

Aus der Klinik und Poliklinik für Frauenheilkunde
und Geburtshilfe der Ludwig-Maximilians-Universität (LMU)

München

Direktor: Prof. Dr. med. Sven Mahner

Etablierung von Organoidmodellen und deren Einführung in die gynäkologische Grundlagenforschung



Habilitationsschrift

Zur Erlangung der Venia Legendi

für das Fach

Experimentelle Frauenheilkunde und Geburtshilfe

Vorgelegt dem Fakultätsrat der Medizinischen Fakultät

Ludwig-Maximilians-Universität (LMU) München

von

Dr.rer.nat. Mirjana Kessler

2024

Mome ocu / Meinem Vater

Inhalt

1.Vorwort	2
2.Einleitung	3
2.1 Einschränkungen herkömmlicher in-vitro Modelle die in der gynäkologischen Grundlagenforschung Verwendung finden.....	3
2.2 Reprogrammierung somatischer Zellen zur Erzeugung von Organoiden aus induzierten pluripotenten Zellen.....	5
2.3 Entdeckung der adulten Stammzellen – die Quelle für aus Patientengewebe direkt abgeleitete Organoidmodelle.....	6
2.4 Embryonale Entwicklungsmechanismen und ihre Verbindung zur Erneuerung der Mukosa des adulten Genitaltrakts.....	9
2.5 Experimentelle Anforderungen zur Beantwortung offener Fragen in der gynäkologischen Forschung.....	10
3. Zielsetzung	12
4. Eigene Arbeiten	13
4.1 Entwicklung von Organoiden aus humanem Gewebe des Eileiters und Untersuchungen zur natürlichen Homöostase und pathogenen Prozessen im Epithel	13
4.1.1 <i>Erste Langzeitorganoidkultur aus humanem Eileiterepithel</i>	13
4.1.2 <i>Infektionsmodell mit Chlamydia trachomatis identifiziert epigenetische Veränderungen in Eileiterorganoiden in Folge chronischer Infektion</i>	14
4.2. Veränderungen der Stammzellregulation und Alleinstellungsmerkmale der Ovarialkarzinomorganoide als Modellsystem.....	16
4.3 Experimentelle Strategie zum umfassenden Biobanking von Organoiden des Ovarialkarzinoms.....	17
4.4. Interdisziplinäre Anwendung der Organoid Technologie- Etablierung alveolarer Langzeitkulturen als Lungeninfektionsmodell	20
5. Zusammenfassung und Ausblick	22
6.Abkürzungsverzeichnis	25
7. Literaturverzeichnis	27
7.1 Eigene Publikationen	33
8. Danksagung	34

1.Vorwort

Diese Habilitationsschrift stellt als Zusammenfassung für die kumulative Habilitation die wichtigsten Erkenntnisse aus langjährigen Arbeiten vor, welche zur Entdeckung und weiteren Entwicklung der Organoid-Technologie in der gynäkologischen Grundlagenforschung tiefgreifende und substantielle Beiträge erbracht haben.

Das einführende Kapitel beschreibt die zu Grunde liegenden theoretischen Aspekte des Regenerationspotentials im adulten Gewebe, sowie die Schlüsselstudien, die die Konzeptentwicklung von direkt aus Patientengewebe abgeleiteten Organoidmodellkulturen ermöglicht haben. Dazu werden offene Fragen der gynäkologischen Onkologie und Reproduktionsmedizin beschrieben, für deren wissenschaftliche Adressierung die Entwicklung der Organoidmodelle von großer Bedeutung sind. Die wichtigsten Ergebnisse, Charakteristika der Modelle und ihre Hauptanwendungen bei der Erforschung der Pathologieentstehung im weiblichen Genitaltrakt, die im Rahmen dieser Habilitation erfolgt sind, werden im Anschluss präsentiert und diskutiert.

Auf die Details der vorgestellten experimentellen Techniken und eine vertiefte Analyse wird auf die Originalstudien verwiesen, die im Publikationsverzeichnis dieser Habilitationsschrift aufgeführt sind.

2. Einleitung

2.1 Einschränkungen herkömmlicher in-vitro Modelle die in der gynäkologischen Grundlagenforschung Verwendung finden

Ein lang erhoffter Durchbruch bei der Entwicklung neuer Therapien für gynäkologische Malignitäten sowie eine Verbesserung der Behandlungsoptionen für andere Erkrankungen des weiblichen Genitaltraktes konnte trotz hoher Erwartungen in den letzten Jahren bisher nicht erzielt werden. Und dies, obwohl ein enormer technologischer Fortschritt bei Hochdurchsatz-Sequenzierung, OMIK-Technologien und nicht zuletzt Ansätze der künstlichen Intelligenz in die Wissenschaft eingebracht worden sind. Die Gründe dafür sind vielfältig, jedoch ist einer der wichtigsten limitierenden Faktoren ein Defizit an adäquaten Labormodellen, die für analytischen Methoden der molekularen Biologie und Zellbiologie zugänglich sind. Solche experimentellen Modelle wiederum sind erforderlich, um neue Kausalitäten zu identifizieren und funktionelle Zusammenhänge, die sich z.B. aus OMIK-Untersuchungen von Patientenmaterial ergeben, im Detail zu analysieren. Interpretation von „Big Data“ Ergebnissen basiert größtenteils auf bereits bestehendem Wissen, weshalb qualitativ neue Erkenntnisse meistens nur als Hypothese formuliert, werden können, die abschließend eine experimentelle Validierung benötigen. Aus diesem Grund bleibt der Aufbau adäquater Modellsysteme, die die wichtigsten biologischen Eigenschaften eines zu untersuchenden erkrankten humanen Gewebes abbilden, eine der größten Herausforderungen in der biomedizinischen Grundlagenforschung. Häufig verursachen stark reduktionistische experimentelle Modelle, die die Komplexität humaner Krankheiten nicht ausreichend erfassen, Probleme bei der Extrapolation der damit erhobenen Daten auf die klinische Situation von Patienten. Als Konsequenz lässt sich hier die oft niedrige Erfolgsrate neuer therapeutischer Ansätze nach dem Übergang von der präklinischen zur klinischen Testphase anführen (Sun et al., 2022; Takebe et al., 2018; Wong et al., 2019).

Über die vergangenen Jahrzehnte basierte die onkologische Grundlagenforschung auf Studien mit Zelllinien, die ursprünglich aus primären Tumoren durch *in vitro* Immortalisierung etabliert worden sind. Diese Zellen wachsen häufig als einschichtiger, nicht polarisierter Zellrasen in 2D Zellkultur und haben phänotypisch wenige Gemeinsamkeiten mit dem hochkomplexen Zellverbund des Krebsgewebes den man *in vivo* in Patienten vorfindet. Diese auch heute noch regelmäßig verwendeten Zellkulturlinien sind häufig nach dem Zufallsprinzip in einem wenig

effizienten Verfahren entstanden, welches Zellen aus chirurgisch gewonnenem Gewebematerial isoliert und auf das Wachstum in 2D Kulturbedingungen selektiert hat. So weisen Krebszellen, ähnlich wie alle anderen Primärzellen auch, ein geringes inhärentes Wachstumspotential auf und haben die Tendenz, in der Regel nach wenigen Passagen in einen Zustand der Seneszenz überzugehen (Sherr & DePinho, 2000). Immortalisierte Zellklone sind daher das Ergebnis einer *in vitro* Selektion sowie der Anhäufung weiterer Mutationen und/oder genomischer Veränderungen *in vitro*, welche das uneingeschränkte Wachstum dieser Zellen ermöglichen. Eine große Studie des Cancer Genome Atlas Research Networks (TCGA) zeigte mittels moderner Hochdurchsatzsequenzierung an 178 Fällen Tumorgewebe von Patientinnen mit Zervixkarzinom geringgradige genomische Aberrationen wie Deletionen/Amplifikationen, Punktmutationen sowie eine Umverteilung kleinerer Abschnitte einzelner Chromosomenarme (Cancer Genome Atlas Research et al., 2017). Im Gegensatz dazu hat eines der heute weltweit meistgenutzten Zellkulturmodelle, die sogenannten Hela-Zellen, die vor ca. 70 Jahren aus dem fortgeschrittenen Zervixkarzinom von Frau Henrietta Lachs (1951 verstorben) abgeleitet wurden, einen hypertriploiden (3N) Chromosomensatz mit 76-80 Chromosomen (Macville et al., 1999; Masters, 2002). Weiterhin hat eine detaillierte molekulargenetische Analyse der 47 häufigst verwendeten Zelllinien in der Erforschung des high-grade Serösen Ovarialkarzinoms (HGSOC), dem tödlichsten gynäkologischen Tumor, belegt, dass sehr viele der Linien erhebliche Unterschiede im genomischen Profil im Vergleich zum HGSOC-Gewebe aufweisen (Domcke et al., 2013). So stellen Mutationen im Tumorsuppressorgen *TP53* mit fast universeller Prävalenz von ~96 % eine der häufigsten molekularen Eigenschaften mit maßgeblichen Auswirkungen auf die Tumorbilogie der HGSOC Entität dar (Cancer Genome Atlas Research, 2011), allerdings weisen nur ca. 62% der verwendeten Zelllinien ebenfalls ein mutiertes *TP53* auf. Im Weiteren hat die oben genannte Studie belegt, dass eine *PIK3CA* Mutation in ~20 % der Zelllinien vorkommt, obwohl die Mutation in der entsprechenden Patientenkohorte lediglich eine Prävalenz von <1% aufweist. Allgemein weisen die Krebszelllinien eine ausgeprägte klonale Evolution *in vitro* auf was ebenfalls in Hinsicht auf die Verwendung dieser Zellen für Forschungsexperimente berücksichtigt werden sollte (Ben-David et al., 2018). Neben diesen erheblichen Unterschieden im molekulargenetischen Profil zeigen die verbreiteten 2D Zelllinien erhebliche Limitationen bezüglich der Abbildung relevanter Signalfaktoren der Zell-Zell-Kommunikation

sowie der Interaktion von Tumorzellen mit anderen Zelltypen wie sie im Tumor Microenvironment häufig vorzufinden sind.

2.2 Reprogrammierung somatischer Zellen zur Erzeugung von Organoiden aus induzierten pluripotenten Zellen

Lange Zeit wurde angenommen, dass Pluripotenz ausschließlich einer Eigenschaft embryonaler Stammzellen ist und somatische, differenzierte Zellen ein irreversibel festgelegtes Zellschicksal mit begrenztem Wachstumspotenzial haben. Diese Annahme wurde durch die tägliche Laborerfahrung bei Arbeiten mit primärem Material gestützt, welche nahelegte, dass Zellen, die aus adultem Gewebe isoliert werden, in Zellkultur lediglich kurze Zeit wachsen können und schnell in eine Phase der Seneszenz eintreten. Erst im Jahr 2006 konnten Shinya Yamanaka und Kazutoshi Takahashi in einer bahnbrechenden Studie zeigen, dass adulte Fibroblasten aus der Maus mittels der Expression von nur vier Faktoren OCT3/4, SOX2, c-MYC und KLF4 vollständig phänotypisch revertieren und die Eigenschaften von embryonalen Stammzellen annehmen. Diese umprogrammierten Zellen wurden induzierte pluripotente Stammzellen, iPS-Zellen genannt (Takahashi & Yamanaka, 2006). iPS-Zellen wurden im Weiteren dazu benutzt, in Kultur unter schrittweiser Zugabe bestimmter Faktoren, eine kontrollierte Differenzierung in verschiedene Zelltypen der drei Keimblätter Endoderm, Mesoderm und Ektoderm auszulösen, und somit die Aktivierung organspezifischer Differenzierungsprogramme durchzuführen (Lewis-Israeli et al., 2021; McCauley et al., 2017; Yucer et al., 2021; Yucer et al., 2017). Die resultierenden 3D Zellkulturen, iPS-abgeleitete Organoide, haben die Ära der Organoidforschung eröffnet und die Etablierung diverser in vitro Krankheitsmodelle ermöglicht, die bis zum heutigen Tag kontinuierlich verbessert und weiterentwickelt werden (Abbildung 1A). Dennoch ist der Hauptvorteil der iPS-abgeleiteten Modelle, ihre absolute Plastizität und die Möglichkeit, mehrere Zelltypen gleichzeitig/parallel zu generieren, gleichzeitig auch die hauptsächliche Hürde im Sinne einer translationalen Anwendungen dieser Technologie. Die Einhaltung der genauen Reihenfolge einzelner Differenzierungsschritte im Labor benötigt detailliertes theoretisches und praktisches Wissen, und entsprechende manuelle Fertigkeiten, um aus iPS-Zellen verwendbare Organoide erzeugen zu können.

2.3 Entdeckung der adulten Stammzellen – die Quelle für aus Patientengewebe direkt abgeleitete Organoidmodelle

Parallel zu dem Fortschritt in der iPS Forschung gab es intensive Bemühungen, die Beteiligung entwicklungsbiologisch relevanter Gene als Regulatoren der funktionellen Homöostase im adulten Gewebe besser zu verstehen. Obwohl ein uneingeschränktes Differenzierungspotential von embryonalen Stammzellen seit längerem bekannt war (Odorico et al., 2001; Schuldiner et al., 2000), waren die Faktoren und Mechanismen, die zur Kontrolle der Homöostase und Regeneration des Epithels im adulten Gewebe beitragen, nur wenig erforscht. Insbesondere wurde die Rolle von Genmutationen in entwicklungsbiologisch relevanten Signalwegen untersucht, da diese oft als sogenannte Treibermutationen zur Karzinomentstehung beitragen, wie z.B. APC-Mutationen im Kolonkarzinom, die eine Aktivierung WNT-Signalwegs verursachen (Kinzler & Vogelstein, 1996; Sansom et al., 2004).

