

3. Zusammenfassungen zum Stand wissenschaftlicher und medizinischer Entwicklungen

Tristan Frum und Jason R. Spence

3.1 Organoide auf Basis von humanen pluripotenten Stammzellen: Modelle für Embryonalentwicklung und Erkrankungen des Menschen¹

Zusammengefasst und aus dem Englischen übersetzt von Anja Pichl und Nina Frey

Während der Embryonalentwicklung wird aus einer kleinen Zahl pluripotenter Stammzellen durch eine zeitlich und räumlich genau abgestimmte Abfolge verschiedener Zellspezifizierungen die unglaubliche Vielfalt an Zelltypen hervorgebracht, die für das menschliche Leben erforderlich ist. Auf diese Weise werden komplexe, dreidimensionale Organe gebildet, die aus vielen spezialisierten Zelltypen bestehen und grundlegende physiologische Funktionen erfüllen, wie z. B. die Atmung durch die Lunge, die Nährstoffaufnahme durch den Darm und die Filterung des Blutes durch die Nieren. Seit Jahrhunderten arbeiten Wissenschaftlerinnen und Wissenschaftler daran, den Prozess der Embryonalentwicklung zu verstehen und die zellulären und molekularen Signale zu identifizieren, welche die Zellen zur Bildung eines bestimmten Organs anleiten. Mittlerweile setzen sie dieses Wissen dazu ein, die menschliche Entwicklung

1 Dieser Beitrag ist eine deutsche Zusammenfassung des Review-Artikels „hPSC-derived organoids: models of human development and disease“ von Tristan Frum und Jason R. Spence, der 2020 im *Journal of Molecular Medicine* erschienen ist und eine umfangreiche Darstellung des wissenschaftlichen Sachstands sowie der aktuellen Literatur zum Thema (Stand Frühjahr 2020) bietet.

und Organentstehung in der Zellkulturschale schrittweise nachzubilden, indem sie die darin kultivierten Zellen dazu bringen, sich zu dreidimensionalen Modellen zu organisieren. Diese Strukturen, die menschlichen Organen in Form und Funktion ähneln, sind unter dem Namen „Organoid“ bekannt. Im Gegensatz zu Organoiden, die aus gewebespezifischen (adulten) Stammzellen gewonnen wurden und stärker vollentwickeltem (adultem) Gewebe ähneln, weisen Zellen und Organoiden, welche aus humanen pluripotenten Stammzellen (hPS-Zellen) gezüchtet wurden, stärkere Ähnlichkeiten zu sich entwickelndem, unreifem (fetalem) Gewebe auf.

Diese Zusammenfassung bietet einen Überblick über die Herstellung hPS-Zell-basierter Organoiden und betont den Beitrag der Entwicklungsbiologie zum Verständnis der physikalischen und molekularen Mechanismen, welche die Entwicklung von Zellen *in vitro* steuern. Im Fokus steht dabei die gerichtete Differenzierung von hPS-Zellen zu Entoderm² und die darauf aufbauende Herstellung von Lungen- und Darmorganoiden. Diskutiert werden zudem Strategien, welche die Reife und Komplexität von hPS-Zell-basierten Organoiden erhöhen, sowie gegenwärtige und künftige Anwendungsmöglichkeiten derselben.

3.1.1 Von der Pluripotenz zur spezifischen Keimschicht

Zur Herstellung von Organoiden nutzen Forschende das Entwicklungspotenzial von hPS-Zellen: ihre Pluripotenz, d. h. ihre Fähigkeit, jeden Zelltyp des Körpers ausbilden zu können. Zellen durchlaufen einen schrittweisen Differenzierungsprozess, wobei die Zelle mit jedem Differenzierungsschritt mehr an einen Zelltyp gebunden wird und gleichzeitig ihr Potenzial zur Generierung anderer Zelltypen immer stärker eingeschränkt wird. Die Abfolge dieser Differenzierungsschritte führt in ihrer Gesamtheit zur Bildung einer vollständig differenzierten Zelle und wird als Zellabstammung oder insgesamt als Abstammungslinie bezeichnet. Durch den Vergleich der Genexpression einzelner Zellen (Einzelzell-RNA-Sequenzierung) aus humanem fetalem Gewebe und aus hPS-Zell-basierten Organoiden sowie ihrer Zwischenstadien konnte gezeigt werden, dass der Aufbau der Abstammungslinien während der Embryonalentwicklung *in vivo* und *in vitro* sehr ähnlich ist.³

