

Aus der Klinik für Innere Medizin V
Pneumologie, Allergologie, Beatmungs- und Umweltmedizin
Universitätsklinikum des Saarlandes, Homburg/Saar
Direktor: Prof. Dr. Dr. Robert Bals

Etablierung und Charakterisierung muriner KRAS-getriebener Lungentumor-Organoid

Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät
der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

2025

vorgelegt von: Jannis Ludwig
geb. am: 06.09.1998 in Wadern

Tag der Promotion: 10.06.2025

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. dent. Matthias Hannig

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Christoph Beißwenger

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Gabriela Krasteva-Christ

Teilergebnisse dieser Arbeit wurden bereits in folgender Publikation veröffentlicht:

An easy-to-perform protocol for culturing primary murine lung tumor cells as organoids [87]

Jannis Ludwig, Felix Ritzmann, Andreas Kamyschnikow, Christian Herr, Robert Bals, Christoph Beisswenger (2024)

Ann Anat. 2024 Aug;255:152298. doi: 10.1016/j.aanat.2024.152298. Epub 2024 Jul

Inhaltsverzeichnis

1. Zusammenfassung / Summary	1
2. Einleitung	5
2.1 Lungenkarzinom.....	5
2.1.1 Epidemiologie	5
2.1.2 Ätiologie und Risikofaktoren.....	6
2.1.3 Histologische Einteilung des Lungenkarzinoms	7
2.1.4 Molekulare Pathogenese und Treibermutationen	8
2.1.5 Tumorprogression durch entzündliche Prozesse	9
2.1.6 Inflammation und Lungenkarzinom.....	10
2.2 <i>KRAS</i> -Onkogen	11
2.2.1 <i>KRAS</i> -Mutationen und Lungenkarzinom	12
2.2.2 <i>KRAS</i> -getriebene NSCLC im Mausmodell.....	13
2.3 Organoide	14
2.3.1 Lungenorganoide	18
2.3.2 Tumororganoide.....	20
2.3.3 Lungenkrebsorganoide	20
2.3.4 Murine <i>KRAS</i> -getriebene Lungentumor-Organoid	21
2.4 Fragestellung	22
3. Material und Methodik.....	23
3.1 Material	23
3.1.1 Übersicht der verwendeten Geräte	23
3.1.2 Übersicht der verwendeten Lösungen und Chemikalien	24
3.1.3 Weitere verwendete Materialien	24
3.1.4 Software.....	24
3.2 Methoden	25
3.2.1 Versuchstiere.....	25
3.2.2 Probengewinnung und Zellkultur	25
3.2.2.1 Herstellung des Organoid Culture Medium (OCM)	25
3.2.2.2 Isolation der Tumorknoten aus <i>Kras</i> -Mäusen und Zellkultur	25
3.2.2.3 Isolation von Lungenparenchym aus Wildtyp-Mäusen.....	27
3.2.2.4 Isolation der Alveolarmakrophagen.....	27
3.2.3 Gewinnung der Organoide und Einbettung in Paraffin	29
3.2.4 Einbettung der <i>Kras</i> -Mauslungen.....	29
3.2.5 Passagieren der Tumor- und Lungenorganoide.....	30
3.2.6 Fotografische Dokumentation und Mikroskopische Vermessung	30
3.2.7 Färbung mit H&E	31

3.2.8 Immunhistochemische Färbung.....	31
3.2.9 Bestimmung des Ki-67-Index.....	32
3.2.10 Statistik	33
4. Ergebnisse	34
4.1 Wachstumsverhalten und Morphologie der murinen Tumor- und Lungenorganoide.....	34
4.1.1 Die Tumororganoide weisen nach 8 Tagen Wachstumszeit einen signifikant größeren Durchmesser als die Lungenorganoide auf	34
4.1.2 Die Tumororganoide zeigen ein Größenwachstum über einen Zeitraum von 30 Tagen	35
4.1.3 Tumor- und Lungenorganoide zeigen eine sphärische Wachstumsform.....	35
4.2 Immunhistochemische Charakterisierung der Tumor- und Lungenorganoide	36
4.3 Vergleich der Zellproliferation von Tumor- und Lungenorganoiden	38
4.4 Tumor- und Lungenorganoide können passagiert werden.....	39
4.5 Immunhistochemische Charakterisierung der Tumor- und Lungenorganoide der Passage 1	40
4.6 Vergleich der Zellproliferation von Tumor- und Lungenorganoiden der Passage 1	42
4.7 Co-Kultur der Tumororganoide mit Alveolarmakrophagen	43
5. Diskussion	45
5.1 Kultivierungsmethodik	45
5.2 Einordnung der morphologischen Beobachtungen.....	47
5.3 Immunhistochemische Charakterisierung und vergleichende Betrachtung der Tumororganoide und Lungenorganoide.....	49
5.4 Vergleichende Betrachtung der passagierten Tumororganoide und Lungenorganoide	52
5.5 Modulierbarkeit des Modells und Einfluss von Alveolarmakrophagen.....	53
5.6 Schlussbemerkung	54
6. Literaturverzeichnis	55
7. Abbildungsverzeichnis	65
8. Tabellenverzeichnis	66
9. Publikationen.....	67
10. Danksagung	68
11. Lebenslauf.....	69

1. Zusammenfassung / Summary

Lungenkrebs ist diejenige Krebserkrankung, welche die weltweit höchste Anzahl an krebsbedingten Todesfällen zu verantworten hat. Der Grundlagenforschung von Lungenkrebs kommt somit weiterhin eine große Wichtigkeit zu, um die Entstehung dieser malignen Neoplasie besser zu verstehen und zielgerichtete Therapien daraus ableiten zu können. Dabei bleibt der Einsatz von Tierversuchen eine oft unverzichtbare Notwendigkeit. Dieser sollte jedoch im Sinne des Tierschutzes auf ein minimales und ethisch vertretbares Niveau reduziert werden. Ein wichtiger Aspekt zur Erreichung dieses Ziels stellt die Modellierung von Krebsgewebe durch eine Zellkultur dar, wobei hierzu eine möglichst getreue Repräsentation der krebseigenen Gewebearchitektur und -eigenschaften benötigt wird. Organoide sind dreidimensionale Zellkulturmodelle, welche diesem Profil deutlich mehr entsprechen als vergleichbare 2D-Zellkulturen. Lungentumororganoiden wird dabei ein großes Potenzial bezüglich des Einsatzes in der Wirkstoffforschung und der Präzisionsmedizin, aber auch der Grundlagenforschung, zugeschrieben.

Das Ziel dieser Arbeit war es, ein niederschwellig durchführbares Protokoll zu etablieren, welches die dreidimensionale Kultivierung von KRAS-getriebenen murinen Lungentumororganoiden ermöglicht, um ein Modell eines im Frühstadium befindlichen Lungenadenokarzinoms zu bieten.

Hierzu wurden Tumorknoten aus den Lungen von C57BL/6N Kras^{LA1}-Mäusen herauspräpariert, in Einzelzellen dissoziiert und in einem Matrigel-haltigen Kulturmedium in Transwell-Membraneinlagen ausgebracht. Die gewachsenen Organoide wurden über einen maximalen Zeitraum von 30 Tagen kultiviert, anschließend in Paraffin eingebettet, zu histologischen Schnitten verarbeitet und durch immunhistochemische Färbungen charakterisiert. Mit dem Vorhaben der Etablierung einer Negativkontrolle wurde das identische Versuchsprotokoll mit dissoziiertem Lungenparenchym von Wildtyp-Mäusen unter identischen Kulturbedingungen durchgeführt, um eine Verunreinigungssituation durch physiologische Lungenzellen abzubilden. Die hierbei gewachsenen Organoide durchliefen ebenfalls einen 30-tägigen Kultivierungsprozess und eine immunhistochemische Charakterisierung.

Die aus dissoziiertem Lungentumorgewebe der *Kras*-Mäuse kultivierten Organoide zeigten sich in der immunhistochemischen Charakterisierung identisch zum Primärtumor positiv für den Alveolarepithelzell-Typ-II-Marker SFTPC, negativ für den Keulenzellmarker SCGB1A1 und negativ für den Basalzellmarker KRT5. Die aus Lungenparenchym der Wildtyp-Mäuse kultivierten Organoide zeigten sich hingegen SFTPC-negativ, SCGB1A1-positiv und KRT5-negativ. Die vergleichende Gegenüberstellung der Tumor- und Lungenorganoide zeigte ebenfalls signifikante Unterschiede im Wachstumsverhalten, der Proliferationsrate sowie im Bereich der zytologischen Merkmale. Beide Organoid-Typen konnten unter Beibehaltung der immunhistochemischen Charakterisierungsmarker passagiert und damit expandiert werden. Aus der Co-Kultivierung der Tumororganoide mit Alveolarmakrophagen resultierte ein größerer Ertrag an Organoiden.

Mit dieser Arbeit gelang die Etablierung eines niederschwellig durchzuführenden Protokolls, um passagierbare, murine, KRAS-getriebene Lungenadenokarzinomzellen in Form einer dreidimensionalen Zellkultur zu kultivieren. Diese Lungentumororganoide konnten immunhistochemisch charakterisiert werden, wurden in Ihrem Wachstumsverhalten vermessen und dienen der Modellierung eines im Frühstadium befindlichen Lungenadenokarzinoms. Weiterhin gelang die Abgrenzung zu aus Lungenparenchym von Wildtyp-Mäusen identisch kultivierten Lungenorganoiden. Diese konnten immunhistochemisch als Keulenzellorganoide identifiziert werden. Beide in dieser Arbeit etablierten Organoidtypen, Tumororganoide und Lungenorganoide, bieten reduktionistische und expandierbare Modelle zur Erforschung des Lungenadenokarzinoms sowie der heterogenen Keulenzellpopulation und leisten damit einen Beitrag zur Reduktion von Tierversuchen.

Summary

Establishment and characterization of murine KRAS-driven lung tumor organoids

Lung cancer is the leading cause of cancer-related deaths worldwide. Basic research into lung cancer is therefore still of great importance in order to better understand the development of this malignant neoplasm and to be able to derive targeted therapies. The use of animal experiments remains an often-indispensable necessity. However, in the interest of animal welfare, this should be reduced to a minimal and ethically acceptable level. An important aspect of achieving this goal is the modelling of cancer tissue in cell culture. This requires the most faithful possible representation of the cancer's own tissue architecture and properties. Organoids are three-dimensional cell culture models that are much closer to this profile than comparable 2D cell cultures. Lung tumor organoids are considered to have great potential for use in drug discovery and precision medicine, as well as in basic research.

The aim of this work was to establish a low-threshold protocol that allows the three-dimensional cultivation of KRAS-driven murine lung tumor organoids to provide a model of early-stage lung adenocarcinoma. Tumor nodules were dissected from the lungs of C57BL/6N *Kras*^{LA1} mice, dissociated into single cells and plated in Matrigel-containing culture medium in Transwell membrane inserts. The grown organoids were cultured for a maximum of 30 days, then embedded in paraffin, processed for histological sections and characterised by immunohistochemical staining. To provide a negative control, the same experimental protocol was performed with dissociated lung parenchyma from wild-type mice under identical culture conditions to simulate contamination by physiological lung cells. These organoids were also cultured for 30 days and immunohistochemically characterised.

The organoids cultured from dissociated *Kras* lung tumor tissue were positive for the alveolar epithelial cell type 2 marker SFTPC, negative for the club cell marker SCGB1A1 and negative for the basal cell marker KRT5 in immunohistochemical characterization, identical to the primary tumor. In contrast, organoids grown from the lung parenchyma of wild-type mice were SFTPC negative, SCGB1A1 positive and KRT5 negative. Comparison of tumor and lung organoids showed significant differences in growth behaviour, proliferation rate and cytological characteristics. Both types of organoids could be passaged and expanded while retaining their immunohistochemical characterisation markers. Co-cultivation of tumor organoids with alveolar macrophages resulted in a higher yield of organoids.

With this work, a low-threshold protocol was established to cultivate passageable, murine, KRAS-driven lung adenocarcinoma cells in the form of a three-dimensional cell culture. These lung tumor organoids could be characterised immunohistochemically, their growth behaviour was measured and they are used to model an early stage lung adenocarcinoma. They could also be distinguished from lung organoids grown in the same way from the lung parenchyma of wild-type mice. These were identified by immunohistochemistry as club cell organoids. Both types of organoids established in this work, tumor

and lung organoids, provide reductionist and expandable models for the study of lung adenocarcinoma and the heterogeneous club cell population, thus contributing to the reduction of animal experimentation.

2. Einleitung

2.1 Lungenkarzinom

2.1.1 Epidemiologie

Das Lungenkarzinom ist eine maligne Tumorerkrankung mit der diesbezüglich höchsten Inzidenz weltweit im Jahr 2022 und verantwortete zu diesem Zeitpunkt gleichsam die höchste Mortalität aller malignen Neoplasien. Mit einer Anzahl von rund 2,5 Millionen global jährlich neu diagnostizierten Lungenkarzinomen, was sich auf einen Anteil von 12,4 % aller Krebsneuerkrankungen beläuft, reiht sich diese Tumorentität knapp vor dem Mammakarzinom ein (11,6 % der weltweiten Krebsneuerkrankungen). 18,7 % aller globaler Malignom-bedingter Tode gingen 2022 schätzungsweise auf das Lungenkarzinom zurück, welches im deutschsprachigen Raum ebenfalls als Bronchialkarzinom bezeichnet wird [12]. Demnach wird dieser Erkrankung eine große epidemiologische Bedeutung zuteil und sie besitzt seit Jahrzehnten hohe global-gesundheitliche Relevanz [34,76,78]. Diese aufgeführten epidemiologischen Daten von Bray et al., basierend auf den GLOBOCAN 2022-Schätzungen der International Agency for Research on Cancer, zeigen außerdem internationale geschlechtsspezifische Differenzen im Hinblick auf Inzidenz und Mortalität. Während das Lungenkarzinom im Jahr 2022 bei Männern bezüglich maligner Krebsneuerkrankungen und Sterblichkeit den führenden Anteil ausmachte, stand es bei Frauen an zweiter Stelle der Inzidenz (nach Mammakarzinom) sowie an zweiter Stelle der Mortalität (nach Mammakarzinom) [12].

In Deutschland zeigten die Erhebungen des Zentrums für Krebsregisterdaten des Robert-Koch-Instituts ähnliche Resultate. Mit etwa 35300 Neuerkrankungen im Jahr 2018 (13,3 % der Krebsneuerkrankungen der Männer) und 28365 Sterbefällen (22,8 % der Krebssterbefälle der Männer) stand die Tumorlokalisation in der Lunge bei Männern in genanntem Jahr an zweiter Stelle der Inzidenz und erster Stelle der Mortalität aller Krebsneuerkrankungen in Deutschland. Das mittlere Erkrankungsalter lag hierbei bei 70 Jahren. Bei den Frauen in Deutschland stand die Neuerkrankungsrate an Lungenkrebs mit einer absoluten Anzahl von etwa 21930 (9,4 % der Krebsneuerkrankungen der Frauen) im Jahr 2018 auf Platz 3, Tumore der Lunge machten mit 16514 (15,8 % der Krebssterbefälle der Frauen) den zweitgrößten Anteil der Sterbefälle aus, die auf eine Malignomerkrankung zurückzuführen waren. Das mittlere Erkrankungsalter betrug hierbei 69 Jahre [38,67].

Die neueste Veröffentlichung des Robert-Koch-Instituts über epidemiologische Krebs-Daten in Deutschland ergab (Stand: 07.12.23), dass im Jahr 2020 bei 34.100 Männern Lungenkrebs neu diagnostiziert wurde, bei den Frauen belief sich diese Anzahl auf 22.590. Der Anteil von Lungenkrebs an allen im Jahr 2019 erfassten Krebsneuerkrankungen betrug demnach bei Männern 13,0 %, bei Frauen 9,8 % [114].

Diese epidemiologischen Daten für Deutschland und der Vergleich mit den Erhebungen vorangegangener Jahre verdeutlichen eine Diskrepanz in der Entwicklung der Inzidenz und Mortalität zwischen Männern und Frauen. Die Inzidenz des Lungenkarzinoms der Frauen steigt seit Ende der 1990er Jahre kontinuierlich an, während die Neuerkrankungsrate der Männer einem leichten

Abwärtstrend unterliegt. Die Prognosen für das Jahr 2022 sagen demnach eine fortschreitende Angleichung der Inzidenzkurven voraus [67]. Zusammenfassend kann die besondere epidemiologische Bedeutung des Bronchialkarzinoms auf nationaler und internationaler Ebene durch die aufgeführten Daten hervorgehoben werden.

2.1.2 Ätiologie und Risikofaktoren

Grundsätzlich werden im Hinblick auf die Genese des Lungenkarzinoms exogene von endogenen Risikofaktoren unterschieden. Als endogener Risikofaktor spielt die genetische Disposition im Sinne einer positiven Familienanamnese bei der Erkrankung an Lungenkrebs eine wichtige Rolle, insbesondere bei in jüngeren Lebensaltern erkrankten Patienten. Im Rahmen genomweiter Assoziationsstudien (GWAS) konnten mehrere genetische Polymorphismen identifiziert werden, welche zu einer Risikoerhöhung beitragen. Eine weiterreichende Aufschlüsselung der Erbllichkeit des Lungenkrebsrisikos ist Teil aktueller Forschung [4,76]. Chronisch-entzündliche Prozesse innerhalb der Lunge stellen ebenfalls einen endogenen Risikofaktor dar. Inflammation, sowohl im Rahmen einer chronisch-entzündlichen Lungenerkrankung als auch in Zusammenhang mit rezidivierenden pulmonalen Infekten, steigert das Risiko zu erkranken [13,89]. Im Fall der chronischen Lungenerkrankungen sind hierbei die chronisch obstruktive Lungenerkrankung (engl. chronic obstructive pulmonary disease, COPD) und Asthma bronchiale besonders relevant [92,146]. Eine COPD-Erkrankung steigert das Lungenkarzinomrisiko um das bis zu 4,5-fache [108], eine Erkrankung an Asthma bronchiale erhöht das Erkrankungsrisiko um 40 % [122]. Lungentuberkulose stellt als Infektion einen unabhängigen Risikofaktor dar [3,54].

Der Hauptrisikofaktor für die Entstehung aller histologischen Klassifikationen des Lungenkarzinoms ist das Rauchen von Tabakprodukten als exogener Risikofaktor [35,76,89]. Rauchen erhöht das Lungenkrebsrisiko um das 10- bis 30-fache [76]. Dabei ist vor allem die Dauer und die Menge des kontinuierlichen Tabakkonsums ausschlaggebend für das erhöhte Risiko der Tumorentstehung gegenüber Nicht-Rauchern [30]. Durch Tabakabstinenz kann das relative Risiko gesenkt werden, erreicht jedoch nicht erneut das Niveau von lebenslangen Nicht-Rauchern [56,89]. Die passive Tabakrauchexposition durch Familie oder Beruf spielt bei der Tumorentstehung ebenfalls eine entscheidende Rolle und erhöht das Erkrankungsrisiko [10,37,100,134]. Neben dem aktiven inhalativen Tabakkonsum und dem Passivrauchen existieren noch weitere exogene Risikofaktoren. Die umweltbedingte beziehungsweise berufliche Exposition gegenüber gewissen schädigenden Substanzen kann ebenfalls ursächlich für eine Bronchialkarzinomerkrankung sein. Zusammenfassend sind Asbest, aromatische Kohlenwasserstoffe, Siliciumdioxid, Radon und Schwermetalle die wichtigsten Lungenkarzinogene bei beruflich Exponierten [89]. Arsen ist ein karzinogenes Element, welchem Millionen Menschen weltweit durch kontaminiertes Trinkwasser und Lebensmittel ausgesetzt sind. Eine Arsenexposition erhöht ebenfalls das Lungenkrebsrisiko [101]. Ein weiterer Umweltfaktor stellt die Luftverschmutzung dar. Luftschadstoffe, wie beispielsweise Dieselabgase, weisen eine genotoxische

und krebserregende Wirkung auf und steigern damit das Risiko an einem Lungenkarzinom zu erkranken [76,84].

2.1.3 Histologische Einteilung des Lungenkarzinoms

Das Lungenkarzinom kann anhand histologischer Charakteristika in zwei übergeordnete Kategorien unterteilt werden. Kleinzellige Lungenkarzinome (engl. Small cell lung carcinoma, SCLC), die einen Anteil von ca. 15 % aller Lungenkarzinome ausmachen, stehen Nicht-kleinzelligen Lungenkarzinomen (engl. Non-small cell lung carcinoma, NSCLC) gegenüber. Diese nehmen den restlichen und damit überwiegenden Anteil der Lungenkarzinome ein (ca. 85 %) [5,42,45,59,125]. Nicht-kleinzellige Lungenkarzinome unterliegen wiederum einer genaueren histologischen Differenzierung. Hierzu gehören Plattenepithelkarzinome, welche 25 % - 30 % der NSCLC ausmachen, Adenokarzinome, die mit 40 % - 50% den größten Anteil der NSCLC einnehmen, und Großzellige Karzinome (10 % - 15 %). Den restlichen Anteil der NSCLC bilden seltenere Formen wie adenosquämöse Karzinome, undifferenzierte Karzinome und Karzinoide beziehungsweise neuroendokrine Karzinome [5,18,58,125]. Das ehemals als separater Subtyp geführte Bronchoalveoläre Karzinom wird nun als Unterkategorie des Adenokarzinoms eingeordnet [125]. Epidemiologische Daten aus den USA und Europa zeigten in den letzten Jahrzehnten einen steigenden Anteil an Adenokarzinomen, vor allem bei Frauen [36,49,85]. Diese Entwicklung führte in den 1990er-Jahren in wirtschaftlich stärker entwickelten Staaten zu einer Ablösung des Plattenepithelkarzinoms durch das Adenokarzinom als häufigster Lungenkrebstyp und wird auf den im Laufe des Jahrhunderts zunehmenden Konsum von Filterzigaretten zurückgeführt. Diese verändern die Tabakverbrennung und ermöglichen eine tiefere Inhalation des Tabakrauchs, wodurch eher periphere Lungenabschnitte der karzinogenen Wirkung ausgesetzt werden, welche die Hauptlokalisation des Adenokarzinoms darstellen [21,76,77,105,131]. Klinisch zeichnet sich das Adenokarzinom außerdem durch seine frühe Metastasierung und seine Assoziation zum malignen Pleuraerguss aus [21,49]. Der Ursprung des Adenokarzinoms liegt in Typ-II-Pneumozyten und vermutlich in Keulenzellen, Flimmerzellen und Becherzellen. Bei der Maus sind sogenannte bronchoalveoläre Stammzellen (engl. bronchioalveolar stem cells, BASCs) unter bestimmten Bedingungen womöglich ebenfalls an der Entstehung des Lungenadenokarzinoms beteiligt [26,120,133,141]. Das meist zentral in der Lunge vorkommende Plattenepithelkarzinom zeigt eine geringere Tendenz zu Fernmetastasen gegenüber dem Adenokarzinom und ist stärker mit dem inhalativen Tabakkonsum assoziiert [21,49]. Das Plattenepithelkarzinom entsteht vermutlich aus Basalzellen der zentralen Atemwege [55,55,141,144]. Im Vergleich zu den NSCLC weist das SCLC eine deutlich höhere Zellteilungsrate auf und besitzt eine wesentlich schlechtere Prognose. Das SCLC zählt zu den neuroendokrinen Tumoren, ist meist zentral lokalisiert und neigt früh im Krankheitsverlauf zu Fernmetastasen [21,118]. Bei schätzungsweise 90 % der Patienten liegt bei Diagnosestellung bereits ein metastasiertes Stadium vor [132]. Diese Lungentumorentität ist am stärksten mit inhalativem Tabakkonsum verknüpft [51,118]. Obwohl generell häufig bei Lungenkarzinomen zu beobachten, ist

das SCLC außerdem am stärksten mit paraneoplastischen Syndromen assoziiert [132]. Die Ursprungszellen des SCLC sowie des großzelligen Karzinoms sind pulmonale neuroendokrine Zellen (engl. Pulmonary neuroendocrine cells, PNECs) [120].

2.1.4 Molekulare Pathogenese und Treibermutationen

Im Prozess der Karzinogenese des Lungenkarzinoms führen genetische und epigenetische Veränderungen zur Aktivierung von Onkogenen, zur Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen und der Etablierung von Treibermutationen, was letztlich Malignität und invasives Wachstum zur Folge hat [42,123,126]. Die in einem mehrstufigen Prozess akkumulierenden genetischen Veränderungen im Bronchialepithel werden hierbei zu einem Großteil durch exogene Risikofaktoren induziert [42]. Bei ungefähr 80 % - 90 % der Lungenkarzinomerkrankungen wird das Rauchen von Tabakprodukten als ursächlich angesehen [24,59,125,157]. Neben der weiterhin etablierten histologischen Klassifikation des Lungenkarzinoms ist die Detektion spezifischer Treibermutationen für Prognose und Therapie von Bedeutung. Diese sind ein zentraler Faktor der Karzinogenese und der daraus resultierenden Malignität. In den letzten Jahren konnten insbesondere im Fall des NSCLC einige dieser Treibermutationen detektiert und teilweise einer zielgerichteten Therapie zugänglich gemacht werden, andere stellen potenzielle zukünftige Ziele therapeutischer Interventionen dar und sind Gegenstand aktueller Forschungen. Die Kenntnis über die Art der Treibermutation des NSCLC bietet somit gegebenenfalls bereits therapeutische Angriffspunkte und besitzt demnach prognostische Bedeutsamkeit [24,36,138]. Als die wichtigsten Gene, die im Rahmen der Pathogenese des NSCLC molekularen Veränderungen ausgesetzt und einer medikamentösen Therapie zugänglich sind, beziehungsweise gemacht werden sollen, werden nach Fois et al. die Gene *EGFR*, *KRAS*, *MET*, *BRAF* und *HER2* (Mutationen oder Amplifikationen) sowie die Gene *ALK* und *ROS1* (Fusionen) aufgeführt. Dabei sind bisher auf *EGFR*- und *BRAF*-Mutationen sowie auf *ALK*- oder *ROS1*-Rearrangements abzielende Medikamente für den klinischen Einsatz zugelassen [36]. Außerdem konnten mit Sotorasib und Adagrasib zwei *KRAS* G12C-Inhibitoren zur Therapie eines vorbehandelten fortgeschrittenen Lungenadenokarzinoms in den USA zugelassen werden [95]. Die Etablierung weiterer zielgerichteter Therapien bei *KRAS*-mutierten Lungenkarzinom-Erkrankungen ist Gegenstand aktueller Forschung [58].

Mutationen des Epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptors (engl. epidermal growth factor receptor, EGFR) sind die zweithäufigsten onkogenen Treibermutationen des NSCLC in der kaukasischen Bevölkerung mit einem Anteil von 10 - 20 %. In der asiatischen Bevölkerung treten *EGFR*-Mutationen deutlich häufiger in bis zu 40 - 50 % der NSCLC auf [44,47,59]. *EGFR*-Mutationen findet man vor allem bei Lungenadenokarzinomen, meistens sind Frauen und Nichtraucher betroffen [29,36,47,115].

KRAS-Mutationen sind die häufigsten in die Karzinogenese des Lungenkarzinoms involvierten Treibermutationen. Sie können bei 25 - 27,5 % der NSCLC nachgewiesen werden [59,129]. Dabei treten Mutationen des *KRAS*-Gens selten bei Plattenepithelkarzinomen (3 - 5 %), jedoch häufig bei

Adenokarzinomen (20 - 30 %) auf [47,62,111,116,126,157]. Im Gegensatz zu *EGFR*-Mutationen sind *KRAS*-Mutationen häufiger bei Erkrankten mit nicht-asiatischer Abstammung und langjährigem inhalativem Tabakkonsum zu beobachten [29,36,111]. Die *KRAS*-Mutation besitzt für diese Arbeit eine besondere Relevanz und wird in nachfolgenden Kapiteln genauer betrachtet.

2.1.5 Tumorprogression durch entzündliche Prozesse

Inflammation fördert grundsätzlich die Entstehung maligner Neoplasien und deren Progression. Hierbei erhöhen insbesondere chronische Entzündungen das Krebsrisiko [22,25,27,40,41,90,96]. Schätzungsweise können 15 - 20 % der weltweiten Krebserkrankungen ursächlich auf entzündliche Prozesse zurückgeführt werden. Prominente Beispiele sind das gesteigerte Darmkrebsrisiko infolge chronisch-entzündlicher Darmerkrankungen (autoimmun) oder das gesteigerte Leberkrebsrisiko infolge viraler Hepatitiden (infektiös) [6,41,72]. Bereits Rudolph Virchow postulierte im Jahr 1863 einen Zusammenhang zwischen chronischen Entzündungen und der Ursprungslokalisation von Krebs [6]. Dabei kann der komplexe Vorgang der körpereigenen Inflammation an vielfältigen Schritten der Karzinogenese in verschiedenen Ausprägungen involviert sein. Beginnend bei der Initiierung einer Neoplasie über die Tumorprogression bis hin zur Beeinflussung des Metastasierungsverhaltens nimmt die Immunantwort Einfluss auf den Prozess. Chronische Inflammation kann dabei unter anderem durch die Induktion genomischer Instabilität, die Induktion von onkogenen Mutationen oder durch verstärkte Angiogeneese zur Karzinogenese beitragen [41,71].

