Gefördert vom

Bundesministerium
für Forschung, Technologie
und Raumfahrt

Zuwendungsempfänger:

Prof. (apl) Dr. Oleg Timofeev
Philipps-Universität Marburg
Institut für Molekulare Onkologie
Zentrum für Tumor- und Immunbiologie
Hans-Meerwein-Str. 3
D-35043 Marburg

Etablierung eines iPSC-basierten Lungenorganoidsystems als Alternative für tierbasierte Forschungsmodelle

Verantwortliche Autoren:

Dr. Oleg Timofeev

Förderkennzeichen: 161L0279A

„Das diesem Bericht zugrundeliegende Vorhaben wurde mit Mitteln des Bundesministeriums für Forschung, Technologie und Raumfahrt unter dem Förderkennzeichen 161L0279A gefördert. Die Verantwortung für den Inhalt dieser Veröffentlichung liegt bei der Autorin/beim Autor.“

Sachbericht zum Verwendungsnachweis

Vorhabenbezeichnung:

Etablierung eines iPSC-basierten Lungenorganoidsystems als Alternative für tierbasierte Forschungsmodelle (IPSELON)

Förderkennzeichen: 161L0279A

Laufzeit des Vorhabens:

01.06.2021 – 14.11.2024

Berichtszeitraum:

01.06.2021 – 14.11.2024

1. Teil I: Kurzbericht (max. 2 Seiten)

1.1. Ursprüngliche Aufgabenstellung

Aufgrund der Komplexität der Lunge als Organ, das in Zellkulturen nicht genau reproduziert werden kann, werden Labortiere in großem Umfang als Modelle für die Untersuchung menschlicher Lungenerkrankungen wie Lungenkrebs, chronisch obstruktive Lungenerkrankung (COPD), Asthma, zystische Fibrose, Infektionskrankheiten usw. verwendet. Einer der Gründe für den weit verbreiteten Einsatz von Mausmodellen, insbesondere bei der Erforschung von Krebs und anderen genetisch bedingten Krankheiten, ist die Tatsache, dass es relativ einfach ist, Mutationen in das Keimbahngenom der Maus einzubringen. Neben den ethischen Problemen, die mit der Verwendung von Tieren als Versuchsmodelle verbunden sind, besteht ein wichtiger einschränkender Aspekt darin, dass sich Anatomie, Physiologie und Genetik des Menschen erheblich von denen der Maus unterscheiden. Daher müssen die an Mäusen gewonnenen experimentellen Daten zusätzlich an menschlichen klinischen Proben oder an Modellen mit menschlichen Zellen validiert werden. Zellkulturmodelle können die Komplexität des menschlichen Gewebes nicht adäquat reproduzieren. Humane Organoide stellen ein alternatives In-vitro-Modell dar, das den klassischen 2D- und 3D-Zellkulturmodellen überlegen ist. Organoide können z.B. aus induzierten pluripotenten Stammzellen (iPSC), die durch Reprogrammierung adulter somatischer Zellen erzeugt werden, hergestellt werden. Die Verwendung von gentechnisch veränderten iPSCs z.B. durch die CRISPR-Cas9-Technologie zur Herstellung von Organoiden erweitert deren Anwendungsmöglichkeiten für die Modellierung verschiedener Krankheiten. Ziel dieses Projektes war es, ein humanes Lungenorganoidsystem zu entwickeln, das die Möglichkeit beinhaltet Organoide mit genetischen Veränderungen zu erzeugen.

1.2. Ablauf des Vorhabens

Die entwickelten Lungenorganoide sollen als Ersatzmöglichkeit für Tiermodelle getestet werden, insbesondere für die Erforschung von Lungenkrebs. Dafür sollten humane Stammzellen (iPSCs) genetisch so modifiziert, dass sie mithilfe von CRISPR-Technologie gezielt verändert werden können. Anschließend wurden aus diesen Zellen funktionale Lungenorganoide hergestellt und auf

bekannte Krebsmutationen getestet, um die Modelle zu validieren und für zukünftige Studien nutzbar zu machen.

Ergebnisse AG Timofeev, Teilprojekt A

Ziel des Projekts war die Entwicklung einer technologischen Plattform zur gezielten genetischen Modifikation humaner induzierter pluripotenter Stammzellen (iPS-Zellen) und deren Anwendung in komplexen 3D-Zellkulturmodellen. Im Zentrum stand die Etablierung des TRAIT-Systems (Toolbox for Rapid Assembly of Integration Templates) – einer modularen Vektorbibliothek zur schnellen und flexiblen Assemblierung genetischer Konstrukte für stabile Integration in das Genom von iPS-Zellen. Die TRAIT-Plattform kombiniert die Vorteile der Golden Gate- und Gateway®-Klonierung und ermöglicht die Generierung komplexer, multizistronischer Expressionskassetten mit verschiedenen Fluoreszenz- und Resistenzmarkern. Insgesamt wurden im Projekt über 60 funktionelle Plasmide entwickelt und charakterisiert; darunter Werkzeuge zur kontrollierten Genexpression, Geninaktivierung (Knock-out) sowie zur konditionalen Aktivierung onkogener Signalwege.

Ein zentraler Anwendungsbereich dieser Technologie war die Erzeugung genetisch definierter iPSC-Linien mit induzierbarer Expression von Cas9 (für CRISPR/Cas9-Geneditierung) sowie konditional aktivierbaren Onkogenen (z. B. KRASG12C, TP53R175H). Es wurden sowohl HEK293- als auch iPSC-basierte Modelle etabliert, in denen die Funktionalität der Expressionskassetten in Bezug auf Induzierbarkeit, Genom-Integration und Genfunktion erfolgreich demonstriert wurde.

Ein weiterer wesentlicher Bestandteil des Projekts war die gerichtete Differenzierung dieser genetisch modifizierten iPSC-Linien zu Lungenepithelzellen und die anschließende Generierung von 3D-Lungenorganoiden. Hierfür wurden etablierte Differenzierungsprotokolle angepasst und optimiert. Die entstehenden Organoide zeigten eine reproduzierbare Expression typischer Marker für verschiedene Entwicklungsstadien und spiegelten die Morphologie alveolärer Strukturen wider. Der Differenzierungserfolg variierte je nach Zelllinie, wobei SCVI15-Derivate bessere Ergebnisse erzielten als WTSIi004-A-Derivate.

Die Funktionalität der konditionalen Onkogenexpression in Organoiden wurde durch Cre-vermittelte Rekombination mittels Adeno- oder Lentiviren getestet. Dabei zeigte sich, dass nach Induktion einzelner Organoide eine verstärkte Proliferation und tumorähnliche Strukturen auftraten – ein erster Hinweis auf die erfolgreiche Transformation durch onkogene Signalwege. Die Gesamtfrequenz solcher Ereignisse war jedoch gering, was vermutlich auf Limitierungen in der Rekombinationseffizienz und onkogenen Aktivierung zurückzuführen ist. Alternative Systeme, wie die lentivirale, tetracyclin-regulierte Expression, zeigten vielversprechende Ergebnisse hinsichtlich stabiler Expression und Nachverfolgbarkeit.

Insgesamt konnte mit diesem Projekt die Machbarkeit einer gezielten genetischen Modifikation und krankheitsrelevanten Modellierung in iPSC-basierten Organoiden überzeugend demonstriert werden. Das TRAIT-System bietet eine leistungsfähige und flexible Grundlage für zukünftige Anwendungen in der funktionellen Genomforschung, Onkologie und präklinischen Testung. Die entwickelte Plattform ist anschlussfähig an weitere Krankheitsmodelle (z. B. für Leber, Darm, Gehirn) und kann perspektivisch um zusätzliche genetische Module erweitert werden. Die Freigabe der Plasmidbibliothek über Addgene sowie die geplanten wissenschaftlichen Publikationen werden zur breiten Verfügbarkeit und Weiterentwicklung in der Forschungsgemeinschaft beitragen.

2. Teil II: Eingehende Darstellung

2.1. Ursprüngliche Aufgabenstellung sowie wissenschaftlicher und technischer Stand, an den angeknüpft wurde

Ursprünglicher Stand der Wissenschaft und Technik.

Lungenerkrankungen sind die häufigsten Erkrankungen, von denen weltweit mehr als 1 Milliarde Menschen betroffen sind. Laut Berichten der WHO leiden etwa 500 Millionen Menschen an chronischen Atemwegserkrankungen wie Asthma, chronisch obstruktiver Lungenerkrankung (COPD), Tuberkulose oder Lungenkrebs. Lungenkrebs, an dem jährlich 1,6 Millionen Menschen sterben, ist die häufigste Todesursache und gilt als die am weitesten verbreitete, tödliche Neoplasie (Torre et al., 2015). Darüber hinaus wird COPD als Komorbidität bei 30-70% der Patienten mit Lungenkrebs festgestellt; andererseits erhöhen chronische Lungenerkrankungen wie Emphyseme das Risiko für die Entwicklung von Lungenkrebs (Barta et al., 2019). Aufgrund der enormen sozioökonomischen Bedeutung dieses Problems nimmt die Forschungsaktivität im Bereich chronischer Atemwegserkrankungen, insbesondere in Krebsstudien, stetig zu. Angesichts der hohen Komplexität der Lunge als Organ, die in der Zellkultur nicht genau reproduziert werden kann, werden in solchen Studien hauptsächlich Labortiere, meist Labormäuse, als Versuchsmodelle verwendet. Allein in Deutschland wurden im Jahr 2023 zu Forschungszwecken 1.044.515 Mäuse verwendet, davon 66% für die Grundlagenforschung und 17% für die translationale und angewandte Forschung. Insbesondere wurden mehr als 200.000 Tiere in Krebsstudien und etwa 30.000 in der Erforschung von Atemwegserkrankungen eingesetzt (Versuchstierzahlen 2018, BMEL).

Eine Möglichkeit, Tiermodelle zu ersetzen, ist die Verwendung von Gewebeorganoiden. Ein Organoid ist eine *in vitro* hergestellte, dreidimensionale, mehrzellige Struktur, die mikroanatomische Merkmale einer funktionellen Untereinheit eines Organs genau reproduziert - mit anderen Worten, ein verkleinertes und vereinfachtes Organ. Organoide können durch gerichtete Differenzierung von Stammzellen - embryonale (ESC), pluripotente (PSC) oder adulte gewebespezifische Stammzellen (ASC), erhalten werden. Organoide können in der Zellkultur expandiert werden, was die Anwendung von Standardtechniken, wie Transfektion, CRISPR-vermittelte Geneditierung, Reporterexpression, Live-Bildgebung usw., für die genetische Modifikation, Behandlung und Analyse ermöglicht. Lungenorganoide können aus ASCs und Vorläuferzellen erhalten werden, die aus Lungengewebe oder Bronchialbürsten isoliert wurden. Alternativ können Organoide aus PSC durch gerichtete Differenzierung erzeugt werden, wobei die Schlüsselschritte der Organogenese während der Embryonalentwicklung *in vitro* rekapituliert werden. Durch den sequentiellen Wechsel von Wachstumsfaktoren und Kulturbedingungen können PSC zur Bildung von Endoderm- und Darmrohr-Sphäroiden gebracht und dann in Vorläufer der Lungenknospenspitze oder in Lungenorganoide differenziert werden, die luftwegsähnliche Strukturen bilden. Diese Organoide entsprechen der menschlichen, fetalen Lunge, enthalten unreife alveolarähnliche epitheliale und mesenchymale Zellen und können direkt für Experimente verwendet oder einer weiteren Reifung unterzogen werden, was zur Entwicklung reifer Atemwegszelltypen (Basal-, Flimmerepithel- und Clubzellen) führt. (Miller et al., 2019)(Konishi et al., 2016).

Die Kombination der Organoidtechnik mit gentechnischen Methoden, insbesondere mit CRISPR-vermitteltem Geneditierung, eröffnet neue Möglichkeiten für die Verwendung von Organoiden als genetische Modelle für menschliche Krankheiten (Gkatzis et al., 2018). Aufgrund seiner Einfachheit, Flexibilität und Möglichkeit für das gleichzeitige Targeting mehrerer Gene ist CRISPR-Cas9 das vielseitigste Werkzeug für die Geneditierung. In den letzten fünf Jahren wurden viele Modifikationen von CRISPR-basierten Methoden entwickelt, die eine gezielte Geneditierung, Regulation der Genexpression oder eine Modifikation des epigenetischen Status ermöglichen (Yin et al., 2019).

Ziele

In diesem Projekt haben wir uns zum Ziel gesetzt, eine iPSC-basierte Plattform für die Erzeugung menschlicher Lungenorganoide mit den gewünschten genetischen Veränderungen zu schaffen. Diese Plattform kann für die Grundlagen- und angewandte Forschung als Ersatz für transgene Mausmodelle verwendet werden, vor allem als Alternative für Lungenkrebs-Mausmodelle.

Aufgaben

Um dieses Ziel zu erreichen, hatten wir zunächst geplant, gentechnisch veränderte menschliche iPSC-Linien mit induzierbarer Expression von CRISPR-Komponenten zu erzeugen. Zusätzlich zur integrierten CRISPR-Maschinerie sollten diese Zelllinien weitere Modifikationen aufweisen, um die Effizienz der Genbearbeitung zu verbessern und die bedingte Expression von Zielgenen zu ermöglichen. Als nächstes wollten wir diese Zelllinien zur Herstellung von Lungenorganoiden verwenden. Wir beabsichtigten, robuste Protokolle für die Differenzierung, Expansion, Konservierung und genetische Modifikation von Organoiden zu entwickeln. Schließlich wollten wir das Modell durch die Erzeugung von Organoiden mit bekannten Krebsmutationen validieren. Diese Organoide sollten für die phänotypische und molekulare Charakterisierung verwendet und die erzielten Ergebnisse mit unseren früheren Daten und veröffentlichten Arbeiten verglichen werden.

2.2. Ablauf des Vorhabens (Vergleich zur ursprünglichen Vorhabenbeschreibung)

Der Arbeitsplan sah 4 Arbeitspakete vor. Ursprünglich hätten die Arbeiten am 01.06.21 beginnen sollen. Aufgrund der späteren Einstellung des Doktoranden zum 15.11.2021 wurden diese und als Folge auch weitere Arbeiten verzögert. Wir haben eine Genehmigung für kostenneutrale Verlängerung des Projektes bis zum 14.11.2024 erhalten.

AP1 Erzeugung von iPSC-CRISPR-Zelllinien. Geplante Dauer – 15 Monate

AP1.1. Klonierung des Vektors. Geplante Dauer – 3 Monate. Durchgeführt von AG Timofeev.

In Arbeitspaket 1.1. sollte ein multicistronisches Plasmid konstruiert werden, das die Cas9-Nuklease unter Kontrolle des Doxycyclin-induzierbaren Systems enthält und CreERT2 konstitutiv exprimiert. Diese Aufgabe wurde früher als geplant, bereits zum Zeitpunkt 31.12.2021 abgeschlossen.

AP1.2. Validierung des Vektors. Geplante Dauer – 3 Monate. Durchgeführt von AG Timofeev.

Im Arbeitspaket 1.2. sollte die Funktionalität der genetischen Konstrukte in der einfach zu handhabenden HEK293-Zelllinie getestet werden. Die Strategie zur gezielten Integration der Transgene in einen Safe-Harbour-Lokus sollte getestet werden. Diese Aufgabe wurde früher als geplant, bereits im Februar 2022 abgeschlossen.

AP1.3. Optimierung von Protokollen für die Genmodifizierung der iPSC. Geplante Dauer – 3 Monate. Durchgeführt von AG Timofeev.

In diesem Projektteil sollten effiziente Protokolle für die Elektroporation und/oder Transfektion und Selektion von iPSC eingerichtet werden. Es wurden optimale Bedingungen für die Transfektion von zwei Zelllinien (SCVI15 und WTSIi004-A) festgelegt, aber nur WTSIi004-A ermöglichte eine robuste Expression von Transgenen. Aufgrund von Verzögerungen bei der Lieferung wichtiger Reagenzien und Materialien dauerten diese Arbeiten länger als geplant und wurden erst im September 2022 abgeschlossen, etwa einen Monat hinter dem Zeitplan. Da sich bei weiteren Experimenten herausstellte, dass die WTSIi004-A Zelllinie nur schwer zu differenzieren war, mussten wir diesen Schritt wiederholen, um unsere Arbeit mit der SCVI15-Zelllinie zu optimieren.

AP1.4 Erzeugung und Charakterisierung von iPSC-CRISPR-Zelllinien. Geplante Dauer – 6 Monate. Durchgeführt von AG Timofeev.