² Während der Embryonalentwicklung entstehen im Embryo drei Keimblätter: Ektoderm (Außenschicht), Mesoderm (Mittelschicht) und Entoderm (Innenschicht). Jedes dieser Keimblätter bildet bestimmte Gewebe und Organe aus; das Entoderm u. a. die hier beispielhaft aufgeführten Organe Lunge und Darm.

³ Für wissenschaftsphilosophische Überlegungen zur Vergleichbarkeit von Organentwicklungsprozessen *in vivo* und *in vitro* siehe Fagan, Kap. 4.

Die ersten Differenzierungsprozesse, welche hPS-Zellen beim Verlassen des Pluripotenzstadiums durchlaufen, legen die Zellen auf eines der drei Keimblätter fest: Entoderm (Innenschicht), Mesoderm (Mittelschicht) und Ektoderm (Außenschicht) (siehe Abbildung 1a). In der Embryonalentwicklung wird dieser Prozess als Gastrulation bezeichnet. Mithilfe von Modellorganismen konnten verschiedene Studien zur Gastrulation wesentliche Signalwege und Bedingungen für die Bildung von Entoderm, Mesoderm und Ektoderm identifizieren. So ist die Aktivität des Wachstumsfaktors TGF-Beta in diesen drei Zellschichten unterschiedlich hoch, was sich auch in den entsprechenden Organoiden widerspiegelt. Durch Anwendung dieses Wissens *in vitro*, nämlich durch Zugabe bestimmter Wachstumsfaktoren wie ACTIVIN oder NOGGIN, die die Aktivität von TGF-Beta beeinflussen, ist die gezielte Differenzierung von hPS-Zellen in verschiedene Keimblätter steuerbar (siehe Abbildung 1b). Auch lassen sich so nahezu reine (einheitliche) Populationen von Entoderm, Mesoderm und Ektoderm züchten. Die Herstellung von Organoiden mit Zellen aus verschiedenen Keimblättern erfordert die Kodifferenzierung beider Abstammungslinien in einer Zellkultur.

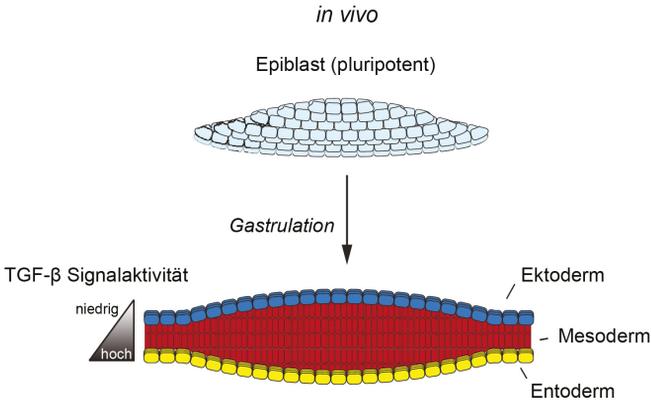
3.1.2 Etablierung regionaler Identität und organspezifischer Vorläuferzellen