Neben der Neoplasie-fördernden Wirkung chronischer Entzündungen löst ein Tumor im Allgemeinen selbst eine Entzündungsreaktion aus, welche die Tumorprogression wiederum fördert und zur Ausbildung der sogenannten Tumormikroumgebung führt [27,40,90]. Zahlreiche Zellen sind Teil dieser Tumormikroumgebung. Dazu zählen zum einen die Krebszellen selbst, die Zellen des sie umgebenden Gewebes, wie beispielsweise Fibroblasten und Endothelzellen, aber auch Zellen des angeborenen Immunsystems (u.a. Makrophagen, Dendritische Zellen, Neutrophile Granulozyten und natürliche Killerzellen) und des adaptiven Immunsystems (T-Lymphozyten und B-Lymphozyten) [25]. Ein weiterer Bestandteil der Tumormikroumgebung sind die von ebendiesen Zellen ausgeschütteten pro- oder antiinflammatorischen Zytokine und Chemokine, die in Ihrer Gesamtheit für ein die Tumorprogression förderndes oder hemmendes Milieu sorgen. Insgesamt betrachtet fördern die meisten proinflammatorischen Zytokine das Tumorwachstum. Es wurden unter anderem die Zytokine Tumornekrosefaktor- α (TNF- α), Interleukin 6 (IL-6) und Interleukin 17 (IL-17) als tumorfördern identifiziert. Proinflammatorische Zytokine können dabei entweder von Tumorzellen selbst oder von Immunzellen ausgeschüttet werden. Antiinflammatorische Zytokine wie Interleukin 10 (IL-10) oder der transformierende Wachstumsfaktor beta (engl. transforming growth factor β , TGF- β) und proapoptotische Zytokine wie der TNF-verwandte Apoptose-induzierende Ligand (engl. TNF-related apoptosis-inducing ligand, TRAIL) weisen insgesamt eine Tumor-supprimierende Wirkung auf [22,27,80]. Diese Beobachtungen haben die Vermutung offenkundig werden lassen, dass der Einfluss

der Tumormikroumgebung auf den Tumor weniger durch den Immunzellgehalt, sondern eher durch die Konzentration und die Zusammensetzung von Zytokinen unabhängig von deren zellulärem Ursprung vermittelt wird [41,80].

Die am häufigsten vorkommende Zellart der Tumormikroumgebung sind neben T-Zellen sogenannte Tumor-assoziierte Makrophagen (TAM) [41]. Dabei liegen diese in Form eines M1- oder eines M2-Phänotyps vor, wobei Letzterer in der Tumormikroumgebung dominiert. Durch sein Spektrum an Zytokinen und Wachstumsfaktoren weist der M2-Typ der TAM eine tumorfördernde Wirkung auf, indem er die T-Zell-vermittelte Anti-Tumor-Immunantwort hemmt, die Angiogenese stimuliert und Tumorwachstum fördert. Makrophagen wird somit insgesamt eine sehr bedeutende tumorfördernde Wirkung im Rahmen der Karzinogenese zugeschrieben [90,103,130].

2.1.6 Inflammation und Lungenkarzinom

Alle im vorausgegangenen Kapitel aufgeführten Mechanismen beeinflussen schlussendlich ebenfalls die Karzinogenese und den Progress des Lungenkarzinoms. Dabei ist die Lunge im Hinblick auf entzündliche Prozesse in besonderer Weise exponiert, da sie durch den ständigen Gasaustausch häufig mit infektiösen Erregern konfrontiert wird und vielfältigen inhalativen Noxen ausgesetzt ist [99]. Chronisch-entzündliche Erkrankungen der Lunge, wie COPD und Asthma bronchiale, sorgen bezüglich des Bronchialkarzinoms für ein gesteigertes Erkrankungsrisiko [13,108,122]. Hierbei bleibt umstritten, ob es sich dabei um unabhängige Risikofaktoren handelt oder um jeweils unterschiedliche Manifestationen des inhalativen Tabakkonsums. Es existieren Hinweise darauf, dass die COPD auch unabhängig von der Raucheranamnese für ein erhöhtes Lungenkarzinomrisiko sorgt [92,146]. Die Resultate weiterer Studien sehen die COPD wiederum nicht als alleinstehenden Risikofaktor an, sondern stellen die Vermutung auf, dass die gemeinsame Raucheranamnese den ursächlichen Faktor darstellt [106]. Dabei wurde jedoch diskutiert, dass Tabakrauch nicht ausschließlich direkte kanzerogene Effekte auf die Lunge ausübt und als Tumorinitiator fungiert, sondern hierdurch auch entzündliche Prozesse angestoßen werden, die das Voranschreiten der Krebserkrankung fördern [136]. Ein kausaler Zusammenhang zwischen infektiösen Lungenentzündungen und der Entstehung und dem Progress von Lungenkrebs wird ebenfalls angenommen [13,14]. So konnte beispielsweise eine Infektion mit *Mycobacterium tuberculosis* als Risikofaktor ausgemacht werden [54], eine Infektion mit *Chlamydia pneumoniae* scheint ebenfalls das Erkrankungsrisiko zu erhöhen [81]. Innerhalb der Tumormikroumgebung des NSCLC bilden Makrophagen die größte Immunzellpopulation und tragen nach neueren Erkenntnissen zur Progression dieser Neoplasie entscheidend bei [5,15]. Alveolarmakrophagen nehmen dabei Einfluss auf die NSCLC-Etablierung, die Metastasierung, die Angiogenese und die Immunsuppression innerhalb einer Erkrankung an NSCLC. Weiterhin sind diese Immunzellen in den Erwerb von Chemoresistenzen involviert [5]. Insgesamt scheinen entzündliche Prozesse im Bereich der Lunge somit einen nicht unwesentlichen Einfluss auf die Entstehung und den Progress einer Lungenkarzinomkrankung auszuüben.

2.2 *KRAS*-Onkogen

Das Gen Kirsten Rat Sarcoma Virus (*KRAS*) ist auf dem kurzen Arm des Chromosoms 12 lokalisiert und kodiert für das Protein K-RAS, welches als Teil des Mitogen-aktivierte Protein-Kinase (MAPK)- und Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K)-Signalwegs eine wichtige Schaltstelle in Hinblick auf Zellproliferation, -differenzierung, -wachstum sowie -überleben darstellt und somit als Proto-Onkogen bezeichnet wird [19,20,36]. Es gehört der Rat Sarkoma (*RAS*)-Superfamilie an, der neben *KRAS* auch *NRAS* sowie *HRAS* angehören. Im physiologischen Zustand wird *KRAS* durch vorgeschaltete Rezeptor-Tyrosinkinasen (beispielsweise durch EGFR) aktiviert und fungiert als membranständige Guanosintriphosphatase (GTPase). Diese ist in Guanosindiphosphat-gebundenem Zustand (GDP) inaktiv und aktiv im Guanosintriphosphat-gebundenem Zustand (GTP). Die Überführung in den aktivierten Zustand wird durch einen Guanin-Nukleotid-Austauschfaktor (engl. guanine nucleotide exchange factor, GEF) angeregt, wie beispielsweise das SOS1-Protein (engl. son of sevenless isoform 1), wodurch dann bereits erwähnte nachgeschaltete Signalwege aktiviert werden [20,107,110,145]. Eine Mutation des *RAS*-Gens liegt bei ungefähr 19 % aller Krebserkrankungen vor und ist somit das häufigste in humanen Krebszellen detektierte Onkogen. Hiervon nehmen Mutationen der *RAS*-Isoform *KRAS* mit einem Anteil von 75 % wiederum den Großteil ein [107,110]. Eine *KRAS*-Mutation führt zu unregulierter Zellproliferation und konnte in zahlreichen Malignomen nachgewiesen werden. Vor allem in Bauchspeicheldrüsenkrebs (88 %) , Darmkrebs (45 – 50 %) und Lungenkrebs (ungefähr 30 %) liegen hohe Mutationsraten vor, aber auch unter anderem in Magen- oder Hautkrebs konnten *KRAS*-Mutationen festgestellt werden [36,107].

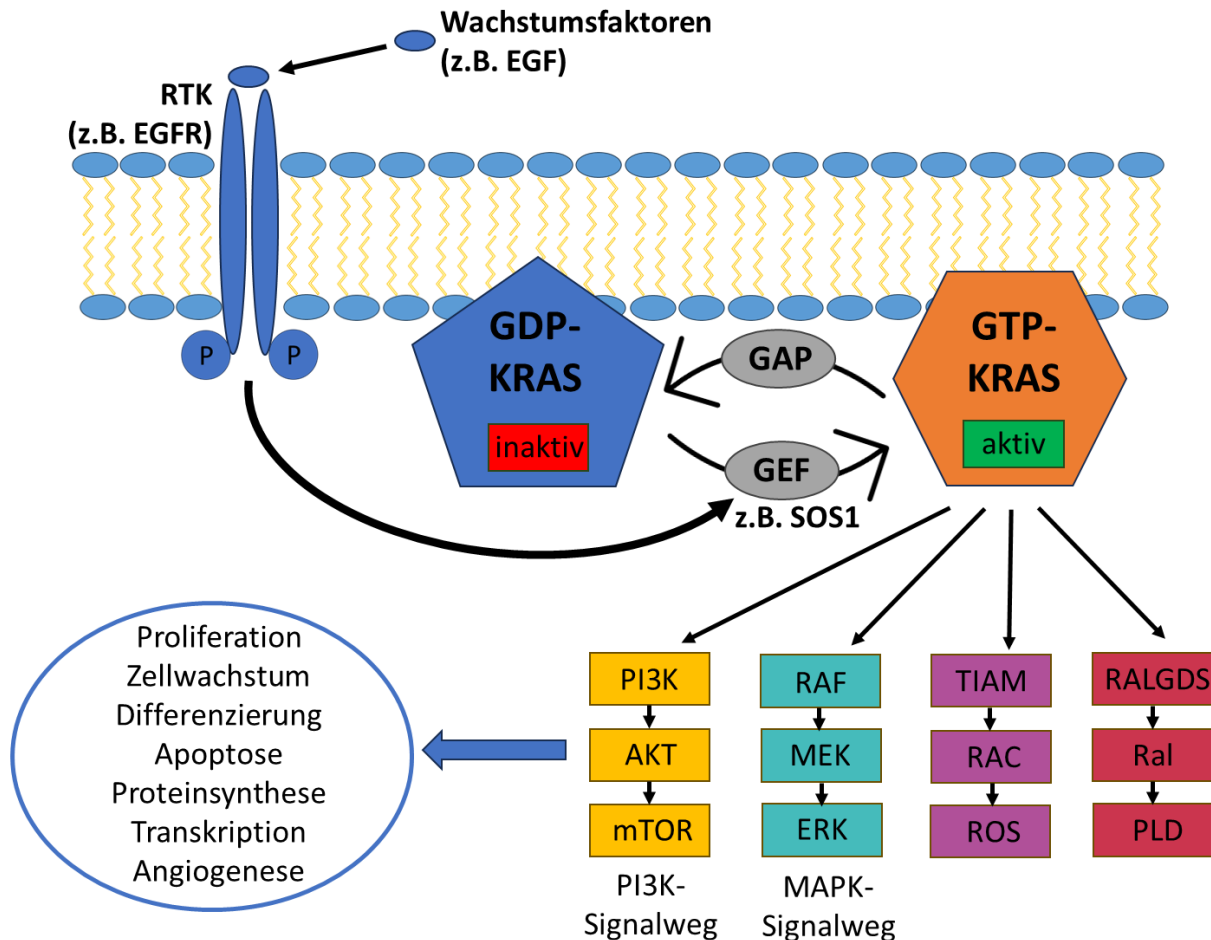


Abbildung 1: Die Signalwege von KRAS (nach [91,110,145]).

Wachstumsfaktoren wie der epidermale Wachstumsfaktor (engl. epidermal growth factor, EGF) binden an Rezeptortyrosinkinasen (RTK) wie den EGFR und aktivieren diese, wodurch Guanin-Nukleotid-Austauschfaktoren (GEF) wie SOS1 zur Zellmembran rekrutiert werden. Diese katalysieren den Austausch von an KRAS gekoppeltem GDP zu GTP, womit KRAS in einen aktiven Zustand versetzt wird. Eine intrinsische GTPase-Aktivität, unterstützt durch GTPase-aktivierende Proteine (GAP), sorgt wiederum für die Hydrolyse von GTP zu GDP, wodurch KRAS in einen inaktiven Zustand versetzt wird. Aktiviertes KRAS stimuliert zahlreiche Signalkaskaden, die entscheidende Prozesse innerhalb der Zelle anstoßen. Beispielhaft sind vier Signalwege aufgeführt. Der PI3K-Signalweg steuert vor allem Proliferation und Zellwachstum. Der MAPK-Signalweg kontrolliert Prozesse wie Differenzierung und Apoptose. Weitere Signalwege wie TIAM (engl. T-cell lymphoma invasion and metastasis-inducing protein 1) und RALGDS (engl. Ral guanine nucleotide dissociation stimulator) können ebenfalls durch KRAS aktiviert werden und sind in den Vesikeltransport und die Organisation des Zytoskeletts involviert. Der mutationsbedingte Verlust der intrinsischen GTPase-Aktivität von KRAS, und der daraus resultierende permanent aktivierte Zustand, beschreibt den Schlüsselmoment der KRAS-bedingten Karzinogenese.

2.2.1 KRAS-Mutationen und Lungenkarzinom

Die häufigsten Mutationen des *KRAS*-Gens finden sich im Codon 12, Mutationen in den Codons 13 und 61 kommen ebenfalls vor, sind jedoch seltener. Am Codon 12 können hierbei die Mutationen G12C, G12V (Transversionen) und G12D (Transition) nach absteigender Häufigkeit genannt werden [20,36,91,145]. Die intrinsische GTPase-Aktivität des KRAS-Proteins in Zusammenspiel mit GTPase-

aktivierenden Proteinen (engl. GTPase-activating proteins, GAP) sorgen durch Hydrolyse des GTP zu GDP zu einer Überführung in den inaktiven Zustand. Durch die aufgeführten Mutationen kommt es zu einem Verlust der intrinsischen GTPase-Aktivität, woraus ein daueraktivierter Zustand des KRAS-Proteins resultiert. Daraus folgt eine persistierende Stimulation Zellproliferation-induzierender Signalkaskaden sowie eine Hochregulation von Überlebenssignalen. Diese Veränderung hat unregulierte Proliferation und Wachstum zur Folge und nimmt somit einen wichtigen Schritt innerhalb der Karzinogenese ein [36,91,110,145]. In Bezug auf das Lungenkarzinom treten *KRAS*-Mutationen fast ausschließlich in Adenokarzinomen auf und können in Plattenepithelkarzinomen nur selten nachgewiesen werden. In SCLC konnten *KRAS*-Mutationen bisher nicht beobachtet werden [140,145]. Es konnte außerdem ein Zusammenhang zwischen dem Rauchverhalten und der Art der detektierten Punktmutationen festgestellt werden. Transitionen treten dabei häufiger bei Nichtrauchern auf, während Transversionen eine Assoziation zum inhalativen Tabakkonsum aufweisen [91,112]. Die Mutation G12C ist mit einem Anteil von 43 % die häufigste *KRAS*-Mutation des Lungenkarzinoms und tritt deutlich häufiger bei Rauchern als bei Nichtrauchern auf. Sie ist ebenfalls häufiger bei Frauen zu beobachten, die dabei ein früheres Erkrankungsalter als Männer mit der gleichen Mutation aufweisen. Diese Beobachtungen stützen die Vermutung, dass Frauen insgesamt eine höhere Anfälligkeit für Tabakkarzinogene besitzen [1,29]. Die Daten zur prognostischen Auswirkung einer nachgewiesenen *KRAS*-Mutation sind zum Teil widersprüchlich. Tendenziell geht man jedoch eher davon aus, dass sich *KRAS*-Mutationen negativ auf die Prognose der Patienten mit fortgeschrittenem NSCLC auswirken [39,91].

2.2.2 KRAS-getriebene NSCLC im Mausmodell

Johnson et al. gelang es einen Mausstamm zu etablieren, welcher insbesondere das Frühstadium eines durch *Kras*-Mutation induzierten Lungenkarzinoms modelliert. Hierbei wurden in vitro latent onkogene Allele konstruiert, indem das eine G12D-Mutation tragende Exon 1 des *Kras*-Gens in den *Kras*-locus von embryonalen Stammzellen integriert wurde. Da es sich bei *Kras* um ein essenzielles Gen der Maus handelt, sind demnach nur heterozygote Exemplare lebensfähig, wohingegen homozygote Mäuse nicht lebensfähig sind. Durch spontane Rekombinationsereignisse in vivo kommt es zu einer Aktivierung des latent onkogenen Allels. Obwohl dieses Ereignis grundsätzlich jede Zelle der Maus betreffen kann, kommt es in den meisten Fällen ausschließlich zu einer Ausbildung multipler multifokaler Lungentumore. Diese können wiederum bei 100 % der als C57BL/6N *Kras*^{LA1} bezeichneten Mäuse beobachtet werden und erstrecken sich histopathologisch von leichten Alveolarepithelhyperplasien bis hin zu Lungenkarzinomen. Letztere ähneln dem menschlichen NSCLC, dabei insbesondere humanen Adenokarzinomen. Damit geht eine durchschnittliche Überlebensrate der Mäuse von 300 Tagen einher [61]. Zu immunhistochemischen Analysen der Lungentumore der C57BL/6N *Kras*^{LA1}-Mäuse wurden bisher vor allem zwei epitheliale Marker herangezogen. Es erfolgte zum einen die Färbung des sekretorischen Proteins Surfactant Protein C

(SFTPC), welches als Marker der Typ-II-Alveolarepithelzellen dient. Zum anderen wurde die Expression von Secretoglobin 1A1 (engl. secretoglobin family 1A member 1, SCGB1A1) betrachtet, welches ebenfalls als Sekretorisches Keulenzell-Protein (engl. club-cell secretory protein, CCSP) bezeichnet wird. Dieser Keulenzell-spezifische Marker dient der Identifikation des Atemwegepithels. In den Lungentumoren der C57BL/6N *Kras*^{LA1}-Mäuse konnte immunhistochemisch eine SFTPC-Expression detektiert, jedoch keine SCGB1A1-Expression festgestellt werden. Diese Konstellation deutet auf eine Typ-II-Pneumozyten-Zelllinie hin und konnte ebenfalls häufig in humanen Adenokarzinomen nachgewiesen werden [26,60,61,94].

Im Folgenden werden die C57BL/6N *Kras*^{LA1}-Mäuse vereinfachend als „*Kras*-Mäuse“ bezeichnet.

2.3 Organoide

Organoiden sind aus Vorläuferzellen entstehende, selbstorganisierende in vitro-Modelle in Form von dreidimensionalen Zellstrukturen. Dabei bilden Organoiden die zentralen biologischen Eigenschaften von Geweben beziehungsweise Organen ab und dienen somit der Modellierung von Organen oder auch Tumoren. Hierzu werden spezielle Kultivierungsverfahren genutzt, welche ein dreidimensionales Wachstum der zu kultivierenden Zellen ermöglichen. Mittels dieser 3D-Kultursysteme kann ein Zellkulturmodell erzeugt werden, das einem Organ beziehungsweise Gewebe bezüglich Gen- und Proteinexpression, Stoffwechselfunktion sowie mikroskopischer Gewebearchitektur deutlich mehr entspricht als vergleichbare 2D-Kultursysteme [104,155]. Organoiden setzen sich, je nach angewandeter Methode, aus mehreren Zelltypen zusammen, welche die Fähigkeit zur Selbstorganisation aufweisen [73,151]. All diese Eigenschaften machen Organoiden zu einem vielversprechenden Forschungsansatz für verschiedenste Bereiche und bergen außerdem ein großes Potenzial zur Reduktion von Tierversuchen [48,155].

Nach Zhao et al. zeichnet sich das Verfahren einer Organoid-Zellkultur durch fünf verschiedene Hauptkomponenten aus. Von besonderer Bedeutung sind demnach die zellulären Ausgangspopulationen, die Extrazelluläre Matrix, lösliche Faktoren, physikalische Komponenten und Elemente der sogenannten Gewebekonstruktion beziehungsweise Gewebezüchtung (engl. Tissue Engineering) [155]. In Hinblick auf die zelluläre Ausgangspopulation können Organoiden grundsätzlich aus induzierten pluripotenten Stammzellen (iPSC) und aus Gewebe isolierten beziehungsweise abgeleiteten Stammzellen (engl. tissue-derived cells, TDC) differenziert werden. Wie gewebsspezifische Stamm- beziehungsweise Vorläuferzellen können auch isolierte Tumorzellen zu Organoiden differenziert werden [48,69,93,155]. Synthetisch hergestellte oder biologisch abgeleitete Äquivalente zur extrazellulären Matrix (EZM) ermöglichen das dreidimensionale Wachstum der Organoiden [155]. Ein biologisch abgeleitetes EZM-Analogon stellt hierbei Matrigel dar. Matrigel wurde 1977 erstmals von Orkin et al. beschrieben, wird aus Engelbreth-Holm-Swarm Maussarkomen gewonnen und setzt sich vor allem aus Laminin (ca. 60 %), Kollagen IV (ca. 30 %), Entactin (ca. 8 %) und Perlecan (ca. 2-3 %) zusammen. Damit weist es eine vergleichbare Zusammensetzung wie die

Basalmembran auf und kann als extrazelluläre Basalmembranmatrix bezeichnet werden [2,102]. Neben Gelen, die auf natürlichen Substanzen wie Kollagen I basieren, existieren außerdem synthetische Alternativen zu Matrigel. Synthetische Hydrogele können zum Beispiel mittels Polyacrylamid (PAM) oder Polyethylenglykol (PEG) erzeugt werden [104]. Zusätzlich zu genannten Strukturproteinen besitzt Matrigel insgesamt eine sehr variable Zusammensetzung und enthält unterschiedliche Konzentrationen von Wachstumsfaktoren, Transkriptionsfaktoren und Zytokinen [2]. Trotz bereits erforschter Alternativen und der unspezifischen, variablen Zusammensetzung des Matrigels, stellt es jedoch weiterhin eine meist unverzichtbare und weit verbreitete Komponente bei der Kultivierung von Organoiden dar [2,155]. Die dritte Hauptkomponente der 3D-Organoidkultur bilden lösliche Faktoren. Diese umfassen Wachstumsfaktoren und niedermolekulare Verbindungen und nehmen Einfluss auf Wachstum und Differenzierung der Organoid-bildenden Zellen. Physikalische Faktoren, wie zum Beispiel regulierende Bioreaktoren, welche der Gewährleistung einer kontinuierlichen Nährstoffdiffusion und der Beseitigung von Zellabfällen dienen, sowie Tissue Engineering-Elemente, wie beispielsweise Bioprinting-Verfahren, komplettieren als vierte und fünfte Hauptkomponente das Kultursystem von Organoiden [155]. Eine schematische Darstellung eines Organoids mit den Hauptkomponenten der 3D-Kultivierung ist in Abbildung 2 skizziert.

Organoiden bieten vielfältige Möglichkeiten in Hinblick auf deren Einsatz in verschiedensten Forschungsbereichen. Neben der Grundlagenforschung an humanen oder murinen Organoiden finden diese Zellkulturmodelle Anwendung im Bereich der präklinischen Forschung. Hierbei sind beispielsweise die Arzneimittelforschung oder die Präzisionsmedizin relevante Anwendungsbereiche [155]. Aus Patientengewebe kultivierte Tumorganoiden spiegeln die verschiedenen essenziellen Eigenschaften des Tumorgewebes wie beispielsweise genomische Veränderungen und molekulare Eigenschaften wider und werden für die personalisierte Krebsbehandlung und die Arzneimittelentwicklung verwendet [33,117,148]. Weitere Einsatzmöglichkeiten finden sich im Bereich der regenerativen Medizin, der Erforschung von Infektionskrankheiten sowie der Erforschung der Pathophysiologie häufiger und seltener Erkrankungen. Organoiden können außerdem als Ausgangsmaterial für Xenotransplantate dienen [73,117,155]. Eine weitere wichtige potenzielle Errungenschaft der Organoid-Forschung könnte die Reduktion von Tierversuchen sein [48,65]. Letztlich wird im Rahmen der Organoid-Forschung die Zukunftsvision verfolgt, mittels Tissue-Engineering und Bioprinting-Technologien zu erreichen, dass die Konstruktion von künstlichem, funktionstüchtigem Gewebe umsetzbar wird [48].

Das Verfahren einer dreidimensionalen Zellkultur in Form von Organoiden weist trotz den bereits aufgeführten vorteilhaften Aspekten gegenüber konventionellen 2D-Zellkultursystemen weiterhin einige Limitationen auf, welche die möglichst realitätsnahe Modellierung von Gewebe behindern. Hierbei können zunächst die Abwesenheiten von Zellpopulationen wie Immunzellen oder mesenchymale Zellen in einigen Modellen aufgeführt werden, die modifizierend hinsichtlich der physiologischen Stammzellnische wirken [48,155]. So werden insbesondere Tumorganoiden meist in

Abwesenheit dieser Zellpopulationen kultiviert, welche imstande sind, die Tumorgewebe zu infiltrieren und das Potenzial besitzen, maßgeblich das Tumorwachstum, die Beschaffenheit des Tumors und das Ansprechen auf Therapien zu regulieren [33,147,148]. In Bezug auf weitere Limitationen dieses Zellkultursystems können die fehlende Vaskularisation und Innervation sowie die Abwesenheit eines Mikrobioms ebenfalls in die Betrachtung miteinbezogen werden. Diese Elemente können einen bedeutenden Einfluss auf das Wachstums- und Differenzierungsverhalten von Stammzellen und Tumorzellen nehmen [48,73,148,151,155]. Ein weiterer limitierender Faktor der Organoid-Zellkultur liegt im dreidimensionalen, kugelig-zystischen Wachstum einiger Organoide. Durch die Ausbildung eines zentralen Lumens kann es bei entsprechender Kultivierungsdauer zu einer Ansammlung von Zelltrümmern in ebendiesem kommen, was sich negativ auf die Reifung und Funktion der Organoid-bildenden Zellen auswirkt [48,155]. Die Kultivierung unter Verwendung von Matrigel-haltigen EZM-Analoga sorgt aufgrund der variablen Zusammensetzung häufig für eine hohe inter- und intraorganoidale Variabilität bezüglich der Zellzusammensetzung und des Wachstumsverhaltens. Dies wirkt sich ebenfalls nachteilig auf eine möglichst homologe Kultivierung von Gewebe aus. Insbesondere bei Verwendung mehrerer Zellpopulationen sinkt die Reproduzierbarkeit, weshalb methodisch reduzierte Organoidmodelle eine weiterhin attraktive Alternative darstellen [155]. Bei allen aufgeführten Limitationen der dreidimensionalen Zellkultursysteme existieren jeweilige Ansätze, die die Repräsentativität der Organoide hinsichtlich der Abbildung eines physiologischen Gewebes erhöhen sollen. Hierbei sind vor allem Bioengineering-Verfahren wie Organs-on-a-chip-Systeme oder Bioprinting wichtige Methoden, um dieses Kultursystem weiter zu verbessern [48,137,151,156].

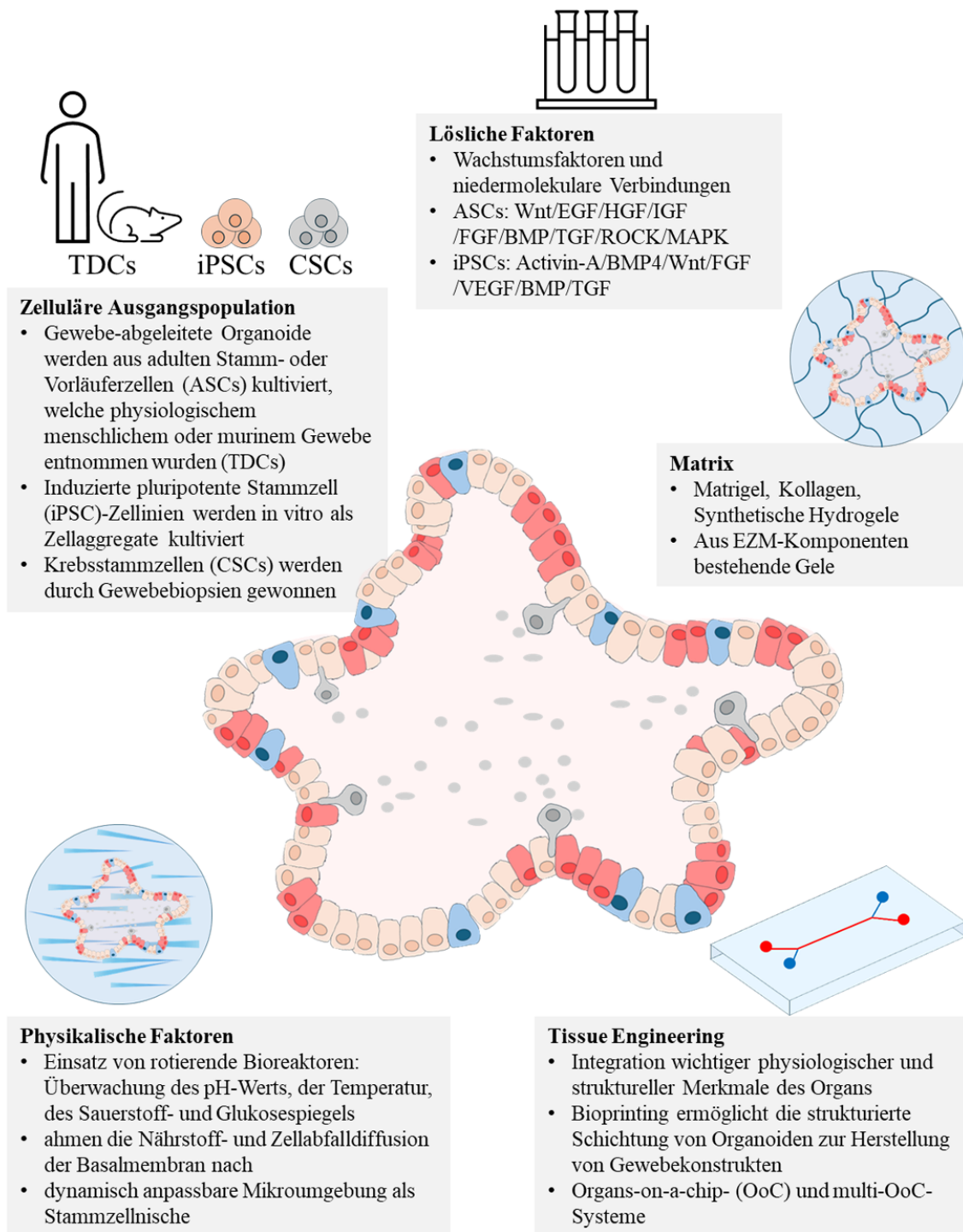


Abbildung 2: Die fünf Hauptkomponenten der 3D-Zellkultur (nach Zhao et al [155])

Schematische Darstellung eines aus verschiedenen Zellpopulationen bestehenden einschichtigen Organoids mit nekrotischen Zelltrümmern im flüssigkeitsgefüllten Lumen der sphärischen Struktur. Darstellung der fünf Hauptkomponenten der 3D-Kultivierung (Zelluläre Ausgangspopulation, Lösliche Faktoren, Matrix, Physikalische Faktoren, Tissue Engineering). EGF (engl. epidermal growth factor), Epidermaler Wachstumsfaktor; HGF (engl. hepatocyte growth factor), Hepatozyten-Wachstumsfaktor; IGF (engl. insulin-like growth factor), insulinähnlicher Wachstumsfaktor; FGF (engl. fibroblast growth factor), Fibroblasten-Wachstumsfaktor; BMP (engl. bone morphogenetic proteins), Knochenmorphogenetische Proteine; TGF (engl. Transforming growth factor), transformierender Wachstumsfaktor; ROCK, Rho-Kinase; MAPK (engl. Mitogen-activated protein kinase), Mitogen-aktivierte Proteinkinase; VEGF (engl. Vascular Endothelial Growth Factor), Endothelwachstumsfaktor.

