Sachbericht zum Verwendungsnachweis

Mamma-Explant

Zuwendungsempfänger	**Förderkennzeichen**
AG Bartneck, UKA/ AG Dahl, UKA	03LW0144 (ehemals 16LW0144)
Vorhabenbeschreibung	**Akronym**
Alternativmethoden: Entwicklung und Validierung eines humanen Brustkrebs-Explantat-Modells (MammaExplant) – Testung potentieller Therapeutika im Explantat-Modell	MammaExplant
Laufzeit des Vorhabens	**Berichtszeitraum**
01.04.2022-31.03.2025	01.04.2022-31.03.2025

Teil I: Kurzbericht

Die ursprüngliche Aufgabenstellung umfasste die Entwicklung eines Brusttumor-Explant-Modells, welches Tierversuche zum Zwecke der Etablierung von Brusttumor-Modellen (z.B. für die Austestung neuer und zielgerichteter Antikrebs-Medikamente) langfristig systematisch ersetzen soll. In solchen Explantaten echter humaner Tumore kann eine Vielzahl von molekularen Markern – zum Beispiel Oberflächenproteine oder sezernierte Zytokine - nachgewiesen und damit tumor-assoziiertes Wissen, was der Therapieauswahl für den Patienten zugutekommt, generiert werden. Die humanen Explantate enthalten neben den Krebszellen auch gesundes Gewebe, Stroma sowie Patienten-spezifische Immunzellen, welche das Wachstum des Tumors fördern oder hemmen. Die intakte Tumor-Mikroumgebung als entscheidendes Charakteristikum des Explant-Modells bildet nicht nur die klinische Heterogenität realistisch ex-vivo ab, sondern erlaubt die mechanistische Aufklärung von Wirkmechanismen bzw. von möglichen Gründen einer Therapieresistenz. Molekulare Analytik von Tumor- und Immunzellen wurden genutzt, um ein deutlich erweitertes Bild der Tumorfunktionalität und Heterogenität im Kontext der Immunzellaktivierung zu liefern. Neueste Proteomanalysetechniken sind dabei, die bisherige die RNA-Analytik zu ergänzen. Die

Ergebnisse des Verbundprojekts werden derzeit für eine Publikation in einer führenden Fachzeitschrift vorbereitet und in Absprache mit den beteiligten Firmen für Patentierungen genutzt.

Zum Zeitpunkt der Antragstellung befanden sich eine Vielzahl von Brustkrebs-Therapeutika in der präklinischen Entwicklung, um neue Therapeutika für die schwer therapierbare metastasierende Form von Brustkrebs zu entwickeln. Die zur Verfügung stehenden, meist murinen, Modelle waren jedoch in ihrer Aussagekraft eingeschränkt. Aufgrund dessen wurden präklinische Modelle ausgebaut, welche die menschliche Erkrankung möglichst realitätsnah nachstellen. Explantatmodelle haben sich hierbei tatsächlich als die am nächsten an die Tumor-Wirklichkeit (Komplexität) herankommenden präklinischen Modelle etabliert.

Die Firma Syntab hat im Rahmen des Projekt MammaExplant ihren neuartigen synthetischen Antikörper (*Immune system engager*, kurz ISEr) der Firma Navitect zur Verfügung gestellt. Firma Navitect hat dann Explantatmodelle mit Brustkrebsproben aus Aachen etabliert und Tumor Response-bezogen analysiert, nachdem diese Mammakarzinome taggleich von einem Kurier vom Klinikum Aachen nach Heidelberg transportiert wurden (organisiert durch die RWTH cBMB, der zentralisierte Biobank der Medizinischen Fakultät in Aachen). Die vergleichende Untersuchung des Proteoms von Mensch und Maus durch die AG Bartneck hat gezeigt, dass ein sehr wichtiger Unterschied zwischen humanen Explantat-Kulturen und dem Mausmodell in dem Komplementsystem besteht. Das Komplementsystem besteht im Körper aus einer Reihe von Proteinen, welche Bakterien abwehren, indem Sie diese eliminieren. Aber auch für die Interaktion zwischen Immunzellen und Tumorzellen ist das Komplementsystem wichtig.