Im Arbeitspaket 1.4 sollten Cas9- und CreERT2- exprimierende iPSC Zelllinien generiert werden. Als nächstes sollte die Aktivitäten von Cas9 und CreERT2 in iPSC Zellen getestet werden. Außerdem, sollte überprüft werden, ob genetisch-modifizierte iPSC Zellen pluripotent und differenzierungsfähig sind. Unter Berücksichtigung des späteren Projektbeginns hätte dieser Projektteil im August 2022 beginnen und im Februar 2023 abgeschlossen werden sollen. Die Notwendigkeit, die Bedingungen für die Einzelzellklonierung und die Expression des Donor-Konstruktes zu optimieren (AP1.3), hat zu Verzögerungen geführt. Daher wurde dieser Projektteil erst im Mai 2023 abgeschlossen.

AP2 Etablierung von Lungenorganoiden aus iPSC-CRISPR-Zellen. Geplante Dauer – 24 Monate

AP2.1. Optimierung der Bedingungen für die Kultivierung von iPSC. Geplante Dauer – 3 Monate. Durchgeführt von AG Herold.

Wurde durch den Verbundpartner (AG Herold) durchgeführt.

AP2.2. Optimierung der Bedingungen für die gerichtete Differenzierung von iPSC zu Lungenorganoiden. Geplante Dauer – 6 Monate. Durchgeführt von AG Herold.

Wurde durch den Verbundpartner (AG Herold) durchgeführt.

AP2.3. Generierung und Charakterisierung von Lungenorganoiden (LO) aus iPSC-CRISPR-Zellen. Geplante Dauer – 15 Monate. Durchgeführt von AG Herold.

Wurde durch den Verbundpartner (AG Herold) durchgeführt.

AP3 Validierung der Plattform. Geplante Dauer – 21 Monate

AP3.1a. Modellierung der Onkogenaktivierung. Geplante Dauer – 9 Monate. Durchgeführt von AG Timofeev.

Im Arbeitspaket 3.1 sollten iPSC Zelllinien mit Lungenkrebs-spezifischen Onkogenen generiert werden. Dazu mussten zunächst genetische Konstrukte erzeugt werden, die gRNA exprimieren (um EML4-ALK Fusionsonkogen zu induzieren) oder Onkogene tragen. Nachdem diese Konstrukte in HEK293-Zellen getestet worden waren, sollte sie für die Erzeugung von genetisch veränderten iPSC verwendet werden. Planmäßig hätte dieser Projektteil im November 2023 abgeschlossen werden sollen. Verzögerungen bei der Umsetzung des AP1.4 führten zu einer Verschiebung der Erarbeitung dieses Arbeitspakets auf Dezember 2023.

AP3.1b. Modellierung der Onkogenaktivierung in Lungenorganoiden. Geplante Dauer – 6 Monate. Durchgeführt von AG Herold und AG Timofeev.

Aufgrund von ungeplanten personellen Veränderungen bei der AG Herold wurde ein Teil der Arbeiten bei der AG Timofeev durchgeführt. Da der Technologietransfer und die Festlegung der Methoden zusätzliche Zeit erforderten, begannen die Arbeiten später als geplant.

AP3.2a. Modellierung von Tumorsuppressor-Mutationen. Geplante Dauer – 9 Monate. Durchgeführt von AG Timofeev.

Im Arbeitspaket 3.2 sollten iPSC Zelllinien mit Tumorsuppressor-Mutationen generiert werden. Dazu mussten zunächst genetische Konstrukte erzeugt werden, die gRNA für Inaktivierung verschiedener Tumorsuppressorgene tragen. Nachdem diese Konstrukte in HEK293-Zellen getestet worden waren, sollte sie für die Erzeugung von genetisch veränderten iPSC verwendet werden. Wegen der Änderungen im experimentellen Design, die für die erfolgreiche Erstellung des Modells notwendig waren, benötigten wir mehr Zeit für die Erzeugung und Validierung neuer genetischer Konstrukte. Aus diesem Grund wurde dieses Arbeitspaket nicht wie ursprünglich geplant im November 2023, sondern erst im Mai 2024 abgeschlossen.

AP3.2b. Modellierung von Tumorsuppressor-Mutationen in Lungenorganoiden. Geplante Dauer – 6 Monate. Durchgeführt von AG Herold und AG Timofeev.

Aufgrund von ungeplanten personellen Veränderungen bei der AG Herold wurde ein Teil der Arbeiten bei der AG Timofeev durchgeführt. Da der Technologietransfer und die Festlegung der Methoden zusätzliche Zeit erforderten, begannen die Arbeiten später als geplant.

AP3.3. Morphologische Charakterisierung von Onko-Organoiden. Geplante Dauer – 6 Monate. Durchgeführt von AG Herold und AG Timofeev.

Aufgrund von ungeplanten personellen Veränderungen bei der AG Herold wurde ein Teil der Arbeiten bei der AG Timofeev durchgeführt. Da der Technologietransfer und die Festlegung der Methoden zusätzliche Zeit erforderten, begannen die Arbeiten später als geplant.

AP3.4. Genetische Charakterisierung von Onko-Organoiden. Geplante Dauer – 9 Monate. Durchgeführt von AG Timofeev.

Im Arbeitspaket 3.4 sollten die Lungenorganoide mit krebsassoziierten Mutationen zur Analyse der Genexpression verwendet werden. Vorläufige Versuche wurden bis November 2024 durchgeführt. Wir planen, die Analyse mit gesammelten Proben fortzusetzen.

AP3.5. Verwendung von Onko-organoiden für Wirkstofftest. Geplante Dauer – 6 Monate. Durchgeführt von AG Timofeev.

Im Arbeitspaket 3.5 sollten die Onko-organoide mit Krebstherapie-Arzneimitteln behandelt werden, und die Therapieantwort sollte analysiert werden. Aufgrund des Mangels an biologischem Material und der knappen materiellen Ressourcen, die durch die steigenden Preise für Verbrauchsmaterialien bedingt waren, war es uns nicht möglich, diese Versuche durchzuführen.

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

Erstellung eines „genetischen Werkzeugsatzes“ zur gezielten Geneditierung in iPS-Zellen und Organoiden (Toolbox for Rapid Assembly of Integration Templates, TRAIT) (AG Timofeev)

Ein zentrales Ziel des Projekts war die Entwicklung einer iPSC-basierten Plattform, die zwei Hauptkomponenten umfasst:

1. Den „genetischen Werkzeugsatz“ zur gezielten Geneditierung in iPS-Zellen und Organoiden (Toolbox for Rapid Assembly of Integration Templates, TRAIT),
2. Humanen iPSC-Linien mit stabiler, induzierbarer Expression von CRISPR-Komponenten.

Das im Projekt entwickelte TRAIT-System ermöglicht die schnelle Assemblierung komplexer genetischer Konstrukte und steigert so die Effizienz und Flexibilität der Plattform. Im Zentrum des Systems steht der Vektor pTCV (Template Cloning Vector). Das einzigartige Design der pTCV-Vektorfamilie (Abb. 1A) erlaubt die nahtlose Kombination mehrerer Genexpressionskassetten oder ganzer Genkreise. In diesen Vektoren wurden die Vorteile zweier Klonierungssysteme vereint: Golden Gate und Gateway®. Ein wesentliches Merkmal des Golden-Gate-Systems ist die Nutzung von Typ-IIS-Restriktionsenzymen (z. B. BsaI oder BbsI), die außerhalb ihrer Erkennungssequenz schneiden und damit definierte Überhänge erzeugen. Diese Überhänge können so gestaltet werden, dass sie gezielt mit anderen Fragmenten zusammengefügt werden, was eine gerichtete Assemblierung mehrerer DNA-Fragmente in einem Reaktionsansatz erlaubt (Abb. 1A). Das Gateway-System von Invitrogen basiert auf einer hochspezifischen Rekombination zwischen sogenannten „att“-Sequenzen und erlaubt den Austausch von DNA-Fragmenten zwischen Vektoren ohne enzymatische Verdau- oder Ligation. Es ermöglicht die schnelle Erzeugung verschiedenartiger Expressionskonstrukte mit identischem Insert durch einfache Übertragung in Zielvektoren mit unterschiedlichen Regulatorsequenzen oder Markern.

Um die Flexibilität weiter zu erhöhen, wurden mehrere pTCV-Varianten erzeugt, die verschiedene Tandem-Klonierungsstellen enthalten (BsaI, BbsI, PaqCI oder Kombinationen; Tab. 1A). Für die Erzeugung komplex genetisch modifizierter Zelllinien wurden zudem Gateway-kompatible pENTR-Vektoren mit unterschiedlichen Fluoreszenz- und Resistenzkassetten erstellt (Tab. 1A),

die mit den pTCV-Vektoren für die Generierung multizistronischer Konstrukte verwendet werden können. Diese Vektoren wurden genutzt, um Donortemplates für die gezielte CRISPR/Cas9 genomische Integration zu generieren: Entweder durch Klonierung von Homologiearmen (für HR-vermittelte Integration) oder kurzen doppelsträngigen Oligonukleotiden (für Homology Independent Targeted Integration, HITI, Artegiani et al., 2020). Diese Plasmide wurden als pTID (Template Integration Donor) bezeichnet. Parallel dazu wurden Expressionskonstrukte (z. B. induzierbare Cas9-Varianten) in pENTR-Vektoren für das Gateway-System kloniert. Mittels Gateway-LR-Reaktion zwischen pENTR und pTID wurden die finalen Templates zur Integration in genomische Safe Harbor-Loci generiert (Abb. 1B).

Die stabile Integration von Cas9 ermöglicht effiziente Geneditierung und die Erzeugung isogener Zelllinien. Um unerwünschte Effekte durch konstitutive Cas9-Expression zu vermeiden, wurde ein tetracyclin-regulierbares Expressionssystem gewählt. Drei Varianten induzierbarer Cas9-Konstrukte wurden generiert:

iCG (Cas9 + GFP),

iCGC (zusätzlich CreERT),

iCGdC (CreERT mit destabilisiertem DHFR-Domäne, aktiviert durch Tamoxifen + Trimethoprim; Abb. 1B, Tab. 1A).

Die Tamoxifen-induzierbare CreERT-Rekombinase erlaubt eine rekombinationsbasierte Regulation der Genexpression. Das iCGdC-Konstrukt bietet durch die DHFR-Domäne eine besonders strenge Kontrolle der Cre-Aktivität und verhindert ungewollte Rekombinationen im Zytoplasma, wie sie bei herkömmlichem CreERT auftreten.

Ein weiteres zentrales Element des CRISPR/Cas9-Systems ist die gRNA, welche über DNA-Vektoren exprimiert werden kann. Hierfür wurde ein pTID-basierter Vektor entwickelt (pTVF-gRNA), der sowohl für transiente Transfektionen als auch für stabile genomische Integration geeignet ist. Die Vektorfamilie enthält ein U6-FrameSelect-sgRNA-Modul (geeignet für HITI) sowie eine leere U6-Kassette zur Klonierung einzelner oder mehrerer gRNAs. Ein mCherry-Marker unter dem EF1a-Promotor ermöglicht die Überwachung der Transfektionseffizienz (Abb. 1C). Mit diesem Vektor und validierten gRNAs wurden diverse Plasmide generiert, u. a. für:

gezielte Integration in Safe Harbor-Loci,
Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen,
Induktion von EML4-ALK-Fusionsonkogenen,
Knock-out lungenassoziierter Gene (Tab. 1A).

Zur Selektion erfolgreich editierter Zellen wurde der pTVF-KOC (Knock-Out Cassette) konstruiert (Abb. 1D), der ein Expressions-Stop-Kassette mit ECFP-Marker und Zeocin-Resistenzgen trägt.

Für die konditionale Transgenexpression wurde der Vektor pTVF-CECC (Conditional Expression Cloning Cassette) entwickelt, der eine STOP-Kassette zwischen EF1a-Promotor und mCherry-Reporter enthält. Nach Cre-vermittelter Rekombination wird die STOP-Kassette entfernt und mCherry sowie das Zielgen exprimiert (Abb. 1E). So wurden diverse Expressionskonstrukte für Onkogene erstellt, die per HR oder HITI in Safe Harbor-Loci integriert wurden (pTOC-Vektoren, Tab. 1A). Insgesamt besteht der TRAIT-Werkzeugsatz aus 64 Plasmiden, die für Klonierungen und Transfektionen genutzt werden können (Tab. 1). Wir beabsichtigen, das System zu veröffentlichen und alle TRAIT-Plasmide über Addgene der wissenschaftlichen Gemeinschaft zur

Verfügung zu stellen. Insgesamt wurden ca. 200 Plasmide erzeugt, einschließlich aller Zwischen- und Testkonstrukte (Tab. 1B, Anhang).

Funktionelle Validierung der genetischen Konstrukte (AG Timofeev)

Im nächsten Schritt wurde die Funktionsfähigkeit der genetischen Konstrukte überprüft. Zunächst testeten wir das piCGC-Konstrukt in transienten Transfektionen, um eine schnelle Analyse zu ermöglichen. Die Expression von EGFP (als Marker für die tet-abhängige Induktion) wurde mittels Durchflusszytometrie untersucht, während die tet-abhängige Expression von Cas9 durch Western Blot analysiert wurde. Beide Tests bestätigten eine erfolgreiche Induktion von EGFP und Cas9 (Abb. 1F).

Die Tamoxifen-abhängige Aktivierung von CreERT wurde mithilfe einer genetisch modifizierten Reporter-Zelllinie untersucht, die ein von loxP-Sequenzen flankiertes GFP-Transgen exprimiert. Nach Aktivierung von Cre kommt es zur Exzision des GFP-Transgens und somit zum Verlust der Fluoreszenz. Tatsächlich beobachteten wir einen fortschreitenden Rückgang des GFP-Signals im Zeitraum von 24–96 Stunden nach Behandlung mit 4-Hydroxytamoxifen (Abb. 1F).

Zur Analyse der Cas9-Nukleaseaktivität wurden HEK293-Zellen mit dem piCGC-Plasmid sowie zwei SGL40C.EFS.RFP657-Vektoren, die gRNAs für den SHS231-Lokus tragen, ko-transfiziert. Nach dreitägiger Induktion mit dem Tetracyclin-Analogon Doxycyclin wurde genomische DNA isoliert und in einem PCR-basierten Assay untersucht. Wie erwartet, konnte eine kleine Deletion im SHS231-Lokus zwischen den gRNA-Bindungsstellen nachgewiesen werden – ein klarer Hinweis auf die funktionelle Aktivität des Cas9-Systems.

Im nächsten Schritt erzeugten wir HEK293-Zelllinien mit stabiler Integration des iCGC-Konstrukts in den SH231-Lokus zur weitergehenden Validierung. Insgesamt wurden 21 Einzelzellklone generiert, von denen 12 eine korrekte Integration zeigten. Neun dieser Klone wurden auf induzierbare Cas9-Expression und Cre-Aktivierung getestet (Abb. 1G). Drei gut funktionierende Klone wurden für weitere methodische Validierungen verwendet. Mit ihnen wurden unter anderem Echtzeit- und digitale PCR-Methoden (ddPCR) zur Quantifizierung integrierter Transgenkopien etabliert (Abb. 1H).

Allerdings zeigte sich in der Testzelllinie eine unerwünschte Hintergrundaktivität von Cre, selbst ohne Tamoxifen-Zugabe (Abb. 1I). Zur Lösung dieses Problems wurde ein modifiziertes piCGDC-Konstrukt mit destabilisierter Cre-Variante entwickelt und getestet. Parallel dazu wurden neue Vektoren mit verbesserter Cas9-Expression erzeugt und erprobt. Zudem wurden etwa 50 verschiedene gRNAs in transgenen HEK293-iCGC-Zellen getestet; die effizientesten wurden für nachfolgende Anwendungen ausgewählt.

Test der konditionalen Expression (AG Timofeev)

Zur Prüfung der Funktionalität des Cre-abhängigen Systems für konditionale Expression (Abb. 1J) wurden HEK293T-Zellen transient mit dem Plasmid pTOC-AAVS1-HA-KRASG12C transfiziert. Die Expression von YEFP und RFP wurde per Durchflusszytometrie analysiert. Wie erwartet, war das YEFP-Signal stark, RFP jedoch nicht nachweisbar (Abb. 1K).

