Gefördert durch:

Bundesministerium
für Forschung, Technologie
und Raumfahrt

Zuwendungsempfänger

Universitätsmedizin Greifswald

Institut für Humangenetik

Fleischmannstraße 43

17475 Greifswald

Titel der Förderung

CCM RESEARCH 2.0 – Verbindung von vaskulären Organoidkulturen, Live-Cell-Imaging und Single-Cell-Genomics als Ersatz für Tiermodelle der Kavernomatose

Verantwortliche Autor*innen

Prof. Dr. med. Matthias Rath (Projektleitung bis 31.03.2024)

Prof. Dr. med. Ute Felbor (Projektleitung ab 01.04.2024)

Dr. rer. nat. Dariush Skowronek

Förderkennzeichen

031L0276

(Laufzeit: 01.06.2021 bis 30.11.2024)

Das diesem Bericht zugrundeliegende Vorhaben wurde mit Mitteln des Bundesministeriums für Forschung, Technologie und Raumfahrt unter dem Förderkennzeichen 031L0276 gefördert.

Die Verantwortung für den Inhalt dieser Veröffentlichung liegt bei den Autor*innen.

INHALTSVERZEICHNIS

1 TEIL I: KURZBERICHT 3

2 TEIL II: AUSFÜHRLICHE DARSTELLUNG 5

2.1 Darstellung der durchgeführten Arbeiten 5

2.1.1 Generierung von *CCM1*$^{-/-}$, *CCM2*$^{-/-}$ und *CCM3*$^{-/-}$ iPSC-Linien 5

2.1.2 Weitgehend xenofreie und gut skalierbare Differenzierung vaskulärer Organoide 7

2.1.3 ScRNA-Analysen von *CCM1*$^{-/-}$, *CCM2*$^{-/-}$ und *CCM3*$^{-/-}$ Organoiden 9

2.1.4 Charakterisierung von *CCM1*$^{-/-}$, *CCM2*$^{-/-}$ und *CCM3*$^{-/-}$ Organoiden 12

2.1.5 Untersuchungen in Mosaikorganoiden 12

2.1.6 In vitro-Perfusion vaskulärer Organoide 14

2.1.7 Ergebnisdissemination 15

2.2 Wichtigste Positionen des zahlenmäßigen Nachweises 15

2.3 Notwendigkeit und Angemessenheit der geleisteten Projektarbeiten 15

2.4 Voraussichtlicher Nutzen / Verwertbarkeit der Ergebnisse 17

2.5 Während der Durchführung des Vorhabens bekannt gewordener Fortschritt auf dem Gebiet des Vorhabens bei anderen Stellen 18

2.6 Erfolgte und geplante Veröffentlichungen der Ergebnisse 19

3 REFERENZVERZEICHNIS 20

1 Teil I: Kurzbericht

Die CCM-Erkrankung (zerebrale kavernöse Malformationen) ist ein gutes Beispiel für die klinisch und genetisch heterogene Gruppe erblicher Gefäßfehlbildungen, von denen insgesamt allein in Deutschland zehntausende Patient*innen betroffen sind. Ziel des Projekts „CCM RESEARCH 2.0“ war die Entwicklung eines organoidbasierten und in vitro perfundierbaren Zellkulturmodells, das sich für Hochdurchsatztestungen eignet und zugleich dem 3R-Prinzip (Replacement, Reduction, Refinement) entspricht. Langfristig sollte das Modell auch auf andere erbliche Gefäßfehlbildungen übertragbar sein.

Zur Erforschung der molekularen Grundlagen der CCM-Erkrankung wurden bereits verschiedene Mausmodelle etabliert [1]. Durch CRISPR/Cas9-Genomeditierungen konnten auch in Zellkultur neue Einblicke in die komplexen Krankheitsmechanismen gewonnen werden [2]. Dennoch steht ein Durchbruch in der Entwicklung wirksamer Therapien bislang aus. Einen wichtigen Fortschritt für die Forschung zu Gefäßerkrankungen brachte 2019 die von Wimmer und Kolleg*innen etablierte Differenzierung vaskulärer Organoide aus humanen induzierten pluripotenten Stammzellen (iPSCs). Erstmals konnte damit die Interaktion von Endothelzellen, Perizyten und der extrazellulären Matrix in einem komplexen Zellkulturmodell untersucht werden [3]. Allerdings blieb die Methode in ihrer Skalierbarkeit begrenzt, da die Differenzierung zeit- und arbeitsintensiv war. Auch war eine funktionelle Perfusion nur nach Transplantation in immundefiziente Mäuse möglich.

Aufbauend auf dem aktuellen Stand der Wissenschaft wurden im Rahmen von CCM RESEARCH 2.0 mithilfe des CRISPR/Cas9-Systems zunächst iPSC-Linien mit einer biallelischen Inaktivierung von jeweils einem der drei bekannten CCM-Gene generiert (*CCM1*$^{-/-}$, *CCM2*$^{-/-}$, *CCM3*$^{-/-}$ iPSCs). Als Ausgangszellen dienten fluoreszenzmarkierte iPSCs aus der Zellbank des Allen Institute for Cell Science [4]. Nach umfangreichen Qualitätskontrollen (u.a. Nachweis der Expression klassischer Stammzellmarker, Zellauthentifizierung, Karyotypisierung) stehen nun pro Gen jeweils mehrere Knockout-iPSC-Linien zur Verfügung, die auch über das Projekt hinaus zur Aufklärung genspezifischer Unterschiede in Schwere und Verlauf der CCM-Erkrankung beitragen können.

Im zweiten Schritt wurde in CCM RESEARCH 2.0 ein Protokoll zur Differenzierung vaskulärer Organoide etabliert, das durch den Einsatz spezieller Zellkulturplatten im 96-Well-Format durchgeführt werden kann und zudem vollständig auf tierisches Serum und Kollagen verzichtet. Wie gut sich gezielte Genomeditierungen in fluoreszenzmarkierten iPSCs und deren gut skalierbare und weitgehend xenofreie Differenzierung zu vaskulären Organoiden ergänzen, wurde im CCM-Kontext sehr deutlich. So zeigten Einzelzell-RNA-Sequenzierungen von *CCM1*$^{-/-}$, *CCM2*$^{-/-}$ und *CCM3*$^{-/-}$ vaskulären Organoiden einerseits eine signifikante Überlappung differentiell exprimierter Gene in Fibroblasten, andererseits aber auch genspezifische Expressionsmuster in neuronalen, mesenchymalen und endothelialen Zellen. Solche vergleichenden Analysen innerhalb eines einheitlichen Modells liefern wertvolle Hinweise darauf, warum beispielsweise pathogene

Varianten im *CCM3*-Gen häufiger zu einem aggressiveren klinischen Verlauf führen als *CCM1*- oder *CCM2*-Varianten.

Für die Testung neuer Wirkstoffe ist neben einem guten Verständnis der Krankheitsentstehung auch die Etablierung einfach auswertbarer und trotzdem aussagekräftiger Read-out-Strategien von zentraler Bedeutung. Nur so lassen sich potenzielle Therapieeffekte zuverlässig und schnell bewerten. Auf der Suche nach geeigneten Parametern wurden in CCM RESEARCH 2.0 auf zellulärer Ebene verschiedene Konsequenzen der Inaktivierung der CCM-Gene untersucht. Bereits unter 2D-Zellkulturbedingungen zeigte sich in *CCM1*$^{-/-}$, *CCM2*$^{-/-}$ und *CCM3*$^{-/-}$ Endothelzellen eine starke Reorganisation des Aktin-Zytoskeletts mit Bildung prominenter Stressfasern. In dreidimensionalen vaskulären Netzwerken konnten zudem Störungen der Interaktion von Endothelzellen und Perizyten sowie von endothelialen Zell-Kontakten (tight and adherens junctions) nachgewiesen werden. Besonders eindrücklich und zugleich unkompliziert darstellbar war jedoch eine stark gesteigerte Proliferation von *CCM1*$^{-/-}$ und *CCM3*$^{-/-}$ Zellen in Mosaikorganoiden, die aus einem Gemisch von Knockout- und Wildtyp-iPSCs differenziert wurden. Durch die unterschiedlichen Fluoreszenzmarkierungen der Zellen (mEGFP und mTagRFP-T) konnte dieser Effekt ohne zusätzliche Färbungen nachgewiesen und mittels High Content Imaging gut quantifiziert werden. Vor dem Hintergrund, dass ein ähnliches Verhalten auch in CCM-Mausmodellen beobachtet wurde und in der Krankheitsentstehung eine wesentliche Rolle spielt [5,6], kann das in CCM RESEARCH 2.0 entwickelte Modell zukünftig zur Vermeidung von Tierversuchen beitragen und die Wirkstoffsuche beschleunigen. Im letzten Teil der CCM RESEARCH 2.0-Förderung wurde auch die angestrebte Perfundierbarkeit realisiert. Dafür wurden neben dem Chorioallantoismembran (CAM)-Modell auch spezielle OrganoPlate Graft-Platten der Firma Mimetas genutzt. Die Möglichkeit, auf Transplantationen in immundefiziente Mäuse zu verzichten, entspricht nicht nur dem 3R-Gedanken, sondern ist auch aus Gründen der Praktikabilität ein großer Vorteil, der die Nutzung des Modells in der biomedizinischen Forschung fördern wird.

Neben den inhaltlichen Erfolgen des Projekts wurden auch wissenschaftliche Kooperationen mit den Instituten für Humangenetik des Universitätsklinikums Jena (Karyotypisierungen) und des Uniklinikums Erlangen (Einzelzell-RNA-Sequenzierungen), dem Institut für Anatomie der Universität Regensburg (Organoid-Perfusion im CAM-Modell) und dem Institut für Molekulare Biotechnologie der Österreichischen Akademie der Wissenschaften (Organoiddifferenzierung) auf- bzw. ausgebaut.

Zusammenfassend wurden die Projektziele von CCM RESEARCH 2.0 erreicht und ein gut skalierbares, in vitro perfundierbares und klinisch relevantes Organoidmodell etabliert, das nicht nur für die CCM-Forschung, sondern auch für die Untersuchung anderer Gefäßerkrankungen und grundlegender Fragestellungen der Angiogenese nutzbar ist.