Die Differenzierung von hPS-Zellen zur entodermalen Abstammungslinie ist der erste Schritt, um Organoiden herzustellen, die Organe repräsentieren, die aus dem Entoderm entstehen, wie z. B. Lunge, Leber, Speiseröhre, Magen und Darm. Der nächste Schritt der gerichteten Differenzierung zielt darauf ab, entwicklungsbiologische Signalwege nachzuahmen, die das Entoderm in spezifische, lokale Strukturen gliedern und im letzten Schritt die Organidentität festlegen. *In vivo* hängen die regionalen Identitäten von ihrer Lokalisierung im Embryo ab, zunächst entlang der Anterior-Posterior-Achse (Körperlängsachse). Dies führt zu einer Strukturbildung des Entoderms in einen vorderen Vorderdarmbereich, aus dem die Schilddrüse, Speiseröhre, Luftröhre und Lunge entstehen, einen hinteren Vorderdarmbereich, aus dem die Leber, Bauchspeicheldrüse und der Magen hervorgehen, in den Mitteldarmbereich, der den ersten Teil des Dünndarms entwickelt, sowie in den Hinterdarmbereich, der weitere Teile des Dünndarms sowie den Dickdarm bildet (siehe Abbildung 2a).

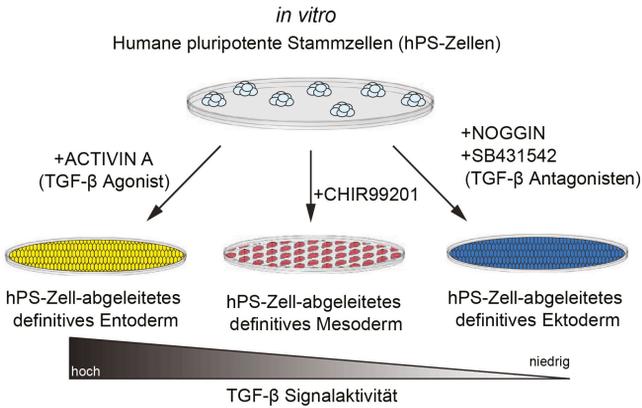
Die Reaktion hPS-Zell-basierten Entoderms auf bestimmte Signale *in vitro* ist mit derjenigen des sich entwickelnden Entoderms *in vivo* vergleichbar, beispielsweise in Hinblick auf die Ausbildung räumlich unterschiedlicher Zellidentitäten (vorne und hinten) und morphogenetischer Aspekte. Durch die Aktivierung bestimmter Signalwege *in vitro* können in hPS-Zell-basiertem Entoderm gezielt morphogenetische Prozesse in Gang gesetzt werden, welche der *In-vivo*-Entstehung des Urdarms entsprechen und

Abbildung 1: Bildung der drei Keimblätter

a



b



Ansammlungen aus epithelialen⁴ sowie mesenchymalen Vorläuferzellen bilden, die sich als sogenannte dreidimensionale „Sphäroide“ von der Zellkulturschale absetzen (siehe Abbildung 2b). Diese werden im Anschluss in eine extrazelluläre Matrix wie z. B. Matrigel gegeben, welche die weitere Vermehrung und gerichtete Differenzierung in 3-D ermöglicht. Methoden zur Herstellung und Erhaltung gewebespezifischer Vorläuferzellen basieren auf bekannten Transkriptionsfaktoren, die bestimmte Populationen von Vorläuferzellen spezifisch kennzeichnen. Derartige Marker werden genutzt, um nach Bedingungen zu suchen, welche die Markerexpression verstärken und somit die gezielte Differenzierung zu einem gewünschten Zelltyp effizienter machen. Mit diesem Ansatz konnten die Signalwege identifiziert werden, durch deren Stimulierung in der Kulturschale beispielsweise Vorderdarm-Entoderm zu Vorläuferzellen der Lunge differenzierbar ist (siehe Abbildung 2c).

