

*Sina Bartfeld und Hans Clevers*

### 3.5 Aus Stammzellen abgeleitete Organoide und ihre Bedeutung für die biomedizinische Forschung und Therapie<sup>25</sup>

Zusammengefasst und aus dem Englischen übersetzt von Lilian Marx-Stölting und Sina Bartfeld

Anfang 2015 erhielt der erste Mukoviszidose-Patient eine individualisierte Therapie, die auf Medikamententests an seinen eigenen Zellen beruhte. Möglich wurde dies durch neue Methoden der dreidimensionalen Zellkultur, mit denen Stammzellen in der Kulturschale vermehrt werden können. Anders als bei der herkömmlichen zweidimensionalen Zellkultur wachsen diese neuen Stammzellkulturen als dreidimensionale Gebilde. Aufgrund ihrer frappierenden Ähnlichkeit mit Organen werden sie „Organoide“ genannt.

Organoide werden durch drei Charakteristika bestimmt: Selbstorganisation, Vielzelligkeit und Funktionsfähigkeit. „Selbstorganisation“ bedeutet dabei, dass die Zellen sich *in vitro* (außerhalb des Körpers, in der Kulturschale) selbstständig in derselben Weise dreidimensional anordnen, wie es für das entsprechende Organ *in vivo* (im Körper) typisch ist. Ähnlich wie ein Organ besteht ein Organoid außerdem aus unterschiedlichen Zelltypen (Vielzelligkeit) und diese weisen zumindest einige der Funktionen auf, die sie typischerweise auch in diesem Organ haben (Funktionsfähigkeit). Ein Beispiel: Adulte Stammzellen des Dünndarms wachsen zu kleinen Strukturen heran, die etwa die Größe von Senfkörnern haben. Jedes Organoid besteht dabei aus einer dreidimensional gefalteten Schicht aus verschiedenen Zellen des Darms (wie Paneth-Zelle, Becherzelle, Enterozyt)<sup>26</sup>, die einen Hohlraum umgeben. Die Zellen orientieren sich zu dem Hohlraum hin, wie zu der Innenseite des Darms. In Einfaltungen, die von dem Hohlraum weg zeigen, siedeln sich die adulten Stammzellen und die Paneth-Zellen an, ganz wie es im echten Darm in den sogenannten Krypten von Lieberkühn (kleine Einsenkungen in der Schleimhaut des Dünn- und Dickdarms) der Fall ist. In den Bereichen

<sup>25</sup> Dieser Beitrag ist eine deutsche Zusammenfassung des Artikels „Stem cell-derived organoids and their application for medical research and patient treatment“ von Sina Bartfeld und Hans Clevers, der im Juli 2017 im *Journal of Molecular Medicine* (95/7: 729–738) erschienen ist.

<sup>26</sup> Paneth-Zellen, Enterozyten und Becherzellen sind Bestandteile des Darmepithels, Paneth-Zellen sondern als Drüsenzellen Verdauungsenzyme ab, Enterozyten resorbieren Nährstoffe aus der Nahrung und Becherzellen produzieren Schleim.

eines Organoids, die nahe am Hohlraum sind, gruppieren sich die Enterozyten und die Becherzellen – im echten Darm entspricht dies den Bereichen der Darmzotten (Villi). So ist ein Dünndarm-Organoid eine sehr reduzierte Miniatur-Version eines echten Darms.

Organoide können inzwischen für viele Organe gezüchtet werden. Hierfür werden entweder pluripotente oder adulte Stammzellen verwendet. Pluripotente Stammzellen, wie z. B. aus Embryonen gewonnene embryonale Stammzellen (ES-Zellen) und aus Spendermaterial beispielsweise von Patienten generierte induzierte pluripotente Stammzellen (iPS-Zellen)<sup>27</sup>, besitzen dabei die Fähigkeit, alle der über 200 verschiedenen Zelltypen des menschlichen Organismus zu bilden. Um aus pluripotenten Stammzellen den gewünschten Gewebetyp zu generieren, benutzen Forscher die Erkenntnisse aus der Entwicklungsbiologie und imitieren im Labor die Entwicklungsschritte, die eine pluripotente Zelle im Körper durchläuft, um zu einer differenzierten Zelle in einem bestimmten Organ zu werden. Im Labor wird dies dadurch erreicht, dass der Nährlösung, in der die Zellen wachsen, verschiedene Faktoren beigemischt werden, die auch im Körper dafür sorgen, dass die Zelle eine bestimmte Entwicklungsrichtung einschlägt.

