

Mikrosatelliteninstabilität in Organoiden aus murinen intestinalen Stammzellen unter *Msh2*-Defizienz

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades
doctor medicinae
(Dr. med.)

an der Medizinischen Fakultät
der Universität Leipzig

eingereicht von:
Tobias Kreutzmann

Geburtsdatum/-ort:
25. Juni 1993, Großenhain

angefertigt an:
Universität Leipzig, Klinik und Poliklinik für Viszeral-, Transplantations-, Thorax-
und Gefäßchirurgie, chirurgisches Forschungslabor

Betreuerin:
Prof. Dr. rer. nat. Gabriela Aust

Beschluss über die Verleihung des Doktorgrades vom 14.12.2021

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	III
1. Einführung.....	1
1.1. Häufigkeit und Einteilung von kolorektalen Karzinomen	1
1.1.1. Genetik des HNPCC	1
1.1.2. Diagnosestellung und Klinik des HNPCC	2
1.1.3. Acetylsalicylsäure als mögliches Präventivum bei HNPCC	3
1.2. Mausmodelle zur Darstellung der <i>in vivo</i> -Situation	3
1.3. Organoidkultur aus intestinalen Stammzellen.....	5
2. Aufgabenstellung	6
3. Materialien und Methodik.....	7
3.1. Generierung der Zielmäuse	7
3.2. Organoidkultivierung	7
3.3. Analyse der Mikrosatelliteninstabilität	8
3.4. Analyse des Wachstumsverhaltens der Organoide	12
4. Ergebnisse	15
4.1. Korrelation der MSI von Organoiden aus Normalgewebe mit dem Alter und dem Genotyp der Mäuse	15
4.2. Korrelation des Wachstumsmusters der Organoide aus Normalgewebe mit dem Δ bp Score	18
4.3. Korrelation der Wachstumsgeschwindigkeit der Organoide aus Normalgewebe mit dem Δ bp Score	20
4.4. Nachweis von Tumorvorläuferzellen in makroskopischem Normalgewebe ..	22
4.5. Vergleich der MSI zwischen <i>in vitro</i> - und <i>in vivo</i> -gealterten Organoiden aus Normalgewebe.....	24
4.6. Auswirkung von ASS als zusätzlicher Kultivierungsfaktor auf die MSI von <i>in vitro</i> -gealterten Organoiden	27
5. Diskussion.....	29
6. Zusammenfassung	38
7. Literaturverzeichnis	41
8. Publikation - Different <i>in vivo</i> and <i>in vitro</i> transformation of intestinal stem cells in mismatch repair deficiency	45
Tabellenverzeichnis	57
Abbildungsverzeichnis	58
Selbstständigkeitserklärung.....	60

Abkürzungsverzeichnis

2D	zweidimensional
3D	dreidimensional
A	Fläche
A ₀	Fläche zum Zeitpunkt 0
APC	Adenomatöse Poliposis coli
ASS	Acetylsalicylsäure
BMP	Knochenmorphogenetisches Protein (<i>engl.: bone morphogenetic protein</i>)
bp	Basenpaar
CaPP	The Colorectal Adenoma/Carcinoma Prevention Programme
CRC	kolorektales Karzinom (<i>engl.: colorectal carcinoma</i>)
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>engl.: deoxyribonucleic acid</i>)
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	epidermaler Wachstumsfaktor (<i>engl.: epidermal growth factor</i>)
FAP	familiäre adenomatöse Poliposis
gDNA	genomische DNA
HNPCC	hereditäres nicht-Poliposis-assoziiertes kolorektales Karzinom (<i>engl.: hereditary non-polyposis colorectal carcinoma</i>)
ISC	intestinale Stammzelle (<i>engl.: intestinal stem cell</i>)
<i>Mlh1</i>	<i>MutL homolog 1</i>
MMR	mismatch repair
MMR-D	mismatch repair-Defizienz (<i>engl.: mismatch repair deficiency</i>)
<i>Msh2</i>	<i>MutS homolog 2</i>
<i>Msh6</i>	<i>MutS homolog 6</i>
MSI	Mikrosatelliteninstabilität
PCR	Polymerasekettenreaktion (<i>engl.: polymerase chain reaction</i>)
<i>Pms2</i>	<i>Postmeiotic secretion increased homolog 2</i>
SEM	Standardfehler des Mittelwertes (<i>engl.: standard error of the mean</i>)
VC	Villin-Cre

1. Einführung

1.1. Häufigkeit und Einteilung von kolorektalen Karzinomen

Etwa jede achte Krebserkrankung in Deutschland ist kolorektal lokalisiert. Dabei erkrankten 2016 circa 26.000 Frauen und 32.300 Männer an kolorektalen Karzinomen (CRC). Das mittlere Erkrankungsalter lag hier bei 76 Jahren bei Frauen und 72 Jahren bei Männern^[2]. Die größte Gruppe bilden dabei sporadische CRC (70-80 %), welche zu 84 % aufgrund chromosomaler Instabilität auf dem Boden einer Inaktivierung des Adenomatösen Poliposis Coli (*APC*) Supressorgens und daraus resultierender Hyperaktivierung des Wnt-Signalweges entstehen. Die restlichen 16 % basieren auf durch Spontanmutation entstandenen defekten *mismatch repair* (MMR) Mechanismen, insbesondere biallelischer Hypermethylierung von *MutS homolog 2* (*MSH2*) und *MutL homolog 1* (*MLH1*)^[3].

20-30 % aller CRC sind erblich bedingt, wobei das hereditäre nicht-Poliposis-assoziierte kolorektale Karzinom (HNPCC) 3 % aller CRC darstellt. Das HNPCC basiert dabei ausschließlich auf MMR-Defizienz (MMR-D)^[4].

1.1.1. Genetik des HNPCC

Die genetische Grundlage für die Entstehung eines HNPCC, auch Lynch-Syndrom, ist die mutationsbedingte und autosomal-vererbte MMR-D, welche meist durch eine Fehlaktivität der Gene *MSH2* oder *MLH1* sowie seltener *MutS homolog 6* (*MSH6*) und *Postmeiotic secretion increased homolog 2* (*PMS2*) ausgelöst werden (Tab. 1)^[5-7]. Dabei kann die Kombination einer initial genetisch bedingten monoallelischen Mutation des betroffenen Gens mit einer Spontanmutation des Allels des korrespondierenden Chromosoms (sog. *second hit*) erfolgen, woraus aus einer Restaktivität ein kompletter Funktionsverlust des jeweiligen MMR-Gens in betroffenen Zellen resultiert^[8].

Die eigentliche Wirkungsweise der Produkte der genannten Gene besteht darin, durch Heterodimerbildung mit komplementären Genprodukten anderer MMR-Gene einfache Basenfehlpaarungen und Schleifenbildung durch Insertionen oder Deletionen während des Replikationsprozesses innerhalb von repetitiven Sequenzen zu erkennen und zu reparieren^[9].

Gen	<i>MSH2</i>	<i>MLH1</i>	<i>MSH6</i>	<i>PMS2</i>
Bezeichnung	<i>MutS homolog 2</i>	<i>MutL homolog 1</i>	<i>MutS homolog 6</i>	<i>Postmeiotic secretion increased homolog 2</i>
Lokalisation (Chromosom)	2p21-p16.3	3p22.2	2p16.3	7p22.1
Häufigkeit Mutation in HNPCC-Patienten (%)	~40	~50	~10	~2
Heterodimer	MutS α (+ <i>MSH6</i>) MutS β (+ <i>MSH3</i>)	MutL α (+ <i>PMS2</i>)	MutS α (+ <i>MSH2</i>)	MutL α (+ <i>MLH1</i>)
Lebenszeitrisiko CRC (%)	48,5	52,4	19,8	10,4

Tabelle 1: Vergleich der relevanten MMR-Gene in HNPCC-Patienten^[7, 8, 10]

Bei MMR-D kommt es zum Ausbleiben dieses Reparaturmechanismus und einer 100-1000fach gesteigerten Akkumulation von Mutationen, welche in nahezu allen HNPCC-assoziierten Neoplasien für deren Entstehung verantwortlich sind. Bevorzugt betroffen sind nicht-codierende Sequenzen, welche über das gesamte Genom verteilt sind und aus einer Abfolge von jeweils 1-6 Nukleotiden bestehen. Diese werden Mikrosatelliten genannt und liegen im Menschen häufig als Vielfaches des Dinukleotids CA_n vor^[11, 12]. Innerhalb der Mikrosatelliten diese Mutationen als Längenänderung in Form von Mikrosatelliteninstabilität (MSI) mittels Polymerasekettenreaktion (PCR) detektiert werden^[6, 8, 13].

Im Menschen häufige Mutationen in bekannten CA_n-Mikrosatelliten unter *MSH2*-Defizienz sind in Mäusen jedoch kaum nachweisbar. Hier wurden durch *Kabbarah et al.* die Mikrosatelliten A27, A33, GA29 und weniger TG27, TA27 beschrieben, die zur Detektion von MSI in murinen Neoplasien bei *Msh2*-Defizienz geeignet sind^[12].

1.1.2. Diagnosestellung und Klinik des HNPCC

Die Diagnosestellung des HNPCC erfolgt im Allgemeinen klinisch. Dafür stehen unterschiedliche Kriterien zur Verfügung. Die Amsterdam-Kriterien I/II stützen sich dabei auf die familiäre Häufung von HNPCC-assoziierten Neoplasien. Treffen sie zu, ist das Vorliegen eines HNPCC wahrscheinlich^[7]. Die Bethesda-Guidelines hingegen zeigen Kriterien auf, mit denen Individuen identifiziert werden sollen, bei denen eine Testung auf MSI indiziert ist^[14].

Das klinische Bild des HNPCC ist gekennzeichnet durch ein erhöhtes Lebenszeitrisiko für das Auftreten von CRC von bis zu 52,4 % in Abhängigkeit vom betroffenen

MMR-Gen (Tab. 1). Mit 70 % aller auftretenden Tumoren bevorzugt betroffen ist dabei das proximale Kolon. Das mittlere Erkrankungsalter liegt bei 52 Jahren und somit deutlich vor dem Median von 72-76 Jahren sporadischer CRC^[6].