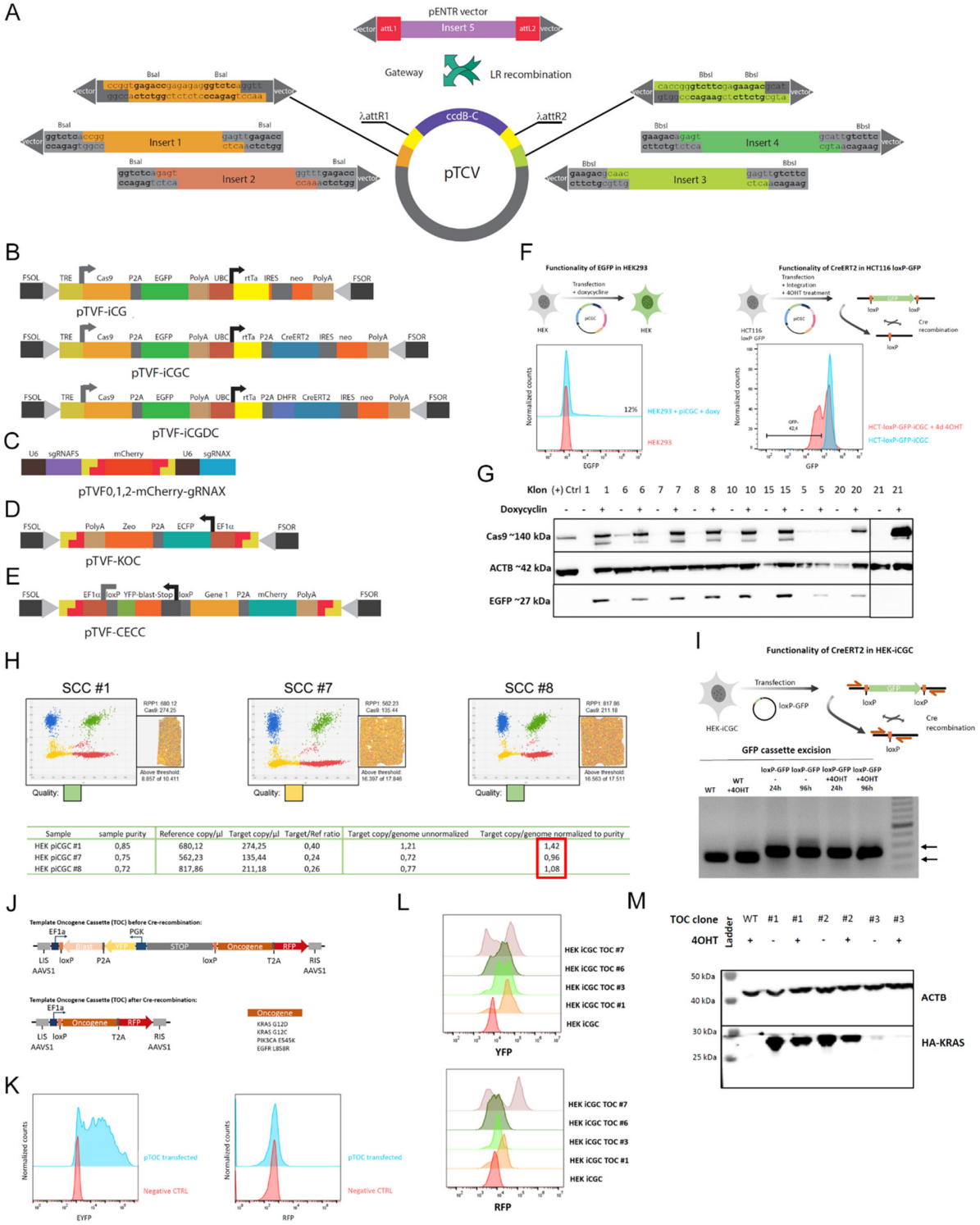
Das Konstrukt wurde anschließend zur gezielten Integration in den AAVS1-Lokus der HEK-iCGC-Zelllinien verwendet. Einzelzellklone wurden generiert und erneut auf YEFP- und RFP-Expression untersucht (Abb. 1L). Übereinstimmend mit den vorherigen Beobachtungen konnte RFP auch ohne 4-OHT-Behandlung nachgewiesen werden – was darauf hinweist, dass CreERT in

Abwesenheit von Tamoxifen (bedingt durch Leckaktivität im Zytoplasma) bereits zur Rekombination führt.

Die Expression des HA-markierten KRAS-Transgens wurde zusätzlich per Western Blot mit einem HA-spezifischen Antikörper nachgewiesen (Abb. 1M). Da sowohl RFP als auch das KRAS-Transgen nur in Zellen mit Cre-Expression vorhanden waren (vgl. Abb. 1K und 1L), wurde die Funktionalität des Plasmids für die konditionale Expression eindeutig bestätigt.

Abbildung 1. Toolbox für den schnellen Aufbau von Integrationsvorlagen (TRAIT).

A – Schematische Darstellung des pTCV-Plasmids. Tandem-BsaI- (orange) und BbsI-Stellen (grün) ermöglichen Golden-Gate-Klonierung einzelner oder multipler Insertionen. Die attR1- und attR2-Stellen (gelb), flankierend zur ccdB-Chloramphenicol-Kassette (violett), dienen als Anker für die Gateway-Integration von DNA-Fragmenten mit attL-Enden (rot). B–E – Schematische Darstellungen von Plasmiden für die CRISPR/Cas9-vermittelte genomische Integration: B – Plasmidfamilie für die induzierbare Expression von Cas9; C – Plasmid für Klonierung spezifischer gRNAs, enthält FrameSelect-sgRNA-Modul für HITI; D – Plasmid für gezielten Knock-out von Genen; E – Plasmid für Cre-abhängige konditionale Expression. Weitere Details im Text. F – Linkes Panel: Nachweis von GFP-Expression in HEK293T-Zellen 24 h nach Transfektion mit pTVF-iCGC und Doxycyclin-Induktion. Rechtes Panel: Abnahme der GFP-Expression in HCT116-Reporterzellen mit loxP-flankiertem GFP-Transgen nach 4OHT-Behandlung. G – Western Blot zur Analyse der induzierbaren Cas9- und GFP-Expression in Einzelzellklonen mit stabil integrierter iCGC-Kassette. H – Digitale PCR zur Bestimmung der Anzahl integrierter iCGC-Kopien. I – PCR-Nachweis von Cre-Aktivität in HEK-iCGC-Zellen; zeigt tamoxifenunabhängige Rekombination. J – Schematische Darstellung des pTOC-Plasmids und des Prinzips der Cre-vermittelten Expression. K – Durchflusszytometrie: Nachweis von YEFP (links) und RFP (rechts) in transient transfizierten HEK293T-Zellen. L – Nachweis von YEFP und RFP in Einzelzellklonen nach Integration von pTOC-HA-KRASG12C in HEK-iCGC-Zellen. M – Western Blot zur Analyse der HA-KRASG12C-Expression in den in L gezeigten Klonen.



Sample	sample purity	Reference copy/µl	Target copy/µl	Target/Ref ratio	Target copy/genome unnormalized	Target copy/genome normalized to purity
HEK piCGC #1	0,85	680,12	274,25	0,40	1,21	1,42
HEK piCGC #7	0,75	562,23	135,44	0,24	0,72	0,96
HEK piCGC #8	0,72	817,86	211,18	0,26	0,77	1,08

Tabelle 1A. Plasmide, die zum TRAIT-System gehören (Toolbox for Rapid Assembly of Integration Templates)

N	Plasmid name	Description
1	pTCV-BsaI	Template Cloning Vector for Gateway and Golden Gate systems
2	pTCV-BbsI	Template Cloning Vector for Gateway and Golden Gate systems
3	pTCV-PaqCI	Template Cloning Vector for Gateway and Golden Gate systems
4	pTCV-BsaI-BbsI	Template Cloning Vector for Gateway and Golden Gate systems
5	pTVF	Template Cloning Vector for Gateway system, contains FrameSelect flanks
6	pENTR-iCG	Donor plasmids for Gateway integration into pTCV derivatives
7	pENTR-iCGCv1	Donor plasmids for Gateway integration into pTCV derivatives
8	pENTR-iCGDCv1	Donor plasmids for Gateway integration into pTCV derivatives
9	pENTR-ECFP-zeo	Donor plasmids for Gateway integration into pTCV derivatives
10	pENTR-GFP-puro	Donor plasmids for Gateway integration into pTCV derivatives
11	pENTR-EYFP-Blasti	Donor plasmids for Gateway integration into pTCV derivatives
12	pENTR-mCherry-Hygro	Donor plasmids for Gateway integration into pTCV derivatives
13	pENTR-RFP657-Puro	Donor plasmids for Gateway integration into pTCV derivatives
14	pENTR-RFP657-Hygro	Donor plasmids for Gateway integration into pTCV derivatives
15	pTVF-iCG	**Templates for genomic integration flanked by FrameSelect**
16	pTVF-iCGCv1	**Templates for genomic integration flanked by FrameSelect**
17	pTVF-iCGDCv1	**Templates for genomic integration flanked by FrameSelect**
18	pTVF0-mCherry-gRNAX-BsaI	Plasmid for cloning of gRNA of interest, contains gRNA for FrameSelect in 0 position
19	pTVF2-mCherry-gRNAX-BsaI	Plasmid for cloning of gRNA of interest, contains gRNA for FrameSelect in 2 position
20	pTVF1-mCherry-gRNAX-BsaI	Plasmid for cloning of gRNA of interest, contains gRNA for FrameSelect in 1 position
21	pTVF0-mCherry-gRNA-hR26-1	Plasmid for targeting the hROSA25 locus, also contains gRNA for FrameSelect in 0 position
22	pTVF0-mCherry-gRNA-hR26-2	Plasmid for targeting the hROSA25 locus, also contains gRNA for FrameSelect in 0 position
23	pTVF0-mCherry-gRNA-AAVS1-1	Plasmid for targeting the AAVS1 locus, also contains gRNA for FrameSelect in 0 position
24	pTVF0-mCherry-gRNA-AAVS1-2	Plasmid for targeting the AAVS1 locus, also contains gRNA for FrameSelect in 0 position
25	pTVF0-mCherry-gRNA-SHS231-1	Plasmid for targeting the SH231 locus, also contains gRNA for FrameSelect in 0 position
26	pTVF0-mCherry-gRNA-SHS231-2	Plasmid for targeting the SH231 locus, also contains gRNA for FrameSelect in 0 position
27	pTVF2-mCherry-gRNA-SCGB3A2	Plasmid for targeting the SCGB3A2 locus, also contains gRNA for FrameSelect in 2 position
28	pTVF0-mCherry-gRNA-SFTPC	Plasmid for targeting the SFTPC locus, also contains gRNA for FrameSelect in 0 position
29	pTVF1-mCherry-gRNA-TP63	Plasmid for targeting the TP63 locus, also contains gRNA for FrameSelect in 1 position
30	pTVF1-mCherry-gRNA-SCGB1A1	Plasmid for targeting the SCGB1A1 locus, also contains gRNA for FrameSelect in 2 position
31	pTVF2-mCherry-gRNA-ASCL1	Plasmid for targeting the ASCL1 locus, also contains gRNA for FrameSelect in 2 position
32	pTVF0-mCherry-gRNA-TP53In1-1	Plasmid for targeting the TP53 locus, also contains gRNA for FrameSelect in 0 position
33	pTVF0-mCherry-gRNA-TP53In1-2	Plasmid for targeting the TP53 locus, also contains gRNA for FrameSelect in 0 position
34	pTVF0-mCherry-gRNA-TP53In1-3	Plasmid for targeting the TP53 locus, also contains gRNA for FrameSelect in 0 position
35	pTVF0-mCherry-gRNA-TP53Ex11-1	Plasmid for targeting the TP53 locus, also contains gRNA for FrameSelect in 0 position
36	pTVF0-mCherry-gRNA-TP53Ex11-2	Plasmid for targeting the TP53 locus, also contains gRNA for FrameSelect in 0 position
37	pTVF0-mCherry-gRNA-TP53Ex11-3	Plasmid for targeting the TP53 locus, also contains gRNA for FrameSelect in 0 position
38	pTVF0-mCherry-gRNA-EML4-ALKv1	Plasmids for generation of EML4-ALKv1 fusion gene, also contains gRNA for FrameSelect in 0 position
39	pTVF0-mCherry-gRNA-EML4-ALKv3	Plasmids for generation of EML4-ALKv3 fusion gene, also contains gRNA for FrameSelect in 0 position
40	pTVF0-mCherry-gRNA7-TP53In5	Plasmid for targeting the TP53 locus, also contains gRNA for FrameSelect in 0 position
41	pTVF0-mCherry-gRNA-TP53-Int4	Plasmid for targeting the TP53 locus, also contains gRNA for FrameSelect in 0 position
42	pTVF0-mCherry-gRNA-TP53-Ex11-6	Plasmid for targeting the TP53 locus, also contains gRNA for FrameSelect in 0 position
43	pTVF-KOC	**Templates for genomic integration of STOP cassette, flanked by FrameSelect 0**
44	pTVF-CECC	**Template for genomic integration of conditional expression cassette, flanked by FrameSelect 0**
45	pENTR-COEC-HA-KRASG12C	Gateway donor vectors for cloning of conditionally expressed KRAS G12C oncogene
46	pENTR-COEC-HA-KRASG12D	Gateway donor vectors for cloning of conditionally expressed KRAS G12D oncogene
47	pENTR-COEC-EGFR L858R	Gateway donor vectors for cloning of conditionally expressed EGFR L858R oncogene
48	pENTR-COEC-PIK3CA E545K	Gateway donor vectors for cloning of conditionally expressed PIK3CA E545K oncogene
49	pTOC-AAVS1-HA-KRASG12C	**Template for integration of KRAS G12C conditional expression cassette into AAVS1 locus**
50	pTOC-hROSA26-HA-KRASG12C	**Template for integration of KRAS G12C conditional expression cassette into hROSA26 locus**
51	pTOC-AAVS1-HA-KRASG12D	**Template for integration of KRAS G12D conditional expression cassette into AAVS1 locus**
52	pTOC-hROSA26-HA-KRASG12D	**Template for integration of KRAS G12D conditional expression cassette into hROSA26 locus**
53	pTOC-FS-ID-KRASG12D	**Template for integration of KRAS G12D conditional expression cassette via FrameSelect**
54	pTOC-FS-ID-KRASG12C	**Template for integration of KRAS G12C conditional expression cassette via FrameSelect**
55	pTOC-AAVS1-EGFR L858R	**Template for integration of EGFR L858R conditional expression cassette into AAVS1 locus**
56	pTOC-hROSA26-EGFR L858R	**Template for integration of EGFR L858R conditional expression cassette into hROSA26 locus**
57	pTOC-AAVS1-PIK3CA E545K	**Template for integration of PIK3CA E545K conditional expression cassette into AAVS1 locus**
58	pTOC-hROSA26-PIK3CA E545K	**Template for integration of PIK3CA E545K conditional expression cassette into hROSA26 locus**
59	pENTR-ECFP-zeo	Gateway donor vectors for cloning of ECFP-zeo cassette into pTCV-based plasmids
60	pENTR-GFP-puro	Gateway donor vectors for cloning of GFP-puro cassette into pTCV-based plasmids
61	pENTR-EYFP-Blasti	Gateway donor vectors for cloning of EYFP-blasi cassette into pTCV-based plasmids
62	pENTR-mCherry-Hygro	Gateway donor vectors for cloning of mCherry-hygro cassette into pTCV-based plasmids
63	pENTR-RFP657-Puro	Gateway donor vectors for cloning of RFP657-puro cassette into pTCV-based plasmids
64	pENTR-RFP657-Hygro	Gateway donor vectors for cloning of RFP657-hygro cassette into pTCV-based plasmids

Erzeugung genetisch veränderter iPSC-CRISPR-Zelllinien (AG Timofeev)

Für die erfolgreiche Etablierung genetisch veränderter iPSC-Zelllinien mussten zunächst effiziente Protokolle für Transfektion und Selektion entwickelt werden. Die optimalen Kulturbedingungen für iPS-Zellen wurden im Labor etabliert. Es wurden verschiedene Transfektionsreagenzien an zwei iPSC-Zelllinien (SCVI15 und WTSIi004-A) getestet. Die besten Ergebnisse wurden mit dem Lipofectamine Stem Transfection Reagent (Thermo) erzielt. Die optimalen Transfektionsbedingungen wurden experimentell ermittelt und ergaben reproduzierbare Effizienzen von 50–70 % (Abb. 2A). Im Anschluss wurden geeignete Selektionsbedingungen mit verschiedenen Antibiotika (Puromycin, Neomycin, Hygromycin, Blasticidin) getestet und sowohl effektive Konzentrationen als auch Selektionsdauer bestimmt. Da die Selektion genetisch modifizierter iPS-Zellen in der Regel die Erzeugung von Einzelzellklonen erfordert, wurden etablierte Protokolle zur Einzelzellklonierung geprüft und für die verwendeten Zelllinien angepasst.