Durch das erfolgreich etablierte Brustkrebs-Explantatmodell konnte somit erfolgreich eine Erweiterung der diagnostischen Möglichkeiten für die Brustkrebspatientinnen

erschlossen werden, deren Umsetzung in den klinischen Alltag aber noch der Einbindung von weiteren Stakeholdern in der Krankenversorgung bedarf. Darüber hinaus wurden zahlreiche neue wissenschaftliche Erkenntnisse zu Brusttumor-relevanten Molekülen wie ITIH5 gewonnen, die in zukünftige Publikationen einfliessen werden.

Sachbericht zum Verwendungsnachweis

Mamma-Explant

Zuwendungsempfänger	**Förderkennzeichen**
AG Bartneck, UKA/ AG Dahl, UKA	03LW0144 (ehemals 16LW0144)
Vorhabenbeschreibung	**Akronym**
Alternativmethoden: Entwicklung und Validierung eines humanen Brustkrebs-Explantat-Modells (MammaExplant) – Testung potentieller Therapeutika im Explantat-Modell	MammaExplant
Laufzeit des Vorhabens	**Berichtszeitraum**
01.04.2022-31.03.2025	01.04.2022-31.03.2025

Teil II: Eingehende Darstellung

Wir berichten über die Projektjahre 2022-2025.

1. **Aufzählung der wichtigsten wissenschaftlich-technischen Ergebnisse und anderer wesentlicher Ereignisse.**

Im Gantt-Chart ist eine Übersicht zum Projekt gegeben (**Abbildung 1**).

		Q1	Q2	Q3	Q4	Q5	Q6	Q7	Q8	Q9	Q10	Q11	Q12
AP-1	1. Etablierung Explantat				M1								
	2. ISERs im Explantat				M2								
	3. Transkriptomik/Proteomik						M3						
AP-2	1. Tierversuchsantrag						M4						
	2. ISERs im Tiermodell								M5				
	3. Transkriptomik/Proteomik								M6				
AP-3	1. Vergleichende Auswerung										M7		
	2. Signalwegsanalyse												M8
	3. 3R-Verwertung												M9

Abbildung: Gantt-Chart zur Darstellung des zeitlichen Ablaufs und der Meilensteine (M) des Projekts.

Abbildung 1: Gantt-Chart zur Projektübersicht.

AP1.1 Etablierung Explantat-Modellsystem: Erfolgreich abgeschlossen durch die Firma Navitect in Zusammenarbeit mit der RWTH cBMB Biobank am Universitätsklinikum Aachen (UKA). Die Mammakarzinom-Proben wurden taggleich vom UKA nach Heidelberg transportiert und dort in Kultur genommen. Die gesamte komplexe Prozesskette vom OP, über die Pathologie, die Biobank, den Taxi-Dienst bis hin zum Labor von Navitect wurde optimiert und steht damit auch für zukünftige Projekte, die auf unfixierten humanen Frischmaterial aufbauen, zur Verfügung. Bei jedem einzelnem Transport nach Heidelberg wurde die ununterbrochene Kühlkette mittels Temperaturdatentrackers erfolgreich dokumentiert (**Abbildung 2**).