2.3.1 Lungenorganoide

Die Lunge besteht aus vielfältigen, spezialisierten Zellpopulationen, die jeweils unterschiedliche Funktionen innerhalb des Organs übernehmen. Das luftleitende System der Bronchien und Bronchiolen ist bei Menschen und Mäusen mit Kinozilien-tragenden Zellen, mit sekretorischen Zellen wie Becher- und Keulenzellen (ehemals Clara-Zellen; engl. Club-Cells) und mit Basalzellen ausgekleidet [8,98]. Letztere dienen als Vorläuferzellen des Atemwegepithels und sind im menschlichen respiratorischen Flimmerepithel ubiquitär vorhanden, bei der Maus beschränkt sich deren Präsenz auf die großen Atemwege [86,98,113]. Mäuse weisen gegenüber Menschen einen sehr niedrigen Anteil an Becherzellen auf. Der Gasaustausch findet in den Lungenbläschen (Alveolen) statt. Diese sind mit Alveolarepithelzellen (Pneumozyten) vom Typ I, welche die Gasaustauschfläche bilden, und vom Typ II ausgekleidet, welche Proteine zur Reduktion der Oberflächenspannung (Surfactant) sezernieren [8].

Um dieser Komplexität des Atemwegs- und Alveolarepithels möglichst gerecht zu werden, hat die Methodik der 3D-in-vitro-Zellkultursysteme auch im Bereich der Lungenforschung Anwendung gefunden. Hier werden Lungenorganoide zur in-vitro-Modellierung der Lungenentwicklung und der Organregeneration eingesetzt und dienen außerdem der grundlegenden Erforschung von Lungenerkrankungen sowie deren Behandlung [86]. Lungenorganoide wurden beispielsweise erfolgreich zur Erforschung des Virus SARS-CoV-2 im Rahmen der Covid-19-Pandemie eingesetzt [43,121,142].

Zur Kultivierung von Organoiden werden Zellpopulationen benötigt, die ein gewisses Stammzell- oder Vorläuferzellpotenzial besitzen. In der Lunge der Maus und des Menschen kommen hierfür Basal- und Keulenzellen im Bereich des Atemwegepithels infrage, im Alveolarraum Typ-II-Pneumozyten [23,149]. Im Bereich des bronchoalveolären Übergangs der Maus (engl. bronchioalveolar duct junction, BADJ) sind Bronchoalveoläre Stammzellen (engl. bronchioalveolar stem cells, BASCs) lokalisiert. Diese können sowohl in Atemwegs- als auch in Alveolarepithelzellen differenzieren und bieten damit ebenfalls eine der dreidimensionalen Kultivierung zugängliche Zellpopulation [64]. Die Existenz einer BASC-äquivalenten Zellpopulation in der menschlichen Lunge konnte bisher noch nicht bewiesen werden, insgesamt deuten die Forschungsdaten jedoch darauf hin [9].

Basalzellen sind relativ undifferenzierte Vorläuferzellen. Zytokeratin 5 (KRT5), Zytokeratin 14 sowie der Transkriptionsmarker Trp63 sind charakteristische Basalzellmarker [86,113]. Organoide aus Basalzellen sind sowohl bei der Maus als auch beim Menschen etabliert. In beiden Fällen können die gewünschten Primärzellen mittels Fluoreszenz-aktivierter Zellsortierung (engl. Fluorescence-activated cell sorting, FACS) oder magnetischer Zellseparation (engl. magnetic activated cell sorting, MACS) isoliert werden. Die Technik der FACS wird meist ebenfalls zur Primärzellisolation im Rahmen der etablierten Keulenzell- und Typ-II-Pneumozyten-Organoide verwendet. Organoide, die aus murinen Basalzellen kultiviert werden, weisen in den meisten Fällen einen zweischichtigen Wandaufbau auf. Dabei nehmen KRT5-positive Basalzellen die äußere Schicht ein, Keratin 8 (KRT8)-positive

Flimmerzellen und sekretorische Zellen bilden die innere Schicht [8,86]. Organoide aus menschlichen Basalzellen setzen sich hauptsächlich aus Basalzellen, Flimmerzellen und Becherzellen zusammen [46]. Die Basalzellen zur Kultivierung menschlicher Lungenorganoide stammen entweder aus Lungenexplantaten, Lungenteilresektionen oder aus bronchoskopisch gewonnenen Bürstenbiopsien beziehungsweise Endobronchialbiopsien [8].

In den Atemwegen der Maus besitzen SCGB1A1-exprimierende Keulenzellen ebenfalls Stammzeleigenschaften. Sie sind in der Lage sich selbst nach einem Gewebeschaden zu erneuern, können jedoch auch in Flimmerepithelzellen differenzieren [109]. Ob diese Eigenschaften auch auf menschliche Keulenzellen zutreffen, ist derzeit noch unklar [86]. Organoide aus sekretorischen Zellen der Atemwege wurden bisher aus Keulenzellen der Maus kultiviert, indem sich diese gemeinsam mit Lungenstromazellen in einer Co-Kultur befanden. Dabei konnten bronchiale, alveoläre und bronchoalveoläre Organoide beobachtet werden [75]. Aufgrund dieser phänotypischen Plastizität von Keulenzellen, die es ebenfalls ermöglicht zu Pneumozyten zu differenzieren, wurde die Vermutung aufgestellt, dass es sich bei Keulenzellen um eine heterogene Population handelt [8,86].

Typ-II-Pneumozyten fungieren in den Alveolen als Stammzellen, die nach Gewebeschäden für eine Regeneration ihrer eigenen Population und der Population der Typ-I-Pneumozyten sorgen [7,26,68,86]. Organoide auf Basis muriner Typ-II-Pneumozyten werden bisher vor allem mittels Co-Kultivierung mit mesenchymalen Zellpopulationen in Matrigel gezüchtet [8,86]. Hierzu werden unter anderem Thrombozytenwachstumsfaktor-Rezeptor α (engl. Platelet-derived growth factor α , PDGFR α) -positive Fibroblasten verwendet. Die in dieser Konstellation gewachsenen Organoide bestehen aus einer äußeren Schicht SFTPC-positiven Typ-II-Pneumozyten und einer inneren Schicht Typ-I-Pneumozyten. Sie werden als Alveosphären bezeichnet [7]. Eine Kultivierung von Organoiden aus isolierten humanen Typ-II-Pneumozyten konnte erfolgreich mit und ohne Co-Kultur mit Fibroblasten durchgeführt werden [153]. Eine Co-Kultivierung humaner Alveolarepithelzellen vom Typ II mit adulten menschlichen Lungenmesenchymzellen resultierte in einer Transdifferenzierung der Alveolarepithelzellen in KRT5-positive Basalzellen [63].

BASCs exprimieren Marker des Atemwegsepithels (SCGB1A1) und des Alveolarepithels (SFTPC), was deren Stammzeleigenschaften hervorhebt, in Atemwegsepithel und Alveolarepithel differenzieren zu können [82]. Organoide aus murinen BASCs konnten bisher in Co-Kultur mit primären Lungenendothelzellen der Maus herangezüchtet werden und führten zu bronchialen, alveolären und bronchoalveolären Organoiden [74].

Eine weitere Option zur Kultivierung von humanen Lungenorganoiden ist die Verwendung humaner pluripotenter Stammzellen (engl. human pluripotent stem cell, hPSC) [52]. Von hPSCs abgeleitete Organoide haben dabei den Vorteil durch CRISPR/Cas9-Gen-Editierung manipuliert werden zu können, um damit eine möglichst genaue Modellierung einer genetischen Lungenerkrankung zu konstruieren [23,86,135].

2.3.2 Tumororganoide

Das Prinzip einer 3D-Organoidkultur kann neben der Modellierung physiologischen Gewebes ebenfalls zur Kultivierung maligne entarteter Zellpopulationen eingesetzt werden, um menschliche oder murine Krebserkrankungen zu modellieren. Tumororganoide des Menschen werden unter anderem als enorm vielversprechend im Rahmen der Präzisionsmedizin und der personalisierten Medizin angesehen und könnten zukünftig den Schritt hin zur regelhaften Anwendung in verschiedenen Bereichen der präklinischen Forschung beschreiten [32,33,70,147–149]. Beim Menschen stehen vor allem von Patientengewebe abgeleitete Organoiden (engl. patient-derived organoids, PDOs) im Fokus [11]. Dabei wird biopsiertes Tumorgewebe eines Patienten in einem speziellen Kulturmilieu zu einem dreidimensionalen Modell des Primärtumors kultiviert [32]. Neben der Krebsmodellierung stehen PDOs beispielsweise Experimenten zur Wirksamkeitsprüfung verschiedener medikamentöser Therapieoptionen im Sinne einer personalisierten Krebstherapie zur Verfügung. Weiterhin können sie der Untersuchung des Mutationsstatus einer Neoplasie sowie der genetischen Heterogenität innerhalb und zwischen Tumoren dienen, oder in sogenannten lebenden Biobänken konserviert werden, die wiederum zur Entwicklung neuer Medikamente verwendet werden können [32,70,147].

Tumororganoide weisen auch langfristig eine ausreichende genetische und morphologische Stabilität auf, um die Schlüsselmerkmale der Ursprungsneoplasie abzubilden [119,124,148]. Gegenüber etablierten humanen Krebsmodellen wie Krebszelllinien und patientenabgeleiteten Xenotransplantaten (engl. patient-derived xenografts, PDXs) liegen verschiedene Vorteile, aber auch Nachteile vor [53]. Beispielsweise sind konventionelle Krebszelllinien zur schnellen und kostengünstigen Etablierung von Krebsmodellen geeignet, bilden die Komplexität von unter anderem Lungenkrebs durch den Verlust der dreidimensionalen Struktur im Gegensatz zu Organoiden jedoch nicht ausreichend ab [66,143]. Im Vergleich zu PDXs benötigen Tumororganoide weniger Zeit und Gewebe zur Kultivierung. Xenotransplantate bringen außerdem deutliche ethische Bedenken bezüglich des Tierschutzes mit sich [143,148]. Ein Nachteil der Krebsmodellierung durch Organoiden gegenüber PDXs ist unter anderem die fehlende Vaskularisation und die fehlende Interaktion zwischen dem Tumor und dem Immunsystems des Patienten beziehungsweise des Wirts [53]. Die Modifizierung der Modellierung einer möglichst physiologischen Tumormikroumgebung, mittels Co-Kultivierung durch Immunzellen, Stromazellen und Nervenzellen, wird eine zukünftige Herausforderung sein, um dieses Krebsmodell weiter zu verbessern [53,144,147].

2.3.3 Lungenkrebsorganoide

Im Hinblick auf das Lungenkarzinom bestehen ebenfalls Bestrebungen, Patienten-abgeleitete Lungenkrebsorganoide im Rahmen der Präzisionsmedizin zu etablieren. Diesbezüglich können diese als auf den jeweiligen Patienten zugeschnittene Modelle des Lungenkarzinoms dienen, um das Therapieansprechen auf bestimmte Chemotherapeutika oder zielgerichtete Therapien zu überprüfen [66,79,83,143,150,154]. Lungenkrebs zeichnet sich neben einer genomischen und phänotypischen

Diversität zwischen Patienten auch durch eine intratumorale Heterogenität aus [66]. Daher sollte auch der Anspruch eines Lungenkrebsmodells sein, diese Heterogenität stabil abzubilden [143]. Den Erkenntnissen neuerer Studien zufolge behalten Patienten-abgeleitete Lungenkrebsorganoide die zentralen molekularen und pathologischen Eigenschaften des jeweiligen Ursprungstumors bei, inklusive dessen intratumoraler Heterogenität [66,127,143]. In einer Studie von Wang et al. konnte außerdem gezeigt werden, dass die Ergebnisse der mit diesen PDOs durchgeführten Medikamentenscreenings in hohem Maß mit dem klinischen Ansprechen des jeweiligen Patienten übereinstimmten [143]. Die Perspektive eines Einsatzes der Organoidkultur in der personalisierten Lungenkarzinomtherapie wird hingegen von anderen Autoren kritisch hinterfragt. Hierbei wird vor allem die niedrige Etablierungsrate aufgeführt und die Beobachtung herausgestellt, dass Lungenkrebsorganoide des Menschen häufig durch Organoide aus physiologischen Atemwegszellen überwachsen werden [28]. Diesbezüglich sind somit weitere Modifizierungen der Kultivierungsprotokolle nötig, um Lungentumororganoide des Menschen effizienter isolieren zu können [17].

Neben diesen bereits in die Nähe gerückten Perspektiven im Rahmen der präklinischen und klinischen Forschung an humanen PDOs, werden Organoide aus Krebszellen als eine zukünftige wichtige Informationsquelle der Grundlagenforschung und der translationalen Forschung angesehen [148,149]. Im Bereich der Grundlagenforschung kommen zur Modellierung von Lungenkrebs ebenfalls Lungentumororganoide murinen Ursprungs zum Einsatz. In einer aktuellen Studie von Dost et al. wurden beispielsweise Typ-II-Alveolarepithelzellen mithilfe komplexer FACS-Protokolle aus genetisch modifizierten Mäusen isoliert und anschließend zu Organoiden kultiviert. Hierdurch sollte ein durch KRAS-Aktivierung initiiertes Modell zur Entstehung und Progression von Lungenadenokarzinomen erstellt werden [31].

2.3.4 Murine KRAS-getriebene Lungentumor-Organoid

In einer Arbeit von Tien et al. aus dem Jahr 2021 wurde ein 3D-Tumororganoid-Zellkulturmodell aus Lungentumorzellen von *Kras*-Mäusen beschrieben. Dabei wurden den Mauslungen Tumorknoten entnommen, diese anschließend in Einzelzellen dissoziiert und in einem speziellen Kulturmedium inklusive Matrigel ausgebracht. Dabei konnte beobachtet werden, dass der Knockout des Gens *Argonaute2* (*Ago2*) zu einem geringeren Größenwachstum der Organoide führte. Die Organoide wurden in der geschilderten Arbeit von Tien et al. nicht weiter charakterisiert [139]. Das Protokoll von Tien et al. sollte in dieser Arbeit aufgegriffen, modifiziert und die potenziell wachsenden Tumorganoide charakterisiert werden.

2.4 Fragestellung

Tierexperimente beanspruchen zahlreiche Forschungstiere, bleiben aber dennoch ein wichtiger Bestandteil der Grundlagenforschung. Die Tierschutzgesetze zahlreicher Staaten unterlagen in den letzten Jahren weiteren Verschärfungen, um die Zahl der getöteten Forschungstiere weiter zu reduzieren und deren Lebensbedingungen zu verbessern. Vor diesem Hintergrund wird eine Modell-basierte Grundlagenforschung mittels Zellkultur immer relevanter, um den weiteren Fortschritt der Forschung auf diesem Gebiet weiterhin zu gewährleisten und den Bedarf an Forschungstieren dabei gleichzeitig auf ein ethisch vertretbares Mindestmaß zu reduzieren. Die grundlegende Erforschung des Bronchialkarzinoms, welches noch immer eine hohe Inzidenz und Mortalität in Deutschland sowie weltweit aufweist, besitzt somit weiterhin große Relevanz.

Unter diesen Gesichtspunkten war es das Ziel dieser Arbeit ein niederschwellig durchführbares Zellkulturmodell zu etablieren, welches es möglich macht, im Frühstadium befindliche Lungentumorzellen der Maus in einem 3D-Organoidmodell zu kultivieren. Dazu sollten aus *Kras*-Mäusen isolierte Tumorknoten in Einzelzellen dissoziiert und in Zellkultur gebracht werden, um in Form von 3D-Organoiden zu proliferieren [139]. Die hierbei gewachsenen Organoide sollten immunhistochemisch charakterisiert werden, um diese dem Tumor-in-vivo zuordnen zu können. Außerdem sollte deren Wachstumsverhalten dokumentiert und quantifiziert werden. Es sollte ebenfalls untersucht werden, ob es unter identischen Versuchsbedingungen auch zu einem Organoidwachstum aus Lungenparenchym von Wildtyp-Mäusen kommen würde. Falls es hierbei ebenfalls zu einem Organoidwachstum käme, sollte über das Wachstumsverhalten und immunhistochemisch ermittelt werden, ob sich diese von den Tumororganoiden unterscheiden. Weiterhin stellte sich die Frage, ob die Möglichkeit besteht, die gewachsenen Organoide zu passagieren und ob sich anschließend deren Differenzierung anhand der immunhistochemischen Eigenschaften von der Ursprungskultur unterscheidet. Zuletzt sollte erfasst werden, ob sich das Wachstumsverhalten der Tumororganoide beeinflussen lässt, wenn diese in Co-Kultur mit Immunzellen in Form von Alveolarmakrophagen ausgebracht wurden.

3. Material und Methodik

3.1 Material

3.1.1 Übersicht der verwendeten Geräte

Die Geräte, die zur Durchführung der Experimente dieser Arbeit Verwendung fanden, sind in der nachfolgenden Tabelle (Tabelle 1) alphabetisch geordnet aufgelistet. Deren Hersteller samt Firmensitz sind ebenfalls aufgeführt.

Tabelle 1: Auflistung der verwendeten Geräte mit Hersteller

Gerätebezeichnung	Hersteller
Analysewaage ABS 120-4N	Kern, Balingen, Deutschland
Brutschrank Hera Cell	Heraeus, Hanau, Deutschland
Lichtmikroskop Axiovert 25	Zeiss, Oberkochen, Deutschland
Lichtmikroskop DM750	Leica, Wetzlar, Deutschland
Lichtmikroskop SMZ-168	Motic, Xiam, China
Mikroskop BX51	Olympus, Shinjuku, Japan
Reagenzglasschüttler Vortex-2 Genie	Scientific Industries, Bohemia, USA
Schlittenmikrotom SM 2000R	Leica, Wetzlar, Deutschland
Sterilbank Hera Safe	Heraeus, Hanau, Deutschland
Systemkamera Canon EOS 600D	Canon, Ota, Japan
Inkubationsbad	GFL, Burgwedel, Deutschland
Inkubationsschüttler Certomat RM und H	B.Braun Biotech International, Berlin, Deutschland
Zentrifuge Allegra X-30R	Beckman Coulter, Brea, USA
Zentrifuge Cellspin II	Tharmac, Wiesbaden, Deutschland
Zentrifuge Heraeus Labofuge 400	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Zentrifuge Heraeus Megafuge 1.0 R	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Zählkammer Neubauer improved	Marienfeld Superior, Lauda-Königshofen, Deutschland

3.1.2 Übersicht der verwendeten Lösungen und Chemikalien

Die Lösungen und Chemikalien, die zur Durchführung der Experimente dieser Arbeit Verwendung fanden, sind in der nachfolgenden Tabelle (Tabelle 2) aufgelistet. Deren Zusammensetzung sowie deren Hersteller sind ebenfalls aufgeführt.

Tabelle 2: Auflistung der verwendeten Lösungen und Chemikalien

Bezeichnung	Zusammensetzung / Hersteller
10 x PBS	NaCl (8 g/l), KCL (0,2 g/l), Na ₂ HPO ₄ (1,44 g/l) x 2 H ₂ O, KH ₂ PO ₄ (0,24 g/l), pH 7,4
3-Amino-9-ethylcarbazol (AEC)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Agaroselösung 3%	Roth, Karlsruhe, Deutschland
BSA	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Cell Recovery Solution (CRS)	Corning, New York, USA
EDTA	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Formalinlösung 4%	108 ml 37% Formaldehydlösung mit 1 x PBS auf 1 L auffüllen
H ₂ O ₂	Acros Organics, Schwerte, Deutschland
Hämatoxylinlösung nach Mayer	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Matrigel	Corning, New York, USA
Trypsin	Gibco, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA

3.1.3 Weitere verwendete Materialien

Weitere verwendete Materialien wie Verbrauchsartikel, Kunststoffwaren, Kits, Antikörper, Bestandteile des Zellkulturmediums und Computerprogramme sowie deren Hersteller, die in den vorausgegangenen Tabellen nicht aufgelisteten wurden, sind dem entsprechenden Methodenteil zu entnehmen.

3.1.4 Software

Zur Datenerfassung und -verarbeitung sowie zum schriftlichen Verfassen dieser Arbeit wurden Komponenten des Microsoft-Office-Paketes (Microsoft, Redmond, USA) verwendet. Dabei diente Microsoft Word als Textverarbeitungsprogramm, Microsoft Excel wurde zur Tabellenkalkulation verwendet und Microsoft PowerPoint fand in der Anordnung und Erstellung von Abbildungen Verwendung. Die Diagramme dieser Arbeit wurden mit GraphPad Prism 9 (Graphpad Software, Inc; San Diego, USA) erstellt, die statistische Datenanalyse erfolgte ebenfalls mit dieser Software.

Zur mikroskopischen Ansicht und Bildaufnahme der histologischen Schnitte diente das Programm Cellsens Dimensions 1.5 (Olympus, Shinjuku, Japan). Die Open-Source-Software ImageJ (Wayne Rasband (NIH), Bethesda, USA) wurde zur Bildverarbeitung und zur Vermessung der Organoide genutzt.

3.2 Methoden

3.2.1 Versuchstiere

Die Organentnahmen der im Folgenden aufgeführten Versuchstiere wurde durch das Landesamt für Soziales, Gesundheit und Verbraucherschutz des Saarlandes genehmigt und unter Einhaltung des deutschen Tierschutzgesetzes durchgeführt. Bei den verwendeten Versuchstieren handelte es sich um 150 bis 200 Tage alte B6.129S-Krastyj (*Kras*)-Mäuse. Diese bilden spontan multiple Lungentumore und zeigen eine mittlere Überlebenszeit von 300 Tagen [61]. Die *Kras*-Mäuse entstammten dabei der eigenen Zucht, deren Stamm wurde ursprünglich vom Frederick National Laboratory for Cancer Research (USA) erhalten. Des Weiteren dienten Wildtyp-Mäuse als Negativkontrolle. Alle Mäuse wurden unter Einhaltung des Tierschutzes gezüchtet. Die Euthanasie erfolgte vor Versuchsbeginn mittels intraabdomineller Injektion von Ketamin (525 mg/kg) und Xylazin (35 mg/kg) unter anschließender Gewährleistung eines sicheren Versterbens der Versuchstiere.

3.2.2 Probengewinnung und Zellkultur

3.2.2.1 Herstellung des Organoid Culture Medium (OCM)

Als Nähr- und Wachstumsmedium zur Kultivierung von Organoiden aus den isolierten murinen Zellen (Tumorgewebe und Lungenparenchym) diente eine Modifikation des Organoid Culture Mediums (OCM) nach Tien et al. [139]. Zur Herstellung des OCM wurde DMEF/F12 (Gibco, Thermo Fisher Scientific, USA) als Basis verwendet, supplementiert mit 1xITS (Insulin, Transferrin und Selenium; Invitrogen, USA), 0,5 % BPE (bovine pituitary extract; Gibco, Thermo Fisher Scientific, USA), 25 ng/ml mEGF (murine epidermal growth factor; PeproTech, USA), 100 nM Retinsäure (Cayman, USA), 0,1 % Primocin (Invivogen, USA) und 10 µM Y-27632 (ROCK inhibitor; Stem Cell, Canada).

3.2.2.2 Isolation der Tumorknoten aus *Kras*-Mäusen und Zellkultur

Die verwendeten B6.129S-Krastyj (*Kras*)-Mäuse wurden zunächst unter Einhaltung des Tierschutzes gezüchtet und euthanasiert. Ihre Lebensdauer betrug zwischen 150 und 200 Tagen. Die Anästhesie und Euthanasie erfolgte mit ausreichendem zeitlichem Abstand vor Versuchsbeginn mittels intraabdomineller Injektion von Ketamin (525 mg/kg) und Xylazin (35 mg/kg). Der definitiven Feststellung des Todes der Maus durch Prüfen des Zwischenzehenreflexes schloss sich die Eröffnung des murinen Thorax an. Nach der makroskopischen Präparation der Lungen folgte eine mikroskopische Präparation der Tumorknoten, wobei angrenzendes Lungenparenchym mit großzügigem Abstand zum Tumor entfernt wurde. Dabei wurde auf eine maximale Tumorausbeute pro Maus geachtet. Die durchschnittliche Anzahl betrug 10-15 Tumorknoten pro Maus, die mikroskopisch eindeutig als solche zu identifizieren waren. Die von Parenchym befreiten Tumorknoten wurden anschließend in steriler phosphatgepufferter Salzlösung (engl. phosphate buffered saline, PBS) gesammelt, wobei hierbei und in nachfolgenden Schritten ein 15 ml-Zentrifugenröhrchen (Corning Falcon, USA) als Gefäß genutzt

wurde. Nach dreiminütiger Zentrifugation mit 300 x g und nachfolgendem Absaugen (alternativ Abpipettieren) des PBS-Überstands, erfolgte unter Verwendung eines lungenspezifischen Dissoziations-Kits (Lung Dissoziation Kit mouse; Miltenyi Biotec, Deutschland) die Dissoziation in eine Einzelzelllösung. Hierbei wurde nach modifiziertem Herstellerprotokoll vorgegangen. Der gewählte Enzymmix wurde äquivalent zur Masse von zwei Mauslungen gewählt. Die Puffer- und Enzymlösungen wurden im Voraus exakt nach Herstellerprotokoll angesetzt und gelagert. Nach der Zugabe des Enzymmixes zu den abzentrifugierten und von PBS befreiten Tumorknoten wurde bei 37 °C und mindestens 1 Stunde Dissoziationszeit unter intermittierendem Schwenken im Inkubationsschüttler und Durchmischen mittels Pipette eine größtmögliche Gewinnung von Einzelzellen erreicht. Alternativ zum Lung Dissoziation Kit kann zur Einzelzell-Dissoziation ebenfalls eine Mischung aus Dispase, Kollagenase und Trypsin verwendet werden.

Nach drei- bis fünfminütiger Zentrifugation mit 300 x g und Absaugen des entstandenen Überstandes schloss sich die Waschung der Zellsuspension an, um eine möglichst vollständige Entfernung der Dissoziationslösung zu erreichen. Dabei wurde dem Zellpellet in jedem Waschgang 10 ml PBS zugesetzt und unter gründlichem Resuspendieren eine Wiederaufnahme des dissoziierten Gewebes in Lösung erzielt. Es schloss sich erneut eine drei- bis fünfminütige Zentrifugation bei 300 x g an, gefolgt von Absaugen des Überstandes. Dieser Waschgang wurde dabei zwei- bis dreimal wiederholt, wobei im letzten Waschgang auf Zentrifugation und Absaugung verzichtet und stattdessen eine Passage der PBS-Tumorzell-Suspension durch einen 70 µm Zellsieb (Corning Falcon, USA) durchgeführt wurde. Dazu wurde die Suspension mittels Pipette auf den Zellfilter transferiert, welcher vorher auf ein 50-ml-Zentrifugenröhrchen (Corning Falcon, USA) aufgesetzt wurde. Zum Zweck der größtmöglichen Gewinnung von Einzelzellen wurde der Zellfilter im Folgenden mit 2 ml sterilem PBS zusätzlich durchgespült.

Die gefilterte Einzelzellsuspension wurde darauffolgend unter sterilen Bedingungen (Sterilbank, Hera Safe) von PBS durch Zentrifugation befreit und in OCM aufgenommen. Fakultativ kann jedoch vor der Aufnahme in das Medium eine Lyse der möglicherweise im Zellpellet enthaltenen Erythrozyten mittels ACK Lysing Buffer (Gibco, Thermo Fisher Scientific, USA) durchgeführt werden. Eine Blutkontamination und hierbei insbesondere die Kontamination mit Erythrozyten kann die Organoidbildung und die Matrixstabilität beeinträchtigen [155]. Nach der anschließenden Zellzählung in einer Neubauer-Zählkammer und der, falls notwendigen, Verdünnung mit OCM, wurde eine Konzentration von 4×10^4 Zellen in 50 µl OCM erreicht. Abschließend wurde 50 µl der OCM-Einzelzellsuspension mit 50 µl Matrigel gemischt [139] und in den 6,5 mm-Transwell-Membraneinlagen einer 24-Well-Platte (Corning, USA) ausgebracht (100 µl pro Transwell-Membraneinlage). Matrigel diente hierbei als extrazelluläre Matrix, um ein dreidimensionales Wachstum der Organoide zu ermöglichen. Zur korrekten Handhabung des Matrigels musste dieses idealerweise 24 Stunden vor Versuchsdurchführung von -80 °C auf Eis transferiert werden, um bei 4 °C eine pipettierfähige Viskosität zu erreichen. Nach Gelieren des Matrigels für 15 Minuten bei 37 °C

wurden 500 µl OCM in das basolaterale Kompartiment der Well-Platte hinzugefügt. Diese wurde bei 37 °C inkubiert (Brutschrank Hera Cell).

