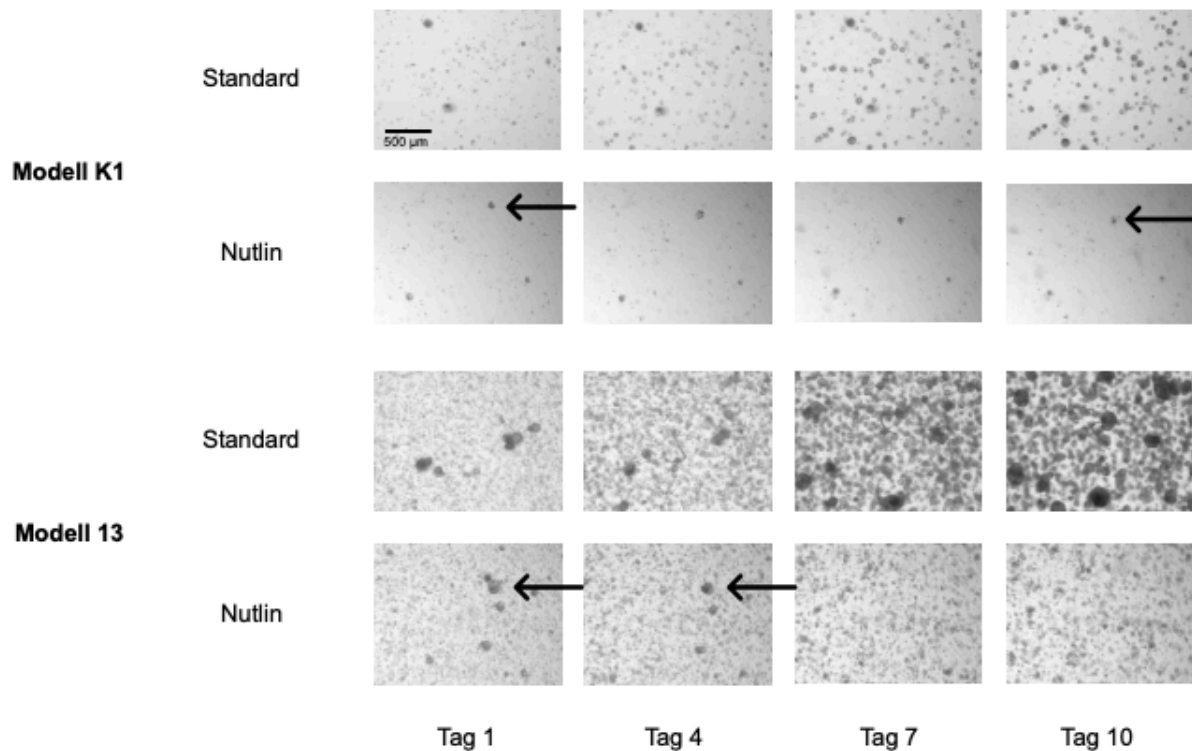
**Abbildung 36:** Vergleich des Organoidmodells BC-ORG #97 mit dem Originaltumor anhand der immunhistochemischen Faktoren Östrogenrezeptor- (Spalte 2), Progesteronrezeptor- (Spalte 3), Her2/neu- (Spalte 4) und Ki-67 Status (Spalte 5).

Des Weiteren fällt auf, dass auf den Bildern der Originaltumoren durchaus ein morphologischer Unterschied im Tumorstadium zwischen den duktalem no special type Karzinomen Nr. 91 und Nr. 102 (Abbildung 34 und 35) und dem invasiv-lobulären Karzinom Nr. 97 (Abbildung 36) augenscheinlich ist. So imponiert die histopathologische Morphologie der beiden Mammakarzinome des no special type weitgehend solide mit tubulären Strukturen, während das invasiv-lobuläre Karzinom ein deutlich diskohäsives Bild abgibt mit einzelnen Tumorzellsträngen, welche im umgebenden Stroma verteilt sind. Bei den jeweils von den verschiedenen Tumorgeweben abgeleiteten Organoiden hingegen lassen sich keine solchen distinkten morphologischen Unterschiede erkennen.

### **3.5 Versuch zur Wirkung von Nutlin-3a auf das Wachstum etablierter Organoidmodelle**

Mit Hilfe der folgenden Versuche sollte neben der immunhistochemischen Bestimmung einiger wichtiger Tumormerkmale (Punkt 3.4) ein weiteres Merkmal der Mammakarzinom-Organoidmodelle erkundet werden. Es handelte sich hierbei um die Funktionalität des Tumorsuppressorgenprodukts p53, welche sich mit Hilfe des Faktors Nutlin-3a überprüfen lässt. Bei Vorhandensein von Wildtyp-p53 stoppt die Zugabe dieses Faktors zum Nährmedium die Zellproliferation; im Falle eines Funktionsverlustes von p53 durch entsprechende Genmutation sollte die Zugabe von Nutlin das Organoidwachstum nicht beeinträchtigen (siehe Punkt 4.4.2).

## 3.5.1 Versuchsteil 1



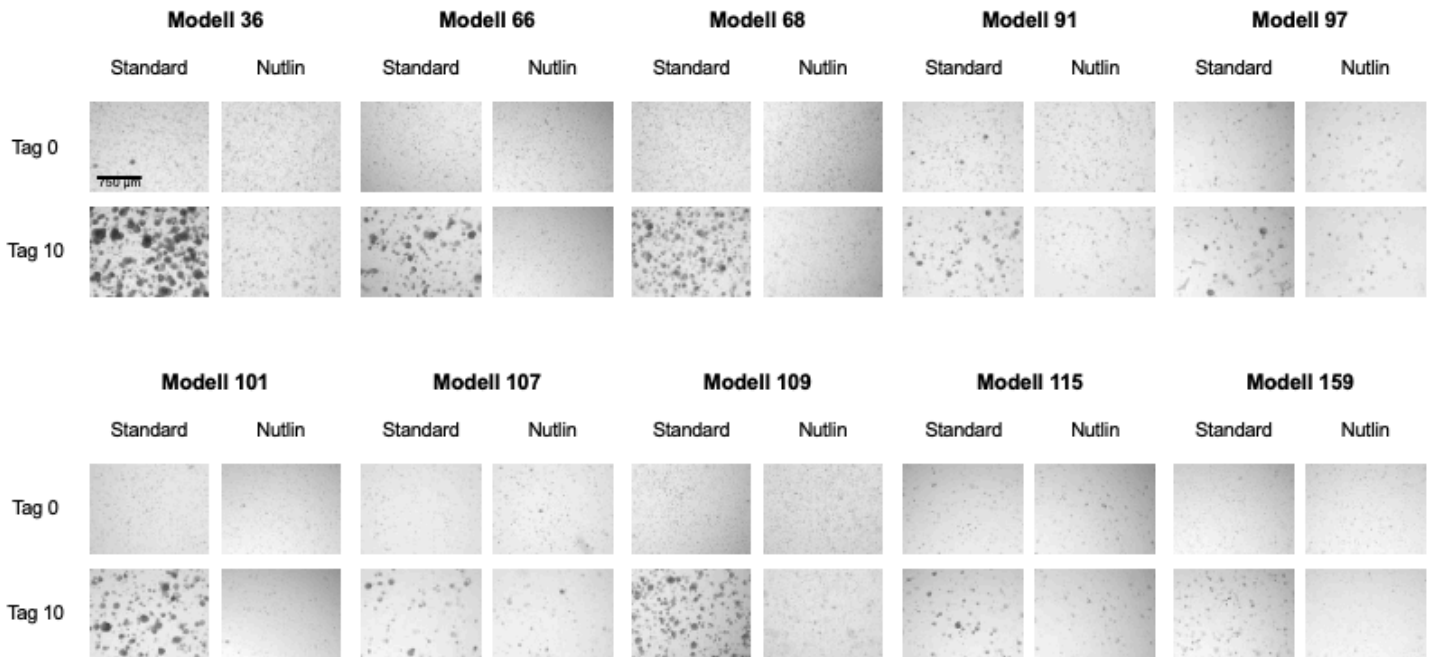
**Abbildung 37:** Versuch zur Wirkung von Nutlin3a auf das Organoidwachstum, Teil 1

Das Organoidmodell K1 (Normales Brustdrüsengewebe) und das Brustkrebs-Organoidmodell BC-ORG #13 wurden je mit Standard-Mamma(karzinom)-Organoid-Nährmedium ohne Zusatz und mit Zusatz von Nutlin-3a behandelt und so die Wirkung des Faktors Nutlin-3a auf das Wachstum dieser beiden Organoidmodelle getestet.

Die Pfeile markieren einen Zerfall bereits nach Ansatz der Kulturen vorhandener Organoidstrukturen im Kulturverlauf.

In Abbildung 37 kann man erkennen, dass die Kulturen der Zellen des Mamma-Normalgewebes und des Brustkrebs-Organoidmodells Nr. 13 unter Behandlung mit Standard-Mamma(karzinom)-Organoid-Nährmedium in beiden Fällen ein gutes Organoidwachstum zeigten. Im Falle des Modells Nr. 13 war das Organoidwachstum sogar exzessiv, was typisch für dieses Modell war (siehe Punkt 3.2.3.2). Im Gegensatz dazu zeigten die Kulturen unter Zugabe von 5 µM Nutlin-3a zum Standard-Nährmedium im Fall der Kontrollzellen keinerlei Organoidwachstum; im Fall des Tumormodells Nr. 13 war das Wachstum deutlich spärlicher als ohne Zugabe von Nutlin-3a. Man erkennt in beiden Fällen unter Behandlung mit Nutlin-3a sogar noch eher einen Zerfall bereits nach Ansatz der Kulturen vorhandener Organoidstrukturen (in Abbildung 37 mit Pfeilen markiert).

## 3.5.2 Versuchsteil 2



**Abbildung 38:** Versuch zur Wirkung von Nutlin3a auf das Organoidwachstum, Teil 2

Auch die Brustkrebs-Organoidmodelle BC-ORG #36, 66, 68, 91, 97, 101, 107, 109, 115 und 159 wurden nun je mit Standard-Mamma(karzinom)-Organoid-Nährmedium ohne Zusatz und mit Zusatz von Nutlin-3a behandelt und so die Wirkung des Faktors Nutlin-3a auf das Wachstum dieser weiteren Organoidmodelle getestet.

Wie in Abbildung 38 zu sehen ist, zeigte auch keines der zehn weiteren Tumormodelle unter Behandlung mit Nutlin-3a nennenswertes Organoidwachstum (jeweils zweite Spalte). Das Organoidwachstum unter Behandlung mit Standard-Mamma(karzinom)-Organoid-Nährmedium ohne Zugabe von Nutlin-3a war von Modell zu Modell unterschiedlich, von sehr gut (Modell Nr. 36) bis äußerst spärlich (Modell Nr. 159). Nichtsdestotrotz war selbst bei diesem Organoidmodell noch ein deutlicher Unterschied zum nicht vorhandenen Organoidwachstum unter Behandlung mit Nutlin-3a zu erkennen (siehe Abbildung 38, letztes Bilderquartett).

## 4 Diskussion

### 4.1 Repräsentativität der Biobank

Eine der wichtigsten Fragen, die es im Rahmen der vorliegenden Arbeit zu klären galt, ist die nach der Repräsentativität der von uns erstellten Organoidbank. Im folgenden Abschnitt soll beleuchtet werden, inwiefern die 178 gesammelten zum Anlegen von Organoidkulturen brauchbaren Tumorzellproben verschiedener Patientinnen und Patienten das breite Spektrum der Entität Mammakarzinom abzubilden vermögen und damit geeignet sind, für repräsentative Studien dieses Krankheitsbildes genutzt zu werden. Zu diesem Zweck sollen die unterschiedlichen erfassten Merkmale der Patient\*innen und ihrer jeweiligen Tumorerkrankung einzeln betrachtet werden.

#### 4.1.1 Patientenalter bei OP

Der Cut-off-Wert von 50 Jahren wurde gewählt, da ab diesem Alter das Risiko, an Brustkrebs zu erkranken, signifikant ansteigt (Hankey et al., 1994).

Gemäß dieser Tatsache stammten die Zell- und Gewebeproben in unserer Tumorbank zu 72% von Patient\*innen, die 50 Jahre oder älter waren, während lediglich 28% auf jüngere Patient\*innen entfielen. Dies entspricht der evidenten Relevanz des fortgeschrittenen Lebensalters als Risikofaktor für die Erkrankung an einem Mammakarzinom (Ditsch et al., 2019).

#### 4.1.2 Patientengeschlecht

Wie bereits erwähnt, konnten in die vorliegende Studie vier männliche Patienten mit Brustkrebs eingeschlossen werden. Von den 178 gesammelten Proben stammten also 2% von Männern, 98% hingegen von Frauen. Auch in der Normalbevölkerung ist das Mammakarzinom des Mannes sehr selten; es entfallen sogar nur weniger als 1% aller Brustkrebserkrankungen auf männliche Patienten (Stadler et al., 2019).

#### 4.1.3 Tumorstatus

Bei den Originaltumoren, die als Gewebequelle für unsere Organoidbank dienten, handelte es sich zu 89% um Primärtumoren der Mamma. 5% waren hingegen Rezidivtumoren und 6% Zweitkarzinome. Das Risiko, ohne adjuvante

Strahlentherapie an einem Lokalrezidiv eines Mammakarzinoms zu erkranken, beträgt nach brusterhaltender Therapie 25-40% und nach Mastektomie 9-20%; eine Bestrahlung vermag dieses Risiko auf 5-10% zu senken. Ein kontralaterales Zweitkarzinom tritt derweil bei Brustkrebspatientinnen mit einer Wahrscheinlichkeit von 1,25-5% auf (Schindlbeck et al., 2019). Vergleicht man diese Werte, so scheinen die Zweitkarzinome unter den für die vorliegende Studie verwendeten Originaltumoren etwas überrepräsentiert zu sein. Es gilt allerdings zu bedenken, dass auch einige unserer Originaltumoren, die als Zweitkarzinome deklariert waren, auf ipsilateraler Seite des Primärtumors aufgetreten waren, genauer gesagt 1/3 der in die vorliegende Studie eingeschlossenen Zweitkarzinome.

#### 4.1.4 Histopathologie

Die im Rahmen der vorliegenden Studie zusammengetragenen Zell- und Gewebeproben stammten zu 72% von invasiv-duktalem Karzinom des no special type (NST). Das invasiv-lobuläre Mammakarzinom war mit 18% der gesammelten Proben vertreten. Alle weiteren histopathologischen Tumortypen waren in unserer Gewebebank deutlich seltener; das muzinöse und metaplastische Mammakarzinom machten jeweils etwa 2% der Originaltumoren aus, das tubuläre und mikropapilläre Mammakarzinom jeweils etwa 1% und das cribriforme Mammakarzinom deutlich unter einem Prozent. Des Weiteren gab es noch einen Misch tumor (NST/muzinöser Typ) und zwei sarkomatöse Phylloides tumoren. Eine weitere Zellprobe stammte von einem nicht invasiven duktalem Carcinoma in situ.

In der Gesamtpopulation gestaltet sich die Verteilung der histopathologischen Subtypen des Mammakarzinoms ähnlich: Das invasiv-duktales Karzinom des „no special type“ (NST) hat mit 40-75% den größten Anteil an den invasiven Mammakarzinomen, gefolgt vom invasiv-lobulären Karzinom mit 5-15%, dem medullären Mammakarzinom mit 1-7% und den tubulären, muzinösen und papillären Mammakarzinomen mit jeweils 1-2%. Alle weiteren Karzinomtypen sind selten; die Häufigkeit ihres Auftretens beträgt jeweils unter 1% (Mayr et al., 2019). Unsere Mammakarzinom-Organoidbank vermag somit die Verteilung des histopathologischen Tumortyps in der Normalbevölkerung weitestgehend akkurat abzubilden.

Das histopathologische Tumorgrading beschreibt den Differenzierungsgrad des Tumorgewebes, also inwieweit das Karzinomgewebe sich in drei wichtigen

Merkmale von normalem Mammagewebe entfernt hat (Elston und Ellis, 1991). Da es sich beim histopathologischen Tumorgrading um ein kontinuierliches Merkmalspektrum handelt, welches sich im Verlauf einer Brustkrebserkrankung ändern kann, ist es für den Vergleich unserer Organoidbank mit der Gesamtpopulation ein eher irrelevanter Faktor.

### 4.1.5 Rezeptorstatus

Im Rahmen der vorliegenden Studie machten Mammakarzinome mit Hormonrezeptor- (ER- und PR-) positivem und Her2/neu-negativem Rezeptorstatus mit 69% den Großteil der Originaltumoren aus. 5% der Originaltumoren waren ER-positiv, jedoch PR-negativ und Her2/neu-negativ. Etwa 1% der Tumoren waren hingegen PR-positiv, jedoch ER-negativ und Her2/neu-negativ. Die zweitgrößte Gruppe bildeten die triple negativen Mammakarzinome mit 12%. An Her2/neu-positiven Mammakarzinomen gab es solche, die gleichzeitig ER- und PR-positiv waren (6%) oder ER-positiv und PR-negativ (2%) oder aber Hormonrezeptor- (ER- und PR-) negativ (2%). Bei 3 % der Originaltumoren, die als Gewebequelle für unsere Organoidbank dienten, blieb der Rezeptorstatus unklar, da nicht mehr nachvollzogen werden konnte, von welchem der verschiedenen Tumorherde mit unterschiedlichem Rezeptorstatus das Gewebestück stammte, welches uns von der Pathologie der Universitätsfrauenklinik Tübingen freundlicherweise zur Verfügung gestellt wurde.

Auch in der Gesamtpopulation ist der Hormonrezeptor-positive Brustkrebs die häufigste Unterform (Rakha et al., 2019/1). In zwei verschiedenen in den USA durchgeführten Studien zum Rezeptorstatus von Mammakarzinomen in der Gesamtbevölkerung betrug der Anteil der Hormonrezeptor-positiven und Her2/neu-negativen Mammakarzinome 53,6% (Parise et al., 2010) bzw. 72,7% (Howlander et al., 2014). Her2/neu-positiv Karzinome machen derweil 10-15% der Gesamtheit der Mammakarzinome aus (Rakha et al., 2019/1), in der oben genannten Studie von Howlander et al. entfielen dabei 10,3% auf sowohl Hormonrezeptor- als auch Her2/neu-positiv Tumoren und 4,6% auf Hormonrezeptor-negativ, aber Her2/neu-positiv Tumoren. Der Anteil der triple negativen Karzinome an der Gesamtheit der Mammakarzinome beträgt etwa 15-20% (Sporikova et al., 2018 und Garrido-Castro et al., 2019). Die Bedeutung der Expression des Progesteronrezeptors ist nach wie vor umstritten. Durch Verbesserung der Bestimmungsmethoden reduzierte sich die



Rate an ER-negativen, aber PR-positiven Mammakarzinomen so innerhalb der letzten Jahrzehnte auf ca. 1% (Degenhardt et al., 2019).

Vergleicht man die Anteile der verschiedenen Rezeptorstatus der Originaltumoren aus der vorliegenden Studie mit den in den oben genannten Studien bestimmten Anteilen an der Gesamtheit der Mammakarzinome in der Normalbevölkerung, so zeigt sich eine deutliche Ähnlichkeit. Allerdings gibt es beim Merkmal des Hormonrezeptorstatus Abweichungen, wenn man verschiedene ethnische Gruppen oder Populationen mit einer unterschiedlichen Verfügbarkeit von Screening-Angeboten vergleichend betrachtet (Rakha et al., 2019/1, Parise et al., 2010 und Howlader et al., 2014). Für eine vornehmlich weiße Bevölkerung in einem Erste-Welt-Land wie Deutschland, aus dem die im Rahmen der vorliegenden Studie verwendeten Tumorgewebeproben ja auch stammten, ist die daraus entstandene Tumorzellbank jedoch durchaus repräsentativ.