2 Teil II: Ausführliche Darstellung

2.1 Ausgangssituation des Projekts

Zerebrale kavernöse Malformationen und andere erbliche Gefäßerkrankungen sind für Betroffene ein wesentlicher Risikofaktor für eine deutlich erhöhte Morbidität. Blutungen führen bei Kavernom-patient*innen nicht selten zu Krampf- und Schlaganfällen mit Lähmungserscheinungen, Gefühls- und Sprachstörungen [7]. Die familiäre Form wird auf Loss-of-Function Varianten in einem der drei Gene *CCM1*, *CCM2* oder *CCM3* zurückgeführt, welche autosomal-dominant vererbt werden. Hochrangig publizierte Studien zur CCM-Pathogenese basierten in den letzten Jahren vorwiegend auf Mausmodellen. Jedoch ist bekannt, dass CCM-Mausmodelle das klinische Bild der familiären Kavernomatose nur eingeschränkt abbilden und zum Teil sehr unterschiedlich stark ausgeprägte Phänotypen ausbilden [1]. In Kenntnis der methodischen Limitationen von Mausmodellen und dem Prinzip der Vermeidung, Verminderung und Verbesserung von Tierversuchen folgend kommt daher der Entwicklung neuer und klinisch relevanter humaner *in vitro*-Modelle der Kavernomatose eine große Bedeutung zu. In der Vergangenheit konnte in Zellkulturmodellen die *in vivo*-Situation mit einer langfristigen und vollständigen Inaktivierung der CCM1-, CCM2- bzw. CCM3-Expression durch Nutzung der weitverbreiteten RNA-Interferenztechnik (siRNA oder shRNA) nur unzureichend nachgebildet werden. In der Arbeitsgruppe der Projektkoordinatoren wurde daher erfolgreich ein Ansatz der Virus- und Plasmid-freien CRISPR/Cas9-Genomeditierung in Endothelzellen etabliert [2,8]. In den anspruchsvollen Zellkulturmodellen konnte bereits ein klonaler Überlebensvorteil, eine fehlgesteuerte Bildung extrazellulärer Matrixkomponenten sowie eine gestörte Organisation CCM1-, CCM2- bzw. CCM3-defizienter Endothelzellen zu Sphäroiden aufgedeckt werden [2,9]. Den Weg der Greifswalder Arbeitsgruppe konsequent weiterverfolgend war im Rahmen der Förderung die Verbindung von dreidimensionalen *in vitro*-Gefäß-Organoid-Modellen, gezielten CRISPR/Cas9-Genomeditierungen und Einzelzell-RNA-Sequenzierungen geplant, um erstmals ein humanes 3D-Organoid-Modell der CCM-Pathogenese zu etablieren. Diese innovativen *in vitro*-Methoden ermöglichen ohne Einsatz von Versuchstieren Einblicke in die CCM-Pathogenese und die systematische Überprüfung der Wirksamkeit neuer Therapieansätze in Hochdurchsatz-testungen.

2.2 Darstellung der durchgeführten Arbeiten

2.2.1 Generierung von *CCM1*$^{-/-}$, *CCM2*$^{-/-}$ und *CCM3*$^{-/-}$ iPSC-Linien

Über das Coriell Institute for Medical Research (Camden, NJ, USA) wurden planmäßig zunächst fluoreszenzmarkierte iPSC-Linien (AICS-0054, AICS-0036, AICS-0016, AICS-0058) aus der Zellbank des Allen Institute for Cell Science (Seattle, WA, USA) beschafft. Mittels Immunfluoreszenzanalysen wurde die Expression pluripotenzassoziierter Marker (TRA-1-60, SOX2, OCT4, SSEA-4) in den expandierten Zellklonen validiert. Zudem wurden bereits vorliegende Sequenzdaten der iPSC-Klone ausgewertet, um pathogene Varianten in krankheitsrelevanten

Genen auszuschließen. Anschließend wurden Aliquots der expandierten Klone kryokonserviert. Die parallele Beschaffung der parentalen iPSC-Linie GM25256 gestaltete sich aufgrund des Versandmediums mit fötalem Kälberserum als problematisch. Die zollrechtliche Abwicklung sowie die obligatorische veterinärmedizinische Begutachtung der importierten Zellen führten zu einer erheblichen Verlängerung der Transportdauer und einer signifikanten Beeinträchtigung der Zellviabilität. Infolgedessen wurde im weiteren Projektverlauf ausschließlich mit den validierten fluoreszenzmarkierten iPSC-Linien gearbeitet. Die Arbeiten zu Arbeitspaket 1 wurden planmäßig im dritten Quartal 2021 abgeschlossen.

Mittels CRISPR/Cas9-vermittelten Genomeditierungen in AICS-0036, AICS-0016 und AICS-0058 iPSCs wurden im zweiten Arbeitspaket *CCM1*$^{-/-}$, *CCM2*$^{-/-}$ und *CCM3*$^{-/-}$ iPSC-Klone generiert (Tab. 1).

Tabelle 1: Generierte *CCM1*$^{-/-}$, *CCM2*$^{-/-}$ und *CCM3*$^{-/-}$ iPSC-Klone.

Zelllinie	Genotyp	Klon	Zygotie	Varianten
AICS-0036	*CCM1*$^{-/-}$	K44	compound-heterozygot	c.[747_771del];[759_765del]
		K47	homozygot	c.[759del];[759del]
	CCM2$^{-/-}$	K62	homozygot	c.[227_231del];[227_231del]
		K40	compound-heterozygot	c.[205-10_229del];[228_229del]
	CCM3$^{-/-}$	K13	compound-heterozygot	c.[88_94del];[90dup]
		K21	homozygot	c.[90_91ins];[90_91ins] (226 bp Insertion)
AICS-0016	*CCM1*$^{-/-}$	K38	compound-heterozygot	c.[758_771del];[759del]
		K56	homozygot	c.[759del];[759del]
	CCM2$^{-/-}$	K40	compound-heterozygot	c.[224_229delinsT];[227dup]
		K41	compound-heterozygot	c.[227_228del];[227_231del]
	CCM3$^{-/-}$	K29	compound-heterozygot	c.[90del];[90dup]
		K105	compound-heterozygot	c.[89_96+2del];[90dup]
AICS-0058	*CCM1*$^{-/-}$	K50	homozygot	c.[756del];[756del]
		K21	compound-heterozygot	c.[750_765];[752_770del]
	CCM2$^{-/-}$	K23	homozygot	c.[227_231del];[227_231del]
		K46	compound-heterozygot	c.[227del];[227dup]
	CCM3$^{-/-}$	K22	compound-heterozygot	c.[87_88del];[89_96+2del]
		K58	compound-heterozygot	c.[88_94del];[90dup]

Die eingebrachten Veränderungen im *CCM1*-, *CCM2*- bzw. *CCM3*-Gen wurden mittels Sanger- und Hochdurchsatzsequenzierung bestimmt. Die expandierten Knockout-Klone zeigten ein normales Wachstumsverhalten, eine typische iPSC-Morphologie und eine reguläre Expression pluripotenz-assoziierter Marker (Abb. 1).

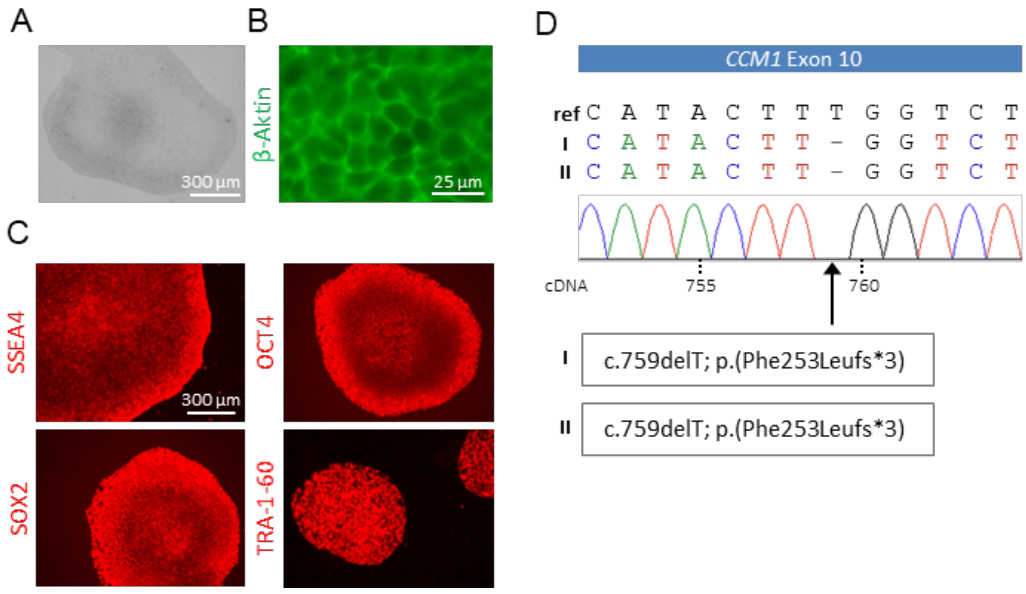

Abbildung 1: Exemplarische Qualitätskontrolle für einen *CCM1*$^{-/-}$ AICS-0016 Klon. Gezeigt sind eine normale iPSC-Morphologie **(A)**, die endogene Fluoreszenzmarkierung des Aktin-Zytoskeletts **(B)**, die Expression der pluripotenz-assoziierten Marker SSEA-4, SOX2, OCT4 und TRA-1-60 **(C)** sowie die Ergebnisse der Genotypisierung **(D)**.

In Zusammenarbeit mit dem Institut für Humangenetik des Universitätsklinikums Jena durchgeführte Karyotypisierungen der generierten iPSC-Klone zeigten erfreulicherweise nur in zwei der 24 untersuchten Zelllinien chromosomale Auffälligkeiten. Diese beiden Zelllinien wurden nicht für die weiteren Analysen verwendet. Für alle anderen Zelllinien wurde ein unauffälliger Karyotyp dokumentiert. Der Großteil der Arbeiten zu Arbeitspaket 2 wurde planmäßig im ersten Quartal 2022 abgeschlossen. Einzig die durch nicht beeinflussbare Lieferverzögerungen von Plastikmaterialien und Matrigel verzögerten Karyotypisierungen wurden erst im zweiten Quartal 2022 abgeschlossen.