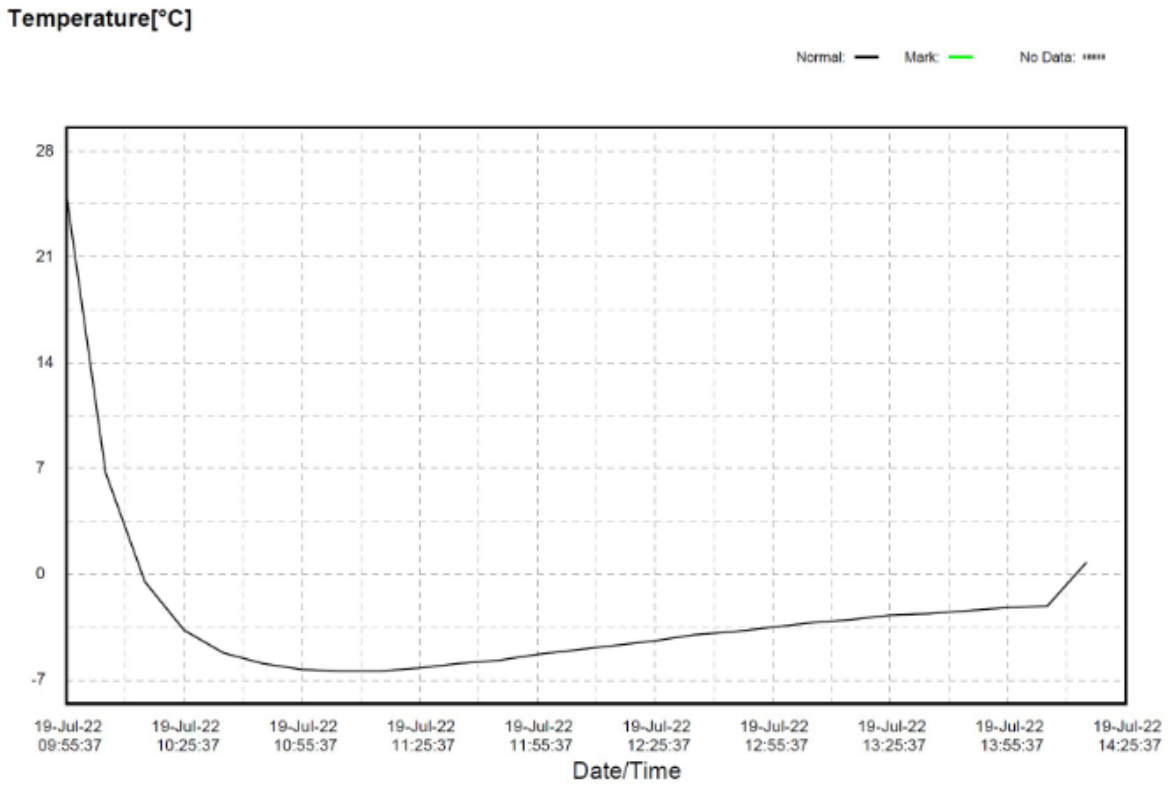

Abbildung 2: Aufzeichnung der Daten des Temperaturtrackers während eines Probentransports vom Klinikum Aachen zu Navitect in Heidelberg. Exemplarische Daten der Temperaturen in der Kühlbox während eines Bioprobentransports im Sommer 2022 (19.07.2022) im Temperaturtracker eines Probentransports. Die Aufzeichnung zeigt, dass ein Transport ca. 2,5 Stunden benötigte und die Temperatur erst mit dem Auspacken des Trackers in Heidelberg die Null-Grad-Grenze überschritt.

AP1.2 ISEr im Explantat: ISEr wurden wie geplant im Explantat eingesetzt, durch die Partner Syntab und Navitect

AP1.3 Transkriptom/ Proteomanalytik:

Das AP ist erfolgreich beendet worden. Es konnten viele bislang noch unbekannte Proteine in Zellkulturüberständen nachgewiesen werden. Es hat sich gezeigt, dass die Menge an Gewebe nicht ausreicht, um umfangreiche Zellisolationen aus den Explantaten durchzuführen. Daher wurden für die RNA-Analytik Kulturen angesetzt. Diese wurden außerdem mit einer massenspektrometrischen Methode zur Proteomanalyse untersucht, wie im letzten Jahr auch unter Verwendung des Förderkennzeichens MammaExplant publiziert (Lin *et al.* 2023, Advanced Healthcare Materials). Der Fokus liegt daher auf der Untersuchung des Proteoms bzw. Sekretoms der Tumor- und Immunzellen.