Ein vollständiger Mediumwechsel des OCM erfolgte alle zwei Tage unter sterilen Bedingungen (Sterilbank Hera Safe). Das frisch hinzugegebene Medium wurde im Vorhinein in einem entsprechenden Falcon-Tube auf 37 °C im Inkubationsbad erwärmt.

3.2.2.3 Isolation von Lungenparenchym aus Wildtyp-Mäusen

Analog zur Durchführung des Protokolls zur Kultivierung von Tumororganoiden aus *Kras*-Mäusen wurde Lungenparenchym von Wildtyp-Mäusen in gleicher Weise präpariert und in Kultur gebracht. Dieses Vorgehen diente als Negativkontrolle.

3.2.2.4 Isolation der Alveolarmakrophagen

Zur Isolation der Alveolarmakrophagen wurde vor Entnahme der Lungen die murine Trachea freipräpariert und mit einer dem Lumen entsprechenden Venenverweilkanüle (Vasofix Braunüle, B. Braun SE, Deutschland) flach punktiert. Anschließend folgte eine fünfmalige bronchoalveoläre Lavage mit jeweils 1 ml sterilem PBS, wobei dieses nach vollständiger Aspiration in einem 50-ml-Zentrifugenröhrchen (Corning Falcon, USA) gesammelt wurde. Es schloss sich eine drei- bis fünfminütige Zentrifugation des Aspirats bei 300 x g mit darauffolgendem Absaugen des Überstandes sowie der Aufnahme des Zellpellets in Medium an. Dieses setzte sich zusammen aus RPMI (Gibco, Thermo Fisher Scientific, USA), supplementiert mit 10 % Fötales Kälberserum (Gibco, Thermo Fisher Scientific, USA), 100 U/ml Penicillin und 100 U/ml Streptomycin. Fakultativ kann jedoch bei makroskopisch erkennbarer Erythrozyten-Beimischung zum Zellpellet vor der Zugabe des Mediums eine Lyse der Erythrozyten mittels ACK Lysing Buffer (Gibco, Thermo Fisher Scientific, USA) durchgeführt werden. Nach der Zellzählung in einer Neubauer-Zählkammer und der korrekten Verdünnung mittels Zugabe von Medium wurden 2×10^4 Zellen pro Well auf eine 24-Well-Platte (Corning, USA) ausgebracht. Die Alveolarmakrophagen in Medium wurden anschließend bei 37 °C für 24 h inkubiert, um eine möglichst vollständige Adhäsion der Makrophagen am Boden des Wells zu erreichen. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die nicht adhärenen Zellen abgesaugt und anschließend zusätzlich mittels OCM ausgewaschen, gefolgt von der abschließenden Zugabe von 500 µl OCM pro Well. Zuletzt erfolgte der Transfer der Transwell-Membraneinlagen, welche die frisch ausgebrachten Tumorzellen in Matrigel enthielten, in die gewünschten Wells mit adhärenen Alveolarmakrophagen. Die Versuchsanordnung der Co-Kultur der Tumororganoiden mit Alveolarmakrophagen wird in Abbildung 3 verdeutlicht.

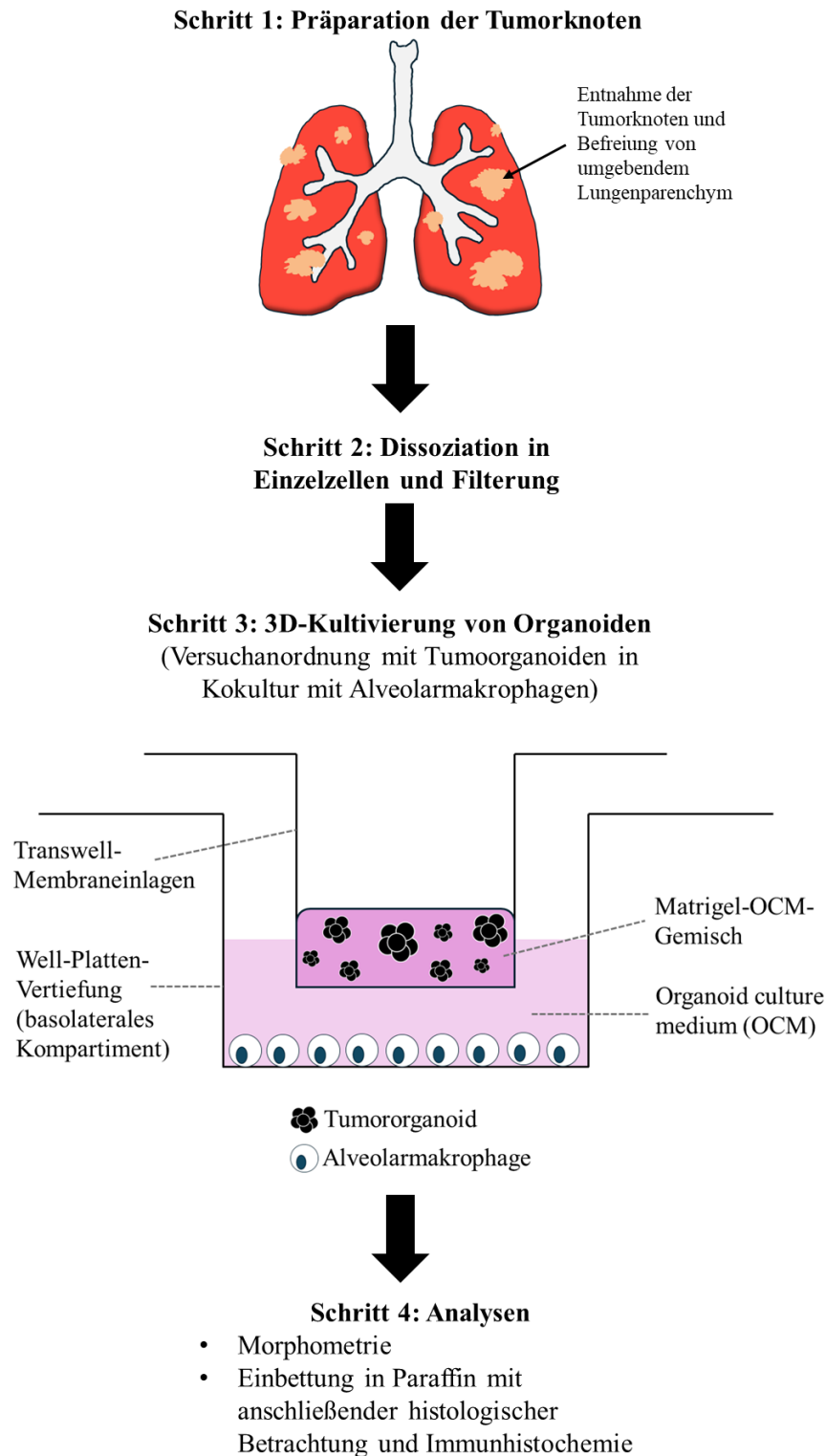


Abbildung 3: Schematische Darstellung der Methodik zur 3D-Kultivierung von Lungentumororganoiden in Co-Kultur mit Alveolarmakrophagen

Zunächst wurden Tumorknoten aus den Lungen der *Kras*-Mäuse herauspräpariert. Dies geschah unter Gewährleistung der Vermeidung einer Kontamination mit physiologischem Lungenparenchym. Der nachfolgenden Dissoziation der Tumorknoten in eine Einzelzelllösung und einer Filterung schloss sich das Ausbringen der Lungentumorzellen in eine Transwell-Membraneinlage mit einem Matrigel-OCM-Gemisch an. In der dargestellten Versuchsanordnung wurden diese mit am Boden des basolateralen Kompartiments adhärennten Alveolarmakrophagen co-kultiviert. Dieses Kompartiment enthielt ebenfalls die Nährlösung OCM. Der 8- bis 30-tägigen Kultivierung schloss sich die Einbettung der gewachsenen Tumororganoide in Paraffin mit darauffolgenden Analysen an (Histologie, Immunhistochemie).

3.2.3 Gewinnung der Organoide und Einbettung in Paraffin

Zur Durchführung der immunhistochemischen Analyse der gewachsenen Organoide erfolgte zunächst die Gewinnung der Organoide aus den Transwell-Membraneinlagen zur nachfolgenden Einbettung in Paraffinblöcke. Hierzu wurde das OCM des basolateralen Kompartments der Platte vollständig entfernt. Die Einbettung erfolgte hierbei nach 8 Tagen oder nach 30 Tagen Wachstumszeit. Darauffolgend wurden die Organoide mittels PBS gepufferter, 4%iger Formaldehydlösung mindestens 1 h fixiert, wobei in die Plattenvertiefungen inklusive Transwell-Membraneinlagen ein möglichst großes Volumen der Lösung eingebracht wurde, um die maximale Fixierungswirkung zu gewährleisten. Im Anschluss daran wurde durch mehrmaliges, vorsichtiges Resuspendieren unter Verwendung von Pipettenspitzen mit großer Öffnung (Axygen T-1005-WB-C-R, Corning, USA) eine Aufnahme der fixierten Organoide in die Pipettenspitze erreicht, woraufhin die Organoid-Formaldehyd-Suspension in einem 15 ml-Zentrifugenröhrchen (Corning Falcon, USA) gesammelt wurde. Die Zentrifugation, zunächst 1-2 Minuten bei 300 x g, wurde dann so lange wiederholt, bis alle Organoide sichtbar sedimentiert waren. Der Überstand wurde abgesaugt und das Organoidpellet in auf 60 °C erwärmtes 3%iges Agarosegel aufgenommen. Die Menge der Agaroselösung wurde in dem Maß gewählt, bis die konische Spitze des Zentrifugenröhrchens gefüllt war. Dies diente dem Zweck, eine angemessene Anzahl an abgebildeten Organoiden in jedem histologischen Schnitt zu erzielen, aber dennoch Spielraum in Bezug auf die Größe des anschließend in Paraffin eingebetteten Gewebeblocks zu erzeugen. Es schloss sich unmittelbar ein zügiges Vermischen der Suspension an, um eine größtmögliche Verteilung der Organoide im Agarosegel zu gewährleisten. Unter 10-minütiger Kühlung bei 4 °C erfolgte das Aushärten des Agarosegels mit abschließender Entfernung des gelierten Kegels aus dem Zentrifugenröhrchen unter Verwendung eines abgerundeten Spatels. Der Länge nach in Einbettkassetten gelagert, wurde der Gel-Kegel bis zur Einbettung in Paraffin mit PBS gepufferter, 4%iger Formaldehydlösung übergossen. Die Paraffineinbettung erfolgte im Institut für experimentelle Chirurgie der Universität des Saarlandes in etablierter Standardmethodik. Von den fertigen Paraffinblöcken wurden dann unter Verwendung eines Schlittenmikrotoms (Leica SM 2000R) 2 µm dicke Schnitte angefertigt, die bis zum Zeitpunkt der Färbung schmutz- und lichtgeschützt gelagert wurden.

3.2.4 Einbettung der *Kras*-Mauslungen

Die histologischen Schnitte ganzer *Kras*-Mauslungen, die als Positivkontrolle der immunhistochemischen Färbungen dienten, wurden freundlicherweise in bereits in Paraffin eingebetteter Form von der Arbeitsgruppe Prof. Dr. Dr. Robert Bals zur Verfügung gestellt. Von diesen wurden ebenfalls 2 µm dicke Schnitte angefertigt.

3.2.5 Passagieren der Tumor- und Lungenorganoide

Um aus den gewachsenen Organoiden eine Einzelzelllösung der Organoid-Zellen herzustellen und diese dann erneut in frischem Medium auf einer neuen Platte auszubringen, mussten diese zunächst möglichst vollständig aus der Matrigel-Matrix und den Transwell-Membraneinlagen herausgelöst werden. Dazu wurde, nach Entfernung des OCM aus der basolateralen Vertiefung der Platte, 300 µl Cell-Recovery-Solution (CRS) zu den Transwell-Membraneinlagen mit Organoiden hinzugegeben. Diese wurden dann bei 4 °C über einen Zeitraum von 15 Minuten gekühlt und anschließend, analog zur geschilderten Methode zur Gewinnung der Organoide, unter Zuhilfenahme der Pipettenspitzen mit weiter Öffnung (Axygen T-1005-WB-C-R, Corning, USA) in einem 15 ml-Zentrifugenröhrchen (Corning Falcon, USA) gesammelt. Dieser Vorgang wurde erneut mit 300 µl CRS zur besseren Ausbeute wiederholt. Die Organoid-CRS-Suspension wurde nachfolgend für 5 Minuten mit 300 x g zentrifugiert und der entstandene Überstand abgesaugt. Dem entstandenen Zellpellet wurde nun 300 µl Trypsin beigelegt und die sich ausbildende Suspension unter mehrmaligem Resuspendieren für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, wodurch der Zellverbund der Organoide erneut in Einzelzellen dissoziiert wurde.

Nach der dosierten Einwirkung des Trypsins folgte anschließend die Auswaschung der Protease durch Zugabe von 10 ml sterilem PBS, begleitet von ausgiebigem Resuspendieren. Der fünfminütigen Zentrifugation bei 300 x g sowie dem Absaugen des entstandenen Überstandes schloss sich die Aufnahme des Zellpellets in auf 37 °C erwärmten OCM an. Nach fakultativer Zellzählung und der Zugabe der entsprechenden Menge an Matrigel analog zur vorausgegangenen Kultivierung (50 µl OCM + 50 µl Matrigel pro Transwell-Membraneinlage), konnte die Zell-Matrigel-OCM-Suspension erneut in Transwell-Membraneinlagen ausgebracht werden. Abschließend folgte hierbei ebenfalls die Zugabe von 500 µl OCM zum basolateralen Kompartiment der Vertiefung nach Gelieren des Matrigels.

3.2.6 Fotografische Dokumentation und Mikroskopische Vermessung

An Tag 6, Tag 8, Tag 15 sowie an Tag 30 der Zellkultur erfolgte eine fotografische Dokumentation der Organoide in Kultur, wobei der Tag der Probengewinnung und somit der Beginn der ex-vivo-Kultur als Tag 0 angesehen wurde. Hierzu wurde ein Lichtmikroskop (Axiovert 25) mit angeschlossener Kamera (Canon EOS 600D) verwendet. Die bildliche Dokumentation wurde in verschiedenen Vergrößerungsstufen durchgeführt. Um das Wachstumsverhalten der Organoide zu quantifizieren, wurde der Durchmesser der Zellverbände mit Hilfe des Programms ImageJ vermessen. Hierbei wurde im Besonderen darauf geachtet, dass nur eindeutig als mehrzellige Organoide zu identifizierende rundliche Zellkonglomerate vermessen und ausgewertet wurden.

3.2.7 Färbung mit H&E

Die Färbung mit Hämatoxylin & Eosin ging der immunhistochemischen Färbung voraus. Dies diente zum einen der Detektion der aussichtsreichsten Schnittebene des Paraffinblocks zur Gewährleistung einer bestmöglichen immunhistochemischen Färbung. Zum anderen konnte hierdurch die Organoidmorphologie genauer betrachtet werden. Der Färbung ging zunächst die Entparaffinierung der 2 µm dicken, fixierten und paraffinierten histologischen Schnitte voraus. Diese erfolgte durch Verwendung von Xylol nach einer nächtlichen Inkubationszeit bei 60 °C. Die anschließende Rehydrierung erfolgte mit einer absteigenden Ethanolreihe (Ethanol 96 %, Ethanol 80 %, Ethanol 70 %, Ethanol 60 %, destilliertes Wasser). Die entparaffinierten und rehydrierten Schnitte wurden darauffolgend mit Hämatoxylin nach GILL-III gefärbt und, nach Spülung mit Leitungswasser, mittels 0,5%iger Salzsäure differenziert. Dem Bläuen durch erneutes Spülen mit Leitungswasser schloss sich die Färbung mit 1%iger wässriger Eosinlösung an. Die Färbung wurde durch Spülung unter fließendem Leitungswasser abgeschlossen, die Objektträger mit einem Deckglas versehen und lichtgeschützt gelagert.

3.2.8 Immunhistochemische Färbung

Der erste Schritt der immunhistochemischen Färbung bestand aus der Entparaffinierung der 2 µm dicken, fixierten und paraffinierten histologischen Schnitte. Hierzu wurden die Organoid-beziehungsweise Lungenschnitte zunächst bei 60 °C über Nacht inkubiert. Die Entparaffinierung erfolgte anschließend Mittels Xylol (3 x 10 min), die Rehydrierung wurde mit einer absteigenden Ethanolreihe durchgeführt. Diese setzte sich nachfolgend aus 100%igem Ethanol (2 x 10 min), 95%igem Ethanol (2 x 5 min) und 70%igem Ethanol (2 x 5 min) zusammen und wurde mit destilliertem Wasser abgeschlossen (2 x 5 min). Da die Fixation mittels Formalin zu einer chemischen Modifikation und damit zu einer Maskierung der zu detektierenden Proteinepitope führen kann, wurde eine partielle Rückgewinnung der Epitope durch ein Aufkochen mit EDTA-Puffer durchgeführt. Dabei wurden die entparaffinierten und rehydrierten Schnitte in einer Mikrowelle in 1 mM EDTA-Puffer (pH 8,0) zunächst aufgekocht und verweilten anschließend für 45 min leicht köchelnd durch Reduzierung der Mikrowellenleistung. Der Waschung mit PBS schloss sich das Blocken endogener Peroxidasen an, indem die Schnitte für 15 min in wässriger 3%iger H₂O₂-Lösung bei Raumtemperatur inkubiert wurden. Nach einer Waschung mit PBS wurden, ebenfalls für 30 min, mittels PBS gepufferter 2%iger BSA-Lösung unspezifische Antikörper-Bindestellen geblockt. Der nächste Schritt bestand aus der Zugabe des Primärantikörpers zu den Schnitten, welche daraufhin über Nacht bei 4 °C inkubiert wurden. Die verwendeten Primärantikörper und deren Arbeitskonzentration sind der Tabelle 3 zu entnehmen. Nach Ablauf der Inkubationszeit folgte eine dreimalige Waschung mit PBS, um die nicht gebundenen Primärantikörper auszuwaschen. Dem schloss sich die Zugabe des mit Meerrettichperoxidase gekoppelten Sekundärantikörpers mit einer Inkubationszeit von 30 Minuten bei Raumtemperatur an. Dieser wurde ebenfalls dreimalig mit PBS ausgewaschen und darauffolgend mit dem Chromogen

3-Amino-9-ethylcarbazol (AEC) behandelt. Nach der mikroskopisch zu beobachtenden Farbreaktion wurde die Chromogenreaktion mittels erneuter Spülung mit PBS gestoppt. Die Gegenfärbung, um die nicht durch die Antikörperbindung gefärbten Strukturen identifizieren zu können, erfolgte für 1 Minute mit Hämatoxylinlösung nach Mayer. Mittels kurzen Eintauchens in Ammoniaklösung wurden die Schnitte gebläut, die im Vorhinein durch Waschung mit PBS von der Hämatoxylin-Färbelösung befreit wurden. Zuletzt wurden die immunhistochemischen Färbung finalisiert, indem eine Eindeckelung mit wasserbasierten Eindeckmittel (Aquatex, Merck KGaA, Deutschland) erfolgte.

Die Immunhistochemischen Färbungen wurden sowohl von Tumor- als auch von Parenchymorganoiden angefertigt. Es wurde bei jeder Färbung ebenfalls eine Positivkontrolle mitgeführt, die aus einem Lungenschnitt einer *Kras*-Maus bestand. Die verwendeten Primärantikörper, die der Charakterisierung der vorhandenen Zellen dienten, waren gegen die Zielstrukturen SFTPC, SCGB1A1, KRT5 und Ki-67 gerichtet. Die jeweilig verwendeten Arbeitskonzentrationen sowie die Hersteller der Primärantikörper sind nachfolgender Tabelle (Tabelle 3) zu entnehmen. Als Sekundärantikörper konnte für alle Primärantikörper der mit Meerrettichperoxidase konjugierte Anti-Hase-Antikörper (Herkunft: Ziege; Hersteller: Agilent, DAKO, Santa Clara, CA, USA; Artikelnummer: P0448) verwendet werden.

Tabelle 3: Auflistung der verwendeten Primärantikörper im Rahmen der immunhistochemischen Färbungen

Zielantigen	Spezies	Arbeitskonzentration	Hersteller und Artikelnummer
Surfactant Protein C (SFTPC)	Hase	1:5000	Abcam, Cambridge, UK; ab90716
SCGB1A1 / Club-Cell-Secretory Protein (CCSP)	Hase	1:2000	Merck, Darmstadt, Deutschland; 07-623
Zytokeratin 5 (KRT5)	Hase	1:100	Abcam, Cambridge, UK; ab64081
Ki-67	Hase	1:200	Abcam, Cambridge, UK; ab15580

3.2.9 Bestimmung des Ki-67-Index

Die Auswertung des Ki-67-Indexes erfolgte durch Verwendung der Open Source Software ImageJ. Hierzu wurden fotografische Übersichtsaufnahmen der Ki-67-gefärbten Organoid-Schnitte angefertigt, wobei auf eine bestmögliche Beurteilbarkeit der Zellkernfärbung geachtet wurde. Mit Hilfe des Tools ImageJ Cell Counters wurden anschließend die mikroskopisch erkennbaren Ki-67-positiv gefärbten Kerne und die Ki-67-negativ gefärbten Kerne pro Organoid ausgezählt und dokumentiert.

Durch Erstellen des Verhältnisses zwischen Ki-67-positiven Zellkernen und der Gesamtzahl der gezählten Zellkerne pro Organoid wurde der Organoid-spezifische Ki-67-Index ausgewertet.

3.2.10 Statistik

Die statistische Analyse der zugrunde liegenden Daten erfolgte mit Hilfe der Programme Microsoft Excel und GraphPad Prism 9. Die Normalverteilung der Daten wurde mittels Shapiro-Wilk-Test geprüft. Zum Vergleich zwischen zwei Gruppen wurde bei Normalverteilung der Student's t-Test verwendet, bei nicht normalverteilten Daten wurde der Mann-Whitney-Test durchgeführt. Beim Vergleich von mehr als 2 Stichproben fand die Varianzanalyse (ANOVA) Verwendung. Die Ergebnisse wurden als statistisch signifikant bei $p < 0,05$ angesehen.

4. Ergebnisse

4.1 Wachstumsverhalten und Morphologie der murinen Tumor- und Lungenorganoide

Aus murinen Lungen von B6.129S-Krastyj (*Kras*)-Mäusen wurden Tumorknoten herauspräpariert, enzymatisch in Einzelzellen dissoziiert und gefiltert. Die vereinzelt Tumorzellen wurden in Kombination mit einem Gemisch aus Matrigel und einem Nährmedium (OCM) auf Transwell-Membraneinlagen ausgebracht und kultiviert. In gleicher Vorgehensweise wurden aus Lungenparenchym von Wildtyp-Mäusen isolierte Einzelzellen in Kultur gebracht, welche als vergleichende Kontrolle dienten. In beiden Versuchsbedingungen kam es zu einem mikroskopisch erkennbaren Heranwachsen von Organoiden innerhalb weniger Tage. Deren Wachstumsverhalten und mikroskopische Struktur wird im Folgenden betrachtet.

4.1.1 Die Tumororganoide weisen nach 8 Tagen Wachstumszeit einen signifikant größeren Durchmesser als die Lungenorganoide auf

Um das Wachstumsverhalten der Tumororganoide mit denen der Lungenorganoide vergleichen zu können, wurden deren Einzelzellen gleichzeitig in Kultur gebracht. Nach 8 Tagen Wachstumszeit wurden Aufnahmen erstellt und die Organoide vermessen. Mit einem medianen Durchmesser von 80 μm waren die Tumororganoide signifikant größer als die Lungenorganoide, die einen medianen Durchmesser von 55 μm aufwiesen.

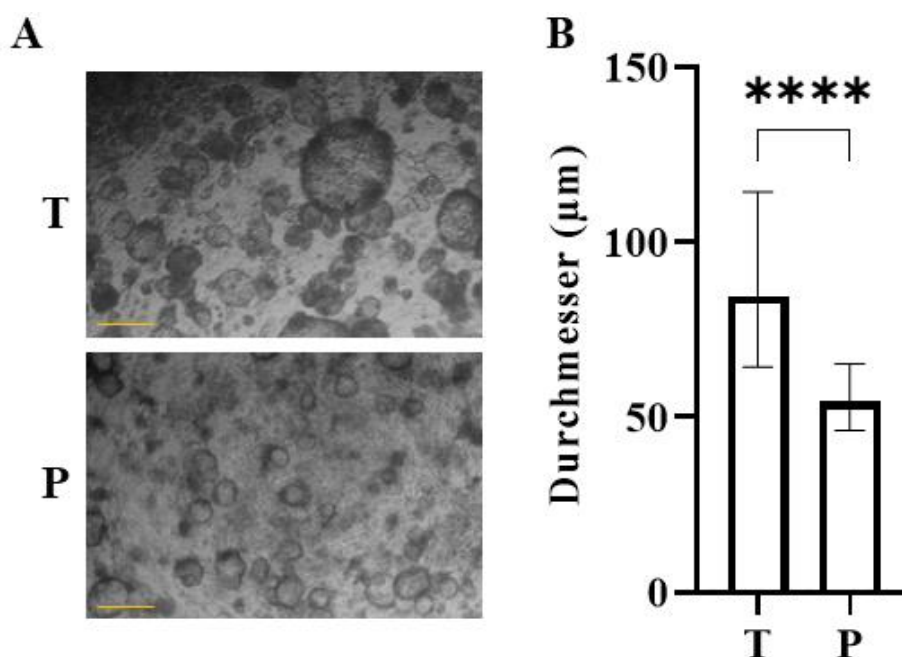


Abbildung 4: Durchmesser der Tumor- und Lungenorganoide 8 Tage nach dem Ausbringen. Organoide aus Tumorknoten, entnommen aus *Kras*-Mäusen (T), und Organoide aus Lungenparenchym von Wildtyp-Mäusen (P) wurden 8 Tage kultiviert und mikroskopisch vermessen. (A) Repräsentative lichtmikroskopische Bilder. (B) Durchmesser der Organoide (n = 548 für T, n = 460 für P). Die Daten wurden mittels Mann-Whitney-U-Test verglichen und sind als Median mit Interquartilsabständen angegeben. $p < 0,0001$. (Maßstabsleiste: 200 μm)

4.1.2 Die Tumororganoide zeigen ein Größenwachstum über einen Zeitraum von 30 Tagen

Um das Größenwachstum der Tumororganoide über einen längeren Zeitraum beurteilen zu können, wurden diese über eine Periode von 30 Tagen kultiviert (Abb. 5A). Dabei wurden die Durchmesser der Tumororganoide zu verschiedenen Zeitpunkten mikroskopisch gemessen. Hierbei konnte ein medianer Durchmesser von 80 μm nach 6 Tagen, 170 μm nach 15 Tagen und 260 μm nach 30 Tagen ermittelt werden (Abb. 5B). Ein annähernd konstantes Größenwachstum über einen Zeitraum von 30 Tagen konnte somit mikroskopisch beobachtet und quantitativ belegt werden.

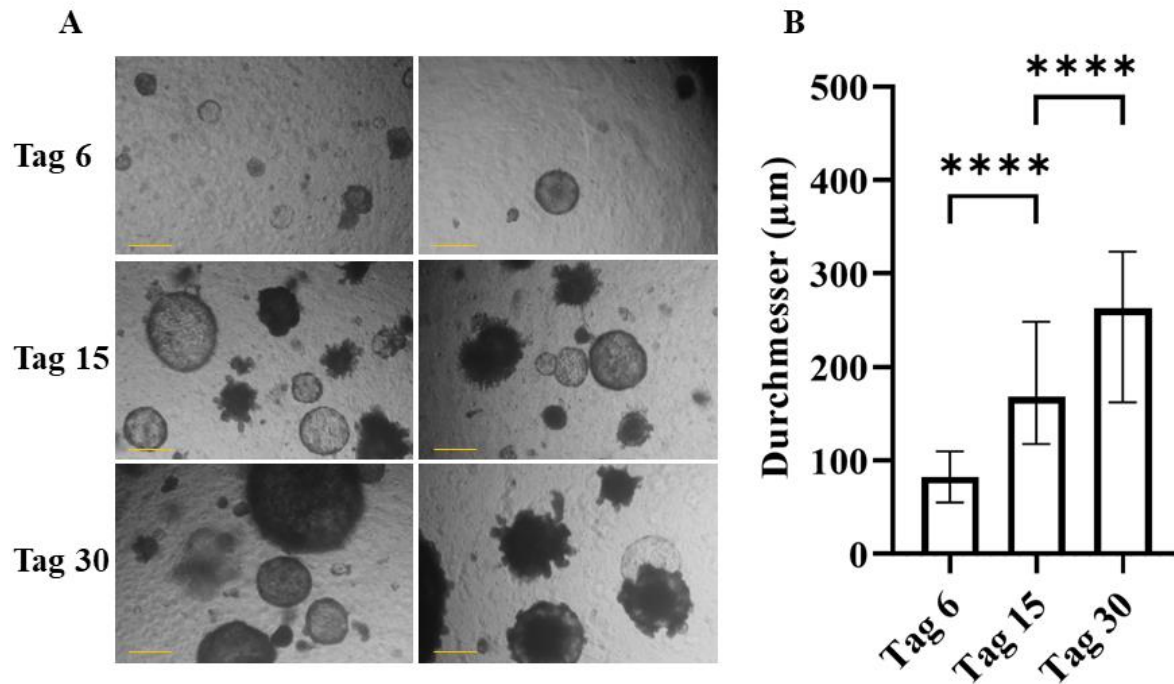


Abbildung 5: Durchmesser der Tumororganoide 6, 15 und 30 Tage nach dem Ausbringen. Organoide aus Tumorknoten, entnommen aus *Kras*- Mäusen, wurden 30 Tage kultiviert. (A) Repräsentative lichtmikroskopische Bilder der Tumororganoide nach 6 Tagen, 15 Tagen und 30 Tagen. (B) Durchmesser der Tumororganoide nach 6 Tagen (n = 88), 15 Tagen (n = 98) und 30 Tagen (n = 65). Die Daten wurden mittels One-way ANOVA verglichen und sind als Median mit Interquartilsabständen angegeben. $p < 0,0001$. (Maßstabsleiste: 200 μm)

4.1.3 Tumor- und Lungenorganoide zeigen eine sphärische Wachstumsform

Nach 8-tägigem Wachstum wurden Organoide aus dem vergleichenden Wachstumsversuch der Tumor- und Lungenorganoide in Paraffin eingebettet. Die Übersichtsfärbung mit H&E zeigte einschichtig aufgebaute, als Sphäre imponierende Organoide sowohl bei den Tumor- als auch bei den Lungenorganoiden (Abb. 6A). Im Zentrum der Organoide konnte hierbei ein Lumen mit Zelltrümmern abgestorbener Zellen beobachtet werden. Die nach 30 Tagen Wachstumszeit eingebetteten Tumororganoide zeigten im Wesentlichen zwei morphologisch abgrenzbare Erscheinungen. Ein Teil der Organoide zeigte eine überwiegend kugelige, lichtmikroskopisch transparente Wachstumsform (Abb. 5A und 6B), welche in allen Zeitabschnitten mikroskopisch zu beobachten war (im Folgenden bezeichnet als Tumororganoid Typ 1). Die zweite Erscheinungsform (im Folgenden bezeichnet als

Tumororganoid Typ 2) zeigte Ausläufer bildende, ausknospende und lichtmikroskopisch weniger transparente Tumororganoiden (Abb. 5A und 6B). Deren Anteil an der Gesamtheit der Tumororganoiden stieg mit der Zeitdauer der Kultur tendenziell an (Abb. 5A). Während die Zellen der Tumororganoiden überwiegend eine annähernd kubische Zellform mit hoher Kern-Plasma-Relation aufwiesen, zeigten die Lungenorganoiden eine eher hochprismatische Zellform, die dem Erscheinungsbild des Atemwegepithels ähnelte (Abb. 6). Diese hochprismatische Zellform trat insbesondere bei den passagierten Lungenorganoiden zum Vorschein.