2.2.2 Weitgehend xenofreie und gut skalierbare Differenzierung vaskulärer Organoide

In den Arbeitspaketen 3 und 5 wurde mit der Etablierung eines weitgehend xenofreien und gleichzeitig hochdurchsatzkompatiblen Protokolls der Differenzierung vaskulärer Organoide aus iPSCs bereits ein wesentliches Projektziel realisiert. Hierfür wurde in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe um Prof. Josef Penninger an der University of British Columbia (Vancouver, Kanada) und dem Institut für Molekulare Biotechnologie der Österreichischen Akademie der Wissenschaften (Wien, Österreich) zunächst das von ihm und seinen Kolleg*innen etablierte Differenzierungs-protokoll für vaskuläre Organoide [10,3] im Greifswalder Labor implementiert. Auch wenn durch die Einschränkungen in der Corona-Pandemie der geplante Forschungsaufenthalt in Kanada nicht realisiert werden konnte, gelang die Implementierung des Protokolls durch den konstruktiven Austausch in virtuellen Meetings problemlos. Die Kooperation führte zu einer gemeinsamen Publikation in *Cellular And Molecular Life Sciences* [11], in der unter Vermeidung von Tierversuchs-experimenten bereits neue Einblicke in die CCM-Pathogenese ermöglicht wurden.

Um die Substitution von fötalem Kälberserum, Rinderkollagen und Matrigel durch xenofreie Ersatzstoffe effizienter austesten zu können, wurden die Arbeiten zur Realisierung einer besseren Skalierbarkeit der Organoiddifferenzierung aus Arbeitspaket 5 zum Teil vorgezogen. Durch

Nutzung von speziellen Zellkulturplatten (PrimeSurface 96 Slit-Well-Platten und Akura 96 Spheroid-Platten) ist es gelungen, ein sehr gut skalierbares Differenzierungsprotokoll zu etablieren (Abb. 2). Dieses kommt ohne den besonders arbeitsintensiven Schritt des Ausschneidens vaskulärer Netzwerke aus der Matrigel-Kollagen-I-Matrix aus und erlaubt durch die Möglichkeit einer genaueren Einstellung der Größe der iPSC-Aggregate gleichzeitig eine hohe Vergleichbarkeit zwischen den Organoiden. Die Robustheit des neuen Verfahrens wurde in mehreren Wiederholungsläufen nachgewiesen. Die vorgezogenen Etablierungsarbeiten aus Arbeitspaket 5 wurden bereits im zweiten Quartal 2022 abgeschlossen. Das neue Verfahren ist mit Liquid Handling-Systemen kombinierbar und könnte damit zukünftig auch in High-Throughput Screening (HTS)-Ansätzen genutzt werden.

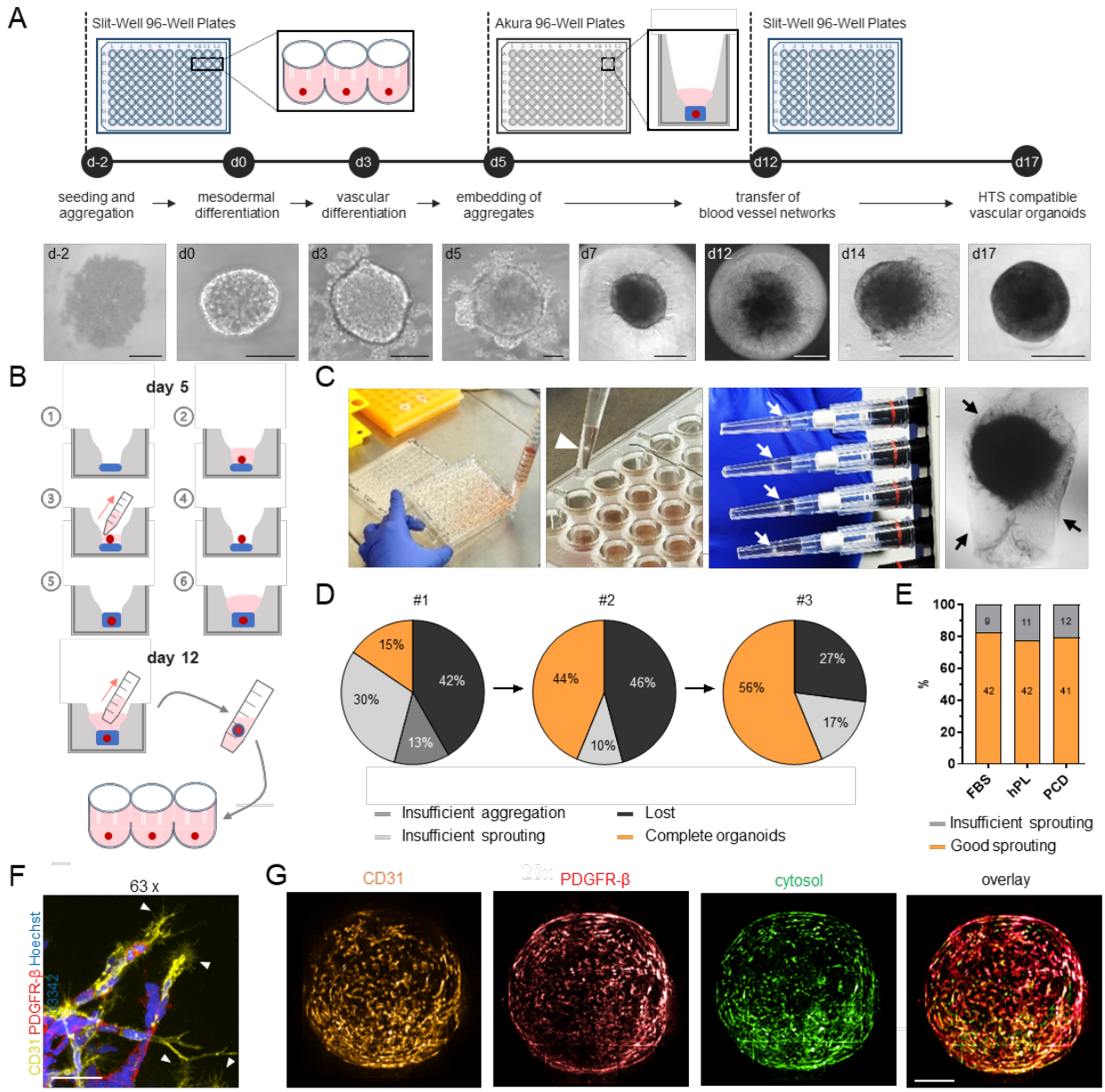

Abbildung 2: Gut skalierbare und nahezu xenofreie Herstellung von Gefäßnetzwerken und vaskulären Organoiden aus fluoreszenzmarkierten iPSCs. **(A)** Schematische Darstellung des neuen Differenzierungsprotokolls sowie repräsentative Bilder der wichtigsten Differenzierungsschritte (Maßstabsbalken: Tag -2, 0, 3, 5 = 100 µm; Tag 8, 12 = 250 µm; Tag 14,

17 = 500 µm). **(B)** Darstellung der Einbettung der vaskulären Aggregate in eine Akura 96-Well-Platte sowie der Übertragung der vaskulären Netzwerke auf eine PrimeSurface 96 Slit-Well-Platte. **(C)** Die Verwendung von PrimeSurface 96 Slit-Well-Platten verkürzt die Zeit für den Mediumwechsel (linkes Bild). Akura 96-Well-Platten ermöglichen die Einbettung der Aggregate in kleine Vertiefungen, wodurch die Menge an Matrixmaterial um die Gefäßnetzwerke minimiert wird (schwarze Pfeile). Dies erlaubt die direkte Übertragung der Netzwerke (weiße Pfeile) auf neue Platten, ohne dass eine zeitaufwendige manuelle Extraktion aus dem Gel nötig ist (mittleres und rechtes Bild). **(D)** Das neue Protokoll ist einfach in der Handhabung und erreicht nach minimalem Training eine hohe Effizienz. Gezeigt werden die Erfolgsraten aus drei Trainingsdurchläufen. **(E)** Die Sprossungseffizienz bleibt erhalten, wenn fetales Kälberserum (FBS) durch humanes Thrombozytenlysat (hPL) oder ein chemisch definiertes Medium (Panexin CD, PCD) ersetzt wird. Die Anzahl der ausreichend gesprossten Netzwerke und der Aggregate mit unzureichender Sprossung ist innerhalb der Balken angegeben. **(F, G)** Aus iPSCs differenzierte Gefäßnetzwerke **(F)** und vaskuläre Organoide **(G)** bestehen aus komplexen Netzwerken von Endothelzellen (CD31) und assoziierten Perizyten (PDGFR-β) (repräsentative Bilder; Maßstabsbalken: 50 µm (F); 200 µm (G)). Weiße Pfeilspitzen markieren angiogene Sprossungen. Adaptiert nach: Skowronek et al., bioRxiv 2024.12.04.626588, Copyright: CC-BY 4.0 International license, Referenz [12].

Mit dem neuen Verfahren wurden in Arbeitspaket 3 u.a. humanes Plättchenlysat und Panexin CD (Serum Replacement with Defined Components; PAN-Biotech GmbH, Aidenbach, Deutschland) als Ersatzstoffe für fötales Kälberserum getestet. Mit beiden Ersatzstoffen konnten reproduzierbar und effizient vaskuläre Netzwerke und vollständige Organoide aus iPSCs generiert werden. Im weiteren Projektverlauf wurde sich für die Verwendung des vollsynthetischen Austauschstoffs Panexin CD entschieden. Auch der Austausch des Rinderkollagens durch ein humanes Kollagen I-Präparat (VitroCol; Advanced BioMatrix, Carlsbad, CA, USA) gelang problemlos. Mit Panexin CD und humanem Kollagen I konnten zuverlässig vaskuläre Netzwerke und Organoide differenziert werden (Abb. 2). Die Robustheit des neuen Protokolls wurde in mehreren Wiederholungsläufen bestätigt. Einzig der Einsatz des aus dem Engelbreth-Holm-Swarm (EHS)-Maussarkom gewonnenen Basalmembranextrakts Matrigel ließ sich zwar reduzieren, jedoch nicht vollständig vermeiden. Im Ergebnis steht damit jetzt nicht nur ein gut skalierbares, sondern auch weitgehend xenofreies Verfahren zur Differenzierung vaskulärer Organoide aus iPSCs zur Verfügung, dass nicht nur in der CCM-Forschung, sondern auch in anderen Bereichen der biomedizinischen Forschung einen wichtigen Beitrag zum wissenschaftlichen Fortschritt leisten kann. Die Arbeiten in Arbeitspaket 3 wurden aufgrund der Priorisierung von Arbeitspaket 5 sowie einer nicht vorhergesehenen Vakanz einer der beiden Doktorandenstellen erst im ersten Quartal 2023 abgeschlossen. Der projektentscheidende Meilenstein wurde dennoch planmäßig erreicht. Die Ergebnisse wurden Ende 2024 in einem Preprint veröffentlicht [12].