Etwas anders ist das bei adulten Stammzellen, die aus Spendermaterial gewonnen werden. Sie sind gewebsspezifisch, also multipotent, nicht pluripotent. Das bedeutet, dass sie darauf festgelegt sind, zu bestimmten Zelltypen zu werden (zu differenzieren). Eine adulte Stammzelle des Darms ist beispielsweise darauf festgelegt, die Zelltypen des Darms (wie Paneth-Zelle, Becherzelle, Enterozyt) zu bilden. Um adulte Stammzellen zu kultivieren, reicht es daher aus, nur die molekulare Umgebung des adulten Gewebes nachzuahmen.

Die Bandbreite der Organe, auf die dieses Prinzip angewendet wurde, wächst rapide an. Es umfasst Organe aus allen drei Keimblättern<sup>28</sup> (Meso-, Ekto- und Endoderm). Da diese Keimblätter das gesamte entwicklungsgeschichtliche Spektrum umfassen, lassen diese Erfolge hoffen, dass möglicherweise alle Organe *in vitro* nachgebildet werden könnten. Endodermale Organoiden aus adulten Stammzellen wurden aus so unterschiedlichen Organen wie Darm, Magen, Pankreas, Leber, Prostata, Speiseröhre, Gallenblase und Geschmacksknospen gewonnen. Mit pluripotenten Stammzellen konnten bislang Darm, Magen, Pankreas, Lunge, Leber, Schilddrüse und Gallengang nachgezüchtet wer-

<sup>27</sup> Induzierte pluripotente Stammzellen werden aus somatischen Zellen (Körperzellen) gewonnen, die durch Zugabe bestimmter Faktoren in einen pluripotenten Zustand reprogrammiert werden.

<sup>28</sup> Keimblätter sind verschiedene Zellschichten, die sich während der Embryonalentwicklung ausdifferenzieren und die im Verlauf der weiteren Entwicklung unterschiedliche Gewebe und Organe hervorbringen. Die drei Keimblätter nennt man Endoderm (Innenschicht), Ektoderm (Außenschicht) und Mesoderm (Mittelschicht).

den. Als mesodermale Organoide konnten bisher aus pluripotenten Stammzellen sehr komplexe Nieren-Organoide herangezogen werden und aus adulten Stammzellen Organoide der Eileiter. Ektodermale Organoide konnten bisher aus pluripotenten Stammzellen für verschiedene Hirnareale gezüchtet werden, dabei auch spektakuläre, einige Millimeter große „mini brains“ und Augenbecher. Adulte Stammzellen von Milchdrüsen und Speicheldrüsen konnten ebenfalls zu Organoiden herangezogen werden (Stand Januar 2017).

Organoide sind für verschiedene Bereiche der Biomedizin sehr vielversprechend. Innerhalb der Grundlagenforschung ermöglichen sie beispielsweise die In-vitro-Untersuchung der Schlüsselreize, die die Organogenese (die Entstehung der Organe im Körper), die Homöostase (Aufrechterhaltung) von Geweben und die Zelldifferenzierung steuern. Dadurch werden auch Gewebe, die in vivo bislang nicht zugänglich waren, erforschbar.

Darüber hinaus können Organoide als Krankheitsmodelle sowohl für Infektionskrankheiten als auch für genetische Krankheiten dienen. Der große Vorteil von Organoiden gegenüber Zelllinien liegt dabei darin, dass sie viele (idealerweise alle) der Zelltypen enthalten, aus denen das Organ in vivo besteht. So können komplexe Vorgänge besser erforscht werden.

Bei der Erforschung von Infektionskrankheiten sind Organoide besonders da interessant, wo bislang gute Modellsysteme fehlen. Dies ist etwa bei denjenigen Krankheiten der Fall, die für Menschen spezifisch sind oder bei denen sich die Pathologie der bisherigen Tiermodelle von der menschlichen Pathologie unterscheidet, wie z. B. bei der Infektion mit dem Magenkeim *Helicobacter pylori* oder dem Durchfallvirus Norovirus. Aber auch für genetische Erkrankungen sind organoidbasierte Krankheitsmodelle vielversprechend. Ein herausragendes Beispiel ist die Mukoviszidose (Zystische Fibrose), die mittels iPS-abgeleiteten Lungenorganoiden oder auch anhand von intestinalen Organoiden aus adulten Stammzellen genauer erforscht wird. Da Organoide nicht nur von gesundem Gewebe, sondern auch aus Tumorgewebe hergestellt werden können, gewinnen Organoide auch in der Krebsforschung an Bedeutung.