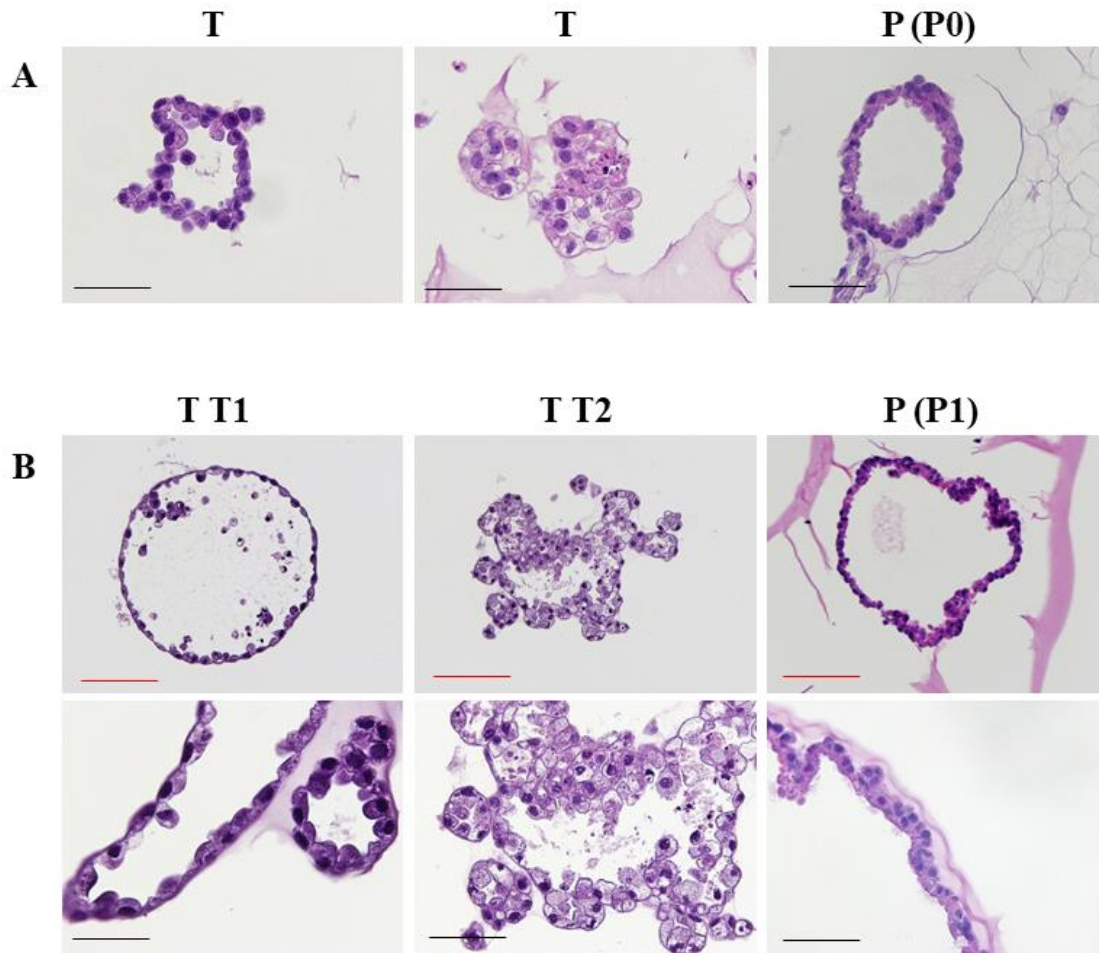


Abbildung 6: Darstellung der Organoidmorphologie mittels H&E-Färbung. Organoiden aus Tumorknoten, entnommen aus *Kras*- Mäusen (T), und Organoiden aus Lungenparenchym von Wildtyp-Mäusen (P) wurden 8 Tage (A), beziehungsweise 30 Tage (B) kultiviert. (A) Repräsentative H&E-Färbungen der Tumor- (T) und Lungenorganoiden (P (P0)) nach 8 Tagen Kultivierung. (B) Repräsentative H&E-Färbungen der Tumororganoiden (T T1 und T T2) und passagierten Lungenorganoiden (P (P1)) nach 30 Tagen Kultivierung. Repräsentative Einteilung der Tumororganoiden nach Morphologie: Tumororganoid Typ 1 (T T1) und Tumororganoid Typ 2 (T T2). (Maßstabsleiste schwarz: 30 µm) (Maßstabsleiste rot: 60 µm).

4.2 Immunhistochemische Charakterisierung der Tumor- und Lungenorganoiden

Zur Charakterisierung der Organoid-bildenden Zelltypen wurde eine Reihe immunhistochemischer Färbungen durchgeführt. Bestandteile dessen waren Färbungen des Typ-II-Pneumozyten-Markers Surfactant Protein C (SFTPC), des Keulenzell-Markers SCGB1A1 und des Basalzell-Markers

Keratin 5 (KRT5) (Abb. 7). Bisher wurden Adenokarzinome in *Kras*-Mäusen als SFTPC positiv und SCGB1A1-negativ beschrieben [60,94]. Es wurden daher auch Färbungen mit Lungenparenchym und Tumorgewebe aus tumorbelasteten *Kras*-Mäusen mitgeführt. Die an den nach 8 Tagen in Paraffin eingebetteten Tumor- und Lungenorganoiden durchgeführten immunhistochemischen Färbungen ergaben an allen Tumororganoiden ein positives Resultat für SFTPC (Abb. 7B), die Färbungen für SCGB1A1 (Abb. 7C) und KRT5 (Abb. 7D) fielen negativ aus. Somit verhielten sich diese in Ihrer Färbung analog zum korrespondierenden Tumor der *Kras*-Mauslunge. Im Gegensatz dazu zeigten sich innerhalb der Lungenorganoiden nur vereinzelte SFTPC-positive Zellen (Abb. 7B), jedoch stellten sich die Lungenorganoiden vollständig positiv für den Klubzell-Marker SCGB1A1 dar (Abb. 7C). Eine KRT5-Expression konnte wie bei den Tumororganoiden nicht nachgewiesen werden (Abb. 7D).

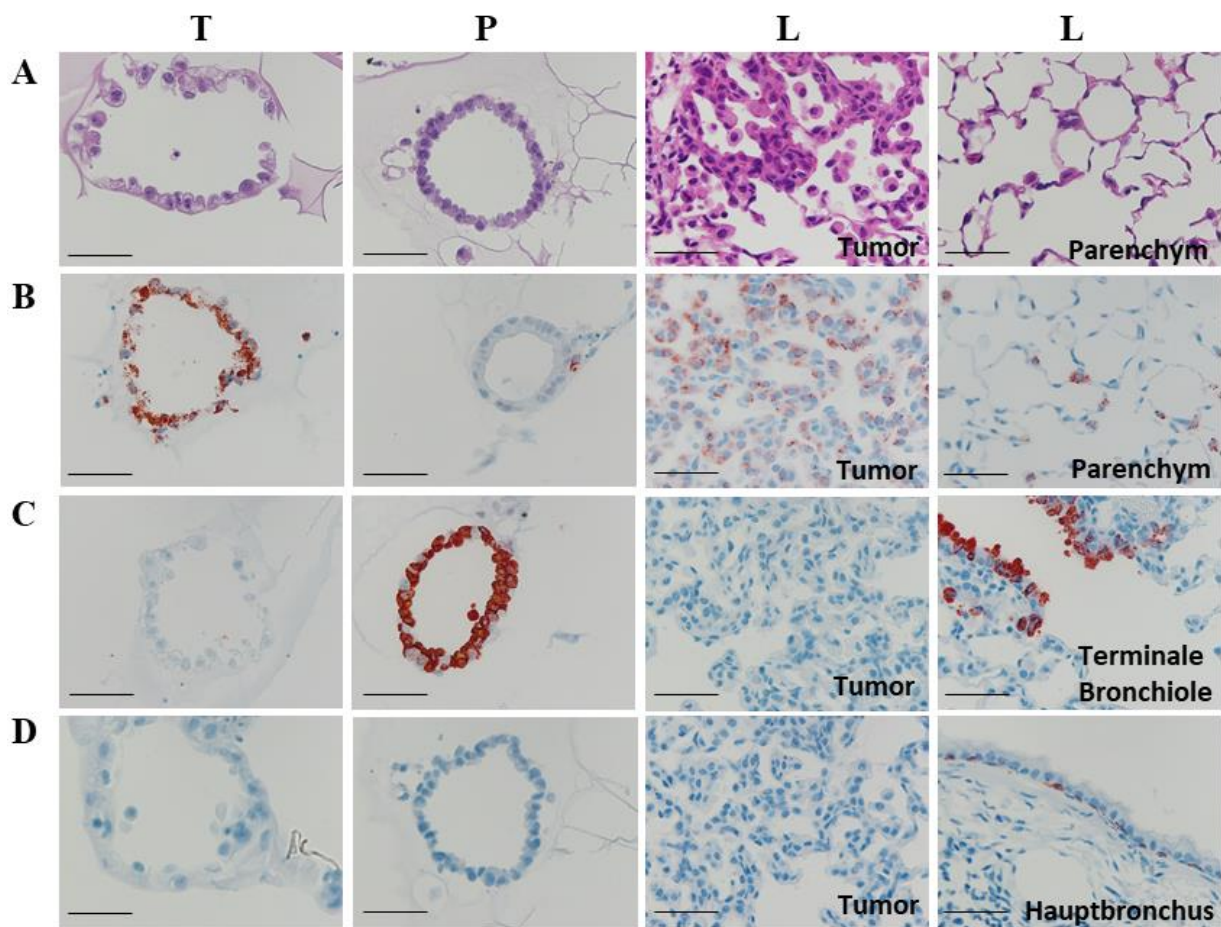


Abbildung 7: SFTPC-, SCGB1A1- und KRT5- Expression der Tumor- und Lungenparenchymorganoiden nach 8 Tagen Kultivierung. Organoiden aus Tumorknoten, entnommen aus *Kras*- Mäusen (**T**) und Organoiden aus Lungenparenchym von Wildtyp-Mäusen (**P**) wurden 8 Tage kultiviert. Repräsentative histologische Schnitte tumoröser und physiologischer Lungenabschnitte aus *Kras*-Mäusen wurden vergleichend als Kontrolle gegenübergestellt (**L**). (**A**) Repräsentative H&E-Färbungen. Immunhistochemische Färbungen für SFTPC (**B**), SCGB1A1 (**C**) und KRT5 (**D**). (Maßstabsleiste: 30 µm)

4.3 Vergleich der Zellproliferation von Tumor- und Lungenorganoiden

Die Zellproliferation der Organoiden wurde bestimmt, indem nach 8 Tagen der Kultivierung eine immunhistochemische Färbung für Ki-67 durchgeführt wurde. Annähernd 30 % der Zellen der Tumororganoiden zeigten sich Ki-67 positiv, bei den Lungenorganoiden betrug der Anteil der Ki-67 positiven Zellen ungefähr 55 %. Nach 8 Tagen der Kultivierung war der Anteil an proliferierenden Zellen in Lungenorganoiden somit signifikant höher als der Anteil an proliferierenden Zellen in Tumororganoiden. Die Ergebnisse wurden dem medianen Proliferationsindex innerhalb der Lungenherde von *Kras*-Mäusen vergleichend gegenübergestellt. Dieser betrug ungefähr 7 %.

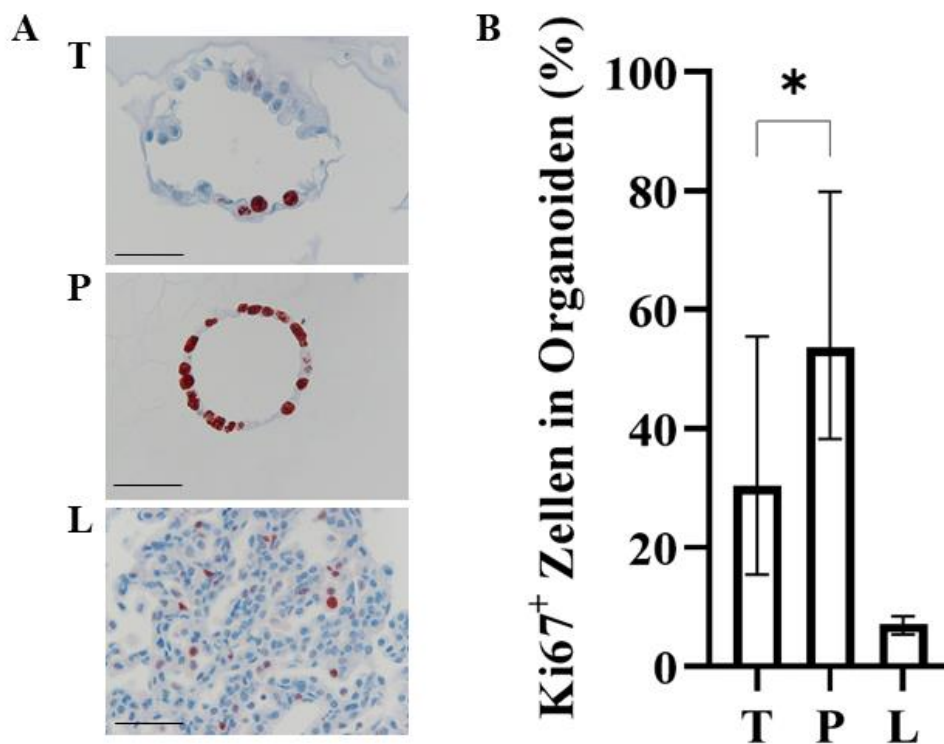


Abbildung 8: Proliferationsmarker Ki-67 der Tumor- und Lungenorganoiden nach 8 Tagen Kultivierung. Organoiden aus Tumorknoten, entnommen aus *Kras*- Mäusen (T), und Organoiden aus Lungenparenchym von Wildtyp-Mäusen (P) wurden 8 Tage kultiviert. Tumoröse Lungenabschnitte von *Kras*-Mäusen (L) wurden als Kontrolle gegenübergestellt. (A) Repräsentative immunhistochemische Färbungen von Ki-67. (B) Ki-67-Index (n = 33 für T, n = 16 für P, n = 3 für L). Die Daten wurden mittels Mann-Whitney-U-Test verglichen und sind als Median mit Interquartilsabständen angegeben. $p < 0,05$. (Maßstabsleiste: 30 μ m)

4.4 Tumor- und Lungenorganoide können passagiert werden

Um zu prüfen, inwiefern die Organoide einer Passage und einer nachfolgenden Expansion unterzogen werden können, wurden Organoide nach 8 Tagen der Kultivierung (im Folgenden als Passage 0 bezeichnet) erneut in eine Einzelzelllösung dissoziiert. Die resultierenden Organoide der Passage 1 wurden in gleicher Weise wie die Passage-0-Organoide in 50-%igem Matrigel und OCM in Transwell-Membraneinlagen über einen Zeitraum von 30 Tagen kultiviert. Es konnte, sowohl bei den Tumor- als auch bei den Lungenorganoiden, ein deutliches Organoidwachstum beobachtet werden. Diese wurden ebenfalls mikroskopisch vermessen. Die Tumororganoide der Passage 1 zeigten sich nach 30 Tagen mit einem medianen Durchmesser von 293 μm signifikant größer als die Lungenorganoide. Diese wiesen einen medianen Durchmesser von 173 μm auf (Abb. 9).

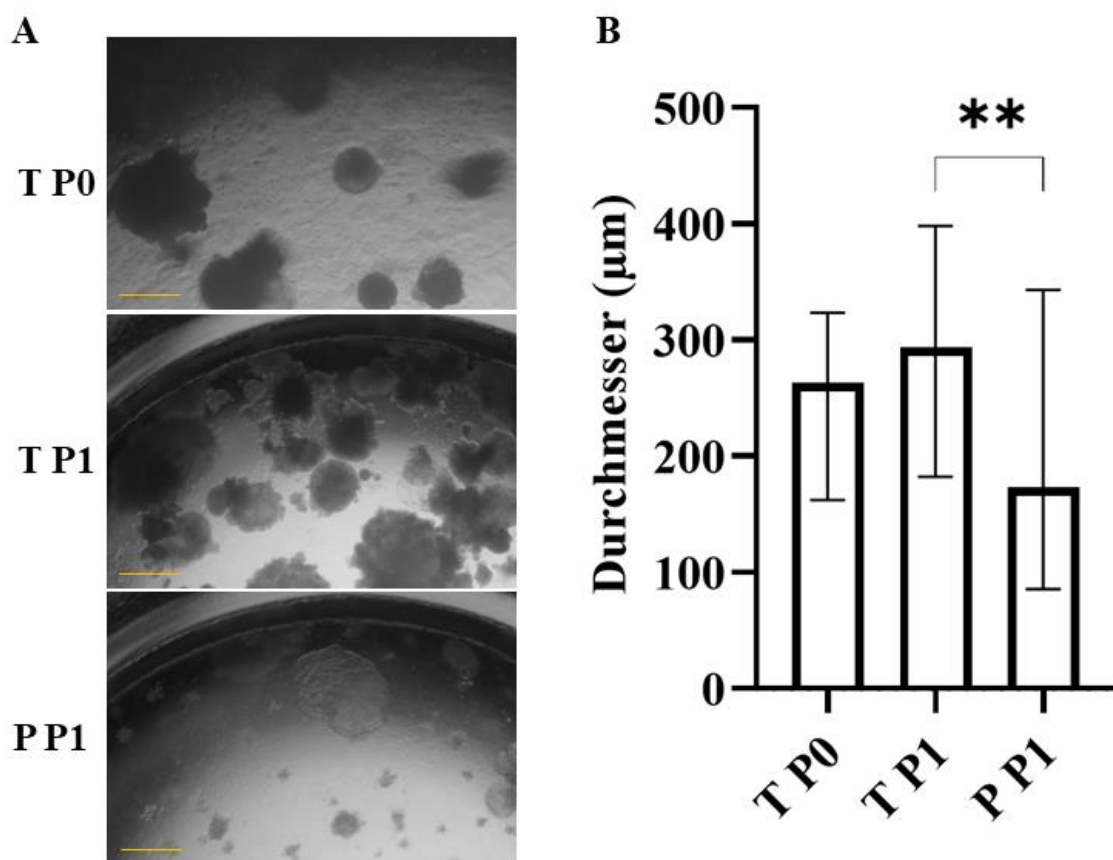


Abbildung 9: Durchmesser der Tumor- und Lungenorganoide der Passage 0 und Passage 1 nach 30 Tagen der Kultivierung. Organoide aus Tumorknoten, entnommen aus *Kras*- Mäusen (T P0), Tumororganoide der Passage 1 (T P1) sowie Lungenorganoide der Passage 1 (P P1) wurden 30 Tage kultiviert und mikroskopisch vermessen. (A) Repräsentative lichtmikroskopische Bilder. (B) Durchmesser der Organoide (n = 65 für T P0, n = 80 für T P1, n = 42 für P P1). Die Daten wurden mittels Mann-Whitney-U-Test verglichen und sind als Median mit Interquartilsabständen angegeben. $p < 0,01$. (Maßstabsleiste: 400 μm).

4.5 Immunhistochemische Charakterisierung der Tumor- und Lungenorganoide der Passage 1

Die passagierten Tumor- und Lungenorganoide wurden 30 Tage kultiviert und anschließend in Paraffin eingebettet. Dem schlossen sich immunhistochemische Färbungen der gleichen Marker an, die zur Charakterisierung der Organoide der Passage 0 dienten. Hierbei sollte eine potenzielle Veränderung der Zellzusammensetzung sichtbar gemacht werden. In der Übersichtsfärbung mit H&E erschienen die Organoid-bildenden Zellverbände der Passage 1 hierbei teilweise kompakter angeordnet im Vergleich zu den Organoiden der Passage 0 (Abb. 10A). In der immunhistochemischen Färbung zeigten sich die Tumororganoide der Passage 1, identisch zu denen der Passage 0, positiv für SFTPC (Abb. 10B). Die Färbungen für den Keulenzellmarker SCGB1A1 (Abb. 10C) und die Färbungen für den Basalzellmarker KRT5 (Abb. 10D) fielen bei den Tumororganoiden der Passage 0 sowie der Passage 1 negativ aus. Eine Veränderung des Expressionsverhaltens der genannten Marker von Passage 0 zu Passage 1 konnte im Fall der Tumororganoide somit nicht beobachtet werden. Die Organoide, die aus Lungenparenchym kultiviert wurden, zeigten hingegen in Passage 1 keine SFTPC-Expression (Abb.: 10B). Diese konnte in Passage 0 noch teilweise nachgewiesen werden. Die Lungenorganoide der Passage 1 zeigten sich, identisch zu Passage 0, SCGB1A1-positiv (Abb.: 10C). Eine Expression des Basalzellmarkers KRT5 konnte bei den Lungenorganoiden in Passage 1 nicht nachgewiesen werden (Abb. 10D).

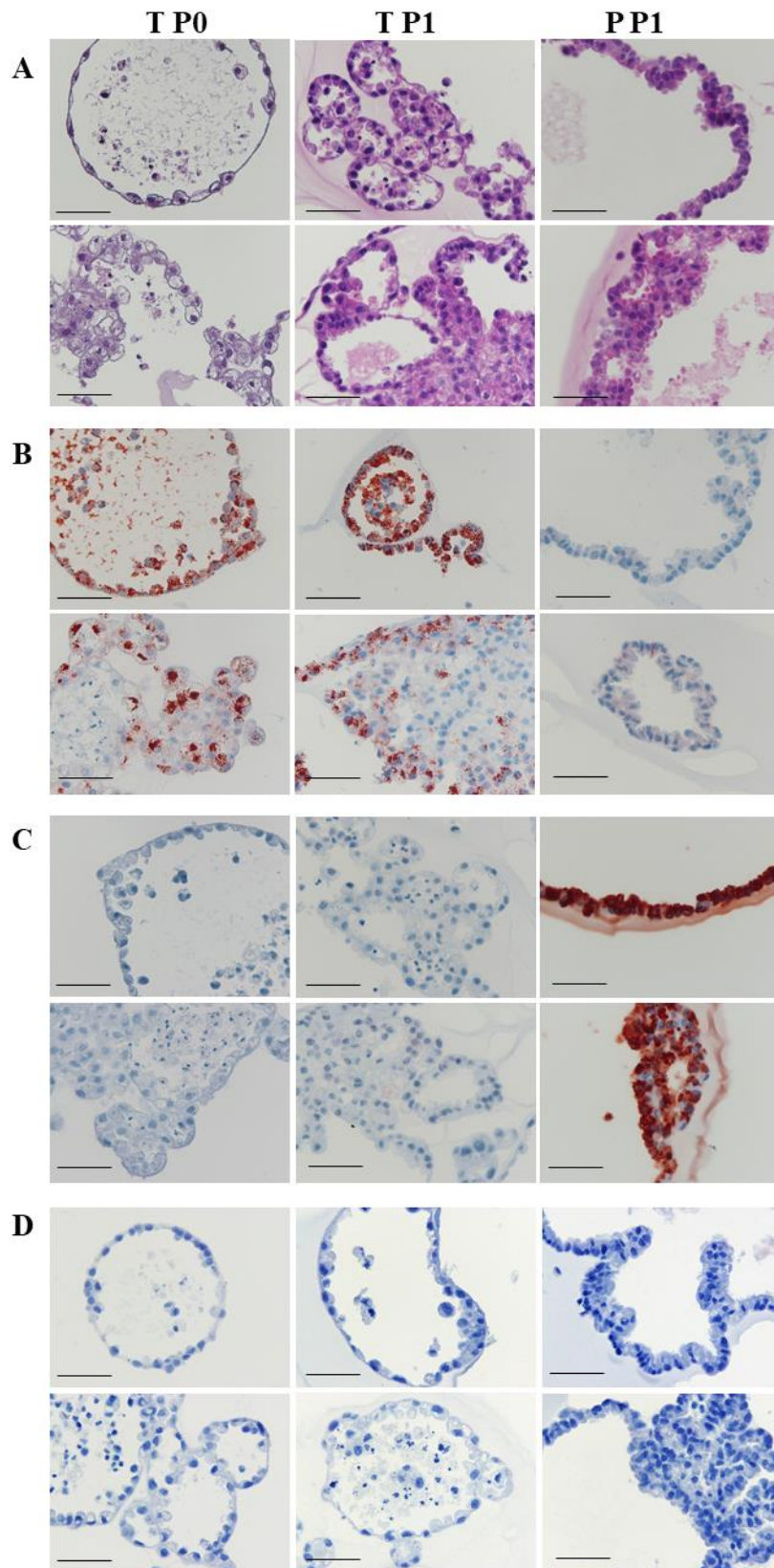


Abbildung 10: SFTPC-, SCGB1A1- und KRT5-Expression der passagierten Tumor- und Lungenorganoide nach 30 Tagen Kultivierung. Organoide aus Tumorknoten, entnommen aus *Kras*-Mäusen (T P0), Tumorganoide der Passage 1 (T P1) sowie Lungenorganoide der Passage 1 (P P1) wurden 30 Tage kultiviert. (A) Repräsentative H&E- Färbungen. Immunhistochemische Färbungen für SFTPC (B), SCGB1A1 (C) und KRT5 (D). (Maßstabsleiste: 30 µm)

4.6 Vergleich der Zellproliferation von Tumor- und Lungenorganoiden der Passage 1

Die Zellproliferation der passagierten Tumor- und Lungenorganoiden wurde bestimmt, indem nach 30 Tagen der Kultivierung eine immunhistochemische Färbung für Ki-67 durchgeführt wurde. Diese ergab einen medianen Anteil an Ki-67-positiven Zellen von annähernd 40 % bei den Lungenorganoiden der Passage 1. Der Median der Ki-67-Indizes der Tumororganoiden erstreckte sich hingegen von 13 % im Fall der Passage 0 bis zu 25 % im Fall der Passage 1. Demnach war der nach 30-tägiger Kultivierung bestimmte Proliferationsindex der passagierten Lungenorganoiden signifikant höher als der Proliferationsindex der passagierten Tumororganoiden.

