

Projektbeschreibung Eisenberger Forschungsstipendium

Dr. med. Simon Engelmann

Klinik für Urologie, Lehrstuhl der Universität Regensburg, Caritas Krankenhaus St. Josef, Regensburg

Eisenberger-Stipendiat 2022, Fördernummer: EnS1/FE-22

Projekt: „Ein Konzept für individualisierte Tumortherapie beim Urothelkarzinom: Etablierung Patienten-akquirierter *in vitro* Modelle für die Testung von Chemo- und Immuntherapien.“

Betreuer und Gastlabor:

Dr. Bernhard Michael Polzer, Fraunhofer ITEM

Bereich personalisierte Tumortherapie, Arbeitsgruppe zelluläre und molekulare Diagnostik, Fraunhofer (ITEM) Institut für Toxikologie und experimentelle Medizin, Regensburg

Projektzusammenfassung

Es stellt für den Urologen eine große Herausforderung dar, den Krankheitsverlauf oder gar das Therapieansprechen beim Urothelkarzinom der Harnblase einzuordnen. Für die verschiedenen Tumorstadien existieren bereits zahlreiche etablierte Therapieverfahren, unter anderem BCG und Mitomycin als Instillationstherapien beim nicht muskelinvasiven Urothelkarzinom (NMIBC) und Gemcitabin/Cisplatin sowie die Immuntherapie beim muskelinvasiven (MIBC) und metastasierten Urothelkarzinom. Trotz jahrelanger Erfahrung und Forschung sind einige Wirkungsmechanismen noch ungeklärt. Auch die Ansprechraten und die Begründung dahinter sind oft rätselhaft. Die BCG-Induktionstherapie bewirkt ein Ansprechen von ca. 55-65% bei papillären high-risk Tumoren und 70-75% bei CIS-Tumoren. Allerdings kann bei 25-45% der Patienten kein Therapieerfolg verzeichnet werden. Im Falle der neoadjuvanten Therapie des MIBC mit Gemcitabin/Cisplatin ist mit einem Therapieansprechen von ca. 50% zu rechnen, sodass für die Hälfte der Patienten sowohl ein Zeitverlust als auch unnötige Nebenwirkungen in Kauf genommen werden müssen. Großer Vorteil der neoadjuvanten Chemotherapie ist, dass bei knapp 25% der Patienten eine Vollremission (ypT0) erwirkt werden kann.

Die Ansprechraten der Therapien für verschiedene Stadien des Urothelkarzinoms ist beschränkt und schwer abschätzbar. Es ist also wünschenswert anhand Patienten-abgeleiteter *in vitro* Modelle, welche parallel zum Krankheits- und Therapieverlauf eines Patienten erschaffen und analysiert werden, Vorhersagen über Therapieansprechen und Progressionsrisiko treffen zu können. In vorangegangenen Forschungsarbeiten mit diesem Ziel finden sich bereits diverse *in vitro*-Modelle wie 2D Zellkulturen, Spheroide oder Gerüst-basierte Modelle, meist mit der Limitation der Verwendung von Zelllinien. Wenigen Forschungsgruppen ist es bereits gelungen, Organoide aus Urothelkarzinom zu etablieren. Aussteht sind intensivierte Drug Screenings und die klinische Anwendung.

Ziel des Projektes ist die Etablierung von Organoiden aus Urothelkarzinom und die Etablierung von 3D in vitro Drug Screening anhand von Organoiden, um Kenntnisse hinsichtlich Therapieansprechen und Krankheitsverlauf zu erlangen.

In einem ersten Schritt wird gewonnenes Tumorgewebe aus TUR-Blase Präparaten von Patienten, welche in die Studie eingeschlossen werden, zu Zellsuspensionen verdaut. Die Zellsuspension wird auf das Vorhandensein von EpCAM+ (Epitheliale Tumorzellen) und CD45+ (Immunzellen) und Zellviabilität analysiert. In einem Teil des Tumorgewebes, welches im Rahmen der TUR-Blase gewonnen wurde, werden Tumor- und Immunzellen separiert. Die Tumorzellen werden in 3D Organoidkultur Konditionen eingepflegt, mit dem Ziel hieraus Organoide zu züchten und zu amplifizieren, sodass sie sich für Screening mit Medikamentendatenbanken eignen. Die Organoide werden sowohl auf histologischer Ebene, als auch auf Genom- und Transkriptom- Ebene analysiert, um sicherzustellen, dass Sie verlässlich dem paternalen Gewebe entsprechen. Ein anderer Teil des Gewebes wird für Zellsuspensionen verwendet, welche Tumor- und Immunzellen beinhalten. Nach der Charakterisierung mittels FACS wird die Zellsuspension in 2D Konditionen auf 384-well Platten verteilt. Diese Zellen können dann einem Drug-Screening mit einer selektionierten Medikamentendatenbank unterzogen werden und mittels High- content Imaging ausgewertet werden.

Der große Nachteil der ‘Organoid’- Herangehensweise ist der Zeitfaktor. Es werden einige Monate benötigt, um Organoide so zu reifen, dass sie für umfassendes Drug-Screening brauchbar sind. Zudem werden nicht von jeder Tumorprobe erfolgreich Organoide angezüchtet werden können. Der Vorteil ist, dass ein 3D Modell die Mikro Umgebung und Struktur des Tumors verlässlicher widerspiegelt. Aufgrund der Replizierbarkeit der Organoide kann ein ausgedehntes Drug-Screening durchgeführt werden. Zudem werden Patienten-Immунzellen präserviert. Im Falle erfolgreicher Organoidanzüchtungen, werden Organoid-Immунzell Ko-Kulturen gegründet. Diese wiederum können für Antikörper und Antikörper-Wirkstoff Konjugat Testungen verwendet werden. Der Vorteil von einem 2D Modell ist die schnelle Durchführbarkeit. Dadurch kann klinisch relevante Information innerhalb weniger Wochen generiert werden. Jedoch kann aufgrund des begrenzten und nicht-replizierbaren Materials nur ein begrenztes Drug-Screening durchgeführt werden.

Die erlernten Methoden werden in unserem urologischen Labor gefestigt und für zukünftige Forschungsprojekte verwendet werden. Nachdem die erlernten Methoden in unserem Labor etabliert sein werden, können sie perspektivisch auch benutzt werden, um urologische Tumorpatienten im Sinne von ‚Bedside to Bench‘ (u.a. Flüssigbiopsien aus Urin, CTCs, DTCs, Organoide) individuell zu therapieren und zu begleiten. Langfristig werden wir noch einen Schritt weiter gehen können und Therapieentscheidungen im Sinne ‚Bedside to Bench & Bench to Bedside‘ durch laboranalytische Verfahren an Patienten- individualisierten Modellen maßgeblich beeinflussen.