Im Rahmen der regenerativen Medizin eignen sich Organoide außerdem als alternative Quelle von transplantierbarem Gewebe, das vor dem Hintergrund geringer Organpenden dringend gebraucht wird. Da Organoide aus kleinsten Mengen von Spenderzellen gezüchtet und danach in vitro vermehrt und differenziert werden können, könnten sie autologe (vom Patienten selbst stammende) Zellen oder in Zukunft möglicherweise auch autologes Gewebe für Transplantationen liefern. Solche autologen Organoidtransplantationen würden es ermöglichen, krankheitsauslösende Mutationen mithilfe verschiedener gentechnischer Methoden in vitro zu korrigieren, bevor die Organoide

transplantiert werden. Erste Experimente im Tiermodell lieferten bereits positive Ergebnisse, weitere Studien zur Funktionalität von Organoiden in vivo sind jedoch nötig.

Ein weiteres Anwendungsgebiet von Organoiden liegt im Bereich toxikologischer Screenings zur Bewertung der Toxizität von Stoffen für die Medikamentenentwicklung. Hierzu gibt es bereits mehrere Organoidbiobanken und weitere werden derzeit etabliert. Dafür werden definierten Patientengruppen Gewebeproben entnommen und im Labor in Kultur genommen. Als Organoiden können die Zellen des Patienten anscheinend unendlich vermehrt, sogar eingefroren und wieder aufgetaut und damit über Jahre im Labor gehalten werden. So stehen Organoiden als kleine Patienten-Avatare für Medikamententests zur Verfügung. Bei Screenings werden zu testende Substanzen zu Organoiden hinzugegeben und ihre Wirkung auf die Organoiden mit einer daran anschließenden Analyse getestet. Mit derselben Methodik lässt sich auch feststellen, welche Gruppe von Patienten von einer Behandlung mit einem bereits bestehenden Medikament profitieren würde. Auch Studien zur Dosierung und zur Toxizität von Substanzen können so erfolgen. Solche Toxizitätsstudien an Organoiden könnten in Zukunft auch Tierversuche ergänzen oder gar ersetzen.

Mittels patientenspezifischer Organoiden kann im Rahmen der sogenannten personalisierten Medizin auch die ideale Behandlung für einen bestimmten Patienten identifiziert werden. Ein gutes Beispiel hierfür ist die eingangs erwähnte Mukoviszidose. Obwohl die Krankheit häufig vorkommt (ca. 1 von 3000 Neugeborenen ist davon betroffen), sind einige Mutationen sehr selten. Da Medikamententests bisher aufwendig und teuer sind, ist es nicht praktikabel, das gesamte Mutationsspektrum abzudecken. Genau dies war das Problem des ersten Patienten, der eine personalisierte Therapie mit Hilfe von Organoiden erhielt: Es gab ein vielversprechendes neues Medikament, aber da dieser Patient eine sehr seltene Mutation im verantwortlichen Gen trug, war dieses neue Medikament nicht für ihn zugelassen, einfach weil seine Mutation zu selten war, um in einer klinischen Studie getestet worden zu sein. Das Forscherteam in den Niederlanden entnahm daraufhin eine Darmprobe und zog aus den adulten Stammzellen im Gewebe Organoiden heran. In Vorarbeiten hatte die Gruppe einen Test entwickelt, mit dem sie die Funktion des defekten Proteins evaluieren konnten. Dieser Test basiert darauf, dass eine bestimmte Substanz (Forskolin) zu den Organoiden gegeben wird. Dies bewirkt, dass Flüssigkeit in das Innere der Organoiden einströmt, wodurch die Organoiden anschwellen. Dieses Anschwellen kann man im Mikroskop sehen und messen. Bei Mukoviszidose-Patienten ist der Einstrom eingeschränkt und die Organoiden schwellen gar nicht oder nur wenig an. Wenn nun ein Medikament hinzugegeben wird, können die Forscher ermitteln, ob dadurch der Einstrom und damit das Anschwellen der Organoiden normalisiert werden kann. Bei dem Patienten mit der sehr seltenen Mutation