2.2.3 ScRNA-Analysen von *CCM1*$^{-/-}$, *CCM2*$^{-/-}$ und *CCM3*$^{-/-}$ Organoiden

Um mithilfe des neuen Verfahrens mehr über die Entstehung zerebraler kavernöser Malformationen (CCM) zu lernen, wurden in Arbeitspaket 4 aus *CCM1*$^{-/-}$, *CCM2*$^{-/-}$ und *CCM3*$^{-/-}$ iPSCs vaskuläre Organoide differenziert und für Einzelzell-RNA-Sequenzierungen (single-cell RNA sequencing / scRNA-seq) vorbereitet. Für alle Konditionen konnten ausreichend Organoide generiert werden. Die vorbereitenden Differenzierungen in Arbeitspaket 4 wurden planmäßig im dritten Quartal 2022 abgeschlossen. Die weitere Probenvorbereitung, Sequenzierung und initiale Datenauswertung in Arbeitspaket 10 wurden wie geplant im Rahmen einer wissenschaftlichen

Kooperation im humangenetischen Institut des Universitätsklinikums Erlangen durchgeführt und im ersten Quartal 2023 abgeschlossen. Die wieder in Greifswald durchgeführte wissenschaftliche Interpretation der scRNA-seq-Analysen gestaltete sich jedoch deutlich komplexer als initial gedacht und zog sich letztlich bis ins zweite Quartal 2024.

Die Ergebnisse der scRNA-seq-Analysen waren jedoch sehr aufschlussreich und stellten für die Etablierung des neuen CCM-Modells eine unerlässliche Grundlage dar. Nach Datenintegration und unüberwachtem Clustering konnten 11 Zellcluster mit spezifischen Genexpressionssignaturen identifiziert werden (Abb. 3). Unter den identifizierten Zelltypen fanden sich u.a. Endothelzellen (c1, c9), perivaskuläre bzw. Stromazellen (c3, c5, c6, c10), neuronale und Glia-ähnliche Zellen (c7, c8, c11) sowie nicht näher zu spezifizierende proliferierende Zellen (c4). Die Inaktivierung der CCM-Gene führte zu deutlichen Veränderungen in der zellulären Zusammensetzung. So zeigten CCM1 Knockout (KO)-Organoide eine Überrepräsentation in den Clustern c3, c9 und c10. CCM2 KO-Organoide hatten einen auffällig hohen Zellanteil in Cluster c5. CCM3 KO-Organoide zeigten insgesamt weniger deutliche Verschiebungen. Jedoch war für diese Kondition auffällig, dass die Cluster c6 und c7 im Unterschied zur Situation in CCM1 KO- und CCM2-KO Organoiden ein Wildtyp-ähnliches Verteilungsmuster zeigten.

Auf Ebene der Genexpression zeigten sich ebenfalls überlappende und genotypspezifische Veränderungen. Die höchste Zahl differentiell exprimierter Gene (DEGs) sowie die größte Überschneidung zwischen allen drei KO-Genotypen zeigte sich in Cluster c10. In anderen Clustern traten genotypspezifische DEG-Profile auf. Besonders ausgeprägte Genexpressionsunterschiede fanden sich in neuronalen Zellen (Cluster c8) der CCM1 KO-Organoide, in mesenchymalen Zellen (Cluster c3) der CCM2 KO-Organoide und in Endothelzellen (Cluster c9) der CCM3 KO-Organoide. In Cluster c9 wurden bspw. in CCM3 KO-Organoiden 193 DEGs detektiert. In CCM1 KO- und CCM2 KO-Organoiden waren es dagegen nur 41 bzw. 96. Unter den deregulierten Genen fanden sich mit *KLF2*, *KLF4*, *THBD* und *RHOA* Gene, deren Rolle in der CCM-Pathogenese gut bekannt ist. Diese Ergebnisse liefern eine molekulare Validierung unseres Modells und unterstreichen dessen Relevanz im Lichte bereits bestehender Erkenntnisse. Darüber hinaus konnten durch unsere Analysen im Endothelzellcluster c9 neue Gene identifiziert werden, die bisher nicht oder nur wenig mit der Entstehung von zerebralen kavernösen Malformationen (CCM) in Verbindung gebracht wurden. Diese Gene zeigten eine Deregulierung für alle drei untersuchten KO-Genotypen. Dazu gehörten *ESM1*, *COL3A1*, *VEGFC*, *NRP2*, *AKAP12*, *S100A4*, *IGFBP5* und *HYAL2,* die hauptsächlich mit angiogenetischen Prozessen assoziiert sind. So führte z.B. der Knockout des endothelialen Tip-Zellmarkergens *Esm1* bei Mäusen zu einer verzögerten Gefäßneubildung, verminderter Filopodienbildung und reduzierter VEGF-induzierter Permeabilität [13]. Eine verstärkte VEGF-C/VEGFR3- oder NRP2-Signaltransduktion wurde sowohl bei lymphatischen Fehlbildungen im Zusammenhang mit einer onkogenen *PIK3CA*-Mutation [14] als auch nach *Ccm3*-Silencing [15] beobachtet. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass IGFBP-5 eine anti-angiogenetische Wirkung auf humane Endothelzellen (HUVECs) hat [16] und dass ein Mangel an

AKAP12 die VEGF-induzierte Migration und Sprossung von Endothelzellen in humanen Zellen und in Mausmodellen beeinträchtigt [17]. Die Deregulierung von zwei Markern der endothelial-mesenchymalen Transition (EndMT), *COL3A1* und *S100A4*, unterstützt die zentrale Rolle dieses Prozesses in der Läsionsentstehung.

Neben genotypübergreifenden Effekten konnten mithilfe des im Rahmen der Förderperiode entwickelten vaskulären CCM-Organoid-Modells, wie in Abbildung 3 gezeigt, auch eine Reihe von genotypspezifischen Effekten identifiziert werden, die neue Ansatzpunkte zur Erklärung der Unterschiede in der Krankheitsausprägung bei Patient*innen mit pathogenen Varianten in den *CCM*-Genen liefern könnten.

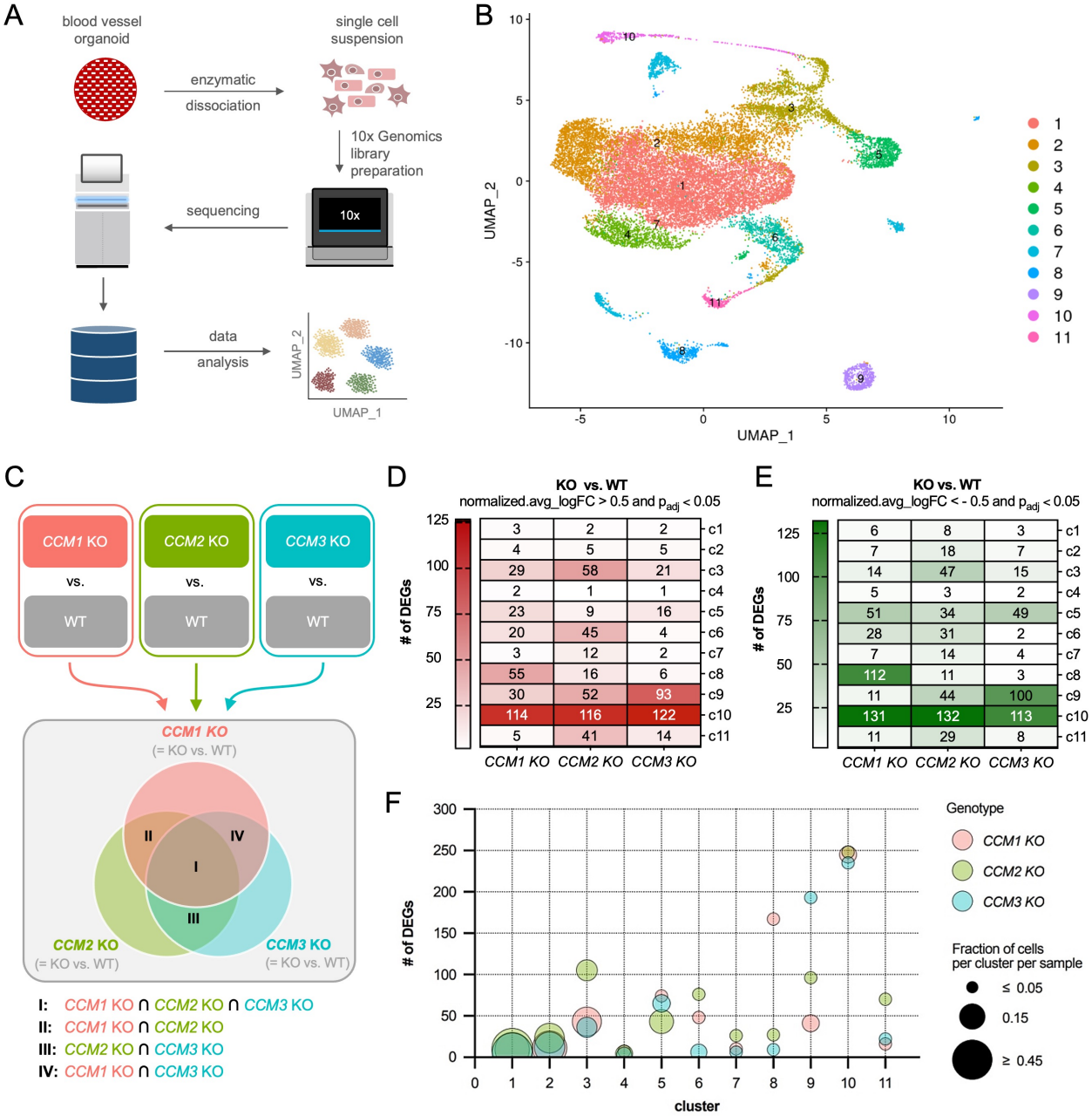

Abbildung 3: Überlappende und genotypspezifische Unterschiede in der Genexpression von vaskulären Knockout-Organoiden. **(A)** Experimentelles Design der Einzelzell-RNA-Sequenzierung (scRNA-seq) für KO- und WT-Organoide. **(B)** Darstellung der scRNA-seq-Daten mittels Uniform Manifold Approximation and Projection (UMAP), wobei die Zellen

entsprechend der unüberwachten Clusteranalyse eingefärbt sind. **(C)** Schema der Analyse-Strategie und der ausgewählten Vergleichsgruppen. **(D,E)** Heatmaps mit der Anzahl signifikant hochregulierter **(D)** bzw. herunterregulierter **(E)** Gene pro Cluster und Genotyp. DEGs = differentiell exprimierte Gene. **(F)** Zusammenhang zwischen der Gesamtzahl der DEGs pro Genotyp und Cluster sowie dem Zellanteil pro Cluster in den CCM1-, CCM2- und CCM3-KO-Proben, dargestellt als Blasendiagramm. Signifikant hoch- bzw. herunterregulierte Gene wurden definiert als solche mit einem normalized.avg_logFC (KO vs. WT) > 0,5 und padj < 0,05 bzw. normalized.avg_logFC (KO vs. WT) < -0,5 und padj < 0,05. Adaptiert nach: Skowronek et al., bioRxiv 2024.12.04.626588, Copyright: CC-BY 4.0 International license, Referenz [12]