### **4.1.6 Ki-67-Status**

Wie bereits beschrieben, handelt es sich bei Ki-67 um einen immunhistochemisch zu bestimmenden Proliferationsmarker. Es existiert hierbei kein international gültiger Standard zur Bestimmung (Dowsett et al., 2011) oder Interpretation (Degenhardt et al., 2019) des Ki-67-Proliferationsindex bei Mammakarzinomen. Die aktuelle S3-Leitlinie gibt an, die Proliferationsrate könne mittels immunhistochemischen Nachweises von Ki-67 dennoch bestimmt werden, da diese bei Betrachtung im Zusammenhang mit anderen Faktoren wie dem Rezeptorstatus, dem Patientenalter, dem TNM-Status und dem histopathologischen Grading zusätzliche prognostische und prädiktive Informationen liefern kann (Mayr et al., 2019).

Angesichts des Mangels eines internationalen Standards bei der Bestimmung dieses Markers und der für sich allein genommen eher niedrigen Aussagekraft bezüglich des Krankheitsverlaufs wäre es jedoch nicht sinnvoll, hier unsere Tumorbank mit dem Brustkrebs in der Allgemeinbevölkerung hinsichtlich dieses Merkmals vergleichen zu wollen.

### **4.1.7 Tumorgröße**

Was die Größe des Tumorherdes angeht, überwogen unter den für die Erstellung einer Tumorzellbank im Rahmen der vorliegenden Studie verwendeten

Originaltumoren deutlich solche, welche von Seiten der Pathologie als Stadium pT1c (35%) bzw. pT2 (45%) deklariert worden waren. Diese Tumoren waren daher 1-2 (pT1c) bzw. 2-5 cm (pT2) im Durchmesser (in Richtung ihrer größten Ausdehnung) groß gewesen (Brierley et al., 2017). Größere und kleinere Tumoren waren deutlich seltener. 7% der Läsionen waren im Stadium pT1b (0,5-1 cm) entfernt worden, nur 2% im Stadium pT1a (0,1-0,5 cm). Tumoren, deren Durchmesser mehr als 5 cm betrug (Stadium pT3) bzw. deren Ausdehnung zum Zeitpunkt der Operation bereits die Brustwand oder Haut betraf (pT4) waren mit 5% (pT3) bzw. 4% (pT4) vertreten. Da sich in unserer Tumorzellbank nur Gewebe eines einzigen Carcinoma in situ (pTis) und eines mikroinvasiven Karzinoms (pT1mi) befand, waren diese Kategorien unter den für die vorliegende Studie verwendeten Originaltumoren lediglich zu Prozentsätzen unter 1% vertreten. Ein weiterer Prozentpunkt entfiel wiederum auf Karzinome, deren Durchmesser unklar war, weil nicht nachvollzogen werden konnte, von welchem unterschiedlich großen Tumorherd derselben Patientin das uns zur Verfügung gestellte Gewebestück stammte.

Vergleicht man diese Daten mit den klinischen Daten des Tumorregister München für die Jahrgangskohorten 2012-2016 (Schrodi et al., 2019), so stellt sich die prozentuale Verteilung der Tumorgröße bei Operation ähnlich dar. Die meisten Prozentpunkte entfallen auf die Kategorien pT1c (34,9%) und pT2 (28,4%). Kleinere und größere Tumoren sind seltener (pT1a 3,8%, pT1b 14,7%, pT3 4,0% und pT4 2,7%). Auffällig ist, dass die Carcinoma in situ (pTis) in diesem die Normalbevölkerung in Bayern abbildenden Kollektiv mit 11,5% einen deutlich höheren Anteil an der Gesamtzahl der Mammakarzinome ausmachen, als das unter den in der vorliegenden Studie verwendeten Originaltumoren der Fall war. Dies ist wohl dadurch zu erklären, dass unserer Arbeitsgruppe von Seiten der Pathologie nur ein Tumorstück zur Verfügung gestellt werden konnte, wenn der Originaltumor groß genug war, um an seinem Gewebe die notwendigen histopathologischen Untersuchungen durchführen und zusätzlich ein Stück für unsere Forschungsarbeit entbehren zu können.

### 4.1.8 Tumorstadium

Wie bereits erwähnt lässt sich das Fortschreiten einer Brustkrebserkrankung mit Hilfe der TNM-Klassifikation nach der Stadieneinteilung des American Joint Committee on Cancer klassifizieren (Amin et al., 2017). Diese Skala verbindet somit Daten zur

Ausdehnung des Primärtumors mit Daten zum Vorhandensein und der Ausprägung von Lymphknoten- und Fernmetastasen, um auf einen Blick ein möglichst ganzheitliches Bild des Stadiums der Tumorerkrankung zu liefern. Die meisten für die vorliegende Studie verwendeten Originaltumoren befanden sich bei Entdeckung und Therapie noch in relativ frühen Stadien; 28% der Tumoren waren dem Stadium IA zuzurechnen, 26% dem Stadium IIA und 19% dem Stadium IIB. Das Stadium IIIA beinhaltete 6% der Originaltumoren, das Stadium IIIB 1% und das Stadium IIIC 2%. Fernmetastasen waren in etwa 3% der Fälle vorhanden (Stadium IV). Bei etwa 15% der Originaltumoren konnte das Krankheitsstadium nicht bestimmt werden, da zum Zeitpunkt der Datenerhebung entweder der Lymphknotenstatus oder das Vorhandensein von Fernmetastasen noch nicht hinreichend geklärt waren.

In Erste-Welt-Ländern wie den USA oder Kanada wird Brustkrebs in der Regel bereits in einem frühen Stadium diagnostiziert; 60-80% im lokalisierten Stadium I-II, 15-35% im regional fortgeschrittenen Stadium III und lediglich etwa 5% im Stadium IV, in dem bereits Fernmetastasen bestehen (Fan et al., 2014 und Bryan et al., 2018). Insofern vermag unsere Organoidbank, deren Proben aus Tumorgewebe stammen, welche in einem deutschen Brustkrebszentrum entnommen wurden, die Situation in Erste-Welt-Regionen durchaus akkurat abzubilden.

### **4.1.9 Neoadjuvante Vorbehandlung**

12% der Originaltumoren, die im Rahmen der vorliegenden Studie zur Gewinnung von Tumorgewebe verwendet wurden, waren im Rahmen einer neoadjuvanten Therapie medikamentös vorbehandelt worden, die Hälfte von ihnen (6%) mittels des Östrogenrezeptor-Modulators Tamoxifen und die andere Hälfte mittels diverser Chemotherapeutika. 88% der Originaltumoren waren nicht medikamentös vorbehandelt. Eine neoadjuvante antiendokrine Therapie beim Mammakarzinom wird i.d.R. durchgeführt, wenn es sich um einen primär nicht operablen oder lokal fortgeschrittenen Befund handelt, während eine Chemotherapie nicht möglich ist oder abgelehnt wird oder zur Evaluierung tumorbiologischer Eigenschaften im Rahmen von Studien. Sie ist aber keine Standardtherapie (Braun et al., 2019). Eine Chemotherapie sollte laut aktueller S3-Leitlinie dagegen immer dann neoadjuvant stattfinden, wenn zum Zeitpunkt der Erstdiagnose die Indikation zur Chemotherapie bereits feststeht, besonders bei triple negativen Mammakarzinomen (Braun et al., 2019). Eine neoadjuvante Systemtherapie ist dann erfolgreich, wenn eine möglichst

hohe pCR (pathologic Complete Resonse) erreicht wird; sprich das Tumorwachstum reduziert bzw. aufgehalten und das vorhandene Tumorgewebe zerstört wurde (Braun et al., 2019).

Die Seltenheit der neoadjuvant antiendokrin behandelten Originaltumoren im Rahmen dieser Studie deckt sich also mit der Tatsache, dass dies eine nur selten, meist im Rahmen von Studien angewandte Therapiemethode ist. Die Seltenheit der neoadjuvant chemotherapeutisch behandelten Originaltumoren lässt sich dagegen vermutlich dadurch erklären, dass bei einer Größenreduktion des Tumorgewebes, auf die diese Form der Therapie ja abzielt, oft schlicht nicht genug Tumormaterial übrig blieb, welches für unsere Forschungsarbeit hätte zur Verfügung gestellt werden können.

### **4.1.10 Zusammenfassung**

Alles in allem lässt sich sagen, dass die von uns erstellte Tumorzellbank zur Schaffung von Organoidkulturen in vielen wichtigen Krankheitsmerkmalen die Verhältnisse der Gesamtheit der Mammakarzinome in der Allgemeinbevölkerung widerspiegelt, darunter Patientenalter und -geschlecht, histopathologischer Typ, Rezeptorstatus und Krankheitsstadium. Insofern ist es im Rahmen dieser Studie gelungen, eine repräsentative Biobank zu schaffen, die das breite Spektrum der Merkmale dieser vielseitigen Krankheit weitgehend akkurat abzubilden vermag.

## **4.2 Potenzielle Einflussfaktoren auf den Etablierungserfolg der Organoidmodelle**

Wie unter Punkt 3.2.1 beschrieben, wurden im Rahmen der vorliegenden Studie brauchbare Tumorzellproben von 178 verschiedenen Mammakarzinomen gesammelt. 115 dieser Zellproben wurden verwendet, um Organoidmodelle der jeweiligen Originaltumoren zu schaffen; das entspricht einer Quote von etwa 65%. Aus Gründen des Personal- und Ressourcenmangels konnten nicht gleich alle gesammelten Proben zum Anlegen von Organoidkulturen verwendet werden. Diese Zell- und Gewebeproben stehen jedoch, eingefroren in flüssigem Stickstoff, jederzeit zum Einsatz für zukünftige Forschungsprojekte zur Verfügung, im Zuge derer eine Etablierung dieser Organoidmodelle versucht werden kann.

### 4.2.1 Vergleich mit anderen Studien

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden zehn verschiedene Studien, welche sich mit der Kultivierung von Mammakarzinom- oder Mamma-Normalgewebe-Organoidkulturen beschäftigt hatten, als Referenzen herangezogen. Um welche Arbeiten es sich dabei genau handelte, wird ausführlich unter Punkt 1.2.4.1 erörtert. Hierbei fällt besonders auf, dass all diese Studien dabei höchst unterschiedliche Ziele verfolgten. Manche zielten, genau wie die vorliegende Arbeit, darauf ab, eine möglichst effiziente Methode zu finden, um Organoidmodelle menschlicher Mammakarzinome (und von normalem Brustdrüsengewebe) zu schaffen und diese Organoidmodelle über möglichst lange Zeiträume in Kultur halten zu können (Sachs et al., 2018, Mazzucchelli et al., 2019 und Campaner et al., 2020). Auch strebten die Autoren jeweils den Nachweis an, dass die von ihnen geschaffenen Organoidmodelle die Eigenschaften der Originaltumoren akkurat widerspiegeln und erforschten die Eignung dieser für Medikamententests. Andere arbeiteten dagegen ausschließlich mit humanem Mamma-Normalgewebe (Rosenbluth et al., 2020 und Dekkers et al., 2020) um die Entstehungsprozesse von Brustkrebs an Hand des Organoidmodells untersuchen zu können. Bei Dekkers et al. wurden die entstandenen Organoidmodelle später mit der CRISPR/Cas9-Technologie genetisch verändert und in immunkompromittierte Mäuse implantiert, um Mammakarzinom-Xenografts zu schaffen. Diese Verbindung der Organoid- mit der CRISPR/Cas9- und der Xenograft-Technologie fand auch in einigen anderen der besagten Studien Anwendung (De Rose et al., 2011, Sachs et al., 2018 und Duarte et al., 2018). Als besonders interessant erwies sich auch eine Studie von Goldhammer et al. aus dem Jahr 2019, deren Ziel es war, die histologische Zusammensetzung von Mammakarzinom-Organoidkulturen näher zu untersuchen.

Lediglich die von Sachs et al. inspirierten Studien (Mazzucchelli et al., 2019 und Campaner et al., 2020) und eben jenes Original erwiesen sich dabei wirklich als geeignet für einen direkten Vergleich mit der vorliegenden Studie, da sich Zielsetzung und Studienaufbau ähnelten. In zwei dieser drei Studien konnte jeweils eine deutlich höhere Etablierungs-Erfolgsquote verbucht werden als in der vorliegenden Arbeit, welche wie bereits erwähnt bei 50% lag, da von den 115 angelegten Organoidmodellen 58 etabliert, d. h. mindestens bis zur dritten Einfrierung passagiert werden konnten. So gaben Sachs et al. bei der Kreation ihrer Biobank mit 95 Mammakarzinom-Organoidmodellen aus 155 Tumor-Gewebeproben

eine Erfolgsquote von über 80% an, bei Mazzucchelli et al. gelang die Etablierung einer Organoidkultur aus Mammakarzinom-Gewebe in 88% (21/24) der Fälle. Ein möglicher Grund hierfür ist jedoch eine unterschiedliche Definition des „Etablierungserfolges“, da Sachs et al. in ihrer Veröffentlichung unerwähnt ließen, was genau sie unter der „Etablierung“ einer Organoidkultur verstanden; sprich ob es sich dabei nur um ein erstes Anwachsen der Organoide in 3D-Kultur oder um eine Langzeit-Kultivierung mit mehreren Passagen handelte. Es wird allerdings beschrieben, dass durch die Neuerungen im Organoid-Wachstumsmedium eine Langzeit-Expansion zumindest einiger Kulturen für mehr als 20 Passagen erzielt werden konnte. Bei Mazzucchelli et al. ist hingegen klar, dass die Autoren als Etablierungserfolg lediglich das einmalige Anwachsen einer Organoidkultur definierten; die langfristige Kultivierung über einen Zeitraum von zwei Monaten gelang hier nur bei zwei von 21 Tumor-Organoidmodellen. Die Autoren schrieben dabei selbst, dass die Anzucht einer primären Organoidkultur aus einer Gewebeprobe ein einfaches Verfahren sei und in den meisten Fällen gelänge. Die Langzeit-Etablierung eines Organoidmodells, welches ein stetiges Wachstum zeige und für die Aufnahme in eine Biobank geeignet sei, sei jedoch deutlich schwieriger. Diese Aussage deckt sich mit unseren eigenen Erfahrungen im Rahmen der vorliegenden Studie. In der Studie von Campaner et al. ließen sich aus den 32 gesammelten Tumorgewebeproben insgesamt 17 Organoidkulturen anzüchten, welche alle über mindestens drei bis zu acht Passagen wuchsen, wenn auch die Autoren der Studie eine Langzeit-Etablierung der Kulturen als Wachstum über mindestens 4 Passagen (entsprechend etwa 4 Wochen) definierten. Somit konnten im Rahmen der Arbeit von Campaner et al. circa 53% der Mammakarzinom-Organoidmodelle für mindestens drei Passagen kultiviert werden, was in etwa unserer eigenen Erfolgsrate von 50% im Rahmen der vorliegenden Studie entspricht. Interessant ist jedoch vor allem die Frage, ob im Zuge dieser Studien Tumormerkmale identifiziert werden konnten, welche mit einem besseren oder schlechteren Wachstum der resultierenden Organoidkulturen einhergingen und damit Einflussfaktoren auf das Organoidwachstum darstellen könnten. Bei Sachs et al. lautete die Antwort auf diese Frage ganz klar nein; die Autoren betonten, dass der histopathologische Subtyp, das histopathologische Grading und der Rezeptorstatus des Originaltumors keinen Einfluss auf den Etablierungserfolg der Organoidmodelle gehabt hätten. Campaner et al. kamen dagegen zu dem Ergebnis, dass die Langzeit-

Etablierung von Organoidmodellen, deren Originaltumoren aggressiveren Tumor-Subtypen zuzuordnen waren (Her2/neu positiv, triple negativ, hoher Ki-67-Proliferationsindex), tendenziell besser gelungen sei (Campaner et al., 2020). Unsere eigenen Beobachtungen im Rahmen der vorliegenden Studie zeigten hingegen, dass Merkmale, die mit einer aggressiveren Krankheitsentität assoziiert waren (junges Patientenalter, hoher histopathologischer Entartungsgrad, triple negativer Rezeptorstatus und hoher Proliferationsindex) unter den gegebenen Kulturbedingungen mit einem schlechteren Wachstum der abgeleiteten Organoidmodelle und einem daher geringeren Etablierungserfolg korrelierten; mögliche Gründe hierfür werden unter Punkt 4.2.3 exploriert. Wie man sieht, kamen verschiedene Studien mit ähnlicher Zielsetzung und Methodik bei dieser Frage zu teils widersprüchlichen Ergebnissen. Inwiefern methodische Unterschiede Einfluss auf den Erfolg bei der Kultivierung von Mammakarzinom-Organoidmodellen haben könnten, wird im folgenden Abschnitt näher betrachtet.

### 4.2.2 Methodische Unterschiede

Die Grundlage für die Methodik in allen oben erwähnten Brustkrebs-Organoidstudien bildete die von De Rose et al. etablierte und von Sachs et al. optimierte Vorgehensweise bei der Verarbeitung des Mamma(karzinom-)gewebes individueller Patient\*innen zu Einzelzellen/Organoiden und deren Ansatz in 3D-Kultur. Einige der Forschungsteams (Mazzucchelli et al., 2019 und Dekkers et al., 2020) kombinierten bewusst methodische Schritte von de Rose et al. und Sachs et al. miteinander und viele fanden Wege, den Prozess der Anzucht und Kultivierung von Mammakarzinom-Organoiden für sich weiter zu optimieren. Jedoch verwendeten seit der Veröffentlichung über die erfolgreiche Etablierung der ersten Mammakarzinom-Organoidbank durch Sachs et al. im Jahr 2018 alle genannten Arbeitsgruppen deren überarbeitete Rezeptur für ein Mamma(karzinom)-Organoid-Nährmedium, welches auf den von Sato et al. geprägten Prinzipien für die erfolgreiche dreidimensionale Kultivierung humaner adulter Stammzellen beruht (siehe Punkt 1.2.4.1). Angesichts der komplett verschiedenen Zielsetzungen und Konzeptionen der Studien, welche sich in den letzten Jahren mit der Kultivierung von Mammakarzinomen befasst haben, ist es nicht weiter verwunderlich, dass darüber hinaus allerdings jede Arbeitsgruppe die methodischen Konzepte ihrer Vorgänger zumindest leicht abänderte und an ihre individuellen Bedürfnisse und Anforderungen anpasste. Yang

et al. beklagten genau diese Tatsache in Ihrer 2020 erschienenen Metaanalyse zu den Fortschritten bei der Nutzung des Organoidmodells in der Brustkrebsforschung. Sie postulieren, dass diese Unterschiede in der Methodik die Vergleichbarkeit und Reproduzierbarkeit der Ergebnisse von Mammakarzinom-Organoidstudien beeinträchtigen könnten und dass es wünschenswert sei, einmal ein Standardprotokoll zu entwickeln, das die besten methodischen Vorgehensweisen bei der Anzucht und Langzeit-Kultivierung von Brustkrebs-Organoiden zuverlässig zusammenfasse (Yang et al., 2020). Wegen der relativen Neuheit des Brustkrebs-Organoidmodells bedürfte es jedoch wohl noch deutlich mehr vergleichender Forschung, um herauszufinden, welche methodischen Schritte wirklich die besten sind, um Mamma(karzinom)-Organoiden möglichst effizient und langfristig kultivieren zu können.