Zellkulturmedien aus den Explantatversuchen und weiteren Immunzell-Brustkrebszell-Kokulturen wurden mittels etablierter Proteomanalytik untersucht. Durch eine Behandlung von Brustkrebszellen mit dem putativen Tumorsuppressor-Protein ITIH5 konnten wichtige, neue Erkenntnisse erlangte werden. In dem folgenden Proteomik-Volcano-Plot sind einige Proteine dargestellt. Unsere Daten deuten darauf hin, dass sich PTX3 und ITIH5 im Tumor komplementär verhalten (im Sinne eines eng verzahnten oder exakt aufeinander abgestimmten, gegenseitig verstärkenden Effekts), aber sie haben beide wichtige, meist tumorsuppressive Funktionen im Tumormikromilieu – insbesondere durch Modulation der extrazellulären Matrix, der Inflammation und der Tumorprogression. ITIH5 ist ein bekannter Metastasensuppressor und Tumorsuppressor, insbesondere in Brust- und Pankreastumoren.

ITIH5 stabilisiert die extrazelluläre Matrix (ECM), hemmt Zellwanderung, Invasion und Metastasierung, fördert Apoptose und schwächt die Tumorproliferation. Der Funktionsverlust von ITIH5 fördert Tumorprogression und Metastasierung. PTX3 (Pentraxin 3) ist ein multifunktionaler Regulator des angeborenen Immunsystems und der Entzündungsreaktion. PTX3 reguliert Komplementaktivierung, wird von Tumorzellen und tumorassoziierten Makrophagen sezerniert, beeinflusst Immunzellinfiltration und Angiogenese. In vielen Tumorarten zeigt PTX3 ebenfalls tumorsuppressive Eigenschaften, kann aber vom Kontext her auch pro-tumorige Effekte aufweisen – insbesondere über Modulation des Tumormikromilieus und der Immunantwort (**Abbildung 3**).

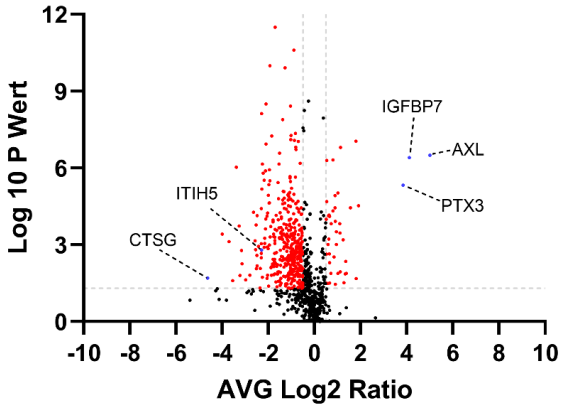

Abbildung 3: Exemplarischer Volcano-Plot aus Zellkulturanalysen.

Die Areitsgruppe von Dr. Bartneck hat auch den Einsatz von mRNA-Technologie untersucht, um für die Tumorpatienten dringend benötigte neue Protein-Replacement-Therapien, zum Beispiel zur Einführung von Tumorsuppressorgenen, zu ermöglichen. Hierfür haben wir unterschiedliche Zelltypen, darunter auch Krebszellen untersucht. Wir haben kürzlich eine neue Studie in dem Journal Advanced Science veröffentlicht. Der Titel der Arbeit ist “Exceptional Uptake, Limited Protein Expression: Liver Macrophages Lost in Translation of Synthetic mRNA.” Adv Sci (Weinh). 2025 Mar;12(9):e2409729. IF 15,1

Im Feld "Funding information" wurde das Projekt MammaExplant genannt.

AP2.1 Tierversuchsantrag: Im April 2024 wurde ein Antrag an den Fördergeber gestellt, die Experimente am Tiermodell von einer externen Firma durchführen (Reaction Biology) zu lassen, welcher vom VDI/VDE im Mai 2024 genehmigt wurde. Durch die Expertise der Firma Reaction Biology im 4T1-Modell konnten die Tiere, die für die Etablierung des Modells an unserem Standort nötig gewesen wären, eingespart werden. Die Gelder für die Durchführung dieses Versuchs wurden aus Personalmitteln bezahlt, die aufgrund des verzögerten Projektstarts 2022 zur Verfügung standen. Der Tierversuch wurde erfolgreich durchgeführt.