Die apiko-basale Polarität der Epithelzellen, Zell-Zell Kommunikation zwischen Gewebezellen, sowie die Wachstumskontrolle sind Kernkomponenten einer gesunden Mukosa. Dazu gehört auch ein intrinsisches Regenerations- bzw. Erneuerungspotential, welches erlaubt, diejenigen Zellen, die z.B. durch Umwelteinwirkungen geschädigt wurden, zu ersetzen, um die Auswirkungen der Schädigung auf das umliegende Gewebe zu limitieren. Durch die Arbeiten unter anderem der Arbeitsgruppe um Hans Clevers wurde im Laufe der Zeit klar, dass der WNT-Signalweg, ein bekannter Regulator aus der frühen Embryonalentwicklung (ursprünglich so genannt nach dem *wingless*-Signalweg aus der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* und dem Wirbeltierhomolog *integrated-1*) (Cox & Peifer, 1998; Morata & Lawrence, 1977), auch eine entscheidende Rolle bei der Mukosaerneuerung im adulten humanen Darm spielt.

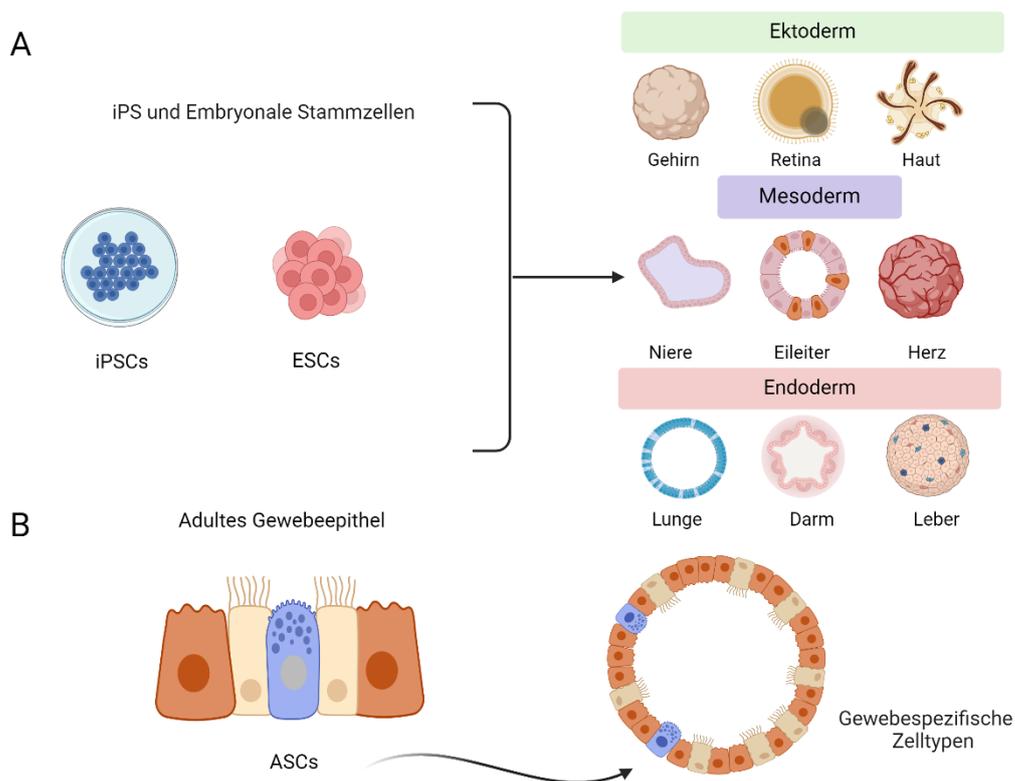
Wie Barker und Kollegen (Barker et al., 2007), in einer Meilensteinstudie im Mausmodell gezeigt haben, lokalisieren adulte Stammzellen im Darm in den Krypten zwischen den Zotten, exprimieren den WNT Rezeptor LGR5, erneuern sich selbst lebenslang neu und produzieren als Tochterzellen neue Epithelzellen, die sich wiederum in voll funktionstüchtige Zellen des Darmepithels differenzieren. In weiteren Studien ist es Forschern dann gelungen, die Kulturbedingungen zu definieren, unter welchen diese Zellen im Labor erhalten werden können und dabei die Regenerationsfähigkeit der Zellen beibehalten. Die Arbeiten von Toshiro Sato (Sato et al., 2009) haben eindrucksvoll gezeigt, dass einzelne LGR5-positive Zellen *in vitro* Darmepithelkrypten produzieren können, ohne Beteiligung von anderen Zelltypen. Wegen der

sehr hohen Ähnlichkeit des entstandenen Epithelzellenverbandes mit dem Ursprungsgewebe wurde dieses Modell auch als „Organoid“ bezeichnet. Diese Entdeckung hat einen Durchbruch bei den experimentellen *in vitro* Arbeiten mit Patientenmaterial erreicht, sowie eine Ära der Forschung an Organoiden aus adulten Stammzellen verschiedenster Gewebe begründet (Barker et al., 2010; Fujii et al., 2018; Huch et al., 2015; Loomans et al., 2018). Im Gegensatz zu von iPS-Zellen abgeleiteten Vorläufern sind die isolierten adulten Stammzellen jedoch nicht pluripotent, sondern sind im organspezifischen Differenzierungsprogramm verankert, so dass in der entsprechenden *in vitro* Kultur nur diejenigen Zelltypen entstehen können, die auch in dem adulten Gewebe/der Mukosaschicht natürlich vorkommen (Abbildung.1B).

Die Voraussetzung für die Organoidbildung und deren Wachstum ist die Einbettung der Progenitorzellen in eine definierte extrazelluläre Matrix (EZM), Basal Membrane Extract (BME), welche sich im Wesentlichen zusammensetzt aus Laminin, Kollagen IV, Entaktin und Heparin-sulfat, sowie der Zugabe definierter Kombinationen von Wachstumsfaktoren, die die Erhaltung des Stammzellpotentials unterstützen. Im Laufe der Jahre hat sich nun gezeigt, dass zelluläre Programme der somatischen Stammzellendifferenzierung in verschiedenen Organsystemen einen hohen Grad an Konservierung aufweisen und zum Teil von den gleichen Signalwegen wie im Darm gesteuert werden; neben dem WNT-Signalweg sind u.a. auch die Signalwege NOTCH, BMP, FGF und EGF beteiligt (Kim et al., 2020). Da die jeweiligen Kombinationen der notwendigen Wachstumsfaktoren aber im Detail von den speziellen Bedingungen des Gewebes des jeweiligen Organs abhängen, musste eine optimale Zusammensetzung der zuzugebenden Wachstumsfaktoren für jedes Organoidsystem zunächst experimentell bestimmt werden, um eine erfolgreiche Arbeit mit dem Modellsystem zu ermöglichen. Nur eine adäquate und quantitativ abgestimmte Zusammensetzung der verschiedenen Faktoren bildet eine Signalumgebung, die den Erhalt des Stammzellpotentials *in vitro* ermöglicht, und dadurch eine Langzeitexpansion der Kulturen sichert.

Trotz der Komplexität der Arbeiten zum Aufbau von Organoidmodellen haben sich in vergangenen Jahren zahlreiche Studien mit der Charakterisierung von Krebsorganoidmodellen beschäftigt, und belegt, dass die etablierten 3D Zellverbände sehr genau die genetischen und zellbiologischen Eigenschaften der jeweiligen Ursprungsgewebe widerspiegeln (Sachs et al., 2018; van de Wetering et al., 2015). So wurden *in vitro* Analysen von Fragestellungen ermöglicht, die bisher nur in Tiermodellen untersucht werden konnten, wie z.B. zu den

molekularen Details von Regulationsmechanismen, welche das Regenerationspotential von Zellen und das Krebswachstum im lebenden Gewebe steuern. Aus heutiger Sicht kann somit die Validierung der ersten Organoidmodelle von Karzinomen als wichtiger Meilenstein in der biomedizinischen und translationalen Forschung betrachtet werden (Ooft et al., 2019). Es hat sich gezeigt, dass Organoide nicht nur ein allgemein besseres Krankheitsmodell als herkömmlichen Ziellinien bieten, sie haben darüber hinaus eine Reihe neuartiger methodologischer Perspektiven eröffnet, wie z.B. die Bestimmung individueller, patientenspezifischer Antworten auf eine zielgerichtete oder systemische Medikamentenbehandlung oder die Möglichkeit zur Entdeckung neuer Arzneimittel durch Hochdurchsatzplattformen in einem dem Gewebe ähnlichen Zellkulturmodell (Vlachogiannis et al., 2018; Yao et al., 2020).



Created with [Biorender.com](https://biorender.com)

Abbildung 1: A) iPS und embryonale Stammzellen sind pluripotent und können sich in Organoidmodelle aller drei Keimblätter differenzieren. B) Adulte Stammzellen weisen gewebespezifische Differenzierungspotentiale auf, daraus entstehende Organoide enthalten jeweils nur organspezifische Epithelzelltypen.

2.4 Embryonale Entwicklungsmechanismen und ihre Verbindung zur Erneuerung der Mukosa des adulten Genitaltrakts

Der Großteil des weiblichen Genitaltrakts, die Vagina, der Uterus und die Eileiter, entwickelt sich aus dem Mesoderm, dem Mittleren der drei Keimblätter, in der Genitalanlage Ductus paramesonephricus (Müller-Gang). Die Eierstöcke entstehen dabei aus nephrogenen Strängen sowie eingewanderten Keimzellen. Eine zentrale Rolle des WNT-Signalwegs in diesen Prozessen wurde in einer Studie gezeigt, die belegte, dass WNT4 mutierte Mäuse keinen Müller-Gang entwickeln (Vainio et al., 1999). Im Einklang mit diesen Daten hat ein detaillierter Case Report, der 2004 im NEJM veröffentlicht wurde, eine kausative Punktmutation im WNT4 Gen bei einer Patientin mit Amenorrhoe, fehlendem Uterus und ausgeprägten Überschuss an androgenen Hormonen identifiziert, die im Hintergrund eines normalen Chromosomensatzes vorlag (Biason-Lauber et al., 2004). Die beiden Studien bestätigten, dass das WNT4 Protein eine zentrale Funktion bei der Festlegung der weiblichen Geschlechtsmerkmale aus den ursprünglich geschlechtsneutralen embryonalen Anlagen übernimmt. Die enge funktionelle Interaktion zwischen der Entwicklung der Genitaltraktes und dem hormonellen Haushalt wurden ebenfalls deutlich. In vivo Studien in Mausmodellen die mit Hilfe von „lineage tracing“/Abstammungsverfolgungsmethoden durchgeführt wurden konnten belegen, dass die Regenerationspotentiale im Uterus und Eileiter während der embryonalen und fetalen Entwicklung und im reproduktionsfähigen Alter in Bezug auf die Expression der LGR-Rezeptoren unterschiedlich reguliert werden. So weist der LGR5 Rezeptor, ein bekannter Stammzellmarker im Gastrointestinaltrakt, während der fetalen Entwicklung ein breites Expressionsmuster sowohl im Uterus als auch im Eileiter auf, welches bis zur Geburt vorhanden ist. In adulten Mäusen ist Lgr5-Expression jedoch nachweislich nur im Tubo-ovarialen Übergang vorhanden (Ng et al., 2014; Seishima et al., 2019). Daten zum humanen Uterus deuten auf eine durchaus komplexere Situation hin, wobei das LGR5 Expressionsmuster unter Hormonstimulation schwankt, und nicht einer definierten Stammzellnische entspricht (Tempest et al., 2018). Dementsprechend bleibt die Frage nach der Identität der relevanten Stammzelle und ihrer Regulation in der dazugehörigen Nische im adulten humanen Genitaltrakt weiterhin offen. Klar ist aber, dass, ähnlich wie in anderen Organsystemen (z.B. im Gastrointestinaltrakt), exogene WNT-Signale erforderlich sind, um das Stammzellpotential stabil zu erhalten und Differenzierungsprozesse zu steuern. Eine weitere

Studie unter Verwendung von lineage tracing im Mausmodell hat gezeigt, dass sich sekretorische Zellen im Eileiter unter Beteiligung von β -Catenin, dem terminalen Effektor des WNT-Signalwegs, selbst erneuern und Vorläufer von zilierten Tochterzellen sind (Ghosh et al., 2017). Die Bedeutung dieser Ergebnisse ist am besten im Kontext des neuen Paradigmas zu verstehen, welches postuliert dass das Seröse Ovarialkarzinom aus transformierten sekretorischen Zellen des Eileiterepithels entsteht (Shih et al., 2021; Wang et al., 2016). Somit steht der Prozess der Differenzierung sekretorischer Zellen in Richtung ziliierter Zellen als ein die Fertilität beeinflussender Faktor (Lyons et al., 2006) (die Zilienbewegung ist unerlässlich für den Transport von Gameten und Embryo), und potenziell wichtiger onkogener Faktor im Mittelpunkt des wissenschaftlichen Interesses. Diese Erkenntnisse waren dementsprechend richtungsweisend für die Optimierung der Kulturbedingungen zur Herstellung von Organoidkulturen aus humanen Eileiterepithelprogenitoren, einem der zentralen Meilensteine dieser Habilitationsarbeit.