Nach der Analyse der aktuell verfügbaren Literatur zur Methodik der Kultivierung von Brustkrebs-Organoiden sollen hier einige Punkte genannt werden, die das methodische Vorgehen im Rahmen der vorliegenden Studie gegebenenfalls ergänzen und die von uns erzielte Erfolgsquote bei der Etablierung der Organoidmodelle verbessern könnten. So postulierten schon De Rose et al. in ihrer 2013 erschienenen methodischen Anleitung, dass der erfolgreiche Aufbau einer Biobank mit der Akquirierung qualitativ hochwertiger Gewebeproben beginne, die einen hohen Anteil lebensfähiger Tumorzellen enthalten. Die Autoren schlugen daher eine enge Zusammenarbeit mit Verwaltungskräften, Chirurgen, OP-Pflegepersonal und Pathologen vor, um Transportwege möglichst kurz und Transportbedingungen möglichst gewebeschonend und steril zu halten. Bei der zukünftigen weiteren Expansion unserer Biobank sollte deshalb nach Möglichkeit auch eine noch bessere Kommunikation aller beteiligter Parteien angestrebt werden, um die Qualität der verwendeten Gewebeproben zu sichern und konstant hoch zu halten.

Ein weiterer Ansatzpunkt, um die Effizienz der Kultivierung von Brustkrebs-Organoidmodellen in Zukunft zu steigern, könnte ein differenzierter Umgang mit Trypsin bei der Verarbeitung von Tumorgewebe und der Passagierung von Organoidkulturen sein. Dies liegt daran, dass ein längerer Verdau in Trypsin die Lebensfähigkeit der Zellen beeinträchtigen kann (De Rose et al., 2013). Viele unserer Vorgänger nutzten beim initialen Verdau des Tumorgewebes lediglich Kollagenase, gegebenenfalls in Kombination mit Hyaluronidase, um vor allem die Zellkontakte der Stromazellen zu lösen (De Rose et al., 2013), jedoch erfolgte kein



anschließender Verdau in Trypsin. Diese Vorgehensweise diene dazu, am Ende des Prozesses keine epithelialen Einzelzellen, sondern vielmehr epitheliale Zellcluster zu erzeugen, aus denen natürlicherweise schneller dreidimensionale Organoidkulturen erwachsen können. Auch bei der Passagierung zumindest bestimmter Kulturen, bei denen es zum Beispiel nur darum ging, die Organoiddichte zu reduzieren, anstatt die Organoide selbst zu zerkleinern, verzichteten einige Arbeitsgruppen auf den Einsatz von Trypsin (Sachs et al., 2018 und Mazzucchelli et al., 2019). Mazzucchelli et al. warteten nach der Passagierung zunächst zwei bis drei Tage, bis wieder kleine gleichmäßige Organoide herangewachsen waren und froren diese dann ohne weitere Zerkleinerung direkt ein. Dies könnte gegebenenfalls helfen, nach dem Auftauen und erneuten Ansetzen des Materials schneller wieder zu brauchbaren Organoiden zu kommen. Wurde bei der Gewebeverarbeitung oder der Passagierung in den oben genannten Arbeiten doch Trypsin verwendet, so betrug die Einwirkungszeit meist nur wenige Minuten und der Fortschritt der Zersetzung wurde meist mikroskopisch kontrolliert, um den Verdau rechtzeitig beenden zu können (De Rose et al., 2013 und Mazzucchelli et al., 2019).

Eine solche genaue Überwachung der einzelnen Prozesse lebten unsere Vorgänger ebenfalls vor. Zu dieser Überwachung zählten beispielsweise auch das mikroskopische Abzählen von Zellen oder Organoiden oder die Durchführung einer FACS-Analyse, um einen Überblick über die genaue Zusammensetzung der Kulturen zu er- und behalten (De Rose et al., 2013 und Rosenbluth et al., 2020) oder auch die simple immunhistochemische Färbung des epithelialen Markers Cytokeratin-19 wie bei Campaner et al., 2020. Allgemein könnte eine genauere Überwachung der Prozesse hilfreich sein, um diese gegebenenfalls individuell anpassen zu können und das jeweils bestmögliche Ergebnis zu erzielen.

Auch die Tatsache, dass es sich bei dem für die Schaffung von Organoidkulturen so essenziellen Faktor Matrigel bzw. BME wie bereits erwähnt um ein organisches Produkt handelt, dessen Zusammensetzung gewissen Schwankungen unterliegt (Lee et al., 2007 und Yang et al., 2020), sollte man sich vor Augen halten. Um Misserfolge auf Grund der Zusammensetzung eines bestimmten Batches zu verhindern, schlugen Lee et al. deswegen vor, die Zellen in der Übergangsphase immer eine Weile in dem vorhergehenden und dem neuen Batch parallel wachsen zu lassen, um mögliche Unterschiede zu detektieren.

Viele der vorangegangenen Arbeiten betonten darüber hinaus die Wichtigkeit der Flexibilität und des individualisierten Umganges mit den einzelnen Organoidmodellen (De Rose et al., 2013, Mazzucchelli et al., 2019 und Campaner et al., 2020). So schrieb Mazzucchelli et al., jede Organoidkultur sei so individuell wie die Patienten, aus deren Gewebe sie gewachsen sei und müsse daher entsprechend unterschiedlich behandelt werden. Natürlich wird man diesen individuellen Ansprüchen durch die simple Umsetzung eines methodischen Protokolls nie gerecht werden können. Jedoch zeigten einige unserer Vorgänger, wie man einem solchen Anspruch nahe kommen kann, indem sie beispielsweise besonders dicht gewachsene Organoidkulturen und solche mit besonders großen Organoiden auf verschiedene Weise passagierten (Mazzucchelli et al., 2019, siehe oben) oder auch morphologisch unterschiedliche Organoide unterschiedlich behandelten (Sachs et al., 2018 und Mazzucchelli et al., 2019). Ein solches Entgegenkommen gegenüber den verschiedenen Bedürfnissen verschiedener Organoidmodelle beziehungsweise mehr Flexibilität statt bloßer Abarbeitung eines Protokolls wäre mit Sicherheit eine weitere Möglichkeit, wie in Zukunft versucht werden könnte, die Effizienz der Kultivierung von Mammakarzinom-Organoidmodellen zu steigern. Allerdings braucht es natürlich auch ausreichendes Training und einige Erfahrung im Umgang mit Organoiden, um solche individuellen Entscheidungen treffen zu können. Je mehr Erfahrung ein Team also mit dem Biobanking von Mammakarzinom-Organoidmodellen sammelt, desto häufiger sollte eine erfolgreiche Etablierung der einzelnen Modelle gelingen.

### **4.2.3 Unterschiedliche Eigenschaften der Originaltumoren**

Im Folgenden sollen nun noch einmal die verschiedenen Merkmale der Originaltumoren, von denen unsere Organoidmodelle abgeleitet waren und mögliche Gründe für ihren Einfluss auf den Etablierungserfolg dieser Modelle beleuchtet werden. Allerdings kann dies selbstverständlich nur eine vereinfachte Betrachtungsweise darstellen, da die verschiedenen Patient\*innen- und Tumormerkmale Hand in Hand gehen und sich gegenseitig beeinflussen.

### **4.2.3.1 Patientenalter bei OP**

Wie unter Punkt 3.2.3.1 beschrieben, konnten die Organoidmodelle von Patient\*innen, die 50 Jahre alt oder älter waren, zu einem höheren Prozentsatz (55%) etabliert werden als die Organoidmodelle jüngerer Patient\*innen (42%). Dieses Ergebnis ging entgegen unserer Erwartung, dass die Organoidmodelle, die von Tumoren jüngerer Menschen abgeleitet waren, ein besseres Wachstum zeigen würden, da es sich bei Mammakarzinomen junger Menschen oft um Subtypen handelt, die sich durch ein aggressiveres Wachstumsverhalten auszeichnen. Zu diesen aggressiven Subtypen zählen Her2/neu-positive und triple negative Karzinome (Anders et al., 2008, Kim et al., 2011). Tatsächlich war der prozentuale Anteil triple negativer Karzinome bei den in die vorliegende Studie eingeschlossenen Patient\*innen unter 50 Jahren erwartungsgemäß höher als unter den Patient\*innen, die 50 Jahre alt oder älter waren. Da sich unter den Kulturbedingungen im Rahmen dieser Studie wie unter Punkt 3.2.3.5 beschrieben die Organoidmodelle triple negativer Mammakarzinome besonders selten (lediglich zu 19%) etablieren ließen, könnte die Korrelation mit diesem Faktor einen Grund für den etwas geringeren Etablierungserfolg der Organoidkulturen aus dem Gewebe junger Patientinnen darstellen.

### **4.2.3.2 Patientengeschlecht**

Über die Auswirkungen des Patientengeschlechts auf das Organoidwachstum lässt sich nur schwer eine Aussage treffen, da wegen des deutlich selteneren Auftretens von Mammakarzinomen bei Männern (etwa 1% aller Neuerkrankungen; Barnes et al., 2019) nur vier Tumorzellproben von männlichen Patienten in unsere Tumorzellbank aufgenommen werden konnten. Von diesen vier Gewebeproben wurden, wie unter Punkt 3.2.3.2 beschrieben, drei zum Anlegen von Organoidkulturen verwendet und zwei dieser drei Organoidmodelle konnten etabliert werden. Diese beiden etablierten Organoidmodelle (Nr. 13 und Nr. 102) männlicher Mammakarzinome zeigten jeweils ein auffallend ergiebiges und langanhaltendes Wachstum, ganz besonders das Modell Nr. 13 (siehe Punkt 3.2.3.2 und Abbildung 9). Bei beiden dieser Originaltumore handelte es sich um nicht medikamentös vorbehandelte Karzinome älterer Männer (58 bzw. 75 Jahre) vom histopathologischen no special type, die Hormonrezeptor-positiv und Her2/neu-negativ waren. In beiden Fällen war das Krankheitsbild außerdem bereits weit

fortgeschritten (Stadium III b bzw. Stadium IV). Jedoch zeigten bei Weitem nicht alle Organoidmodelle von late stage Mammakarzinomen innerhalb der vorliegenden Studie ein solch auffallend gutes Wachstum; einige davon konnten nicht einmal etabliert werden (siehe Punkt 3.2.3.8). Es gelang uns also nicht, einen eindeutigen Faktor zu definieren, der das besonders ergiebige Wachstum dieser beiden Mammakarzinom-Organoidmodelle männlichen Ursprungs erklären konnte.

### **4.2.3.3 Histopathologischer Typus**

Was den Einfluss des histopathologischen Typus der Originaltumoren auf den Etablierungserfolg der Organoidmodelle betrifft, so fiel im Rahmen der vorliegenden Studie, wie unter Punkt 3.2.3.3 beschrieben, vor allem auf, dass sich Organoidmodelle invasiv-lobulärer Mammakarzinome prozentual häufiger etablieren ließen als Organoidmodelle invasiv-duktales Mammakarzinome bzw. des deutlich häufigeren invasiv-duktales no special type (NST) (80% vs. 44%). Die histopathologische Klassifikation des invasiv-lobulären Karzinoms geht oft mit prognostisch günstigen Faktoren wie einem geringen histopathologischen Entdifferenzierungsgrad, Östrogenrezeptor-Positivität, Her2/neu-Negativität und einem niedrigen Proliferationsindex einher (Shin et al., 2019). Dies trifft auch weitgehend auf die invasiv-lobulären Originaltumoren zu, die in unsere Gewebebank aufgenommen werden konnten. So befanden sich unter ihnen lediglich zwei triple negative und zwei Her2/neu-positive Mammakarzinome, sie gehörten fast ausschließlich dem histopathologischen intermediate grade (G2) an und ihr Proliferationsindex lag bei höchstens 30%. All diese Faktoren gingen im Rahmen der vorliegenden Arbeit mit einem besseren Etablierungserfolg einher (siehe Punkt 3.2.3.4, 3.2.3.5 und 3.2.3.6). Dies könnte eine mögliche Erklärung für die auffallend hohe Erfolgsquote bei der Etablierung von Organoidmodellen invasiv-lobulärer Mammakarzinome im Vergleich mit solchen vom no special type im Rahmen der vorliegenden Studie sein. Über die möglichen Auswirkungen der übrigen histopathologischen Sonderformen des Mammakarzinoms auf das Organoidwachstum lässt sich wegen der geringen Anzahl der Fälle, die für die vorliegende Studie rekrutiert werden konnten, schwerlich eine Aussage treffen. Dass jedoch die Organoidmodelle der beiden Phylloides Tumoren wegen schlechten Wachstums verworfen werden mussten, lässt sich vermutlich dadurch erklären, dass es sich dabei um sarkomatöse Tumoren handelte (Stadler et al., 2019), deren Zellen

unter Kulturbedingungen, welche für die Anzucht epithelialer Tumorzellen optimiert worden waren, nicht anwachsen konnten.

#### **4.2.3.4 Histopathologisches Grading**

Wie im vorherigen Abschnitt beschrieben, ließen sich im Zuge der vorliegenden Studie die Organoidmodelle aus den Zellen besser differenzierter Tumore (G1 und G2) prozentual häufiger etablieren als Organoidmodelle aus den Zellen von high grade (G3) Mammakarzinomen (siehe Punkt 3.2.3.4). Eine mögliche Erklärung für dieses Phänomen könnte sein, dass das von Sachs et al. für die Anzucht von Mammakarzinom- und Mamma-Normalgewebe-Organoiden etablierte Nährmedium auf einem Konzept beruht, welches ursprünglich für die Kultivierung nicht maligner epithelialer Zellen in 3D-Kultur entwickelt wurde (siehe Punkt 1.2.1 und 1.2.4.1). Auch die von Sachs et al. als wichtigste Neuerung im Bezug auf das Kulturmedium bezeichnete Hinzunahme des Faktors Neuregulin-1 fördert keinesfalls spezifisch das Wachstum maligner Mammakarzinomzellen (Goldhammer et al., 2019). Es könnte also durchaus sein, dass Karzinomzellen, welche sich durch Mutationen histopathologisch weiter vom ursprünglichen normalen Drüsengewebe entfernt hatten, durch Kultivierung in diesem Medium benachteiligt wurden und daher ein schlechteres Wachstum an den Tag legten. Auch war der Anteil triple negativer Mammakarzinome unter den im Zuge dieser Arbeit zum Anlegen von Organoidkulturen verwendeten high grade Tumoren besonders hoch (14 von 42). Und da Organoidkulturen von Tumoren mit diesem bestimmten Rezeptorstatus unter den im Rahmen der vorliegenden Studie angewandten Kulturbedingungen besonders schlecht zu wachsen schienen (siehe Punkt 3.2.3.5), ist es nicht verwunderlich, dass dies auch bei Organoidmodellen von high grade Originaltumoren der Fall war.

#### **4.2.3.5 Rezeptorstatus**

Im Rahmen der vorliegenden Studie ließen sich Organoidmodelle von Hormonrezeptor- oder zumindest Östrogenrezeptor-positiven Originaltumoren prozentual am häufigsten etablieren. Organoidmodelle von Tumoren mit Amplifikation von Her2/neu ließen sich, unabhängig vom Hormonrezeptorstatus, etwa in der Hälfte der Fälle bis zur Etablierung in Kultur halten. Die triple negativen

(ER– PR– Her2/neu–) Mammakarzinome erzeugten, wie bereits des Öfteren erwähnt, den höchsten Anteil an Organoidmodellen, bei denen eine Etablierung wegen mangelnden Wachstums nicht gelang (siehe Punkt 3.2.3.5).

Sowohl Her2/neu-Positivität als auch triple Negativität gehen häufig mit anderen histopathologischen Tumormerkmalen einher, die auf eine erhöhte Aggressivität der Erkrankung hindeuten, wie einem hohen histopathologischen Entartungsgrad und Proliferationsindex (auch wenn diese Eigenschaft in triple negativen Karzinomen stärker ausgeprägt ist als in Her2/neu-positiven Karzinomen) (Rakha et al., 2019/1). Wie unter Punkt 4.2.3.4 und 4.2.3.6 ausgeführt, korrelierten diese beiden Parameter im Rahmen unserer Arbeit ebenfalls mit einem Her2/neu-positiven bzw. triple negativen Rezeptorstatus und einem geringeren Etablierungserfolg.

Das von Sachs et al. in ihrer 2018 erschienen Veröffentlichung über den Aufbau einer Brustkrebs-Organoid-Biobank eingeführte und auch im Rahmen der vorliegenden Arbeit verwendete Mamma(karzinom)-Organoid-Nährmedium enthält, wie unter Punkt 1.2.4.1 ausgeführt, viele verschiedene Faktoren, die das Wachstum der Organoiden in 3D-Kultur ergiebiger gestalten und auch über längere Kulturzeiträume fördern sollen. Diese Faktoren greifen hierfür in zahlreiche zelluläre Regulationskreisläufe ein. Maligne Tumorzellen, einschließlich Mammakarzinomzellen, weisen meist vielfältige somatische Mutationen auf, auch wenn nur die wenigsten von ihnen als klare Treiber des Fortschreitens der Tumorerkrankung betrachtet werden. Natürlich kodieren einige dieser mutierten Gene für Proteine, die Faktoren innerhalb der zellulären Regulationskreisläufe darstellen, beispielsweise in Wachstums- und Proliferations-, Reparatur-, Zellzyklus- oder Transkriptions-Regulations-Signalwegen. Die durchschnittliche Mutationsrate ist unter Vertretern des molekularen basal-like Subtyps, der zu etwa 80% von triple negativen Karzinomen gebildet wird, hierbei innerhalb der Entität Brustkrebs mit am höchsten und Studien haben gezeigt, dass über 90% der Patient\*innen mit triple negativen Mammakarzinomen Veränderungen in mindestens einer dieser zellulären Signalkaskaden aufweisen (Garrido-Castro et al., 2019). Unseren Überlegungen nach könnte es also besonders bei hochgradig mutierten triple negativen Mammakarzinomen dem Wachstum der Tumorzellen und damit dem Organoidwachstum eher abträglich sein, besagte zelluläre Signalkaskaden durch Zugabe von Faktoren von außen zu manipulieren. Daher versuchten wir, wie unter Punkt 2.4 und 3.3 beschrieben und unter Punkt 4.3 näher ausgeführt, das Wachstum

und den Etablierungserfolg unserer Organoidmodelle triple negativer Mammakarzinome zu verbessern, indem wir dem Medium verschiedene Faktoren entzogen.

Interessant ist, dass die Etablierung triple negativer Mammakarzinom-Organoidmodelle in den Arbeiten unserer Vorgänger, die sich ebenfalls mit der Anzucht und Kultivierung von Brustkrebs-Organoidmodellen beschäftigten, nie ein nennenswertes Problem darzustellen schien. Im Vergleich unter Punkt 4.2.1 wird jedoch deutlich, dass dies eventuell an einer unterschiedlichen Definition dessen liegen könnte, was die „Etablierung“ einer Organoidkultur bedeutet.