Parallel dazu wurde mit der Etablierung iPSC-basierter Zelllinien begonnen, die eine induzierbare Expression von Cas9-GFP bzw. Cas9-GFP-Cre ermöglichen (Abb. 2B). Nach Transfektion der SCVI15-Zellen mit dem piCGC-Konstrukt und anschließender Neomycin-Selektion wurde die erfolgreiche Integration des Konstrukts mittels PCR in polyklonalen Zellkulturen überprüft. Nach Einzelzellklonierung wurden mehrere Dutzend Neomycin-resistente Klone isoliert, amplifiziert und per PCR auf korrekte Integration getestet. Einige Klone wurden als positiv bestätigt (Abb. 2C). Die anschließende Analyse zeigte jedoch keine nachweisbare induzierbare Expression von Cas9 und GFP – vermutlich infolge Gen-Silencing, ein bekanntes Phänomen in pluripotenten Zellen (siehe Tabelle 2). Daraufhin wurde die alternative Zelllinie WTSIi004-A verwendet. Nach mehreren Versuchen konnten daraus fünf monoklonale Derivate mit stabiler, induzierbarer Expression von Cas9 und GFP etabliert werden (Tabelle 3, Abb. 2D, E). Beide Zelllinien (SCVI15 und WTSIi004-A) wurden auf das Vorhandensein von Pluripotenzmarkern und ihre Differenzierungsfähigkeit geprüft. Die Identität und Pluripotenz der Zellen wurden mittels Immunfluoreszenzfärbung für Oberflächenmarker (SSEA-3, SSEA-4, TRA-1-81, TRA-1-60-R) und anschließender Durchflusszytometrie bestätigt (Abb. 2F).

Konditionale Expression von Onkogenen in iPSC (AG Timofeev)

Ursprünglich war geplant, das EML4-ALK-Fusionsgen als Modell für krebsassoziierte Mutationen zu verwenden. Die entsprechenden gRNAs wurden kloniert, in HEK293-Zellen getestet, und das Vorhandensein der EML4-ALK-Fusion wurde per PCR bestätigt (Abb. 2G). Da jedoch zu befürchten war, dass eine direkte Induktion dieser Mutation in iPS-Zellen deren Pluripotenz beeinträchtigen könnte, wurde davon abgesehen. Frühere Erfahrungen hatten gezeigt, dass die Erzeugung genetisch definierter Einzelzellklone aus iPSC langwierig ist. Sollte das EML4-ALK-Onkogen die Zellfitness oder Pluripotenz negativ beeinflussen, könnten nachfolgende Experimente erschwert werden. Deshalb entschieden wir uns, zusätzliche Onkogene als konditional exprimierbare Transgene zu nutzen. Hierfür wurden pTVF-CECC-Konstrukte erzeugt, die zunächst in HEK293-Zellen getestet wurden. Methoden zur Analyse der Onkogenexpression mittels Durchflusszytometrie und Western Blot wurden etabliert (Abb. 1J–M). Anschließend wurden diese Konstrukte in transienten Transfektionen in iPSC-Zellen getestet und ebenfalls per FACS und Western Blot analysiert (Abb. 2H, I). Daraufhin wurden stabile iPSC-Linien mit konditionaler Expression verschiedener Onkogene erzeugt. Nach Blasticidin-Selektion wurden polyklonale Zellpools mittels FACS sortiert, da die STOP-Kassette im Konstrukt EYFP exprimiert. Auf diese Weise wurden über 20 iPSC-Zelllinien mit stabil integrierten, konditional exprimierbaren

Onkogenen etabliert, darunter KRASG12C, KRASG12D, EGFRL858R, PIK3CE545K und BRAFV600E.

Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen (AG Timofeev)

Es wurden genetische Konstrukte zur Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen (TP53, KEAP1, STK11, CDKN2A, RB1) erstellt und zunächst in HEK293-Zellen getestet. Die effizientesten gRNAs wurden für den Einsatz in iPSC-Zellen ausgewählt (Abb. 2J und nicht gezeigt). Als weitere Strategie zur Modellierung krebsassoziierter Missense-Mutationen in TP53 entschieden wir uns für die konditionale Expression mutierter TP53-Transgene. Dafür wurden drei Mutationen (TP53R175H, TP53R248Q, TP53R273H) in die CECC-Konstrukte kloniert und anschließend in das Genom von iPSC-Zellen integriert. Nach Antibiotikaselektion konnten Zelllinien erzeugt werden, die diese mutierten Transgene tragen. Eine vollständige Übersicht aller erzeugten genetisch modifizierten Zelllinien ist in Tabelle 4 (Anhang) enthalten.

Abbildung 2. Erzeugung von genetisch modifizierten iPSC-CRISPR-Zelllinien.

A – FACS-Analyse von SCVI15-Zellen, 24 Stunden nach Transfektion mit Reportervektoren, die entweder GFP (linkes Panel) oder EYFP (rechtes Panel) exprimieren. Die jeweiligen Transfektionsbedingungen sind im Diagramm angegeben. B – Schematische Darstellung der verwendeten Konstrukte (iCGC und gRNA-Vektoren) zur gezielten Integration in den SH231-Lokus sowie des Workflows zur Generierung monoklonaler iPSC-Zelllinien. C – PCR-Strategie (oberes Panel) zum Nachweis einer korrekten Integration des iCGC-Konstrukts in den SH231-Lokus. Darunter: PCR-Ergebnisse, die die erfolgreiche Integration im SCVI15 iCGC-Klon #2 bestätigen. D – Nachweis der GFP-Expression in fünf Einzelzellklonen der Zelllinie WTSIi004-A mit gezielter Integration des iCG-Konstrukts in den SH231-Lokus. Die Zellen wurden 24 h vor der FACS-Analyse mit Doxycyclin behandelt. E – Immunfluoreszenz-Nachweis von Cas9 in den gleichen monoklonalen Zelllinien wie in D. F – FACS-Analyse zur Überprüfung der Pluripotenzmarker in WTSIi004-A-Zellen mit iCG-Kassette. Klon #28 wurde aufgrund seiner Eigenschaften für Folgeexperimente ausgewählt. G – Oben: PCR-Strategie zur Detektion des EML4-ALK-Fusionsgens in HEK293T-iCGC-Zellen nach Transfektion mit spezifischen gRNAs. Unten: PCR-Ergebnisse, die die Entstehung der Fusion bestätigen. H – Transiente Transfektion von SCVI15-Zellen mit dem pTVF-CECC-KRASG12C-Plasmid, das eine konditionale Expression des KRAS-Onkogens erlaubt. Rechtes Panel: FACS-Nachweis von EYFP (aus der STOP-Kassette), starker Fluoreszenzpeak (rot). Linkes Panel: Mit Cre-kotransfizierte Zellen zeigen eine verringerte EYFP-Expression (blau) und eine gleichzeitige Expression des RFP-Markers, der mit KRASG12C co-exprimiert wird. Die Zellen wurden 24 h nach Transfektion für FACS und Western Blot geerntet. I – Western Blot zur Bestätigung der KRASG12C-Expression in den Zellen aus H. J – Erfolgreiche Inaktivierung des RB1-Tumorsuppressorgens in iPSC-Zellen. WTSIi004-A-iCG-Zellen wurden mit dem pTVF-gRNA-Vektor transfiziert. Nach Selektion mit Hygromycin wurde Cas9 durch Doxycyclin induziert, genomische DNA isoliert und der Zielbereich per PCR amplifiziert und sequenziert. Die Ergebnisse wurden mit dem Online-Tool TIDE (Tracking of Indels by DEcomposition) analysiert.

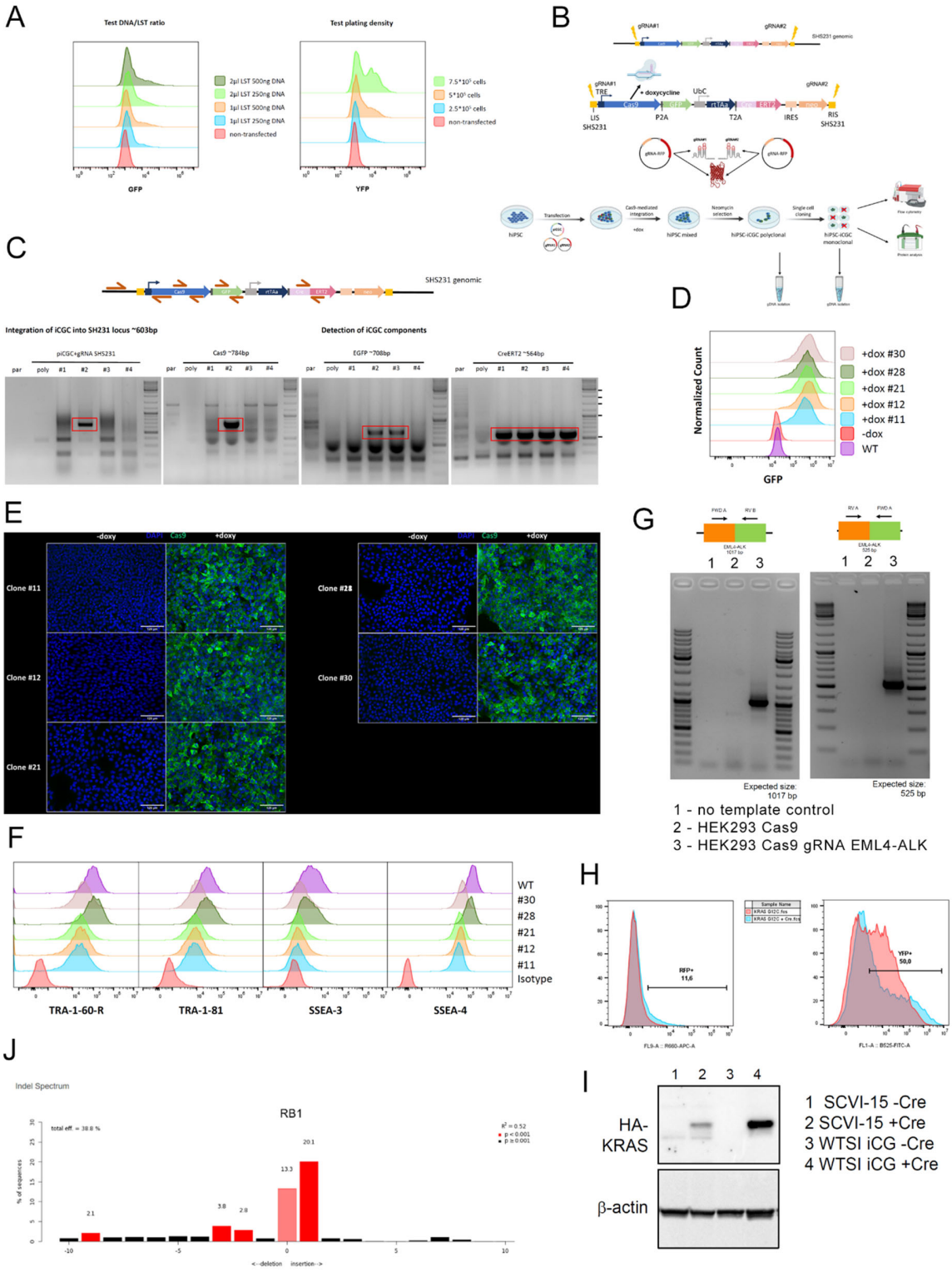

A
Test DNA/LST ratio
2µl LST 500ng DNA
2µl LST 250ng DNA
1µl LST 500ng DNA
1µl LST 250ng DNA
non-transfected
GFP
Test plating density
7.5*10^5 cells
5*10^5 cells
2.5*10^5 cells
non-transfected
YFP
B
gRNA#1
gRNA#2
SHS231 genomic
+ doxycycline
UbC
rtTA
Cas9
EGFP
P2A
T2A
IRES
LIS SHS231
RIS SHS231
hiPSC
Transfection
Cas9-mediated integration
+dox
hiPSC mixed
Neomycin selection
hiPSC-iCGC polyclonal
Single cell cloning
hiPSC-iCGC monoclonal
Flow cytometry
Protein analysis
C
SHS231 genomic
Integration of iCGC into SH231 locus ~603bp
Detection of iCGC components
piCGC+gRNA SHS231
Cas9 ~784bp
EGFP ~708bp
CreERT2 ~564bp
par
poly
#1
#2
#3
#4
D
Normalized Count
+dox #30
+dox #28
+dox #21
+dox #12
+dox #11
-dox
WT
GFP
E
-doxy
DAPI
Cas9
+doxy
Clone #11
Clone #12
Clone #21
Clone #28
Clone #30
G
FWD A
RV B
RV A
FWD A
EML4-ALK 1017 bp
EML4-ALK 525 bp
1
2
3
Expected size: 1017 bp
Expected size: 525 bp
1 - no template control
2 - HEK293 Cas9
3 - HEK293 Cas9 gRNA EML4-ALK
F
WT
#30
#28
#21
#12
#11
Isotype
TRA-1-60-R
TRA-1-81
SSEA-3
SSEA-4
H
Sample Name
KRAS G12C fcs
KRAS G12C + Cre fcs
RFP+
11,6
YFP+
50,0
FL9-A :: R660-APC-A
FL1-A :: B525-FITC-A
J
Indel Spectrum
RB1
total eff. = 38.8 %
% of sequences
2.1
3.8
2.8
13.3
20.1
<--deletion insertion-->
I
1
2
3
4
HA-KRAS
β-actin
1 SCVI-15 -Cre
2 SCVI-15 +Cre
3 WTSI iCG -Cre
4 WTSI iCG +Cre

Tabelle 2. Übersicht über die Experimente zur Erzeugung von SCVI15-Zelllinien mit induzierbarer Cas9-Expression

			Pool			Single cell cloning				
Date	Construct	Locus	FACS	PCR	WB	Number of clones	FACS	PCR	WB	Conclusion
08.07.2022	iCGC	SH231	No pool generated			4	X 03.08.2022	X 15.08.2022	(X)	- Clone 4 showed targeted integration in antisense direction, verified by sequencing - no GFP induction in all clones - No Cas9 detection via Western Blot, however positive control was also negative
30.08.2022	iCGC	SH231	X 13.10.2022	X 11.10.2022	X 25.10.2022	-	-	-	-	- Successfull integration in sense and antisense (no sequencing) - No GFP or Cas9 induction - Also, IF staining for Cas9 was negative
20.03.2023	ID-iCG	hROSA	No pool generated			6	X 11.04.2023	-	-	- No GFP expression - Not further tested

Tabelle 3. Übersicht über die Experimente zur Erzeugung von WTSI-Zelllinien mit induzierbarer Cas9-Expression

			Pool			Single cell cloning				
Date	Construct	Locus	FACS	PCR	WB	Number of clones	FACS	PCR	WB	Conclusion
29.10.2022	iCGCv1	SH231	18.11?	-	-	-	-	-	-	- No full characterization done
09.11.2022	iCGCv1	SH231 AAVS1 hROSA	X 23.11.2022	No targeted PCR performed	-	-	-	-	-	- No GFP or Cas9 induction
29.11.2022	iCG	SH231 AAVS1 hROSA	X 19.12.2022	X 01.02.2023	-	-	-	-	-	- Successfull integration in pool, especially in SH231 locus (sequencing 06.02.2023) - No GFP expression
10.02.2023	ID-iCG	hROSA	X 17.04.2023	X 28.06.2023 and TBD	-	34 (5 positive)	X 01.05.2023	TBD	TBD	- Successfull integration in antisense direction in pool (sequencing needs to be done) - 34 clones generated, 5 showed monoclonal GFP induction, X showed mixed-clones with GFP - Genotyping needs to be done - Cas9 expression is validated by Immunostaining and dox-inducible functionality validated by Annikas test with sgRNAs after lentiviral infection

Tabelle 4. Die im Rahmen des Projekts erzeugten genetisch veränderten iPSC-Zelllinien