2.5 Experimentelle Anforderungen zur Beantwortung offener Fragen in der gynäkologischen Forschung

Die Erforschung von Mechanismen hinter der Entstehung von Pathologien im oberen Genitaltrakt wird durch die Abwesenheit aussagekräftiger, nichtinvasiver diagnostischer Methoden erschwert. Die vorhandenen Datensätze aus humanem Gewebe sind das Ergebnis pathologischer *ex vivo* Untersuchungen von operativ gewonnenen Proben, in der Regel im Zusammenhang mit fortgeschrittenen Krankheitsstadien. Obwohl die konsistente Datenlage zu einer breiten Akzeptanz für die Hypothese der Herkunft des Ovarialkarzinoms aus transformierten Eileiterepithel geführt hat, bleiben noch viele Fragen in Bezug auf Kausalität und Sequenz der Transformationsprozesse bestehen (Bowtell et al., 2015; Vaughan et al., 2011). Im Kontext der Ovarialkarzinomentstehung werden sekretorische Zellen im Eileiterepithel als mutmaßliche Vorläuferzellen früher neoplastischer Veränderungen (STICs) angesehen. STIC-Läsionen (small tubal intraepithelial carcinoma) wurden in Gewebeproben von *BRCA1* Keimbahnvariantenträgerinnen nachgewiesen, denen zur Senkung des Krebsrisikos prophylaktisch die Eierstöcke und Eileiter entfernt worden waren (Carlson et al., 2008; Piek et al., 2003). Neuere NGS-Analysen haben eine genetische Kontinuität zwischen Eileiterepithel und Krebszellen nachgewiesen, wobei die einzelnen mechanistischen Schritte dieser Transformation bisher unklar verbleiben (Ducie et al., 2017). Insbesondere sind Schritte

und Signale noch zu klären, welche die Disseminierung von Eileiterepithelzellen des Fimbrientrichters im distalen Eileiter zur nahegelegenen Oberfläche des Ovars hervorrufen. Weitere Erkenntnisse über die zeitliche Reihenfolge der zellulären Veränderungen, die zu invasiven neoplastischen Veränderungen führen, sind eine wichtige Voraussetzung für die Identifikation spezifischer Biomarker zur diagnostischen Früherkennung des Ovarialkarzinoms.

Auch ist der Krankheitsverlauf des Ovarialkarzinoms, der zweithäufigsten Krebsart des Genitaltrakts in Deutschland, immer noch durch eine schlechte Langzeitprognose gekennzeichnet, wobei eine ausgeprägte Resistenzentwicklung des Karzinoms auf die Behandlung mit Standardchemotherapien eine der Hauptursachen für die hohe Morbidität und Mortalität ist (Colombo et al., 2014; Patch et al., 2015). In diesem zentralen Themenbereich der gynäkologischen-onkologischen translationalen Forschung bieten Organoidmodelle vielfältige Anwendungsmöglichkeiten und neue Perspektiven. Die einmaligen Eigenschaften neuartiger Organoidmodelle, die in dieser Arbeit *de novo* etabliert und charakterisiert wurden, eröffnen zum ersten Mal die Möglichkeiten, die Fragestellungen die Resistenzentstehung und Therapieansprechen systematisch *in vitro* zu untersuchen. Organoide aus gesundem Mukosa wiederum eröffnen die Perspektive realistische Infektionsmodelle zu bilden, um den möglichen Einfluss von Erregern auf die Pathogenese zu ermitteln.

Dieser Habilitation befasst sich umfassend mit der Einführung neuartiger Organoidmodelle in die gynäkologische Grundlagenforschung, ausgehend von einer initialen Beschreibung der Schlüsselmechanismen, die ein stabiles, langzeitiges Wachstum von 3D Kulturen nach Isolation adulter Stammzellen aus dem Eileitergewebe von Patienten unterstützen. Aufbauend auf diesen Arbeiten ist es gelungen, ein standardisiertes Verfahren für den Aufbau einer lebenden Biobank aus dem Ovarialkarzinomgewebe zu entwickeln, welche zahlreiche Organoidlinien aus verschiedenen Krankheitsstadien und diversen molekularen Charakteristika enthält. Mit Hilfe dieser lebenden Biobank wird es in der Zukunft möglich, das Anwendungspotential der Organoidtechnologie in Hinblick auf Testungen von patientenspezifischen Therapie-Antworten zu nutzen und eine Etablierung prädiktiver *in vitro* Assays anzugehen. Diese Arbeit reiht sich somit ein in die anhaltenden Bestrebungen der

Forschungsgemeinschaft grundlegend neue Technologien und Techniken für die Anwendung in der gynäkologischen und onkologischen Forschung zu entwickeln.

3. Zielsetzung

Diese Habilitationsarbeit beschreibt die Etablierung von Langzeitorganoidkulturen aus dem humanen Eileitergewebe zur Anwendung in Studien zu den zellulären Ursachen des Ovarialkarzinoms und dem möglichen Einfluss des inflammatorischen Milieus auf die Zelltransformation. Dabei wird ein Schwerpunkt auf die Identifikation von Schlüsselfaktoren gesetzt, die den Erhalt des Stammzellpotentials im Gewebe regulieren, sowie deren Veränderungen während der Pathogenese. Wegen der dualen Rolle des Eileiters als Fertilitätsfaktor sowie als Ursprungsgewebe der Krebsentstehung im Ovarialkarzinom hat das entwickelte experimentelle Modell ein breites Anwendungspotential bei gynäkologisch--onkologischen als auch reproduktionsmedizinischen Fragestellungen. Ein weiterer Fokus des Habilitationsvorhabens bezieht sich auf die Etablierung von Organoidmodellen aus primärem Gewebe des High-grade Serösen Ovarialkarzinoms. Neben der detaillierten Analyse der Unterschiede bei der Stammzellregulation im gesunden Epithel und dem malignen Tumor und deren Bedeutung für neue therapeutische Ansätze, sind weitergehende Arbeiten dahingehend konzipiert und im Sinne einer experimentellen Strategie für effektives und reproduzierbares Biobanking umgesetzt worden. Damit ist die zuverlässige Herstellung von Organoidlinien aus Krebsgewebe umfassender klinischer Präsentationen im klinischen Alltag gelungen. Die Umsetzung dieser Plattform in vollem Umfang kann somit von großer Bedeutung für nachfolgende Projekte im Besonderen im Bereich der personalisierten Medizin sein.

In seiner Gesamtheit umfasst das Habilitationsprojekt somit mehrere Teilprojekte, die sich auf die Erforschung von Organoiden als Modellsystem zur getreuen Nachbildung biologischer und pathologischer Prozesse in gesunden und erkrankten Epithelgeweben fokussieren. Durch Untersuchungen der Mechanismen, die grundlegend das Wachstum und die Differenzierung in Organoiden steuern, werden neue Zusammenhänge in der Krebsentstehung und dem Krankheitsverlauf identifiziert und bringen neue Ansätze und langfristige Strategien zur Lösung seit langem bestehender Fragestellungen in der klinisch/onkologischen Forschung ein.

4. Eigene Arbeiten

4.1 Entwicklung von Organoiden aus humanem Gewebe des Eileiters und Untersuchungen zur natürlichen Homöostase und pathogenen Prozessen im Epithel

4.1.1 Erste Langzeitorganoidkultur aus humanem Eileiterepithel

Kessler, M., Hoffmann, K., Brinkmann, V., Thieck, O., Jackisch, S., Toelle, B., Berger, H., Mollenkopf, H.J., Mangler, M., Sehouli, J., Fotopoulou, C. & Meyer, T.F. The Notch and Wnt pathways regulate stemness and differentiation in human fallopian tube organoids. *Nature Communications* 6, 8989 (2015).

Etablierung des ersten Organoidmodells aus humanem Eileiter (Kessler et al., 2015) wurde im Rahmen dieses Habilitationsprojektes in der Zeitschrift *Nature Communications* im Jahr 2015 veröffentlicht und gehört zu den wegweisenden Grundlagenarbeiten, die wegen ihrer Bedeutung und Tragweite zur Referenzstudie des Forschungsfelds geworden ist. Eines der Hauptziele des Projektes war es, die molekularen Bedingungen zu identifizieren, die die Erhaltung des Regenerationspotentials adulter Stammzellen steuern und somit auch die Kultivierung des Eileiterepithels in Form von Organoiden *in vitro* stabilisieren. Durch systematisches Austesten von Kombinationen parakriner Signalfaktoren und Standardisierung des Isolationsprotokolls basierend auf Eileiterresektionen wurde somit ein Verfahren entwickelt, welches zuverlässig die Generierung von langzeitstabilen Organoidkulturen aus humanen Eileitern ermöglicht. Es konnte gezeigt werden, dass die Aktivität des kanonischen WNT-Signalwegs und des NOTCH Signalwegs für die Erhaltung des Stammzellpotentials notwendig sind, während parallel eine Inhibition des BMP-Signalwegs und bestimmte Typen des TGF β -Rezeptorsignalwegs durchgeführt werden muss. Die Aktivität der genannten Schlüsselsignalwege konnte belegt werden mittels lentiviraler Transduktion von WNT-Reporter genen und durch Analyse von Genexpressionsdaten. Im Weiteren konnte im Organoidmodell bestätigt werden, dass sekretorische Zellen die Vorläufer von zilierten Zellen sind, was ein wichtiger konzeptioneller Beweis ist, um Validität des Modelles insgesamt zu zeigen. Zusätzlich konnte eine Differenzierung von zilierten Zellen durch gezielte Inhibition des NOTCH-Signalwegs effektiv induziert werden, was ein wichtiger Nachweis für die Rolle des Signalwegs in diesem zentralen Mechanismus der Regulation der epithelialen Homöostase

erbracht hat. Phänotypische Analysen mittels hochauflösender Konfokalmikroskopie und Transmissionselektronmikroskopie haben eindrucksvoll gezeigt, dass Eileiterorganoide wichtige molekulare Marker exprimieren, die aus dem Gewebe bekannt sind (u.a PAX8, CA125, CDH1), sowie bedeutende funktionelle Eigenschaften des Eileiterepithels aufweisen, wie die Präsenz reifer Zilien und Mikrovilli sowie der apikobasalen Zellpolarität, gekennzeichnet durch den Aufbau von Zell-Zell-Adhäsionskomplexen (Tight Junctions, ZA). Weiterhin konnte mittels Genexpressionsanalysen nachgewiesen werden, dass diese Organoide auf Hormonstimulation eine physiologische Antwort zeigen. Als Folge dieses Projekts können nun aus jedem frischen Eileiterzellisolat Organoidkulturen hergestellt werden, die über mehr als 16 Monate *in vitro* kulturiert werden können. So entstand eine erste lebende „Biobank“ bestehend aus Eileiterorganoiden, welche die Basis für Folgeprojekte in der Infektionsforschung und zur Entstehung des Eierstockkrebs, die weitere wichtige Teile dieser Habilitationsarbeit darstellen, geschaffen hat.

4.1.2. Infektionsmodell mit *Chlamydia trachomatis* identifiziert epigenetische Veränderungen in Eileiterorganoiden in Folge chronischer Infektion

Kessler, M., Hoffmann, K., Fritsche, K., Brinkmann, V., Mollenkopf, H.J., Thieck, O., Teixeira da Costa, A.R., Braicu, E.I., Sehoul, J., Mangler, M., Berger, H. & Meyer, T.F. Chronic *Chlamydia* infection in human organoids increases stemness and promotes age-dependent CpG methylation. *Nature Communications* 10, 1194 (2019).

Nach erfolgreicher Etablierung wurde das Eileiterorganoidmodell als System für die Optimierung und Analyse der chronischen Chlamydieninfektion verwendet, einem Prozess, der im Körper oft asymptomatisch verläuft und zum Tubenverschluss und Fertilitätsproblemen führen kann. Ziel des Projekts war es, die Pathogenität des intrazellulären Bakteriums *Chlamydia trachomatis* in Hinblick auf dessen Potential zu untersuchen das humane Eileiterepithel als Wirtsgewebe nachhaltig zu verändern. Der negative Einfluss aufsteigender Chlamydieninfektionen auf die Fertilität und Durchlässigkeit der Eileiter ist epidemiologisch gut belegt (Davies et al., 2016; Mardh, 2004; Svenstrup et al., 2008; Tsevat et al., 2017). Ob eine chronische, oft asymptomatische und langanhaltende Infektion jedoch tatsächlich die zellulären Eigenschaften des infizierten Epithels über die akute Infektionsphase und inflammatorische Antwort hinaus beeinflusst, konnte bis zum Einsatz des

Organoidmodells nicht eingehend untersucht werden. Mittels Organoidkulturen konnte jedoch ein chronisches Infektionsmodell etabliert werden (Kessler et al., 2019), bei dem sich Chlamydien über mehrere Monate produktiv innerhalb der Eileiterzellen vermehren konnten. Im Gegensatz zu herkömmlichen Zellkulturen, bei denen die 2D Zellen in kurzer Zeit nach Infektion absterben, haben die Organoide einen hohen Grad an Widerstandsfähigkeit und Reparaturkapazität gegenüber der Infektion gezeigt. Diese Eigenschaften haben es den Organoidkulturen erlaubt, trotz anhaltender Infektion weiterhin zu wachsen und sich zu regenerieren und Langzeitwachstum trotz bestehender Infektion fortzusetzen. Die Dynamik der Wirts-Pathogen-Interaktion, während der akuten Infektionsphase (48h) konnte durch live-cell Imaging im Detail analysiert werden, indem fluoreszenzmarkierte Epithelzellen und *Chlamydien* verwendet wurden.