AP2.2 ISEr im Tiermodell: Die Firma Syntab hat Dosisfindungsstudien im Tiermodell durchgeführt, welcher der Planung der Versuche der AG Bartneck (Pharmakodynamik-Studie) zugutekamen. Im Folgenden stellen wir einige ausgewählte interessante Kandidaten-Proteine dar. Im Volcanoplot sind diese Proteine dargestellt, die signifikant (Y-Achse) hoch- oder herunterreguliert sind (hierfür entspricht die Position eines einzelnen Punkts auf der X-Achse einem ausgewählten Protein) (**Abbildung 4**). Das Matrix metalloprotein 8 (Mmp8) konnte erfolgreich quantifiziert werden (**Abbildung 5**). Die Mmp8 zeigte, anders als viele andere MMPs, in diversen Studien eine hemmende Wirkung auf das Tumorwachstum und die Metastasierung. In Mausmodellen verringert systemische oder tumoreigene MMP8-Expression die Tumorgröße und behindert die Entstehung und Ausbreitung von Metastasen.

Die MMP ist daher ein potentieller Kandidat für Protein Replacement-Therapien auf der Basis von synthetischer mRNA.

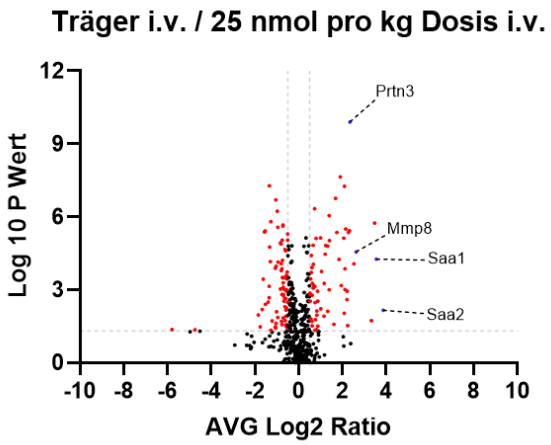

Abbildung 4: Volcanoplot einer ausgewählten Bedingung aus der Phamakodynamikstudie von Synab.

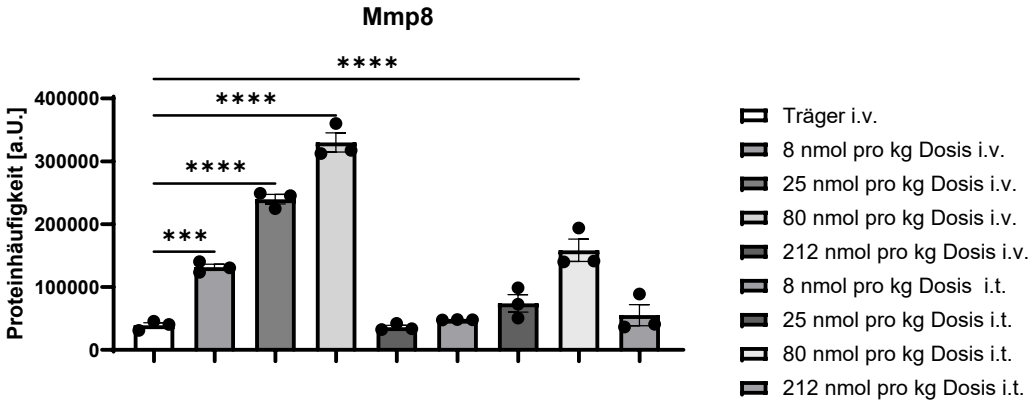

Abbildung 5: Relative Mengen des Proteins Mmp8 aus der Phamakodynamikstudie von Synab.

AP2.3 Transkriptom/Proteomanalytik: Das Ziel der ISER war eine Immunaktivierung und diese konnte anhand der in Kulturmedien freigesetzten Proteine erfolgreich nachgewiesen werden.