NN	Cells	Mod.	Targeted to	Selection	Note	Transfected with
1	SCVI-15 #1	EYFP-blasti, mCherry-hygro, ECFP-Zeo		zeocin	CFP+YFP+	
2	SCVI-15 #1	EYFP-blasti, mCherry-hygro, ECFP-Zeo		zeocin	mCherry+	
3	SCVI-15 #4	EYFP-blasti, mCherry-hygro, ECFP-Zeo		blasticidin 10	YFP+	
4	SCVI-15 #4	EYFP-blasti, mCherry-hygro, ECFP-Zeo		blasticidin 10	CFP+	
5	SCVI-15 #4	EYFP-blasti, mCherry-hygro, ECFP-Zeo		hygromycin 250	mCherry+	
6	SCVI-15 #4	EYFP-blasti, mCherry-hygro, ECFP-Zeo		hygromycin 250	mCherry+YFP+	
7	SCVI-15 #4	EYFP-blasti, mCherry-hygro, ECFP-Zeo		zeocin	CFP+	
8	SCVI-15 #4	EYFP-blasti, mCherry-hygro, ECFP-Zeo		zeocin	YFP+	
9	SCVI-15 #3	EYFP-blasti, mCherry-hygro, ECFP-Zeo		blasticidin 10	mCherry+	
10	SCVI-15 #3	EYFP-blasti, mCherry-hygro, ECFP-Zeo		blasticidin 10	YFP+CFP+	
11	SCVI-15 p-GFP-puro-CECC-v1		SHS231	puromycin 1	GFP+	
12	SCVI-15 p-GFP-puro-CECC-v1		SHS231	puromycin 1	GFP+mCherry+	
13	SCVI-15 p-GFP-puro-CECC-v1		SHS231		GFP+	BRAFV600E
14	SCVI-15 p-GFP-puro-CECC-v1		SHS231		GFP+mCherry+	BRAFV600E
15	SCVI-15 p-GFP-puro-CECC-v1		SHS231		mCherry+	transfected with CECC-v1+Pa01 22.11.23
16	SCVI-15 #1	EYFP-blasti, mCherry-hygro, ECFP-Zeo	hROSA26, SHS231 and AAVS1	zeocin	unsorted pool	
17	SCVI-15 #4	EYFP-blasti, mCherry-hygro, ECFP-Zeo	hROSA26, SHS231 and AAVS1	blasticidin 10	unsorted pool	
18	SCVI-15 #4	EYFP-blasti, mCherry-hygro, ECFP-Zeo	hROSA26, SHS231 and AAVS1	hygromycin 250	unsorted pool	
19	SCVI-15 #4	EYFP-blasti, mCherry-hygro, ECFP-Zeo	hROSA26, SHS231 and AAVS1	zeocin	unsorted pool	
20	SCVI-15 #3	EYFP-blasti, mCherry-hygro, ECFP-Zeo	hROSA26, SHS231 and AAVS1	blasticidin 10	unsorted pool	
21	SCVI-15 p-GFP-puro-CECC-v1		SHS231	puromycin 1	unsorted pool	
22	SCVI-15 #1L	EYFP-blasti, mCherry-hygro, ECFP-Zeo	hROSA26, SHS231 and AAVS1	zeocin	ECFP+EYFP+	pTCV-DONR-iCG-atBGT
23	SCVI-15 #1L	EYFP-blasti, mCherry-hygro, ECFP-Zeo	hROSA26, SHS231 and AAVS1	zeocin	ECFP+EYFP+	pTCV-DONR-CECC-v1
24	SCVI-15 #2L	EYFP-blasti, mCherry-hygro, ECFP-Zeo	hROSA26, SHS231 and AAVS1	blasticidin	EYFP+	pTCV-DONR-iCG-
25	SCVI-15 #3L	EYFP-blasti, mCherry-hygro, ECFP-Zeo	hROSA26, SHS231 and AAVS1	hygromycin	mCherry+	pTCV-DONR-iCG
26	SCVI-15 #4L	EYFP-blasti, mCherry-hygro, ECFP-Zeo	hROSA26, SHS231 and AAVS1	zeocin	ECFP+	pTCV-DONR-iCG-atBGT
27	SCVI-15 #5L	EYFP-blasti, mCherry-hygro, ECFP-Zeo	hROSA26, SHS231 and AAVS1	blasticidin	mCherry+	pTCV-DONR-iCG
28	SCVI-15 #1L	EYFP-blasti, mCherry-hygro, ECFP-Zeo	hROSA26, SHS231 and AAVS1	zeocin	CFP+YFP+	pTCV-DONR-iCG-atBGT (H285),pTCV-DONR-CECC-v1 (H269)
29	SCVI-15 #5S	EYFP-blasti, mCherry-hygro, ECFP-Zeo	hROSA26, SHS231 and AAVS1	blasticidin 10ug/ml	YFP+CFP+	pTCV-DONR-iCG-atBCT ,pTCV-DONR-CECC-v1-atBGT
30	SCVI-15 #1L CECC-v1	EYFP-blasti, mCherry-hygro, ECFP-Zeo	hROSA26, SHS231 and AAVS1	zeocin, puromycin 1ug/ml	ECFP+EYFP+mCh	pTCV-DONR-TP53R175HHA
31	SCVI-15 #1L CECC-v1	EYFP-blasti, mCherry-hygro, ECFP-Zeo	hROSA26, SHS231 and AAVS1	zeocin, puromycin 1ug/ml	ECFP+EYFP+mCh	pTCV-DONR-TP53R248QHA
32	SCVI-15 #1L CECC-v1	EYFP-blasti, mCherry-hygro, ECFP-Zeo	hROSA26, SHS231 and AAVS1	zeocin, puromycin 1ug/ml	ECFP+EYFP+mCh	pTCV-DONR-TP53R273HHA
33	SCVI-15 #1L CECC-v1	EYFP-blasti, mCherry-hygro, ECFP-Zeo	hROSA26, SHS231 and AAVS1	zeocin, puromycin 1ug/ml	ECFP+EYFP+mCh	pTCV-DONR-Cas9-
34	SCVI-15 #3S	EYFP-blasti, mCherry-hygro, ECFP-Zeo	hROSA26, SHS231 and AAVS1	hygromycin 250	mCherry+YFP+	pTCV-DONR-CECC-v1
35	SCVI-15 #3S	EYFP-blasti, mCherry-hygro, ECFP-Zeo	hROSA26, SHS231 and AAVS1	hygromycin 250	mCherry+YFP+	pTCV-DONR-CECC-v1-
36	SCVI-15 #3S	EYFP-blasti, mCherry-hygro, ECFP-Zeo	hROSA26, SHS231 and AAVS1	hygromycin 250	mCherry+YFP+	pTCV-DONR-CECC-v1-atBGT
37	SCVI-15 #1L CECC-v1	EYFP-blasti, mCherry-hygro, ECFP-Zeo	hROSA26, SHS231 and AAVS1	zeocin, puromycin 1ug/ml	ECFP+EYFP+mCh	pTCV-DONR-TP53R175HHA
38	SCVI-15 #1L CECC-v1	EYFP-blasti, mCherry-hygro, ECFP-Zeo	hROSA26, SHS231 and AAVS1	zeocin, puromycin 1ug/ml	ECFP+EYFP+mCh	pTCV-DONR-TP53R248QHA
39	SCVI-15 #1L CECC-v1	EYFP-blasti, mCherry-hygro, ECFP-Zeo	hROSA26, SHS231 and AAVS1	zeocin, puromycin 1ug/ml	ECFP+EYFP+mCh	pTCV-DONR-TP53R273HHA
40	SCVI-15 #1L CECC-v1	EYFP-blasti, mCherry-hygro, ECFP-Zeo	hROSA26, SHS231 and AAVS1	zeocin, puromycin 1ug/ml	ECFP+EYFP+mCh	pTCV-DONR-Cas9-
41	SCVI-15 #3S	EYFP-blasti, mCherry-hygro, ECFP-Zeo	hROSA26, SHS231 and AAVS1	hygromycin 250	mCherry+YFP+	pTCV-DONR-COEC-HA-KRASG12C-
42	SCVI-15 #3S	EYFP-blasti, mCherry-hygro, ECFP-Zeo	hROSA26, SHS231 and AAVS1	hygromycin 250	mCherry+YFP+	pTCV-DONR-COEC-HA-KRASG12C-
43	SCVI-15 #3S	EYFP-blasti, mCherry-hygro, ECFP-Zeo	hROSA26, SHS231 and AAVS1	hygromycin 250	mCherry+YFP+	pTCV-DONR-COEC-EGFR L858R-
44	SCVI-15 #3S	EYFP-blasti, mCherry-hygro, ECFP-Zeo	hROSA26, SHS231 and AAVS1	hygromycin 250	mCherry+YFP+	pTCV-DONR-COEC-EGFR L858R-
45	SCVI-15 #3S	EYFP-blasti, mCherry-hygro, ECFP-Zeo	hROSA26, SHS231 and AAVS1	hygromycin 250	mCherry+YFP+	pTCV-DONR-COEC-PIK3CA E545K-
46	SCVI-15 #3S	EYFP-blasti, mCherry-hygro, ECFP-Zeo	hROSA26, SHS231 and AAVS1	hygromycin 250	mCherry+YFP+	pTCV-DONR-COEC-PIK3CA E545K-
47	SCVI-15 #3S	EYFP-blasti, mCherry-hygro, ECFP-Zeo	hROSA26, SHS231 and AAVS1	hygromycin 250	mCherry+YFP+	pTCV-DONR-COEC-HA-KRASG12C-
48	SCVI-15 #3S	EYFP-blasti, mCherry-hygro, ECFP-Zeo	hROSA26, SHS231 and AAVS1	hygromycin 250	mCherry+YFP+	pTCV-DONR-COEC-HA-KRASG12C-
49	SCVI-15 #3S	EYFP-blasti, mCherry-hygro, ECFP-Zeo	hROSA26, SHS231 and AAVS1	hygromycin 250	mCherry+YFP+	pTCV-DONR-COEC-EGFR L858R-
50	SCVI-15 #3S	EYFP-blasti, mCherry-hygro, ECFP-Zeo	hROSA26, SHS231 and AAVS1	hygromycin 250	mCherry+YFP+	pTCV-DONR-COEC-EGFR L858R-
51	SCVI-15 #3S	EYFP-blasti, mCherry-hygro, ECFP-Zeo	hROSA26, SHS231 and AAVS1	hygromycin 250	mCherry+YFP+	pTCV-DONR-COEC-PIK3CA E545K-
52	SCVI-15 #3S	EYFP-blasti, mCherry-hygro, ECFP-Zeo	hROSA26, SHS231 and AAVS1	hygromycin 250	mCherry+YFP+	pTCV-DONR-COEC-PIK3CA E545K-
53	SCVI-15 #3S CECC-v1-	EYFP-blasti, mCherry-hygro, ECFP-Zeo	hROSA26, SHS231 and AAVS1	hygromycin 250	mCherry+YFP+	pTCV-DONR-TP53R175HHA
54	SCVI-15 #3S CECC-v1-	EYFP-blasti, mCherry-hygro, ECFP-Zeo	hROSA26, SHS231 and AAVS1	hygromycin 250	mCherry+YFP+	pTCV-DONR-TP53R248QHA
55	SCVI-15 #3S CECC-v1-	EYFP-blasti, mCherry-hygro, ECFP-Zeo	hROSA26, SHS231 and AAVS1	hygromycin 250	mCherry+YFP+	pTCV-DONR-TP53R273HHA
56	SCVI-15 #3S CECC-v1-	EYFP-blasti, mCherry-hygro, ECFP-Zeo	hROSA26, SHS231 and AAVS1	hygromycin 250	mCherry+YFP+	pTCV-DONR-Cas9-
57	SCVI-15 #3S COEC-HA-KRASG12C-	EYFP-blasti, mCherry-hygro, ECFP-Zeo	hROSA26, SHS231 and AAVS1	hygromycin 250, blasicidin 10ul/ml	mCherry+YFP+	pTCV-DONR-CECC-v1
58	SCVI-15 #3S COEC-HA-KRASG12C-	EYFP-blasti, mCherry-hygro, ECFP-Zeo	hROSA26, SHS231 and AAVS1	hygromycin 250, blasicidin 10ul/ml	mCherry+YFP+	pTCV-DONR-CECC-v1-
59	SCVI-15 #3S COEC-EGFR L858R-	EYFP-blasti, mCherry-hygro, ECFP-Zeo	hROSA26, SHS231 and AAVS1	hygromycin 250, blasicidin 10ul/ml	mCherry+YFP+	pTCV-DONR-CECC-v1
60	SCVI-15 #3S COEC-EGFR L858R-	EYFP-blasti, mCherry-hygro, ECFP-Zeo	hROSA26, SHS231 and AAVS1	hygromycin 250, blasicidin 10ul/ml	mCherry+YFP+	pTCV-DONR-CECC-v1-
61	SCVI-15 #3S COEC-PIK3CA E545K-	EYFP-blasti, mCherry-hygro, ECFP-Zeo	hROSA26, SHS231 and AAVS1	hygromycin 250, blasicidin 10ul/ml	mCherry+YFP+	pTCV-DONR-CECC-v1
62	SCVI-15 #3S COEC-PIK3CA E545K-	EYFP-blasti, mCherry-hygro, ECFP-Zeo	hROSA26, SHS231 and AAVS1	hygromycin 250, blasicidin 10ul/ml	mCherry+YFP+	pTCV-DONR-CECC-v1-
63	SCVI-15 #3S CECC-v1	EYFP-blasti, mCherry-hygro, ECFP-Zeo	hROSA26, SHS231 and AAVS1	hygromycin 250, puromycin 0.5 ug/m	mCherry+YFP+	COEC-HA-KRASG12C- +COEC-EGFR L858R-GT
64	SCVI-15 #3S CECC-v1	EYFP-blasti, mCherry-hygro, ECFP-Zeo	hROSA26, SHS231 and AAVS1	hygromycin 250, puromycin 0.5 ug/m	mCherry+YFP+	COEC-HA-KRASG12C- +COEC-PIK3CA E545K-GT
65	SCVI-15 #3S CECC-v1- TP53R175HHA	EYFP-blasti, mCherry-hygro, ECFP-Zeo	hROSA26, SHS231 and AAVS1	hygromycin 250, puromycin 0.5 ug/m	mCherry+YFP+	pTCV-DONR-COEC-HA-KRASG12C-
66	SCVI-15 #3S CECC-v1- TP53R248QHA	EYFP-blasti, mCherry-hygro, ECFP-Zeo	hROSA26, SHS231 and AAVS1	hygromycin 250, puromycin 0.5 ug/m	mCherry+YFP+	pTCV-DONR-COEC-HA-KRASG12C-
67	SCVI-15 #3S CECC-v1- TP53R273HHA	EYFP-blasti, mCherry-hygro, ECFP-Zeo	hROSA26, SHS231 and AAVS1	hygromycin 250, puromycin 0.5 ug/m	mCherry+YFP+	pTCV-DONR-COEC-HA-KRASG12C-
68	SCVI-15 #3S CECC-v1- TP53R175HHA	EYFP-blasti, mCherry-hygro, ECFP-Zeo	hROSA26, SHS231 and AAVS1	hygromycin 250, puromycin 0.5 ug/m	mCherry+YFP+	pTCV-DONR-COEC-EGFR L858R-
69	SCVI-15 #3S CECC-v1- TP53R248QHA	EYFP-blasti, mCherry-hygro, ECFP-Zeo	hROSA26, SHS231 and AAVS1	hygromycin 250, puromycin 0.5 ug/m	mCherry+YFP+	pTCV-DONR-COEC-EGFR L858R-
70	SCVI-15 #3S CECC-v1- TP53R273HHA	EYFP-blasti, mCherry-hygro, ECFP-Zeo	hROSA26, SHS231 and AAVS1	hygromycin 250, puromycin 0.5 ug/m	mCherry+YFP+	pTCV-DONR-COEC-EGFR L858R-
71	SCVI-15 #3S CECC-v1- Cas9-	EYFP-blasti, mCherry-hygro, ECFP-Zeo	hROSA26, SHS231 and AAVS1	hygromycin 250	mCherry+YFP+	pEF_Cre-NLS_Blast (F811)
72	SCVI-15 p-GFP-puro-CECC-v1	GFP-Puro into hROSA26		puromycin 1	GFP+mCherry+	pTCV-DONR-Cas9- (H243)
73	SCVI-15 #3S CECC-v1- TP53R175HHA	EYFP-blasti, mCherry-hygro, ECFP-Zeo	hROSA26, SHS231 and AAVS1	hygromycin 250	mCherry+YFP+	pEF_Cre-NLS_Blast (F811)
74	SCVI-15 #3S CECC-v1- TP53R248QHA	EYFP-blasti, mCherry-hygro, ECFP-Zeo	hROSA26, SHS231 and AAVS1	hygromycin 250	mCherry+YFP+	pEF_Cre-NLS_Blast (F811)
75	SCVI-15 #3S CECC-v1- TP53R273HHA	EYFP-blasti, mCherry-hygro, ECFP-Zeo	hROSA26, SHS231 and AAVS1	hygromycin 250	mCherry+YFP+	pEF_Cre-NLS_Blast (F811)
76	SCVI-15 p-GFP-puro-CECC-v1 Cas9-	GFP-Puro into hROSA26		puromycin 1	GFP+mCherry+	pEF_Cre-NLS_Blast (F811)
77	SCVI-15 #3S COEC-HA-KRASG12C- pTCV-DONR-CECC-v1	EYFP-blasti, mCherry-hygro, ECFP-Zeo	hROSA26, SHS231 and AAVS1	n 250, blasicidin 10ul/ml, puromycin	mCherry+YFP+	pEF_Cre-NLS_Blast (F811)
78	SCVI-15 #3S COEC-HA-KRASG12C- pTCV-DONR-CECC-v1-	EYFP-blasti, mCherry-hygro, ECFP-Zeo	hROSA26, SHS231 and AAVS1	n 250, blasicidin 10ul/ml, puromycin	mCherry+YFP+	pEF_Cre-NLS_Blast (F811)
79	SCVI-15 #3S COEC-HA-KRASG12C- pTCV-DONR-CECC-v1-	EYFP-blasti, mCherry-hygro, ECFP-Zeo	hROSA26, SHS231 and AAVS1	n 250, blasicidin 10ul/ml, puromycin	mCherry+YFP+	pEF_Cre-NLS_Blast (F811)
80	SCVI-15 p-GFP-puro-CECC-v1-BRAFV600E (7L)		SHS231		GFP+	pEF_Cre-NLS_Blast (F811)
81	SCVI-15 p-GFP-puro-CECC-v1-BRAFV600E (7S)		SHS231		GFP+mCherry+	pEF_Cre-NLS_Blast (F811)
82	SCVI-15 #3S COEC-EGFR L858R- CECC-v1	EYFP-blasti, mCherry-hygro, ECFP-Zeo	hROSA26, SHS231 and AAVS1	n 250, blasicidin 10ul/ml, puromycin	mCherry+YFP+	pEF_Cre-NLS_Blast (F811)
83	SCVI-15 #3S COEC-EGFR L858R- CECC-v1-	EYFP-blasti, mCherry-hygro, ECFP-Zeo	hROSA26, SHS231 and AAVS1	n 250, blasicidin 10ul/ml, puromycin	mCherry+YFP+	pEF_Cre-NLS_Blast (F811)
84	SCVI-15 #3S CECC-v1- TP53R175HHA COEC-HA-KRAS G12C-	EYFP-blasti, mCherry-hygro, ECFP-Zeo	hROSA26, SHS231 and AAVS1	hygromycin 250, puromycin 0.5 ug/m	mCherry+YFP+	pEF_Cre-NLS_Blast (F811)
85	SCVI-15	NKX2.1-GFP-Puro-HDR-tag		puromycin 0.5 ug/ml	2.1-GFP-Puro-HDI	NKX2.1-GFP-Puro-HDR-tag
1	WTSI-iCGI#28	p-GFP-puro , p-mCherry-hygro , p-ECFP-ze	AAVS1, hROSA26, SHS231	Puromycin 1ug/ml	ool after selection	
2	WTSI-iCGI#28	p-GFP-puro , p-mCherry-hygro , p-ECFP-ze	AAVS1, hROSA26, SHS231	Puromycin 1ug/ml	ool after selection	
3	WTSI-iCGI#28	p-GFP-puro , p-mCherry-hygro , p-ECFP-ze	AAVS1, hROSA26, SHS231	Puromycin 1ug/ml	ool after selection	
4	WTSI-iCGI#28	p-GFP-puro , p-mCherry-hygro , p-ECFP-ze	AAVS1, hROSA26, SHS231	Puromycin 1ug/ml	ool after selection	
5	WTSI-iCGI#28-#1-1	p-GFP-puro , p-mCherry-hygro , p-ECFP-ze	AAVS1, hROSA26, SHS231	Puromycin 1ug/ml	copGFP	
6	WTSI-iCGI#28-#1-2	p-GFP-puro , p-mCherry-hygro , p-ECFP-ze	AAVS1, hROSA26, SHS231	Puromycin 1ug/ml	ECFP	
7	WTSI-iCGI#28-#1-3	p-GFP-puro , p-mCherry-hygro , p-ECFP-ze	AAVS1, hROSA26, SHS231	Puromycin 1ug/ml	mCherry	
8	WTSI-iCGI#28-#2-1	p-GFP-puro , p-mCherry-hygro , p-ECFP-ze	AAVS1, hROSA26, SHS231	Puromycin 1ug/ml	copGFP	
9	WTSI-iCGI#28-#2-2	p-GFP-puro , p-mCherry-hygro , p-ECFP-ze	AAVS1, hROSA26, SHS231	Puromycin 1ug/ml	ECFP	
10	WTSI-iCGI#28-#2-3	p-GFP-puro , p-mCherry-hygro , p-ECFP-ze	AAVS1, hROSA26, SHS231	Puromycin 1ug/ml	mCherry	
11	WTSI-iCGI#28-#3-1	p-GFP-puro , p-mCherry-hygro , p-ECFP-ze	AAVS1, hROSA26, SHS231	Puromycin 1ug/ml	copGFP	
12	WTSI-iCGI#28-#3-2	p-GFP-puro , p-mCherry-hygro , p-ECFP-ze	AAVS1, hROSA26, SHS231	Puromycin 1ug/ml	ECFP	
13	WTSI-iCGI#28-#3-3	p-GFP-puro , p-mCherry-hygro , p-ECFP-ze	AAVS1, hROSA26, SHS231	Puromycin 1ug/ml	mCherry	
14	WTSI-iCGI#28-#4-1	p-GFP-puro , p-mCherry-hygro , p-ECFP-ze	AAVS1, hROSA26, SHS231	Puromycin 1ug/ml	copGFP	
15	WTSI-iCGI#28-#4-2	p-GFP-puro , p-mCherry-hygro , p-ECFP-ze	AAVS1, hROSA26, SHS231	Puromycin 1ug/ml	ECFP	
16	WTSI-iCGI#28-#4-3	p-GFP-puro , p-mCherry-hygro , p-ECFP-ze	AAVS1, hROSA26, SHS231	Puromycin 1ug/ml	mCherry	
17	WTSI-iCGI#28-#1-3	p-GFP-puro , p-mCherry-hygro , p-ECFP-ze	AAVS1, hROSA26, SHS231	Puromycin 0.5ug/ml	mCherry	
18	WTSI-iCGI#28-#4-3	p-GFP-puro , p-mCherry-hygro , p-ECFP-ze	AAVS1, hROSA26, SHS231	Puromycin 0.5ug/ml	mCherry	
19	WTSI-iCGI#28-#3-1	p-GFP-puro , p-mCherry-hygro , p-ECFP-ze	AAVS1, hROSA26, SHS231	Puromycin 1ug/ml	copGFP	
20	WTSI-iCGI#28-#4-1	p-GFP-puro , p-mCherry-hygro , p-ECFP-ze	AAVS1, hROSA26, SHS231	Puromycin 1ug/ml	copGFP	
21	WTSI-iCGI#28-#3-1 gRNA-2	p-GFP-puro , p-mCherry-hygro , p-ECFP-ze	AAVS1, hROSA26, SHS231	Puromycin 1ug/ml	copGFP	
22	WTSI-iCGI#28-#4-1 gRNA-2	p-GFP-puro , p-mCherry-hygro , p-ECFP-ze	AAVS1, hROSA26, SHS231	Puromycin 1ug/ml	copGFP	
23	WTSI-iCGI#28-#1-3 gRNA-2	p-GFP-puro , p-mCherry-hygro , p-ECFP-ze	AAVS1, hROSA26, SHS231	romycin 1ug/ml, hygromycin 125ug/	mCherry	
24	WTSI-iCGI#28-#1-3 gRNA-2	p-GFP-puro , p-mCherry-hygro , p-ECFP-ze	AAVS1, hROSA26, SHS231	romycin 1ug/ml, hygromycin 125ug/	mCherry	
25	WTSI-iCGI#28-#4-3 gRNA-2	p-GFP-puro , p-mCherry-hygro , p-ECFP-ze	AAVS1, hROSA26, SHS231	Puromycin 1ug/ml	copGFP	
26	WTSI-iCGI#28-#4-3 gRNA-2	p-GFP-puro , p-mCherry-hygro , p-ECFP-ze	AAVS1, hROSA26, SHS231	Puromycin 1ug/ml	copGFP	
27	WTSI-iCGI#28					
28	WTSI-iCGI#28-#4-3 gRNA-2	p-GFP-puro , p-mCherry-hygro , p-ECFP-ze	AAVS1, hROSA26, SHS231	Puromycin 1ug/ml	copGFP	