Im Anschluss wurden unter kontrollierten Laborbedingungen erste longitudinale Experimente durchgeführt, um den Einfluss der chronischen Chlamydieninfektion auf die zelluläre und genomische Ebene zu untersuchen. Methylierungsanalysen haben gezeigt, dass das mit *Chlamydia* infizierte Epithel Veränderungen in der Verteilung methylierter Dinukleotide (mCpG-Inseln) aufweist, die auf einen beschleunigten Alterungsprozess hindeuten und auf veränderte Funktion der sogenannten Polycombkomplexe. Diese Studie hat ebenfalls gezeigt, dass eine Chlamydieninfektion zusätzlich zu der angeborenen inflammatorischen Antwort eine Induktion von Signalwegen auslöst, die die Kontrolle der Zellteilungs- und Differenzierungsprozesse im Gewebe steuern. Einer dieser neu identifizierten Signalwege wird von dem durch Chlamydieninfektion in den Organoidzellen induzierten Faktor LIF angesteuert, einem Faktor, der bisher hauptsächlich für seine zentrale Rolle bei der Einnistung des Embryos in die Gebärmutter bekannt war. Die ektopische Induktion von LIF im Eileiter als Folge einer Chlamydieninfektion könnte möglicherweise zum Mechanismus beitragen, der ein stark erhöhtes Risiko für ektopische Schwangerschaften nach Infektion vermittelt (Xia et al., 2020).

4.2. Veränderungen der Stammzellregulation und Alleinstellungsmerkmale der Ovarialkarzinomorganoide als Modellsystem

Hoffmann, K., Berger, H., Kulbe, H., Thillainadarasan, S., Mollenkopf, H.J., Zemojtel, T., Taube, E., Darb-Esfahani, S., Mangler, M., Sehoul, J., Chekerov, R., Braicu, E.I., Meyer, T.F. & **Kessler, M.** Stable expansion of high-grade serous ovarian cancer organoids requires a low-Wnt environment. *EMBO Journal* 39, e104013 (2020).

Nach der systematischen Untersuchung homöostatischer Prozesse und Mechanismen die die Differenzierung und physiologische Funktion des Eileiterepithels steuern, wurden Eileiterorganoide zur *in vitro* Nachbildung des Prozesses der Entstehung von Eierstockkrebs eingesetzt. Um die Sequenz der Tumorentstehung nachzuvollziehen, wurden gezielt die wichtigsten bekannten Tumorsuppressoren des Ovarialkarzinoms (TP53, PTEN und RB1) mittels lentiviraler und retroviraler Transduktion spezifischer shRNAs ausgeschaltet. Effektiver Dreifach-knockdown wurde auf Ebene der Genexpression mittels qPCR und auf Proteinebene für insgesamt 7 Linien bestätigt. Die Erwartung an dieses Experiment war, dass die Störung der Funktion von Tumorsuppressoren eine unkontrollierte Proliferation auslöst. Überraschenderweise wurde jedoch durch die gezielte experimentelle Manipulation ein Wachstumsstop in der Kultur verursacht. Obwohl die Experimente eindrucksvoll gezeigt haben, dass erwartete phänotypische Veränderungen als Folge der Inaktivierung der Tumorsuppressorgene eintreten, wie ein Anstieg von Cyclin E1, Verlust der Polarität und Veränderungen der Zellkernmorphologie, erfolgte kein langfristiges intrinsisches Wachstum der Kulturzellen. In Gegenteil wurden auch gezielte Veränderungen der Kulturbedingungen benötigt, um ein stabiles Wachstum der genetisch veränderten Organoide zu unterstützen. Diese Daten unterstützen die Hypothese, dass eine Krebsentstehung nicht allein durch eine Akkumulation von Treibermutationen zu erklären ist, sondern vielmehr als Ergebnis einer Interaktion der Tumorzellen mit der Mikroumgebung betrachtet werden kann, welches das Wachstum von transformierten Zellen begünstigt. Die optimalen Kulturbedingungen die für die Expansion von Ovarialkarzinomorganoiden bzw. Eileiterorganoiden mit dreifachem knockdown der Tumorsuppressoren notwendig sind, wurden in Experimenten mit Isolaten aus primären Gewebe zum Zeitpunkt zytoreduktiver Tumorresektion identifiziert. Es hat sich gezeigt, dass das Ovarialkarzinom-Medium frei vom WNT-Agonist WNT3A sein muss, die Organoide nur in manchen Fällen von RSPONDIN1 profitieren und das Wachstum begünstigt

wird durch eine Aktivierung des BMP-Signalwegs. Dies steht im Gegensatz zu den für Eileiterorganoide optimierten Medien, welche starke WNT Stimulation erfordern und das BMP Signal durch Zugabe von Noggin gehemmt werden muss, um ein langfristiges Wachstum der Kultur zu ermöglichen.

Dieses für Tumorzellen optimierte Medium wurde erfolgreich für die Etablierung einer Kohorte von 15 Linien aus 13 Krebspatientinnen genutzt. Ein Vergleich zwischen Organoidlinien und dem ursprünglichen Gewebe hat auf genomischer (Panel Sequenzierung) und Genexpressionsebene bestätigt, dass dieses neuartige Zellkulturmodell alle wichtigen molekularen Charakteristika des primären Tumors stabil *in vitro* beibehält (Hoffmann et al., 2020). Diese Ergebnisse haben dadurch einen wichtigen konzeptionellen Beweis erbracht, dass ein Biobanking-Ansatz mit patientenspezifischen Organoidlinien in der Praxis effektiv umsetzbar ist. Die prinzipielle Erkenntnis zur Expandierbarkeit von Ovarialkarzinomorganoiden wurde in parallelen Studien von anderen Arbeitsgruppen unabhängig bestätigt (Kopper et al., 2019; Senkowski et al., 2023). Dennoch stellt die projektspezifische Formulierung der Komponenten des Kulturmediums in zwei optimierten Zusammensetzungen (OCM1 und OCM2) ein Alleinstellungsmerkmal dieser Habilitationsarbeit dar. Die jeweiligen Zusammensetzungen wurden als Patent in der EU und den USA veröffentlicht und diente fortan als Grundlage zur Etablierung einer umfangreichen Organoid-Biobank des Ovarialkarzinoms im Folgeprojekt dieser Habilitationsarbeit.

4.3 Experimentelle Strategie zum umfassenden Biobanking von Organoiden des Ovarialkarzinoms

Trillsch, F., Czogalla, B., Kraus, F., Burges, A., Mahner, S. & **Kessler, M.** Protocol to optimize the biobanking of ovarian cancer organoids by accommodating patient-specific differences in stemness potential. STAR Protocols 4, 102484 (2023).

Stabiles Langzeitwachstum der Organoide ist einer der wichtigsten Faktoren und Voraussetzungen für eine erfolgreiche Anwendung in der translationalen Forschung. Die Expandierbarkeit, Herstellung von Stocks und Zugänglichkeit für molekularbiologische Methoden sind unerlässlich für Mittel- bis Hochdurchsatz Assays bei Wirkstofftestungen, und ermöglichen so eine robuste Reproduzierbarkeit der Ergebnisse. Die Zusammensetzung des

verwendeten Mediums spielt dabei eine entscheidende Rolle, um das Stammzellpotential der Organoide *in vitro* zu erhalten. Die oben beschriebenen Grundmedien wurden daher im Weiteren benutzt um den Ausbau der experimentellen Plattform, die erweiterte Standardisierung und ein umfassendes Biobanking von Ovarialkarzinomorganoidlinien aus verschiedenen Krankheitsstadien voran zu treiben. Aufbauend auf der initialen Studie, die sich auf Gewebeproben aus primären zytoreduktiven Operationen fokussiert hatte, wurden die Indikationen im Folgenden auf rezidivierende Tumoren, im Intervall vorgenommene zytoreduktive Operationen (post neoadjuvant chemo therapy-NACT) und verschiedene histologische Subtypen (HGSOC und LGSOC) erweitert, um eine umfassendere Biobank zu etablieren, die die Komplexität des Ovarialkarzinoms im klinischen Alltag widerspiegelt.

In der Praxis wurde für manche der verwendeten Primärgewebe beobachtet, dass nach erfolgreicher Zellisolation und Aussähen in 3D Kulturmedium Organoide geformt werden, die initiales robustes Wachstum zeigen, welches allerdings über die Zeit stark nachlässt und letztlich zu einem Stillstand kommt. Dieses Phänomen geht einher mit Anzeichen zellulären Stresses (u.a Vakuolen, Verlust der Zell-Zell-Kontakte) und deutet darauf hin, dass das Stammpotential bei diesen speziellen Kulturen nicht vollständig durch das standardisierte Medium stabilisiert werden kann. Diese Erfahrungswerte bekräftigten die Hypothese, dass das jeweilige Ovarialkarzinomgewebe von Heterogenität geprägt ist und ein optimales Biobanking weitere Anpassungen an das individuelle Patientenmaterial im Einzelfall erfordert, um das gesamte Spektrum der Variabilität dieser Tumorentität abzudecken. Bei der systematischen Nachverfolgung dieser Beobachtungen wurde z.B. ein für das Wachstum positiver Effekt von Heregulin β -1 als Zugabe zu den OCM1 und OCM2 Medien nachgewiesen. Heregulin β -1 ist ein löslicher Faktor, der die epidermalen Wachstumsfaktorrezeptoren ERBB3 and ERBB4 bindet, für die in der Literatur eine wachstumsfördernde Funktion bei Organoiden berichtet worden war (Jarde et al., 2016; Kopper et al., 2019). Der positive Effekt von Heregulin β -1 wurde für eine Subgruppe von Tumoren bestätigt, während die Auswirkungen des Faktors auf andere Gruppen deutlich negativ sind. Um das so erweiterte Spektrum der notwendigen Wachstumsbedingungen in die Biobanking Prozess einfließen zu lassen, wurde inzwischen eine 4-Medien- Konzept als neues Standardverfahren etabliert. Im Weiteren konnte gezeigt werden, dass die Isolation der Vorläuferzellen aus dem Primärgewebe ein kritischer Schritt ist und dass bei manchen Proben eine kurzfristige Kultivierung unter 2D Bedingungen und

anschließender Umsetzung in 3D Matrix zu einer verbesserten Organoidbildung und stabileren Langzeitwachstum im Vergleich zu direktem Transfer führt.

Zusammen betrachtet haben diese Beobachtungen gezeigt, dass das Stammzellpotential des Krebsgewebes aus Ovarialkarzinompatientinnen von Heterogenität geprägt ist, welche zurzeit anhand von den bekannten Parametern nicht prädiktiv klassifizierbar ist. Somit erfordert ein erfolgreiches Biobanking eine systematische Anwendung der etablierten und neuer experimenteller Medien, um optimale Kulturbedingungen zu identifizieren die auf die jeweilige Patientin spezifisch abgestimmt sind. Ein daraufhin optimiertes Protokoll stellt sicher, dass das Wachstumspotential *in vitro* stringent überprüft wird, bevor die Linien zur weiteren Verwendung kryo-asserviert werden. Dieses Verfahren bietet einen entscheidenden Vorteil für potenzielle spätere Anwendungen der Linien, da das Risiko des Wachstumstopps in späteren Passagen, und somit ein Verlust der Linie aus dem jeweiligen experimentellen Ansatz verringert wird.

Weiterhin hat das Projekt bestätigt, dass neben der stringenten Kontrolle der Kulturbedingungen im Labor und der standardisierten Probenentnahme durch erfahrene Chirurgen z.B. auch konstante Transportbedingungen für die Proben ein weiterer wichtiger Bestandteil des gesamten Biobanking-Prozesses ist der in den standardisierten Verfahrensprotokollen (SOPs) berücksichtigt werden sollte. Nach diesem Verfahren wurde zu dem Zeitpunkt des Abschlusses dieser Arbeit mehr als 60 Organoidlinien von 54 Ovarialkarzinompatientinnen erfolgreich generiert. Die Effizienz des Verfahrens liegt zurzeit bei ~50 %, was sowohl eine effektive experimentelle Strategie belegt, und große Chancen eröffnet, um neue Projekte zu konzipieren und experimentell umzusetzen.

4.4. Interdisziplinäre Anwendung der Organoid Technologie- Etablierung alveolarer Langzeitkulturen als Lungeninfektionsmodell

Hoffmann, K., Obermayer, B., Honzke, K., Fatykhova, D., Demir, Z., Lowa, A., Alves, L.G.T., Wyler, E., Lopez-Rodriguez, E., Mieth, M., Baumgardt, M., Hoppe, J., Firsching, T.C., Tonnies, M., Bauer, T.T., Eggeling, S., Tran, H.L., Schneider, P., Neudecker, J., Ruckert, J.C., Gruber, A.D., Ochs, M., Landthaler, M., Beule, D., Suttorp, N., Hippenstiel, S., Hocke, A.C. & **Kessler, M.** Human alveolar progenitors generate dual lineage bronchioalveolar organoids. *Commun Biol* 5, 875 (2022).

Dieses interdisziplinäre Projekt war Teil der Anstrengungen während der Covid-19 Pandemie, um geeignete zelluläre Modelle zur Untersuchung des Wirtzelltropismus von SARS-COV2 in verschiedenen Geweben zu etablieren und für die Infektionsforschung zu nutzen. Die Forschungsvorhaben wurden über das Konsortium „Organo-Strat“ durch das BMBF im Rahmen der ersten Förderperiode des Netzwerks Universitäts-Medizin (NUM) unterstützt. Durch die Arbeiten des Teilprojekts Lungenorganoide konnten alveolare Organoide als Langzeitkulturmodell erfolgreich etabliert werden. Konservierung der Entwicklungsregulatoren auf genomischer Ebene und auf Ebene zellbiologischer Mechanismen gehören zu den Hauptmerkmalen und Ergebnissen der Evolution, die deutlich in entwicklungsbiologischen Prozessen zu sehen sind. Die Untersuchungen der Pathogenese in adulten Geweben haben dennoch in verschiedenen Organsystemen gezeigt, dass Entwicklungsregulatoren funktionell bei allen Prozessen beteiligt sind, bei denen sich die Homöostase verändert, sowohl im Krebs, bei degenerativen Erkrankungen als auch in entzündeten Geweben.