2.2.4 Charakterisierung von *CCM1*$^{-/-}$, *CCM2*$^{-/-}$ und *CCM3*$^{-/-}$ Organoiden

In Arbeitspaket 6 wurden Untersuchungen zur Organisation des Zytoskeletts nach *CCM1*-, *CCM2*- bzw. *CCM3*-Inaktivierung durchgeführt. Unter 2D-Zellkulturbedingungen zeigten sich in Endothelzellen, welche aus *CCM1*$^{-/-}$, *CCM2*$^{-/-}$ und *CCM3*$^{-/-}$ iPSC differenziert wurden, im Vergleich zu Wildtyp-Zellen deutliche Unterschiede in der Organisation des Aktin-Zytoskeletts. Insbesondere fiel eine ausgeprägte Bildung von Aktin-Stressfasern auf. Durch die mEGFP-Markierung des β-Aktins eignet sich dieses Verhalten sehr gut als Read-out-Parameter für Hochdurchsatz-Screening-Ansätze. In komplexen vaskulären Netzwerken (= 3D-Zellkulturbedingungen) ließen sich jedoch keine eindeutigen Unterschiede mehr feststellen. Warum die 3D-Zellkultur die abnorme Reorganisation des Aktin-Zytoskeletts zu kompensieren scheint, könnte ggf. im Rahmen eines Folgeprojekts adressiert werden. In Arbeitspaket 7 wurden Untersuchungen zur Ausbildung von Adhärenzkontakten nach *CCM1*-, *CCM2*- bzw. *CCM3*-Inaktivierung durchgeführt. Die Analysen zur Expression und Lokalisation des mEGFP-markierten β-Catenins in den aus *CCM1*$^{-/-}$, *CCM2*$^{-/-}$ bzw. *CCM3*$^{-/-}$ iPSC differenzierten vaskulären Netzwerken zeigten jedoch keine deutlichen Unterschiede. Dieser Marker eignet sich somit nicht als Read-out-Parameter für Hochdurchsatz-Screening-Ansätze. Die Arbeiten in Arbeitspaket 6 und 7 wurden im Berichtszeitraum 2023 abgeschlossen und der Meilenstein wurde erreicht.

2.2.5 Untersuchungen in Mosaikorganoiden

Bereits mit dem von der Arbeitsgruppe von Prof. Penninger beschriebenen Differenzierungsprotokoll (vgl. Punkt 1.2.) konnten wir in Übereinstimmung mit Ergebnissen aus Mausstudien [6,5] zeigen, dass CCM3 KO-Zellen in vaskulären Mosaik-Organoiden aus CCM3-KO- und Wildtyp-Zellen eine abnorm erhöhte Proliferation aufweisen. Diese Ergebnisse sind in eine erste Projektpublikation eingeflossen [11]. Mit dem im Projekt neu entwickelten, besser skalierbaren und weitgehend xenofreien Differenzierungsprotokoll konnten wir dieses Ergebnis nicht nur reproduzieren, sondern auch zeigen, dass CCM1 KO-Zellen in vaskulären CCM1 KO/WT Mosaikorganoiden ein ähnliches Verhalten zeigen. Für CCM2 KO-Zellen wurde dagegen eine geringere Proliferation beobachtet (Abb. 4). In den Experimenten fiel schnell auf, dass die abnorme Proliferation der Zellen ein äußerst robuster und gut zu adressierender Parameter war, sodass zugunsten von effektiven High-Content-Imaging-Analysen auf die initial vorgesehenen Live-Cell-Imaging-Analysen verzichtet wurde. Diese Entscheidung trug letztlich auch dem Grundgedanken

des Projekts Rechnung, ein Modell zu etablieren, dass später gut in High-Throughput Screening (HTS)-Ansätze integriert werden kann.

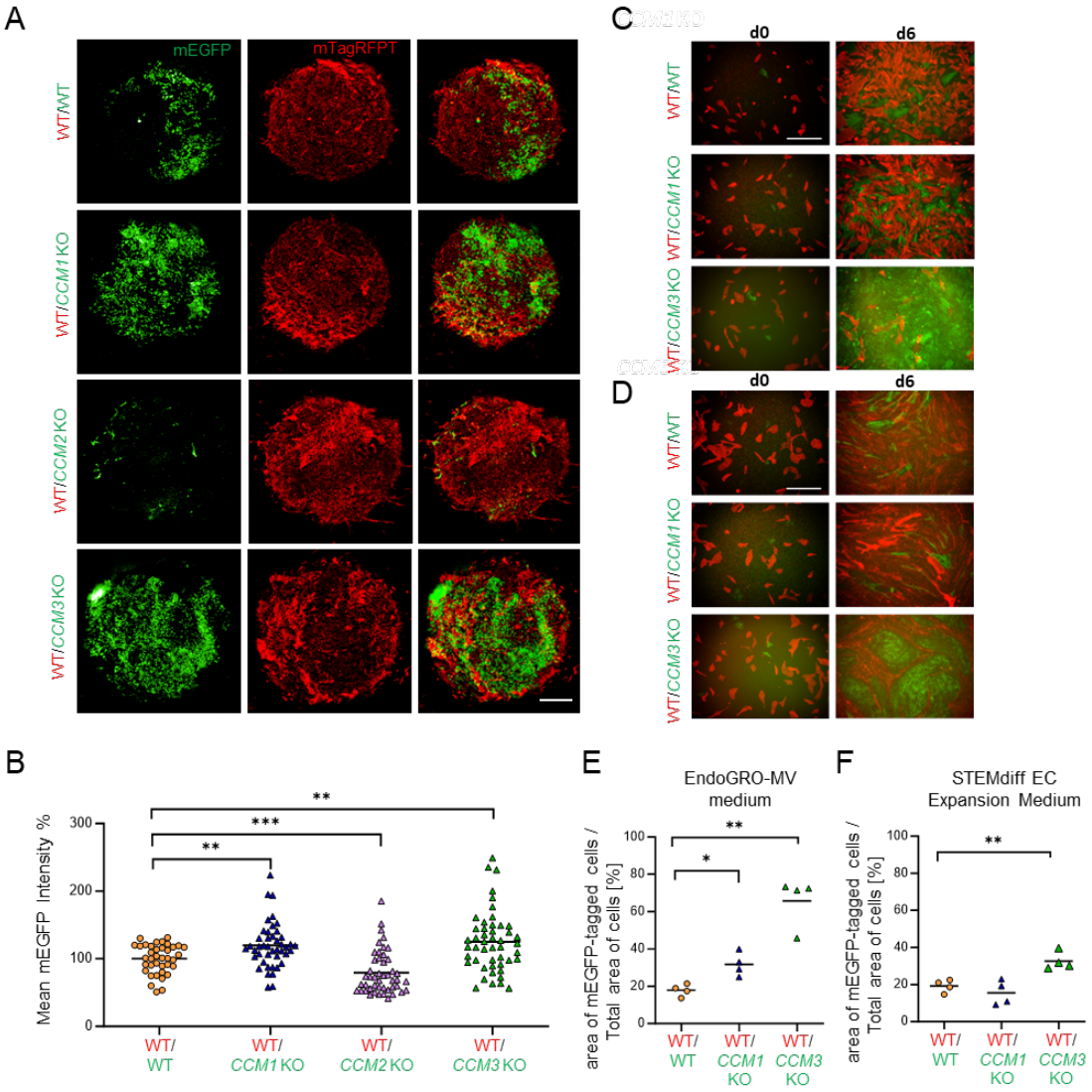

Abbildung 4: Abnorme Proliferation von Knockout-Zellen in vaskulären Mosaikorganoiden und EC-Kokulturen. **(A)** In vaskulären Mosaik-Organoiden aus WT- und CCM3 KO- bzw. WT- und CCM1 KO-Zellen zeigte sich eine abnorme Proliferation von KO-Zellen, wohingegen in Mosaik-Organoiden aus WT- und CCM2 KO-Zellen eine reduzierte Proliferation beobachtet wurde. KO-Zellen waren mit mEGFP markiert, WT-Zellen entweder mit mTagRFPT oder mEGFP (Maßstabsbalken: 200 µm). **(B)** Die mittlere mEGFP-Intensität in WT/KO-Mosaik-Organoiden wurde relativ zur Intensität in WT/WT-Organoiden normiert. Die Experimente wurden in drei unabhängigen Ansätzen durchgeführt (n = 38–48 pro Genotyp). Statistische Analysen erfolgten mittels Mann-Whitney-U-Test mit Welch-Korrektur (**P < 0,01, ***P < 0,001). **(C,D)** In einer Validierung in 2D-Kokulturen wurden mEGFP-markierte CCM1 oder CCM3 KO-iECs mit mTagRFPT-markierten WT-iECs im Verhältnis 1:9 ausgesät und in EndoGRO-MV **(C)** oder STEMdiff-EC-Expansionsmedium **(D)** kultiviert (Maßstabsbalken: 200 µm). **(E,F)** Nach sechs Tagen wurde die Fläche der mEGFP-positiven Zellen im Verhältnis zur Gesamtfläche bestimmt (n = 4 pro Genotyp, drei unabhängige biologische Replikate). Statistische Auswertungen erfolgten über multiple Zwei-Stichproben-t-Tests mit Welch-Korrektur und Holm-Šídák-Adjustierung (* = Padj < 0,05; ** = Padj < 0,01). Bildquelle: Skowronek et al., bioRxiv 2024.12.04.626588, Copyright: CC-BY 4.0 International license, Referenz [12]