Erzeugung von Organoiden aus genetisch veränderten Zellen (AG Timofeev)

Während die in der AG Herold etablierten Protokolle zur gerichteten Differenzierung von iPS-Zellen reproduzierbar und effizient mit der Ausgangszelllinie SCVI15 funktionierten, zeigten die genetisch modifizierten Derivate dieser Linie große Schwankungen in der Differenzierungseffizienz. Gleiches galt für die zweite eingesetzte Linie WTSIi004-A, deren nicht modifizierte Ausgangszellen bereits eine geringere Differenzierungsrate aufwiesen. Obwohl die Expression von Pluripotenzmarkern (SSEA-3, SSEA-4, TRA-1-81 und TRA-1-60-R) in den getesteten genetisch veränderten SCVI15-Zellen hoch war, war sie in den WTSIi004-A-Derivaten schwächer (Abb. 3A). Zudem zeigte sich, dass hohe Pluripotenz allein keine Garantie für eine effiziente Differenzierung in bestimmte Zelltypen darstellt – diese hängt stark von den verwendeten Protokollen ab. Daher mussten wir die Differenzierungsbedingungen speziell für die genetisch veränderten Zelllinien erneut optimieren.

Da es technisch nicht möglich war, alle transgenen Linien (siehe Tabelle 4) umfassend zu charakterisieren, wählten wir zwei Zelllinien für weiterführende Experimente aus:

1. SCVI15-3S-B3, ein monoklonaler SCVI15-Derivat mit stabil integrierten Konstrukten zur konditionalen Expression von TP53R175H und KRASG12C;
2. WTSI-iCG-28-1-2: ein sortierter polyklonaler WTSIi004-A-Derivat mit induzierbarer Expression von Cas9-GFP und einer gRNA-Kassette mit drei gRNAs gegen TP53, EML4 und ALK1.

Die Differenzierung erfolgte auf Basis von drei etablierten Protokollen (Miller et al., 2019; Jackob et al., 2019; Ori et al., 2022), mit kleineren Anpassungen. Wir testeten verschiedene Bedingungen, um eine optimale Zellviabilität und Differenzierungseffizienz zu erreichen: unterschiedliche Plattierungsbeschichtungen (Vitronectin, Matrigel), Methoden und Reagenzien für die Zellplattierung (Accutase für Einzelzellplattierung oder Versene-Lösung und Dispase für die Plattierung in Zellklumpen), sowie verschiedene Plattierungstechniken (direkte Plattierung in Differenzierungsmedium oder zunächst in E8-Medium, gefolgt von einem Mediumwechsel am nächsten Tag).

Differenzierung zu Lungenorganoiden (AG Timofeev)

Nach der Optimierung der Differenzierungsbedingungen für iPSC-Linien mit Konstrukten zur Induktion onkogener Expression begannen wir mit der Erzeugung von Lungenorganoiden aus diesen Zelllinien. Wir induzierten die Differenzierung zum definitiven Endoderm (DE) und analysierten die Expression der DE-Marker CD117 (c-Kit) und CD184 (CXCR-4) mittels Durchflusszytometrie 72–96 Stunden nach Beginn der Differenzierung (Abb. 3A). Sobald der Anteil doppelt positiver Zellen über 70 % lag, führten wir die Differenzierung für weitere 4–5 Tage in Richtung anterior foregut endoderm (AFE) fort und überprüften die Expression der Marker SOX2 und FOXA2 mittels Immunfluoreszenz oder FACS (Abb. 3B und C). Anschließend setzten wir die Differenzierung für weitere 7–10 Tage in Richtung Lungenvorläuferzellen fort und analysierten die Expression der Oberflächenmarker CD47/CD26 sowie des spezifischen LPC-Markers CPM (Abb. 3D). In diesem Stadium lag der Anteil CMP-positiver LPC-Zellen in der Linie SCVI15-3S-B3 je nach Markerexpression bei 15 % bis 90 % (Abb. 3D). Bei den WTSIi004-A-Derivaten lag der Anteil bei 10 % bis 50 %, was darauf hindeutet, dass diese Linie weniger zur Differenzierung in Lungenepithel geeignet ist (Abb. 3D). Um die Fähigkeit genetisch veränderter Zellen zur Bildung von 3D-Organoiden zu testen, plattierten wir die Zellen an Tag 14–15 der

Differenzierung ohne Sortierung in Matrigel, bei variabler Zelldichte, und führten die Differenzierung gemäß dem Protokoll von Ori et al. fort, das sich in früheren Experimenten als besonders effizient erwiesen hatte. Die Zellen wurden mit LO-Differenzierungsmedium behandelt und mikroskopisch überwacht. Bereits nach 5–10 Tagen in 3D-Kultur bildeten sich kugelförmige Strukturen. Die Morphologie der Organoide, die aus WTSI-iCG-28-1-2 und SCVI15-3S-B3 hervorgingen, war vergleichbar und entsprach der von alveolären Organoiden, wie sie in der Literatur (Jackob et al., 2019; Ori et al., 2022) beschrieben sind (Abb. 3E, Tag 28).

Charakterisierung der Organoide (AG Timofeev)

Zur weiteren Charakterisierung sammelten wir die Organoide nach 14 bis 40 Tagen in 3D-Kultur, fixierten sie mit PFA und verwendeten sie für Immunfärbungen und fluoreszenzmikroskopische Analysen. Wie in Abbildung 3F dargestellt, konnten wir in allen Sphäroiden den epithelialen Marker E-Cadherin nachweisen. Darüber hinaus identifizierten wir Organoide mit Expression des NKX2-1-Proteins, einem Marker für Typ-2-Alveolarzellen (AT2), die charakteristisch für das alveoläre Kompartiment sind. In einigen wenigen Organoiden wurde außerdem p63 exprimiert – ein Protein, das typischerweise in proximalen Lungenepithelzellen vorkommt. Damit konnten wir bestätigen, dass unsere genetisch modifizierten iPS-Zellen, die Konstrukte zur onkogenen Aktivierung tragen, in der Lage sind, sich zu differenzieren und Lungenorganoide zu bilden..