1.1.3. Acetylsalicylsäure als mögliches Präventivum bei HNPCC

In der ersten und zweiten Studie des *Colorectal Adenoma/Carcinoma Prevention Programme* (CaPP) wurde ein präventiver Effekt der Substitution von Acetylsalicylsäure (ASS) hinsichtlich der Entstehung von CRC bei familiärer adenomatöser Poliposis (FAP), einer autosomal-dominant vererbten Erkrankung mit vermehrtem kolorektalem Auftreten von Polypen, und HNPCC-Patienten nachgewiesen. Die potentielle präventive Auswirkung von ASS auf die Entstehung von Polypen in FAP-Patienten sollte im CaPP2 in HNPCC-Patienten im Hinblick auf die Tumorentstehung überprüft werden. Es wurde beobachtet, dass Patienten mit CRC seltener ASS einnahmen als Patienten, die nicht von CRC betroffen waren. Die tägliche Einnahme von 600 mg ASS bewirkte eine signifikante Reduktion für das Auftreten von CRC sowie HNPCC-assoziierten Tumoren um circa 63 % nach einem Beobachtungszeitraum von insgesamt 5 Jahren. Im 2011 gestarteten CaPP3 wird geklärt, ob die Wirkung von ASS dosisabhängig ist und somit ein geringfügig erhöhtes Blutungsrisiko bei niedriger Dosierung von ASS zum gleichen präventivem Effekt führt.

Der Mechanismus der präventiven Behandlung mit ASS konnte bis jetzt nur hypothetisch erklärt werden. ASS könnte zum einen tumorbedingte Entzündungsprozesse und dadurch auch die Tumorentstehung unterdrücken oder zum anderen die T-Zell-vermittelte Immunantwort auf Frameshift-Peptide modellieren, welche durch insertions- oder deletionsbedingte Leserasterverschiebungen bei der Proteinsynthese ausgelöst wird. Auch dieser Frage wird aktuell in CaPP3 nachgegangen^[15].

1.2. Mausmodelle zur Darstellung der *in vivo*-Situation

Die Untersuchung der Tumorentstehung bei HNPCC-Patienten auf zellulärer Ebene ist durch viele Faktoren erschwert. Zum einen bedingt das hohe mittlere Erkrankungsalter von 52 Jahren einen deutlich prolongierten Untersuchungszeitraum bis zum eigentlichen Auftreten eines CRC im Patienten. Zum anderen sind zur Sicherung der Diagnose HNPCC vor dem Auftreten eines CRC als auch zur weiteren Untersuchung nach Tumorentstehung multiple bioptische Eingriffe im Patienten notwendig, welche aus ethischer Sicht medizinisch nicht vertretbar sind. Die im Vergleich zu anderen Entitäten von CRC eher geringe Zahl von Patienten mit HNPCC erschwert zusätzlich die

Erhebung einer signifikanten Anzahl von Daten, um Vergleiche innerhalb der Patientengruppe zu ermöglichen^[6, 7]. Zur Lösung dieser Probleme wurden Tiermodelle entwickelt, die die genetische Situation bei HNPCC abbilden und diese mit einer hohen Zahl von möglichst frühzeitig auftretenden CRC kombinieren.

Initial beschriebene Mausmodelle zur Untersuchung von intestinalen Tumoren, wie das *Apc*-Knockout-Modell, waren durch eine isolierte Tumorbildung im Dünndarm als Modell für das humane CRC nicht geeignet. Ebenso konnten *Mlh1*- sowie *Msh2*-Knockout-Modelle mit Inaktivierung des jeweiligen Gens in allen somatischen Zellen durch eine frühe Entwicklung von Lymphomen ohne Ausbildung von CRC nicht genutzt werden^[16, 17].

Kuchertapati et al. entwickelten ein konditionelles Knockout-Mausmodell zur spezifischen Inaktivierung von *Msh2* im Darmepithel. Dabei wird das geflochte Exon 12 von *Msh2* mittels Cre-Rekombinase selektiv in Villin-positiven Zellen entfernt. Dazu werden *Msh2^{LoxP/+}*-Mäuse mit transgenen *Villin-Cre(VC)*-Mäusen (B6;D2-Tg(Vil-Cre)) gekreuzt, um *VC^{+/?}Msh2^{LoxP/+}*-Mäuse zu generieren. Die heterozygoten Mäuse der F1-Generation werden erneut gekreuzt, was zur homozygoten Zielmaus *VC^{+/?}Msh2^{LoxP/LoxP}* (*Msh2^{-/-}*) führt^[18]. Diese stellt durch die darmspezifische epitheliale Inaktivierung von *Msh2* ein geeignetes HNPCC Modell dar (Tab. 2)^[19].

Gen	Transgen	Zielgewebe	Phänotyp	Ausbildung MSI
<i>Msh2^{LoxP}</i>	<i>Villin-Cre</i>	<i>Villin</i> exprimierende intestinale Epithelzellen	intestinale Tumoren	+++
<i>Msh2^{LoxP}</i>	<i>Ella-Cre</i>	alle	T-Zell-Lymphome, Dünndarntumore	-
<i>Msh2^{LoxP}</i>	<i>Lgr5-CreERT2</i>	<i>Lgr5</i> exprimierende Stammzellen	Dünndarntumore	-
<i>Msh2^{LoxP}</i>	<i>Adenoviral-Cre</i>	Instestinum	Dickdarntumore bei inaktivem <i>Apc</i>	-
<i>Mlh1^{LoxP}</i>	<i>Ella-Cre</i>	alle	T-Zell-Lymphome, intestinale Tumore	+++
<i>Mlh1^{LoxP}</i>	<i>Lck-Cre</i>	<i>Lck</i> exprimierende Thymozyten	T-Zell-Lymphome	++

Tabelle 2: aktuelle Knockout-Mausmodelle für *Msh2* und *Mlh1*; Vergleich der Lokalisation von Tumoren und Ausbildung von MSI^[17]

1.3. Organoidkultur aus intestinalen Stammzellen

Eine aus multipotenten intestinalen Stammzellen (ISC) abgeleitete Organoidkultur wurde 2009 von *Sato et al.* beschrieben und hat sich in den letzten Jahren zum Goldstandard zur Untersuchung des Darmepithels *in vitro* entwickelt^[20, 21].

Die Organoiden stellen dabei eine Miniaturausgabe der Ursprungsdärme *ex vivo* dar. Sie imitieren die intestinale Struktur im Hinblick auf Krypten, Villi und epitheliale Zelltypen sowie deren organspezifische Funktion^[20].

Entscheidend für die nahezu unbegrenzte Kultur dieser Darmorganoiden war die Identifizierung der Signalwege, die die Population der aus Krypten isolierten ISC zum einen mit der Fähigkeit zur Replikation erhalten und zum anderen zu deren Proliferation und zur Differenzierung der Epithelzellen führen^[22].

Eine Steigerung der Proliferation und Stammzellfähigkeit erfolgt dabei über den Wnt- und Ras/Raf/Mek/Erk-Signalweg. Wnt steuert dabei die Stammzellreifung sowie -proliferation. Der epidermale Wachstumsfaktor (EGF) stimuliert die Proliferation der ISC und Epithelzellen entlang des Villus. Beide werden von Paneth-Zellen sezerniert und dienen jeweils als Liganden zur Aktivierung der genannten Signalwege. R-Spondin fungiert dabei als zusätzlicher Aktivator des Wnt-Signalweges^[21-23]. Noggin hingegen führt durch Inhibierung des *Bone Morphogenetic Proteins* (BMP) und des Smad-Signalweges zur Erhöhung der Anzahl von ISC mit zusätzlich erhöhter Wnt-Aktivität^[23].

Die ISC werden aus den Darmkrypten EDTA-vermittelt isoliert und anschließend in Matrigel unter Substitution der genannten Faktoren eingebettet. Im Matrigel bilden die isolierten Krypten einzelne Organoiden mit bis zu je 40 Kryptendomänen^[21, 22]. Eine Passagierung der Organoiden nach Separation in einzelne Zellen nach 14 Tagen kann unbegrenzt wiederholt werden^[21].

Durch die Abbildung der intestinalen Struktur, eine Anwachsrate von nahezu 100 % kombiniert mit den etablierten Kultivierungsbedingungen ermöglichen Organoiden physiologische sowie genetische Analysen des intestinalen Epithels auf zellulärer Ebene. Im Vergleich zur einzelzellbasierten Monolayer-Kultur mit begrenzter Kultivierungszeit sind diese Untersuchungen in Organoiden, als sich selbst erneuerndes 3D-Modell, unbegrenzt möglich^[20, 21, 24]. Eine Analyse pathophysiologischer Merkmale, wie MSI unter MMR-D in intestinalen Organoiden, war zum Zeitpunkt dieser experimentellen Arbeiten noch nicht etabliert. Im Hinblick darauf stellen der Einfluss der Substitution von Medikamenten wie ASS und die Änderung der genannten Kultivierungsfaktoren weitere Betrachtungspunkte dar.

2. Aufgabenstellung

Die vorliegende Dissertationsschrift basiert auf der Publikation

Keysselt, K.*, **Kreutzmann, T.***, Rother, K.*, Kerner, C., Krohn, K., Przybilla, J., Buske, P., Löffler-Wirth, H., Löffler, M., Galle, J.*, Aust, G.* *Different in vivo and in vitro transformation of intestinal stem cells in mismatch repair deficiency*. *Oncogene*, 2017. **36**(19): p. 2750-2761.

(*geteilte Autorenschaft)

Ziel der Arbeit ist es, im $VC^{+/?}Msh2^{LoxP/LoxP}(Msh2^{-/-})$ -Mausmodell die Häufigkeit von Mutationen in Mikrosatelliten in ISC-Organoiden, die aus makroskopisch normalem Darm oder aus Tumoren generiert wurden, in Abhängigkeit vom Alter der Maus, der Dauer der Kultivierung der Organoide und den Kultivierungsbedingungen zu quantifizieren.

Hierzu wurde eine neue Methode zur Analyse des MSI-Status von Organoiden etabliert und die quantitative Auswertung der Mutationen anhand von neu definierten Scores vorgenommen. Diese Scores wurden zusätzlich zum *in vitro* Wachstumsmuster der Organoide, das über 3D Lifeimaging verfolgt und anschließend quantifiziert wurde, korreliert. Durch dieses Studiendesign konnten im Vergleich zu heterozygoten $Msh2^{+/-}$ - und $Msh2^{+/+}$ -Kontrollmäusen folgende Fragen beantwortet werden:

- Ab welchem Mausalter kommt es zum Auftreten von MSI? Nimmt diese im Alter zu und geht dabei der ermittelte MSI-Status mit einer Änderung des Wachstumsmusters eines Organoids einher?
- Können im makroskopisch normalen Darm Tumorstammzellen als Beginn einer in HNPCC-Patienten beschriebenen Adenom-Karzinom-Sequenz nachgewiesen werden?
- Hat eine *in vitro*-Langzeitkultivierung der Organoide Auswirkungen auf den MSI-Status sowie das Wachstumsmuster und kann eine Substitution von ASS diese beeinflussen?