### **4.2.3.6 Ki-67-Status**

Wie unter Punkt 3.2.3.6 beschrieben und in Abbildung 13 zu sehen, gelang im Rahmen der vorliegenden Arbeit eine Etablierung der Organoidmodelle von Originaltumoren mit niedrigem Proliferationsindex im Schnitt häufiger als bei Organoidmodellen von Karzinomen mit höherem Proliferationsindex. Besonders sichtbar war diese Diskrepanz zwischen den Organoidmodellen „gering proliferierender“ (MIB-1 Labeling Index  $\leq 10\%$ ) und „hochproliferativer“ ( $>25\%$ ) Originaltumoren. Dieses Ergebnis war überraschend, da man intuitiv meinen könnte, eine höhere Proliferationsrate der Tumorzellen würde zu besser und schneller wachsenden Organoidkulturen führen. Allerdings handelt es sich beim Ki-67-Proliferationsindex um einen wichtigen Marker für die Aggressivität des Karzinoms; sodass ein hoher Prozentwert häufig assoziiert ist mit aggressiveren Tumor-Subtypen wie triple negativen oder ER-negativen und Her2/neu-positiven Mammakarzinomen (Rakha et al., 2019). Diese Korrelation lässt sich ebenfalls deutlich bei der Betrachtung der in diese Studie inkludierten Karzinome erkennen: Alle außer einem einzigen zum Anlegen von Organoidkulturen verwendeten triple negativen Karzinome und etwa die Hälfte der Her2/neu-positiven Karzinome waren hochproliferativ. Und wie bereits mehrfach erwähnt (siehe auch Punkt 3.2.3.5 und 4.2.3.5) gingen solche aggressiven Tumorsubtypen gemäß der Ergebnisse der vorliegenden Studie tendenziell mit schlechteren Etablierungschancen für ihre Organoidmodelle einher, was, wie von uns vermutet, mit einem Selektionseffekt des verwendeten Kulturmediums zusammenhängen könnte.

### **4.2.3.7 Tumorgröße und Tumorstadium**

Wie unter Punkt 3.2.3.7 und 3.2.3.8 ausgeführt und aus Abbildung 14 und 15 ersichtlich ließ sich im Rahmen der vorliegenden Studie zwischen dem Grad der Fortgeschrittenheit der Tumorerkrankung der Patient\*innen und dem Etablierungserfolg ihrer Organoidmodelle keine eindeutige Korrelation ableiten. Wie in den vorangegangenen Unterkapiteln beschrieben, schienen es eher vor allem die histopathologischen Merkmale des Tumorgewebes zu sein, welche einen Einflussfaktor auf das Wachstum der Organoidkulturen darstellten.

### **4.2.3.8 Größe des verarbeiteten Tumorstücks**

Auch zwischen der Größe des verarbeiteten Tumorstücks und dem Etablierungserfolg der daraus entstandenen Organoidkulturen ließ sich keine eindeutige Korrelation erkennen (siehe Abbildung 16). Unsere Erwartung, dass größere Gewebestücke wegen der potenziell größeren Ausbeute vitaler Tumorzellen erfolgreichere Organoidmodelle hervorbringen würden, konnte daher nicht bestätigt werden. Tendenziell war sogar das Gegenteil der Fall (siehe Punkt 3.2.3.9). Allerdings wurde unter diesem Gesichtspunkt, wie bereits erwähnt, das gesamte uns von den Kollegen der Pathologie zur Verfügung gestellte Gewebe betrachtet, noch bevor offensichtliches Fettgewebe oder nekrotisches Gewebe entfernt worden war. Tatsache ist jedoch, dass auch mit Hilfe wirklich kleiner Tumorgewebestücke (minimal ca. 12 mm<sup>3</sup>) teilweise sehr gut wachsende Organoidkulturen erstellt werden konnten. Dies gibt Hoffnung für Brustkrebspatient\*innen, welche eine neoadjuvante oder palliative medikamentöse Therapie benötigen. Denn damit auch sie von den Möglichkeiten der personalisierten Medizin, die das Organoidmodell in Zukunft bieten könnte, profitieren können, müssen auch kleine durch Biopsien gewonnene Gewebeproben für die erfolgreiche Etablierung qualitativ hochwertiger Organoidkulturen ausreichen (Yang et al., 2019).

### **4.2.3.9 Neoadjuvante Therapie**

Der Anteil neoadjuvant vorbehandelter Mammakarzinome unter den Originaltumoren, deren Gewebe im Rahmen der vorliegenden Studie zum Anlegen von Organoidkulturen genutzt wurde, war wie unter Punkt 3.2.3.10 und 3.2.3.11 beschrieben gering (ca. 10%). Jeweils etwa die Hälfte davon entfiel auf



Patient\*innen, die eine neoadjuvante Chemotherapie bzw. eine neoadjuvante antihormonelle Therapie mit dem Wirkstoff Tamoxifen durchlaufen hatten. Der Grund für diese Seltenheit in unserer Biobank besteht, wie unter Punkt 4.1.9 diskutiert, bei der neoadjuvanten antiendokrinen Therapie vermutlich in der Tatsache, dass es sich nicht um eine Standard-, sondern eher eine experimentelle Therapiemethode handelt (Braun et al., 2019). Währenddessen konnten von den klassisch chemotherapeutisch vorbehandelten Mammakarzinomen natürlich nur solche in die Gewebebank aufgenommen werden, von denen nach Abschluss der Therapie noch ausreichend Tumormaterial übrig geblieben war, sodass die Pathologie uns einen Teil davon für Forschungszwecke zur Verfügung stellen konnte.

Sowohl von den neoadjuvant chemotherapeutisch als auch antihormonell vorbehandelten Originaltumoren konnte jeweils lediglich ein Organoidmodell etabliert werden (siehe Punkt 3.2.3.10 bzw. 3.2.3.11). Angesichts der intendierten Wachstumshemmung der Tumorzellen durch diese Behandlungen scheint dieses Ergebnis nicht weiter verwunderlich. Jedoch ist erwähnenswert, dass die eine von neoadjuvant chemotherapeutisch behandeltem Gewebe abgeleitete Organoidkultur, die ein für die Etablierung ausreichendes Wachstum zeigte, von einem Originaltumor stammte, der ein Ansprechen mit zumindest mäßiger Tumorregression auf eben diese Therapie gezeigt hatte. Daneben gab es Organoidmodelle von Tumoren, die laut Pathologiebericht keinerlei Therapieansprechen gezeigt hatten (Regressionsgrad 0 nach Sinn) oder unter Chemotherapie sogar progredient waren, deren Wachstum nicht für eine Etablierung ausreichte. Ein weiterer Faktor, den es bei den chemotherapeutisch vorbehandelten Originaltumoren zu bedenken gilt, ist die indikationsbedingte Korrelation mit einem triple negativen Rezeptorstatus, welcher, wie schon mehrmals ausgeführt, im Zuge der vorliegenden Studie mit einem geringeren Etablierungserfolg der Organoidmodelle einherging.

### **4.2.3.10 Zusammenfassung**

Alles in allem lässt sich bei der Betrachtung verschiedener Patient\*innen- und Tumormerkmale als mögliche Einflussfaktoren auf das Organoidwachstum im Rahmen dieser Studie folgendes Muster erkennen: Merkmale, die mit einer aggressiveren Krankheitsentität assoziiert sind, wie junges Patientenalter, hoher histopathologischer Entartungsgrad, triple negativer Rezeptorstatus und hoher Proliferationsindex, korrelierten unseren Beobachtungen nach unter den gegebenen

Kulturbedingungen mit einem schlechteren Wachstum der abgeleiteten Organoidmodelle und einem daher geringeren Etablierungserfolg. Da uns diese Korrelation insbesondere für Originaltumoren mit sowohl Hormonrezeptor- als auch Her2/neu-negativem Rezeptorstatus bereits relativ früh auffiel, wurde der Versuch gestartet, die Kulturbedingungen für eben diesen Tumorsubtyp durch Modifikationen des Kulturmediums zu verbessern. Die Ergebnisse dieses Experiments werden unter Punkt 3.3 dargestellt und sollen im folgenden Abschnitt näher beleuchtet werden.

### **4.3 Versuch zur Optimierung des Nährmediums für Organoidmodelle triple negativer Originaltumoren**

#### **4.3.1 Problematik**

15-20% aller Fälle invasiver Mammakarzinome sind immunhistochemisch triple negativ (ER-negativ, PR-negativ und Her2/neu-negativ) (Sporikova et al., 2018 und Garrido-Castro et al., 2019). Dieser Rezeptorstatus ist assoziiert mit jüngerem Patientenalter, höherem histopathologischen Entdifferenzierungsgrad, höherem Proliferationsindex und stärkerer Fortgeschrittenheit der Erkrankung zum Zeitpunkt der Diagnose als bei Hormonrezeptor-positiven Karzinomen (Kumar und Aggarwal, 2016). Tumorerkrankungen mit triple negativen Mammakarzinomen nehmen außerdem oft einen besonders aggressiven klinischen Verlauf mit übergreifend schlechterer Prognose bei hohem metastatischem Potenzial, hoher Rezidivwahrscheinlichkeit und geringer Überlebensrate (Garrido-Castro et al., 2019). Die meisten triple negativen Mammakarzinome sind invasiv-duktral (Coussy et al., 2017), der Anteil seltener histopathologischer Subtypen wie metaplastischer, medullärer oder apokriner Mammakarzinome ist innerhalb des triple negativen Brustkrebs jedoch auch vergleichsweise hoch (Sporikova et al., 2018). Tumore, die immunhistochemisch als triple negativ klassifiziert wurden, können theoretisch jedem einzelnen intrinsischen molekularen Subtyp der Mammakarzinome angehören; sprich luminal A- oder B-like, Her2-enriched, basal-like, normal-like oder claudin-low (Sporikova et al., 2018 und Garrido-Castro et al., 2019), wenn auch die Assoziation mit den drei letzteren am größten ist (Kumar und Aggarwal, 2016). Schon zwischen diesen drei verschiedenen molekularen Subtypen des triple negativen Brustkrebs gibt es signifikante Unterschiede, auch was klinische Faktoren wie die Prognose angeht (Kumar und Aggarwal, 2016). Der größte Anteil der triple negativen Mammakarzinome (50-75%) gehört dem basal-like Subtyp an (Garrido-Castro et al., 2019 und Yin et al., 2020), jedoch sind aus den oben genannten Gründen triple negativer Brustkrebs und basal-like Brustkrebs keinesfalls miteinander gleichzusetzen (Kumar und Aggarwal, 2016). Es besteht weiterhin sogar eine große intertumorale mutationale und transkriptionale Heterogenität innerhalb der verschiedenen molekularen Subtypen des triple negativen Brustkrebs (Pohl et al., 2017) und natürlich weisen einzelne Tumoren auch immer eine gewisse intratumorale genetische Heterogenität auf (Garrido-Castro et al., 2020). Allgemein

handelt es sich bei triple negativem Brustkrebs also um eine Krankheitsentität mit einem hohen Grad an Heterogenität, sowohl molekular, als auch histopathologisch und klinisch (Yin et al., 2020).

Wegen des Mangels an Rezeptoren, die die Möglichkeit einer gezielten Behandlung von triple negativen Mammakarzinomen eröffnen könnten, stellt die klassische Chemotherapie bisher die einzige Option eines systemischen Therapieansatzes dar, um das Outcome für die Betroffenen zu verbessern (Kumar und Aggarwal, 2016). Glücklicherweise zeigen triple negative Tumoren in der Regel eine hohe Chemosensitivität (Kumar und Aggarwal, 2016) und sprechen deutlich besser auf neoadjuvante Chemotherapien an als Hormonrezeptor-positive Mammakarzinome (Yin et al., 2020). Patient\*innen mit triple negativen Mammakarzinomen, die auf eine neoadjuvante Chemotherapie mit einer pathologischen Komplettremission reagieren, haben sogar eine besonders gute Langzeit-Prognose (Sporikova et al., 2018). Jedoch treten bei diesem Tumorsubtyp durchaus auch Resistenzen gegen verschiedene Chemotherapeutika auf (Merikhian et al., 2021). Daher ist die Findung von molekularen Targets innerhalb des triple negativen Brustkrebs und der entsprechenden Agenzien, um neue personalisierte Therapieregimes für die betroffenen Patient\*innen schaffen zu können, ein aktuelles und wichtiges Feld der Mammakarzinomforschung (Lyons, 2019 und Yin et al., 2020). Natürlich wird die Suche danach weiter kompliziert durch die oben beschriebene enorme Heterogenität innerhalb des triple negativen Subtyps des Mammakarzinoms (Garrido-Castro et al., 2020). Es wäre also enorm wichtig, dass Technologien wie die Organoidanzucht für die weitere Erforschung der molekularen Eigenschaften triple negativer Mammakarzinome zur Verfügung stehen. Dass wir im Rahmen der vorliegenden Studie ausgerechnet bei der Etablierung von Organoidmodellen von Originaltumoren dieses Rezeptorstatus Schwierigkeiten hatten (siehe Punkt 3.2.3.5) ist daher enttäuschend. Um diesem Umstand zu begegnen versuchten wir deshalb, das Wachstum unserer Organoidmodelle triple negativer Karzinome durch Modifikationen des Kulturmediums zu verbessern (siehe Punkt 2.4 und 3.3).

Wie bereits unter Punkt 2.4.3.5 ausgeführt, war unsere Überlegung dabei, dass ein Eingriff in die zellulären Regulationskreisläufe durch verschiedene Faktoren des Nährmediums dem Wachstum der ohnehin häufig hochgradig mutierten Zellen triple negativer Mammakarzinome eher abträglich sein könnte. Warum wir für unsere

Versuche dabei die Faktoren Wnt3a, R-Spondin1/3 und Noggin auswählten und dem Kulturmedium entzogen, soll in den folgenden Abschnitten erklärt werden.

### 4.3.2 Mediumversuche

#### 4.3.2.1 *Faktoren des Wnt-Signaling-Pathways: Wnt3a und R-Spondin1 bzw. 3*

Wnt-Signaling reguliert eine Vielzahl von zellulären Prozessen, unter anderem Differenzierung, Proliferation und Stammzell-Pluripotenz. Dieser Signalweg spielt auch eine entscheidende Rolle in der Entwicklung der menschlichen Brustdrüsen in der Embryogenese, in der Pubertät und Schwangerschaft, da auch adultes Brustdrüsengewebe Wnt-responsive Stammzellpopulationen enthält. Die zelluläre Wnt-Signalkaskade ist dagegen bei vielen verschiedenen Formen von Krebs dysreguliert, darunter auch bei menschlichem Brustkrebs (Pohl et al., 2017). Eine abnorm hohe Aktivität des Wnt-Signalweges spielt jedoch eine entscheidende Rolle besonders in der Entwicklung von triple negativen Mammakarzinomen (Coussy et al., 2017) und obwohl dieser Subtyp wie bereits ausgeführt eine äußerst komplizierte, heterogene Krankheitsentität mit Aberrationen in vielen verschiedenen zellulären Regulationskreisläufen darstellt, so ist die Dysregulation der Wnt-Signalkaskade doch ein charakteristisches Kennzeichen dieser Tumoren (Pohl et al., 2017 und Mohammadi-Yeganeh et al., 2019). Alle molekularen Subtypen des triple negativen Brustkrebs weisen nämlich verschiedene Mutationen im Wnt-Signalweg auf (Pohl et al., 2017). Die Dysregulation dieses Signalweges spielt eine wichtige Rolle bei der Entstehung und Metastasierung von triple negativem Brustkrebs (Pohl et al., 2017) und sorgt für eine insgesamt schlechtere Prognose dieser Erkrankung (Merikhian et al., 2021).

Das von Sachs et al. etablierte und auch im Rahmen der vorliegenden Studie verwendete Mamma(karzinom)-Organoid-Kulturmedium enthält mit Wnt3a und R-Spondin1 bzw. 3 (diese können laut des Medium-Rezeptes von Sachs et al. beide verwendet werden) zwei wichtige Faktoren des Wnt-Signaling-Pathways, auch wenn die Autoren erklären, dass die Zugabe von Wnt3a zum Nährmedium die Kulturbedingungen nicht signifikant verbessere und daher entbehrlich sei (Sachs et al., 2018).

Wnt3a ist ein Aktivator des Wnt// $\beta$ -Catenin-Signalweges und damit an der Tumorgenese und -progression von triple negativem Brustkrebs beteiligt (He et al., 2015).

Bei R-Spondin1-4 handelt es sich um eine Familie von Proteinen, welche als Onkogene agieren (Conboy et al., 2021). Sie sind Synergisten von Wnt-Liganden und aktivieren ebenfalls den Wnt// $\beta$ -Catenin-Signalweg. Die RSPO-Familie ist hauptsächlich in triple negativen Mammakarzinomen überexprimiert; die Überexpression mindestens eines RSPO-Gens konnte in 11,6% der Fälle von Brustkrebs allgemein und 55,8% der Fälle von triple negativem Brustkrebs beobachtet werden. Eine Überexpression dieser Gene in Mammakarzinomen korreliert dabei mit einem höheren histopathologischen Entartungsgrad, einem erhöhten Ki-67-Proliferationsindex und negativem Hormonrezeptor- und Her2/neu-Status. Andere aktivierende Mutationen der Wnt// $\beta$ -Catenin-Signalkaskade, welche in zahlreichen anderen menschlichen Krebsarten zu finden sind, sind bei Brustkrebs dagegen selten, was ein weiterer Hinweis für die wichtige Rolle der RSPO-Überexpression in der erhöhten Wnt-Signaling-Aktivität und damit auch der Genese und des Fortschreitens von (triple negativem) Brustkrebs ist (Coussy et al., 2017).

Auch wenn der Wnt-Signalweg genau wie die Krankheitsentität des triple negativen Brustkrebs sehr komplex und noch nicht vollständig charakterisiert ist (Pohl et al., 2017), so scheint die Signifikanz seiner Dysregulation für die Entstehung und das Wachstum dieses Tumor-Subtyps doch unbestreitbar.

### **4.3.2.2 Inhibitor des TGF $\beta$ /BMP-Signaling-Pathways: Noggin**

Die Transforming Growth Factor  $\beta$  (TGF $\beta$ ) Superfamilie ist involviert in zahlreiche zelluläre Prozesse. Die meisten Faktoren dieser Signalkaskade können unterteilt werden in die TGF $\beta$ - und BMP (Bone Morphogenetic Protein)-Unterfamilien, welche häufig gegensätzliche Effekte zu haben scheinen (Zabala et al., 2020). Noggin ist hierbei ein sezernierter löslicher Antagonist, der die Liganden des BMP-Signalweges im extrazellulären Raum regulieren kann. BMPs sind sezernierte Zytokine bzw. Wachstumsfaktoren (Owens et al., 2015). Sie verdanken ihren Namen der Tatsache, dass sie die osteoblastische Differenzierung mesenchymaler Stammzellen induzieren (Zabala et al., 2020). TGF $\beta$ /BMP-Signaling hat außerdem bedeutenden Einfluss auf die Entwicklung und Homöostase des normalen Brustdrüsengewebes

(Zabala et al., 2020). Gene, die BMPs enkodieren, sind in Mammakarzinomzellen häufig amplifiziert und/oder überexprimiert, jedoch auch ihre Antagonisten wie Noggin (Owens et al., 2015). Darüber hinaus ist die Aktivierung des TGF $\beta$ /BMP-Signalweges ein bestimmendes Merkmal des triple negativen Brustkrebs. Bei diesem Mammakarzinom-Subtyp sind die Rezeptoren und Liganden dieser Kaskade chronisch überexprimiert, was mit Metastasierung und schlechterem Patientenüberleben assoziiert ist. In malignen Tumoren ist diese Signalkaskade nämlich involviert in die Proliferation, Migration und Invasion von Krebszellen, außerdem die epithelial-mesenchymale Transition, den Umbau der extrazellulären Matrix, die Angiogenese, Immunsuppression und Mechanismen der Chemoresistenz (Di et al., 2019). Jedoch ist ihre Rolle in der Tumorentwicklung und -progression durchaus ambivalent: Einige Studienergebnisse sprechen dafür, dass TGF $\beta$  und BMPs initial als Tumorsuppressoren agieren und das Tumorstadium hemmen, dagegen jedoch in späteren Stadien Prozesse wie die Zellproliferation, epithelial-mesenchymale Transition, Ausbildung von Tumorstammzellen, Invasion und Metastasierung fördern (Di et al., 2019). Des Weiteren entdeckten Owens et al. im Rahmen ihrer 2015 veröffentlichten Studie mehrere Hinweise auf eine gegensätzliche Rolle der TGF $\beta$ - und BMP-Familien auf die tumorbiologischen Eigenschaften und die Prognose von Brustkrebs. Auch Zabala et al. mahnten daher in ihrer 2020 erschienenen Veröffentlichung, dass dieser Signalweg kontextabhängig funktioniert und ihn betreffende Experimente durch den Versuchsaufbau oder die individuellen Mutationen der verwendeten Tumormodelle beeinflusst werden könnten.