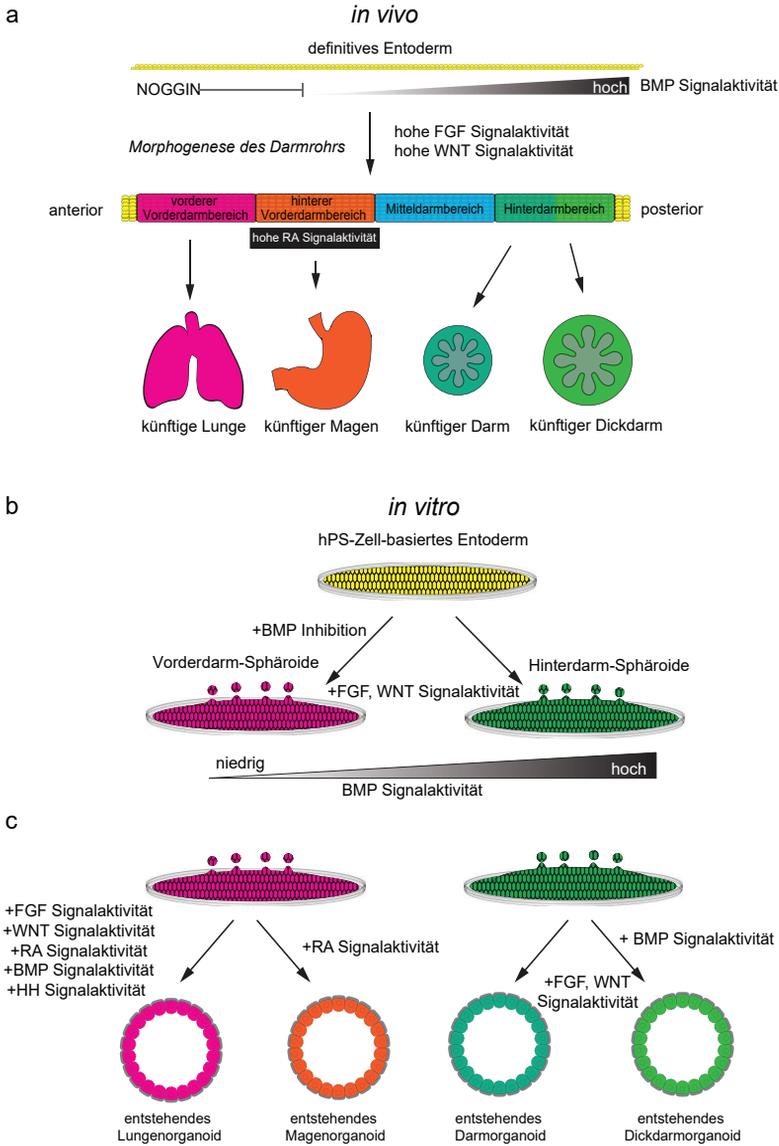
Im Anschluss an die Spezifizierung von Vorläuferzellen werden die entstehenden Organoiden aus dem Nährmedium, welches die Vorläuferzellen induziert hat, in ein anderes Nährmedium versetzt, das nun die Vermehrung und den Erhalt der Vorläuferzellen gewährleistet. Dadurch wird ein kontinuierliches Wachstum des Organoids ermöglicht, welches Teile der Organentstehung *in vivo* widerspiegelt. Darmorganoiden beispielsweise zeigen verschiedene Aspekte der fetalen Darmentstehung, einschließlich ihrer zelltypspezifischen Organisation und Morphogenese. Methoden zur Herstellung von Lungenorganoiden variieren untereinander stärker als die zur Herstellung von Darmorganoiden. Dies könnte auf grundlegende Unterschiede in der Spezifizierung von Vorläuferzellen der Lunge und des Darms hindeuten oder lediglich auf Unterschiede des Forschungsstandes bzw. der Präferenzen der Forschenden im jeweiligen Feld. Auch Lungenorganoiden ähneln in ihrem Wachstum in der Kulturschale in vielerlei Hinsicht der fetalen Lungenentwicklung, beispielsweise hinsichtlich der zeitlichen Reihenfolge der Zelldifferenzierung. Desweiteren zeigen Lungenorganoiden, wenn sie unter Bedingungen kultiviert werden, die eine Differenzierung ermöglichen, eine dem menschlichen Lungenepithel ähnliche Organisation.