3. Materialien und Methodik

3.1. Generierung der Zielmäuse

Die Mausstämme B6.SJL-Tg(Vil-cre)997Gum/J und B6.Cg-Msh2tm2.1Rak/J wurden aus dem Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME, USA) bezogen. Durch die Kreuzung dieser Mäuse wurde das *Msh2*-Allel unter den Einfluss des VC-Transgens gestellt, welche zu den Ziellinien mit den Genotypen $VC^{+/?}Msh2^{LoxP/LoxP}$ (*Msh2*^{-/-}), $VC^{+/?}Msh2^{LoxP/+}$ (*Msh2*^{+/-}) und $VC^{-/-}Msh2^{LoxP/LoxP}$ (*Msh2*^{+/+}) führte. Es erfolgte eine Zusammenstellung von jeweils fünf Triplets aus 1, 2, 3, 5, 8 und 12 Monate alten Mäusen. Ein Triplet stammte dabei immer aus einem Wurf und bestand aus je einer *Msh2*^{+/+}-, *Msh2*^{+/-}- und *Msh2*^{-/-}-Maus.

3.2. Organoidkultivierung

Die Isolation und Kultur der Organoide wurde von Frau K. Keyßelt vorgenommen und wird deshalb nicht im Detail beschrieben.

Die mechanische Isolierung einzelner Krypten aus morphologisch normalen Abschnitten des Jejunums erfolgte nach Inkubation in 2 mM EDTA Puffer^[25]. Die so isolierten Organoide wurden als Fraktion N (Normalgewebe) bezeichnet.

Anschließend wurde das nach EDTA Behandlung verbleibende Restgewebe mittels Kollagenase Typ IX (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland) und Dispase Typ II (Thermo Fisher Scientific, Berlin, Deutschland) weiter verdaut, um potentielle Adenomzellen zu isolieren^[25]. Diese Organoide wurden als Fraktion A (Adenom) bezeichnet.

CRC traten nur in *Msh2*^{-/-}-Mäusen ab einem Alter von 12 Monaten auf. Die Anzahl und Lokalisation der Tumore wurden im gesamten Darm erfasst. Die zwei größten Tumoren wurden reseziert, mechanisch zerkleinert und verdaut^[25]. Organoide dieser Fraktion wurden als T (Tumor) bezeichnet.

Zur Kultivierung der Organoide wurden jeweils circa 50 Krypten (N), Kriptenfragmente (A) oder Tumorzellen (T) in 10 µl Matrigel (BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland) eingesät. Die Fraktion N wurde mit EGF, Nog-Fc -und Rspo1-Fc-Medium versetzt^[22]. Die Kultivierung der Fraktionen A und T erfolgte lediglich mit EGF. Dadurch sollte ein von Noggin und R-Spondin unabhängiges Wachstumsverhalten und damit die Selektion benignen von malignen Zellen erreicht werden. Alle Organoide einer spezifischen Fraktion einer einzelnen Maus wurden zusammen kultiviert.

Um den potentiellen Effekt von ASS auf die MSI und Änderungen des Wachstumsmusters in *in vitro*-Langzeitkultivierung zu analysieren, wurden Organoide

der Fraktion N 8 Monate alter Mäuse anschließend für weitere 18 Wochen mit und ohne Zugabe von 1 μ M ASS kultiviert und deren Mikrosatellitenstatus und Wachstumsmuster mit entsprechenden Organoiden 12 Monate alter Mäuse verglichen (Tab. 3).

Bezeichnung der Fraktion	Anzahl der Mäuse	Ursprungsgewebe Organoide	Alter (Monate)	Kultivierungsbedingungen	Substitution von ASS	Dauer Kultivierung (Wochen)
N1 ENR1	5/Genotyp	N	1	ENR		1
N2 ENR1	5/Genotyp	N	2	ENR		1
N3 ENR1	5/Genotyp	N	3	ENR		1
N5 ENR1	5/Genotyp	N	5	ENR		1
N8 ENR1	5/Genotyp	N	8	ENR		1
N8 ENR18	5/Genotyp	N	8	ENR		18
N8 ENR18 + ASS	4/Genotyp	N	8	ENR	x	18
A8 E1	5	A	8	EGF		1
N12 ENR1	5/Genotyp	N	12	ENR		1
N12 ENR1 + ASS	4/Genotyp	N	12	ENR	x	1
A12 E1	5	A	12	EGF		1
T12 E1*	5 2 Tumore/Maus	T	12	EGF		1

*Tabelle 3: Übersicht der untersuchten Organoide sowie Art und Dauer deren Kultivierung mit dazugehöriger Anzahl und Alter der Ursprungsmäuse; *Tumoren nur aus 12 Monate alten *Msh2*^{-/-} Mäusen, ENR = EGF, Noggin, R-Spondin^[1]*

3.3. Analyse der Mikrosatelliteninstabilität

Die Organoide wurden unter optischer Kontrolle einzeln aus dem Matrigel gepickt. Die Freisetzung der genomischen DNA (gDNA) aus den Organoiden zur weiteren Analyse der Mikrosatelliten erfolgte nach Zugabe von 50 μ l Quick Extract Extraktionslösung (Biozym Scientific GmbH, Oldendorf, Deutschland) durch Erwärmen der Probe auf 65°C für sechs Minuten und anschließend auf 98°C für zwei Minuten.

Die Analyse der mutationsbedingten MSI erfolgte mittels PCR in den bei *Msh2*-Defizienz bevorzugt betroffenen Mikrosatelliten A27, A33 und GA29. Diese wurden von

Kabbarah et al. als deutlich sensitiver für MSI in murinem Gewebe als das für die Analyse von humanem Gewebe etablierte Standardpanel beschrieben^[12].

Zur Reduzierung der benötigten Zeit und verwendeten Materialien wurden die drei einzelnen Singleplex-PCR unter simultaner Verwendung der drei Primer für die Analyse der Mikrosatelliten A27, A33 und GA29 zu einer Multiplex-PCR kombiniert. Somit war es möglich, während einer Zyklusabfolge die Produkte aller drei Primerpaare gemeinsam zu amplifizieren, aber diese im weiteren Verlauf einzeln auszuwerten. Die jeweiligen forward-Primer (Tab. 4) wurden zur späteren Differenzierung der einzelnen PCR-Produkte mittels der Farbstoffe ATTO550, Hexachlorofluorescin oder Fluorescin markiert (BioTeZ, Berlin, Deutschland).

Name	Chromosom (Maus)	Primer (5'-3')	Produktlänge (bp)	Farbstoff forward-Primer
A27	17	for: TCC CTG TAT AAC CCT GGC TGA CT rev: GCA ACC AGT TGT CCT GGC GTG GA	143	ATTO550
A33	17	for: TAC AGA GGA TTG TCC TCT TGG AG rev: GCT GCT TCA CTT GGA CAT TGG CT	141	Hexachlorofluorescin
GA29	5	for: CAG GAG GTC AAG GTC ATC CTA AG rev: CCA CCA TGG TAG GAG CTT GCT A	156	Fluorescin

Tabelle 4: Übersicht der analysierten Mikrosatelliten A27, A33 und GA29 im Hinblick auf Lokalisation, dazugehörige Primerpaare, PCR-Produktlänge und Farbmarkierung^[12]

Hierzu wurden 2,3 µl der gDNA-Lösung eines einzelnen Organoids, 0,2 µl DreamTaq Green DNA Polymerase (Thermo Fisher Scientific, Berlin, Deutschland), 1,5 µl DreamTaq Green PCR Puffer (Thermo Fisher Scientific, Berlin, Deutschland), 2,5 µl Desoxyribonukleosidtriphosphat-Lösung (Thermo Fisher Scientific, Berlin, Deutschland) und jeweils 1 µl der Primer in einer 12,5 µl Multiplex-PCR mit einer Anlagerungstemperatur von 59°C und einer Elongationstemperatur von 96 °C über 28 Zyklen vervielfältigt. 1 µl des PCR-Produktes wurde zusammen mit 0,25 µl Gene Scan ROX Längenstandard (Life Technologies of Thermo Fisher Scientific, Berlin) aufgetragen. Die Länge der PCR-Produkte jedes Markers von jedem Organoid wurde mittels der GeneMapper Software (Life Technologies of Thermo Fisher Scientific, Berlin, Deutschland) bestimmt.

Zunächst wurden die Standardlängen in Basenpaaren (bp) der drei Marker in Schwanzbiopsien aus *Msh2*^{+/+}-Mäusen (143 bp (A27), 141 bp (A33) und 156 bp (GA29)) als Kontrollwerte ermittelt, die die Referenzwerte für die Längenbestimmung aller untersuchten Organoide aller Fraktionen darstellten. Bei der Auswertung der PCR-Produkte kam es zum Auftreten von weiteren *peaks* durch Amplifikate unterschiedlicher Länge (sog. *stutter bands*) im Vergleich zum höchsten eigentlich relevanten *peak*. Diese entstehen durch ein während einer PCR häufig fehlerhaftes Ansetzen der Polymerase an dem zu replizierenden *template* (sog. *DNA slippage*). Diese wurden in der Analyse vernachlässigt und die Länge im Bereich des höchsten *peaks* als Referenzwert angenommen (Abb. 1).