Wie bereits erwähnt ist Noggin ein extrazellulärer Antagonist diverser BMPs, darunter mindestens BMP2, 4, 5, 6, 7, 13 und 14 (Blásquez-Medela et al., 2019). Dem von Sachs et al. in ihrer 2018 erschienen Arbeit vorgestellten Brust(krebs)-Organoid-Kulturmedium wird es zugesetzt, da es die Anzahl der initialen Organoiden in einer Kultur steigern und ihre Expansionsrate vergrößern kann (Yu und Huang, 2020). Dies könnte mit seiner Hemmung des Faktors BMP7 zusammenhängen, da eine Zugabe dessen laut einer 2020 erschienenen Studie von Zabala et al. einen gegenteiligen Effekt auf Organoidkulturen aus gesundem Brustdrüsengewebe hatte. Allerdings ist zu beachten, dass es sich hierbei um normales Mammagewebe handelte, von dem sich die Zellen triple negativer Karzinome in der Regel durch zahlreiche Mutationen weit entfernt haben (Garrido-Castro et al., 2019). Daher sahen

wir Grund zur Annahme, dass Noggin auf Organoidmodelle mancher Tumorzellsubtypen wie triple negativer Mammakarzinome eine andere Wirkung haben könnte. Auch unterscheidet sich die BMP-Rezeptorexpression laut Zabala et al. zwischen basalen und luminalen Mamma-Zellpopulationen. Während Basalzellen deutlich höhere Expressionslevel von BMPR2 aufwiesen, so exprimierten luminalen Zellen mehr BMPR1A und B, was zu der früheren Entdeckung passt, dass BMPR1A in Brustdrüsengewebe für Hormon-Signaling und Milchproduktion wichtig ist (Zabala et al., 2020). Dies könnte ein Grund für eine möglicherweise unterschiedliche Reaktion von basal-like und luminal-like Mammakarzinomzellen auf Eingriffe in den BMP-Signaling-Pathway sein. Dass BMP7 auf verschiedene immortalisierte Mamma-Epithel-Zelllinien gegensätzliche Effekte haben, sprich proliferativ oder anti-proliferativ wirken kann, wurde bereits nachgewiesen (Zabala et al., 2020). Wichtigerweise konnten Zabala et al. auch zeigen, dass eine exogene Zufuhr von Faktoren des TGF $\beta$ /BMP-Signaling-Pathways in vitro die Effekte derselben endogenen Faktoren auf das Mammagewebe in vivo zu spiegeln vermochte.

### 4.3.3 Resultate

Wie unter Punkt 3.3 veranschaulicht brachte der Versuch, die Kulturbedingungen für Organoidmodelle triple negativer Mammakarzinome im Rahmen der vorliegenden Studie zu verbessern und dadurch die Erfolgsrate deren Etablierung zu erhöhen, leider nicht den gewünschten Erfolg. Zwar konnten zwei der fünf Organoidmodelle triple negativer Originaltumoren bis zur dritten Einfrierung von Zellmaterial gebracht und damit nach unserer Definition des Begriffs etabliert werden, jedoch mussten die Kulturen bereits in der darauffolgenden Passage auf Grund geringen bzw. fehlenden Organoidwachstums verworfen werden. Die drei übrigen Modelle konnten nicht einmal bis zur Etablierung gebracht werden; zwei von ihnen zeigten bereits nach dem initialen Kulturansatz kein nennenswertes Organoidwachstum. Die Modifikationen des Kulturmediums, die wir durch Weglassen drei verschiedener Faktoren des Wnt- bzw. TGF $\beta$ /BMP-Signaling-Pathways vornahmen, vermochten daran in keinem der fünf Fälle etwas zu ändern. Wir stellten nur fest, dass das Organoidwachstum, zumindest was Anzahl und Größe der Organoide anging, unter der Entfernung der Faktoren Wnt3a und Noggin nicht weiter zu leiden schien, da die Resultate weitgehend denjenigen entsprachen, die wir durch die Nutzung des vollständigen Mamma(karzinom)-Organoid-Kulturmediums nach der Rezeptur von



Sachs et al. erzielen konnten. Die Zugabe der Faktoren Wnt3a und Noggin zum Brustkrebs-Organoid-Nährmedium schien also im Rahmen dieses Versuchs zumindest für das Wachstum von Organoidmodellen triple negativer Mammakarzinome entbehrlich. Die Zugabe der Faktoren R-Spondin1 oder R-Spondin3 schien im Rahmen dieses Versuchs zumindest für das Wachstum von Organoidmodellen triple negativer Mammakarzinome dagegen essenziell.

Wie bereits erwähnt sahen Sachs et al. im Rahmen ihrer 2018 veröffentlichten Arbeit zum Aufbau einer Mammakarzinom-Organoidbank unter der Nutzung des von ihnen optimierten Kulturmediums keine Benachteiligung bestimmter Organoidmodelle auf Grund ihres Rezeptorstatus. Die Autoren gaben an, dass die Zugabe von Wnt3a ihrer Erfahrung nach die Organoid-Kulturbedingungen nicht merklich zu verbessern vermochte, was zu unseren eigenen Beobachtungen im Rahmen dieses Versuchs passt (Sachs et al., 2018).

Die Morphologie der Organoidkulturen veränderte sich sichtlich unter der Modifikation des Nährmediums, und zwar auf unterschiedliche Weise: Bei vier der fünf Modelle schien die Zugabe von L-WRN konditioniertem Medium zum Organoid-Kulturmedium ein Absinken der Zellen durch das Matrigel und ein flächiges, zweidimensionales Wachstum auf dem Boden der Kulturwells zu begünstigen; in einem Fall (Organoidmodell Nr. 100) schien dagegen ein Weglassen des konditionierten Mediums eben diesen Effekt zu haben (siehe Abbildungen 23 bis 33 unter Punkt 3.3). Diese unterschiedliche Reaktion der verschiedenen Organoidmodelle auf die Zusammensetzung des Nährmediums entspricht den Erfahrungen einiger unserer Vorgänger bei der Kultivierung von Brustkrebs-Organoiden, dass jedes Organoidmodell individuell verschieden ist und entsprechend behandelt werden muss (De Rose et al., 2013, Mazzucchelli et al., 2019 und Campaner et al., 2020).

Auch einige dieser Vorgänger führten im Zuge ihrer Studien Versuche zur Variation des von Sachs et al. etablierten Mamma(karzinom)-Organoid-Nährmediums durch. So behandelten Rosenbluth et al. beispielsweise Organoidkulturen aus Mamma-Normalgewebe vier verschiedener Frauen mit zehn verschiedenen Kulturmedien. Bei acht dieser Medien fehlte jeweils ein Faktor der Rezeptur nach Sachs et al. In der Mehrzahl der Fälle beeinflussten diese Änderungen in der Rezeptur des Nährmediums das Mengenverhältnis der verschiedenen Brustdrüsenzell-Subpopulationen. Das Weglassen des Faktors Noggin resultierte dabei in einer

Zunahme des Anteils luminaler Progenitorzellen, während die Entfernung von R-Spondin1 das Gegenteil, nämlich die relative Verkleinerung der luminalen Progenitor-Fraktion bewirkte (Rosenbluth et al., 2020). Auch wenn es sich also bei den im Rahmen dieses Versuchs getesteten Organoidmodellen um Kulturen normaler, nicht maligner Brustdrüsenzellen handelte, so zeigte er doch, dass eine Variation der Rezeptur des Nährmediums um nur einen Faktor einen messbaren Effekt auf die kultivierten Zellen haben kann, was sich durch unsere eigenen Beobachtungen bestätigen ließ.

### 4.3.4 Ausblick

Nun sind die bloße Anzahl und Größe der Organoide freilich nicht die einzigen Merkmale, die eine Organoidkultur ausmachen. Es wäre daher interessant, die einzelnen Modelle mittels DNA- bzw. RNA-analytischer Methoden näher untersuchen zu können, um beispielsweise herauszufinden, um welche Subtypen des heterogenen Krankheitsbildes des triple negativen Brustkrebs es sich handelt und nach Erklärungen für die unterschiedlichen Reaktionen auf die Mediumvariationen zu suchen oder auch um festzustellen, ob und inwiefern verschiedene Rezepturen des Kulturmediums die Erhaltung der mutationalen Eigenschaften der Originaltumoren innerhalb der entsprechenden Organoidmodelle beeinflussen. Und auch bei der Modifikation des Kulturmediums wurden im Rahmen dieses Versuchs offensichtlich nicht alle Möglichkeiten ausgeschöpft. Dieses enthält noch elf weitere Faktoren (siehe Tabelle 2) und kann damit auf enorm viele verschiedene Weisen variiert werden. Sie alle bilden Ansatzpunkte für weitere Mediumversuche, die interessante Auswirkungen auf Organoidkulturen triple negativer Mammakarzinome haben könnten. Natürlich sollten wegen der Interaktionen und Verstrickungen verschiedener Signalkaskaden in triple negativen Tumorzellen untereinander (Merikhian et al., 2021) auch kombinierte Modifikationen verschiedener Mediumbestandteile ausprobiert werden. Und nicht zuletzt kommt es wohl nicht nur auf ein Vorhandensein oder Fehlen der verschiedenen Wachstumsfaktoren an, sondern auch auf die Konzentration dieser. So stellten Sachs et al. im Prozess ihrer Optimierung des auf Sato et al. beruhenden Organoid-Nährmediums für Mamma(karzinom)-Organoide beispielsweise fest, dass eine EGF-Konzentrationen von über 5 ng/ml zwar die Proliferation der Zellen erhöhte, jedoch auch zu einem Absinken der Organoidkulturen durch das BME und einem graduellen Verlust ihrer

dreidimensionalen Struktur führte, ähnlich wie es im Rahmen unserer Mediumversuche bei manchen Rezepturen und bestimmten Organoidmodellen zu beobachten war (siehe Punkt 3.3). Außerdem stellten die Autoren fest, dass eine Konzentration von SB2020190 über 1  $\mu\text{M}$  die Effizienz der Organoidbildung innerhalb ihrer Kulturen negativ beeinflusste (Sachs et al., 2018). Wie man sieht gäbe es noch unzählige Möglichkeiten, das Mamma(karzinom)-Organoid-Nährmedium nur auf Grundlage der bereits enthaltenen Faktoren zu variieren. Vielleicht liegt der Schlüssel für ein besseres Wachstum der Organoidmodelle triple negativer Mammakarzinome auch gar nicht in einer Elimination oder Konzentrationsänderung dieser Mediumbestandteile, sondern in der Hinzugabe eines neuen, unbekanntes Faktors, der erst noch bestimmt werden muss.

Wie bereits erwähnt und auch in den Ergebnissen unserer Versuche zur Optimierung des Kulturmediums anschaulich (siehe Punkt 3.3) konnten von vielen der uns im Zuge dieser Studie zur Verfügung stehenden triple negativen Originaltumor-Gewebeproben aber durchaus erfolgreich Organoidkulturen angelegt werden. Das Problem war die langfristige Kultivierung dieser Organoide, was nach unserer Definition zu einer geringen Erfolgsrate bei der Etablierung dieser Modelle führte (siehe Punkt 4.2.3.5). Jedoch stellt sich hier auch die Frage nach der Sinnhaftigkeit der langfristigen Kultivierung patientenabgeleiteter Organoidmodelle. Die Gründe dafür sollen im folgenden Kapitel betrachtet werden.

## 4.4 Konservierung der Tumormerkmale in Mammakarzinom-Organoidmodellen

### 4.4.1 Vergleich der Organoidmodelle mit dem ursprünglichen Tumor

Ziel dieses Versuchs war es, herauszufinden, ob die Organoidmodelle einige wichtige Merkmale ihrer Originaltumoren auch über einen längeren Kulturzeitraum und mehrere Passagen beibehalten würden. Wie unter Punkt 2.5 beschrieben, wurden daher für die Durchführung dieses Versuchs zehn bereits etablierte Organoidmodelle mit möglichst verschiedenen Patient\*innen- und Tumoreigenschaften ausgewählt. Die Organoidmodelle waren also mindestens bis zur dritten Einfrierung von Zellmaterial erfolgreich kultiviert worden. Da allerdings nicht unbedingt bei jeder Passagierung genug Material zum Einfrieren vorhanden war, waren manche der Modelle bereits deutlich häufiger als dreimal passagiert worden. Es wurden solche Modelle ausgewählt, die auch nach der Etablierung noch ein ausreichendes Wachstum zeigten, um genug größenadäquate Organoide für den beschriebenen Versuch zu liefern. Die ausgewählten Modelle wurden dann, nachdem ihre Organoide zu einer mittleren Größe herangewachsen waren, zur Anfertigung von Paraffinschnitten geerntet. Es wurde nicht zu lange gewartet, um die strukturelle Integrität der Organoide zu bewahren und eine Konfluenz der Organoide oder eine Auflösung zu groß gewachsener Organoide zu vermeiden. Anschließend wurden die gewonnenen Schnitte zur HE- und immunhistochemischen Färbung in die Pathologie geschickt. Angefärbt wurden der Östrogen- und Progesteronrezeptor, der Wachstumsfaktorrezeptor Her2/neu und das Ki-67-Antigen. Anschließend wurden die Organoidschnitte mikroskopisch mit den gefärbten Schnitten der Originaltumoren verglichen.

Wie unter Punkt 3.4 beschrieben und in Abbildung 34 bis 36 veranschaulicht, stellte sich in der immunhistochemischen Färbung keines der zehn Organoidmodelle ER-, PR- oder Her2/neu-positiv dar, ungeachtet des Rezeptorstatus des entsprechenden Originaltumors. Lediglich die Färbung des Proliferationsmarkers Ki-67 zeigte innerhalb der Organoide positive Ergebnisse, deren Ausprägung augenscheinlich in etwa der Ausprägung in den Originaltumor-Schnitten entsprach.

### 4.4.2 Versuch zur Wirkung von Nutlin-3a auf das Wachstum etablierter Organoidmodelle

Mit Hilfe dieses Versuchs sollte neben der immunhistochemischen Bestimmung einiger wichtiger Tumormerkmale ein weiteres Merkmal der Mammakarzinom-Organoidmodelle untersucht werden, nämlich funktionshemmende Mutationen im Tumorsuppressorgen TP53. Es handelt sich dabei um das am häufigsten mutierte Gen bei menschlichen Krebserkrankungen. Sein Genprodukt p53 wird durch eine Vielzahl intra- und extrazellulärer Stresssignale aktiviert wie DNA-Schädigungen, Aktivierung von Onkogenen, Hypoxie oder Änderungen der Sauerstoffradikal-Level. Durch Akkumulation im Zellinneren wirkt es dann als Transkriptionsfaktor, dessen Target-Gen-Produkte in eine Vielzahl wichtiger zellulärer Prozesse wie Apoptose, Zell-Zyklus-Stop, Seneszenz, DNA-Reparatur, anti-oxidative Funktionen und metabolische Regulationen involviert sind. Da p53 so das Genom stabilisiert und maligne Entartungen von Zellen verhindern kann, wird es häufig als „Wächter des Genoms“ bezeichnet. Über 50% menschlicher Malignome weisen Mutationen des TP53-Gens auf (Yue et al., 2017).

Mit Mutationen in 30-35% aller Fälle stellt TP53 auch bei Mammakarzinomen das am häufigsten mutierte Gen dar, an triple negativen Brustkrebserkrankungen beträgt der Anteil TP53-mutierter Tumore sogar 80% (Duffy et al. 2018). Im Allgemeinen kommen TP53-Mutationen häufiger bei ER-negativem Brustkrebs wie triple negativen Karzinomen oder bestimmten Her2/neu-positiven Subtypen vor als bei ER-positiven Mammakarzinomen (Sporikova et al., 2018). Das primäre Resultat dieser TP53-Mutationen in Krebszellen ist ein Verlust der Funktionen von Wildtyp-p53, was den Tumorzellen einen enormen Vorteil in der Krebsentwicklung verschafft, da sie intrinsische Mechanismen der Tumorsuppression wie Seneszenz und Apoptose verlieren (Mantovani et al., 2019).

MDM2 (Mouse Double Minute 2 Homolog) ist ein primärer zellulärer Inhibitor von p53. Es inhibiert die Funktionen von p53 durch verschiedene Mechanismen, welche jedoch alle durch die direkte Interaktion der beiden Faktoren ausgelöst werden (Wang et al., 2017). Nutline sind Imidazolderivate, die wiederum die p53-MDM2-Interaktion in Zellen, die Wildtyp-p53 besitzen, unterbinden und damit p53 stabilisieren, was auf die betroffenen Zellen eine teilungshemmende Wirkung hat (Zhu et al., 2019). Daher wurde Nutlin-3a auch im Rahmen der bereits erwähnten Studie von Dekkers et al. verwendet, um Organoidmodelle mit nicht funktionalem p53 zu

selektionieren. Die Organoidkulturen wurden hierfür mit einer Konzentration von 5  $\mu$ M Nutlin-3a behandelt (Dekkers et al., 2020).

Wir selbst nutzten diesen Faktor in derselben Konzentration, um herauszufinden, welche Organoidkulturen noch funktionales Wildtyp-p53 besäßen. Da das kodierende Gen in 30-35% der Fälle des malignen Mammakarzinoms mutiert ist (siehe oben) gingen wir davon aus, ein paar Organoidmodelle identifizieren zu können, bei denen eine solche Mutation vorläge, die die Funktion des Proteins beeinträchtigen und die Organoide resistent gegen die Behandlung mit Nutlin-3a machen würde.

Zu diesem Zweck testeten wir, wie unter Punkt 2.6 beschrieben, die Wirkung von Nutlin-3a auf elf verschiedene Brustkrebs-Organoidmodelle. Als Kontrolle diente ein Organoidmodell aus Mamma-Normalgewebe, da wir bei diesem davon ausgehen konnten, dass es funktionales Wildtyp-p53 besäße. In Teil 1 des Versuchs wurde die Wirkung von Nutlin-3a auf dieses Organoidmodell aus Normalgewebe mit seiner Wirkung auf das Tumor-Organoidmodell Nr.13 verglichen. Dieses Modell wurde ausgewählt, da es wie unter Punkt 3.2.3.2 erwähnt das mit Abstand ergiebigste und längstanhaltende Wachstum aller unserer Organoidmodelle zeigte und uns daher vermuten ließ, dass es eventuell eine Mutation im TP53-Gen aufweisen könnte, die zu diesem Phänomen beitrug. Im zweiten Teil des Versuchs wurde dann die Wirkung von Nutlin-3a auf das Wachstum zehn weiterer bereits etablierter Mammakarzinom-Organoidmodelle getestet. Die ausgewählten Modelle stimmten größtenteils mit denjenigen überein, welche für den oben beschriebenen Vergleich der Organoidmodelle mit den jeweiligen Originaltumoren verwendet wurden (siehe Punkt 2.6.1).