Induktion der Onkogenexpression in Organoiden (AG Timofeev)

Als Nächstes zielten wir auf die Aktivierung der Onkogenexpression in Organoiden ab. Um die Expression zu induzieren, mussten wir die Cre-Rekombinase verwenden, die die Exzision der STOP-Kassette bewirkt und dadurch die Transkription der Transgene TP53R175H und KRASG12C ermöglicht. Für die Übertragung von Cre entschieden wir uns für adenovirale Vektoren und testeten zunächst verschiedene Infektionsbedingungen mithilfe eines Adenovirus, das GFP exprimiert. Wir konnten Bedingungen etablieren, die eine akzeptable Effizienz bei gleichzeitig geringer Toxizität zeigten (Abb. 3G). Die infizierten Organoide wurden über 14 Tage mikroskopisch beobachtet, wobei festgestellt wurde, dass das GFP-Signal in den ersten 2–3 Tagen zunimmt, anschließend aber allmählich abnimmt – in einigen Zellen war es jedoch noch bis zu 10 Tage lang nachweisbar. Nach Etablierung der Bedingungen wurden SCVI15-3S-B3-basierte Organoide (nach 3–3,5 Wochen 3D-Differenzierung im Matrigel) mit AdGFP oder AdGFP+Cre infiziert. In den folgenden 8 Tagen wurden die Organoide mikroskopisch beobachtet. Bei AdGFP+Cre zeigte sich in einigen Organoiden eine verstärkte Proliferation von GFP-positiven Zellen in tumorartigen Clustern (Abb. 3H). Bei AdGFP allein war die GFP-Expression kurzzeitig nachweisbar, die Zellen bildeten jedoch keine kompakten Strukturen. Diese Proliferation ist vermutlich auf die Aktivierung der Onkogene zurückzuführen. Allerdings zeigte nur ein kleiner Anteil der infizierten Organoide diesen Effekt, was eine weiterführende Analyse erschwerte. Für die geringe Effizienz der Tumorinduktion gibt es mehrere Erklärungsansätze: Erstens, wie wir aus früheren Experimenten gelernt haben, exprimieren nicht alle Zellen die Onkogene TP53R175H und KRASG12C nach der Transfektion, was auf eine unvollständige Rekombination zurückzuführen sein kann – die Entfernung der STOP-Kassette durch Cre erfolgt nur langsam und nicht mit 100% Effizienz. Zweitens könnte die Onkogenexpression zu schwach oder der Beobachtungszeitraum zu kurz gewesen sein, um eine deutliche Proliferationssteigerung auszulösen. Drittens könnten trotz der Einführung zweier potenter kooperierender Onkogene interne tumorsuppressive Mechanismen die onkogene Signalgebung überwunden und die

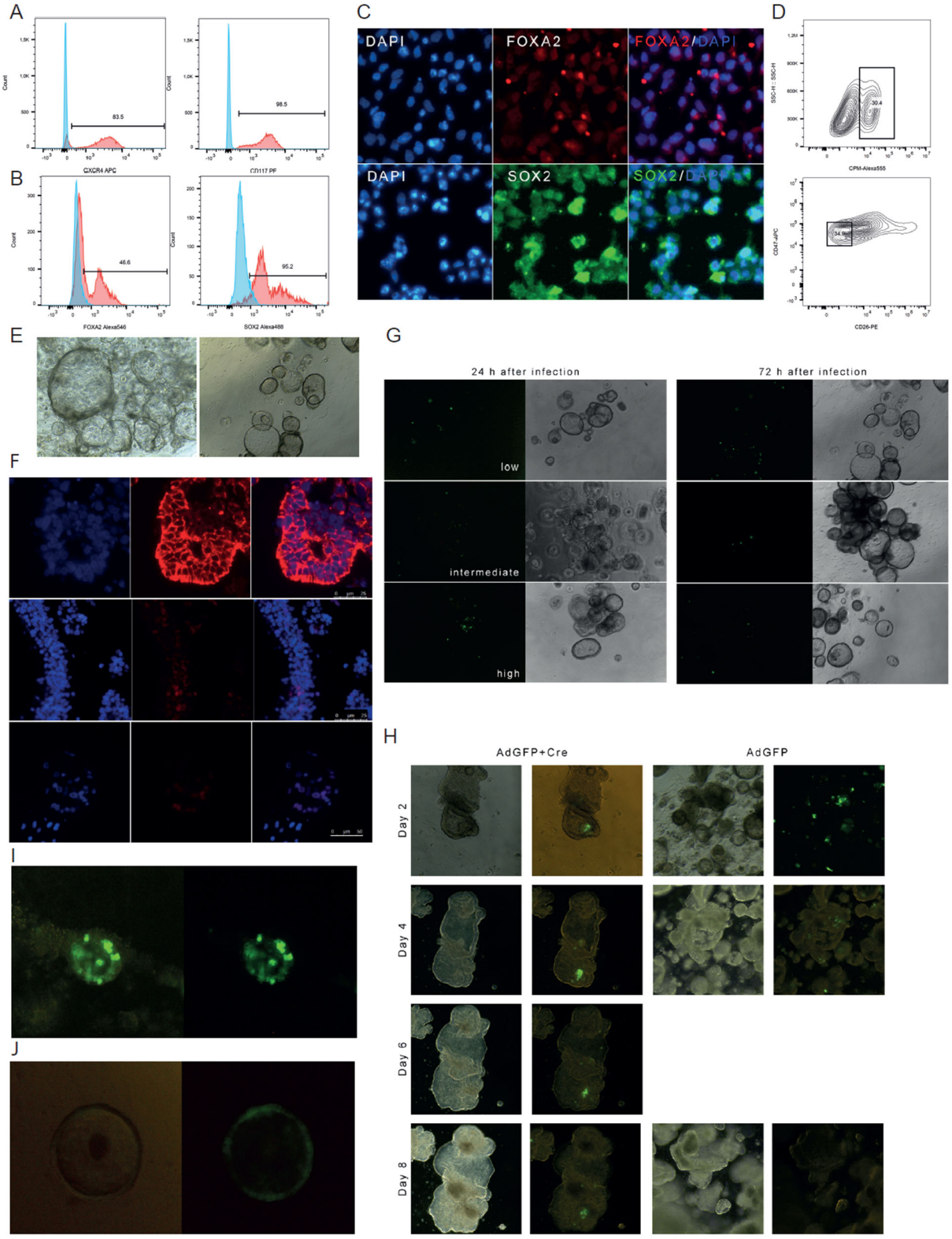
Zellproliferation gestoppt haben. Es ist bekannt, dass auch in vitro nur ein geringer Teil der Zellen, die mit kooperierenden Onkogenen transfiziert wurden, tatsächlich transformiert wird.

Aufgrund des schrittweisen Verlusts der GFP-Expression, die an die transiente Expression des adenoviralen Vektors gebunden war, war eine längerfristige Beobachtung der infizierten Zellen nicht möglich. Die Organoide wurden zwar gesammelt und fixiert, um sie mittels Immunfluoreszenzmikroskopie und qPCR zu charakterisieren, doch aufgrund der Seltenheit von Organoiden mit phänotypischen Veränderungen reichte das Material nicht aus, um innerhalb des vorgesehenen Zeitrahmens eine umfassende Analyse durchzuführen. Trotzdem konnte die Machbarkeit der Methode zur Erzeugung genetisch modifizierter Organoide demonstriert werden – wir arbeiten jedoch weiterhin an der Verbesserung der Effizienz und Reproduzierbarkeit des Verfahrens.

Als Alternative zur adenoviralen Übertragung der Cre-Rekombinase für die konditionale Expression testeten wir einen Ansatz auf Basis einer tetracyclin-induzierbaren Expression mittels lentiviraler Vektoren. Wir etablierten Infektionsbedingungen für Lungenorganoide unter Verwendung eines GFP-Reporters (Abb. 3I). Obwohl die Effizienz geringer war als bei der Adenovirusinfektion, ermöglichte die stabile Transduktion durch Lentiviren eine Anreicherung und Amplifikation transduzierter Organoide. Mit dieser Technik wurden Organoide erzeugt, die eine induzierbare Expression der onkogenen EGFR-A289V-Mutante (gekoppelt an einen GFP-Marker) erlauben. Nach einer Woche Kultivierung konnten 24 Stunden nach Doxycyclin-Zugabe mehrere GFP-positive Organoide nachgewiesen werden (Abb. 3J).

Abbildung 3. Erzeugung und Charakterisierung von Onko-Organoiden.

A – Expression der DE-Marker CD117 (c-Kit) und CD184 (CXCR-4) in SCVI15-3S-B3-Zellen, analysiert mittels Durchflusszytometrie 96 Stunden nach Beginn der Differenzierung. – Expression der AFE-Marker SOX2 und FOXA2 in SCVI15-3S-B3-Zellen, analysiert per FACS an Tag 9 der Differenzierung. C – Immunfluoreszenzfärbung der in B beschriebenen Zellen mit denselben Antikörpern. D – Expression der Markern CD47/CD26 oder CPM, analysiert per Durchflusszytometrie in SCVI15-3S-B3-Zellen an Tag 15 der Differenzierung; etwa 30 % der Zellen entsprechen dem LPC-Phänotyp. E – Morphologie von Lungenorganoiden, erzeugt durch gerichtete Differenzierung von WTSI-iCG-28-1-2 (linkes Panel) und SCVI15-3S-B3 (rechtes Panel) an Tag 35. F – Nachweis von E-Cadherin (oberes Panel), NKX2-1 (mittleres Panel) und p63 (unteres Panel) in Organoiden aus WTSI-iCG-28-1-2 an Tag 40. G – Etablierung der Infektionsbedingungen für Adenoviren in Lungenorganoiden. LO (lung organoids) aus WTSI-iCG-28-1-2 wurden an Tag 40 mit verschiedenen Dosen GFP-kodierender Adenoviren infiziert; grüne Fluoreszenz wurde nach 24 und 72 Stunden überwacht. H – Organoide aus SCVI15-3S-B3-Zellen wurden an Tag 35 mit Adenoviren infiziert, die Cre und GFP exprimieren; die grüne Fluoreszenz wurde über 8 Tage beobachtet. I – LO aus WTSI-iCG-28-1-2 wurden an Tag 31 mit einem lentiviralen Vektor infiziert, der GFP exprimiert; die Fluoreszenz wurde über 10 Tage lang beobachtet. J – Wie in I, jedoch Infektion mit einem Lentivirus, das ein induzierbares EGFRA289V-GFP-Transgen trägt; Nachweis der Expression 24 Stunden nach Zugabe von 1 µg/ml Doxycyclin.


A
B
C
D
E
F
G
H
I
J
DAPI
FOXA2
FOXA2/DAPI
DAPI
SOX2
SOX2/DAPI
24 h after infection
72 h after infection
low
intermediate
high
AdGFP+Cre
AdGFP
Day 2
Day 4
Day 6
Day 8

2.4. Die wichtigsten Positionen des zahlenmäßigen Nachweises

Teilprojekt A, AG Timofeev

Position Personal

Da der geeignete Doktorand für dieses Projekt später als ursprünglich geplant eingestellt wurde, haben wir eine kostenneutrale Verlängerung des Projekts beantragt. Das Projekt begann am 15.11.2021. Die Doktorandenstelle war bis zum Projektende am 14.11.2024 besetzt, Die Personalmittel wurden mit 624,48 € überzogen. Ein Ausgleich erfolgte durch die Position "Sonstige Verwaltungsausgaben". Gem. den NABF dürfen Einzelansätze um bis zu 20 Prozent überschritten werden, soweit die Überschreitung durch entsprechende Einsparungen bei anderen Einzelansätzen ausgeglichen werden kann.

Position Sachmittel/Material

Die beantragten Labormaterialien und weiteren Sachmittel wurden wie vorgesehen für alle oben genannten Arbeiten eingesetzt. Aufgrund erheblicher Preissteigerungen bei Reagenzien – bei einigen Produkten lagen die Kosten zum Zeitpunkt der Beschaffung bis zu doppelt so hoch wie ursprünglich kalkuliert – reichten die verfügbaren Mittel jedoch nicht aus, um Verbrauchsmaterialien für die Einzelzellsequenzierung zu erwerben.

Position Reisen

Die beantragten Reisemittel wurden mit 552,82 € überzogen. Ein Ausgleich erfolgte durch die Position "Sonstige Verwaltungsausgaben". Gem. den NABF dürfen Einzelansätze um bis zu 20 Prozent überschritten werden, soweit die Überschreitung durch entsprechende Einsparungen bei anderen Einzelansätzen ausgeglichen werden kann.

Position Publikationskosten

Die beantragten Mittel konnten nicht verwendet werden, da sich eine Publikation noch in der Vorbereitung befindet.

Sonstige allgemeine Verwaltungsausgaben - Mittelumwidmung

Im Rahmen des Projekts wurde eine Mittelumwidmung aus der Position 0843 (sonstige allgemeine Verwaltungsausgaben) in die Position 0831 (Gegenstände bis 800 EUR) vorgenommen.

Mit den umgewidmeten Mitteln wurde ein kompaktes Mikroskop angeschafft, das in einer biologischen Sicherheitswerkbank installiert werden kann. Der Erwerb dieses Mikroskops war für die Fortführung des Projekts von zentraler Bedeutung.

Bis dahin hatten wir ein herkömmliches Mikroskop verwendet, um mit Organoiden zu arbeiten und Klone genetisch veränderter Zellen zu isolieren. Da dieses Mikroskop jedoch außerhalb steriler Bedingungen eingesetzt werden musste, war die Arbeit mit einem erhöhten Kontaminationsrisiko verbunden. Tatsächlich kam es bereits zu Verlusten wertvoller Zelllinien, deren Herstellung mehrere Wochen bis Monate in Anspruch genommen hatte.

Zur Vermeidung solcher Verluste war ein Mikroskop erforderlich, das innerhalb einer sterilen Biosicherheitswerkbank betrieben werden kann. Nach Prüfung mehrerer Angebote haben wir ein

geeignetes und kostengünstiges Modell ausgewählt, das für 787,74 Euro (inkl. MwSt) beschafft wurde. Das Mikroskop bleibt dauerhaft im Einsatz und wird weiterhin im Labor verwendet.

2.5. Notwendigkeit und Angemessenheit der geleisteten Projektarbeiten

Bitte legen Sie dar, warum die Arbeiten ohne die Förderung nicht hätten umgesetzt werden können.

Von den jeweiligen Universitäten werden nur sehr begrenzte Forschungsmittel bereitgestellt. Hiervon wird die Grundausstattung der Labore (z.B. Sicherheitswerkbänke, Inkubatoren) sowie die Grundversorgung (z.B. von CO_2 für die Inkubatoren, Wasseraufbereitung, Büromaterial, Software-Lizenzen, etc.) finanziert. Darüberhinausgehende Drittmittel stehen für 3R-Forschung und dieses konkrete Projekt nicht zur Verfügung. Die Herstellung von menschlichen Lungenorganoiden ist aber ein sehr komplexer, zeit- und kostenintensiver Prozess. Dies ist zum Beispiel auf die notwendige Verwendung von menschlichen Wachstumsfaktoren in Kulturqualität und die hochkomplexen Kulturbedingungen zurückzuführen. Wachsende Organoid-Kulturen müssen z.B. alle zwei Tage mit Wachstumsfaktoren und frischem Kulturmedium versorgt werden. Die Realisierung des Projektes ist daher auf die beantragte Drittmittelfinanzierung angewiesen.

2.6. Voraussichtlicher Nutzen, insbesondere die Verwertbarkeit des Ergebnisses - auch konkrete Planungen für die nähere Zukunft - im Sinne des fortgeschriebenen Verwertungsplans

2.6.1. Wirtschaftliche Erfolgsaussichten

Ziel unseres Projekts ist die Entwicklung einer Plattform, die als Alternative zu Tierversuchen in der Grundlagenforschung, translationalen Medizin und präklinischen Forschung eingesetzt werden kann. Die kommerzielle Nutzung biomedizinischer Technologien führt häufig zu einer eingeschränkten Zugänglichkeit für akademische und gemeinnützige Einrichtungen, die oft über begrenzte finanzielle Mittel verfügen. Um dem entgegenzuwirken, verfolgen wir bewusst einen offenen, gemeinnützigen Verwertungsansatz. Unsere im Projekt entwickelten Technologien – einschließlich Plasmide und Zelllinien – sollen der wissenschaftlichen Gemeinschaft frei zugänglich gemacht werden. Damit leisten wir einen aktiven Beitrag zur Umsetzung der 3R-Prinzipien (Replace, Reduce, Refine) sowie zur Förderung und Verbreitung tierfreier Testsysteme. Die Verteilung erfolgt über etablierte, gemeinnützige Organisationen wie Addgene oder im Rahmen wissenschaftlicher Kooperationen. Damit schaffen wir eine niedrigschwellige und nachhaltige Verwertungsstruktur, die sowohl wissenschaftliche als auch ethische Standards fördert und eine breite Anwendung ermöglicht – auch über die Laufzeit des Projekts hinaus.

2.6.2. Wissenschaftliche / technische Erfolgsaussichten

Im Rahmen des Projekts wurden wesentliche technologische Grundlagen für die präzise genetische Modifikation humaner iPS-Zellen sowie deren differenzierte Anwendung in komplexen 3D-Modellen gelegt. Mit dem TRAIT-System (Toolbox for Rapid Assembly of Integration Templates) steht nun ein leistungsfähiges, flexibel einsetzbares Vektor-Toolkit zur Verfügung, das den schnellen Aufbau stabil integrierter, multizistronischer Expressionskassetten erlaubt. Dieses System ist kompatibel mit bewährten Klonierungstechnologien (Golden Gate und Gateway®) und

ermöglicht die effiziente Kombination regulatorischer Elemente, Marker, Reportergene und Transgene.

Durch Etablierung iPSC-basierter Zelllinien mit induzierbarer Expression von CRISPR/Cas9-Komponenten, Cre-Rekombinase und onkogenen Transgenen konnte eine Plattform geschaffen werden, die sowohl für funktionelle Genanalysen als auch für krankheitsbezogene Modellierung – insbesondere in onkologischen Kontexten – von hoher Relevanz ist. Die erfolgreiche Differenzierung dieser Linien in Lungenorganoide mit reproduzierbarer Expression alveolärer und epithelialer Marker (u. a. NKX2-1, p63, E-Cadherin) unterstreicht das Potenzial für die Modellierung spezifischer Krankheitsprozesse in vitro.