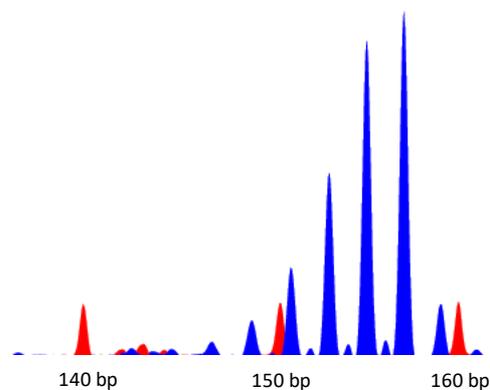


Abbildung 1: exemplarische Darstellung der Auswertung eines PCR-Produktes des Markers GA29 (Schwanzbiopsie *Msh2*^{+/+}-Maus), der Hauptpeak liegt bei 156 bp und ist umgeben von *stutter bands*; rot = Längenstandard, blau = PCR-Produkte unterschiedlicher Länge (die Höhe entspricht dabei der Anzahl der Amplifikate)

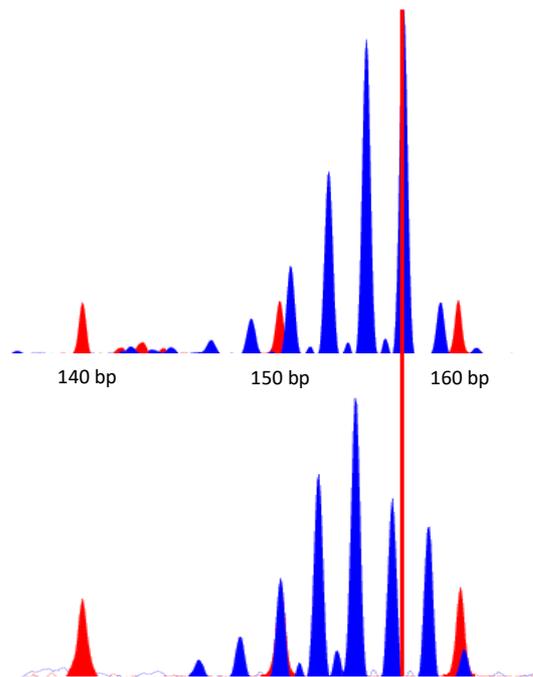


Abbildung 2: exemplarische Darstellung eines Basenpaarverlustes von 2 bp im Vergleich zum Kontrollwert von 156 bp (oben) auf 154 bp (unten); rote Linie = initiale Länge

Die Bestimmung des MSI Scores erfolgte aus der absoluten Längenänderung in den drei untersuchten Markern. Einer Deletion oder Insertion von bp in einem Marker wurde der Wert 1 zugeordnet. Bei fehlender Längenänderung erfolgte die Zuordnung des Wertes 0. Auch hier wurde isoliert die Produktlänge im Bereich des höchsten *peaks* betrachtet (Abb. 2).

Die einzelnen Werte für die drei Marker wurden addiert, sodass ein MSI Score von 0 – 3 für jedes einzelne Organoid gebildet wurde. Anschließend wurde der Durchschnitt aller Werte des MSI Scores aller untersuchten Organoide der gleichen Fraktion gebildet und der *standard error of the mean* (SEM) bestimmt.

Der MSI Score gab also lediglich an, ob und wie viele der drei untersuchten Marker eine Längenänderung aufweisen. Die Ausprägung der Längenänderungen war anhand des MSI Scores nicht darzustellen, sodass zusätzlich ein Δ bp Score erstellt wurde. Hierzu wurde von der ermittelten Länge des jeweiligen PCR-Produktes eines einzelnen Markers in jedem einzelnen Organoid der ermittelte Kontrollwert subtrahiert.

Beispielrechnung:

Produktlänge Organoid für A27	–	Kontrollwert für A27	= Δ bp
139 bp	–	143 bp	= -4 bp

Der erstellte Δbp Score diene dadurch zur Quantifizierung der Längenänderung in Mikrosatelliten. Auch hier erfolgte die Bildung des Durchschnitts des Δbp Scores aus aller Werte der untersuchten Organoide einer Fraktion mit Bestimmung des SEM.

Es wurden zusätzlich *heatmaps* zur grafischen Darstellung der durchschnittlichen Längenänderungen innerhalb einer Organoidfraktion in Abhängigkeit vom Alter der Mäuse erstellt. Dazu wurde für alle Organoide einer Fraktion der Durchschnitt der ermittelten *peak*-Höhen im Bereich jeder einzelnen Basenpaarlänge gebildet. Dieser Durchschnitt wurde anschließend normiert (höchster Wert = 100). Die prozentuale Verteilung aller ermittelten Längen der PCR-Produkte wurde dann durch Abstufung der Farbtintensität verdeutlicht (je höher der prozentuale Anteil, desto dunkler die Farbe).

Beispiel heatmap:

Basenpaarlänge	Anteil (%)
132 bp	0
133 bp	25
134 bp	50
135 bp	75
136 bp	100

Die statistische Auswertung des Δbp Scores zwischen den unterschiedlichen Genotypen und Fraktionen der Organoide erfolgte mittels *T*-Test und SPSS (IBM, Ehningen, Deutschland). P-Werte < 5% wurden dabei als signifikant angenommen und entsprechend gekennzeichnet (* = $P < 0,05$, ** = $P < 0,01$, *** = $P < 0,001$).

3.4. Analyse des Wachstumsverhaltens der Organoide

Das Wachstum der einzelnen Organoide wurde mittels *3D Life Scanning Microscopy* über insgesamt 144 Stunden aufgezeichnet. Die Aufnahme erfolgte dabei aller acht Stunden. Dafür wurden ein CKX41 Mikroskop (Olympus, Hamburg, Deutschland) zur Aufnahme der einzelnen Bilder und ein Inkubationssystem (ibidi, Martinsried, Deutschland), das Bedingungen wie Gaszufuhr und Feuchtigkeit über den Zeitraum der Aufzeichnung konstant hielt, verwendet.

Es ist nicht möglich ein Objekt in seiner dreidimensionalen (3D) Struktur durch eine einzelne zweidimensionale (2D) Aufnahme scharf abzubilden. Deshalb wurde zur Aufnahme der Organoide das Prinzip des *z-stackings* genutzt. Dazu werden zu einem bestimmten Zeitpunkt einzelne Bilder eines Organoids in verschiedenen Z-Ebenen angefertigt. Die Position des aufgezeichneten Organoids sowie der Kamera in einer

Aufnahme bleiben hierbei konstant, während sich die ObjektivEinstellung zur detailgetreuen Abbildung der Z-Ebenen des Objekts ändert. Die einzelnen Bilder werden anschließend durch Überlagerung in ein scharfes 2D-Bild transformiert.

Die Fläche (A) einzelner Organoide zu jedem Zeitpunkt der Aufnahme wurde in Relation zur Fläche zu Beginn der Aufnahmen gestellt (A₀). Hieraus konnten für jedes aufgenommene Organoid mittels Origin7.0 (OriginLab Corporation, Northampton, USA) eine Wachstumskurve ermittelt werden.

Anschließend erfolgte anhand der Aufnahmen die Einteilung des Wachstums der einzelnen Organoide für jeden einzelnen Zeitpunkt. Hierbei wurde in verzweigtes, zystisch-ähnliches, retardiertes (Abb. 3) oder zystisches (Abb. 4) Wachstumsmuster unterschieden.

Das ermittelte Wachstumsmuster wurde danach mit der dazugehörigen Summe der Δ bp Scores der Marker A27, A33 und GA29 des entsprechenden Organoids korreliert.

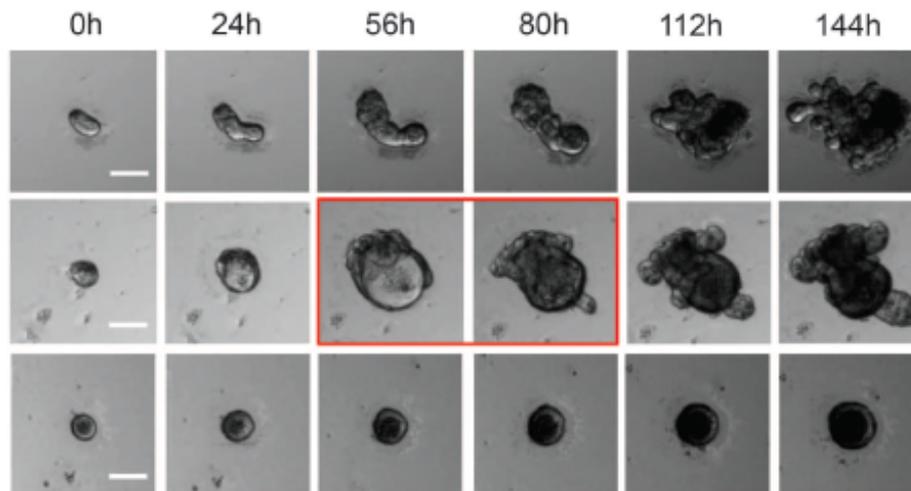


Abbildung 3: mikroskopische Differenzierung des Wachstumsverhaltens der Organoide in verzweigt, zystisch-ähnlich und retardiert (von oben nach unten) in Abhängigkeit von der Zeit^[1]

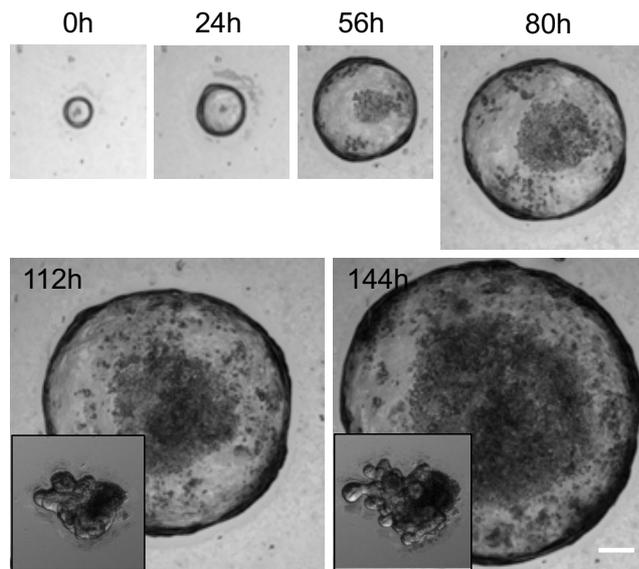


Abbildung 4: mikroskopische Differenzierung der unterschiedlichen Querschnittsflächen der Organoiden bei verzweigtem und zystischem Wachstumsmuster^[1]

4. Ergebnisse

4.1. Korrelation der MSI von Organoiden aus Normalgewebe mit dem Alter und dem Genotyp der Mäuse

Zur Evaluation, ab welchem Alter der Maus MSI im Darmepithel auftritt und ob diese mit steigendem Alter zunimmt, wurde der MSI Score in Organoiden aus Normalgewebe 1, 2, 3, 5, 8 und 12 Monate alter *Msh2^{+/+}*-, *Msh2^{+/-}*- und *Msh2^{-/-}*-Mäuse (N1 ENR1, N2 ENR1, N3 ENR1, N5 ENR1, N8 ENR1, N12 ENR1) bestimmt.