zeigte sich, dass die Zugabe des neuen Medikaments das Anschwellen der Organoide normalisierte. Der Patient bekam daraufhin das Medikament und seine Symptome verbesserten sich deutlich. Nach diesem ersten translationalen Erfolg wurden größere Studien initiiert. Bis jetzt wurden sieben Patienten aufgrund der Ergebnisse in ihren Organoiden therapiert. Die Krankenkassen in den Niederlanden unterstützen jetzt den Aufbau einer großen Biobank, deren Ziel es ist, jedem Mukoviszidose-Patienten in den Niederlanden zu ermöglichen, für sich Organoide anlegen zu lassen. Derzeit (Januar 2017) umfasst die Biobank mehr als 300 Patienten.

Andere laufende Studien untersuchen derzeit die Möglichkeiten von Organoiden in der Krebsbehandlung. Wenn Tumororganoiden von einem Patienten erstellt werden, bleibt die ursprüngliche Heterogenität des primären Tumors in den Organoiden erhalten. Es ist denkbar, dass bei der Anwendung von Krebsmedikamenten in den Organoiden die gleiche Resistenz entstehen könnte, wie beim Patienten. Wenn dies der Fall wäre, könnten die Organoide eine gewisse Vorhersage für Resistenzbildung liefern. Ob sich diese Hoffnung bewahrheitet, wird sich in den laufenden Studien noch zeigen.

Trotz aller Ähnlichkeit mit Organen, sind die derzeitigen Organoide stark reduktionistische Modelle. Ein echter Darm besteht nicht nur aus der inneren Schicht der Schleimhaut (Epithel), sondern ist von Bindegewebe (Mesenchym) und Muskelschichten umgeben, weist ein Nervensystem sowie Blutgefäße auf und ist von Mikroorganismen besiedelt. Während das Mesenchym auch in den aus pluripotenten Zellen abgeleiteten Organoiden vorhanden ist, fehlen die anderen Komponenten oft. Natürlich liegt hierin auch ein Vorteil, da ein spezifischer Effekt auf bestimmte Zellen untersucht werden kann. Es wird aber auch bereits die nächste Generation von noch komplexeren Organoiden entwickelt. Ein spannender Fortschritt ist beispielsweise der Aufbau von aus pluripotenten Zellen abgeleiteten Darm-Organoiden mit einem funktionierenden Darm-Nervensystem. Diese Organoide enthalten erstmals Zellen aus allen drei Keimblättern in einem Organoid, mit endodermalen Epithelzellen aus Endoderm, mesodermalem Mesenchym und Nervenzellen, die aus der ektodermalen Neuralleiste abgeleitet wurden. Zukünftige Entwicklungen werden voraussichtlich immer komplexere Organoide hervorbringen.

Aber auch schon die derzeitigen Organoide sind ein immenser Fortschritt für die Biomedizin. Vor der Entwicklung von Organoiden wurde in der Forschung meist auf Tumorzelllinien oder Tiermodelle zurückgegriffen und obwohl diese Modelle vielfältige wertvolle Ergebnisse hervorgebracht haben, fehlte ein Modellsystem, das echtem menschlichen Gewebe näher ist. Organoide sind normale, nicht transformierte Zellen, die in natürlichen Zellverbänden wachsen. Sie sind aber auf der anderen Seite im Labor ähnlich praktisch handhabbar wie Zelllinien. So können Organoide auch mittels ver-

schiedener Technologien, wie etwa der neuen Genomchirurgie (CRISPR/Cas), gentechnisch modifiziert werden. Dabei können aus einzelnen gentechnisch veränderten Zellen klonale Organoide mit den gewünschten genetischen Änderungen erzeugt werden, um etwa den Effekt einer spezifischen Mutation zu untersuchen oder eine Mutation eines bestimmten Patienten zu reparieren. Organoide können im Labor bisher ohne ersichtliches Limit expandiert werden, sodass ausreichend Material für große Experimente zur Verfügung gestellt werden kann. Für die medizinische Forschung und die Entwicklung neuer Behandlungsmethoden ist es von größter Bedeutung, dass grundsätzlich für fast jeden Patienten Organoide generiert werden können, sodass die genetische Bandbreite der Patienten im Labor untersucht werden kann. Dadurch gewinnen Organoide rapide an Bedeutung in der Grundlagenforschung, der Medikamentenentwicklung und der individualisierten Therapie.