3.1.3 Strategien zur Verbesserung der Reife von Organoiden

Es gibt eine Vielzahl von Ansätzen, um die Reifung von Organoiden zu fördern. Der Reifungsprozess umfasst zusätzliche Strukturbildung mit Bereichen von differenzier-

⁴ Epithelzellen bauen das Epithel auf, also die ein- oder mehrzellige Zellschicht, die bei Vielzellern alle inneren und äußeren Körperoberflächen auskleidet und die aus Deckgewebe und Drüsengewebe besteht.

Abbildung 2: Strukturbildung des Entoderms



2a zeigt die natürliche Differenzierung des Entoderms in verschiedene Organe in Abhängigkeit von der Signalaktivität verschiedener zellulärer Wachstumssignale (NOGGIN, BMP, FGF, WNT, RA).

2b und c zeigen, wie durch gezielte Blockierung oder Aktivierung der beteiligten Signalwege Organoiden *in vitro* hergestellt werden können, welche diese Organe nachbilden. Dies geschieht über den Zwischenschritt der Bildung von Vorderdarm- und Hinterdarm-Sphäroiden.

ten Zellen und Vorläuferzellen, einem erhöhten Anteil von differenzierten Zellen und einer höheren Funktionalität derselben. Der einfachste Ansatz besteht darin, den Organoiden Zeit für den Reifungsprozess zu lassen; Organoide besitzen eine inhärente Fähigkeit zur Reifung und zeigen, wenn sie ungestört in der Kulturschale gelassen werden, im Laufe der Zeit typischerweise eine höhere Komplexität und zunehmend Charakteristika früher fetaler Organentstehung. Dieses Entwicklungsvermögen ist jedoch begrenzt und Organoide weisen auch nach mehrmonatiger Kultivierung noch immer Transkriptions- und Proteomprofile auf, die eher fetalem als adultem Gewebe ähneln. Darüber hinaus entstehen mit zunehmendem Wachstum und höherer Komplexität Probleme der Verfügbarkeit von Nährstoffen und Sauerstoff, welche zum Absterben von Gewebe im Inneren des Organoids führen können.

Interessanterweise führt die ektopische⁵ Transplantation von Organoiden in Versuchstiere (zum Beispiel unter die Nierenkapsel) zu einem Reifegrad, der den unter Kulturbedingungen *in vitro* weit übersteigt. Der höhere Reifegrad von transplantierten menschlichen Darm- und Lungenorganoiden zeigt sich beispielsweise in erhöhter zellulärer Differenzierung und Strukturbildung. Zudem werden die transplantierten Organoide durch die umliegenden Zellen mit Gefäßen versorgt, werden größer als *in vitro* und weisen eine höhere mesenchymale Diversität und Organisation auf. Welche Eigenschaften der *In-vivo*-Umgebung genau die Reifung der transplantierten Organoide fördern, ist noch nicht gänzlich bekannt. Das gemeinsame Auftreten von Vaskularisation (Neubildung kleiner Blutgefäße) und erhöhter mesenchymaler Komplexität im Zusammenhang mit Organoidreifung hat jedoch das Interesse an der Entwicklung von Kokultursystemen von hPS-Zell-basierten Organoiden und mesenchymalen sowie endothelialen Zellen geweckt. Derartige Systeme konnten nachweislich den Reifegrad von Hirn-, Leber-, Nieren- und Lungenorganoiden erhöhen. In hPS-Zell-basierten Nierenorganoiden konnten endogene, also aus dem Gewebe selbst entstammende, Endothelzellen nachgewiesen werden, was auf ein Potenzial zur eigenständigen Blutgefäßbildung hindeutet (siehe Gupta/Dilmen/Morizane, Kap. 3.6), welches auch andere hPS-Zell-basierte Organoide haben könnten. Alternative Ansätze komplexer, biotechnologisch hergestellter Gefäßnetzwerke zur Unterstützung des Wachstums und der Reifung von Organoiden sind ebenfalls auf dem Vormarsch.