AP3.1 Vergleichende Auswertung: Die vergleichende Auswertung der Proteomdaten des Explantats und dem vergleichenden Tierversuch wurde mittlerweile beendet. Es hat sich gezeigt, dass eine Reihe von Biomarkern für die vergleichende Auswertung sehr gut geeignet sind, wie z.B. Matrix Metalloporteinase 8 (MMP8), um Explantat und das Standard-Mausmodell 4T1 zu vergleichen.

AP3.2 Signalweganalyse: Eine Reihe von Proteinen konnte im Mausserum nicht nachgewiesen werden, wurde aber in den Explantaten/Zellkulturen (z.B. Komplementfaktoren und Gerinnungsfaktoren) und umgekehrt sind einige Proteine angereichert in den Zellkulturen (wie z.B. AXL).

AP3.3 3R-Verwertung: Wir haben regelmäßig an anderen digitalen Veranstaltungen des Bundesnetzwerk 3R teilgenommen.

AP4 Koordination: Es finden regelmäßige Projektmeetings zu bisherigen Erfolgen, Kenntnisständen und weiterem Vorgehen vor.

2. **Vergleich des Vorhabenstands mit der ursprünglichen (bzw. mit Zustimmung des ZG geänderten) Arbeits-, Zeit- und Kostenplanung.**

AP1.1 Etablierung Explantat: Wurde wie geplant durch den Verbundpartner Navitect Bio in Zusammenarbeit mit der RWTH zentralisierten Biomaterialbank (RWTH cBMB) durchgeführt.

AP1.2 ISEr im Explantat: Wie geplant von den Partnern Syntab und Navitect durchgeführt.

AP1.3 Transkriptom/Proteomanalytik: Es hat sich gezeigt, dass die Proteomstudien am besten geeignet sind, um die Vorgänge in den Explantaten zu verfolgen. Wurden erfolgreich abgeschlossen.

AP2.1 Tierversuchsantrag: Durch eine Umwidmung von Personalmitteln wurde der geplante Tierversuch an die Firma Reaction Biology extern vergeben und erfolgreich durchgeführt. Tumormaterial und Serumproben wurden erhalten und analysiert.

AP2.2 ISEr im Tiermodell: Da das Experiment extern vergeben wurde, gibt es durch die externe Vergabe des Tierversuchs Abweichungen vom ursprünglichen Plan, welche aber bereits vom VDI/VDE genehmigt wurden.

AP2.3 Transkriptom/Proteomanalytik: Wurde erfolgreich abgeschlossen

AP3.1 Vergleichende Auswertung: Wurde erfolgreich abgeschlossen

AP3.2 Signalweganalyse: Wurde erfolgreich abgeschlossen

AP3.3 3R-Verwertung: Wurde erfolgreich abgeschlossen

AP4 Koordination: Wurde über die gesamte Projektlaufzeit erfolgreich von der Firma Syntab durchgeführt.

Kostenplan:

Aufgrund der notwendigen Rahmenbedingungen, das Projekt am 01.04.2022 bereits zu starten, kam es zu Verzögerungen beim Personaleinsatz. Entscheidender Grund dafür ist, dass eine Ausschreibung der Stelle am Uniklinikum Aachen erst nach Erhalt der Mittelbestätigung möglich ist. Mit Herrn Adrian Kuzmanovic hat zum 15.08.2022 in dem Projekt ein sehr gut geeigneter Mitarbeiter angefangen und sich rasch ins Thema eingearbeitet. Aus diesen Gründen wurden weniger Personalmittel im Berichtsjahr abgerufen als vorgesehen. Durch die externe Vergabe des Tierversuchs wurden die Verzögerungen im Projektstart wie geplant gut ausgeglichen.

Haben sich die Aussichten für die Erreichung der Ziele des Vorhabens innerhalb des angegebenen Berichtszeitraums gegenüber dem ursprünglichen Antrag geändert (Begründung)?

Nein, die Ziele wurden im Berichtszeitraum erreicht.