Besonders hervorzuheben ist die Möglichkeit zur kontrollierten Aktivierung onkogener Mutationen innerhalb der Organoide, z. B. mittels adenoviraler oder lentiviraler Induktion, was realitätsnahe Tumormodelle ermöglicht. Die entwickelten Werkzeuge bieten damit eine wertvolle Grundlage für präklinische Studien zur Tumorentstehung, Arzneimitteltestung und personalisierten Medizin.

Langfristig sind eine Erweiterung des TRAIT-Systems, die Etablierung weiterer krankheitsspezifischer iPSC-Modelle sowie die Veröffentlichung und Verfügbarmachung der Vektoren über Addgene geplant. Damit besitzt die Plattform hohe Anschlussfähigkeit an bestehende Forschungsinfrastrukturen und adressiert zentrale Fragestellungen in der translationalen Biomedizin.

2.6.3. Wissenschaftliche und wirtschaftliche Anschlussfähigkeit

Die im Projekt entwickelten Technologien bieten ein hohes Maß an Anschlussfähigkeit sowohl im wissenschaftlichen als auch im wirtschaftlichen Kontext.

Wissenschaftlich knüpft das Projekt unmittelbar an zentrale Fragestellungen der funktionellen Genomforschung, der personalisierten Medizin und der zellbasierten Krankheitsmodellierung an. Die entwickelte TRAIT-Plattform ermöglicht eine systematische und flexible genetische Modifikation humaner iPS-Zellen und Organoide und schafft damit die Grundlage für weiterführende Studien zur Genfunktionsanalyse, zur Untersuchung onkogener Signalwege und zur Modellierung komplexer Erkrankungen in humanen zellulären Kontexten. Durch die Kompatibilität mit etablierten Differenzierungsprotokollen (z. B. für Lungenepithel) ist eine Übertragbarkeit auf andere Organoidmodelle – z. B. für Darm, Leber oder Gehirn – in hohem Maße gegeben.

Die Bereitstellung der Vektoren über Addgene sowie eine geplante Veröffentlichung der Methodik ermöglichen eine breite Nutzung in der wissenschaftlichen Gemeinschaft und fördern die nachhaltige Integration in nationale und internationale Forschungsnetzwerke. Das System ist zudem anschlussfähig an bestehende Programme der Biomedizin, Krebsforschung und Wirkstoffentwicklung.

Wirtschaftlich ergibt sich ein hohes Potenzial für Anwendungen in der präklinischen Testung, etwa zur Identifikation und Validierung von Targets, zur Wirkstoffsicherheit sowie zur Stratifizierung von Patientenmodellen. Die TRAIT-Plattform bietet Biotech- und Pharmaunternehmen einen niederschwelligen Zugang zu stabilen, genetisch definierten Zellmodellen mit präziser Steuerbarkeit – ein zentraler Baustein für die Entwicklung personalisierter Therapien und die Etablierung innovativer Screening-Plattformen.

Darüber hinaus eröffnet die Technologie langfristig Möglichkeiten für Kooperationen mit Industriepartnern, etwa im Bereich Onkologie, zellbasierter Diagnostik oder zelltherapeutischer Entwicklungen, und könnte mittelfristig auch zur Gründung von Ausgründungen (Spin-offs) beitragen.

2.7. Während der Durchführung des Vorhabens dem Zuwendungsempfänger bekannt gewordener Fortschritt auf dem Gebiet des Vorhabens bei anderen Stellen

In den letzten zwei Jahren wurden bedeutende Fortschritte im Bereich der iPSC-basierten Lungenorganoidforschung erzielt, die sowohl die Modellierung von Lungenerkrankungen als auch die Entwicklung präklinischer Testsysteme vorantreiben. Verbesserte Differenzierungsprotokolle: Neue Methoden ermöglichen die effiziente Differenzierung humaner iPS-Zellen in 3D-Lungenorganoide, die sowohl proximale als auch distale Atemwegstrukturen enthalten. Diese Organoide zeigen eine realitätsnahe Zellarchitektur und können über 90 Tage kultiviert werden, was sie für Langzeitstudien geeignet macht. Es wurden matrixfreie Verfahren entwickelt, die die Herstellung von Lungenorganoiden ohne den Einsatz von Matrigel ermöglichen. Diese Methoden verbessern die Reproduzierbarkeit und Standardisierung der Organoidkulturen.

2.8. Erfolgte oder geplante Veröffentlichungen des Ergebnisses nach Nr. 5 der NKBF/NABF

Die im Rahmen des Projekts erzielten Ergebnisse wurden in Form von Posterpräsentationen auf zahlreichen wissenschaftlichen Konferenzen vorgestellt (DZL-Tagung 2023, 2024, EMBO-Konferenz 2023, ISSCR-Tagung 2024, UCT-Konferenzen 2023, 2024). Die im Rahmen des Vorhabens entwickelten Technologien bieten ein hohes Potenzial für wissenschaftliche Veröffentlichungen in anerkannten Fachzeitschriften. In naher Zukunft planen wir die Publikation unseres genetischen Systems TRAIT (Toolbox for Rapid Assembly of Integration Templates), das eine flexible und effiziente Plattform für die gezielte Geneditierung in humanen iPS-Zellen und Organoiden darstellt. Die Veröffentlichung wird sich auf die methodische Innovation, die Modularität des Systems und dessen Anwendbarkeit in der funktionellen Genomik konzentrieren. Darüber hinaus ist eine weitere Publikation des Organoid-Systems zur onkogenen Modellierung in humanen iPSC-basierten Lungenorganoiden vorgesehen. Hierbei soll insbesondere der Einsatz von konditional aktivierbaren Onkogenen, die CRISPR/Cas9-Integration, sowie die erfolgreiche Differenzierung und Charakterisierung der Organoide im Vordergrund stehen.

Anhang

Tabelle 1B. Vollständige Liste der im Rahmen des Projekts erzeugten und verwendeten Plasmide.

N	Plasmid name
1	pCRbluntII-IRESneo
2	SGL40C.EFS.RFP657-sgRNA1-SH231
3	SGL40C.EFS.RFP657-sgRNA2-SH231
4	pUC19-iCas9-CreERT2
5	pMK-RQ-T2ACreERT2
6	pUC19-SH231-5'-iCas9-CreERT2
7	pUC57-SH231-3prime
8	pUC19-SH231-iCas9-CreERT2-IRES-neo (piCGC)
9	pSpCas9(BB)-2A-Puro-gRNA-EML4V2#5
10	pSpCas9(BB)-2A-Puro-gRNA-EML4V2#6
11	pSpCas9(BB)-2A-Puro-gRNA-EML4V2#7
12	pSpCas9(BB)-2A-Puro-gRNA-CD74-Ch
13	pSpCas9(BB)-2A-Puro-gRNA-ROS1-Ch
14	pSpCas9(BB)-2A-Puro-gRNA-KIF5B-Ch
15	pSpCas9(BB)-2A-Puro-gRNA-RET-Ch
16	pSpCas9(BB)-2A-Puro-gRNA-ALK-Ch
17	pSpCas9(BB)-2A-Puro-gRNA-ALK#1
18	pSpCas9(BB)-2A-Puro-gRNA-ALK#2
19	pSpCas9(BB)-2A-Puro-gRNA-ALK#3
20	pSpCas9(BB)-2A-Puro-gRNA-EML4V1Ch
21	pSpCas9(BB)-2A-Puro-gRNA-EML4V1Pe
22	pSpCas9(BB)-2A-Puro-gRNA-EML4V1#4
23	pSpCas9(BB)-2A-Puro-gRNA-EML4V3Zh
24	pSpCas9(BB)-2A-Puro-gRNA-EML4V3#8
25	pSpCas9(BB)-2A-Puro-gRNA-EML4V3#9
26	pSpCas9(BB)-2A-Puro-gRNA-EML4V3#10
27	pBabe-EGFR-L858R
28	pCIG-PIK3CA-E545K
29	pBabe-HA-KRAS-G12D
30	pSpCas9(BB)-2A-Puro-gRNA1-SH231
31	pSpCas9(BB)-2A-Puro-gRNA2-SH231
32	pUC57
33	pCRbluntII-TOPO-AAVS1-LHA
34	pCRbluntII-TOPO-CDKN2A-LHA
35	pCRbluntII-TOPO-CDKN2A-RHA
36	pCRbluntII-TOPO-hROSA26-RHA
37	pCRbluntII-TOPO-KEAP1-RHA
38	pCRbluntII-TOPO-STK11-RHA
39	pCR2.1-TOPO-hROSA26-LHA
40	pCR2.1-TOPO-AAVS1-RHA
41	pCR2.1-TOPO-KEAP1-LHA
42	pCR2.1-TOPO-STK11-LHA
43	pTCV
44	pUC57-GAs-II
45	pUC57-GAs-IA
46	pUC57-GAs-IB
47	pTCV-BsaI-free
48	SGL40C.EFS.RFP657-sgRNACDKN2A-L
49	SGL40C.EFS.RFP657-sgRNACDKN2A-R
50	SGL40C.EFS.RFP657-sgRNA-STK11-L

51	SGL40C.EFS.RFP657-sgRNA-STK11-R1
52	SGL40C.EFS.RFP657-sgRNA-STK11-R2
53	SGL40C.EFS.RFP657-sgRNA-STK11-R3
54	SGL40C.EFS.RFP657-sgRNA-KEAP1-L
55	SGL40C.EFS.RFP657-sgRNA-KEAP1-R1
56	SGL40C.EFS.RFP657-sgRNA-KEAP1-R2
57	SGL40C.EFS.RFP657-sgRNA-KEAP1-R3
58	pCR-XL2-TOPO-EGFR-L858R
59	pCR2.1-TOPO-HA-KRAS-G12D
60	pCR2.1-TOPO-KRAS-G12C
61	pCR2.1-TOPO-ECFP
62	pTCV-CDKN2A-HITI
63	pCRbluntII-TOPO-T2A-RFP
64	SGL40C.EFS.RFP657-sgRNA-TP53-1
65	SGL40C.EFS.RFP657-sgRNA-TP53-2
66	pCECC
67	pUC57-ECFP-STOP (KOC)
68	pCR-XL2-TOPO-PIK3CA E545K
69	pENTR-KOC
70	pTCV-hROSA26-HITI
71	pTCV-KEAP1-HITI
72	pCOEC-HA-KRASG12C
73	pTKO-KEAP1-HITI
74	pTCV-CDKN2A-HITI-1
75	pTCV-STK11-HITI
76	pTKO-STK11-HITI
77	pTKO-CDKN2A-HITI-1
78	pCOEC-HA-RAS G12D
79	pENTR-COEC-HA-KRASG12C
80	pCOEC-EGFR L858R
81	pTCV-AAVS1new-HITI
82	SGL40C.EFS.RFP657 -sgRNA-AAVS1-KK
83	SGL40C.EFS.RFP657 -sgRNA-AAVS1-new
84	pENTR-COEC-HA-KRASG12D
85	pTOC-AAVS1-HA-KRASG12C
86	pTOC-hROSA26-HA-KRASG12C
87	pTOC-AAVS1-HA-KRASG12D
88	pTOC-hROSA26-HA-KRASG12D
89	SGL40C.EFS.RFP657-gRNA2-hROSA26
90	SGL40C.EFS.RFP657 -sgRNA1-hROSA26
91	pENTR-COEC-EGFR L858R
92	pTOC-AAVS1-EGFR L858R
93	pTOC-hROSA26-EGFR L858R
94	pCOEC-PIK3CA E545K
95	pEGFP-N1
96	pENTR-COEC-PIK3CA E545K
97	pTOC-AAVS1-PIK3CA E545K
98	pTOC-hROSA26-PIK3CA E545K
99	pAAV-EF1a-vCre
100	pAAV-EF1a-Flpo
101	pAAV-Ef1a-Coff/Fon-oScarlet

102	pAAV-Ef1a-Con/Foff 2.0-oScarlet
103	pAAV-Ef1a-Con/Fon-oScarlet
104	pAAV-nEF-Con/Fon/Von eYFP
105	pUC57-iCGCv1
106	pENTR-iCGCv1
107	pTCV-iCGCv1-SHS231-HITI
108	pTCV-BbsI-only
109	pTCV-BsaI-only
110	pSpCas9(BB)-2A-Puro(PX459)-FrSe0
111	pSpCas9(BB)-2A-Puro(PX459)-FrSe+1
112	pSpCas9(BB)-2A-Puro(PX459)-FrSe+2
113	pUC57-Myc-DHFR
114	pUC57-mCherry
115	pTVF-FrSe0-BbsI
116	pTVF-FrSe+1-BbsI
117	pTVF-FrSe+2-BbsI
118	pTVF-FrSe0-BsaI
119	pTVF-FrSe+1-BsaI
120	pTVF-FrSe+2-BsaI
121	pSpCas9(BB)-2A-Puro(PX459)v2 -BsaI
122	pTCV-FS-HITI
123	pUC57-mCherry-BsaI-free
124	pUC57-iCGDC
125	pCECCv2
126	pTVF0-sgRNAx-BbsI
127	pTVF+1-sgRNAx-BbsI
128	pTVF+2-sgRNAx-BbsI
129	pTVF0-sgRNAx-BsaI
130	pTVF+1-sgRNAx-BsaI
131	pTVF+2-sgRNAx-BsaI
132	pENTR-mCherry-BsaI-free
133	pTCV-SHS231-HITI
134	pTCV-iCGCv1-FS
135	pTVF0-mCherry-gRNAX-BsaI
136	pTVF0-mCherry-BsaI
137	pTVF1-mCherry-BsaI
138	pTVF2-mCherry-BsaI
139	pTVF2-mCherry-gRNAX-BsaI
140	pTVF1-mCherry-gRNAX-BsaI
141	pUC57-Con/Fon-oScarlet-puro-GFP
142	pUC57-T2A-vCre-puro-GFP
143	pUC57-T2A-Flpo-puro-GFP
144	pUC57-iCG
145	pUC57-iCGDCv1
146	pENTR-Con/Fon-oScarlet-puro-GFP
147	pENTR-T2A-vCre-puro-GFP
148	pENTR-T2A-Flpo-puro-GFP
149	pENTR-iCG
150	pENTR-iCGDCv1
151	pUC57-Con/Fon/Von-EYFP-puro-GFP
152	pTCV-FS-Con/Fon-oScarlet-puro-GFP

153	pTCV-FS-T2A-vCre-puro-GFP
154	pTCV-FS-T2A-Flpo-puro-GFP
155	pTCV-FS-iCG
156	pTCV-FS-iCGDCv1
157	pENTR-Con/Fon/Von-EYFP-puro-GFP
158	pTCV-FS-Con/Fon/Von-EYFP-puro-GFP
159	pTVF0-mCherry-gRNA-hR26-1
160	pTVF0-mCherry-gRNA-hR26-2
161	pTVF0-mCherry-gRNA-AAVS1-1
162	pTVF0-mCherry-gRNA-AAVS1-2
163	pTVF0-mCherry-gRNA-SHS231-1
164	pTVF0-mCherry-gRNA-SHS231-2
165	pTVF2-mCherry-gRNA-SCGB3A2
166	pTVF0-mCherry-gRNA-SFTPC
167	pTVF1-mCherry-gRNA-TP63
168	pTVF1-mCherry-gRNA-SCGB1A1
169	pTVF2-mCherry-gRNA-ASCL1
170	pTCVIns-FS
171	pTCVIns-FS-iCG
172	pTCVIns-FS-iCGDCv1
173	pTCV-DTS-FS
174	pTCV-FS-Ins-DTS
175	TCV-FS-Ins-DTS-iCG
176	pTVF0-mCherry-gRNA-TP53In1-1
177	pTVF0-mCherry-gRNA-TP53In1-2
178	pTVF0-mCherry-gRNA-TP53In1-3
179	pTVF0-mCherry-gRNA-TP53Ex11-1
180	pTVF0-mCherry-gRNA-TP53Ex11-2
181	pTVF0-mCherry-gRNA-TP53Ex11-3
182	TCV-FS-Ins-DTS-iCGDC
183	pUC57-KOCv1
184	pAAV-EF1a-Cre
185	pAAV-Ef1a-Coff/Fon-BFP
186	pAAV-Ef1a-Con/Fon-BFP
187	pX552
188	pAdDeltaF6
189	pDGM6
190	pAAV2/2
191	pAAV2/8
192	pAAV2/9n
193	pENTR-KOCv1
194	pCMV-Bxb1
195	pLVX-TetOne-Puro-GFP