Großes Interesse besteht zudem an der Entwicklung von Ansätzen des Bioengineering, die versuchen, physikalische und andere Kräfte nachzubilden, welche den Reifungsprozess während der Embryonalentwicklung vorantreiben (siehe Teriyaprom/Batista-Rocha/Koo, Kap. 3.3). Es ist jedoch nicht einfach, diese in einer Kultur-

5 Vorkommen an einer für das Gewebe untypischen Stelle.

schale nachzuahmen. Mechanische Kräfte wie Spannungen und Starrheit der extrazellulären Matrix sind seit Langem als wesentliche Faktoren für die Differenzierung und das Verhalten von Zellen bekannt und lassen sich durch alternative Matrizes wie z. B. synthetische Hydrogelkompositionen beeinflussen, welche mehr Spielraum in Bezug auf die Zusammensetzung und Starrheit lassen. Zudem werden komplexe Wachstumsmatrizes entwickelt, welche eine räumliche und zeitliche Kontrolle über die Starrheit und Zusammensetzung des Substrats ermöglichen. Darüber hinaus wird an Mikrofluidikplattformen gearbeitet, die weitere physikalische Entwicklungssignale nachbilden und die Herstellung reproduzierbarer Organoidarchitekturen ermöglichen sollen.

Die beschriebenen Ansätze sind vielversprechend für die Reifung von hPS-Zell-basierten Organoiden *in vitro* und stark geprägt von unserem Verständnis der Faktoren, welche die Organreifung während der Embryonalentwicklung *in vivo* steuern. Die Nachahmung der Organreifung in der Kulturschale ist ein reduktiver Ansatz, der spannende Einsichten in die menschliche Entwicklung und Krankheitsmechanismen verspricht.

3.1.4 Gegenwärtige und künftige Anwendungsmöglichkeiten

Ogleich noch viel getan werden muss, um die Komplexität und Reproduzierbarkeit von hPS-Zell-basierten Organoidkulturen zu verbessern, liefern diese Modelle bereits jetzt Erkenntnisse für wichtige medizinische Forschungszweige, beispielsweise Wirt-Mikroben-Interaktionen, aufkommende virale Infektionen und die Versorgung Frühgeborener. So wurden beispielsweise Darmorganoide als Modell genutzt, um den Einfluss des Mikrobioms auf die fetale Entwicklung zu untersuchen. Die Ansiedlung mit Mikroben scheint die Reifung hPS-Zell-basierter Organoide zu fördern. Darmorganoide haben sich zudem als geeignetes Modell für die Untersuchung verbreiteter viraler und mikrobieller Infektionen erwiesen. Lungenorganoide werden als Modell für geläufige Atemwegsinfektionen genutzt. Anhand von Organoiden aus adulten Stammzellen lässt sich z. B. die Infektiosität neu auftretender Influenzastämme untersuchen. Dies legt nahe, dass auch hPS-Zell-basierte Lungenorganoide als erneuerbare Quelle von Atemwegsgewebe für die Modellierung von häufigen und neu auftretenden Atemwegsinfektionen von Nutzen sein könnten.