Als Teil dieser Arbeit waren die zellbiologischen Erkenntnisse und gesammelte Expertise über Regenerationsmechanismen in adulten Gewebe im Genitaltrakt, die durch Entwicklungsregulatoren gesteuert sind, auch Wegweisend für die Etablierung eines neuen alveolaren Organoidmodells während der SARS-COV2 Pandemie in den Jahren 2020-2021. Vor allem die zentrale Bedeutung der lokalen Mikroumgebung im adulten Gewebe für die Regulation des Regenerations- und Differenzierungspotentials wurde auch durch die Studie zum Lungengewebe deutlich. Obwohl die prinzipielle Abstammung der alveolaren Zellen aus der HTII-280 positiven Stammzellpopulation schon bekannt war (Barkauskas et al., 2013), war bis zum Pandemiestart ein Erhalt von Progenitorzellen *in vitro* und Herstellung einer

Organoidkultur nicht gelungen, wodurch solche Modelle nicht für die Infektionsforschung zur Verfügung standen. Durch Anwendung systematischer Tests der Kulturbedingungen und molekulare Analyse der Auswirkungen auf Phänotyp und Zusammensetzung der Organoidkultur konnte das Projekt dieses Problem erfolgreich lösen (Hoffmann et al., 2022), unabhängig von anderen Gruppen die parallel ähnliche Beobachtungen gemacht haben (Katsura et al., 2020; Youk et al., 2020). Stabil wachsende alveolare Organoide aus HTII-280 Progenitorzellen wurden etabliert, die > 6 Monaten in Kultur expandiert werden konnten. Phänotypische Charakterisierung dieser Linien mittels Western Blot und qPCR belegte, dass Organoide auch nach mehreren Monaten in Kultur charakteristische Differenzierungsmarker robust exprimieren (NAPSIN, SFTPC, HOPX). Transmissionselektronenmikroskopie konnte zeigen, dass lamellar strukturierte opake Vesikel von den Organoidzellen gebildet und in das Lumen ausgeschieden werden, ein wichtiger funktioneller Marker funktionsfähiger Pneumozyten/AT2-Zellen. Weitere Experimente konnten hier eine besondere Rolle des GSK3B-Inhibitors CHIR99021 bei der Etablierung und langzeitiger Expansion alveolarer Organoide identifizieren. Eine detaillierte Expressionsanalyse dieser Organoide mittels single-cell RNA-Sequenzierung hat ergeben, dass der alveolare Phänotyp plastisch ist und einige Zellen in den Organoiden auch geringe Levels von Genen exprimieren, die typisch für das Atemwegsepithel sind. Interessanterweise führt die Entfernung des GSK3B Inhibitors aus dem Medium zu einer Umprogrammierung der Zellschicksale in Richtung des respiratorischen Epithels und Verlust des alveolaren Phänotyps. Somit, und durch weitere funktionelle Versuche, konnte die duale Plastizität der HTII-280+ Progenitorzellen unter dem Einfluss der Mikroumgebung auf die Differenzierungsprozesse im Lungengewebe nachgewiesen werden, was ein Alleinstellungsmerkmal dieses Projektes darstellt und einen neuen Beitrag zum Lungenforschungsfeld geleistet hat.

Die Ergebnisse dieses Projekts bieten somit Hinweise für zukünftige Projekte in der Lungenforschung, vor allem im Bereich von chronischen Lungenkrankheiten, bei denen in vielen Fällen die Ätiologie und Mechanismen der Pathogenese noch weitgehend unbekannt sind. Im Rahmen des Lungenorganoidprojektes wurde die neuentwickelte Organoidkultur für die Etablierung eines Infektionsmodells am Beispiel des Influenza A Virus angewendet. Während erfolgreiche Replikation des Virus im Plaque-Assay bestätigt wurde, haben Expressionsanalyse gezeigt, dass die Wirtszellantwort im Organoidmodell wichtige Faktoren

(z.B. Interferone) einschließt, die auch die Antwort des Lungengewebes auf eine *ex vivo* Infektion auszeichnet.

5. Zusammenfassung und Ausblick

Die Entwicklung adäquater experimenteller *in vitro* Modellen gehört zu den wichtigsten Zielen der biomedizinischen Grundlagen- und Translationsforschung. Bisher verwendete, stark reduktionistische 2D Zellkulturmodelle weichen deutlich in ihrer Biologie von den Eigenschaften der eigentlichen Gewebe ab, welches sie repräsentieren sollen. Dies kann zu Problemen bei der Interpretation der in solchen Modellen erhobenen Ergebnisse und der Extrapolation auf die Situation in den Geweben der Patienten führen, mit substantiell negativen Auswirkungen auf z.B. die Selektion von Wirkstoffen im Prozess der Medikamentenentwicklung in der präklinischen Phase (Ben-David et al., 2018).

Die Entdeckung des Regenerationspotentials im adulten Gewebe, welches eine kontinuierliche Erneuerung und Ersatz von geschädigtem Epithel im Erwachsenen ermöglicht, hat den Weg für die Etablierung der Organoid-Technologie geebnet, die durch Nutzung von detaillierten 3D Zellkulturmodellen das Potential haben, einen interdisziplinären Durchbruch in der biomedizinischen Forschung zu erreichen. Die Entwicklung adäquater Modelle in der gynäkologischen Grundlagenforschung stellte bisher, wegen der eingeschränkten Möglichkeiten molekulare Analysen am gesunden Gewebe durchzuführen, eine besondere Herausforderung dar.

Die humanen Eileiter sind von zentraler Bedeutung für die Reproduktion, als Nische für die Fertilisierung der Eizelle, wie auch als Ort an dem die ersten Tage der Embryonalentwicklung bis zur Implantation der Blastozyste im Endometrium der Gebärmutter (6-10 Tage nach Fertilisierung) stattfinden. Trotz ihrer wichtigen biologischen Funktion und der Bedeutung für die Gesundheit der Frau sind unsere Erkenntnisse über die vielfältige Rolle des Eileiterepithels durch die schwer zugängliche Lokalisierung im Abdomen sowie durch eingeschränkte Möglichkeiten zur Bildgebung *in situ* immer noch rudimentär. Neben diesen reproduktionsbiologisch wichtigen Fragestellungen ist eine Fortsetzung und Ausweitung von Studien wichtig, die eine detaillierte Erforschung der Eileiterbiologie hinsichtlich ihrer zentralen Rolle bei der Entstehung des Ovarialkarzinoms untersuchen.

Im Rahmen dieser Habilitationsarbeit wurden *de novo* Organoide aus dem humanen Eileitergewebe etabliert; ein Grundlagenforschungsprojekt, welches die Signalwege identifiziert hat, die das Langzeitwachstum und die Differenzierung von Vorläuferzellen in Kultur steuern. Die detaillierte phänotypische Charakterisierung der Eileiterorganoide haben bestätigt, dass das Organoid epithel die Architektur des Eileiterepithels *in vivo* widerspiegelt und auch eine physiologische Antwort auf Hormonstimulation zeigt. Die Originalpublikation zu diesen Arbeiten (Kessler et al., 2015, Nature Communications) wurde wegen der Bedeutung für die wissenschaftliche Gemeinschaft in einem Editorial (Research Highlights) des Mutterjournals Nature begleitend besprochen. Durch ihre wissenschaftliche Qualität ist diese Publikation zu einer Referenzstudie im Feld geworden und wurde bisher 291-mal zitiert (Clarivate Web of Science Collection, Stand Februar 2024). Durch diese Arbeit wurde die erste lebende Biobank von Eileiterorganoiden generiert.

Die methodologischen Vorteile des Eileiterorganoidmodells wurde in Folgeprojekten direkt gezeigt, wie dem ersten chronischen *in vitro* Infektionsmodell mit dem gramnegativen intrazellulären Pathogen *Chlamydia trachomatis*. Diese Arbeit hat es ermöglicht, die Interaktion zwischen humanen Epithelzellen und Erreger über die akute Infektionsphase von 72h hinaus zu analysieren, und Langzeitfolgen der Infektion z.B. auf die Epigenetik der Wirtszelle zu identifizieren und Hinweise zu finden wie durch Chlamydien verursachte Entzündungsprozesse nachhaltig die epitheliale Homöostase im Eileiter verändern können. Die Erkenntnis, dass die Chlamydieninfektion ein Risikofaktor für weitere pathologische Sequenzen darstellen können ist von Wichtigkeit für die weitere klinische Forschung, insbesondere da onkologische Studien das Eileiterepithel in direkte Verbindung mit der Entstehung des Ovarialkarzinoms gebracht haben. Die Ergebnisse dieser Arbeit konnten bereits wichtige Hinweise darauf geben, dass nicht nur bestimmte, das Wachstum des Tumors fördernde Mutationen, sondern auch Faktoren aus der Mikroumgebung des Tumors für die Biologie des Eierstockkrebses eine zentrale Rolle zukommen. Folgestudien sollen nun vor allem die Zusammensetzung und Entstehung einer die Transformation fördernden Mikroumgebung untersuchen, um besser zu verstehen welche Zellen und physiologischen Prozesse die Signale *in situ* produzieren, die es mutierten Epithelzellen ermöglichen in das Ovar zu invadieren. Dazu sollen neueste spatial-transcriptomics Technologien zum Einsatz kommen die es erlauben, Expressionsprofile einzelner Zelltypen *in situ* zu identifizieren, die

mittels sekretierter Faktoren eine Nische für migratorische Tumorzellen bilden. Auch sollen Folgestudien klären, ob die durch die Chlamydieninfektion induzierte Beschleunigung genomischer Alterungsprozesse ein Risikopotential für diesen Prozess darstellt. Im Besonderen wäre es interessant, Organoide aus Patientengewebe zu gewinnen, bei denen ein Tubenverschluss in der Vergangenheit diagnostiziert wurde, um die bestehenden *in vitro* Hinweise auf Änderungen der epigenetischen Ebene *ex vivo* zu validieren.

Die Strategie zum effektiven Biobanking von Ovarialkarzinomorganoiden wurde während diese Habilitation erfolgreich entwickelt und umfassend implementiert. Parallel werden weitere gezielte Arbeiten zur Anpassungen der Kulturbedingungen und des Zellisoliationsverfahrens erforderlich, die zusätzliche Verbesserung der bereits jetzt sehr robusten Standardprotokolle erreichen. Ziel ist es, den Ausbau der umfangreichen Biobank zu erweitern mit dem maximalen Ziel, dass für jeden Tumor eine entsprechende Organoidlinie generiert werden kann. Eine entsprechend hohe Effizienz wäre von große Bedeutung für die weitere Entwicklung der Organoidtechnologie, die z.B. als Point-of-care Test die klinischen Entscheidungsprozesse im Alltag begleiten könnten.

In der Zusammenschau der vorgestellten Projekte ergeben sich klare allgemein gültige Schlussfolgerungen zu unserem Verständnis wichtiger Pathogeneseprozesse im menschlichen Körper, sei es im weiblichen Genitaltrakt oder in der Lunge. Alle Daten der hier vorgestellten Projekte sprechen konsistent dafür, dass das Zusammenspiel aus adulten Epithelstammzellen und Signalen aus deren Umgebung ein dynamischer Prozess ist, der auch durch äußere Faktoren wie Infektionen beeinflusst werden kann. Auch Organoidzellen aus dem Krebsgewebe sind von der individuellen Mikroumgebung abhängig, was eine wichtige Erkenntnis sein kann, um neue und verbesserte therapeutische Konzepte in der Gynäkologie zu entwickeln. Die Gesamtheit der vorgestellten Forschungsansätze zeigt somit die Wichtigkeit zellulärer Entscheidungsprozesse für die Regulation der natürlichen Homöostase im Gewebe sowie deren Beitrag zur Krankheitsentstehung- und Verlauf im menschlichen Körper.

Die Entwicklung neuer methodologischer Konzepte, die im Rahmen dieser Arbeit entwickelt worden sind, haben zu einem qualitativen Fortschritt der Organoidtechnologie geführt und maßgeblich zur Einführung von Organoidmodellen in die gynäkologische Grundlagerecherche

beigetragen. Weiterhin hat diese Habilitationsarbeit einen bedeutenden interdisziplinären Beitrag für die Lungenforschung erbracht, da das etablierte alveolare Organoidmodell für *in vitro* Studien mit SARS-COV2 Infektionen während der Zeit der Pandemie angewendet werden konnte, woraus mehrere Publikationen mit hohem wissenschaftlichem Einfluss entstanden sind (Faist et al., 2023; Honzke et al., 2022).

Die Organoid-Biobank des Ovarialkarzinoms bietet auch einen hervorragenden Ausgangspunkt für vielfältige Anwendungsmöglichkeiten im diagnostischen Bereich, zur personalisierten Testung der Wirksamkeit gezielter Therapien *in vitro* sowie der detaillierten Analyse von zellulären Mechanismen der Resistenzentwicklung auf klinisch relevante Medikamente. Somit wurden hervorragende Voraussetzungen für zukünftige Arbeiten geschaffen, die unter Anwendung modernster Methoden der Molekulargenetik, wie CRISPR/CAS9 basiertem Genom-Editing und funktionellen *in-vitro* Assays, zentrale Mechanismen der klonalen Evolution des Ovarialkarzinoms in Zukunft entschlüsseln werden können.