Die MSI Scores der Organoiden aus makroskopisch normalem Gewebe erhöhen sich in Abhängigkeit vom Genotyp sowie mit steigendem Mausalter.

In den Organoiden 1 Monate alter Mäuse (N1 ENR1) aller drei Genotypen sind circa 83,3 % der untersuchten Marker unverändert (MSI Score = 0). Die veränderten Marker weisen gleichverteilt Deletionen auf. Der mittlere MSI Score in Organoiden aller Genotypen beträgt zu diesem Zeitpunkt circa 0,2.

Mit steigendem Alter der Mäuse nimmt der MSI Score in *Msh2^{+/-}*- und *Msh2^{-/-}*-Organoiden zu. Jedes *Msh2^{-/-}*-Organoid 2 Monate alter Mäuse (N2 ENR1) ist bereits in mindestens einem der drei untersuchten Marker instabil (MSI Score > 0). Etwa die Hälfte der *Msh2^{-/-}*-Organoiden weist dabei einen MSI Score ≥ 2 auf. Bis zu einem Mausalter von 5 Monaten (N5 ENR1) steigt der MSI Score in *Msh2^{-/-}*-Organoiden weiter an und erreicht an diesem Zeitpunkt ein Plateau von circa 2,6. Das bedeutet, dass in wenigen *Msh2^{-/-}*-Organoiden auch im hohen Mausalter nicht in allen untersuchten Markern eine MSI auftritt.

Im Unterschied zu *Msh2^{-/-}*- und *Msh2^{+/-}*-Organoiden ändert sich der MSI Score in *Msh2^{+/+}*-Organoiden mit steigendem Mausalter nur wenig. Der mittlere MSI Score von *Msh2^{+/+}*-Organoiden 3 Monate alter Mäuse (N3 ENR1) beträgt circa 0,4 und erhöht sich ab diesem Zeitpunkt nicht mehr (Abb. 5).

In der Analyse wird deutlich, dass sich der MSI Score mit steigendem Mausalter erhöht, jedoch die weiteren quantitativen Längenänderungen der Marker ab einem bestimmten Zeitpunkt nicht weiter abbildet.

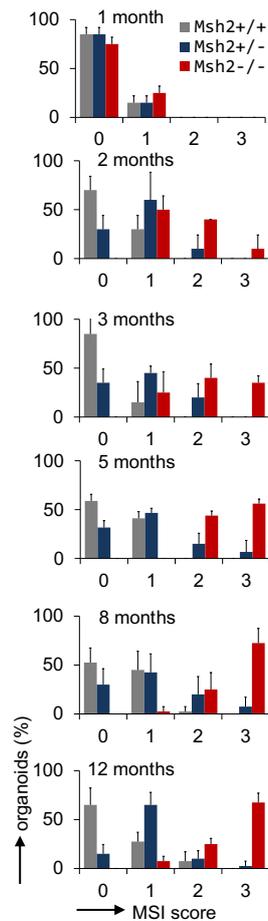


Abbildung 5: Darstellung des prozentualen Anteils (+ SEM) des MSI Scores in Organoiden der Fraktionen N1 ENR1, N2 ENR1, N3 ENR1, N5 ENR1, N8 ENR1 und N12 ENR1 in Abhängigkeit vom Genotyp (n=5 Mäuse/Genotyp 1-5 Monate, n=4 Mäuse/Genotyp 8 und 12 Monate, n=10 Organoide/Maus)^[1]

Da in den PCR-Produkten aller Marker vorwiegend Deletionen auftreten, wurde der Δ bp Score bestimmt und grafisch in *heatmaps* umgesetzt. Dadurch konnte der auch im hohen Mausalter kontinuierliche Verlust von bp dargestellt werden.

Der Δ bp Score nimmt vor allem in $Msh2^{-/-}$ -Organoiden in Abhängigkeit vom Mausalter in allen Markern kontinuierlich zu. Das zeigt sich besonders deutlich im Dinukleotidmarker GA29, in welchem sich die Produktlänge von 156 bp (N1 ENR1) auf 152 bp (N12 ENR1) verkürzt.

In $Msh2^{+/-}$ -Organoiden ändern sich die Δ bp Scores der drei Marker, entsprechend der niedrigeren MSI Scores, weniger. Die Produktlänge des Markers A33 verkürzt sich dabei mit einem Δ bp Score von 1 in nahezu allen Organoiden über die Lebenszeit der Mäuse und ist somit am deutlichsten in der *heatmap* darstellbar. Der Δ bp Score der Marker A27 und GA29 steigt hingegen nur in wenigen Organoiden.

Msh2^{+/+}-Organoiden weisen im Vergleich zu *Msh2*^{+/-}- und *Msh2*^{-/-}-Organoiden entsprechend des MSI Scores auch den niedrigsten Δ bp Score auf. Dabei verkürzt sich die Produktlänge hauptsächlich im Marker A33 von 141 bp (N1 ENR1) auf 140 bp (N12 ENR1). Das tritt jedoch im Vergleich zu *Msh2*^{+/-}-Organoiden deutlich seltener auf. Die Produktlängen der Marker A27 und GA29 bleiben über die Lebenszeit der Mäuse in den meisten *Msh2*^{+/+}-Organoiden weitestgehend unverändert (Abb. 6).

In der Darstellung des Δ bp Scores als *heatmap* ist somit zu sehen, dass MSI einen sich schnell entwickelnden und über den Zeitpunkt der Plateaubildung des MSI Scores hinaus voranschreitenden Prozess, insbesondere in *Msh2*^{-/-}-Organoiden, darstellt.

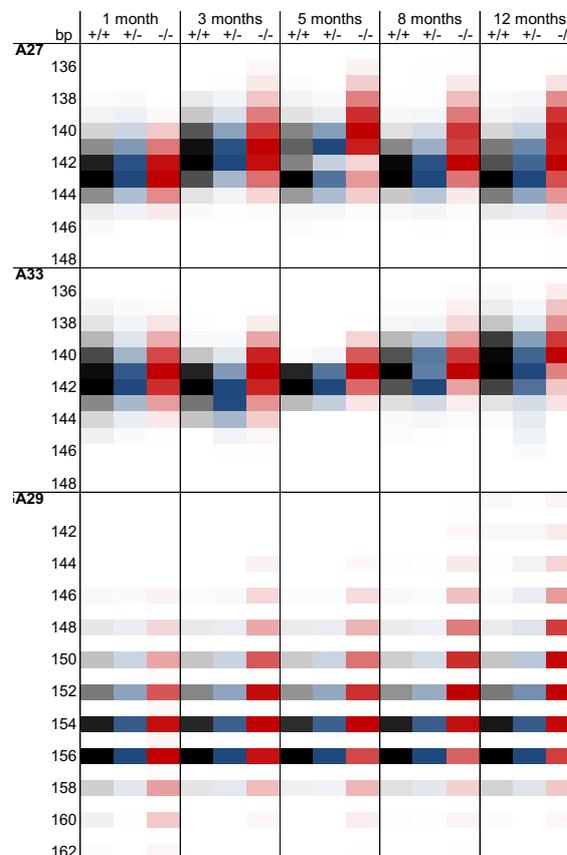


Abbildung 6: *heatmap* zur Darstellung der Längenänderung der PCR-Produkte der Marker A27, A33 und GA29 in Organoiden der Fraktionen N1 ENR1, N2 ENR1, N3 ENR1, N5 ENR1, N8 ENR1 und N12 ENR1 in Abhängigkeit vom Genotyp (*Msh2*^{+/+} = schwarz, *Msh2*^{+/-} = blau, *Msh2*^{-/-} = rot; n=3 Mäuse/Genotyp 1-5 Monate, n=4 Mäuse/Genotyp 8 und 12 Monate, n=10 Organoiden/Maus)^[1]

4.2. Korrelation des Wachstumsmusters der Organoide aus Normalgewebe mit dem Δ bp Score

Zum Nachweis eines Zusammenhangs zwischen MSI und dem Wachstumsmuster der Organoide aus Normalgewebe wurde das Wachstumsmuster aller 8 h über 144 h subjektiv als verzweigt, zystisch-ähnlich und zystisch in 3D-Videos beurteilt und mit dem entsprechenden Δ bp Score korreliert. Das erfolgte für Organoide 8 und 12 Monate alter Mäuse (N8 ENR1, N12 ENR1) aller drei Genotypen.

Jedes $Msh2^{+/+}$ -Organoid 8 Monate alter Mäuse (N8 ENR1) wächst über 144 h verzweigt. Dagegen wachsen $Msh2^{-/-}$ -Organoide 8 Monate alter Mäuse (N8 ENR1) teilweise bereits zu Beginn der Untersuchungszeit zystisch-ähnlich. Ab 72 h steigt der Anteil an zystisch-ähnlich wachsenden Organoiden deutlich an. Ein tumorähnliches, also zystisches Wachstumsmuster ist bei keinem der $Msh2^{-/-}$ -Organoide (N8 ENR1) zu beobachten. Wenige $Msh2^{+/-}$ -Organoide (N8 ENR1) wachsen für kurze Zeit zystisch-ähnlich, kollabieren jedoch im weiteren Verlauf und zeigen danach erneut ein verzweigtes Wachstumsmuster (Abb. 7).

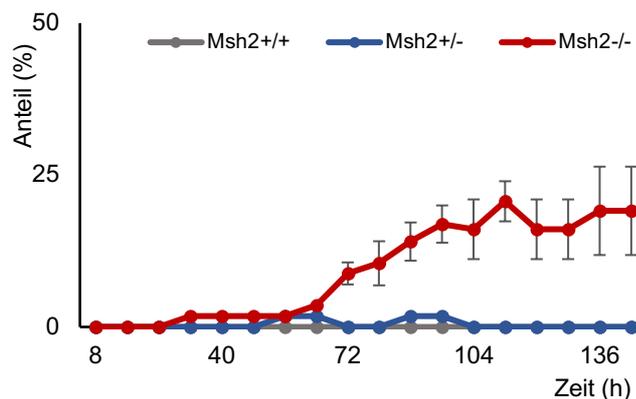


Abbildung 7: prozentualer Anteil (+ SEM) zystisch-ähnlicher wachsender Organoide der Fraktion N8 ENR1 aller Genotypen (n=4 Mäuse/Genotyp, n=13 Organoide/Maus)

Einzelne $Msh2^{-/-}$ -Organoide 12 Monate alter Mäuse (N12 ENR1) weisen deutlich früher, bereits nach 8 h, ein zystisch-ähnliches oder vereinzelt zystisches Wachstumsmuster auf. Dieses Wachstumsmuster behalten sie durchschnittlich über 104 h bei. Danach kollabieren diese Organoide und kehren zu einem verzweigten Wachstumsmuster zurück. Circa 9 % der $Msh2^{-/-}$ -Organoide (N12 ENR1) wachsen während der 144 h zystisch-ähnlich oder zystisch.