Wie unter Punkt 3.5 dargestellt, konnten wir jedoch kein Organoidmodell identifizieren, welches der Behandlung mit Nutlin-3a gegenüber resistent war. Zwar schienen manche Organoide des Modells Nr.13 trotz Nutlin-Behandlung noch ein wenn auch deutlich reduziertes Wachstum zu zeigen, was auf einige Zellen mit TP53-Mutationen in dieser Kultur hindeutete, andere bereits nach Passagierung vorhandene Organoide zerfielen dagegen unter der Behandlung mit Nutlin-3a und alle weiteren getesteten Modelle zeigten unter der Behandlung augenscheinlich überhaupt kein Organoidwachstum (siehe Abbildung 37 und 38). Natürlich könnte es sein, dass mit elf Tumor-Organoidmodellen unsere Stichprobe einfach zu gering war, jedoch hätten sich unter den elf getesteten statistisch gesehen etwa drei Nutlin-

resistente Modelle befinden müssen. Leider wurde auf Grund des ohnehin meist schlechten Organoidwachstums kein triple negatives Modell in den Versuch integriert, was bei der größeren Häufigkeit von TP53-Mutationen innerhalb dieses Tumorsubtyps gegebenenfalls die Chance auf die Identifikation eines Nutlin-resistenten und damit TP53-mutierten Organoidmodells erhöht hätte.

### 4.4.3 Mögliche Gründe für die Resultate

Zunächst soll betrachtet werden, wie der Vergleich der Organoidmerkmale mit den zugehörigen Originaltumoren bei einigen unserer Vorgängerstudien mit vergleichbarer Zielsetzung und Studienaufbau ausfiel. Als Sachs et al. die erste Mamma(karzinom)-Organoidbank schufen, untersuchten sie ebenfalls, inwiefern die Organoidmodelle die Eigenschaften ihrer Originaltumoren beibehalten würden. Die Autoren verglichen hierfür den histopathologischen Typus, den immunhistochemischen Hormonrezeptor- und Her2/neu-Status und genetische Kopienzahlvariationen, Mutationslast, Mutationsmuster und somatische Mutationen in bestimmten Brustkrebs-Driver-Genen. Sie kamen dabei zu dem Schluss, dass die Organoide die mutationalen Merkmale der Originaltumoren durchaus abzubilden vermochten, auch bei der histopathologischen Typisierung und immunhistochemischen Markern sahen sie eine gute Übereinstimmung. Organoide von Her2/neu-positiven Mammakarzinomen waren dabei in 80% der Fälle ebenfalls positiv und Organoide von Her2/neu-negativen Mammakarzinomen in 90% der Fälle ebenfalls negativ. Auch ein ER- oder PR-negativer Rezeptorstatus wurde in 90% der Fälle beibehalten. Etwas geringer fiel dagegen mit 75% die Konservierungsrate eines ER- oder PR-positiven Rezeptorstatus aus. Wie Sachs et al. vor ihnen nahmen auch Mazzucchelli et al. einen histopathologischen Vergleich der im Rahmen ihrer Studie gezüchteten Mammakarzinom-Organoidmodelle mit den entsprechenden Originaltumoren vor, indem sie Schnitte der beiden jeweils mit Hilfe der HE-Färbung und immunhistochemischen Färbemethoden für die Hormonrezeptoren, Her2/neu, Ki-67 und E-Cadherin aufarbeiteten. Die Autoren dieser Studie sprachen hierbei ebenfalls von einer guten Übereinstimmung. Leider ließen beide Veröffentlichungen unerwähnt, nach wie langer Zeit in Kultur bzw. wie vielen Passagierungen der Organoidkulturen diese Versuche durchgeführt wurden, nur in Bezug auf die Kopienzahlvariationen erwähnten Sachs et al., dass diese auch nach „mehrmaliger Passagierung“ der Organoide beibehalten worden seien. Es bleibt also unklar, ob die

Vergleiche der Organoidmodelle mit den Originaltumoren an Hand früher Passagen durchgeführt wurden oder ob es sich, wie im Zuge der vorliegenden Studie, um bereits mindestens 3x, meist aber deutlich häufiger, passagierte Organoidkulturen handelte.

In der Mammakarzinom-Organoidstudie von Campaner et al. zeigten sich dagegen einige deutliche Unterschiede zwischen den Originaltumoren und den daraus abgeleiteten Organoidmodellen. Die Autoren verglichen zunächst Schnitte der Originaltumoren mit den dazugehörigen Organoid-Schnitten, indem sie beide mittels immunhistochemischer Marker gegen Cytokeratin 19 (um die epitheliale Natur der Organoide zu überprüfen), ER, PR und Her2/neu anfärbten. Von den 17 im Rahmen der Studie erfolgreich kultivierten Brustkrebs-Organoidmodellen stimmten acht in allen vier Merkmalen mit den Originaltumoren überein, vier wiesen Unterschiede auf und die fünf übrigen konnten auf Grund von technischen Problemen nicht evaluiert werden. In der CK19- und Her2/neu-Expression stimmten die Paare weitgehend überein, jedoch stellte sich das Organoidmodell eines Her2/neu-positiven Karzinoms als Her2/neu-negativ heraus. Die Autoren vermuteten als Grund hierfür die Herausselektionierung einer Her2/neu-negativen Zell-Subpopulation des Originaltumors. Was die Expression der Hormonrezeptoren anging, so war diese selbst in ER- oder PR-positiven Organoidmodellen deutlich reduziert gegenüber den Originaltumoren (80-98% positiver Zellen in den Originaltumoren vs. 5-60% in den Organoidkulturen). Die genomische Analyse zeigte zwar eine Konsistenz in den Mutationsspektren und Kopienzahlvariationen zwischen Originaltumoren und deren Organoidmodellen, jedoch auch eine durchschnittlich deutlich geringere Mutationslast unter den Organoidmodellen im Vergleich zu den Originaltumoren; nur bei 3 von 5 Paaren wurden über 40% der somatischen Mutationen beibehalten. Außerdem gab es zwischen den Originaltumoren und ihren Organoidmodellen teilweise Unterschiede in zentralen Mammakarzinom-Driver-Genen. Die Autoren vermuteten daher eine Selektionierung weniger aberranter Tumorzell-Subpopulationen durch die Kulturbedingungen (Campaner et al., 2020). Passend zu diesen Ergebnissen sprachen auch Rosenbluth et al. in ihrer 2020 erschienen Veröffentlichung davon, dass sich ER-positive Zellen als schwierig in Organoidkulturen zu konservieren erwiesen hätten. Ihre aus Mamma-Normalgewebe stammenden Organoidkulturen zeigten einen durchschnittlich 10-prozentigen Anteil ER-positiver Zellen und eine „generell niedrige“ Expression des



Progesteronrezeptors. Der scheinbar mehrfach beobachtete Rückgang von ER-Positivität unter den für Mamma(karzinom)-Organoiden etablierten Kulturbedingungen könnte möglicherweise mit einer Selektionierung von basal-like Zellen zusammenhängen, wie sie mehrere unserer Vorgänger während ihrer Mamma(karzinom)-Organoidstudien beobachten konnten (Campaner et al., 2020 und Goldhammer et al., 2020).

Goldhammer et al. verwendeten darüber hinaus in ihrer Mammakarzinom-Organoidstudie eine von ihrer eigenen Arbeitsgruppe entwickelte Methodik, um mit Hilfe von Immunfluoreszenz-Färbung verschiedener Zellpolaritäts-assoziiierter Marker maligne und nicht maligne Strukturen innerhalb von Mammakarzinom-Organoidkulturen voneinander zu unterscheiden. Dadurch konnten sie zeigen, dass sich zu Beginn der Kulturperiode in ihren fünf untersuchten Organoidkulturen lediglich unter 10% nicht-maligner Zellen befanden, der Rest der Zellen zeigte ein malignes Profil. Nach zwei bis vier Wochen in Kultur hatte sich dieses Verhältnis quasi umgekehrt. In der Gesamt-Genom-Sequenzierung von drei Organoidmodellen in Passage 3 bis 4 und ihren entsprechenden Originaltumoren ergaben sich ähnliche Resultate wie in der Studie von Campaner et al. (siehe oben): Die Autoren beobachteten einen Drift mit Verlust genetischer Aberrationen unter den Organoid-Kulturbedingungen. Wegen dieser von ihnen beobachteten Selektionierung residueller normaler Zellen und Zellen des basal-like Phänotyps plädierten die Autoren dafür, nur primäre Organoidkulturen direkt nach dem initialen Ansatz für eventuelle Medikamententests zu nutzen, da nur diese den Originaltumor akkurat abzubilden vermochten. Die Autoren kritisierten außerdem, dass die Hinzunahme des Faktors Neuregulin1 zum Mamma(karzinom)-Organoid-Kulturmedium, den Sachs et al. als ihre wichtigste Neuerung ansahen (Sachs et al., 2018), wohl nicht dazu beitrage, dass das Nährmedium spezifischer auf die Bedürfnisse maligner Mammakarzinomzellen zugeschnitten werde, da Neuregulin1 im Gegenteil das Wachstum normaler Mamma-Organoide fördere (Goldhammer et al., 2020).

Anhand dieser Erkenntnisse scheint es durchaus plausibel, dass die schlechte Übereinstimmung der untersuchten Merkmale der bereits mehrfach passagierten Organoidmodelle mit den Originaltumoren bzw. unseren Erwartungen auf einem intrakulturellen Drift mit Selektionierung von normalen und basal-like Zellen auf Grund der Kulturbedingungen beruhte und dass ein Vergleich früherer Passagen der Kulturen mit den Originaltumoren eventuell andere Ergebnisse gebracht hätte.

### 4.4.4 Ausblick

Wegen der zahlreichen Vorteile des Organoidmodells gegenüber anderen Mammakarzinom-Kulturmodellen (siehe Punkt 1.2.3) stellt es einen derzeit viel beforschten Hoffnungsträger für die Findung weiterer personalisierter Therapieansätze dieses diversen Krankheitsbildes dar. Allerdings ist es wichtig, anzuerkennen, dass auf diesem Gebiet noch viel weitere Forschung notwendig ist, da die Prozesse, welche die Organoidentwicklung beeinflussen, bei Weitem noch nicht ausreichend verstanden sind (Huch et al., 2017). Durch den Vergleich der verschiedenen Veröffentlichungen, die sich innerhalb der letzten Jahre mit der Kultivierung von Mammakarzinom-Organoiden auseinandergesetzt haben, wird außerdem klar, dass es bei vielen ihrer Ergebnisse noch an Reproduzierbarkeit mangelt. Dies hängt sicherlich damit zusammen, dass bis jetzt ein einheitliches methodisches Standardprotokoll fehlt, welches die Erfahrungen dieser verschiedenen Arbeitsgruppen, die in den letzten Jahren an der Etablierung von Mammakarzinom-Organoidmodellen gearbeitet haben, einfließen lässt und miteinander verknüpft (Yang et al., 2020). Dabei wäre jedoch auch wichtig, angesichts der großen Heterogenität der Organoidmodelle auf die individuellen Bedürfnisse verschiedener Kulturen einzugehen (Campaner et al., 2020). Des Weiteren sprechen Ergebnisse früherer Arbeiten (siehe Punkt 4.4.3) und auch unsere eigenen Erkenntnisse im Zuge der vorliegenden Studie dafür, dass es sinnvoll wäre, unter den aktuell etablierten Kulturbedingungen nur Originalansätze bzw. frühe Passagen der Organoidmodelle für etwaige Wirkstoff- oder Medikamententests zu benutzen, um einer Verfälschung der Ergebnisse durch einen geno- und phänotypischen Drift der Kulturen vorzubeugen. Auch sollte die Zusammensetzung des Kulturmediums besser definiert und noch spezieller auf die Bedürfnisse maligner Mammakarzinomzellen verschiedener Subtypen abgestimmt werden, um einem etwaigen Selektionsdruck innerhalb der Kulturen entgegenzutreten (Huch et al., 2017 und Campaner et al., 2020). Des Weiteren fordern einige Publikationen, die schlecht definierten 3D-Matrizes wie Matrigel und BME gegen eine stromale Komponente zu ersetzen, die das Mikroenvironment von Mammakarzinomen besser abzubilden und wichtige tumorspezifische Nischenfaktoren zu liefern vermag (Huch et al., 2017 und Campaner et al., 2020). Weitere Ideen, um das Konzept des Mammakarzinom-Organoidmodells voranzubringen, sind eine Schaffung von Organoidkulturen aus einzelnen Tumorzell-

Subpopulationen, um die intratumorale Heterogenität besser abbilden zu können und die Kreation von Organoidmodellen metastatischer Läsionen, um auch weiter fortgeschrittene Erkrankungen und deren Bekämpfungsmöglichkeiten erforschen zu können (Campaner et al., 2020). Der Weg zu einer wirklich personalisierten Behandlung des komplexen Krankheitsbildes des humanen Brustkrebs mit Hilfe der Organoidtechnologie ist daher wohl noch lang, doch wo für die Patient\*innen solch hohe und wichtige Gewinne winken lohnt es sich mit Sicherheit, diesen auch zu beschreiten (Huch et al., 2017).

### 5 Zusammenfassung

Die Organoidtechnologie birgt viele Vorteile gegenüber anderen Mammakarzinom-Kulturmodellen und stellt einen viel beforschten Hoffnungsträger für die personalisierte Therapie dieser vielseitigen Krankheitsentität dar.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte eine patientenabgeleitete Tumorzellbank mit für die Anzucht in dreidimensionalen Organoidkulturen geeigneten Proben 178 verschiedener Mammakarzinome geschaffen werden. Diese Tumorzellbank repräsentiert die Verhältnisse in der Gesamtheit der Brustkrebsfälle in der Allgemeinbevölkerung hinsichtlich vieler wichtiger Patienten- und Tumormerkmale und vermag es, die Vielfalt dieses komplexen Krankheitsbildes abzubilden.

Die Erfolgsrate bei der Langzeit-Etablierung unserer Organoidmodelle betrug in etwa 50%. Wir betrachteten mehrere mögliche Einflussfaktoren auf den Etablierungserfolg und kamen zu dem Schluss, dass Merkmale des Originaltumors, welche mit einem aggressiveren Phänotyp assoziiert sind, in der Regel mit einer geringeren Erfolgsquote bei der Etablierung der entsprechenden Organoidmodelle einhergingen. Besonders auffällig war diese Korrelation für den immunhistochemisch triple negativen Rezeptorstatus. Daher starteten wir einen Versuch zur Optimierung des Organoid-Kulturmediums für Organoidmodelle von Karzinomen mit dieser Eigenschaft. Wir gingen dabei von einer Beeinträchtigung des Wachstums dieser Organoidkulturen durch bestimmte Mediumfaktoren auf Grund bei diesem Tumorsubtyp häufig vorhandener Mutationen in einigen intrazellulären Signalkaskaden, welche wichtige Aspekte des Tumorwachstums regulieren, aus. Leider zeigten diese Modifikationen des Mamma(karzinom)-Organoid-Nährmediums im Rahmen der vorliegenden Studie nicht den gewünschten Erfolg, da sie das Wachstum von Organoidkulturen triple negativer Mammakarzinome nicht zu verbessern vermochten. Unser Ansatz birgt jedoch noch viel weiteres Forschungspotenzial.

Da eine Beibehaltung wichtiger Merkmale der Originaltumoren für einen lohnenden Einsatz von Mammakarzinom-Organoidmodellen in der Erforschung dieser Erkrankung und für die Findung potenzieller personalisierter Therapieansätze essenziell ist, überprüften wir diesen Aspekt mit Hilfe immunhistochemischer Methoden und einer Methodik zur Feststellung des TP53-Mutationsstatus; des am häufigsten mutierten Gens in humanem Brustkrebs. Leider stimmten die meisten der

## **Zusammenfassung**

von uns untersuchten Merkmale der Organoidmodelle nach mehrmaliger Passagierung nicht mit den Merkmalen der Originaltumoren überein. Wir vermuten als Ursache hierfür einen geno- und phänotypischen Drift innerhalb der Organoidkulturen mit Selektionierung residueller normaler, genetisch weniger aberranter Zellen, wie er bereits in vorherigen Studien zur Etablierung von Mammakarzinom-Organoidmodellen beobachtet werden konnte.

Bevor das Organoidmodell also in Zukunft die Grundlage für eine wahrhaft personalisierte Therapie des humanen Brustkrebs bieten kann, müssen die aktuell angewandten Kulturbedingungen und insbesondere die Zusammensetzung des Mamma(karzinom)-Organoid-Kulturmediums noch spezifischer auf die Bedürfnisse maligner Mammakarzinomzellen abgestimmt und außerdem vereinheitlicht werden.

## 6 Literaturverzeichnis

ANDERS, C. K., HSU, D. S., BROADWATER, G. 2008. Young age at diagnosis correlates with worse prognosis and defines a subset of breast cancers with shared patterns of gene expression. *J Clin Oncol*, 26, 3324–3330.

AMIN, M. B., EDGE, S., GREENE, F., BYRD, D. R., BROOKLAND, R. K., WASHINGTON, M. K., GERSHENWALD, J. E., COMPTON, C. C., HESS, K. R., SULLIVAN, D. C., JESSUP, J. M., BRIERLEY, J. D., GASPARI, L. E., SCHILSKY, R. L., BALCH, C. M., WINCHESTER, D. P., ASARE, E. A., MADERA, M., GRESS, D. M., MEYER, L. R. (Eds.): AJCC cancer staging manual, 8<sup>th</sup> edition. Springer, New York, 2017.

BARKER, N., VAN ES, J. H., KUIPERS, J., KUJALA, P., VAN DEN BORN, M., COZIJNSEN, M., HAEGEBARTH, A., KORVING, J., BEGTHEL, H., PETERS, P. J., CLEVERS, H., 2007. Identification of stem cells in small intestine and colon by marker gene *Lgr5*. *Nature*, 449, 1003–1007.

BARNES, B., BUTTMANN-SCHWEIGER, N., DAHM, S., FIEBIG, J., FRANKE, M., GURUNG-SCHÖNFELD, I., HABERLAND, J., KRAYWINKEL, K., WIENECKE, A.: Krebs in Deutschland für 2015/2016. 12. Ausgabe. Robert Koch-Institut (Hrsg.) und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (Hrsg.), Berlin, 2019. 78-81.

BARTFELD, S., CLEVERS, H., 2017. Stem cell-derived organoids and their application for medical research and patient treatment. *J Mol Med*, 95, 729-738.

BLÁSQUEZ-MEDELA, A., JUMABAY, M., BOSTRÖM, K., 2019. Beyond the bone: Bone morphogenetic protein signaling in adipose tissue. *Obes Rev*, 20(5), 648-658.

BRAY, F., FERLAY, J., SOERJOMATARAM, I., SIEGEL, R., TORRE, L. A., JEMAL, A., 2018. Global Cancer Statistics 2018: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin*, 68, 394–424.

BRIERLEY, J. D., GOSPODAROWICZ, M. K., WITTEKIND, C. (Eds.): TNM classification of malignant tumours, 8<sup>th</sup> edition. Wiley Blackwell, Oxford, 2017.

BRINTON, L. A., GAUDET, M. M., GIERACH, G. L. Breast Cancer. In: THUN, M. J., LINET, M. S., CERHAN, J. R., HAIMAN, C. A., SCHOTTENFELD, D. (Hrsg.) Cancer Epidemiology and Prevention, 4<sup>th</sup> Edition. Oxford University Press, New York, 2018, 861-888.

BRYAN, S., MASOUD, H., WEIR, H. K., WOODS, R., LOCKWOOD, G., SMITH, L., BRIERLEY, J., GOSPODAROWICZ, M., BADETS, N., 2018. Cancer in Canada: Stage at diagnosis. *Health Rep*, 29(12), 21-25.