Aufgrund der Ähnlichkeit hPS-Zell-basierter Organoide mit fetalem Gewebe sind diese Organoide sehr gut zur Modellierung von Erkrankungen in Zusammenhang mit Frühgeburten geeignet. Besonders relevant sind hier Lungenorganoide, die dazu genutzt werden können, Moleküle und Wirkstoffe zu untersuchen, welche die Ent-

wicklung und Reifung des Lungengewebes beschleunigen. Auf diese Art könnten neue Therapieansätze für die Verbesserung der Lungenfunktion Frühgeborener entwickelt werden. Auch Darmorganoide bieten Anwendungsmöglichkeiten bei Krankheiten im Zusammenhang mit Frühgeburten und niedrigem Geburtsgewicht, insbesondere da ein Hauptproblem in diesen Fällen die Nährstoffversorgung ist. An primären Darmorganoiden von Mäusen konnte bereits die Nährstoffaufnahme nachgestellt werden; die Entwicklung analoger Methoden für menschliche Darmorganoide kann die Untersuchung der fetalen Nährstoffaufnahme ermöglichen sowie die Entwicklung von Therapieansätzen, welche die mit der Nährstoffaufnahme zusammenhängende Reifung beschleunigen.

3.1.5 Chancen und Herausforderungen

Organoide aus hPS-Zellen bieten ein großes Potenzial für die Untersuchung spezifischer Aspekte der humanen Embryonalentwicklung und menschlicher Erkrankungen. Gegenwärtig können hPS-Zell-basierte Organoide als hervorragende Modelle für die frühe fetale Entwicklung genutzt werden. Sie ermöglichen die Nachbildung angeborener Krankheiten und können zur Verbesserung der Frühgeborenenversorgung beitragen. Es wird hart daran gearbeitet, die Komplexität und den Reifegrad hPS-Zell-basierter Organoide zu erhöhen. Ziel dessen ist die Modellierung aller Stadien der Organentwicklung, vom fetalen Stadium über das erwachsene bis hin zu dem des Alters.

Eine bestehende Herausforderung für die Generierung von Organoiden ist der Zugang zu menschlichem (adultem sowie fetalem) Gewebe, welches der Maßstab für in vitro gezüchtete Organoide ist. Auch wenn die Erkenntnisse der Embryonalentwicklung in Modellorganismen zentral sind, werden in hPS-Zell-basierten Organoiden auch spezifisch menschliche Aspekte der Organentwicklung und -physiologie erkennbar. Daher müssen hPS-Zell-basierte Organoide sowohl mit fetalem als auch adultem Gewebe vom Menschen verglichen werden, um die Genauigkeit des Organoidsystems zu gewährleisten. Obgleich derartige Studien strengen regulatorischen und ethischen Richtlinien unterliegen und fetales Gewebe verwenden, das ansonsten verworfen werden würde, bleibt die Verwendung dieser Gewebe in den USA und in anderen Teilen der Welt ein polarisierendes Thema. Der Gebrauch fetalen Gewebes in der Forschung wird mit komplexen politischen und gesellschaftlichen Fragestellungen wie z. B. Abtreibung in Verbindung gebracht. Daher ist es von äußerster Wichtigkeit, dass Wissenschaftlerinnen und Wissenschaftler Falschinformationen widersprechen, den gesellschaftlichen Nutzen ihrer Forschung an hPS-Zell-basierten Organoiden und feta-

lem Gewebe hervorheben und sich an der Entwicklung ethischer und regulatorischer Rahmenbedingungen beteiligen, welche die Fortsetzung solcher Forschungsvorhaben ermöglicht.

Es ist bemerkenswert, wie weit hPS-Zell-basierte Organoiden in den ungefähr 20 Jahren seit der Gewinnung der ersten hPS-Zellen entwickelt werden konnten: von grundlegenden Entdeckungen, wie hPS-Zellen in spezifische Keimschichten differenziert werden können, über die Identifizierung bestimmter Signalwege, welche die Entstehung von Vorläuferzellen bestimmter Organe fördern, bis hin zur Schaffung von 3-D-Modellen der Organentwicklung und -funktion. Die zunehmende Komplexität und Wiedergabetreue von hPS-Zell-basierten Organoidmodellen lässt auf ein größeres Verständnis von Aspekten der menschlichen Embryonalentwicklung und menschlicher Erkrankungen hoffen, das zu einer besseren Gesundheit führen könnte.