Zur Bestätigung des proliferativen Vorteils von CCM1 und CCM3 KO-Zellen wurden ergänzende 2D-Kokultur-Experimente mit Endothelzellen durchgeführt, die zuvor aus WT- und KO-iPSCs

differenziert wurden (iECs). Auch hier zeigten CCM3 KO-iECs in Kokultur mit WT-iECs eine stark gesteigerte Proliferation, die besonders ausgeprägt in EndoGRO-MV-Medium auftrat. Im STEMdiff-EC-Expansionsmedium war die Proliferation der CCM3 KO-iECs ebenfalls signifikant, jedoch weniger stark erhöht. CCM1 KO-iECs zeigten in EndoGRO-MV-Medium eine moderate Proliferationssteigerung. Im STEMdiff-Medium wurde dagegen für CCM1 KO-iECs keine verstärkte Proliferation festgestellt. Zusammengefasst zeigen diese Daten, dass die Inaktivierung von CCM1 und CCM3 allein keine Hyperproliferation auslöst, jedoch in einem bestimmten Mikroumfeld eine abnormale Zellproliferation begünstigen kann. Um die Interaktion zwischen KO- und WT-Zellen besser zu verstehen, wurden Immunfluoreszenzanalysen in vaskulären KO/WT Mosaiknetzwerken ergänzt. Dabei fiel besonders in CCM3 KO/WT-Gefäßnetzwerken eine deutlich komplexere Struktur aus CD31-positiven Endothelzellen und PDGFR-β-positiven Perizyten sowie weniger VE-Cadherin-positive CCM3 KO-Zellen auf. Die Arbeiten in Arbeitspaket 8 wurden in Übereinstimmung mit der aktualisierten Meilensteinplanung der kostenneutralen Laufzeitverlängerung zum Ende des ersten Quartals 2024 abgeschlossen und sind ebenfalls in den Ende 2024 veröffentlichten Preprint eingeflossen [12].

2.2.6 In vitro-Perfusion vaskulärer Organoide

Im Rahmen des Arbeitspakets 9 wurde die Etablierung einer 3R-kompatiblen Perfusion von dreidimensionalen vaskulären Netzwerken unter Verwendung der OrganoPlate-Graft-Technologie [18] etabliert. Die Gelkanäle der OrganoPlate wurden nach Herstellerangaben präpariert und mit humanen umbilikalen Endothelzellen (HUVECs, PromoCell, Heidelberg, Deutschland) besiedelt. Diese bildeten anschließend Endothelkanäle, die mithilfe eines angiogenen Cocktails zur Sprossung angeregt wurden. Die mit dem oben beschriebenen neuen Protokoll differenzierten vaskulären Netzwerke wurden dann auf das HUVEC-Gefäßbett transplantiert und weiter kultiviert. Dabei bildeten sich Anastomosen zwischen dem Gefäßnetzwerk der HUVECs und dem der transplantierten vaskulären Netzwerke (Abb. 5A). Durch Einbringen von fluoreszierendem und fixierbarem Dextran konnte die Perfusion der vaskulären Netzwerke erfolgreich nachgewiesen werden (Abb. 5B). Das Arbeitspaket wurde im November 2024 abgeschlossen. Damit ist es gelungen, die Blutgefäßorganoide ohne Transplantation in Versuchstiere zu perfundieren und die Grundlage zu schaffen, um zukünftig den Einfluss der Strömungsverhältnisse bei zerebralen kavernösen Malformationen und anderen gefäßassoziierten Erkrankungen 3R-konform untersuchen zu können.

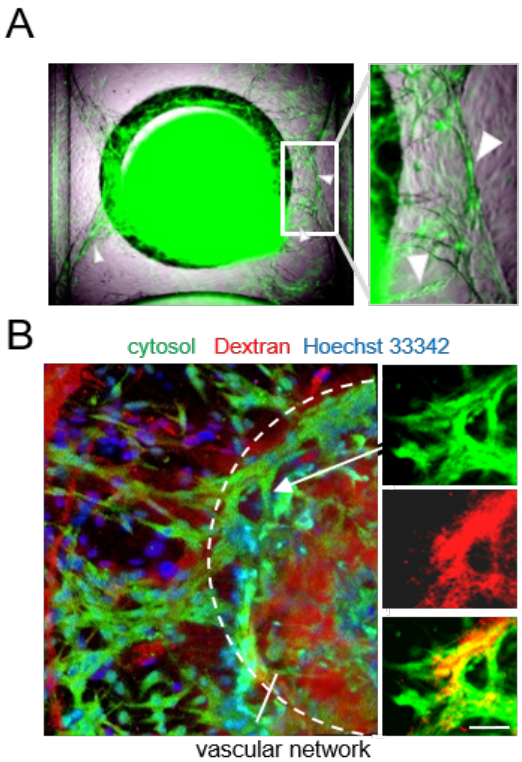

Abbildung 5: Die Perfusion der vaskulären Netzwerke mit der OrganoPlate-Graft-Technologie. **(A)** Nach der Kultivierung der Netzwerke auf dem Gefäßbett der OrganoPlate bildeten sich Anastomosen zwischen beiden Gefäßnetzwerken (weiße Pfeilspitzen). **(B)** Die Einleitung von TMR-Aminodextran zeigte die erfolgreiche Perfusion der vaskulären Netzwerke (Maßstabsbalken: 50 µm). Adaptiert nach: Skowronek et al., bioRxiv 2024.12.04.626588, Copyright: CC-BY 4.0 International license, Referenz [12]

2.2.7 Ergebnisdissemination

Die bereits realisierten und noch geplanten Veröffentlichungen und Präsentationen der Projektergebnisse sind unter Punkt 6 beschrieben. Der ursprünglich geplante Workshop in Greifswald konnte innerhalb der Projektlaufzeit nicht durchgeführt werden, da hierdurch die Patentanmeldung für neue Verfahren gefährdet worden wäre.

2.3 Wichtigste Positionen des zahlenmäßigen Nachweises

Wie im Sachbericht für 2022 beschrieben, hat sich im Jahr 2022 ein unvorhergesehener Personalwechsel ergeben, der trotz einer zeitnahen Neuausschreibung dazu geführt hat, dass eine der beiden Doktorandenstellen vom 01.10.2022 bis 28.02.2023 unbesetzt war. Zum 01.03.2023 konnte die Stelle mit einer naturwissenschaftlichen Doktorandin besetzt werden. In der Folge des Personalwechsels wurde am 14.06.2023 eine kostenneutrale Laufzeitverlängerung des Projekts bis zum 30.11.2024 beantragt. Diese wurde vom Projektträger bewilligt. Zum 01.01.2024 hat sich ein weiterer Personalwechsel ergeben. Ein Mitarbeiter ist nach Abschluss seiner Promotion auf eine volle Hausstelle gewechselt. In der Förderperiode wurden somit 254.521,73 € der insgesamt geplanten Personalmittel in Höhe von 269.203,00 € verausgabt. Im ursprünglichen Projektantrag wurden für zwei Doktorandenstellen durchschnittlich 7.477,87 € pro Monat für 36 Monate

veranschlagt. Aufgrund der oben beschriebenen Stellenvakanz belief sich die geförderte Beschäftigungszeit für zwei Doktoranden über die gesamte Projektlaufzeit einschließlich der beantragten Laufzeitverlängerung auf 34 Monate. Die durchschnittlichen Personalkosten für zwei Doktorandenstellen betrugen aufgrund der im Projektverlauf gestiegenen tariflichen Konditionen auf 7.485,93 € pro Monat. Die verbleibenden Personalmittel in Höhe von 14.681,27 € wurden in Übereinstimmung mit den Verwendungsrichtlinien in notwendige Sachmittel umgewidmet. Die für die im Jahr 2021 geplante Auslandsreise nach Kanada veranschlagten Mittel in Höhe von 3.000 € wurden (auch aufgrund der Einschränkungen im Rahmen der Corona-Pandemie) nicht abgerufen und ebenfalls in Sachmittel umgewidmet.

In den Arbeitspaketen 1-9 des CCM RESEARCH 2.0-Projekts wurden Zellkulturarbeiten durchgeführt. Diese reichten von der Kultivierung der iPSCs bis hin zur Synthese der vaskulären Organoide. Die Kosten für die benötigten Zellkulturmedien und Verbrauchsmaterialien beliefen sich über den gesamten Förderzeitraum auf insgesamt 45.894,77 €.

Für die Generierung, Qualitätskontrolle und nachfolgende Analysen der CCM1-, CCM2- und CCM3-defizienten Zelllinien wurden Reagenzien und Antikörper im Wert von 15.243,30 € verwendet. In Zusammenarbeit mit dem Universitätsklinikum Jena wurden zudem, wie im Antrag vorgesehen, für 4.439,94 € Karyotypisierungen realisiert, um die chromosomale Integrität der generierten iPSC-Klone abzusichern.

Für das in der Förderperiode im Arbeitspaket 5 neu etablierte Protokoll zur hochdurchsatzkompatiblen Synthese von vaskulären Organoiden wurden spezielle Zellkulturplatten (Akura 96-well Platten und Slit-well 96-well Platten) verwendet. Die Kosten für diese Platten beliefen sich während der Projektlaufzeit auf 8.572,23 €. Für den erfolgreichen Ersatz von FBS, bovinem Kollagen sowie die Reduktion von Matrigel konnte das im Antrag aufgeführte Produkt JellaGel leider nicht den gewünschten Erfolg erzielen, sodass weitere Matrixalternativen zur Testung herangezogen werden mussten. Für dieses in Arbeitspaket 3 aufgeführte Teilziel sowie die im weiteren Projektverlauf angefallenen Mengen der eingesetzten Kollagen- und FBS-Ersatzstoffe wurden 6.480,21 € verwendet.

Für die Durchführung der in den Arbeitspaketen 3, 5, 6, 7 und 8 veranschlagten mikroskopischen Analysen in Form von High-Content Imaging auf einem Operetta CLS High-Content Imaging Gerät und konfokaler Mikroskopie in der Greifswalder Imaging Facility wurden 5.350,00 € ausgegeben.

Für die in Arbeitspaket 9 durchgeführten Perfusionsstudien mussten aufgrund neuer Mindestbestellmengen und Preiserhöhungen des Herstellers fünf OrganoPlate-Graft-Platten für 7.854,00 € beschafft werden.

Die in Arbeitspaket 10 beschriebenen scRNA-Seq-Analysen wurden wie geplant am Universitätsklinikum Erlangen durchgeführt. Die Kosten für den Probenversand, die Laboranalysen sowie die bioinformatische Auswertung der Rohdaten beliefen sich auf insgesamt 15.006,28 €.