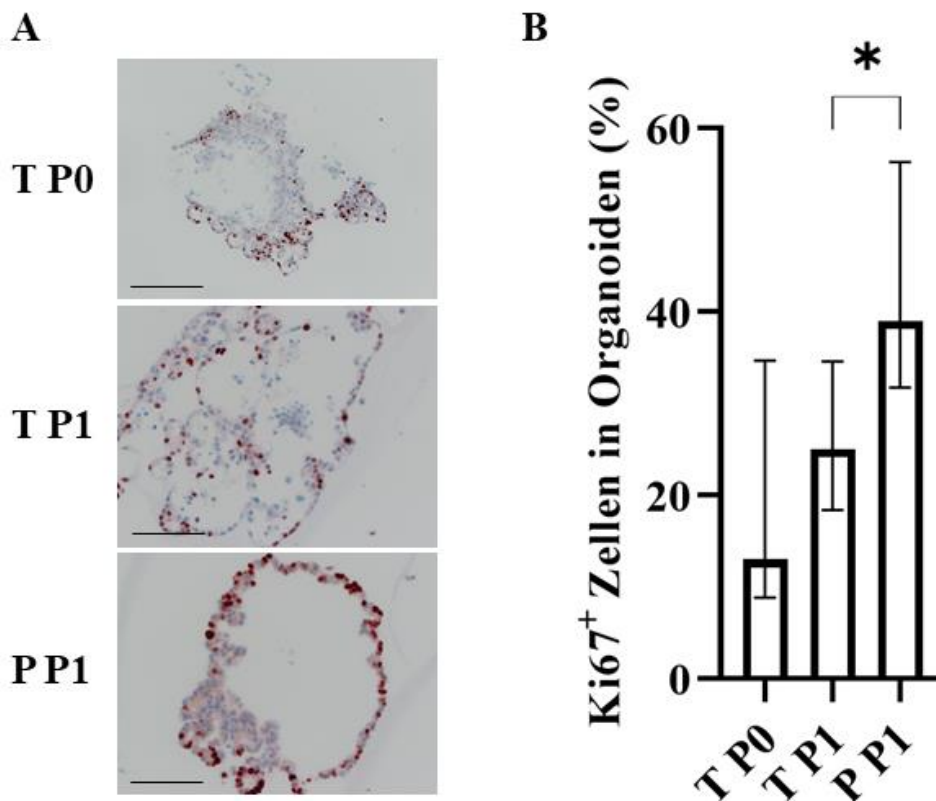


Abbildung 11: Proliferationsmarker Ki-67 der Tumor- und Lungenorganoiden der Passage 0 und Passage 1 nach 30 Tagen Kultivierung. Organoiden aus Tumorknoten, entnommen aus *Kras*- Mäusen (T P0), Tumororganoiden der Passage 1 (T P1) sowie Lungenorganoiden der Passage 1 (P P1) wurden 30 Tage kultiviert. (A) Repräsentative immunhistochemische Färbungen von Ki-67. (B) Ki-67-Index (n=9 für T P0, n=21 für T P1, n = 7 für P P1). Die Daten wurden mittels Mann-Whitney-U-Test verglichen und sind als Median mit Interquartilsabständen angegeben. $p < 0,05$. (Maßstabsleiste: 60 μm)

4.7 Co-Kultur der Tumororganoide mit Alveolarmakrophagen

Vorausgegangene Arbeiten wie die von Casanova-Acebes et al. konnten zeigen, dass Makrophagen das Tumorwachstum im Fall von NSCLC fördern [15]. Um eine Aussage darüber machen zu können, inwieweit Makrophagen ebenfalls das Wachstum der Tumororganoide innerhalb des in dieser Arbeit etablierten Modells beeinflussen, wurden diese 30 Tage in Co-Kultur mit isolierten Alveolarmakrophagen zusammengeführt. Hierzu wurden die Makrophagen im basolateralen Kompartiment der mit Transwell-Membraneinlagen bestückten Well-Platte ausgebracht. Nach 30 Tagen wurde eine mikroskopische Messung der Organoiddurchmesser durchgeführt und die Anzahl der gewachsenen Organoide pro Well bestimmt. Es zeigte sich eine signifikant höhere Anzahl an Organoiden in den Wells, in denen sich die Tumororganoide in Co-Kultur mit Makrophagen befanden, gegenüber der Kontrollgruppe (Abb. 12A). Ein Unterschied im durchschnittlichen Organoiddurchmesser zwischen beiden Gruppen konnte jedoch nicht festgestellt werden (Abbildung 12B). Eine Paraffin-Einbettung wurde hierbei nach 30 Tagen ebenfalls durchgeführt und immunhistochemische Färbungen der Marker SFTPC, SCGB1A1 und KRT5 angefertigt. Sowohl die Co-Kultur-Gruppe mit Makrophagen als auch die Kontroll-Gruppe der Tumororganoide zeigten sich SFTPC-positiv, SCGB1A1-negativ und KRT5-negativ.

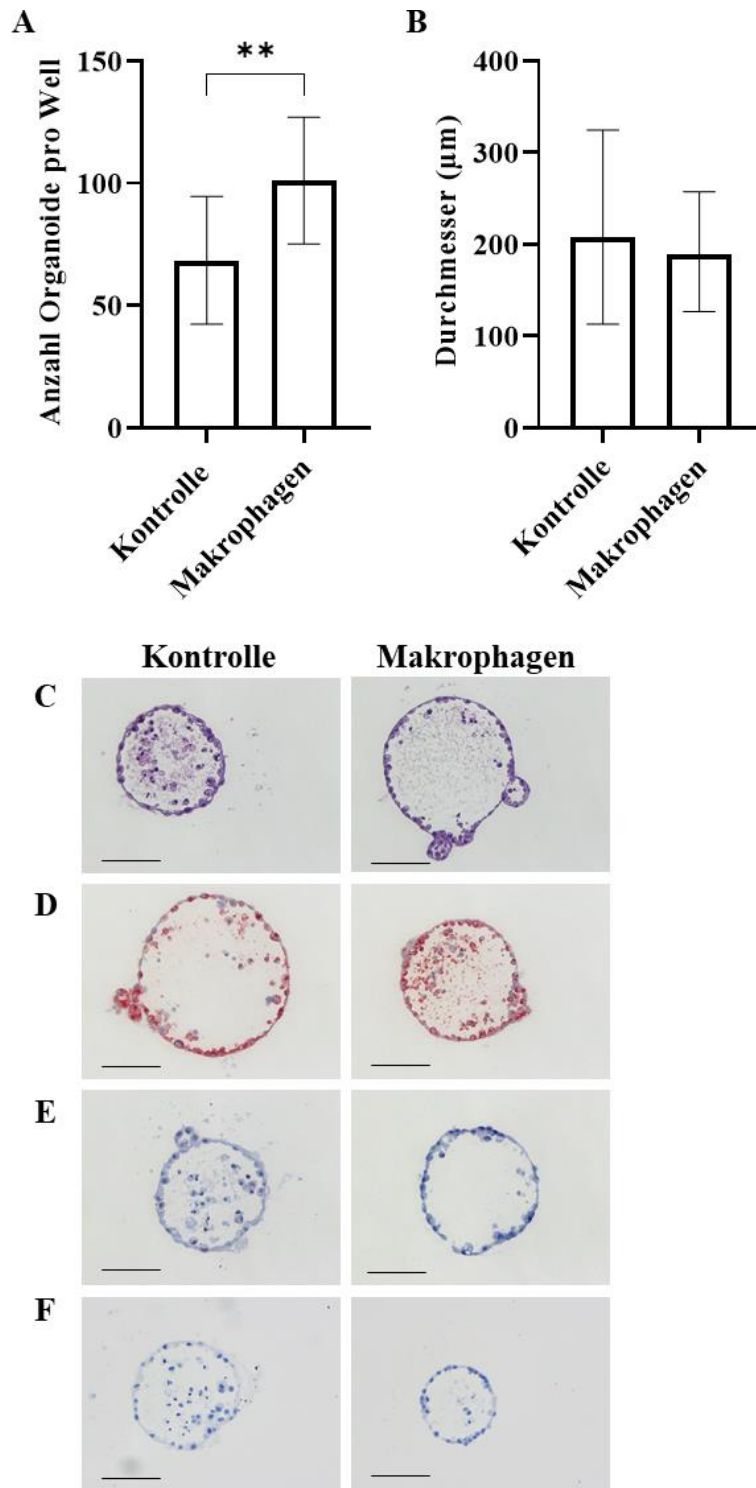


Abbildung 12: Co-Kultur der Tumororganoide mit Alveolarmakrophagen nach 30 Tagen Kultivierung. Organoide aus Tumorknoten, entnommen aus *Kras*-Mäusen, wurden über einen Zeitraum von 30 Tagen in Co-Kultur mit Alveolarmakrophagen kultiviert, indem diese im basolateralen Anteil der mit Transwell-Membraneinlagen bestückten Well-Platte ausgebracht wurden (**Makrophagen**). Tumororganoide wurden als Kontrolle ebenfalls in Mono-Kultur kultiviert (**Kontrolle**). (**A**) Anzahl der Organoide pro Transwell-Membraneinlage ($n = 7$ pro Gruppe). Die Daten wurden mittels Student's t-test verglichen und sind als Mittelwert mit Standardabweichung angegeben. $p < 0,01$. (**B**) Durchmesser der Organoide ($n = 141$ für Kontrolle, $n = 311$ für Makrophagen). Die Daten wurden mittels Mann-Whitney-U-Test verglichen und sind mit Interquartilsabständen abgebildet (**C**) Repräsentative H&E Färbung der Tumororganoide. Immunhistochemische Färbungen für SFTPC (**D**), SCGB1A1 (**E**) und KRT5 (**F**). (Maßstabsleiste: 60 µm)

5. Diskussion

Lungenkrebs ist die häufigste krebsbedingte Todesursache weltweit [76,78]. Zellkulturmodelle, welche die Schlüsselmerkmale sowie die pathophysiologische Umgebung dieser malignen Neoplasie möglichst realitätsnah rekapitulieren, werden in der Grundlagenforschung und präklinischen Forschung des Lungenkarzinoms weiterhin benötigt. 3D-Zellkulturmodelle in Form von Organoiden besitzen das Potenzial, diese erwünschten Aspekte eines Zellkulturmodells abzubilden. In der vorliegenden Arbeit wurde ein niederschwellig durchzuführendes Protokoll etabliert, welches es erlaubt, KRAS-getriebene, murine Lungentumororganoiden in Form eines 3D-Organoidmodells über einen Zeitraum von mindestens 30 Tagen zu kultivieren. Hierbei wurden Tumorknoten aus der Lunge von *Kras*-Mäusen herauspräpariert, enzymatisch dissoziiert und in einem Matrigel-haltigen Kulturmedium ausgebracht. Die Lungentumororganoiden wurden mittels mikroskopischer Vermessung, zytologischer Begutachtung sowie immunhistochemisch charakterisiert. Unter Verwendung der identischen Methodik kultivierte Organoiden aus physiologischem Lungenparenchym von Wildtyp-Mäusen wurden den Lungentumororganoiden vergleichend gegenübergestellt. Die Lungenparenchymorganoiden durchliefen dabei ebenfalls eine morphologische und immunhistochemische Charakterisierung. Beide Organoidtypen konnten, erneut in eine Einzelzelllösung versetzt, passagiert und damit expandiert werden.

5.1 Kultivierungsmethodik

Die Kultivierung von physiologischem Lungengewebe in Form dreidimensional wachsender Organoiden ist sowohl unter Verwendung menschlicher als auch muriner Lungenzellen bereits etabliert. Verschiedene Kultursysteme wurden unter anderem von Lu et al. und Barkauskas et al. in Übersichtsarbeiten zusammengefasst [8,86]. Im Hinblick auf die Modellierung von Lungenkarzinomgewebe in Form einer 3D-Organoidkultur kann (zum Veröffentlichungszeitpunkt dieser Arbeit) ein deutlicher Schwerpunkt innerhalb der Fachliteratur verzeichnet werden. Der Fokus liegt hierbei vor allem auf der Etablierung Patienten-abgeleiteter Tumororganoiden im Rahmen der präklinischen Forschung und der Präzisionsmedizin [11,149,150]. Die Modellierung des Lungenkarzinoms in Form einer auf murinen Lungenkrebszellen basierenden 3D-Kultivierung ist im Bereich der Grundlagenforschung jedoch ebenfalls vielversprechend [149]. Dieser Ansatz wurde in der Fachliteratur bisher im Gegensatz zu humanen Lungentumororganoiden weniger ausführlich beleuchtet. Diese Arbeit soll einen Beitrag dazu leisten, diese vorhandene Lücke zu füllen und Inspirationen dazu bieten, um dieses Modell weiter auszubauen.

Eine standardisierte Vorgehensweise innerhalb der 3D-Kultivierung von Lungen- oder Lungentumorgewebe existiert bisher nicht, sodass die Resultate verschiedener Modelle und Kultursysteme nicht gänzlich uneingeschränkt miteinander vergleichbar sind [8,149]. Bei der Kultivierung von Lungenorganoiden können jedoch einige grundlegende methodische Aspekte

ausgemacht werden, die ein Großteil der Kultursysteme miteinander teilen [8]:

Nachdem das jeweilige Gewebe mechanisch oder enzymatisch in Einzelzellen dissoziiert wurde, werden in der Mehrzahl der verschiedenen Kultivierungsmethoden von Lungenorganoiden FACS-Protokolle zur Isolierung der gewünschten Zellpopulationen angewendet [8]. Hierbei werden die gewünschten Zellen mittels meist immunologisch angesteuerter molekularer Oberflächenmarker selektiv markiert und anschließend sortiert [50]. Die Isolierung von Tumorzellen und deren vollständige Separation von physiologischen Zellen gestaltet sich hingegen schwieriger. Zhao et al. beschreiben, dass zurzeit keine robuste Methode existiert, eine vollständige Trennung von Tumorzellen und nicht-neoplastischen Zellen zu erreichen [155]. In Betrachtung der bisher beschriebenen Kultivierungsmethodik von murinen Lungentumororganoiden ist es in einer Arbeit von Dost et al. gelungen, *Kras*^{G12D}-getriebene Lungentumorzellen durch die Verwendung eines FACS-Protokolls zu selektieren. Hierbei erfolgte die Sortierung durch den Einsatz der Antikörper Anti-CD31, Anti-CD45, Anti-Ly-6A/E (SCA1) und Anti-CD326 (EP-CAM). In genannter Arbeit konnte gezeigt werden, dass es bereits früh innerhalb der Karzinogenese des Lungenadenokarzinoms zum Verlust von Differenzierungsmarkern der Alveolarzellen kommt. Dies wurde durch die Kultivierung von Organoiden aus Lungenadenokarzinomzellen von *Kras*^{LSL-G12D}; *Rosa26*^{LSL-YFP} (KY)-Mäusen und der Analyse von transkriptionellen Veränderungen innerhalb dieser Organoiden erreicht [31].

Die anschließende Aussaat der isolierten pulmonalen Primärzellen, bei Betrachtung der verschiedenen Lungenorganoid- oder Lungentumororganoid-Protokolle, erfolgt meist in einem Matrigel-haltigen Kulturmedium. Die bereits bei der Kultivierung der ersten murinen Basalzellorganoide von Rock et al. verwendete 50%ige Matrigelkonzentration stellt weiterhin eine etablierte Methode dar und wurde auch im Kulturprotokoll dieser Arbeit angewendet [113]. Alternativ kann Matrigel in unterschiedlichen geringeren Konzentrationen in Schichten aufgetragen werden, um ein Absinken der Organoiden zu erreichen und diese damit auf einer Ebene zu platzieren. Das Kulturmedium enthält neben Wachstumsfaktor-reduziertem Matrigel gezielt wachstumsmodulierende Substanzen, die sich abhängig vom murinen oder humanen Ursprung der Primärzellen unterscheiden. Besonders hervorzuheben sind hierbei der wachstumsfördernde (murine) epidermale Wachstumsfaktor (engl. epidermal growth factor, EGF) sowie der Rho-assoziierte Proteinkinase-Inhibitor Y-27632 (ROCK-Inhibitor), welcher das Zellüberleben fördert [8]. Beide Substanzen wurden zur Wachstumsmodulation auch in dem in dieser Arbeit verwendeten OCM integriert.

Die Ausgangszellpopulationen der in dieser Arbeit kultivierten Organoiden wurden nicht mittels FACS isoliert, sondern es wurde gezielt ein methodisch reduzierter Ansatz zur Isolierung der gewünschten Zellpopulation gewählt. Tien et al. beschrieben die Kultivierung von KRAS-getriebenen murinen Lungentumororganoiden, indem Tumorknoten dieser Mäuse präpariert, enzymatisch dissoziiert und in einem Organoid-Kulturmedium ausgebracht wurden [139]. Diese pragmatische Vorgehensweise wurde in dieser Arbeit aufgegriffen. Die in dieser Arbeit beschriebene Methodik stützt sich somit auf die Idee, den ressourcenintensiven Schritt der FACS-vermittelten Zellsortierung zu überspringen und durch

die Eigenschaften im womöglich dominierenden Wachstumsverhalten KRAS-getriebener Lungenkarzinomzellen innerhalb der gewählten Kulturbedingungen eine Isolierung von Tumororganoiden bei eventueller Verunreinigung durch physiologische Lungenzellen herbeizuführen. Das Unterlassen einer FACS-gesteuerten Isolierung der primären Tumorzellen vor der Aussaat sollte durch die mittels immunhistochemischer Charakterisierung erzielte Zuordnung der Organoide zum Primärtumor nach erfolgtem Organoidwachstum ersetzt werden. Diese Charakterisierung wird in nachfolgenden Kapiteln diskutiert.

Die grundsätzlichen Limitationen bei der Modellierung von Gewebe in Form von Organoiden im Allgemeinen (Kapitel 2.3) lässt sich auch auf Organoide aus Lungenzellen beziehungsweise Lungentumorzellen übertragen [8,86]. Diese führen dazu, dass immer komplexer werdende Organoidmodelle erforscht und etabliert werden [48,151,155,156]. Mit der Integration von verschiedenen Zelltypen wie beispielsweise mesenchymalen Zellen, mit der Simulation einer Perfusion oder der genaueren Darstellung der Organ-eigenen Gewebearchitektur wird in diesen Modellen angestrebt, möglichst physiologische Bedingungen innerhalb der Zellkultur herzustellen [8,48,68,86,98,144]. Hierbei kann jedoch diskutiert werden, ob ein Zugewinn an Komplexität mit einem gleichzeitigen Verlust an Kontrolle innerhalb des Modells einhergeht und für den Erkenntnisgewinn innerhalb eines bestimmten Mechanismus am Modell teilweise hinderlich ist [48]. Demnach haben sich innerhalb der 3D-Kultivierung neben vielschichtigen, komplexen Modellen ebenfalls einfache, reduktionistische Modelle bewährt [155]. Dieser Ansatz sollte in dieser Arbeit verfolgt werden.

5.2 Einordnung der morphologischen Beobachtungen

Die unter Verwendung des in dieser Arbeit dargelegten Protokolls kultivierten Organoide wurden in ihrem Wachstumsverhalten beobachtet und vermessen. Zur Quantifizierung des Größenwachstums wurde der Durchmesser der kugelig gewachsenen Organoide herangezogen. Außerdem erfolgte eine morphologische sowie eine orientierende zytologische Einordnung im Rahmen der H&E-Färbungen. Die Betrachtung der Entwicklung des medianen Durchmessers der Tumororganoiden über einen Kultivierungszeitraum von 30 Tagen zeigte ein annähernd konstantes Wachstumsverhalten. Der mediane Durchmesser von 80 µm nach 8 Tagen Kultivierungszeit wurde nach 15 Tagen ungefähr verdoppelt und nach 30 Tagen annähernd verdreifacht. Mikroskopisch konnten überwiegend 2 morphologisch abgrenzbare Erscheinungsformen der Tumororganoiden differenziert werden. Eine streng kugelige, lichtmikroskopisch-transparente, keine Ausläufer-bildende Form (Tumororganoid Typ 1) konnte von einer Ausläufer-bildenden, lichtmikroskopisch-intransparenteren Form (Tumororganoid Typ 2) abgegrenzt werden. Hierbei scheint es sich aufgrund der identischen immunhistochemischen Charakterisierung jedoch nicht um verschieden zellulär zusammengesetzte Organoide zu handeln, sondern vielmehr um verschiedene Reifestadien. Die Häufigkeitszunahme der Ausläufer-bildenden Form (Typ 2) gegenüber der Nicht-Ausläufer-bildenden Form (Typ 1) über 30 Tage könnte sich mit einer Entwicklung des Typs 2 aus dem Typ 1 heraus erklären lassen. Im Rahmen der H&E-Färbung

zeigten die Tumororganoide zu jeder Zeit einen einschichtigen Aufbau im Gegensatz zu zahlreichen 3D-Kultivierungsformen von physiologischem Atemwegs- oder Alveolarepithel der Maus [86]. Außerdem konnten bei der zytologischen Betrachtung charakteristische Malignitäts-Merkmale herausgearbeitet werden. Die Zellen der Tumororganoide zeigten neben einer kubischen Zellform und mittelgroßen bis großen Zellkernen eine deutliche Kernpolymorphie sowie eine zugunsten des Zellkerns verschobene Zell-Plasma-Relation. Diese Merkmale der Tumororganoid-Zellen sind mit einer Lungenadenokarzinom-Identität somit zu vereinbaren [57,60].

Eine grundsätzliche Problematik der dreidimensionalen Kultivierung zeigte sich auch im Fall der in dieser Arbeit kultivierten Tumororganoide. Insbesondere die Betrachtung der nach 30 Tagen eingebetteten und gefärbten Organoid-Kugeln zeigte eine deutliche Akkumulation von nekrotischen Zellen und Zelltrümmern im Inneren des Lumens innerhalb der Organoid-Kugeln. Dieser Prozess kann sich negativ auf das weitere Organoidwachstum auswirken und scheint dahingehend auch möglicherweise ein begrenzender Faktor zu sein [48,155]. Die Organoidkultur hat diesbezüglich neben einer erneuten Dissoziation in Einzelzellen und weiteren Expansion noch keinen etablierten Mechanismus entwickelt, um diese Problematik zu umgehen [155]. In zukünftigen Arbeiten, welche auf dem in dieser Arbeit etablierten Modell aufbauen, könnte die Organoidkultur über einen Zeitraum von über 30 Tagen hinaus weiterbetrieben werden. Dabei könnte beispielsweise beobachtet werden, ob ein limitierender Kultivierungszeitpunkt bei einer erweiterten Kultivierungsdauer auszumachen ist oder ab welchem potenziellen Zeitpunkt die charakteristische kugelige Wachstumsform nicht mehr aufrechterhalten werden kann.

Der Vergleich der Tumororganoide mit den unter identischen Bedingungen und Vorgehen kultivierten Lungenorganoiden zeigte einige Unterschiede hinsichtlich des Größenwachstums und der zytologischen Merkmale. Sowohl zu einem frühen Zeitpunkt (8 Tage) der Passage 0 als auch zu einem späten Zeitpunkt der Passage 1 (30 Tage) zeigten sich die Tumororganoide signifikant größer gegenüber den Lungenorganoiden hinsichtlich des medianen Durchmessers. Aus der differenzierten Betrachtung der Größenverteilung der Lungenorganoide bei längerer Kultivierungsdauer (30 Tage) ging eine größere Differenz zwischen maximalem und minimalem Organoid-Durchmesser sowie ein größerer Interquartilsabstand im Vergleich zu den Tumororganoiden hervor. Die Lungenorganoid-Zellkultur der Passage 1 enthielt somit nach 30 Tagen zahlreiche kleine Organoiden, welche keine wesentliche Größenzunahme über den Kulturzeitraum erreichten und deutlich unter dem unteren Quartil der Tumororganoide der Passage 0 und 1 lagen (Abbildung 9). Ein kleinerer Anteil der Lungenorganoide erreichten einen mit den Tumororganoiden vergleichbaren maximalen Durchmesser. Im Falle der größten Lungenorganoide war jedoch stets eine kugelige, lichtmikroskopisch-transparente Morphologie zu beobachten. Ausläufer-bildende, ausknospende Organoidformen der Lungenorganoide konnten weder zu einem frühen noch zu einem späten Kulturzeitpunkt in Passage 0 oder Passage 1 beobachtet werden. Die zytologische Betrachtung der Lungenorganoide zeigte keine Malignitäts-typischen Stigmata. Die Organoid-bildenden Zellen imponierten hierbei überwiegend hochprismatisch ohne

deutliche Kernatypien und wiesen eine Lokalisation des Nukleus im basalen Zelldrittel auf. Die Existenz von Flimmerepithelzellen im Verbund mit SCGB1A1-positiven Zellen im Sinne von bronchialen Organoiden ist mit den histologischen Beobachtungen vereinbar und kann mittels immunhistochemischer Färbungen zukünftig eruiert werden [75].

Zusammenfassend konnte hinsichtlich des Wachstumsverhaltens und der zytologischen Merkmale bereits eine deutliche Differenzierung und Abgrenzung zwischen Tumor- und Lungenorganoiden herausgestellt werden.

5.3 Immunhistochemische Charakterisierung und vergleichende Betrachtung der Tumororganoide und Lungenorganoide

Wie in vorherigen Arbeiten beschrieben, konnte in dieser Arbeit mittels immunhistochemischer Färbungen gezeigt werden, dass Lungentumore in *Kras*-Mäusen den Typ-II-Pneumozytenmarker SFTPC exprimieren, jedoch keine Expression des Keulenzellmarkers SCGB1A1 aufweisen [60,94]. Weiterhin fielen die Färbungen des Basalzellmarkers KRT5 innerhalb der Lungenherde negativ aus, eine Expression konnte ausschließlich in den murinen Hauptbronchien detektiert werden. Diese Marker-Konstellation stützt die Annahme, dass der zelluläre Ursprung des in diesem Modell mittels G12D-*Kras*-Mutation induzierten Lungenkarzinoms in Typ-II-Pneumozyten liegt [120]. Die Tumorerläsionen der *Kras*-Mäuse ähneln histopathologisch insbesondere humanen Adenokarzinomen der Lunge. Bei diesen konnten ebenfalls häufig SFTPC-Expressionen beobachtet werden [120]. Das exakte Spektrum des zellulären Ursprungs des humanen Lungenadenokarzinoms ist jedoch weiterhin nicht genau definiert und bleibt Gegenstand aktueller Forschung [152]. Neben Typ-II-Alveolarepithelzellen scheinen auch Keulenzellen an der Karzinogenese des Lungenadenokarzinoms beteiligt zu sein. Mausstudien legen nahe, dass bei diesen im Gegensatz zu Typ-II-Pneumozyten hingegen eine vorangegangene Entzündungsreaktion zur Initiation der Karzinogenese notwendig zu sein scheint [88,133]. Murine BASCs, welche in Alveolarepithelzellen und Atemwegsepithel differenzieren können, sind als indirekter Vorläufer ebenfalls in die Entstehung des Adenokarzinoms involviert, möglicherweise handelt es sich bei diesen jedoch auch um eine direkte Vorläuferpopulation [64,152]. Insgesamt gelten Typ-II-Pneumozyten als die am besten charakterisierten Ursprungszellen [120]. Zusammenfassend unterstreicht die immunhistochemische Charakterisierung der Tumorerläsionen der *Kras*-Mäuse somit deren Eignung zur Modellierung eines im Frühstadium befindlichen menschlichen Lungenadenokarzinoms.

Die hier als Tumororganoide bezeichneten Organoide, die aus Einzelzellen kultiviert wurden, welche den dissoziierten *Kras*-Lungentumorknoten entstammten, wiesen das identische Expressionsmuster der drei zur Charakterisierung herangezogenen Marker wie die *Kras*-Lungentumore auf (SFTPC-positiv, SCGB1A1-negativ, KRT5-negativ). Diese Beobachtung lässt zunächst die Schlussfolgerung zu, dass es sich hierbei um aus *Kras*-Lungen-Adenokarzinomzellen bestehende Tumororganoide handelt. Eine weitere in Betracht zu ziehende Annahme besteht jedoch darin, dass eine Verunreinigung der

präparierten Tumorknoten mit nicht entarteten Zellen stattgefunden hat und hierbei reine Typ-II-Pneumozyten-Organoid kultiviert wurden. Dies wäre ebenfalls mit der beobachteten Markerkonstellation zu erklären. Im Rahmen der Organoidkultur ist es bekannt, dass physiologische Zellen das Potenzial besitzen, die Zellkultur zu überwuchern und die Tumorzellpopulation zu verdrängen [28,33]. Diese Beobachtung ist wahrscheinlich auf eine höhere Rate an mitotischem Versagen und anschließendem Zelltod von Tumororganoiden zurückzuführen [33]. Bis vor wenigen Jahren war zur Kultivierung sowohl muriner als auch humaner Typ-II-Pneumozyten-Organoid eine Co-Kultivierung mit mesenchymalen Zellen nötig [8,86]. Die innerhalb dieser Bedingungen gewachsenen Organoid wurden als Alveosphären bezeichnet und setzten sich neben einer äußeren Zellschicht aus Typ-II-Pneumozyten aus einer inneren Zellschicht aus Typ-I-Pneumozyten zusammen [7]. Shiraishi et al. ist es jedoch gelungen, passagierbare, murine Alveosphären ohne mesenchymale Co-Kultivierung heranzuzüchten. Dies gelang durch die Identifikation der zentralen Mediatoren der Interaktion zwischen pulmonalen Fibroblasten und Typ-II-Pneumozyten innerhalb einer Co-Kultur, welche das Wachstum der Typ-II-Zellen entscheidend beeinflusst und fördert. Durch Zugabe der für diese Interaktion ursächlichen Faktoren wurde die Fibroblasten-freie Kultivierung von murinen Alveosphären erreicht. Dazu zählten beispielsweise Tgf- β -Inhibitoren oder Fgf7-Liganden [128]. Naranjo et al. beschrieben anschließend ein Protokoll zur Kultivierung passagierbarer reiner muriner Alveolarepithelzell-Typ-II-Organoid. Dazu wurde ein weiter modifiziertes Kulturmedium definiert, welches unter anderem einige der bereits von Shiraishi et al. identifizierten Mediatoren wie Tgf- β -Inhibitoren oder Fgf7-Aktivatoren enthielt, die in vivo von pulmonalen Fibroblasten vermittelt werden. Durch Zugabe weiterer Aktivatoren der alveolären Regeneration und Proliferation (c-Met, Wnt) sowie Inhibitoren der entsprechenden Antagonisten dieser Prozesse (p38 MAPK) wurde das Kulturmedium komplettiert [97]. Die Notwendigkeit der Supplementierung von Fibroblasten-vermittelten Faktoren beziehungsweise der Co-Kultivierung mit mesenchymalen Zellen zur Kultivierung von reinen Alveolarepithelzell-Typ-II-Organoiden und Alveosphären, machen das Vorliegen von reinen Typ-II-Pneumozyten-Organoiden in dieser Arbeit zunächst unwahrscheinlich. Der einschichtige Aufbau der Tumororganoid sowie die vollständige SFTPC-Positivität der vitalen Organoid-bildenden Zellen sprechen außerdem gegen die Kultivierung zweischichtiger Alveosphären. Um die Möglichkeit einer Verunreinigung mit physiologischen Lungenzellen dennoch genauer zu untersuchen, wurde physiologisches Lungenparenchym aus Wildtyp-Mäusen unter Verwendung des identischen Versuchsprotokolls in Einzelzellen dissoziiert und kultiviert. Diese Ausgangssituation würde einer Verunreinigungssituation entsprechen und war demnach als Negativkontrolle konzipiert.