Auch die $Msh2^{+/+}$ -Organoide 12 Monate alter Mäuse (N12 ENR1) wachsen häufiger heterogen. Etwa 5 % dieser Organoide weisen ab 64 h ein zystisch-ähnliches Wachstumsverhalten auf, welches über 60 h beibehalten wird (Abb. 8).

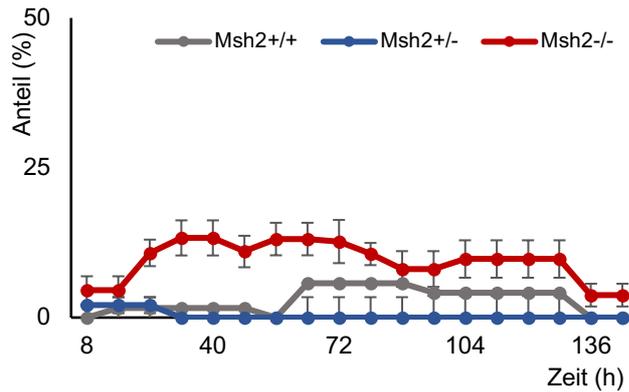


Abbildung 8: prozentualer Anteil (+ SEM) zystisch-ähnlicher und zystisch wachsender Organoide der Fraktion N12 ENR1 aller Genotypen (n=4 Mäuse/Genotyp, n=12 Organoide/Maus)

Es zeigt sich somit, dass Organoide 12 Monate alter Mäuse (N12 ENR1) aller drei Genotypen früher mit einem zystisch-ähnlichen oder zystischen Muster wachsen und dieses länger aufrechterhalten als Organoide des entsprechenden Genotyps 8 Monate alter Mäuse (N8 ENR1). Die Dauer des zystisch-ähnlichen oder zystischen Wachstums ist dabei in *Msh2*^{+/-}- und *Msh2*^{-/-}-Organoiden beider Altersgruppen (N8 ENR1, N12 ENR1) nicht abhängig von der Höhe des Δbp Scores (Abb. 9).

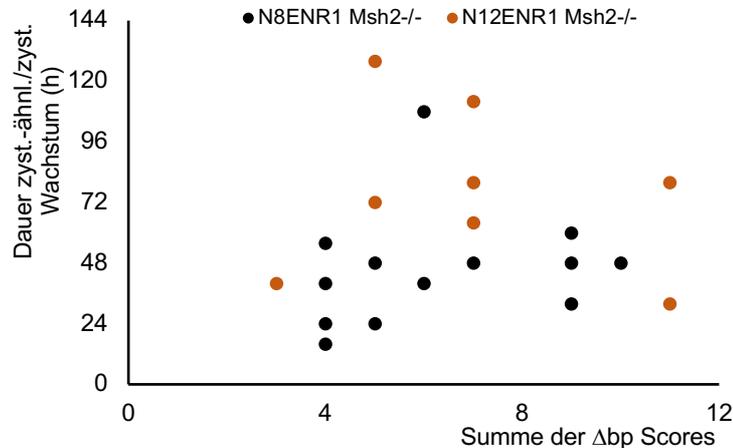


Abbildung 9: Dauer des zystisch-ähnlichen oder zystischen Wachstums und Summe der Δbp Scores der drei Marker für einzelne Organoide, exemplarisch für *Msh2*^{-/-}-Organoide der Fraktionen N8 ENR1 (n=14 Organoide) und N12 ENR1 (n=8 Organoide)

Zystisch-ähnlich wachsende *Msh2*^{+/-}-Organoide 12 Monate alter Mäuse (N12 ENR1) weisen hingegen immer einen unveränderten MSI Score auf.

Das bedeutet, dass das Wachstumsmuster der Organoide und dessen Dauer nicht mit dem Δbp Score korreliert. Eine Änderung des Wachstumsmusters der Organoide (N8 ENR1, N12 ENR1) ist allein durch MSI und nicht deren Ausprägung bedingt. Die

Wahrscheinlichkeit, dass Organoide zystisch-ähnlich oder zystisch wachsen, steigt mit zunehmendem Mausalter.

4.3. Korrelation der Wachstumsgeschwindigkeit der Organoide aus Normalgewebe mit dem Δbp Score

Zum Nachweis eines Zusammenhangs zwischen MSI und der Wachstumsgeschwindigkeit der Organoide aus Normalgewebe wurde für jedes Organoid eine Wachstumskurve erstellt. Die Wachstumsgeschwindigkeit jedes Organoids wurde mit seinem Δbp Score korreliert. Das erfolgte für Organoide 8 und 12 Monate alter Mäuse (N8 ENR1, N12 ENR1) aller drei Genotypen.

Die Wachstumsgeschwindigkeit der Organoide aus Normalgewebe 8 Monate alter Mäuse (N8 ENR1) der drei verschiedenen Genotypen ist gleich. Die mittlere Verdopplungszeit der Querschnittsfläche der Organoide beträgt etwa 30 h (Abb. 10).

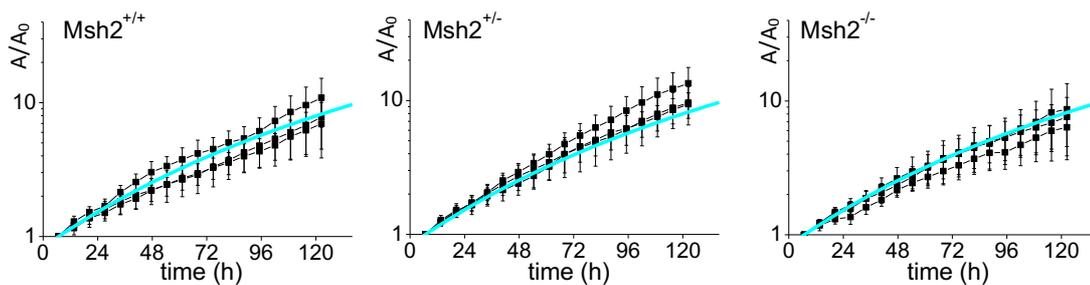


Abbildung 10: Wachstumskurven von Organoiden der Fraktion N8 ENR1 ($n=3$ Mäuse/Genotyp, $n=15$ Organoide/Maus) aller Genotypen, jede Kurve repräsentiert die Organoide einer Maus; blau = angepasste exponentielle Wachstumskurve N12 ENR1 mit einer Verdopplungszeit der Querschnittsfläche von $30 h^{[1]}$

$Msh2^{+/+}$ - und $Msh2^{+/-}$ -Organoide aus Normalgewebe 12 Monate alter Mäuse (N12 ENR1) weisen annähernd die gleiche Wachstumsgeschwindigkeit auf. Im Unterschied dazu zeigen $Msh2^{-/-}$ -Organoide in diesem Mausalter (N12 ENR1) vereinzelt abweichende Wachstumsgeschwindigkeiten. Circa 10 % dieser Organoide wachsen dabei initial schneller als $Msh2^{+/+}$ - und $Msh2^{+/-}$ -Organoide (N12 ENR1), also zystisch. Diese kollabieren jedoch im weiteren Verlauf, also fallen in sich zusammen, und verkleinern dabei ihre Querschnittsfläche (Abb. 11).

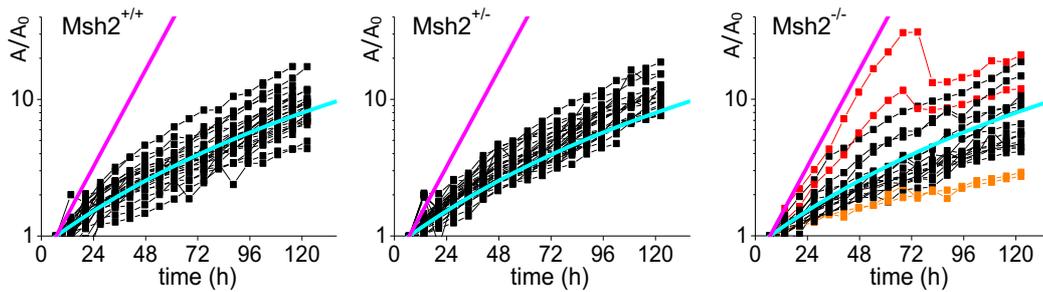


Abbildung 11: Wachstumskurven von einzelnen Organoiden der Fraktion N12 ENR1, jede Kurve repräsentiert ein Organoid ($Msh2^{+/+}$ $n=28$, $Msh2^{+/-}$ $n=32$, $Msh2^{-/-}$ $n=20$), schwarz = verzweigt, rot = zystisch-ähnlich/zystisch, orange = retardiert, blau = angepasste exponentielle Wachstumskurve N12 ENR1 mit einer Verdopplungszeit der Querschnittsfläche von 30 h, rosa = angepasste exponentielle Wachstumskurve T12 E1 mit einer Verdopplungszeit der Querschnittsfläche von 12 h^[1]

Das Wachstumsmuster entwickelt sich dann über ein zystisch-ähnliches zurück zum verzweigten. Die schneller wachsenden Organoide 12 Monate alter Mäuse (N12 ENR1) weisen immer einen maximalen MSI Score auf. Die Summe der Δbp Scores ist im Vergleich zu verzweigt und zystisch-ähnlich wachsenden $Msh2^{-/-}$ -Organoiden in diesem Mausalter (N12 ENR1) jedoch nicht erhöht (Abb. 12).

Circa 80% aller $Msh2^{-/-}$ -Organoide 12 Monate alter Mäuse (N12 ENR1) wachsen mit der gleichen Wachstumsgeschwindigkeit wie $Msh2^{+/+}$ - und $Msh2^{+/-}$ -Organoide in diesem Mausalter (Abb. 11).