3. **Sind inzwischen von dritter Seite FE-Ergebnisse bekannt geworden, die für die Durchführung des Vorhabens relevant sind?**

Uns sind keine bekannt.

4. **Sind oder werden Änderungen in der Zielsetzung notwendig?**

Nein.

5. **Jährliche Fortschreibung des Verwertungsplans. Diese soll, soweit im Einzelfall zutreffend, Angaben zu folgenden Punkten enthalten (Geschäftsgeheimnisse des ZE brauchen nicht offenbart zu werden):**
   a. **Erfindungen/Schutzrechtsanmeldungen und erteilte Schutzrechte, die vom ZE oder von am Vorhaben Beteiligten gemacht oder in Anspruch genommen wurden, sowie deren standortbezogene Verwertung (Lizenzen u. a.) und erkennbare weitere Verwertungsmöglichkeiten.**
   b. **Wirtschaftliche Erfolgsaussichten nach Projektende (mit Zeithorizont) - z. B. auch funktionale / wirtschaftliche Vorteile gegenüber Konkurrenzlösungen, Nutzen für verschiedene Anwendergruppen/-Industrien am Standort Deutschland, Umsetzungs- und Transferstrategien (Angaben, soweit die Art des Vorhabens dies zulässt).**

Siehe bitte die Ausführungen des Partners Syntab.

   c. **Wissenschaftliche und/oder technische Erfolgsaussichten nach Projektende (mit Zeithorizont) - u. a. wie die geplanten Ergebnisse in anderer Weise (z. B. für öffentliche Aufgaben, Datenbanken, Netzwerke, Transferstellen etc.) genutzt werden können. Dabei ist auch eine etwaige Zusammenarbeit mit anderen Einrichtungen, Firmen, Netzwerken, Forschungsstellen u. a. einzubeziehen.**
      Siehe bitte die Ausführungen des Partners Syntab.

   d. **Wissenschaftliche und wirtschaftliche Anschlussfähigkeit für eine mögliche notwendige nächste Phase bzw. die nächsten innovatorischen Schritte zur erfolgreichen Umsetzung der FE-Ergebnisse.**

Siehe bitte die Ausführungen des Partners Syntab.

Bezugnahme auf die wichtigsten Positionen des zahlenmäßigen Nachweises:
Die wichtigsten Positionen des zahlenmäßigen Nachweises sind die Personalkosten und die Sachkosten.
Die Personalkosten kosten nach dem Projektstart zunächst mit leichter Verzögerung abgerufen werden und wurden eingesetzt, um Mitarbeiter wie Adrian Kuzmanovic (Doktorand) und Wiktoria Rajek (Biotechnologie-Masterstudentin) in das Projekt einzubinden. Die Mitarbeiter haben das Projekt kontinuierlich unterstützt und erfolgreich vorangebracht. Hierbei ist auch zu beachten, dass den Mitarbeitern aufgrund der dynamischen Verfügbarkeit des Probenmaterials viel Flexibilität abverlangt wurde.
Ein Teil der Personalkosten wurde im Jahr 2024 umgewidmet, um den an die deutsche Firma Reaction Biology ausgelagerten Tierversuch zu finanzieren.
Die Verbrauchsmittel wurden sparsam eingesetzt, um die entsprechende molekulare Analytik des Projekts wie geplant durchzuführen. Die Proteomuntersuchungen wurden wie ursprünglich geplant, extern von der Kooperationspartnerin Dr. Justina Clarinda Wolters durchgeführt.

Notwendigkeit und Angemessenheit der geleisteten Projektarbeiten
Die Projektarbeiten waren im Einzelnen notwendig und angemessen. Prof. Edgar Dahl hat auf den anfänglichen Probenmaterial-Mangel reagiert, indem er eine weitere Kooperation mit dem Luisenhospital in Aachen eingegangen ist. Die Probenvorbereitungen und Analytik verursachten Kosten waren angemessen und konnten durch andere Partner nicht besser oder kostengünstiger durchgeführt werden.