Die unter der Verwendung von physiologischem Lungengewebe gewachsenen Organoid zeigten im Gegensatz zu den Tumororganoiden und den *Kras*-Mauslungen ein abweichendes Ergebnis der immunhistochemischen Charakterisierungsmarker. Nur vereinzelte Zellen waren SFTPC-positiv, während eine stark positive Expression von SCGB1A1 beobachtet werden konnte. Der Basalzellmarker KRT5 war auch hierbei nicht nachweisbar. Diese Konstellation lässt die Schlussfolgerung zu, dass es

sich bei den Lungenparenchymorganoiden um Keulenzellorganoide handelt. Ein Wachstum von Alveolarepithelzellen konnte in der Kontrolle somit nicht beobachtet werden. Keulenzellen besitzen im murinen und möglicherweise auch im menschlichen respiratorischen Epithel eine komplexe Stammzellfunktion [9,109]. Rawlins et al. konnten nachweisen, dass Keulenzellen in Mausbronchiolen die Fähigkeit dazu besitzen sich selbst zu erneuern und in Flimmerepithelzellen zu differenzieren [109]. Diese Tatsache könnte deren Potenzial zum dominierenden Wachstum innerhalb des Spektrums der physiologischen Epithelzellpopulationen der Lunge unter den gewählten Kulturbedingungen erklären. In Anbetracht der Expression einzelner SFTPC-positiver Zellen innerhalb der Lungenparenchymorganoide kann die Kultivierung einiger doppelt-positiver Zellen im Sinne des BASC-Modells diskutiert werden, bei denen es sich um eine Untergruppe der sehr heterogenen Keulenzellpopulation handelt.

Neben der immunhistochemischen Charakterisierung zeigte die Färbung des Proliferationsmarkers Ki-67 ebenfalls signifikante Unterschiede zwischen den Tumor- und den Lungenorganoiden. Zunächst stand dem durchschnittlichen Ki-67-Index von rund 7 % innerhalb der *Kras*-Lungentumore in vivo ein annähernd viermal so hoher medianer Proliferationsindex der Tumororganoide gegenüber (30 %) nach 8 Tagen der Kultivierung. Diese gesteigerte Proliferation im Rahmen der dreidimensionalen Kultivierung lässt sich mit der starken Wachstumsstimulation durch anabole Supplemente wie EGF oder Insulin erklären, welche dem OCM zugesetzt wurden. Hierdurch konnte außerdem gezeigt werden, dass die Adenokarzinomzellen für wachstumsmodulierende Substanzen in der dreidimensionalen Kultur weiterhin zugänglich sind. Mit median 55 % befanden sich schließlich eine signifikant höhere Anzahl an Zellen der Lungenorganoide in einem proliferativen Zustand als die Zellen der Tumororganoide. In Zusammenschau mit der immunhistochemischen Charakterisierung und der Identifikation der Parenchymorganoide als Keulenzellorganoide, lässt sich der sehr hohe Ki-67-Index der Lungenorganoide auf die Stammzeleigenschaften der Keulenzellen zurückführen. Es ist bekannt, dass Keulenzellen in bestimmten Medien eine sehr hohe proliferative Aktivität aufweisen können [75]. Diese Eigenschaft hebt somit deren Potenzial hervor, die dreidimensionale Zellkultur zu dominieren in Konkurrenz zu den restlichen physiologischen Zellpopulationen der murinen Lunge.

Die Notwendigkeit spezieller Faktoren innerhalb des Kulturmediums zur Kultivierung von reinen Typ-II-Pneumozyten-Organoiden beziehungsweise Alveosphären und deren Abwesenheit in dem in dieser Arbeit verwendeten OCM, machen das Vorliegen von reinen Typ-II-Pneumozyten-Organoiden in dieser Arbeit höchst unwahrscheinlich. In der simulierten Kontaminierungssituation mit physiologischen Zellen zeigte sich, dass diese zu einer Kultivierung von Keulenzellorganoiden unter identischen Versuchsbedingungen führt. In Zusammenschau der in dieser Arbeit erbrachten Ergebnisse und Schlussfolgerungen lässt sich herausarbeiten, dass in dieser Arbeit *Kras*-Lungentumororganoide kultiviert wurden. Eine weiterreichende Charakterisierung der Tumor- und Lungenorganoide auf molekularbiologischer Ebene sollte zukünftig aufbauend auf dieser Arbeit durchgeführt werden und bildet mögliche Ansätze zum Ausbau des hier etablierten Modells sowie zur definitiven Klärung des

zellulären Ursprungs der Tumororganoide. Durch die Ähnlichkeit des KRAS-induzierten murinen Lungenkarzinoms mit dem humanen Adenokarzinom der Lunge hinsichtlich histopathologischer und immunhistochemischer Charakterisierung sowie der gemeinsamen Ursprungszellpopulation, eignen sich C57BL/6N *Kras*^{LA1}-Mäuse zur Modellierung eines humanen Lungenadenokarzinoms im Frühstadium. Zusammenfassend bietet das in dieser Arbeit dargelegte Protokoll die Möglichkeit, diese Modellierung in Form einer dreidimensionalen Organoidzellkultur zu erreichen.

5.4 Vergleichende Betrachtung der passagierten Tumororganoide und Lungenorganoide

Nach 30 Tagen Wachstumszeit wurden sowohl Tumor- als auch Lungenorganoide in Einzelzelllösung dissoziiert und anschließend wieder ausgebracht. Die in dieser Passage gewachsenen Tumororganoide zeigten eine vergleichbare Größe gegenüber den primär kultivierten Tumororganoiden nach 30 Tagen. Die proliferative Aktivität unterschied sich ebenfalls nicht signifikant. Im Rahmen der immunhistochemischen Charakterisierung erwiesen sich die Tumororganoide der Passage 1 identisch zu denen der Passage 0 als vollständig SFTPC-positiv, KRT5-negativ und SCGB1A1-negativ. Diese Konstanz der Tumororganoide hinsichtlich des Wachstums- und Proliferationsverhaltens sowie des Expressionsverhaltens der Charakterisierungsmarker über den Vorgang des Passagierens hinweg, lässt auf eine Stabilität der zentralen Zelleigenschaften schließen. Daraus ergibt sich die Fähigkeit der Expansion der in dieser Arbeit etablierten Tumororganoide. In einem zukünftigen Ausbau dieses Tumororganoidmodells könnte eine weiterreichende Beurteilung der Passage-Fähigkeit der Tumororganoide in Form von beispielsweise 10 Passagen erfolgen. Dabei bleibt die immunhistochemische Färbung eine wichtige Charakterisierungsmethode, die Untersuchung der genomischen Stabilität über multiple Passagen könnte jedoch ebenfalls in die Betrachtung miteinbezogen werden.

Die Lungenorganoide wiesen ebenfalls die Fähigkeit zur Passage auf und zeigten, wie bereits in Passage 0, eine höhere Proliferationsrate als die Tumororganoide der jeweiligen Passage. Eine Kultivierung einzelner SFTPC-positiver Zellen konnte in der Passage 1 hingegen nicht mehr beobachtet werden, alle Zellen zeigten sich ausschließlich SCGB1A1-positiv und weiterhin KRT5-negativ. Somit erfolgte durch den Vorgang des Passagierens eine Selektion von ausschließlich SCGB1A1-positiven Zellen. Bisher konnten durch die Co-Kultivierung von murinen Keulenzellen mit Lgr6-pos- oder Lgr5-pos-Zellen drei Organoidtypen verschiedener Zellzusammensetzung erzeugt werden. Erstens konnten bronchiale Organoide kultiviert werden, die sich aus Keulenzellen und Flimmerepithelzellen zusammensetzten. Zweitens konnten alveoläre, aus Typ-I- und Typ-II-Pneumozyten bestehende Organoide gezüchtet werden sowie drittens eine bronchoalveoläre Mischform [75]. Die in dieser Arbeit kultivierten Lungenorganoide sind somit dem bronchialen Typ zuzuordnen, das Vorhandensein von Flimmerepithelzellen ist der mikroskopischen Betrachtung entsprechend möglich und ist Ziel zukünftiger weiterreichender Charakterisierung der Lungenorganoide. Weiterhin wird mit dieser Arbeit gezeigt, dass eine Kultivierung muriner Keulenzellorganoide auch ohne mesenchymale Beteiligung in

Form einer Co-Kultur möglich ist, möglicherweise wird durch deren Abwesenheit das Wachstum des bronchialen Typs bevorzugt. Da es sich bei Keulenzellen um eine sehr heterogene Population handelt, die in den letzten Jahren immer weiter aufgeschlüsselt wurde, bleibt weiterhin offen, ob die in dieser Arbeit kultivierten SCGB1A1-positiven Organoiden möglicherweise eine Keulenzellsubpopulation darstellen [8,9]. Durch eine weiterreichende Charakterisierung der Lungenorganoiden auf molekularbiologischer Ebene könnte eine genaue Zuordnung hergestellt werden. Nach Barkauskas et al. bietet insbesondere die Organoidkultur die Möglichkeit zur Testung des Einflusses bestimmter Zytokine und Wachstumsfaktoren auf sekretorische Zellen und könnte somit der Identifikation von Keulenzellsubpopulationen dienen, die beispielsweise ein erhöhtes Regenerationspotenzial aufweisen [8]. Somit kann das in dieser Arbeit dargelegte Protokoll ebenfalls einen methodisch reduzierten Ansatz zur Kultivierung muriner Keulenzellorganoiden liefern und könnte einen Beitrag zur weiteren Differenzierung der Keulenzellpopulation leisten.

5.5 Modularität des Modells und Einfluss von Alveolarmakrophagen

Bei der Betrachtung des Wachstumsverhaltens von Tumororganoiden, welche 30 Tage mit Alveolarmakrophagen co-kultiviert wurden, zeigte sich keine signifikante Veränderung hinsichtlich des Organoiddurchmessers im Vergleich zu Tumororganoiden in Monokultur. Es konnte jedoch ein signifikant höherer Ertrag an Organoiden in Form einer höheren Organoidanzahl pro Well im Fall der Makrophagen-Co-Kultur gegenüber der Tumororganoid-Monokultur erreicht werden. Diese Beobachtungen lassen darauf schließen, dass durch die Makrophagen-vermittelten inflammatorischen Mediatoren eine Steigerung der Rate an zu Organoiden expandierenden Einzelzellen erreicht werden kann. Diese inflammatorische Komponente innerhalb des Modells scheint das Organoidwachstum, die Organoidmorphologie und erwartungsgemäß das Expressionsverhalten der Charakterisierungsmarker hingegen nicht zu beeinflussen. Inflammation fördert generell die Tumorentstehung und -progression im Rahmen der Tumormikroumgebung [27,40,90]. Als Gewebe-residente Immunzellen leisten verschiedene Subtypen von Makrophagen zu dieser Tumor-fördernden Komponente der Inflammation einen bedeutenden Beitrag [16,103]. Auch Alveolarmakrophagen sind nach Balážová et al. wesentlich an der Etablierung und der Progression des NSCLC beteiligt und bilden diesbezüglich eine der am häufigsten zu beobachtenden Immunzell-Infiltrate. Dreidimensionalen Co-Kultur-Modellen aus NSCLC-Zellen und Immunzellen, beispielsweise in einem Transwell-System mit Makrophagen, wird eine bedeutende Rolle in der Etablierung von Makrophagen-gerichteten Therapien des NSCLC zugeschrieben [5]. Diesbezüglich könnte auch das in dieser Arbeit etablierte Modell einen Beitrag leisten.

Die Erhöhung der Organoid-Etablierungsrate durch die Co-Kultur mit Alveolarmakrophagen zeigt in einem ersten Ansatz, dass dieses KRAS-vermittelte Lungentumormodell durch äußere Faktoren modulierbar ist. Durch die Co-Kultur mit weiteren Immunzellen wie Lymphozyten oder mit mesenchymalen Lungenzellen wie Lungenfibroblasten kann eine weitere Vertiefung des Modells

erfolgen. Die Supplementierungen Tumorwachstum-fördernder Zytokine und deren Einfluss auf das Wachstumsverhalten der Tumororganoide könnten ebenfalls zukünftige Ansätze sein, dass in dieser Arbeit etablierte Modell weiter auszubauen.

5.6 Schlussbemerkung

Mit dieser Arbeit wurde ein niederschwellig durchführbares Protokoll etabliert, KRAS-getriebene murine Lungentumorzellen in Form von Organoiden über einen Zeitraum von mindestens 30 Tagen zu kultivieren. Diese Tumororganoide wurden immunhistochemisch charakterisiert, konnten passagiert und damit expandiert werden. Aus der Co-Kultivierung der Tumororganoide mit Alveolarmakrophagen resultierte eine höhere Organoid-Etablierungsrate und damit ein höherer Organoid-Ertrag, woraus sich die Modulationsfähigkeit des Modells durch Inflammation ableiten lässt. Zudem zeigten die zunächst als Negativkontrolle konzipierten Lungenparenchym-Organoiden, dass mit diesem Protokoll ebenfalls eine Kultivierung von murinen Keulenzellorganoiden erreicht werden kann, welche gleichermaßen die Fähigkeit zur Expansion mittels Passage aufwiesen. Zusammenfassend sollten die nächsten Schritte zur Fortführung des in dieser Arbeit etablierten Modells vorrangig auf eine molekulargenetische Charakterisierung der Tumor- und Lungenorganoide ausgerichtet werden. Auf diese Weise könnte der definitive Ausschluss der Kultivierung von reinen, passagierbaren Typ-II-Pneumozyten-Organoiden vertieft werden, für deren Anzucht bisher die Supplementierung von mesenchymalen Mediatoren im Kulturmedium notwendig war. Außerdem könnten Informationen über die mögliche Kultivierung einer Keulenzellsubpopulation innerhalb der Lungenorganoide gewonnen werden. Ein weiterer Ansatz zur Erweiterung des hier etablierten Modells stellt die Ermittlung einer möglicherweise vorhandenen Expansionsgrenze der Tumororganoide dar. Diese könnte durch die Fortführung multipler Passagen erreicht werden. Außerdem könnte der Einfluss der Co-Kultivierung mit weiteren Immun- oder mesenchymalen Zellen sowie die Reaktion der Organoiden auf die Stimulation mit verschiedenen Zytokinen oder Wirkstoffen untersucht werden. Tierexperimente werden in der Krebsforschung weiterhin benötigt und erfordern eine beträchtliche Anzahl von Forschungstieren. In zahlreichen Staaten wurden Tierversuche gesetzlich reduziert, um ein ethisch vertretbares Niveau zu erreichen. Demnach kommt der Entwicklung von Zellkultur-basierten Methoden eine große Wichtigkeit zu, um Tierexperimente zu reduzieren und hierbei in Grundlagenforschung sowie Medikamentenentwicklung Anwendung zu finden. Dreidimensionale Kultursysteme wie Organoidmodelle haben den Anspruch die Gegebenheiten in vivo physiologisch getreuer abzubilden, als es mit konventionellen 2D-Kultursystemen möglich ist. Im Rahmen der Lungenkarzinomforschung bieten murine KRAS-getriebene Lungenkarzinome die Möglichkeit zur Modellierung eines menschlichen Lungenadenokarzinoms im Frühstadium. Das in dieser Arbeit entwickelte Modell dient zur Abbildung eines Lungenadenokarzinoms in Form einer dreidimensionalen Organoid-Zellkultur und trägt somit dazu bei, den Einsatz von Zellkulturmodellen zur Reduktion von Tierversuchen in der Grundlagen- und translationalen Lungenkrebsforschung voranzutreiben.

6. Literaturverzeichnis

1. Adderley H, Blackhall FH, Lindsay CR (2019) KRAS-mutant non-small cell lung cancer: Converging small molecules and immune checkpoint inhibition. *EBioMedicine* 41:711–716
2. Aisenbrey EA, Murphy WL (2020) Synthetic alternatives to Matrigel. *Nat Rev Mater* 5:539–551
3. Aoki K (1993) Excess Incidence of Lung Cancer among Pulmonary Tuberculosis Patients. *Jpn J Clin Oncol* 23:205–220
4. Bailey-Wilson JE, Sellers TA, Elston RC, Evens CC, Rothschild H (1993) Evidence for a major gene effect in early-onset lung cancer. *J La State Med Soc Off Organ La State Med Soc* 145:157–162
5. Balážová K, Clevers H, Dost AF The role of macrophages in non-small cell lung cancer and advancements in 3D co-cultures. *eLife* 12:e82998
6. Balkwill F, Mantovani A (2001) Inflammation and cancer: back to Virchow? *The Lancet* 357:539–545
7. Barkauskas CE, Cronce MJ, Rackley CR, Bowie EJ, Keene DR, Stripp BR, Randell SH, Noble PW, Hogan BLM (2013) Type 2 alveolar cells are stem cells in adult lung. *J Clin Invest* 123:3025–3036
8. Barkauskas CE, Chung M-I, Fioret B, Gao X, Katsura H, Hogan BLM (2017) Lung organoids: current uses and future promise. *Development* 144:986–997
9. Blackburn JB, Li NF, Bartlett NW, Richmond BW (2023) An update in club cell biology and its potential relevance to chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Physiol-Lung Cell Mol Physiol* 324:L652–L665
10. Boffetta P (2002) Involuntary smoking and lung cancer. *Scand J Work Environ Health* 28 Suppl 2:30–40
11. Bose S, Clevers H, Shen X (2021) Promises and Challenges of Organoid-Guided Precision Medicine. *Med N Y N* 2:1011–1026
12. Bray F, Laversanne M, Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Soerjomataram I, Jemal A (2024) Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin* 74:229–263
13. Brenner DR, McLaughlin JR, Hung RJ (2011) Previous Lung Diseases and Lung Cancer Risk: A Systematic Review and Meta-Analysis. *PLOS ONE* 6:e17479
14. Budisan L, Zanoaga O, Braicu C, Pirlog R, Covaliu B, Esanu V, Korban SS, Berindan-Neagoe I (2021) Links between Infections, Lung Cancer, and the Immune System. *Int J Mol Sci* 22:9394
15. Casanova-Acebes M, Dalla E, Leader AM, LeBerichel J, Nikolic J, Morales BM, Brown M, Chang C, Troncso L, Chen ST, Sastre-Perona A, Park MD, Tabachnikova A, Dhainaut M, Hamon P, Maier B, Sawai CM, Agulló-Pascual E, Schober M, Brown BD, Reizis B, Marron T, Kenigsberg E, Moussion C, Benaroch P, Aguirre-Ghiso JA, Merad M (2021) Tissue-resident macrophages provide a pro-tumorigenic niche to early NSCLC cells. *Nature* 595:578–584
16. Cassetta L, Pollard JW (2018) Targeting macrophages: therapeutic approaches in cancer. *Nat Rev Drug Discov* 17:887–904

17. Chen J, Na F (2022) Organoid technology and applications in lung diseases: Models, mechanism research and therapy opportunities. *Front Bioeng Biotechnol* 10:
18. Chen Z, Fillmore CM, Hammerman PS, Kim CF, Wong K-K (2014) Non-small-cell lung cancers: a heterogeneous set of diseases. *Nat Rev Cancer* 14:535–546
19. Cheng L, Alexander RE, MacLennan GT, Cummings OW, Montironi R, Lopez-Beltran A, Cramer HM, Davidson DD, Zhang S (2012) Molecular pathology of lung cancer: key to personalized medicine. *Mod Pathol* 25:347–369
20. Chu QS (2020) Targeting non-small cell lung cancer: driver mutation beyond epidermal growth factor mutation and anaplastic lymphoma kinase fusion. *Ther Adv Med Oncol* 12:1758835919895756
21. Collins LG, Haines C, Perkel R, Enck RE (2007) Lung Cancer: Diagnosis and Management. *Am Fam Physician* 75:56–63
22. Coussens LM, Werb Z (2002) Inflammation and cancer. *Nature* 420:860–867
23. Cunniff B, Druso JE, van der Velden JL (2021) Lung organoids: advances in generation and 3D-visualization. *Histochem Cell Biol* 155:301–308
24. Dantoing E, Piton N, Salaün M, Thiberville L, Guisier F (2021) Anti-PD1/PD-L1 Immunotherapy for Non-Small Cell Lung Cancer with Actionable Oncogenic Driver Mutations. *Int J Mol Sci* 22:6288
25. de Visser KE, Eichten A, Coussens LM (2006) Paradoxical roles of the immune system during cancer development. *Nat Rev Cancer* 6:24–37
26. Desai TJ, Brownfield DG, Krasnow MA (2014) Alveolar progenitor and stem cells in lung development, renewal and cancer. *Nature* 507:190–194
27. Diakos CI, Charles KA, McMillan DC, Clarke SJ (2014) Cancer-related inflammation and treatment effectiveness. *Lancet Oncol* 15:e493–e503
28. Dijkstra KK, Monkhorst K, Schipper LJ, Hartemink KJ, Smit EF, Kaing S, de Groot R, Wolkers MC, Clevers H, Cuppen E, Voest EE (2020) Challenges in Establishing Pure Lung Cancer Organoids Limit Their Utility for Personalized Medicine. *Cell Rep* 31:107588
29. Dogan S, Shen R, Ang DC, Johnson ML, D'Angelo SP, Paik PK, Brzostowski EB, Riely GJ, Kris MG, Zakowski MF, Ladanyi M (2012) Molecular Epidemiology of EGFR and KRAS Mutations in 3026 Lung Adenocarcinomas: Higher Susceptibility of Women to Smoking-related KRAS-mutant Cancers. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res* 18:6169–6177
30. Doll R, Peto R, Boreham J, Sutherland I (2004) Mortality in relation to smoking: 50 years' observations on male British doctors. *BMJ* 328:1519
31. Dost AFM, Moye AL, Vedaie M, Tran LM, Fung E, Heinze D, Villacorta-Martin C, Huang J, Hekman R, Kwan JH, Blum BC, Louie SM, Rowbotham SP, Sainz de Aja J, Piper ME, Bhetariya PJ, Bronson RT, Emili A, Mostoslavsky G, Fishbein GA, Wallace WD, Krysan K, Dubinett SM, Yanagawa J, Kotton DN, Kim CF (2020) Organoids Model Transcriptional Hallmarks of Oncogenic KRAS Activation in Lung Epithelial Progenitor Cells. *Cell Stem Cell* 27:663–678.e8
32. Driehuis E, Kretzschmar K, Clevers H (2020) Establishment of patient-derived cancer organoids for drug-screening applications. *Nat Protoc* 15:3380–3409
33. Drost J, Clevers H (2018) Organoids in cancer research. *Nat Rev Cancer* 18:407–418

34. Ferlay J, Colombet M, Soerjomataram I, Parkin DM, Piñeros M, Znaor A, Bray F (2021) Cancer statistics for the year 2020: An overview. *Int J Cancer* 149:778–789
35. Fidler-Benaoudia MM, Torre LA, Bray F, Ferlay J, Jemal A (2020) Lung cancer incidence in young women vs. young men: A systematic analysis in 40 countries. *Int J Cancer* 147:811–819
36. Fois SS, Paliogiannis P, Zinellu A, Fois AG, Cossu A, Palmieri G (2021) Molecular Epidemiology of the Main Druggable Genetic Alterations in Non-Small Cell Lung Cancer. *Int J Mol Sci* 22:612
37. Fontham ET, Correa P, Reynolds P, Wu-Williams A, Buffler PA, Greenberg RS, Chen VW, Alterman T, Boyd P, Austin DF (1994) Environmental tobacco smoke and lung cancer in nonsmoking women. A multicenter study. *JAMA* 271:1752–1759
38. Frost N, Griesinger F, Hoffmann H, Länger F, Nestle U, Schütte W, Wolf J, Reck M (2022) Lung Cancer in Germany. *J Thorac Oncol* 17:742–750
39. Goulding RE, Chenoweth M, Carter GC, Boye ME, Sheffield KM, John WJ, Leusch MS, Muehlenbein CE, Li L, Jen M-H, Rojubally A, Jansen J, Druyts E (2020) KRAS mutation as a prognostic factor and predictive factor in advanced/metastatic non-small cell lung cancer: A systematic literature review and meta-analysis. *Cancer Treat Res Commun* 24:100200
40. Greten FR, Grivennikov SI (2019) Inflammation and Cancer: Triggers, Mechanisms, and Consequences. *Immunity* 51:27–41
41. Grivennikov SI, Greten FR, Karin M (2010) Immunity, Inflammation, and Cancer. *Cell* 140:883–899
42. Hammerschmidt S, Wirtz H (2009) Lung Cancer: Current Diagnosis and Treatment. *Dtsch Arztebl Int* 106:809–820
43. Han Y, Duan X, Yang L, Nilsson-Payant BE, Wang P, Duan F, Tang X, Yaron TM, Zhang T, Uhl S, Bram Y, Richardson C, Zhu J, Zhao Z, Redmond D, Houghton S, Nguyen D-HT, Xu D, Wang X, Jessurun J, Boreczuk A, Huang Y, Johnson JL, Liu Y, Xiang J, Wang H, Cantley LC, tenOever BR, Ho DD, Pan FC, Evans T, Chen HJ, Schwartz RE, Chen S (2021) Identification of SARS-CoV-2 inhibitors using lung and colonic organoids. *Nature* 589:270–275
44. Harrison PT, Vyse S, Huang PH (2020) Rare epidermal growth factor receptor (EGFR) mutations in non-small cell lung cancer. *Semin Cancer Biol* 61:167–179
45. Herbst RS, Morgensztern D, Boshoff C (2018) The biology and management of non-small cell lung cancer. *Nature* 553:446–454
46. Hild M, Jaffe AB (2016) Production of 3-D Airway Organoids From Primary Human Airway Basal Cells and Their Use in High-Throughput Screening. *Curr Protoc Stem Cell Biol* 37:IE.9.1-IE.9.15
47. Hirsch FR, Scagliotti GV, Mulshine JL, Kwon R, Curran WJ, Wu Y-L, Paz-Ares L (2017) Lung cancer: current therapies and new targeted treatments. *The Lancet* 389:299–311
48. Hofer M, Lutolf MP (2021) Engineering organoids. *Nat Rev Mater* 6:402–420
49. Hoffman PC, Mauer AM, Vokes EE (2000) Lung cancer. *The Lancet* 355:479–485
50. Hu P, Zhang W, Xin H, Deng G (2016) Single Cell Isolation and Analysis. *Front Cell Dev Biol* 4:
51. Huang R, Wei Y, Hung RJ, Liu G, Su L, Zhang R, Zong X, Zhang Z-F, Morgenstern H, Brüske I, Heinrich J, Hong Y-C, Kim JH, Cote M, Wenzlaff A, Schwartz AG, Stucker I, McLaughlin J, Marcus MW, Davies MPA, Liloglou T, Field JK, Matsuo K, Barnett M, Thornquist M, Goodman

- G, Wang Y, Chen S, Yang P, Duell EJ, Andrew AS, Lazarus P, Muscat J, Woll P, Horsman J, Dawn Teare M, Flugelman A, Rennert G, Zhang Y, Brenner H, Stegmaier C, van der Heijden EHFM, Aben K, Kiemeny L, Barros-Dios J, Pérez-Ríos M, Ruano-Ravina A, Caporaso NE, Bertazzi PA, Landi MT, Dai J, Shen H, Fernandez-Tardon G, Rodriguez-Suarez M, Tardon A, Christiani DC (2015) Associated Links Among Smoking, Chronic Obstructive Pulmonary Disease, and Small Cell Lung Cancer: A Pooled Analysis in the International Lung Cancer Consortium. *EBioMedicine* 2:1677–1685
52. Huang SXL, Green MD, de Carvalho AT, Mumau M, Chen Y-W, D’Souza SL, Snoeck H-W (2015) The in vitro generation of lung and airway progenitor cells from human pluripotent stem cells. *Nat Protoc* 10:413–425
53. Huang Y, Huang Z, Tang Z, Chen Y, Huang M, Liu H, Huang W, Ye Q, Jia B (2021) Research Progress, Challenges, and Breakthroughs of Organoids as Disease Models. *Front Cell Dev Biol* 9:
54. Hwang SY, Kim JY, Lee HS, Lee S, Kim D, Kim S, Hyun JH, Shin JI, Lee KH, Han SH, Song YG (2022) Pulmonary Tuberculosis and Risk of Lung Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis. *J Clin Med* 11:765
55. Hynds RE, Janes SM (2017) Airway Basal Cell Heterogeneity and Lung Squamous Cell Carcinoma. *Cancer Prev Res (Phila Pa)* 10:491–493
56. IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans (2004) Tobacco smoke and involuntary smoking. *IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum* 83:1–1438
57. Idowu MO, Powers CN (2010) Lung cancer cytology: potential pitfalls and mimics - a review. *Int J Clin Exp Pathol* 3:367–385
58. J. Saller J, Boyle TA (2022) Molecular Pathology of Lung Cancer. *Cold Spring Harb Perspect Med* 12:a037812
59. Jachowski A, Marcinkowski M, Szydłowski J, Grabarczyk O, Nogaj Z, Marcin Ł, Pławski A, Jagodziński PP, Słowikowski BK (2023) Modern therapies of nonsmall cell lung cancer. *J Appl Genet* 64:695–711
60. Jackson EL, Willis N, Mercer K, Bronson RT, Crowley D, Montoya R, Jacks T, Tuveson DA (2001) Analysis of lung tumor initiation and progression using conditional expression of oncogenic K-ras. *Genes Dev* 15:3243–3248
61. Johnson L, Mercer K, Greenbaum D, Bronson RT, Crowley D, Tuveson DA, Jacks T (2001) Somatic activation of the K-ras oncogene causes early onset lung cancer in mice. *Nature* 410:1111–1116
62. Judd J, Abdel Karim N, Khan H, Naqash AR, Baca Y, Xiu J, VanderWalde AM, Mamdani H, Raez LE, Nagasaka M, Pai SG, Socinski MA, Nieva JJ, Kim C, Wozniak AJ, Ikpeazu C, de Lima Lopes G Jr, Spira AI, Korn WM, Kim ES, Liu SV, Borghaei H (2021) Characterization of KRAS Mutation Subtypes in Non-small Cell Lung Cancer. *Mol Cancer Ther* 20:2577–2584
63. Kathiriya JJ, Wang C, Brumwell A, Cassandras M, Saux CL, Wolters P, Matthay M, Chapman HA, Peng T (2020) Human alveolar Type 2 epithelium transdifferentiates into metaplastic KRT5+ basal cells during alveolar repair. 2020.06.06.136713
64. Kim CFB, Jackson EL, Woolfenden AE, Lawrence S, Babar I, Vogel S, Crowley D, Bronson RT, Jacks T (2005) Identification of Bronchioalveolar Stem Cells in Normal Lung and Lung Cancer. *Cell* 121:823–835