6.Abkürzungsverzeichnis

2D	Zweidimensionalität
3D	Dreidimensionalität
APC	Adenomatous Polyposis Coli
AT2	Alveolar type II cells
BME	Basal Membrane Extract
BMP	Bone Morphogenic Proteins
BRCA1	Breast Cancer1, early-onset
CA125	Cancer-Antigen 125
CDH1	Cadherin 1
<i>Ctr</i>	<i>Chlamydia trachomatis</i>
ERBB	Erb-b2 receptor tyrosine kinase
EZM	Extrazelluläre Matrix

Hela Zellen	Henrietta Lacks Zellen
HGSOC	High Grade Serous Ovarian
iPS Zellen	Induzierte pluripotente Stammzellen
KLF4	Krüppel-like Factor 4
LGR5	Leucine rich repeat containing G protein-coupled receptor 5
LGSOC	Low Grade Serous Ovarian Cancer
NACT	Neoadjuvante Chemotherapie
NUM	Netzwerk Universitäts-Medizin
OCM	Ovarian Cancer Medium
OCT3/4	Oktamer-bindender Transkriptionsfaktor 3/4
OMIK	Technologien die für die ganzheitliche Analyse von Molekülen eingesetzt wird: Genomik, Proteomik, Transkriptomik, Metabolomik
PIK3CA	Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphate 3-Kinase Catalytic Subunit Alpha
PTEN	Phosphatase and Tensin homolog
qPCR	quantitative Polymerase-Kettenreaktion
RB-1	Retinoblastom 1
shRNA	small hairpin RNA
SARS-COV2	Severe acute respiratory syndrome coronavirus type 2
SOX2	Sex determining Region Y (SRY)-box2
STIC	Serous Tubal Intraepithelial Carcinoma
TCGA	The Cancer Genome Atlas Program
TGF β	Transforming growth factor β
TP53	Tumor Protein 53
WNT	Zusammensetzung von Wg (Wingless) und Int-1
ZA	Zonula adherens

7. Literaturverzeichnis

- Barkauskas, C. E., Cronce, M. J., Rackley, C. R., Bowie, E. J., Keene, D. R., Stripp, B. R., Randell, S. H., Noble, P. W., & Hogan, B. L. (2013, Jul). Type 2 alveolar cells are stem cells in adult lung. *J Clin Invest*, *123*(7), 3025-3036. <https://doi.org/10.1172/JCI68782>
- Barker, N., Huch, M., Kujala, P., van de Wetering, M., Snippert, H. J., van Es, J. H., Sato, T., Stange, D. E., Begthel, H., van den Born, M., Danenberg, E., van den Brink, S., Korving, J., Abo, A., Peters, P. J., Wright, N., Poulsom, R., & Clevers, H. (2010, Jan 8). Lgr5(+ve) stem cells drive self-renewal in the stomach and build long-lived gastric units in vitro. *Cell Stem Cell*, *6*(1), 25-36. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2009.11.013>
- Barker, N., van Es, J. H., Kuipers, J., Kujala, P., van den Born, M., Cozijnsen, M., Haegerbarth, A., Korving, J., Begthel, H., Peters, P. J., & Clevers, H. (2007, Oct 25). Identification of stem cells in small intestine and colon by marker gene Lgr5. *Nature*, *449*(7165), 1003-1007. <https://doi.org/10.1038/nature06196>
- Ben-David, U., Siranosian, B., Ha, G., Tang, H., Oren, Y., Hinohara, K., Strathdee, C. A., Dempster, J., Lyons, N. J., Burns, R., Nag, A., Kugener, G., Cimini, B., Tsvetkov, P., Maruvka, Y. E., O'Rourke, R., Garrity, A., Tubelli, A. A., Bandopadhyay, P., Tsherniak, A., Vazquez, F., Wong, B., Birger, C., Ghandi, M., Thorner, A. R., Bittker, J. A., Meyerson, M., Getz, G., Beroukchim, R., & Golub, T. R. (2018, Aug). Genetic and transcriptional evolution alters cancer cell line drug response. *Nature*, *560*(7718), 325-330. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0409-3>
- Biason-Lauber, A., Konrad, D., Navratil, F., & Schoenle, E. J. (2004, Aug 19). A WNT4 mutation associated with Mullerian-duct regression and virilization in a 46,XX woman. *N Engl J Med*, *351*(8), 792-798. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa040533>
- Bowtell, D. D., Bohm, S., Ahmed, A. A., Aspuria, P. J., Bast, R. C., Jr., Beral, V., Berek, J. S., Birrer, M. J., Blagden, S., Bookman, M. A., Brenton, J. D., Chiappinelli, K. B., Martins, F. C., Coukos, G., Drapkin, R., Edmondson, R., Fotopoulou, C., Gabra, H., Galon, J., Gourley, C., Heong, V., Huntsman, D. G., Iwanicki, M., Karlan, B. Y., Kaye, A., Lengyel, E., Levine, D. A., Lu, K. H., McNeish, I. A., Menon, U., Narod, S. A., Nelson, B. H., Nephew, K. P., Pharoah, P., Powell, D. J., Jr., Ramos, P., Romero, I. L., Scott, C. L., Sood, A. K., Stronach, E. A., & Balkwill, F. R. (2015, Nov). Rethinking ovarian cancer II: reducing mortality from high-grade serous ovarian cancer. *Nat Rev Cancer*, *15*(11), 668-679. <https://doi.org/10.1038/nrc4019>
- Cancer Genome Atlas Research, N. (2011, Jun 29). Integrated genomic analyses of ovarian carcinoma. *Nature*, *474*(7353), 609-615. <https://doi.org/10.1038/nature10166>
- Cancer Genome Atlas Research, N., Albert Einstein College of, M., Analytical Biological, S., Barretos Cancer, H., Baylor College of, M., Beckman Research Institute of City of, H., Buck Institute for Research on, A., Canada's Michael Smith Genome Sciences, C., Harvard Medical, S., Helen, F. G. C. C., Research Institute at Christiana Care Health, S., HudsonAlpha Institute for, B., ILSbio, L. L. C., Indiana University School of, M., Institute of Human, V., Institute for Systems, B., International Genomics, C., Leidos, B., Massachusetts General, H., McDonnell Genome Institute at Washington, U., Medical College of, W., Medical University of South, C., Memorial Sloan Kettering Cancer, C., Montefiore Medical, C., NantOmics, National Cancer, I., National Hospital, A. N., National Human Genome Research, I., National Institute of Environmental Health, S., National Institute on, D., Other Communication, D., Ontario Tumour Bank, L. H. S. C., Ontario Tumour Bank, O. I. f. C. R., Ontario Tumour Bank, T. O. H., Oregon, H., Science, U., Samuel Oschin Comprehensive Cancer Institute, C.-S. M. C., International, S. R. A., St Joseph's Candler Health, S., Eli, Edythe, L. B. I. o. M. I. o. T., Harvard, U., Research Institute at Nationwide Children's, H., Sidney Kimmel Comprehensive Cancer Center at Johns Hopkins, U., University of, B., University of Texas, M. D. A. C. C., University of Abuja Teaching, H., University of Alabama at, B., University of California, I., University of California Santa, C., University of Kansas Medical, C., University of, L., University of New Mexico Health Sciences, C., University of North Carolina at Chapel, H., University of Oklahoma Health Sciences, C., University of, P., University of Sao Paulo, R. a. P. M. S., University of Southern, C., University of, W., University of Wisconsin School of, M., Public, H., Van Andel Research, I., & Washington University in St. L. (2017, Mar 16). Integrated

- genomic and molecular characterization of cervical cancer. *Nature*, 543(7645), 378-384.
<https://doi.org/10.1038/nature21386>
- Carlson, J. W., Miron, A., Jarboe, E. A., Parast, M. M., Hirsch, M. S., Lee, Y., Muto, M. G., Kindelberger, D., & Crum, C. P. (2008, Sep 1). Serous tubal intraepithelial carcinoma: its potential role in primary peritoneal serous carcinoma and serous cancer prevention. *J Clin Oncol*, 26(25), 4160-4165.
<https://doi.org/10.1200/JCO.2008.16.4814>
- Colombo, P. E., Fabbro, M., Theillet, C., Bibeau, F., Rouanet, P., & Ray-Coquard, I. (2014, Feb). Sensitivity and resistance to treatment in the primary management of epithelial ovarian cancer. *Crit Rev Oncol Hematol*, 89(2), 207-216. <https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2013.08.017>
- Cox, R. T., & Peifer, M. (1998, Feb 12). Wingless signaling: the inconvenient complexities of life. *Curr Biol*, 8(4), R140-144. [https://doi.org/10.1016/s0960-9822\(98\)70081-8](https://doi.org/10.1016/s0960-9822(98)70081-8)
- Davies, B., Turner, K. M. E., Frolund, M., Ward, H., May, M. T., Rasmussen, S., Benfield, T., Westh, H., & Danish Chlamydia Study, G. (2016, Sep). Risk of reproductive complications following chlamydia testing: a population-based retrospective cohort study in Denmark. *Lancet Infect Dis*, 16(9), 1057-1064.
[https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(16\)30092-5](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(16)30092-5)
- Domcke, S., Sinha, R., Levine, D. A., Sander, C., & Schultz, N. (2013). Evaluating cell lines as tumour models by comparison of genomic profiles. *Nat Commun*, 4, 2126. <https://doi.org/10.1038/ncomms3126>
- Ducie, J., Dao, F., Considine, M., Olvera, N., Shaw, P. A., Kurman, R. J., Shih, I. M., Soslow, R. A., Cope, L., & Levine, D. A. (2017, Oct 17). Molecular analysis of high-grade serous ovarian carcinoma with and without associated serous tubal intra-epithelial carcinoma. *Nat Commun*, 8(1), 990.
<https://doi.org/10.1038/s41467-017-01217-9>
- Faist, A., Schloer, S., Mecate-Zambrano, A., Janowski, J., Schreiber, A., Boergeling, Y., Conrad, B. C. G., Kumar, S., Toebben, L., Schughart, K., Baumgardt, M., Kessler, M., Hoenzke, K., Hocke, A., Trautmann, M., Hartmann, W., Kato, H., Rescher, U., Christersson, A., Kuehn, J., Mellmann, A., Wolff, T., Kuempers, P., Rovas, A., Wiewrodt, R., Wiebe, K., Barth, P., Ludwig, S., & Brunotte, L. (2023, Jan). Inhibition of p38 signaling curtails the SARS-CoV-2 induced inflammatory response but retains the IFN-dependent antiviral defense of the lung epithelial barrier. *Antiviral Res*, 209, 105475.
<https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2022.105475>
- Fujii, M., Matano, M., Toshimitsu, K., Takano, A., Mikami, Y., Nishikori, S., Sugimoto, S., & Sato, T. (2018, Dec 6). Human Intestinal Organoids Maintain Self-Renewal Capacity and Cellular Diversity in Niche-Inspired Culture Condition. *Cell Stem Cell*, 23(6), 787-793 e786. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2018.11.016>
- Ghosh, A., Syed, S. M., & Tanwar, P. S. (2017, Sep 1). In vivo genetic cell lineage tracing reveals that oviductal secretory cells self-renew and give rise to ciliated cells. *Development*, 144(17), 3031-3041.
<https://doi.org/10.1242/dev.149989>
- Hoffmann, K., Berger, H., Kulbe, H., Thillainadarasan, S., Mollenkopf, H. J., Zemojtel, T., Taube, E., Darb-Esfahani, S., Mangler, M., Sehouli, J., Chekerov, R., Braicu, E. I., Meyer, T. F., & Kessler, M. (2020, Mar 16). Stable expansion of high-grade serous ovarian cancer organoids requires a low-Wnt environment. *EMBO J*, 39(6), e104013. <https://doi.org/10.15252/embj.2019104013>
- Hoffmann, K., Obermayer, B., Honzke, K., Fatykhova, D., Demir, Z., Lowa, A., Alves, L. G. T., Wyler, E., Lopez-Rodriguez, E., Mieth, M., Baumgardt, M., Hoppe, J., Firsching, T. C., Tonnies, M., Bauer, T. T., Eggeling, S., Tran, H. L., Schneider, P., Neudecker, J., Ruckert, J. C., Gruber, A. D., Ochs, M., Landthaler, M., Beule, D., Suttrop, N., Hippenstiel, S., Hocke, A. C., & Kessler, M. (2022, Aug 25). Human alveolar progenitors generate dual lineage bronchioalveolar organoids. *Commun Biol*, 5(1), 875.
<https://doi.org/10.1038/s42003-022-03828-5>
- Honzke, K., Obermayer, B., Mache, C., Fatykhova, D., Kessler, M., Dokel, S., Wyler, E., Baumgardt, M., Lowa, A., Hoffmann, K., Graff, P., Schulze, J., Mieth, M., Hellwig, K., Demir, Z., Biere, B., Brunotte, L., Mecate-Zambrano, A., Bushe, J., Dohmen, M., Hinze, C., Elezkurtaj, S., Tonnies, M., Bauer, T. T., Eggeling, S., Tran, H. L., Schneider, P., Neudecker, J., Ruckert, J. C., Schmidt-Ott, K. M., Busch, J., Klauschen, F.,