2.4 Notwendigkeit und Angemessenheit der geleisteten Projektarbeiten

Vor Beginn des Projekts stützte sich die Forschung zu zerebralen kavernösen Malformationen weitgehend auf 2D-Zellkultur- und Mausmodelle. Ein Protokoll zur Synthese von vaskulären Organoiden von Wimmer und Kolleg*innen kann zwar prinzipiell auf die CCM-Forschung angewendet werden, war aufgrund von intensiven Arbeitsschritten jedoch nicht für Hochdurchsatzuntersuchungen geeignet. Darüber hinaus enthielt das Protokoll einen wesentlichen Anteil tierischer Bestandteile und kann deswegen nicht als eine echte 3R-konforme Alternative zu Tierversuchen in der CCM-Forschung betrachtet werden. Im Rahmen der Förderperiode konnten die veranschlagten Projektziele vollständig umgesetzt werden, wodurch ein neuartiges und gut skalierbares Syntheseprotokoll für vaskuläre Organoide etabliert wurde. Mit Hilfe dieses Systems konnten außerdem bereits neue Einblicke in die Pathogenese von CCMs erhalten werden. Insbesondere die im Projekt gewonnenen Erkenntnisse über Genotyp-spezifische Unterschiede und Gemeinsamkeiten der CCM-Pathogenese werden zukünftig für die individuelle Therapieentwicklung von entscheidender Bedeutung sein. Das in dem geförderten Projekt etablierte Protokoll bietet somit ein vielversprechendes Werkzeug zur 3R-konformen Identifizierung potenzieller Wirkstoffkandidaten in einem hochrelevanten biologischen System und leistet damit einen wichtigen Beitrag zur Entwicklung neuer Therapieansätze für CCM. Darüber hinaus bietet das neue Protokoll weitreichende Anwendungsmöglichkeiten in weiteren vaskulären Forschungsgebieten.

2.5 Voraussichtlicher Nutzen / Verwertbarkeit der Ergebnisse

Der Nutzen des CCM RESEARCH 2.0-Projekts ergibt sich u.a. aus der wissenschaftlichen und wirtschaftlichen Verwertung der Projektergebnisse.

Auf der wissenschaftlichen Ebene zeigt sich die Verwertung u.a. in mehreren bereits realisierten Publikationen (vgl. Pkt. 2.6). Im Rahmen von Konferenzen und Vorträgen konnten zudem neue Kooperationen initiiert werden (u.a. AG Härteis / Universität Regensburg; AG Aung / TH Deggendorf; AG Mandic / Universitätsklinikum Marburg). Die Projektergebnisse sind ferner die Grundlage für neue Drittmittelanträge, die bereits eingereicht sind oder sich in der Vorbereitung befinden. Um die Nachnutzung der generierten Einzelzell-RNA-Sequenzierungsdaten zu ermöglichen, wurden die Daten in die Gene Expression Omnibus (GEO)-Datenbank eingestellt. Die allgemeine Veröffentlichung des Datensatzes (GSE276497) ist nach der regulären Publikation der Projektergebnisse vorgesehen. Außerdem wird nach der regulären Publikation der Projektergebnisse mit der Zellbank des Coriell Institute for Medical Research und dem Allen Institute for Cell Science geklärt, ob die generierten iPSCs in die Zellbank aufgenommen und so auch anderen Forschungsgruppen zugänglich gemacht werden können. Im Zusammenhang mit dem Projekt konnten zudem mehrere naturwissenschaftliche und medizinische Promotionen erfolgreich abgeschlossen werden. Auch die angestrebte Förderung des wissenschaftlichen Nachwuchses konnte somit realisiert werden.

Auf der wirtschaftlichen Ebene ist aus dem CCM RESEARCH 2.0-Projekt eine Patentanmeldung beim Europäischen Patentamt (EPA) hervorgegangen. Das in der Anmeldung dargelegte Verfahren der vollständig im 96-Well-Format durchführbaren und weitgehend ohne tierische Komponenten auskommenden Differenzierung vaskulärer Organoide bedeutet eine deutliche Reduktion der Arbeits- und Sachkosten. Der erweiterte europäische Recherchebericht (EESR) vom EPA wird in der zweiten Jahreshälfte 2025 erwartet. Parallel wird in Zusammenarbeit mit der Universität Rostock Service GmbH ein Exposé des Erfindungsgegenstands vorbereitet, das auf den Internetseiten verschiedener Technologiebörsen veröffentlicht werden soll. Abhängig vom Ergebnis des EESR wird ein Verwertungsbeginn ab 2026 angestrebt.
Im CCM RESEARCH 2.0-Projekt wurde ein hohes Maß an Know-how aufgebaut. Selbst wenn der Recherchebericht des EPA die Neuheit des CCM RESEARCH 2.0-Verfahrens nicht feststellen sollte, kann dieses Know-how genutzt werden. Als alternative Verwertungsstrategie würde in diesem Fall in Zusammenarbeit mit dem Zentrum für Forschungsförderung und Transfer (ZFF) der Universität Greifswald die Möglichkeit geprüft, nach Erwerb der notwendigen Lizenzen und Klärung der rechtlichen Voraussetzungen Auftragsforschungen mit genetisch veränderten Organoiden anbieten. In diesem Kontext wären auch Hochdurchsatztestungen von Wirkstoffbibliotheken möglich. Sollte die alternative Verwertungsstrategie nach Vorliegen eines negativen EESR greifen, würde zunächst die Vorstellung der Projektergebnisse im UNIQUE-Ideenwettbewerb der Universität angestrebt. Für die parallel notwendige Klärung rechtlicher und finanzieller Voraussetzungen einer Unternehmensausgründung wären mindestens 2 Jahre zu veranschlagen. Ein Verwertungsbeginn wäre frühestens im Jahr 2028 möglich.

2.6 Während der Durchführung des Vorhabens bekannt gewordener Fortschritt auf dem Gebiet des Vorhabens bei anderen Stellen

- Schmidt S et al., A Blood Vessel Organoid Model Recapitulating Aspects of Vasculogenesis, Angiogenesis and Vessel Wall Maturation. Organoids. 2022; 1(1):41-53. [Ref.: [19]]

  Inhalt der Arbeit: Im April 2022 wurde eine Arbeit von Schmidt und Kolleg*innen publiziert, die eine Perfusion von vaskulären Organoiden im Hühnerei-Chorionallantoismembran-Modell (CAM) beschreibt. Die Autor*innen konnten zeigen, dass durch die Perfusion eine bessere Reifung der vaskulären Strukturen erreicht werden kann. **Auswirkungen auf das CCM RESEARCH 2.0-Projekt:** Eine Perfusion von vaskulären Organoiden im CAM-Modell war im CCM RESEARCH 2.0-Projekt initial nicht vorgesehen. Nachdem auf dem BMBF-Statusseminar im September 2022 jedoch eine wissenschaftliche Kooperation mit den Arbeitsgruppen von Frau Prof. Silke Härteis (Universität Regensburg) und Herrn Prof. Thiha Aung (Technische Hochschule Deggendorf) initiiert wurde, die umfangreiche Erfahrungen mit dem CAM-Modell haben, wurde in Ergänzung zum Perfusionsansatz in OrganoPlate Graft-Platten auch eine Perfusion der nach dem neuen Protokoll differenzierten Organoiden im CAM-Modell realisiert. Die Ergebnisse sind in einen gemeinsam publizierten Preprint eingeflossen [12].

- Quintard C et al., A microfluidic platform integrating functional vascularized organoids-on-chip. Nat Commun. 2024;15(1):1452. [Ref.: [20]]

  Inhalt der Arbeit: Quintard und Kolleg*innen publizierten im Februar 2024 eine Methode zur Perfusion vaskulärer Organoide auf einem selbst hergestellten Mikrofluidikchip. Sie konnten zeigen, dass eine Kultivierung unter kontinuierlichen Flussbedingungen das Wachstum der Organoide sowie die Reifung der vaskulären Strukturen positiv beeinflusst. Die Organoide konnten über mindestens 30 Tage auf diesem Chip kultiviert werden, sodass damit prinzipiell auch Langzeitexperimente möglich werden. **Auswirkungen auf das CCM RESEARCH 2.0-Projekt:** Das Verfahren von Quintard und Kolleg*innen wurde nicht als Alternativ-, sondern viel mehr als komplementärer Ansatz für die in CCM RESEARCH 2.0 verfolgte Perfusionsstrategie angesehen. Diese Bewertung ergab sich vor allem aus der Tatsache, dass die beschriebenen Perfusionschips im Gegensatz zu den im CCM RESEARCH 2.0 verwendeten OrganoPlate Graft-Platten noch nicht kommerziell verfügbar sind und damit einer breiten Anwendung derzeit noch nicht uneingeschränkt offenstehen.

- Dao L et al., Modeling blood-brain barrier formation and cerebral cavernous malformations in human PSC-derived organoids. Cell Stem Cell. 2024; 31(6):818-833.e11. [Ref.: [21]]

  Inhalt der Arbeit: Im Juni 2024 publizierten Dao und Kolleg*innen eine Arbeit zur Modellierung der CCM-Erkrankung in vaskularisierten Hirnorganoiden. Hierfür fusionierten sie jeweils aus patientenspezifischen iPSCs differenzierte Hirnorganoide mit vaskulären Organoiden (= Assembloide). In diesen Assembloiden konnten sie auffällig erweitere Gefäßstrukturen mit einer verringerten Expression von endothelialen Zell-Zell-Kontakten sowie CCM-typische Genexpressionsunterschiede nachweisen. **Auswirkungen auf das CCM RESEARCH 2.0-Projekt:** Die zum Ende der Projektlaufzeit publizierte Arbeit von Dao und Kolleg*innen hatte keinen direkt Einfluss mehr auf den Projektverlauf von CCM RESEARCH 2.0. In der Abwägung zwischen steigendem Komplexitätsgrad (Assembloid-Modell) und Hochdurchsatzkompatibilität (CCM RESEARCH 2.0-Modell) könnten sich die beiden unterschiedlichen Ansätze jedoch in der Zukunft sinnvoll ergänzen. Insbesondere die Möglichkeit, vaskuläre Organoide ohne die Notwendigkeit des manuellen Ausschneidens der vaskulären Netzwerke aus der Hydrogel-Matrix zu differenzieren, könnte die Skalierbarkeit des Assembloid-Ansatzes deutlich steigern.