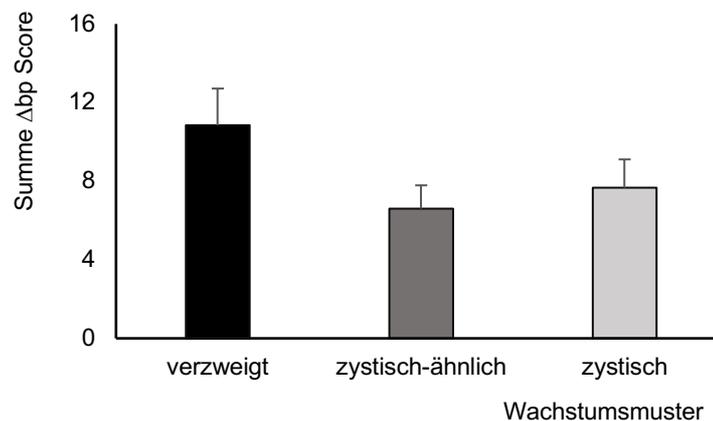


Abbildung 12: Mittelwert der Summe der Δbp Scores (+ SEM) der drei Marker aller $Msh2^{-/-}$ -Organoide der Fraktion N12 ENR1 in Abhängigkeit vom Wachstumsmuster (verzweigt $n=39$ Organoide, zystisch-ähnlich $n=5$ Organoide, zystisch $n=5$ Organoide)

Es besteht somit keine Korrelation zwischen dem Δbp Score und der Wachstumsgeschwindigkeit von Organoiden aus Normalgewebe 8 und 12 Monate alter Mäuse (N8 ENR1 und N12 ENR1) der drei Genotypen.

4.4. Nachweis von Tumorvorläuferzellen in makroskopischem Normalgewebe

Makroskopisch manifeste Tumoren waren nur in mindestens 12 Monate alten *Msh2^{-/-}*-Mäusen nachweisbar. Organoide aus diesen Tumoren wurden ohne Noggin und R-Spondin kultiviert.

Zur Isolation von Organoiden aus Tumorvorläuferzellen (Adenome), wurde makroskopisch normales Gewebe 8 und 12 Monate alter Mäuse nach der mechanischen/EDTA-basierten Isolation von normalen Organoiden enzymatisch verdaut und diese Organoide ebenfalls ohne Noggin und R-Spondin kultiviert.

Anschließend wurden die Δ bp Scores sowie das Wachstumsmuster dieser Organoide 8 und 12 Monate alter Mäuse (A8 E1, A12 E1) sowie von Organoiden aus Tumoren 12 Monate alter *Msh2^{-/-}*-Mäuse (T12 E1) miteinander verglichen.

Organoide aus Tumorgewebe (T12 E1) weisen einen höheren Δ bp Score aller drei Marker als *Msh2^{-/-}*-Organoide aus Normalgewebe 12 Monate alter Mäuse (N12 ENR1) auf. Der deutlichste Unterschied zwischen Normal- und Tumororganoiden zeigt sich im Marker A27. Hier verkürzt sich die Produktlänge der *Msh2^{-/-}*-Organoide (N12 ENR1) von 142 bp auf 139 bp in Tumororganoiden (T12 E1).

Organoide aus Adenomgewebe (A8 E1, A12 E1) haben im Vergleich zu *Msh2^{-/-}*-Organoiden aus Normalgewebe (N12 ENR1) ebenfalls einen erhöhten Δ bp Score in allen Markern. Der Δ bp Score von Organoiden aus Adenomgewebe nimmt dabei mit höherem Mausalter zu, ist jedoch bei Organoiden aus Adenomgewebe 12 Monate alter Mäuse (A12 E1) geringer als in Tumororganoiden (T12 E1) (Abb. 13).

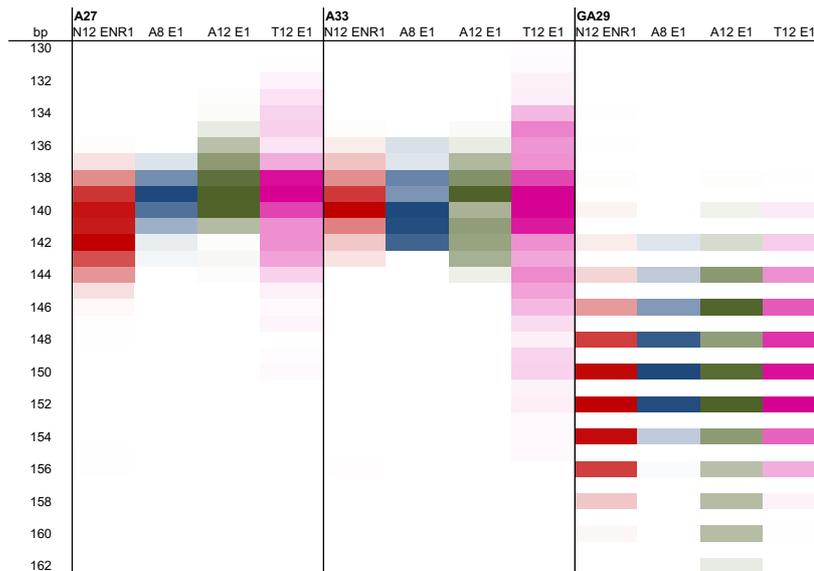


Abbildung 13: heatmap zur Darstellung der Längenänderung der PCR-Produkte der Marker A27, A33 und GA29 in *Msh2*^{-/-}-Organoiden der Fraktionen N12 ENR1, A8 E1, A12 E1 und T12 E1 (n=4 Mäuse/Fraktion, n=10 Organoide aus Normal- und Tumorgewebe/Maus, n=5 Organoide aus Adenomgewebe/Maus)^[1]

Tumororganoiden (T12 E1) wachsen initial ausschließlich zystisch, was sie für mehrere Tage beibehalten. Die Wachstumsgeschwindigkeit in Tumororganoiden (T12 E1) ist im Vergleich zu Organoiden aus Normalgewebe 12 Monate alter Mäuse (N12 ENR1) mit einer mittleren Verdopplungszeit der Querschnittsfläche von etwa 12 h um nahezu das Dreifache gesteigert.

Etwa 3 % der Tumororganoiden (T12 E1) kollabieren bereits nach 48-72 h und kehren über ein zystisch-ähnliches zum verzweigten Wachstumsmuster zurück. 2 % der Tumororganoiden (T12 E1) wachsen nach 48 h nicht mehr. Dieses ausgeprägt heterogene Wachstumsverhalten ist in Organoiden eines einzelnen Tumors als auch zwischen Organoiden unterschiedlicher Tumoren zu beobachten (Abb. 14).

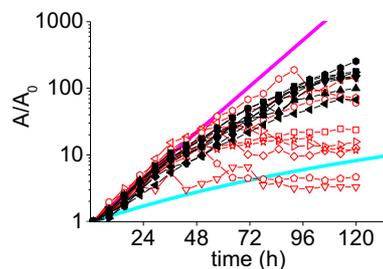


Abbildung 14: Wachstumskurven von einzelnen Organoiden aus zwei Tumoren einer *Msh2*^{-/-}-Maus, jede Kurve repräsentiert ein Organoid (schwarz = Organoide aus Tumor 1 mit nahezu identischem Wachstum, orange = Organoide aus Tumor 2 mit frühzeitigem Wachstumsabbruch, blau = gemittelte Wachstumskurve von normalen Organoiden aus 12 Monate alten Mäusen (N12 ENR1) mit einer Verdopplungszeit der Querschnittsfläche von 30 h, pink = gemittelte Wachstumskurve von Tumororganoiden (T12E1) mit einer Verdopplungszeit der Querschnittsfläche von 12 h^[1]

Organoide aus Adenomgewebe (A8 E1, A12 E1) wachsen initial ebenfalls meist zystisch und schneller als *Msh2*^{-/-}-Organoide der gleichen Mäuse (N12 ENR1). Sie kollabieren später häufiger als Tumorganoide (T12 E1) und kehren über ein zystisch-ähnliches zum verzweigten Wachstumsmuster zurück. Am Ende der Beobachtungszeit (144 h) wachsen etwa 50 % der Adenomorganoide (A8 E1, A12 E1) verzweigt (Abb. 15).

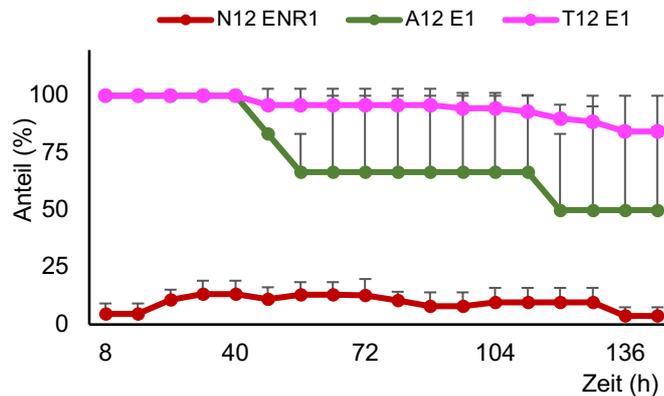


Abbildung 15: prozentualer Anteil (+ SD) zystisch-ähnlich oder zystisch wachsender *Msh2*^{-/-}-Organoide der Fraktionen N12 ENR1, A12 E1 und T12 E1 (n=4 Mäuse/Fraktion, n=10 Organoide aus Normal- und Tumorgewebe/Maus, n=5 Organoide aus Adenomgewebe/Maus)

Die Kultivierung von *Msh2*^{-/-}-Organoiden ohne Noggin und R-Spondin zeigt, dass sich in makroskopisch normalem Gewebe 8 und 12 Monate alter *Msh2*^{-/-}-Mäuse potentielle Tumovorläuferzellen (Adenome) befinden.

Zusätzlich charakterisieren der sich erhöhende Δ bp Score als auch der steigende Anteil zystisch wachsender Organoide von Normal- über Adenom- hin zum Tumorgewebe die Adenom-Karzinom-Sequenz des untersuchten Mausmodells auf Ebene der Organoide.

4.5. Vergleich der MSI zwischen *in vitro*- und *in vivo*-gealterten Organoiden aus Normalgewebe

Um die MSI zwischen *in vitro*- und *in vivo*-gealterten Organoiden zu vergleichen, wurden Organoide aus Normalgewebe 8 Monate alter Mäuse aller drei Genotypen für 18 weitere Wochen unter Anwesenheit von ENR kultiviert (N8 ENR18), sodass diese Organoide letztlich 12 Monate alt waren. Diese *in-vitro* gealterten Organoide wurden mit frisch präparierten Organoiden 12 Monate alter Mäuse (N12 ENR1) verglichen, wodurch der Effekt einer Langzeitkultur auf die genetische Stabilität der Organoide quantifiziert wurde.