BURSTEIN, M. D., TSIMELZON, A., POAGE, G. M., COVINGTON, K. R., CONTRERAS, A., FUQUA, S. A. W., SAVAGE, M. I., KENT OSBORNE, C., HILSENBECK, S. G., CHANG, J. C., MILLS, G. B., LAU, C. C., BROWN, P. H.,

2014. Comprehensive genomic analysis identifies novel subtypes and targets of triple-negative breast cancer. *Clin Cancer Res*, 21(7), 1688-1698.

CAMP, J. G., BADSHA, F., FLORIO, M., KANTON, S., GERBER, T., WILSCH-BRÄUNINGER, M., LEWITUS, E., SYKES, A., HEVERS, W., LANCASTER, M., KNOBLICH, J.A., LACHMANN, R., PÄÄBO, S., HUTTNER, W. B., TREUTLEIN, B., 2015. Human cerebral organoids recapitulate gene expression programs of fetal neocortex development. *Proc Natl Acad Sci USA*, 112, 15672–15677.

CAMPANER, E., ZANNINI, A., SNTORSOLA, M., BONAZZA, D., BOTTIN, C., CANCELILA, V., TRIPODO, C., BORTUL, M., ZANCONATI, F., SCHOEFER, S., DEL SAL, G., 2020. Breast Cancer Organoids Model Patient-Specific Response to Drug Treatment, *Cancers*, 12(12), 3869.

CAMPBELL, J. J., DAVIDENKO, N., CAFFAREL, M. M., CAMERON, R. E., WATSON, C. J., 2011. A multifunctional 3D co-culture system for studies of mammary tissue morphogenesis and stem cell biology. *PLoS One*, 6(9), e25661.

CHIA, S., NORRIS, B., SPEERS, C., CHEANG, M., GILKS, B., GOWN, A. M., HUNTSMAN, D., OLIVOTTO, I. A., NIELSEN, T. O., GELMON, K., 2008. Human epidermal growth factor receptor 2 overexpression as a prognostic factor in a large tissue microarray series of node-negative breast cancers. *J Clin Oncol*, 26, 5697-5704.

CLARKE, R., TYSON, J. J., DIXON, J. M., 2015. Endocrine resistance in breast cancer – An overview and update. *Mol Cell Endocrinol*, 418, 220–234.

CLEVERS, H., LOH, K. M., NUSSE, R., 2014. Stem cell signaling. An integral program for tissue renewal and regeneration: Wnt signaling and stem cell control. *Science*, 346, 1248012.

CLEVERS, H., 2016. Modeling Development and Disease with Organoids. *Cell*, 165, 1586-1597.

COATES, A. S., WINER E. P., GOLDBIRSCHE A., GELBER, R. D., GNANT, M., PICCART-GEBHART, M., THÜRLIMANN, B., SENN, H.-J., PANEL MEMBERS. 2015. Tailoring therapies – Improving the management of early breast cancer: St. Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2015. *Ann Oncol*, 26, 1533-1546.

COLDITZ, G. A., ROSNER, B., 2000. Cumulative risk of breast cancer to age 70 years according to risk factor status: data from the Nurses' Health Study. *Am J Epidemiol*, 152(10), 950-964.

COLZANI, E., JOHANSSON, A. L., LILJEGREN, A., FOUKAKIS, T., CLEMENTS, M., ADOLFSSON, J., HALL, P., CZENE, K., 2014. Time-dependent risk of developing distant metastasis in breast cancer patients according to treatment, age and tumour characteristics. *Br J Cancer*, 110, 1378–1384.

CONBOY, C. B., VÉLEZ-REYES, G. L., RATHE, S. K., ABRAHANTE, J. E., TEMIZ, N. A., BURNS, M. B., HARRIS, R. S., STARR, T. K., LARGAESPADA, D. A., 2021.

R-Spondins 2 and 3 Are Overexpressed in a Subset of Human Colon and Breast Cancers. *DNA Cell Biol*, 40(1), 70-79.

CÒRRO, C., NOVELLASDEMUNT, L., LI, V. S. W., 2020. A brief history of organoids. *Am J Physiol Cell Physiol*, 319, C151-C165.

COUSSY, F., LALLEMAND, F., VACHER, S., SCHNITZLER, A., CHEMLALI, W., CALY, M., NICOLAS, A., RICHON, S., MESEURE, D., EL BOTTY, R., DE-PLATER, L., FUHRMANN, L., DUBOIS, T., ROMAN-ROMAN, S., DANGLES-MARIE, V., MARANGONI, E., BIÈCHE, I., 2017. Clinical value of R-spondins in triple-negative and metaplastic breast cancers. *Br J Cancer*, 116(12), 1595-1603.

DEGENHARDT, T., BRAUN, M., EBNER, F., Ettl, J., HARBECK, N., HESTER, A.: Prognostische und prädiktive Faktoren. In: BAUERFEIND, I. (Hrsg.), DI GOIA, D., HARBECK, N., PIGORSCH, S., SALAT, C. (Eds.) MANUAL Mammakarzinome – Empfehlungen zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge. Zuckschwerdt Verlag GmbH, München, 2019, 137-158.

DEKKERS, J. F., WHITTLE, J. R., VAILLANT, F., CHEN, H.-R., DAWSON, C., LIU, K., GEURTS, M. H., HEROLD, M. J., CLEVERS, H., LINDEMAN, G. J., VISVADER, J. E., 2020. Modeling Breast Cancer Using CRISPR-Cas9–Mediated Engineering of Human Breast Organoids. *J Natl Cancer Inst*, 112(5), 540-544.

DE LAU, W., BARKER, N., LOW, T. Y., KOO, B.-K., LI, V. S. W., TEUNISSEN, H., KUJALA, P., HAEGEBARTH, A., PETERS, P. J., VAN DE WETERING, M., STANGE, D.E., VAN ES, J., GURADAVACCARO, D., SCHASFOORT, R. B. M., MOHRI, Y., NISHIMORI, K., MOHAMMED, S., HECK, A. R. J., CLEVERS, H., 2011. Lgr5 homologues associate with Wnt receptors and mediate R-spondin signalling. *Nature*, 476, 293-297.

DE ROSE, Y. S., WANG, G., LIN, Y.-C., BERNARD, P. S., BUYS, S. S., EBBERT, M. T. W., FACTOR, R., MATSEN, C., MILASH, B. A., NELSON, E., NEUMAYER, L., RANDALL, R. L., STIJLEMAN, I. J., WELM, B. E., WELM, A. L., 2011. Tumor grafts derived from women with breast cancer authentically reflect tumor pathology, growth, metastasis and disease outcomes. *Nat Med*, 17(11), 1514-1520.

DE ROSE, Y. S., GLIGORICH, K. M., WANG, G., GEORGELAS, A., BOWMAN, P., COURDY, S. J., WELM, A. L., WELM, B. E., 2013. Patient-derived Models of Human Breast Cancer: Protocols for In vitro and In vivo Applications in Tumor Biology and Translational Medicine. *Curr Protoc Pharmacol*, 2013 Mar, Chapter 14, Unit14.23.

DI, L., LIU, L.-J., YAN, Y.-M., FU, R., LI, X., XU, Y., CHENG, Y.-X., WU, Z.-Q., 2019. Discovery of a natural small-molecule compound that suppresses tumor EMT, stemness and metastasis by inhibiting TGFβ/BMP signaling in triple-negative breast cancer. *J Exp Clin Cancer Res*, 38(1), 134.

DITSCH, N., HIMSL, I., MAURER, S., PLATTNER, B., WOLF, C., ZEDER-GÖß, C.: Mammakarzinom-Prävention. In: BAUERFEIND, I. (Hrsg.), DI GOIA, D., HARBECK, N., PIGORSCH, S., SALAT, C. (Eds.) MANUAL Mammakarzinome – Empfehlungen zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge. Zuckschwerdt Verlag GmbH, München, 2019, 16-39.



DOWSETT, M., CUZICK, J., INGLE, J., COATES, A., FORBES, J., BLISS, J., BUYSE, M., BAUM, M., BUZDAR, A., COLLEONI, M., COOMBES, C., SNOWDON, C., GNANT, M., JAKESZ, R., KAUFMANN, M., BOCCARDO, F., GODWIN, J., DAVIES, C., PETO, R., 2010. Meta-analysis of breast cancer outcomes in adjuvant trials of aromatase inhibitors versus tamoxifen. *J Clin Oncol*, 28, 509–518.

DOWSETT, M., NIELSEN, T. O., A'HERN, R., BARTLETT, J., COOMBES, R. C., CUZICK, J., ELLIS, M., HENRY, N. L., HUGH, J. C., LIVELY, T., MCSHANE, L., PAIK, S., PENAULT-LLORCA, F., PRUDKIN, L., REGAN, M., SALTER, J., SOTIRIOU, C., SMITH, I. E., VIALE, G., ZUJEWSKI, J. A., HAYES, D. F., INTERNATIONAL KI-67 IN BREAST CANCER WORKING GROUP. 2011. Assessment of Ki67 in breast cancer: recommendations from International Ki67 in Breast Cancer working group. *J Natl Cancer Inst*, 103, 1656-1664.

DROST, J., CLEVERS, H., 2017. Translational applications of adult stem cell-derived organoids. *Development*, 144(6), 968-975.

DROST, J., CLEVERS, H., 2018. Organoids in cancer research. *Nat Rev Cancer*, 18(7), 407-418.

DUARTE, A. A., GOGOLA, E., SACHS, N., BARAZAS, M., ANNUNZIATO, S., DE RUITER, J. R., VELDS, A., BLATTER, S., HOUTHUIJZEN, J. M., VAN DE VEN, M., CLEVERS, H., BORST, P., JONKERS, J., ROTTENBERG, S., 2018. BRCA-deficient mouse mammary tumor organoids to study cancer-drug resistance. *Nat Methods*, 15(2), 134-140.

DUFFY, M. J., SYNNOTT, N. C., CROWN, J., 2018. Mutant p53 in breast cancer: potential as a therapeutic target and biomarker. *Breast Cancer Res Treat*, 170(2), 213-219.

ELSTON, C. W., ELLIS, I. O. 1991. Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up. *Histopathology*, 19(5), 403-410.

FAN, L., STRASSER-WEIPPL, K., LI, J.-J., ST LOUIS, J., FINKELSTEIN, D. M., YU, K.-D., CHEN, W.-Q., SHAO, Z.-M., GOSS, P. E., 2014. Breast Cancer in China. *Lancet Oncol*, 15(7), e279-289.

FISHER, B., REDMOND, C., FISHER, E. R., CAPLAN, R., 1988. Relative worth of estrogen or progesterone receptor and pathologic characteristics of differentiation as indicators of prognosis in node negative breast cancer patients: findings from National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project Protocol B-06. *J Clin Oncol*, 6, 1076-1087.

FISHER, B., ANDERSON, S., BRYANT, J., MARGOLESE, R. G., DEUTSCH, M., FISHER E. R., JEONG, J. H., WOLMARK, N., 2002. Twenty-year follow-up of a randomized trial comparing total mastectomy, lumpectomy, and lumpectomy plus irradiation for the treatment of invasive breast cancer. *N Engl J Med*, 347, 1233–1241.

- GARRIDO-CASTRO, A. C., LIN, N. U., POLYAK, K., 2019. Insights into molecular classifications of triple-negative breast cancer: improving patient selection for treatment. *Cancer Discov*, 9(2), 176-198.
- GERDES, J., SCHWAB, U., LEMKE, H., STEIN, H. 1983. Production of a mouse monoclonal antibody reactive with a human nuclear antigen associated with cell proliferation. *Int J Cancer*, 31, 13–20.
- GOLDHAMMER, N., KIM, J., TIMMERMANS-WIELENGA, V., PETERSEN, O. W., 2019. Characterization of organoid cultured human breast cancer. *Breast Cancer Res*, 21(1), 141.
- GOLDHIRSCH, A., WINER, E. P., COATES, A. S., GELBER, R. D., PICCART-GEHART, M., THÜRLIMANN, B., SENN, H.-J., PANEL MEMBERS, 2013. Personalizing the treatment of women with early breast cancer: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2013. *Ann Oncol*, 24(9), 2206-2223.
- HAMMOND, M. E., HAYES, D. F., WOLFF, A. C., MANGU, P. B., TEMIN, S. 2010. American Society of Clinical Oncology/College Of American Pathologists guideline recommendations for immunohistochemical testing of estrogen and progesterone receptors in breast cancer. *J Clin Oncol*, 28(16), 2784-2795.
- HANKEY, B. F. 1994. State bite age distribution of breast cancer cases. *JNCI J Natl Cancer Inst.*, 86, 1441.
- HARAMIS, A. P., BEGTHEL, H., VAN DEN BORN, M., VAN ES, J., JONKHEER, S., OFFERHAUS, G. J., CLEVERS, H., 2004. De novo crypt formation and juvenile polyposis on BMP inhibition in mouse intestine. *Science*, 303, 1684–1686.
- HE, S., LU, Y., LIU, X., HUANG, X., KELLER, E. T., QIAN, C.-N., ZHANG, J., 2015. Wnt3a: functions and implications in cancer. *Chin J Cancer*, 34(12), 554-562.
- HELLERHOFF, K., DE WAAL, J. C., DIFLIFF, C., PERLET, C.: Bildgebende und interventionelle Diagnostik. In: BAUERFEIND, I. (Hrsg.), DI GOIA, D., HARBECK, N., PIGORSCH, S., SALAT, C. (Eds.) *MANUAL Mammakarzinome – Empfehlungen zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge*. Zuckschwerdt Verlag GmbH, München, 2019, 40-82.
- HOFMANN, C., OBERMEIER, F., ARTINGER, M., HAUSMANN, M., FALK, W., SCHOELMERICH, J., ROGLER, G., GROSSMANN, J., 2007. Cell-cell contacts prevent anoikis in primary human colonic epithelial cells. *Gastroenterology*, 132, 587–600.
- HOLBRO, T., CIVENNI, G., HYNES, N. E., 2003. The ErbB receptors and their role in cancer progression. *Exp Cell Res*, 284, 99-110.
- HOWLADER, N., ALTEKRUSE, S. F., LI, C. I., CHEN, V. W., CLARKE, C. A., RIES, L. A. G., CRONIN, K. A., 2014. US Incidence of Breast Cancer Subtypes Defined by Joint Hormone Receptor and HER2 Status. *J Natl Cancer Inst*, 106(5), dju055.

HUCH, M., KNOBLICH, J. A., LUTOLF, M. P., MARTINEZ-ARIAS, A., 2017. The hope and the hype of organoid research. *Development*, 144(6), 938-941.

JUNG, P., SATO, T., MERLOS-SUÁREZ, A., BARRIGA, F. M., IGLESIAS, M., ROSSELL, D., HERBERT, A., GALLARDO, M., BLASCO, M. A., SANCHO, E., CLEVERS, H., BATLLE, E., 2011. Isolation and in vitro expansion of human colonic stem cells. *Nat. Med.* 17, 1225-1227.

KIM, H. J., HAN, W., YI, O. V., SHIN, H. C., AHN, S. K., KOH, B. S. 2011. Young age is associated with ipsilateral breast tumor recurrence after breast conserving surgery and radiation therapy in patients with HER2-positive/ER-negative subtype. *Breast Cancer Res Treat*, 130, 499–505.

KORINEK, V., BARKER, N., MOERER, P., VAN DONSELAAR, E., HULS, G., PETERS, P. J., CLEVERS, H., 1998. Depletion of epithelial stem-cell compartments in the small intestine of mice lacking Tcf-4. *Nat Genet*, 19, 379–383.

KRETZSCHMAR, K., CLEVERS, H., 2016. Organoids: Modeling Development and the Stem Cell Niche in a Dish. *Dev Cell*, 38, 590-600.

KREUTZFELDT, J., ROZEBOOM, B., DEY, N., DE, P., 2020. The trastuzumab era: current and upcoming targeted HER2+ breast cancer therapies. *Am J Cancer Res*, 10(4), 1045-1067.

KUMAR, P., AGGARWAL, R., 2016. An overview of triple-negative breast cancer. *Arch Gynecol Obstet*, 293, 247-269.

LACROIX, M., LECLERCQ, G., 2004. Relevance of breast cancer cell lines as models for breast tumours: an update. *Breast Cancer Res Treat*, 83, 249-289.

LANCASTER, M. A., RENNER, M., MARTIN, C.-A., WENZEL, D., BICKNELL, L. S., HURLES, M. E., HOMFRAY, T., PFENNINGER, J. M., JACKSON, A. P., KNOBLICH, J. A., 2013. Cerebral organoids model human brain development and microcephaly. *Nature*, 501, 373–379.

LANCASTER, L. A., KNOBLICH, J. A., 2014. Organogenesis in a dish: modeling development and disease using organoid technologies. *Science*, 345, 1247125–1247125.

LEE, G. Y., KENNY, P. A., LEE, E. H., BISSELL, M. J., Three-dimensional culture models of normal and malignant breast epithelial cells. *Nat Methods*, 4(4), 359-365.

LEHMANN, B. D., BAUER, J. A., CHEN, X., SANDERS, M. E., CHAKRAVARTHY, A. B., SHYR, Y., PIETENPOL, J. A., 2011. Identification of human triple-negative breast cancer subtypes and preclinical models for selection of targeted therapies. *J Clin Invest*, 121(7), 2750-67.

LEITLINIENPROGRAMM ONKOLOGIE (DEUTSCHE KREBSGESELLSCHAFT, DEUTSCHE KREBSHILFE, AWMF): S3-Leitlinie Früherkennung, Diagnose, Therapie und Nachsorge des Mammakarzinoms, Version 4.4, AWMF, 2021,

Registernummer: 032-045OL, <http://www.leitlinienprogramm-onkologie.de/leitlinien/mammakarzinom/> (abgerufen am: 08.12.2021)

LINNEMANN, J. R., MIURA, H., MEIXNER, L. K., IRMLER, M., KLOOS, U. J., HIRSCHI, B., BARTSCH, H. S., SASS, S., BECKERS, J., THEIS, F. J., GABKA, C., SCOTLAR, K., SCHEEL, C. H., 2015. Quantification of regenerative potential in primary human mammary epithelial cells. *Development*, 142(18), 3239-3251.

LIU, G., DAVID, B. T., TRAWCZYNSKI, M., FESSLER, R. G., 2020. Advances in Pluripotent Stem Cells: History, Mechanisms, Technologies, and Applications. *Stem Cell Rev Rep*, 16(1), 3-32.

LYONS, T. G., 2019. Targeted Therapies for Triple-Negative Breast Cancer. *Curr Treat Options in Oncol*, 20(82).

MANTOVANI, F., COLLAVIN, L., DEL SAL, G., 2018. Mutant p53 as a guardian of the cancer cell. *Cell Death Differ*, 26(2), 199-212.

MARCHIÒ, C., HORLINGS, H. M., VINCENT-SALOMON, A.: Invasive micropapillary carcinoma. In: WHO CLASSIFICATION OF TUMOURS EDITORIAL BOARD. WHO Classification of Tumours, 5<sup>th</sup> Edition – Breast Tumours. World Health Organization, 2019, 128-130.

MAYR, D., BEER, M., MEINDL, A., WÜRSTLEIN, R., SCHMOEKEL, E.: Pathologie der Mammakarzinome und der intraepithelialen Proliferationen der Mamma. In: BAUERFEIND, I. (Hrsg.), DI GOIA, D., HARBECK, N., PIGORSCH, S., SALAT, C. (Eds.) MANUAL Mammakarzinome – Empfehlungen zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge. Zuckschwerdt Verlag GmbH, München, 2019, 83-126.