- Horst, D., Radbruch, H., Radke, J., Heppner, F., Corman, V. M., Niemeyer, D., Muller, M. A., Goffinet, C., Mothes, R., Pascual-Reguant, A., Hauser, A. E., Beule, D., Landthaler, M., Ludwig, S., Suttorp, N., Witzentrath, M., Gruber, A. D., Drosten, C., Sander, L. E., Wolff, T., Hippenstiel, S., & Hocke, A. C. (2022, Dec). Human lungs show limited permissiveness for SARS-CoV-2 due to scarce ACE2 levels but virus-induced expansion of inflammatory macrophages. *Eur Respir J*, *60*(6).
<https://doi.org/10.1183/13993003.02725-2021>
- Huch, M., Gehart, H., van Boxtel, R., Hamer, K., Blokzijl, F., Verstegen, M. M., Ellis, E., van Wenum, M., Fuchs, S. A., de Ligtt, J., van de Wetering, M., Sasaki, N., Boers, S. J., Kemperman, H., de Jonge, J., Ijzermans, J. N., Nieuwenhuis, E. E., Hoekstra, R., Strom, S., Vries, R. R., van der Laan, L. J., Cuppen, E., & Clevers, H. (2015, Jan 15). Long-term culture of genome-stable bipotent stem cells from adult human liver. *Cell*, *160*(1-2), 299-312. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.11.050>
- Jarde, T., Lloyd-Lewis, B., Thomas, M., Kendrick, H., Melchor, L., Bougaret, L., Watson, P. D., Ewan, K., Smalley, M. J., & Dale, T. C. (2016, Oct 26). Wnt and Neuregulin1/ErbB signalling extends 3D culture of hormone responsive mammary organoids. *Nat Commun*, *7*, 13207.
<https://doi.org/10.1038/ncomms13207>
- Katsura, H., Sontake, V., Tata, A., Kobayashi, Y., Edwards, C. E., Heaton, B. E., Konkimalla, A., Asakura, T., Mikami, Y., Fritch, E. J., Lee, P. J., Heaton, N. S., Boucher, R. C., Randell, S. H., Baric, R. S., & Tata, P. R. (2020, Dec 3). Human Lung Stem Cell-Based Alveolospheres Provide Insights into SARS-CoV-2-Mediated Interferon Responses and Pneumocyte Dysfunction. *Cell Stem Cell*, *27*(6), 890-904 e898.
<https://doi.org/10.1016/j.stem.2020.10.005>
- Kessler, M., Hoffmann, K., Brinkmann, V., Thieck, O., Jackisch, S., Toelle, B., Berger, H., Mollenkopf, H. J., Mangler, M., Sehoul, J., Fotopoulou, C., & Meyer, T. F. (2015, Dec 8). The Notch and Wnt pathways regulate stemness and differentiation in human fallopian tube organoids. *Nat Commun*, *6*, 8989.
<https://doi.org/10.1038/ncomms9989>
- Kessler, M., Hoffmann, K., Fritsche, K., Brinkmann, V., Mollenkopf, H. J., Thieck, O., Teixeira da Costa, A. R., Braicu, E. I., Sehoul, J., Mangler, M., Berger, H., & Meyer, T. F. (2019, Mar 18). Chronic Chlamydia infection in human organoids increases stemness and promotes age-dependent CpG methylation. *Nat Commun*, *10*(1), 1194. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-09144-7>
- Kim, J., Koo, B. K., & Knoblich, J. A. (2020, Oct). Human organoids: model systems for human biology and medicine. *Nat Rev Mol Cell Biol*, *21*(10), 571-584. <https://doi.org/10.1038/s41580-020-0259-3>
- Kinzler, K. W., & Vogelstein, B. (1996, Oct 18). Lessons from hereditary colorectal cancer. *Cell*, *87*(2), 159-170.
[https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)81333-1](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)81333-1)
- Kopper, O., de Witte, C. J., Lohmussaar, K., Valle-Inclan, J. E., Hami, N., Kester, L., Balgobind, A. V., Korving, J., Proost, N., Begthel, H., van Wijk, L. M., Revilla, S. A., Theeuwssen, R., van de Ven, M., van Roosmalen, M. J., Ponsioen, B., Ho, V. W. H., Neel, B. G., Bosse, T., Gaarenstroom, K. N., Vrieling, H., Vreeswijk, M. P. G., van Diest, P. J., Witteveen, P. O., Jonges, T., Bos, J. L., van Oudenaarden, A., Zweemer, R. P., Snippert, H. J. G., Kloosterman, W. P., & Clevers, H. (2019, May). An organoid platform for ovarian cancer captures intra- and interpatient heterogeneity. *Nat Med*, *25*(5), 838-849.
<https://doi.org/10.1038/s41591-019-0422-6>
- Lewis-Israeli, Y. R., Wasserman, A. H., Gabalski, M. A., Volmert, B. D., Ming, Y., Ball, K. A., Yang, W., Zou, J., Ni, G., Pajares, N., Chatzistavrou, X., Li, W., Zhou, C., & Aguirre, A. (2021, Aug 26). Self-assembling human heart organoids for the modeling of cardiac development and congenital heart disease. *Nat Commun*, *12*(1), 5142. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-25329-5>
- Loomans, C. J. M., Williams Giuliani, N., Balak, J., Ringnalda, F., van Gurp, L., Huch, M., Boj, S. F., Sato, T., Kester, L., de Sousa Lopes, S. M. C., Roost, M. S., Bonner-Weir, S., Engelse, M. A., Rabelink, T. J., Heimberg, H., Vries, R. G. J., van Oudenaarden, A., Carlotti, F., Clevers, H., & de Koning, E. J. P. (2018, Mar 13). Expansion of Adult Human Pancreatic Tissue Yields Organoids Harboring Progenitor Cells with Endocrine Differentiation Potential. *Stem Cell Reports*, *10*(3), 712-724.
<https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2018.02.005>

- Lyons, R. A., Saridogan, E., & Djahanbakhch, O. (2006, Jul-Aug). The reproductive significance of human Fallopian tube cilia. *Hum Reprod Update*, 12(4), 363-372. <https://doi.org/10.1093/humupd/dml012>
- Macville, M., Schrock, E., Padilla-Nash, H., Keck, C., Ghadimi, B. M., Zimonjic, D., Popescu, N., & Ried, T. (1999, Jan 1). Comprehensive and definitive molecular cytogenetic characterization of HeLa cells by spectral karyotyping. *Cancer Res*, 59(1), 141-150. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9892199>
- Mardh, P. A. (2004, Feb). Tubal factor infertility, with special regard to chlamydial salpingitis. *Curr Opin Infect Dis*, 17(1), 49-52. <https://doi.org/10.1097/00001432-200402000-00010>
- Masters, J. R. (2002, Apr). HeLa cells 50 years on: the good, the bad and the ugly. *Nat Rev Cancer*, 2(4), 315-319. <https://doi.org/10.1038/nrc775>
- McCauley, K. B., Hawkins, F., Serra, M., Thomas, D. C., Jacob, A., & Kotton, D. N. (2017, Jun 1). Efficient Derivation of Functional Human Airway Epithelium from Pluripotent Stem Cells via Temporal Regulation of Wnt Signaling. *Cell Stem Cell*, 20(6), 844-857 e846. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2017.03.001>
- Morata, G., & Lawrence, P. A. (1977, Apr). The development of wingless, a homeotic mutation of Drosophila. *Dev Biol*, 56(2), 227-240. [https://doi.org/10.1016/0012-1606\(77\)90266-4](https://doi.org/10.1016/0012-1606(77)90266-4)
- Ng, A., Tan, S., Singh, G., Rizk, P., Swathi, Y., Tan, T. Z., Huang, R. Y., Leushacke, M., & Barker, N. (2014, Aug). Lgr5 marks stem/progenitor cells in ovary and tubal epithelia. *Nat Cell Biol*, 16(8), 745-757. <https://doi.org/10.1038/ncb3000>
- Odorico, J. S., Kaufman, D. S., & Thomson, J. A. (2001). Multilineage differentiation from human embryonic stem cell lines. *Stem Cells*, 19(3), 193-204. <https://doi.org/10.1634/stemcells.19-3-193>
- Ooft, S. N., Weeber, F., Dijkstra, K. K., McLean, C. M., Kaing, S., van Werkhoven, E., Schipper, L., Hoes, L., Vis, D. J., van de Haar, J., Prevoo, W., Snaebjornsson, P., van der Velden, D., Klein, M., Chalabi, M., Boot, H., van Leerdam, M., Bloemendal, H. J., Beerepoot, L. V., Wessels, L., Cuppen, E., Clevers, H., & Voest, E. E. (2019, Oct 9). Patient-derived organoids can predict response to chemotherapy in metastatic colorectal cancer patients. *Sci Transl Med*, 11(513). <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aay2574>
- Patch, A. M., Christie, E. L., Etemadmoghadam, D., Garsed, D. W., George, J., Fereday, S., Nones, K., Cowin, P., Alsop, K., Bailey, P. J., Kassahn, K. S., Newell, F., Quinn, M. C., Kazakoff, S., Quek, K., Wilhelm-Benartzi, C., Curry, E., Leong, H. S., Australian Ovarian Cancer Study, G., Hamilton, A., Mileskkin, L., Au-Yeung, G., Kennedy, C., Hung, J., Chiew, Y. E., Harnett, P., Friedlander, M., Quinn, M., Pyman, J., Corder, S., O'Brien, P., Leditschke, J., Young, G., Strachan, K., Waring, P., Azar, W., Mitchell, C., Traficante, N., Hendley, J., Thorne, H., Shackleton, M., Miller, D. K., Arnau, G. M., Tothill, R. W., Holloway, T. P., Semple, T., Harliwong, I., Nourse, C., Nourbakhsh, E., Manning, S., Idrisoglu, S., Bruxner, T. J., Christ, A. N., Poudel, B., Holmes, O., Anderson, M., Leonard, C., Lonie, A., Hall, N., Wood, S., Taylor, D. F., Xu, Q., Fink, J. L., Waddell, N., Drapkin, R., Stronach, E., Gabra, H., Brown, R., Jewell, A., Nagaraj, S. H., Markham, E., Wilson, P. J., Ellul, J., McNally, O., Doyle, M. A., Vedururu, R., Stewart, C., Lengyel, E., Pearson, J. V., Waddell, N., deFazio, A., Grimmond, S. M., & Bowtell, D. D. (2015, May 28). Whole-genome characterization of chemoresistant ovarian cancer. *Nature*, 521(7553), 489-494. <https://doi.org/10.1038/nature14410>
- Piek, J. M., Verheijen, R. H., Kenemans, P., Massuger, L. F., Bulten, H., & van Diest, P. J. (2003, Aug). BRCA1/2-related ovarian cancers are of tubal origin: a hypothesis. *Gynecol Oncol*, 90(2), 491. [https://doi.org/10.1016/s0090-8258\(03\)00365-2](https://doi.org/10.1016/s0090-8258(03)00365-2)
- Sachs, N., de Ligt, J., Kopper, O., Gogola, E., Bounova, G., Weeber, F., Balgobind, A. V., Wind, K., Gracanin, A., Begthel, H., Korving, J., van Boxtel, R., Duarte, A. A., Lelieveld, D., van Hoeck, A., Ernst, R. F., Blokzijl, F., Nijman, I. J., Hoogstraat, M., van de Ven, M., Egan, D. A., Zinzalla, V., Moll, J., Boj, S. F., Voest, E. E., Wessels, L., van Diest, P. J., Rottenberg, S., Vries, R. G. J., Cuppen, E., & Clevers, H. (2018, Jan 11). A Living Biobank of Breast Cancer Organoids Captures Disease Heterogeneity. *Cell*, 172(1-2), 373-386 e310. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.11.010>

- Sansom, O. J., Reed, K. R., Hayes, A. J., Ireland, H., Brinkmann, H., Newton, I. P., Batlle, E., Simon-Assmann, P., Clevers, H., Nathke, I. S., Clarke, A. R., & Winton, D. J. (2004, Jun 15). Loss of Apc in vivo immediately perturbs Wnt signaling, differentiation, and migration. *Genes Dev*, *18*(12), 1385-1390. <https://doi.org/10.1101/gad.287404>
- Sato, T., Vries, R. G., Snippert, H. J., van de Wetering, M., Barker, N., Stange, D. E., van Es, J. H., Abo, A., Kujala, P., Peters, P. J., & Clevers, H. (2009, May 14). Single Lgr5 stem cells build crypt-villus structures in vitro without a mesenchymal niche. *Nature*, *459*(7244), 262-265. <https://doi.org/10.1038/nature07935>
- Schuldiner, M., Yanuka, O., Itskovitz-Eldor, J., Melton, D. A., & Benvenisty, N. (2000, Oct 10). Effects of eight growth factors on the differentiation of cells derived from human embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *97*(21), 11307-11312. <https://doi.org/10.1073/pnas.97.21.11307>
- Seishima, R., Leung, C., Yada, S., Murad, K. B. A., Tan, L. T., Hajamohideen, A., Tan, S. H., Itoh, H., Murakami, K., Ishida, Y., Nakamizo, S., Yoshikawa, Y., Wong, E., & Barker, N. (2019, Nov 26). Neonatal Wnt-dependent Lgr5 positive stem cells are essential for uterine gland development. *Nat Commun*, *10*(1), 5378. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-13363-3>
- Senkowski, W., Gall-Mas, L., Falco, M. M., Li, Y., Lavikka, K., Kriegbaum, M. C., Oikkonen, J., Bulanova, D., Pietras, E. J., Vossgrone, K., Chen, Y. J., Erkan, E. P., Dai, J., Lundgren, A., Gronning Hog, M. K., Larsen, I. M., Lamminen, T., Kaipio, K., Huvila, J., Virtanen, A., Engelholm, L., Christiansen, P., Santoni-Rugiu, E., Huhtinen, K., Carpen, O., Hynninen, J., Hautaniemi, S., Vaharautio, A., & Wennerberg, K. (2023, Jun 19). A platform for efficient establishment and drug-response profiling of high-grade serous ovarian cancer organoids. *Dev Cell*, *58*(12), 1106-1121 e1107. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2023.04.012>
- Sherr, C. J., & DePinho, R. A. (2000, Aug 18). Cellular senescence: mitotic clock or culture shock? *Cell*, *102*(4), 407-410. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)00046-5](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)00046-5)
- Shih, I. M., Wang, Y., & Wang, T. L. (2021, Jan). The Origin of Ovarian Cancer Species and Precancerous Landscape. *Am J Pathol*, *191*(1), 26-39. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2020.09.006>
- Sun, D., Gao, W., Hu, H., & Zhou, S. (2022, Jul). Why 90% of clinical drug development fails and how to improve it? *Acta Pharm Sin B*, *12*(7), 3049-3062. <https://doi.org/10.1016/j.apsb.2022.02.002>
- Svenstrup, H. F., Fedder, J., Kristoffersen, S. E., Trolle, B., Birkelund, S., & Christiansen, G. (2008, Sep). Mycoplasma genitalium, Chlamydia trachomatis, and tubal factor infertility--a prospective study. *Fertil Steril*, *90*(3), 513-520. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2006.12.056>
- Takahashi, K., & Yamanaka, S. (2006, Aug 25). Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*, *126*(4), 663-676. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.07.024>
- Takebe, T., Imai, R., & Ono, S. (2018, Nov). The Current Status of Drug Discovery and Development as Originated in United States Academia: The Influence of Industrial and Academic Collaboration on Drug Discovery and Development. *Clin Transl Sci*, *11*(6), 597-606. <https://doi.org/10.1111/cts.12577>
- Tempest, N., Baker, A. M., Wright, N. A., & Hapangama, D. K. (2018, Jun 1). Does human endometrial LGR5 gene expression suggest the existence of another hormonally regulated epithelial stem cell niche? *Hum Reprod*, *33*(6), 1052-1062. <https://doi.org/10.1093/humrep/dey083>
- Tsevat, D. G., Wiesenfeld, H. C., Parks, C., & Peipert, J. F. (2017, Jan). Sexually transmitted diseases and infertility. *Am J Obstet Gynecol*, *216*(1), 1-9. <https://doi.org/10.1016/j.ajog.2016.08.008>
- Vainio, S., Heikkila, M., Kispert, A., Chin, N., & McMahon, A. P. (1999, Feb 4). Female development in mammals is regulated by Wnt-4 signalling. *Nature*, *397*(6718), 405-409. <https://doi.org/10.1038/17068>
- van de Wetering, M., Francies, H. E., Francis, J. M., Bounova, G., Iorio, F., Pronk, A., van Houdt, W., van Gorp, J., Taylor-Weiner, A., Kester, L., McLaren-Douglas, A., Blokker, J., Jaksani, S., Bartfeld, S., Volckman, R., van Sluis, P., Li, V. S., Seepo, S., Sekhar Peadamallu, C., Cibulskis, K., Carter, S. L., McKenna, A., Lawrence, M. S., Lichtenstein, L., Stewart, C., Koster, J., Versteeg, R., van Oudenaarden, A., Saez-