2.7 Erfolgte und geplante Veröffentlichungen der Ergebnisse

Bereits regulär veröffentlichte Originalarbeiten:

- Rath M, Schwefel K, Malinverno M, et al. Contact-dependent signaling triggers tumor-like proliferation of CCM3 knockout endothelial cells in co-culture with wild-type cells. Cell Mol Life Sci. 2022; 79(6):340. doi:10.1007/s00018-022-04355-6
- Pilz RA, Skowronek D, Mellinger L, Bekeschus S, Felbor U, Rath M. Endothelial Differentiation of CCM1 Knockout iPSCs Triggers the Establishment of a Specific Gene Expression Signature. Int J Mol Sci. 2023;24(4):3993. doi:10.3390/ijms24043993

- Pilz RA, Skowronek D, Hamed M, et al. Using CRISPR/Cas9 genome editing in human iPSCs for deciphering the pathogenicity of a novel CCM1 transcription start site deletion. Front Mol Biosci. 2022;9:953048. doi:10.3389/fmolb.2022.953048

Bereits regulär publizierte Übersichtsarbeiten:

- Skowronek D, Pilz RA, Schwefel K, Much CD, Felbor U, Rath M. Bringing CCM into a dish: cell culture models for cerebral cavernous malformations. Med Genet. 2021; 33(3):251-259. doi: 10.1515/medgen-2021-2091.

Als Preprint veröffentlichte Originalarbeiten:

- Skowronek D, Pilz RA, Saenko VV, Mellinger L, Singer D, Ribback S, et al. High-throughput differentiation of human blood vessel organoids reveals overlapping and distinct functions of the cerebral cavernous malformation proteins. bioRxiv. 2024:2024.12.04.626588. doi: 10.1101/2024.12.04.626588. (Originalmanuskript bei Angiogenesis akzeptiert und derzeit im finalen Editing durch das Journal)

Vorträge:

- Matthias Rath: Decoding the complexity of cavernous malformations with hiPSC-derived vascular organoids and single cell genomics. GBM Lunch Talk, Study Group Molecular Medicine der Gesellschaft für Biochemie und Molekularbiologie (GBM), 10.07.2024, virtuelles Meeting.
- Matthias Rath: New Insights into the Pathophysiology of Hereditary Vascular Malformations from iPSC-Derived Vascular Organoids. Second Scientific HHT Symposium, 11.05.2025, Bad Windsheim.

Geplante Präsentationen:

- Norddeutscher Humangenetik-Tag, 2025
- 21st Annual Alliance to Cure Cavernous Malformation International CCM Scientific Meeting, November 2025, Atlanta (Georgia, USA)
- European CCM Meeting, März 2026, Tübingen
- 36. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Humangenetik e.V., 2026

3 Referenzverzeichnis

1. Zeineddine HA, Girard R, Saadat L, Shen L, Lightle R, Moore T, Cao Y, Hobson N, Shenkar R, Avner K, Chaudager K, Koskimaki J, Polster SP, Fam MD, Shi C, Lopez-Ramirez MA, Tang AT, Gallione C, Kahn ML, Ginsberg M, Marchuk DA, Awad IA (2019) Phenotypic characterization of murine models of cerebral cavernous malformations. Lab Invest 99 (3):319-330. doi:10.1038/s41374-018-0030-y
2. Schwefel K, Spiegler S, Ameling S, Much CD, Pilz RA, Otto O, Volker U, Felbor U, Rath M (2019) Biallelic CCM3 mutations cause a clonogenic survival advantage and endothelial cell stiffening. J Cell Mol Med 23 (3):1771-1783. doi:10.1111/jcmm.14075
3. Wimmer RA, Leopoldi A, Aichinger M, Wick N, Hantusch B, Novatchkova M, Taubenschmid J, Hammerle M, Esk C, Bagley JA, Lindenhofer D, Chen G, Boehm M, Agu CA, Yang F, Fu B, Zuber J, Knoblich JA, Kerjaschki D, Penninger JM (2019) Human blood vessel organoids as a model of diabetic vasculopathy. Nature 565 (7740):505-510. doi:10.1038/s41586-018-0858-8
4. Roberts B, Haupt A, Tucker A, Grancharova T, Arakaki J, Fuqua MA, Nelson A, Hookway C, Ludmann SA, Mueller IA, Yang R, Horwitz R, Rafelski SM, Gunawardane RN (2017) Systematic gene tagging using CRISPR/Cas9 in human stem cells to illuminate cell organization. Mol Biol Cell 28 (21):2854-2874. doi:10.1091/mbc.E17-03-0209
5. Detter MR, Snellings DA, Marchuk DA (2018) Cerebral Cavernous Malformations Develop Through Clonal Expansion of Mutant Endothelial Cells. Circ Res 123 (10):1143-1151. doi:10.1161/CIRCRESAHA.118.313970
6. Malinverno M, Maderna C, Abu Taha A, Corada M, Orsenigo F, Valentino M, Pisati F, Fusco C, Graziano P, Giannotta M, Yu QC, Zeng YA, Lampugnani MG, Magnusson PU, Dejana E (2019) Endothelial cell

clonal expansion in the development of cerebral cavernous malformations. Nat Commun 10 (1):2761. doi:10.1038/s41467-019-10707-x
7. Batra S, Lin D, Recinos PF, Zhang J, Rigamonti D (2009) Cavernous malformations: natural history, diagnosis and treatment. Nat Rev Neurol 5 (12):659-670. doi:10.1038/nrneurol.2009.177
8. Spiegler S, Rath M, Much CD, Sendtner BS, Felbor U (2019) Precise CCM1 gene correction and inactivation in patient-derived endothelial cells: Modeling Knudson's two-hit hypothesis in vitro. Mol Genet Genomic Med 7 (7):e00755. doi:10.1002/mgg3.755
9. Schwefel K, Spiegler S, Kirchmaier BC, Dellweg PKE, Much CD, Pane-Farre J, Strom TM, Riedel K, Felbor U, Rath M (2020) Fibronectin rescues aberrant phenotype of endothelial cells lacking either CCM1, CCM2 or CCM3. FASEB J 34 (7):9018-9033. doi:10.1096/fj.201902888R
10. Wimmer RA, Leopoldi A, Aichinger M, Kerjaschki D, Penninger JM (2019) Generation of blood vessel organoids from human pluripotent stem cells. Nat Protoc 14 (11):3082-3100. doi:10.1038/s41596-019-0213-z
11. Rath M, Schwefel K, Malinverno M, Skowronek D, Leopoldi A, Pilz RA, Biedenweg D, Bekeschus S, Penninger JM, Dejana E, Felbor U (2022) Contact-dependent signaling triggers tumor-like proliferation of *CCM3* knockout endothelial cells in co-culture with wild-type cells. Cell Mol Life Sci 79 (6):340. doi:10.1007/s00018-022-04355-6
12. Skowronek D, Pilz RA, Saenko VV, Mellinger L, Singer D, Ribback S, Weise A, Claaßen K, Büttner C, Brockmann EM, Hübner CA, Aung T, Haerteis S, Bekeschus S, Ekici AB, Felbor U, Rath M (2024) High-throughput differentiation of human blood vessel organoids reveals overlapping and distinct functions of the cerebral cavernous malformation proteins. bioRxiv:2024.2012.2004.626588. doi:10.1101/2024.12.04.626588 (preprint)
13. Rocha SF, Schiller M, Jing D, Li H, Butz S, Vestweber D, Biljes D, Drexler HC, Nieminen-Kelha M, Vajkoczy P, Adams S, Benedito R, Adams RH (2014) Esm1 modulates endothelial tip cell behavior and vascular permeability by enhancing VEGF bioavailability. Circ Res 115 (6):581-590. doi:10.1161/CIRCRESAHA.115.304718
14. Martinez-Corral I, Zhang Y, Petkova M, Ortsater H, Sjoberg S, Castillo SD, Brouillard P, Libbrecht L, Saur D, Graupera M, Alitalo K, Boon L, Vikkula M, Makinen T (2020) Blockade of VEGF-C signaling inhibits lymphatic malformations driven by oncogenic PIK3CA mutation. Nat Commun 11 (1):2869. doi:10.1038/s41467-020-16496-y
15. Qin L, Zhang H, Li B, Jiang Q, Lopez F, Min W, Zhou JH (2021) CCM3 Loss-Induced Lymphatic Defect Is Mediated by the Augmented VEGFR3-ERK1/2 Signaling. Arterioscler Thromb Vasc Biol 41 (12):2943-2960. doi:10.1161/ATVBAHA.121.316707
16. Rho SB, Dong SM, Kang S, Seo SS, Yoo CW, Lee DO, Woo JS, Park SY (2008) Insulin-like growth factor-binding protein-5 (IGFBP-5) acts as a tumor suppressor by inhibiting angiogenesis. Carcinogenesis 29 (11):2106-2111. doi:10.1093/carcin/bgn206
17. Benz PM, Ding Y, Stingl H, Loot AE, Zink J, Wittig I, Popp R, Fleming I (2020) AKAP12 deficiency impairs VEGF-induced endothelial cell migration and sprouting. Acta Physiol (Oxf) 228 (1):e13325. doi:10.1111/apha.13325
18. van Duinen V, Zhu D, Ramakers C, van Zonneveld AJ, Vulto P, Hankemeier T (2019) Perfused 3D angiogenic sprouting in a high-throughput in vitro platform. Angiogenesis 22 (1):157-165. doi:10.1007/s10456-018-9647-0
19. Schmidt S, Alt Y, Deoghare N, Krüger S, Kern A, Rockel AF, Wagner N, Ergün S, Wörsdörfer P (2022) A Blood Vessel Organoid Model Recapitulating Aspects of Vasculogenesis, Angiogenesis and Vessel Wall Maturation. Organoids 1 (1):41-53
20. Quintard C, Tubbs E, Jonsson G, Jiao J, Wang J, Werschler N, Laporte C, Pitaval A, Bah TS, Pomeranz G, Bissardon C, Kaal J, Leopoldi A, Long DA, Blandin P, Achard JL, Battail C, Hagelkruys A, Navarro F, Fouillet Y, Penninger JM, Gidrol X (2024) A microfluidic platform integrating functional vascularized organoids-on-chip. Nat Commun 15 (1):1452. doi:10.1038/s41467-024-45710-4
21. Dao L, You Z, Lu L, Xu T, Sarkar AK, Zhu H, Liu M, Calandrelli R, Yoshida G, Lin P, Miao Y, Mierke S, Kalva S, Zhu H, Gu M, Vadivelu S, Zhong S, Huang LF, Guo Z (2024) Modeling blood-brain barrier formation and cerebral cavernous malformations in human PSC-derived organoids. Cell Stem Cell 31 (6):818-833 e811. doi:10.1016/j.stem.2024.04.019