MAZZUCHELLI, S., PICCOTTI, F., ALLEVI, R., TRUFFI, M., SORRENTINO, L., RUSSO, L., AGOZZINO, M., SIGNATI, L., BONIZZI, A., VILLANI, L., CORSI, F., 2019. Establishment and Morphological Characterization of Patient-Derived Organoids from Breast Cancer. *Biol Proced Online*, 2019 Jun 15, 21:12.

MERIKHIAN, P., EISAVAND, M. R., FARAHMAND, L., 2021. Triple-negative breast cancer: understanding Wnt signaling in drug resistance. *Cancer Cell Int*, 21(1), 419.

MILES, D. W., HARRIS, W. H., GILLETT, C. E., SMITH, P., BARNES, D. M., 1999. Effect of c-erbB(2) and estrogen receptor status on survival of women with primary breast cancer treated with adjuvant cyclophosphamide/ methotrexate/fluorouracil. *Int J Cancer*, 84, 354–359.

MILLS SHAW, K. R., WROBEL, C. N., BRUGGE, J. S., 2004. Use of Three-Dimensional Basement Membrane Cultures to Model Oncogene-Induced Changes in Mammary Epithelial Morphogenesis. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*, 9(4), 297-310.

MOHAMMADI-YEGANEH, S., HOSSEINI, V., PARYAN, M., 2019. Wnt pathway targeting reduces triple-negative breast cancer aggressiveness through miRNA regulation in vitro and in vivo. *J Cell Physiol*, 234(10), 18317-18328.

NAGINI, S., 2017. Breast Cancer: Current Molecular Therapeutic Targets and New Players. *Anticancer Agents Med Chem*, 17(2), 152-163.

ODLE, T. G., 2014. Adverse effects of breast cancer treatment. *Radiol Technol*, 85(3), 297M-319M.

OOTANI, A., XINGNAN, L., SANGIORGI, E., HO, Q. T., UENO, H., TODA, S., SUGIHARA, H., FUJIMOTO, K., WEISSMAN, I. L., CAPECCHI, M. R., KUO, C. J., 2009. Sustained in vitro intestinal epithelial culture within a Wnt-dependent stem cell niche. *Nat Med*, 15, 701–706.

OWENS, P., PICKUP, M. W., NOVITSKIY, S. V., GILTNANE, J. M., GORSKA, A. E., HOPKINS, C. R., HONG, C. C., MOSES, H. L., 2015. Inhibition of BMP signaling suppresses metastasis in mammary cancer. *Oncogene*, 34(19), 2437-2449.

PARISE, C. A., BAUER, K. R., CAGGIANO, V., 2010. Variation in breast cancer subtypes with age and race/ethnicity. *Crit Rev Oncol Hematol*, 76, 44-52.

PARKER, J. S., MULLINS, M., CHEANG, M. C. U., LEUNG, S., VODUC, D., VICKERY, T., DAVIES, S., FAURON, C., HE, X., HU, Z., QUACKENBUSH, J. F., STILJEMAN, I. J., PALAZZO, J., MARRON, J. S., NOBEL, A. B., MARDIS, E., NIELSEN, T. O., ELLIS, M. J., PEROU, C. M., BERNARD, P. S., 2009. Supervised risk predictor of breast cancer based on intrinsic subtypes. *J Clin Oncol*, 27(8), 1160-1167.

PARSONS, J. FRANCAVILLA, C., 2020. 'Omics Approaches to Explore the Breast Cancer Landscape. *Front Cell Dev Biol*, 7(395).

POHL, S.-G., BROOK, N., AGOSTINO, M., ARFUSO, F., KUMAR, A. P., DHARMARAJAN, A., 2017. Wnt signaling in triple-negative breast cancer. *Oncogenesis*, 6(4), e310.

RAKHA, E. A., ALLISON, K. H., ELLIS, I. O., HORI, R., MASUDA, S., PENAULT-LLORCA, F., TSUDA, H., VINCENT-SALOMON, A.: Invasive breast carcinoma: General overview. In: WHO CLASSIFICATION OF TUMOURS EDITORIAL BOARD. WHO Classification of Tumours, 5<sup>th</sup> Edition – Breast Tumours. World Health Organization, 2019, 82-101.

RAKHA, E. A., ALLISON, K. H., BU, H., ELLIS, I.O., FOSCHINI, M. P., HORII, R., MASUDA, S., PENAULT-LLORCA, F., SCHNITT, S. J., TSUDA, H., VINCENT-SALOMON, A., YANG, W. T.: Invasive breast carcinoma of no special type. In: WHO CLASSIFICATION OF TUMOURS EDITORIAL BOARD. WHO Classification of Tumours, 5<sup>th</sup> Edition – Breast Tumours. World Health Organization, 2019, 102-109.

ROSENBLUTH, J. M., SCHACKMANN, R. C. J., GRAY, G. K., SELFORS, L. M., LI, C. M.-C., BOEDICKER, M., KUIKEN, H. J., RICHARDSON, A., BROCK, J., GARBER, J., DILLON, D., SACHS, N., CLEVERS, H., BRUGGE, J. S., 2020. Organoid cultures from normal and cancer-prone human breast tissues preserve complex epithelial lineages. *Nat Commun*, 11(1), 1711.

ROSSOUW, J. E., ANDERSON, G. L., PRENTICE, R. L., LACROIX, A. Z., KOOPERBERG, C., STEFANICK, M. L., JACKSON, R. D., BERESFORD, S. A. A., HOWARD, B. V., JOHNSON, K. C., MORLEY KOTCHEN, J., OCKENE, J., WRITING GROUP FOR THE WOMEN'S HEALTH INITIATIVE INVESTIGATORS, 2002. Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women: principal results From the Women's Health Initiative randomized controlled trial. *JAMA*, 288(3), 321-333.

SACHS, N., CLEVERS, H., 2014. Organoid cultures for the analysis of cancer phenotypes. *Curr Opin Genet Dev*, 24, 68-73.

SACHS, N., DE LIGHT, J., KOPPER, O., GOGOLA, E., BOUNOVA, G., WEEBER, F., BALGOBIND, A. V., WIND, K., GRACANIN, A., BEGTHEL, H., KORVING, J., VAN BOXTEL, R., DUARTE, A. A., LELIEVELD, D., VAN HOECK, A., ERNST, R. F., BLOKZIJL, F., NIJMAN, I. J., HOOGSTRAAT, M., VAN DE VEN, M., EGAN, D. A., ZINZALLA, V., MOLL, J., BOJ, S. F., VOEST, E. E., WESSELS, L., VAN DRIEST, P. J., ROTTENBERG, S., VRIES, R. G. J., CUPPEN, E., CLEVERS, H., 2018. A Living Biobank of Breast Cancer Organoids Captures Disease Heterogeneity. *Cell*, 172, 373-386.

SATO, T., VRIES, R. G., SNIPPERT, H. J., VAN DE WETERING, M., BARKER, N., STANGE, D. E., VAN ES, J. H., ABO, A., KUJALA, P., PETERS, P. J., CLEVERS, H., 2009. Single Lgr5 stem cells build crypt-villus structures in vitro without a mesenchymal niche. *Nature*, 459, 262-265.

SATO, T., STANGE, D. E., FERRANTE, M., VRIES, R. G. J., VAN ES, J. H., VAN DEN BRINK, S., VAN HOUTD, W. J., PRONK, A., VAN GORP, J., SIERSEMA, P. D., CLEVERS, H., 2011. Long-term expansion of epithelial organoids from human colon, adenoma, adenocarcinoma, and Barrett's epithelium. *Gastroenterology*, 141(5), 1762-1772.

SCHINDLBECK, C., DATHE, O., DI GIOIA, D., GUTSCHOW, K., KÖNIG, A., SOMMER, H., DE WAAL, J., WYPIOR, H., Nachsorge. In: BAUERFEIND, I. (Hrsg.), DI GOIA, D., HARBECK, N., PIGORSCH, S., SALAT, C. (Eds.) *MANUAL Mammakarzinome – Empfehlungen zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge*. Zuckschwerdt Verlag GmbH, München, 2019, 263-286.

SHIN, S. J., DESMEDT, C., KRISTIANSEN, G., REIS-FILHO, J. S., SASANO, H.: Invasive lobular carcinoma. In: WHO CLASSIFICATION OF TUMOURS EDITORIAL BOARD. *WHO Classification of Tumours, 5<sup>th</sup> Edition – Breast Tumours*. World Health Organization, 2019, 114-118.

SIMMINI, S., BIALECKA, M., HUCH, M., KESTER, L., VAN DE WETERING, M., SATO, T., BECK, F., VAN OUDENAARDEN, A., CLEVERS, H., DESCHAMPS, J., 2014. Transformation of intestinal stem cells into gastric stem cells on loss of transcription factor Cdx2. *Nat Commun*, 5, 5728.

SLAMON, D. J., CLARK, G. M., WONG, S. G., LEVIN, W. J., ULLRICH, A., MCGUIRE, W. L., 1987. Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science*, 235, 177-182.

SLAMON, D. J., LEYLAND-JONES, B., SHAK, S., FUCHS, H., PATON, V., BAJAMONDE, A., FLEMING, T., EIERMANN, W., WOLTER, J., PEGRAM, M., BASELGA, J., NORTON, L., 2001. Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2. *N Engl J Med*, 344, 783-792.

SPORIKOVA, Z., KOUDELAKOVA, V., TROJANEC, R., HAJDUCH, M., 2018. Genetic Markers in Triple-Negative Breast Cancer. *Clin Breast Cancer*, 18(5), e841-e850.

STADLER, P., BAUERFEIND, I., BEER, M., SCHMOECKEL, E.: Sonderfälle. In: BAUERFEIND, I. (Hrsg.), DI GOIA, D., HARBECK, N., PIGORSCH, S., SALAT, C. (Eds.) MANUAL Mammakarzinome – Empfehlungen zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge. Zuckschwerdt Verlag GmbH, München, 2019, 459-473.

STAL, O., SULLIVAN, S., WINGREN, S., SKOOG, L., RUTQVIST, L. E., CARSTENSEN, J. M., NORDENSKJÖLD, B., 1995. c-erbB-2 expression and benefit from adjuvant chemotherapy and radiotherapy of breast cancer. *Eur J Cancer*, 31a, 2185–2190.

STANFORD, J. L., SZKLO, M., BRINTON, L. A., 1986. Estrogen receptors and breast cancer. *Epidemiol Rev*, 8, 42-59.

STENDAHL, M., RYDÉN, L., NORDENSKJÖLD, B., JÖNSSON, P.-E., LANDBERG, G., JIRSTRÖM, K., 2006. High progesterone receptor expression correlates to the effect of adjuvant tamoxifen in premenopausal breast cancer patients. *Clin Cancer Res*, 12, 4614-4618.

TAKASATO, M., ER, P. X., CHIU, H. S., MAIER, B., BAILLIE, G. J., FERGUSON, C., PARTON, R. G., WOLVETANG, E. J., ROOST, M. S., CHUVA DE SOUSA LOPES, S. M., LITTLE, M. H., 2015. Kidney organoids from human iPS cells contain multiple lineages and model human nephrogenesis. *Nature*, 526, 564-568.

VAN DEURZEN, C. H. M., DENKERT, C., PURDIE, C. A.: Tubular carcinoma. In: WHO CLASSIFICATION OF TUMOURS EDITORIAL BOARD. WHO Classification of Tumours, 5<sup>th</sup> Edition – Breast Tumours. World Health Organization, 2019, 119-120.

VARGO-GOGOLA, T., ROSEN, J. M., 2007. Modelling breast cancer: one size does not fit all. *Nat Rev Cancer*, 7(9), 659-672.

VLACHOGIANNIS, G., HEDAYAT, S., VATSIOU, A., JAMIN, Y., FERNÁNDEZ-MATEOS, J., KHAN, K., LAMPIS, A., EASON, K., HUNTINGFORD, I., BURKE, R., RATA, M., KOH, D.-M., TUNARIU, N., COLLINS, D., HULKKI-WILSON, S., RAGULAN, C., SPITERI, I., MORRCRAFT, S. Y., CHAU, I., RAO, S., WATKINS, D., FOTIADIS, N., BALI, M., DARVISH-DAMAVANDI, M., LOTE, H., ELTAHIR, Z., SMYTH, E. C., BEGUM, R., CLARKE, P. A., HAHNE, J. C., DOWSETT, M., DE BONO, J., WORKMAN, P., SADANANDAM, A., FASSAN, M., SANSOM, O. J., ECCLES, S., STARLING, N., BRACONI, C., SOTTOVIRA, A., ROBINSON, S. P., CUNNINGHAM, D., VALERI, N., 2018. Patient-derived organoids model treatment response of metastatic gastrointestinal cancers. *Science*, 359(6378), 920-926.

- WANG, S., ZHAO, Y., AGUILAR, A., BERNARD, D., YANG, C.-Y., 2017. Targeting the MDM2-p53 Protein-Protein Interaction for New Cancer Therapy: Progress and Challenges. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 7(5), a026245.
- WEEBER, F., OOF, S. N., DIJKSTRA, K. K., VOEST, E. E., 2017. Tumor Organoids as a Pre-clinical Cancer Model for Drug Discovery. *Cell Chem Biol*, 24(9), 1092-1100.
- WEN, H. Y., DESMEDT, C., REIS-FILHO, J. S., SCHMITT, F.: Mucinous carcinoma. In: WHO CLASSIFICATION OF TUMOURS EDITORIAL BOARD. WHO Classification of Tumours, 5<sup>th</sup> Edition – Breast Tumours. World Health Organization, 2019, 123-125.
- WOLFF, A. C., HAMMOND, M. E., HICKS, D. G., DOWSETT, M., MCSHANE, L. M., ALLISON, K. H., ALLRED, D. C., BARTLETT J. M. S., BILOUS, M., FITZGIBBONS, P., HANNA, W., JENKINS, R. B., MANGU, P. B., SOONMYUNG, P., PEREZ, E. A., PRESS, M. F., SPEARS, P. A., VANCE, G. H., VIALE, G., HAYES, D. F. 2013. Recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer: American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists clinical practice guideline update. *J Clin Oncol*, 31(31), 3997-4013.
- YANG, L., LIU, B., CHEN, H., GAO, R., HUANG, K., GUO, Q., LI, F., CHEN, W., HE, J., 2020. Progress in the application of organoids to breast cancer research. *J Cell Mol Med*, 24(10), 5420-5427.
- YARDEN, Y., SLIWKOWSKI, M. X., 2001. Untangling the ErbB signalling network. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2, 127–137.
- YIN, L., DUAN, J.-J., BIAN, X.-W., YU, S.-C., 2020. Triple-negative breast cancer molecular subtyping and treatment progress. *Breast Cancer Res*, 22(1), 61.
- YIN, X., FARIN, H. F., VAN ES, J. H., CLEVERS, H., LANGER, R., KARP, J. M., 2014. Niche-independent high-purity cultures of Lgr5<sup>+</sup> intestinal stem cells and their progeny. *Nat. Methods* 11, 106–112.
- YOULDEN, D. R., CRAMB, S. M., DUNN, N. A., MULLER, J. M., PYKE, C. M., BAADE, P. D., 2012. The descriptive epidemiology of female breast cancer: an international comparison of screening, incidence, survival and mortality. *Cancer Epidemiol*, 36, 237–48.
- YU, J., HUANG, W., 2020. The Progress and Clinical Application of Breast Cancer Organoids. *Intl J Stem Cells*, 13(3), 295-304.
- YUE, X., ZHAO, Y., XU, Y., ZHENG, M., FENG, Z., HU, W., 2017. Mutant p53 in cancer: accumulation, gain-of-function and therapy. *J Mol Biol*, 429(11), 1595-1606.
- ZABALA, M., LOBO, N. A., ANTONY, J., HEITINK, L. S., GULATI, G. S., LAM, J., PARASHURAMA, N., SANCHEZ, K., ABORNO, M., SIKANDAR, S. S., KUO, A. H., QIAN, D., KALINSKY, T., SIM, S., LI, L., DIRBAS, F. M., SOMLO, G., NEWMAN, A., QUAKE, S. R., CLARKE, M. F., 2020. LEFTY1 Is a Dual-SMAD Inhibitor that



Promotes Mammary Progenitor Growth and Tumorigenesis. *Cell Stem Cell*, 27(2), 284-299.

ZBUK, K., ANAND, S. S., 2012. Declining incidence of breast cancer after decreased use of hormone-replacement therapy: magnitude and time lags in different countries. *J Epidemiol Community Health*, 66, 1–7.

ZHU, Y., WANG, H., THURAISAMY, A.: Chapter 15 - MDM2/P53 Inhibitors as Sensitizing Agents for Cancer Chemotherapy. In: CHEN, Z.-S., YANG, D.-H. (Hrsg.) Protein Kinase Inhibitors as Sensitizing Agents for Chemotherapy. Academic Press, 2019. 243-266.

## 7 Erklärung zum Eigenanteil der Dissertationsschrift

Die Arbeit wurde von mir, Anna Wagner, an der Universitäts-Frauenklinik des Universitätsklinikum Tübingen unter Betreuung durch Prof. Dr. med. Andreas Hartkopf durchgeführt.

Die Konzeption der Studie erfolgte durch Prof. Dr. med. Andreas Hartkopf in Zusammenarbeit mit Dr. rer. nat. André Koch.

Die Versuche und die statistische Auswertung wurden nach Einarbeitung durch Dr. André Koch von mir eigenständig durchgeführt.

Ich versichere, das Manuskript nach Anleitung von Dr. André Koch und Prof. Dr. Andreas Hartkopf eigenständig verfasst und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen verwendet zu haben.

Tübingen, den \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
Anna Wagner

### 8 Danksagung

Hiermit möchte ich mich bei allen, die zur Entstehung dieser Arbeit beigetragen und mich in ihrer Fertigstellung unterstützt haben, herzlich bedanken.

Mein besonderer Dank gilt hierbei Herrn Prof. Dr. Andreas Hartkopf für die freundliche und unkomplizierte Betreuung und Dr. André Koch für die geduldige Einarbeitung und Anleitung, den konstruktiven Input und die kontinuierliche Unterstützung während des gesamten langen Arbeits- und Schreibprozesses.

Mein weiterer Dank gilt dem gesamten Team des Forschungsinstituts für Frauengesundheit, für die Schaffung einer angenehmen und freundschaftlichen Arbeitsumgebung während meiner einjährigen Laborarbeit.

Insbesondere möchte ich mich hier bei Ingrid Teufel und Sabine Hofmeister bedanken für ihre freundliche Einarbeitung in verschiedene Methodiken der praktischen Laborarbeit, ihre Unterstützung bei der Optimierung von Arbeitsprozessen und ihre Hilfe bei der Beschaffung der von mir benötigten Materialien.

Vielen Dank auch an Dr. Jürgen Andress für die Vermittlung dieser Doktorarbeit, für sein kontinuierliches Interesse an deren Gelingen und für die praktische Unterstützung während des gesamten Prozesses, sei es durch die Beschaffung von Literatur oder das geduldige Beantworten meiner vielen Fragen.

Außerdem möchte ich mich bei meinen Eltern und meinem Stiefvater Georg für ihre finanzielle und moralische Unterstützung in den letzten Jahren bedanken, ohne die es mir nicht möglich gewesen wäre, mich mit all meiner Zeit und Energie auf das Medizinstudium und diese Doktorarbeit zu konzentrieren.

Zum Schluss soll mein Dank noch Emma, dem Baby und Sergeant Pluderhose gelten, die mich während des gesamten Schreibprozesses begleitet und maßgeblich unterstützt haben.

*„Die Wissenschaft hat festgestellt, dass Coca-Cola Schnaps enthält.“*

- Mein Vater, immer