- Rodriguez, J., Vries, R. G., Getz, G., Wessels, L., Stratton, M. R., McDermott, U., Meyerson, M., Garnett, M. J., & Clevers, H. (2015, May 7). Prospective derivation of a living organoid biobank of colorectal cancer patients. *Cell*, *161*(4), 933-945. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.03.053>
- Vaughan, S., Coward, J. I., Bast, R. C., Jr., Berchuck, A., Berek, J. S., Brenton, J. D., Coukos, G., Crum, C. C., Drapkin, R., Etemadmoghadam, D., Friedlander, M., Gabra, H., Kaye, S. B., Lord, C. J., Lengyel, E., Levine, D. A., McNeish, I. A., Menon, U., Mills, G. B., Nephew, K. P., Oza, A. M., Sood, A. K., Stronach, E. A., Walczak, H., Bowtell, D. D., & Balkwill, F. R. (2011, Sep 23). Rethinking ovarian cancer: recommendations for improving outcomes. *Nat Rev Cancer*, *11*(10), 719-725. <https://doi.org/10.1038/nrc3144>
- Vlachogiannis, G., Hedayat, S., Vatsiou, A., Jamin, Y., Fernandez-Mateos, J., Khan, K., Lampis, A., Eason, K., Huntingford, I., Burke, R., Rata, M., Koh, D. M., Tunariu, N., Collins, D., Hulkki-Wilson, S., Ragulan, C., Spiteri, I., Moorcraft, S. Y., Chau, I., Rao, S., Watkins, D., Fotiadis, N., Bali, M., Darvish-Damavandi, M., Lote, H., Eltahir, Z., Smyth, E. C., Begum, R., Clarke, P. A., Hahne, J. C., Dowsett, M., de Bono, J., Workman, P., Sadanandam, A., Fassan, M., Sansom, O. J., Eccles, S., Starling, N., Braconi, C., Sottoriva, A., Robinson, S. P., Cunningham, D., & Valeri, N. (2018, Feb 23). Patient-derived organoids model treatment response of metastatic gastrointestinal cancers. *Science*, *359*(6378), 920-926. <https://doi.org/10.1126/science.aao2774>
- Wang, Y., Li, L., Wang, Y., Tang, S. N., & Zheng, W. (2016). Fallopian tube secretory cell expansion: a sensitive biomarker for ovarian serous carcinogenesis. *Am J Transl Res*, *8*(1), 230-238. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27069556>
- Wong, C. H., Siah, K. W., & Lo, A. W. (2019, Apr 1). Estimation of clinical trial success rates and related parameters. *Biostatistics*, *20*(2), 273-286. <https://doi.org/10.1093/biostatistics/kxx069>
- Xia, Q., Wang, T., Xian, J., Song, J., Qiao, Y., Mu, Z., Liu, H., & Sun, Z. (2020, Jan). Relation of Chlamydia trachomatis infections to ectopic pregnancy: A meta-analysis and systematic review. *Medicine (Baltimore)*, *99*(1), e18489. <https://doi.org/10.1097/MD.00000000000018489>
- Yao, Y., Xu, X., Yang, L., Zhu, J., Wan, J., Shen, L., Xia, F., Fu, G., Deng, Y., Pan, M., Guo, Q., Gao, X., Li, Y., Rao, X., Zhou, Y., Liang, L., Wang, Y., Zhang, J., Zhang, H., Li, G., Zhang, L., Peng, J., Cai, S., Hu, C., Gao, J., Clevers, H., Zhang, Z., & Hua, G. (2020, Jan 2). Patient-Derived Organoids Predict Chemoradiation Responses of Locally Advanced Rectal Cancer. *Cell Stem Cell*, *26*(1), 17-26 e16. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2019.10.010>
- Youk, J., Kim, T., Evans, K. V., Jeong, Y. I., Hur, Y., Hong, S. P., Kim, J. H., Yi, K., Kim, S. Y., Na, K. J., Bleazard, T., Kim, H. M., Fellows, M., Mahbubani, K. T., Saeb-Parsy, K., Kim, S. Y., Kim, Y. T., Koh, G. Y., Choi, B. S., Ju, Y. S., & Lee, J. H. (2020, Dec 3). Three-Dimensional Human Alveolar Stem Cell Culture Models Reveal Infection Response to SARS-CoV-2. *Cell Stem Cell*, *27*(6), 905-919 e910. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2020.10.004>
- Yucer, N., Ahdoot, R., Workman, M. J., Laperle, A. H., Recouvreux, M. S., Kurowski, K., Naboulsi, D. J., Liang, V., Qu, Y., Plummer, J. T., Gayther, S. A., Orsulic, S., Karlan, B. Y., & Svendsen, C. N. (2021, Dec 28). Human iPSC-derived fallopian tube organoids with BRCA1 mutation recapitulate early-stage carcinogenesis. *Cell Rep*, *37*(13), 110146. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2021.110146>
- Yucer, N., Holzapfel, M., Jenkins Vogel, T., Lenaeus, L., Ornelas, L., Laury, A., Sareen, D., Barrett, R., Karlan, B. Y., & Svendsen, C. N. (2017, Sep 6). Directed Differentiation of Human Induced Pluripotent Stem Cells into Fallopian Tube Epithelium. *Sci Rep*, *7*(1), 10741. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-05519-2>

7.1 Eigene Publikationen

Originalarbeiten als Erst- oder Letztautorin

Hoffmann, K., B. Obermayer, K. Honzke, D. Fatykhova, Z. Demir, A. Lowa, L. G. T. Alves, E. Wyler, E. Lopez-Rodriguez, M. Mieth, M. Baumgardt, J. Hoppe, T. C. Firsching, M. Tonnies, T. Bauer, S. Eggeling, H. L. Tran, P. Schneider, J. Neudecker, J. C. Ruckert, A. D. Gruber, M. Ochs, M. Landthaler, D. Beule, N. Suttorp, S. Hippenstiel, A. C. Hocke and **M. Kessler** (2022). "Human alveolar progenitors generate dual lineage bronchioalveolar organoids." *Commun Biol* 5(1): 875.

Hoffmann, K., H. Berger, H. Kulbe, S. Thillainadarasan, H. J. Mollenkopf, T. Zemojtel, E. Taube, S. Darb-Esfahani, M. Mangler, J. Sehouli, R. Chekerov, E. I. Braicu, T. F. Meyer and **M. Kessler** (2020). "Stable expansion of high-grade serous ovarian cancer organoids requires a low-Wnt environment." *EMBO J* 39(6): e104013.

Kessler, M., K. Hoffmann, K. Fritsche, V. Brinkmann, H. J. Mollenkopf, O. Thieck, A. R. Teixeira da Costa, E. I. Braicu, J. Sehouli, M. Mangler, H. Berger and T. F. Meyer (2019). "Chronic Chlamydia infection in human organoids increases stemness and promotes age-dependent CpG methylation." *Nat Commun* 10(1): 1194.

Kessler, M., K. Hoffmann, V. Brinkmann, O. Thieck, S. Jackisch, B. Toelle, H. Berger, H. J. Mollenkopf, M. Mangler, J. Sehouli, C. Fotopoulou and T. F. Meyer (2015). "The Notch and Wnt pathways regulate stemness and differentiation in human fallopian tube organoids." *Nat Commun* 6: 8989.

Kessler, M., J. Zielecki, O. Thieck, H. J. Mollenkopf, C. Fotopoulou, and T. F. Meyer. 2012. "Chlamydia trachomatis disturbs epithelial tissue homeostasis in fallopian tubes via paracrine Wnt signaling." *Am J Pathol* 180 (1):186-98. doi: 10.1016/j.ajpath.2011.09.015.

Trillsch, F., B. Czogalla, F. Kraus, A. Burges, S. Mahner, and **M. Kessler**. 2023. "Protocol to optimize the biobanking of ovarian cancer organoids by accommodating patient-specific differences in stemness potential." *STAR Protoc* 4 (3):102484. doi: 10.1016/j.xpro.2023.102484.

Trillsch, F., Reichenbach, J., Czogalla, B., Kraus, F., Burges, A., Mahner, S., and **M. Kessler**. 2024 "Strategy for Biobanking of Ovarian Cancer Organoids: Addressing the Interpatient Heterogeneity across Histological Subtypes and Disease Stages" *JoVE* , <https://dx.doi.org/10.3791/66467>

Patent

OVARIAN CANCER ORGANOID CULTURE WO2019162453A1 (EP19705543.7A, US2021230555A1); Veröffentlichung 2019

Erfinder: Thomas F. Meyer und **Mirjana Kessler**

8. Danksagung

Diese Habilitationsarbeit ist entstanden durch viele Jahre Grundlagenforschung an mehreren führenden deutschen Forschungseinrichtungen und Kliniken in Berlin und in München. Meine Dankbarkeit geht an Prof Sven Mahner, für die einmalige Gelegenheit Biobanking-Organoid-Technologie am Forschungslabor der LMU Frauenklinik zu implementieren und weiterzuentwickeln, für seine stetige Unterstützung und Begleitung, die unerlässlich waren, damit diese Arbeit in heutiger Form fertiggestellt wird.

Großer Dank geht auch an Prof. Thomas F. Meyer, Max-Planck-Gesellschaft, MPG Institut für Infektionsbiologie in Berlin, wo ich die ersten Schritte in die Welt der Organoidforschung gemacht habe und sehr viele Schlüsselentdeckungen dieser Arbeit entstanden sind. Herzlichen Dank an Dr. Karen Hoffmann, die mich für einige Jahre als wunderbares und sehr wertvolles Teammitglied in meiner wissenschaftlichen Tätigkeit begleitet hat. Bei dem Universitätsklinikum Charité Berlin, Klinik für Infektiologie und Pneumologie, bedanke ich mich für die zwei sehr spannenden Jahre Coronaforschung, in denen ich die Etablierung des Lungenorganoidmodells geleitet habe.

Vielen Dank an alle Mitarbeiter und Mitarbeiterinnen der LMU-Frauenklinik, die mir mein neues berufliches „Zuhause“ seit 2021 sehr angenehm gestaltet haben. Dem Forschungslabor MTA-Team ein ganz herzlicher Dank für Alles, was sie im Alltag leisten und die sehr nette Menschlichkeit miteinander. Der großen Doktorandentruppe, die die Räume des Forschungslabors täglich mit Enthusiasmus, Motivation und Gelächter ausfüllen: Danke euch! Vielen Dank auch an Prof. Fabian Trillsch und PD Alexander Burges für ihre Expertise, den unermüdlichen Einsatz im OP-Saal und die Hilfe bei den klinischen Aspekten und Herausforderungen in der Ovarialkarzinomforschung.

Für meine Familie: Meinem Mann Thomas und meinen Kinder Philip, Stefan und Ana: als erstes Danke für die Geduld! Für alle Fristen und Paper-Revisionen die ihr überstanden habt, für die wissenschaftlichen Seminare im Babyalter, bei denen ihr dabei gewesen seid, ohne zu klagen, für das „Ja“ zum großen Umzug nach München und dass ihr an mich glaubt, auch wenn es nervt. Danke. Eure Liebe gibt mir Kraft.

Diese Arbeit wäre auch nicht das Gleiche, ohne das stetige unermüdliche Anfeuern aus meiner Heimatstadt Belgrad, Serbien: meinen Eltern und Bruder und dem großen

Verwandtschafts und Freundeskreis. An Kosa und Vladislava, meine besten Freundinnen, geht mein ganz besonderer Dank, für ein täglich offenes Ohr, und das wir gemeinsam bewiesen haben, dass fast 25 Jahre Fernbeziehung auch halten kann.