65. Kim J, Koo B-K, Knoblich JA (2020) Human organoids: model systems for human biology and medicine. *Nat Rev Mol Cell Biol* 21:571–584
66. Kim M, Mun H, Sung CO, Cho EJ, Jeon H-J, Chun S-M, Jung DJ, Shin TH, Jeong GS, Kim DK, Choi EK, Jeong S-Y, Taylor AM, Jain S, Meyerson M, Jang SJ (2019) Patient-derived lung cancer organoids as in vitro cancer models for therapeutic screening. *Nat Commun* 10:3991
67. Koch-Institut R Krebs in Deutschland für 2017/2018.
68. Kong J, Wen S, Cao W, Yue P, Xu X, Zhang Y, Luo L, Chen T, Li L, Wang F, Tao J, Zhou G, Luo S, Liu A, Bao F (2021) Lung organoids, useful tools for investigating epithelial repair after lung injury. *Stem Cell Res Ther* 12:95
69. Kratochvil MJ, Seymour AJ, Li TL, Paşca SP, Kuo CJ, Heilshorn SC (2019) Engineered materials for organoid systems. *Nat Rev Mater* 4:606–622
70. Kretzschmar K (2021) Cancer research using organoid technology. *J Mol Med* 99:501–515
71. Kundu JK, Surh Y-J (2008) Inflammation: Gearing the journey to cancer. *Mutat Res Mutat Res* 659:15–30
72. Kuper H, Adami H-O, Trichopoulos D (2000) Infections as a major preventable cause of human cancer. *J Intern Med* 248:171–183
73. Lancaster MA, Knoblich JA (2014) Organogenesis in a dish: Modeling development and disease using organoid technologies. *Science* 345:1247125
74. Lee J-H, Bhang DH, Beede A, Huang TL, Stripp BR, Bloch KD, Wagers AJ, Tseng Y-H, Ryeom S, Kim CF (2014) Lung stem cell differentiation in mice directed by endothelial cells via a BMP4-NFATc1-Thrombospondin-1 axis. *Cell* 156:440–455
75. Lee J-H, Tammela T, Hofree M, Choi J, Marjanovic ND, Han S, Canner D, Wu K, Paschini M, Bhang DH, Jacks T, Regev A, Kim CF (2017) Anatomically and Functionally Distinct Lung Mesenchymal Populations Marked by Lgr5 and Lgr6. *Cell* 170:1149–1163.e12
76. Leiter A, Veluswamy RR, Wisnivesky JP (2023) The global burden of lung cancer: current status and future trends. *Nat Rev Clin Oncol* 20:624–639
77. Lewis DR, Check DP, Caporaso NE, Travis WD, Devesa SS (2014) U.S. Lung Cancer Trends by Histologic Type. *Cancer* 120:2883–2892
78. Li C, Lei S, Ding L, Xu Y, Wu X, Wang H, Zhang Z, Gao T, Zhang Y, Li L (2023) Global burden and trends of lung cancer incidence and mortality. *Chin Med J (Engl)* 136:1583
79. Li Y, Chan JWY, Lau RWH, Cheung WWY, Wong AM, Wong AM, Wong N, Ng CSH (2021) Organoids in Lung Cancer Management. *Front Surg* 8:753801
80. Lin W-W, Karin M (2007) A cytokine-mediated link between innate immunity, inflammation, and cancer. *J Clin Invest* 117:1175–1183
81. Littman AJ, Jackson LA, Vaughan TL (2005) Chlamydia pneumoniae and Lung Cancer: Epidemiologic Evidence. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 14:773–778
82. Liu Q, Liu K, Cui G, Huang X, Yao S, Guo W, Qin Z, Li Y, Yang R, Pu W, Zhang L, He L, Zhao H, Yu W, Tang M, Tian X, Cai D, Nie Y, Hu S, Ren T, Qiao Z, Huang H, Zeng YA, Jing N, Peng G, Ji H, Zhou B (2019) Lung regeneration by multipotent stem cells residing at the bronchioalveolar-duct junction. *Nat Genet* 51:728–738

83. Liu Y, Zhou Y, Chen P (2023) Lung cancer organoids: models for preclinical research and precision medicine. *Front Oncol* 13:
84. Loomis D, Huang W, Chen G (2014) The International Agency for Research on Cancer (IARC) evaluation of the carcinogenicity of outdoor air pollution: focus on China. *Chin J Cancer* 33:189–196
85. Lortet-Tieulent J, Soerjomataram I, Ferlay J, Rutherford M, Weiderpass E, Bray F (2014) International trends in lung cancer incidence by histological subtype: Adenocarcinoma stabilizing in men but still increasing in women. *Lung Cancer* 84:13–22
86. Lu T, Cao Y, Zhao P, Shen S, Xi Y (2021) Organoid: a powerful tool to study lung regeneration and disease. *Cell Regen* 10:21
87. Ludwig J, Ritzmann F, Kamyschnikow A, Herr C, Bals R, Beisswenger C (2024) An easy-to-perform protocol for culturing primary murine lung tumor cells as organoids. *Ann Anat - Anat Anz* 255:152298
88. Mainardi S, Mijimolle N, Francoz S, Vicente-Dueñas C, Sánchez-García I, Barbacid M (2014) Identification of cancer initiating cells in K-Ras driven lung adenocarcinoma. *Proc Natl Acad Sci* 111:255–260
89. Malhotra J, Malvezzi M, Negri E, La Vecchia C, Boffetta P (2016) Risk factors for lung cancer worldwide. *Eur Respir J* 48:889–902
90. Mantovani A, Allavena P, Sica A, Balkwill F (2008) Cancer-related inflammation. *Nature* 454:436–444
91. Martin P, Leighl NB, Tsao M-S, Shepherd FA (2013) KRAS Mutations as Prognostic and Predictive Markers in Non–Small Cell Lung Cancer. *J Thorac Oncol* 8:530–542
92. Mayne ST, Buenconsejo J, Janerich DT (1999) Previous Lung Disease and Risk of Lung Cancer among Men and Women Nonsmokers. *Am J Epidemiol* 149:13–20
93. McCauley HA, Wells JM (2017) Pluripotent stem cell-derived organoids: using principles of developmental biology to grow human tissues in a dish. *Development* 144:958–962
94. Moghaddam SJ, Li H, Cho S-N, Dishop MK, Wistuba II, Ji L, Kurie JM, Dickey BF, Demayo FJ (2009) Promotion of lung carcinogenesis by chronic obstructive pulmonary disease-like airway inflammation in a K-ras-induced mouse model. *Am J Respir Cell Mol Biol* 40:443–453
95. Moldvay J, Tímár J (2024) KRASG12C mutant lung adenocarcinoma: unique biology, novel therapies and new challenges. *Pathol Oncol Res* 29:1611580
96. Murata M (2018) Inflammation and cancer. *Environ Health Prev Med* 23:50
97. Naranjo S, Cabana CM, LaFave LM, Romero R, Shanahan S-L, Bhutkar A, Westcott PMK, Schenkel JM, Ghosh A, Liao LZ, Priore ID, Yang D, Jacks T (2022) Modeling diverse genetic subtypes of lung adenocarcinoma with a next-generation alveolar type 2 organoid platform. *Genes Dev* 36:936–949
98. Nikolić MZ, Rawlins EL (2017) Lung Organoids and Their Use To Study Cell-Cell Interaction. *Curr Pathobiol Rep* 5:223–231
99. Nouredine N, Chalubinski M, Wawrzyniak P (2022) The Role of Defective Epithelial Barriers in Allergic Lung Disease and Asthma Development. *J Asthma Allergy* 15:487–504

100. Öberg M, Jaakkola MS, Woodward A, Peruga A, Prüss-Ustün A (2011) Worldwide burden of disease from exposure to second-hand smoke: a retrospective analysis of data from 192 countries. *The Lancet* 377:139–146
101. Oberoi S, Barchowsky A, Wu F (2014) The Global Burden of Disease for Skin, Lung, and Bladder Cancer Caused By Arsenic in Food. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 23:1187–1194
102. Orkin RW, Gehron P, McGoodwin EB, Martin GR, Valentine T, Swarm R (1977) A murine tumor producing a matrix of basement membrane. *J Exp Med* 145:204–220
103. Pan Y, Yu Y, Wang X, Zhang T (2020) Tumor-Associated Macrophages in Tumor Immunity. *Front Immunol* 11:
104. Peng H, Poovaiah N, Forrester M, Cochran E, Wang Q (2015) Ex Vivo Culture of Primary Intestinal Stem Cells in Collagen Gels and Foams. *ACS Biomater Sci Eng* 1:37–42
105. Pikor LA, Ramnarine VR, Lam S, Lam WL (2013) Genetic alterations defining NSCLC subtypes and their therapeutic implications. *Lung Cancer* 82:179–189
106. Powell HA, Iyen-Omofoman B, Baldwin DR, Hubbard RB, Tata LJ (2013) Chronic Obstructive Pulmonary Disease and Risk of Lung Cancer: The Importance of Smoking and Timing of Diagnosis. *J Thorac Oncol* 8:6–11
107. Prior IA, Hood FE, Hartley JL (2020) The Frequency of Ras Mutations in Cancer. *Cancer Res* 80:2969–2974
108. Punturieri A, Szabo E, Croxton TL, Shapiro SD, Dubinett SM (2009) Lung Cancer and Chronic Obstructive Pulmonary Disease: Needs and Opportunities for Integrated Research. *JNCI J Natl Cancer Inst* 101:554–559
109. Rawlins EL, Okubo T, Xue Y, Brass DM, Auten RL, Hasegawa H, Wang F, Hogan BLM (2009) The Role of Scgb1a1+ Clara Cells in the Long-Term Maintenance and Repair of Lung Airway, but Not Alveolar, Epithelium. *Cell Stem Cell* 4:525–534
110. Reck M, Carbone DP, Garassino M, Barlesi F (2021) Targeting KRAS in non-small-cell lung cancer: recent progress and new approaches. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol* 32:1101–1110
111. Riely GJ, Kris MG, Rosenbaum D, Marks J, Li A, Chitale DA, Nafa K, Riedel ER, Hsu M, Pao W, Miller VA, Ladanyi M (2008) Frequency and distinctive spectrum of KRAS mutations in never smokers with lung adenocarcinoma. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res* 14:5731–5734
112. Riely GJ, Marks J, Pao W (2009) KRAS Mutations in Non–Small Cell Lung Cancer. *Proc Am Thorac Soc* 6:201–205
113. Rock JR, Onaitis MW, Rawlins EL, Lu Y, Clark CP, Xue Y, Randell SH, Hogan BLM (2009) Basal cells as stem cells of the mouse trachea and human airway epithelium. *Proc Natl Acad Sci* 106:12771–12775
114. Ronckers C, Spix C, Trübenbach C, Katalinic A, Christ M, Cicero A, Folkerts J, Hansmann J, Kranzhöfer K, Kunz B, Manegold K, Meyer zum Büschenfelde U, Penzkofer A, Vollmer G, Weg-Remers S, Barnes B, Buttman-Schweiger N, Dahm S, Franke M, Schönfeld I, Kraywinkel K, Wienecke A (2023) Krebs in Deutschland für 2019/2020.
115. Rosell R, Moran T, Queralt C, Porta R, Cardenal F, Camps C, Majem M, Lopez-Vivanco G, Isla D, Provencio M, Insa A, Massuti B, Gonzalez-Larriba JL, Paz-Ares L, Bover I, Garcia-Campelo R, Moreno MA, Catot S, Rolfo C, Reguart N, Palmero R, Sánchez JM, Bastus R, Mayo C, Bertran-

- Alamillo J, Molina MA, Sanchez JJ, Taron M (2009) Screening for Epidermal Growth Factor Receptor Mutations in Lung Cancer. *N Engl J Med* 361:958–967
116. Rosell R, Codony-Servat J, González J, Santarpia M, Jain A, Shivamallu C, Wang Y, Giménez-Capitán A, Molina-Vila MA, Nilsson J, González-Cao M (2024) *KRAS* G12C-mutant driven non-small cell lung cancer (NSCLC). *Crit Rev Oncol Hematol* 195:104228
117. Rossi G, Manfrin A, Lutolf MP (2018) Progress and potential in organoid research. *Nat Rev Genet* 19:671–687
118. Rudin CM, Brambilla E, Faivre-Finn C, Sage J (2021) Small-cell lung cancer. *Nat Rev Dis Primer* 7:3
119. Sachs N, Papaspyropoulos A, Zomer-van Ommen DD, Heo I, Böttlinger L, Klay D, Weeber F, Huelsz-Prince G, Iakobachvili N, Amatngalim GD, de Ligt J, van Hoeck A, Proost N, Viveen MC, Lyubimova A, Teeven L, Derakhshan S, Korving J, Begthel H, Dekkers JF, Kumawat K, Ramos E, van Oosterhout MF, Offerhaus GJ, Wiener DJ, Olimpio EP, Dijkstra KK, Smit EF, van der Linden M, Jaksani S, van de Ven M, Jonkers J, Rios AC, Voest EE, van Moorsel CH, van der Ent CK, Cuppen E, van Oudenaarden A, Coenjaerts FE, Meyaard L, Bont LJ, Peters PJ, Tans SJ, van Zon JS, Boj SF, Vries RG, Beekman JM, Clevers H (2019) Long-term expanding human airway organoids for disease modeling. *EMBO J* 38:e100300
120. Sainz de Aja J, Dost AFM, Kim CF (2021) Alveolar progenitor cells and the origin of lung cancer. *J Intern Med* 289:629–635
121. Salahudeen AA, Choi SS, Rustagi A, Zhu J, van Unen V, de la O SM, Flynn RA, Margalef-Català M, Santos AJM, Ju J, Batish A, Usui T, Zheng GXY, Edwards CE, Wagar LE, Luca V, Anchang B, Nagendran M, Nguyen K, Hart DJ, Terry JM, Belgrader P, Ziraldo SB, Mikkelsen TS, Harbury PB, Glenn JS, Garcia KC, Davis MM, Baric RS, Sabatti C, Amieva MR, Blish CA, Desai TJ, Kuo CJ (2020) Progenitor identification and SARS-CoV-2 infection in human distal lung organoids. *Nature* 588:670–675
122. Santillan AA, Camargo CA, Colditz GA (2003) A meta-analysis of asthma and risk of lung cancer (United States). *Cancer Causes Control CCC* 14:327–334
123. Sato M, Shames DS, Gazdar AF, Minna JD (2007) A Translational View of the Molecular Pathogenesis of Lung Cancer. *J Thorac Oncol* 2:327–343
124. Sato T, Stange DE, Ferrante M, Vries RGJ, Es JH van, Brink S van den, Houdt WJ van, Pronk A, Gorp J van, Siersema PD, Clevers H (2011) Long-term Expansion of Epithelial Organoids From Human Colon, Adenoma, Adenocarcinoma, and Barrett’s Epithelium. *Gastroenterology* 141:1762–1772
125. Schabath MB, Cote ML (2019) Cancer Progress and Priorities: Lung Cancer. *Cancer Epidemiol Biomark Prev Publ Am Assoc Cancer Res Cosponsored Am Soc Prev Oncol* 28:1563–1579
126. Sekido Y, Fong KM, Minna JD (2003) Molecular Genetics of Lung Cancer. *Annu Rev Med* 54:73–87
127. Shi R, Radulovich N, Ng C, Liu N, Notsuda H, Cabanero M, Martins-Filho SN, Raghavan V, Li Q, Mer AS, Rosen JC, Li M, Wang Y-H, Tamblyn L, Pham N-A, Haibe-Kains B, Liu G, Moghal N, Tsao M-S (2020) Organoid Cultures as Preclinical Models of Non-Small Cell Lung Cancer. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res* 26:1162–1174
128. Shiraishi K, Shichino S, Ueha S, Nakajima T, Hashimoto S, Yamazaki S, Matsushima K (2019) Mesenchymal-Epithelial Interactome Analysis Reveals Essential Factors Required for Fibroblast-Free Alveolosphere Formation. *iScience* 11:318–333

129. Sholl LM, Aisner DL, Varella-Garcia M, Berry LD, Dias-Santagata D, Wistuba II, Chen H, Fujimoto J, Kugler K, Franklin WA, Iafrate AJ, Ladanyi M, Kris MG, Johnson BE, Bunn PA, Minna JD, Kwiatkowski DJ (2015) Multi-institutional oncogenic driver mutation analysis in lung adenocarcinoma: The Lung Cancer Mutation Consortium experience. *J Thorac Oncol Off Publ Int Assoc Study Lung Cancer* 10:768–777
130. Sica A, Allavena P, Mantovani A (2008) Cancer related inflammation: The macrophage connection. *Cancer Lett* 267:204–215
131. Song M-A, Benowitz NL, Berman M, Brasky TM, Cummings KM, Hatsukami DK, Marian C, O'Connor R, Rees VW, Woroszylo C, Shields PG (2017) Cigarette Filter Ventilation and its Relationship to Increasing Rates of Lung Adenocarcinoma. *JNCI J Natl Cancer Inst* 109:djx075
132. Soomro Z, Youssef M, Yust-Katz S, Jalali A, Patel AJ, Mandel J (2020) Paraneoplastic syndromes in small cell lung cancer. *J Thorac Dis* 12:6253–6263
133. Spella M, Lilis I, Pepe MA, Chen Y, Armaka M, Lamort A-S, Zazara DE, Roumelioti F, Vreka M, Kanellakis NI, Wagner DE, Giannou AD, Armenis V, Arendt KA, Klotz LV, Toumpanakis D, Karavana V, Zakynthinos SG, Giopanou I, Marazioti A, Aidinis V, Sotillo R, Stathopoulos GT (2019) Club cells form lung adenocarcinomas and maintain the alveoli of adult mice. *eLife* 8:e45571
134. Stayner L, Bena J, Sasco AJ, Smith R, Steenland K, Kreuzer M, Straif K (2007) Lung cancer risk and workplace exposure to environmental tobacco smoke. *Am J Public Health* 97:545–551
135. Strikoudis A, Cieślak A, Loffredo L, Chen Y-W, Patel N, Saqi A, Lederer DJ, Snoeck H-W (2019) Modeling of Fibrotic Lung Disease Using 3D Organoids Derived from Human Pluripotent Stem Cells. *Cell Rep* 27:3709-3723.e5
136. Takahashi H, Ogata H, Nishigaki R, Broide DH, Karin M (2010) Tobacco Smoke Promotes Lung Tumorigenesis by Triggering IKK β - and JNK1-Dependent Inflammation. *Cancer Cell* 17:89–97
137. Takebe T, Zhang B, Radisic M (2017) Synergistic Engineering: Organoids Meet Organs-on-a-Chip. *Cell Stem Cell* 21:297–300
138. Tan AC, Tan DSW (2022) Targeted Therapies for Lung Cancer Patients With Oncogenic Driver Molecular Alterations. *J Clin Oncol* 40:611–625
139. Tien JC-Y, Chugh S, Goodrum AE, Cheng Y, Mannan R, Zhang Y, Wang L, Dommeti VL, Wang X, Xu A, Hon J, Kenum C, Su F, Wang R, Cao X, Shankar S, Chinnaiyan AM (2021) AGO2 promotes tumor progression in KRAS-driven mouse models of non-small cell lung cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 118:e2026104118
140. Timar J, Kashofer K (2020) Molecular epidemiology and diagnostics of KRAS mutations in human cancer. *Cancer Metastasis Rev* 39:1029–1038
141. Travis WD, Brambilla E, Noguchi M, Nicholson AG, Geisinger KR, Yatabe Y, Beer DG, Powell CA, Riely GJ, Van Schil PE, Garg K, Austin JHM, Asamura H, Rusch VW, Hirsch FR, Scagliotti G, Mitsudomi T, Huber RM, Ishikawa Y, Jett J, Sanchez-Cespedes M, Sculier J-P, Takahashi T, Tsuboi M, Vansteenkiste J, Wistuba I, Yang P-C, Aberle D, Brambilla C, Flieder D, Franklin W, Gazdar A, Gould M, Hasleton P, Henderson D, Johnson B, Johnson D, Kerr K, Kuriyama K, Lee JS, Miller VA, Petersen I, Roggli V, Rosell R, Saijo N, Thunnissen E, Tsao M, Yankelwitz D (2011) International Association for the Study of Lung Cancer/American Thoracic Society/European Respiratory Society International Multidisciplinary Classification of Lung Adenocarcinoma. *J Thorac Oncol* 6:244–285
142. van der Vaart J, Lamers MM, Haagsmans BL, Clevers H (2021) Advancing lung organoids for COVID-19 research. *Dis Model Mech* 14:dmm049060

143. Wang H-M, Zhang C-Y, Peng K-C, Chen Z-X, Su J-W, Li Y-F, Li W-F, Gao Q-Y, Zhang S-L, Chen Y-Q, Zhou Q, Xu C, Xu C-R, Wang Z, Su J, Yan H-H, Zhang X-C, Chen H-J, Wu Y-L, Yang J-J (2023) Using patient-derived organoids to predict locally advanced or metastatic lung cancer tumor response: A real-world study. *Cell Rep Med* 4:100911
144. Wang J, Li X, Chen H (2020) Organoid models in lung regeneration and cancer. *Cancer Lett* 475:129–135
145. Westcott PMK, To MD (2013) The genetics and biology of KRAS in lung cancer. *Chin J Cancer* 32:63–70
146. Wu AH, Fontham ETH, Reynolds P, Greenberg RS, Buffler P, Liff J, Boyd P, Henderson BE, Correa P (1995) Previous Lung Disease and Risk of Lung Cancer among Lifetime Nonsmoking Women in the United States. *Am J Epidemiol* 141:1023–1032
147. Xu H, Lyu X, Yi M, Zhao W, Song Y, Wu K (2018) Organoid technology and applications in cancer research. *J Hematol Oncol* 11:116
148. Xu H, Jiao D, Liu A, Wu K (2022) Tumor organoids: applications in cancer modeling and potentials in precision medicine. *J Hematol Oncol* 15:58
149. Xu Y, Xin W, Yan C, Shi Y, Li Y, Hu Y, Ying K (2022) Organoids in lung cancer: A teenager with infinite growth potential. *Lung Cancer Amst Neth* 172:100–107
150. Yang W, Li Y, Shi F, Liu H (2023) Human lung organoid: Models for respiratory biology and diseases. *Dev Biol* 494:26–34
151. Yi SA, Zhang Y, Rathnam C, Pongkulapa T, Lee K-B (2021) Bioengineering Approaches for the Advanced Organoid Research. *Adv Mater* 33:2007949
152. Yin H, Jing B, Xu D, Guo W, Sun B, Zhang J, Liao Y, Song H, Wang T, Liu S, Kuang Y, Hu M, Li K, Zhang S, Zhang H, Xu J, Li X, Du J, Wu Y, Wang Q, Yao F, Chin YE, Zhou BP, Deng J (2022) Identification of Active Bronchioalveolar Stem Cells as the Cell of Origin in Lung Adenocarcinoma. *Cancer Res* 82:1025–1037
153. Youk J, Kim T, Evans KV, Jeong Y-I, Hur Y, Hong SP, Kim JH, Yi K, Kim SY, Na KJ, Bleazard T, Kim HM, Fellows M, Mahbubani KT, Saeb-Parsy K, Kim SY, Kim YT, Koh GY, Choi B-S, Ju YS, Lee J-H (2020) Three-Dimensional Human Alveolar Stem Cell Culture Models Reveal Infection Response to SARS-CoV-2. *Cell Stem Cell* 27:905–919.e10
154. Zhang Z, Wang H, Ding Q, Xing Y, Xu Z, Lu C, Luo D, Xu L, Xia W, Zhou C, Shi M (2018) Establishment of patient-derived tumor spheroids for non-small cell lung cancer. *PLOS ONE* 13:e0194016
155. Zhao Z, Chen X, Dowbaj AM, Sljukic A, Bratlie K, Lin L, Fong ELS, Balachander GM, Chen Z, Soragni A, Huch M, Zeng YA, Wang Q, Yu H (2022) Organoids. *Nat Rev Methods Primer* 2:1–21
156. Zheng F, Xiao Y, Liu H, Fan Y, Dao M (2021) Patient-Specific Organoid and Organ-on-a-Chip: 3D Cell-Culture Meets 3D Printing and Numerical Simulation. *Adv Biol* 5:2000024
157. Zhu Q-G, Zhang S-M, Ding X-X, He B, Zhang H-Q (2017) Driver genes in non-small cell lung cancer: Characteristics, detection methods, and targeted therapies. *Oncotarget* 8:57680–57692

7. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Die Signalwege von KRAS (nach [91,110,145]).....	12
Abbildung 2: Die fünf Hauptkomponenten der 3D-Zellkultur (nach Zhao et al [155]).....	17
Abbildung 3: Schematische Darstellung der Methodik zur 3D-Kultivierung von Lungentumororganoiden in Co-Kultur mit Alveolarmakrophagen	28
Abbildung 4: Durchmesser der Tumor- und Lungenorganoide 8 Tage nach dem Ausbringen.....	34
Abbildung 5: Durchmesser der Tumororganoide 6, 15 und 30 Tage nach dem Ausbringen	35
Abbildung 6: Darstellung der Organoidmorphologie mittels H&E-Färbung	36
Abbildung 7: STPC-, SCGB1A1- und KRT5- Expression der Tumor- und Lungenparenchymorganoide nach 8 Tagen Kultivierung	37
Abbildung 8: Proliferationsmarker Ki-67 der Tumor- und Lungenorganoide nach 8 Tagen Kultivierung	38
Abbildung 9: Durchmesser der Tumor- und Lungenorganoide der Passage 0 und Passage 1 nach 30 Tagen der Kultivierung	39
Abbildung 10: SFTPC-, SCGB1A1- und KRT5 Expression der passagierten Tumor- und Lungenorganoide nach 30 Tagen Kultivierung.....	41
Abbildung 11: Proliferationsmarker Ki-67 der Tumor- und Lungenorganoide der Passage 0 und Passage 1 nach 30 Tagen Kultivierung	42
Abbildung 12: Co-Kultur der Tumororganoide mit Alveolarmakrophagen nach 30 Tagen Kultivierung.....	44

8. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Auflistung der verwendeten Geräte mit Hersteller	23
Tabelle 2: Auflistung der verwendeten Lösungen und Chemikalien.....	24
Tabelle 3: Auflistung der verwendeten Primärantikörper im Rahmen der immunhistochemischen Färbungen.....	32

9. Publikationen

Teilergebnisse dieser Arbeit wurden in folgenden Publikationen und Kongressbeiträgen veröffentlicht:

Wissenschaftliche Publikationen:

Jannis Ludwig, Felix Ritzmann, Andreas Kamyschnikow, Christian Herr, Robert Bals, Christoph Beisswenger (2024) An easy-to-perform protocol for culturing primary murine lung tumor cells as organoids, Annals of Anatomy - Anatomischer Anzeiger, Volume 255

DOI: 10.1016/j.aanat.2024.152298

Kongressbeiträge:

Jannis Ludwig, Felix Ritzmann, Andreas Kamyschnikow, Robert Bals, Christoph Beisswenger (2022)
A simple protocol for culturing murine tumor cells as 3D organoids

DGP-Herbsttagung, Section Cell Biology, 07-08 Oktober 2022 in Marburg

10. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich die Gelegenheit nutzen, mich bei einigen Persönlichkeiten zu bedanken. Der vollständige Prozess einer Dissertation gestaltet sich nicht selten an mancher Stelle mühsam. Das Finden eines geeigneten Themas, die Produktion eigener Ergebnisse, das Ordnen dieser Ergebnisse oder das letztendliche Verfassen einer Dissertation sind allesamt Herausforderungen, die es auf persönlicher Ebene zu meistern gilt und an denen sich die Möglichkeit bietet daran zu wachsen. Umso prägender sind die Persönlichkeiten, die in dieser Zeit persönlich oder beruflich in diesen Prozess involviert sind.

Zunächst bedanke ich mich bei Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Robert Bals für die Bereitstellung des Themas dieser Arbeit und die Vermittlung an Herrn Beisswenger.

Meinem Doktorvater Prof. Dr. rer. physiol. Christoph Beißwenger gilt besonderen Dank für seine engagierte Betreuung und seine Geduld und Zuversicht mit einem manchmal ungeduldigen Doktoranden.

Bei meinem Betreuer Dr. rer. nat. Felix Ritzmann möchte ich mich herzlich bedanken. Seine sympathische Art, sein immer offenes Ohr und seine Expertise waren für mich wichtige Stützen, auf die ich mich immer verlassen konnte.

Den restlichen Mitarbeitern des Labors möchte ich ebenfalls meinen Dank aussprechen. Stellvertretend Michelle Brand, Andreas Kamyschnikow und Anja Honecker waren immer hilfsbereit und zuvorkommend bei wissenschaftlichen Fragen.

Ganz besonders danken möchte ich meiner Familie, meiner Mutter Doris Ludwig, meinem Vater Thomas Ludwig und meinem Bruder Maurice Ludwig, sowie meiner Freundin Anna Grünwald. Diese Menschen haben mich in jeglicher Situation aufgefangen und bestärkt, auf eine Weise wie man es sich nur wünschen kann. Ihre Unterstützung war die Grundlage dieser Arbeit und hat mir erst ermöglicht daran zu wachsen. Vielen Dank.

11. Lebenslauf

Aus datenschutzrechtlichen Gründen wird der Lebenslauf in der elektronischen Fassung der Dissertation nicht veröffentlicht.