Die Δ bp Scores der Organoide aus der Langzeitkultur (N8 ENR18) wurden mit ihrem dazugehörigen Wachstumsmuster und -geschwindigkeit korreliert und anschließend mit

in vivo-gealterten Organoiden 8 und 12 Monate alter Mäuse (N8 ENR1, N12 ENR1) verglichen.

In den *in vitro*-gealterten Organoiden (N8 ENR18) kommt es zu Beginn der Untersuchung häufiger zu zystisch-ähnlichem oder zystischem Wachstum im Vergleich zu *in vivo*-gealterten Organoiden 8 und 12 Monate alter Mäuse (8 ENR1, N12 ENR1). Das zeigt sich in Organoiden aller drei Genotypen. *In vitro*-gealterte *Msh2*^{-/-}-Organoiden (N8 ENR18) zeigen dieses Wachstumsmuster am häufigsten und am längsten (Abb. 16).

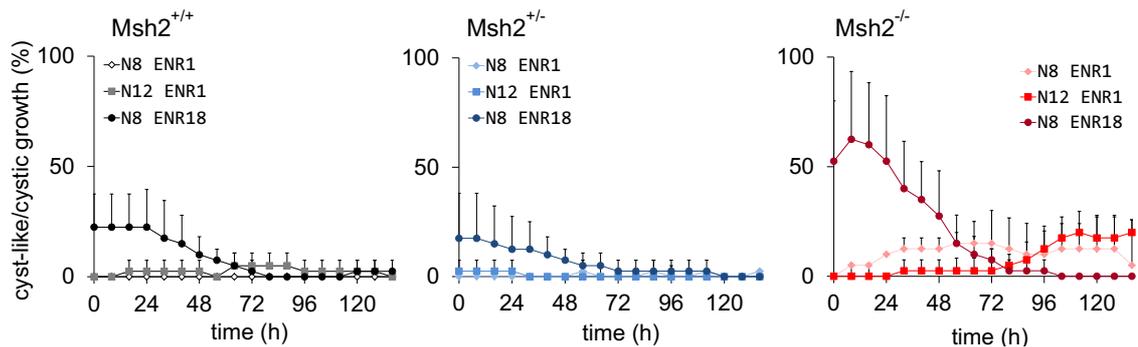


Abbildung 16: prozentualer Anteil (+ SEM) zystisch-ähnlich oder zystisch wachsender Organoiden der Fraktionen N8 ENR1, N12 ENR1 und N8 ENR18 aller Genotypen (n=4 Mäuse/Genotyp, n=10 Organoiden/Maus)^[1]

Die *in vitro*-gealterten Organoiden (N8 ENR18) wachsen im Vergleich zu *in vivo*-gealterten Organoiden 8 und 12 Monate alter Mäuse (N8 ENR1, N12 ENR1) heterogener. Einzelne Organoiden (N8 ENR18) aller drei Genotypen wachsen dabei unmittelbar zu Beginn der Untersuchung mit tumorähnlicher Geschwindigkeit. *In vitro*-gealterte *Msh2*^{-/-}-Organoiden wachsen im Vergleich zu *in vitro*-gealterten *Msh2*^{+/-}- und *Msh2*^{-/-}- Organoiden (N8ENR18) jedoch häufiger und länger tumorähnlich. (Abb. 10, 11, 17)

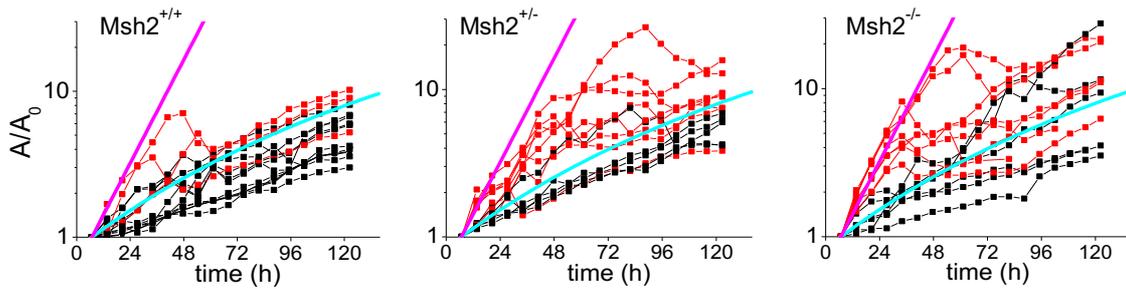


Abbildung 17: Wachstumskurven von einzelnen Organoiden der Fraktion N8 ENR1 einer Maus, jede Kurve repräsentiert ein Organoid ($Msh2^{+/+}$ $n=18$, $Msh2^{+/-}$ $n=22$, $Msh2^{-/-}$ $n=20$), schwarz = verzweigt, rot = zystisch-ähnlich/zystisch, blau = angepasste exponentielle Wachstumskurve N12 ENR1 mit einer Verdopplungszeit der Querschnittsfläche von 30 h, rosa = angepasste exponentielle Wachstumskurve T12 E1 mit einer Verdopplungszeit der Querschnittsfläche von 12 h^[1]

Die Δbp Scores von *in vitro*-gealterten Organoiden (N8 ENR18) sind in allen drei Markern im Vergleich zu *in vivo*-gealterten Organoiden 8 und 12 Monate alter Mäuse (N8 ENR1, N12 ENR1) erhöht. Das zeigt sich besonders deutlich in Organoiden von $Msh2^{-/-}$ Mäusen (N8 ENR18) (Abb. 18).

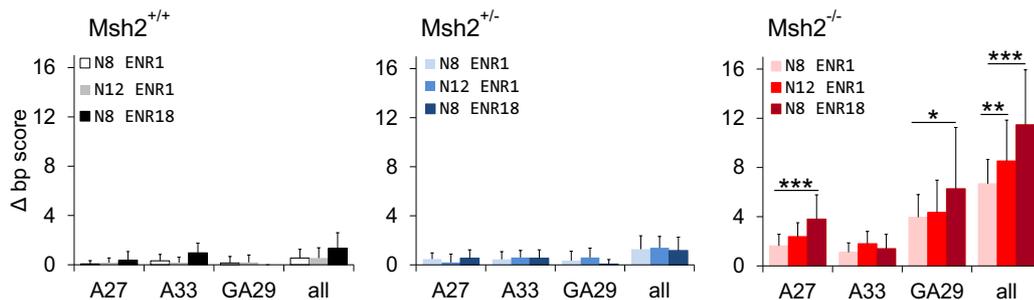


Abbildung 18: Mittelwert der Δbp Scores (+ SEM) der drei Marker und deren Summe von Organoiden der Fraktionen N8 ENR1, N12 ENR1 und N8 ENR18 aller Genotypen ($n=4$ Mäuse/Fraktion und Genotyp, $n=10$ Organoiden/Maus; T-Test: * $p<0,05$, ** $p<0,01$, *** $p<0,001$)^[1]

Das Wachstumsmuster und -geschwindigkeit der *in vitro*-gealterten Organoiden (N8 ENR 18) korreliert wie auch in den *in vivo*-gealterten Organoiden 8 und 12 Monate alter Mäuse (N8 ENR1 und N12 ENR1) nicht mit den Δbp Scores (Abb. 9, 19).

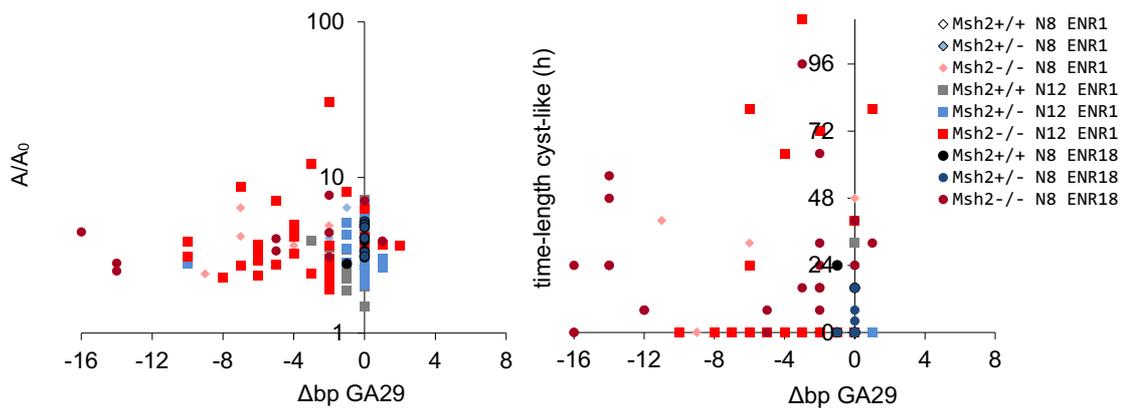


Abbildung 19: Vergrößerung der Querschnittsfläche (links) und Dauer des zystisch-ähnlichen oder zystischen Wachstums (rechts) der Organoide der Fraktionen N8 ENR1, N12 ENR1 und N8 ENR18 in Abhängigkeit vom Δbp Score, exemplarisch für den Marker GA29 ($n=1$ Maus/Fraktion und Genotyp, alle untersuchten Organoide einer Maus sind dargestellt)^[1]

Das bedeutet, dass MSI während einer Langzeitkultivierung von Organoiden eher und häufiger auftritt. Das Wachstumsmuster und die -geschwindigkeit einzelner Organoide ändert sich dabei vermehrt. Die MSI, bestimmt mittels Δbp Scores, korreliert dabei wie während einer *in vivo*-Kultivierung nicht mit der Dauer des geänderten Wachstumsverhaltens.

4.6. Auswirkung von ASS als zusätzlicher Kultivierungsfaktor auf die MSI von *in vitro*-gealterten Organoiden

ASS beeinflusst das *Outcome* von Patienten mit hereditären CRC, beispielsweise hinsichtlich eines verringerten Auftretens von Tumoren, positiv.

Um den potentiellen Einfluss von ASS auf die MSI der Organoide während einer *in vitro*-Langzeitkultivierung zu untersuchen, wurden Organoide aus Normalgewebe 8 Monate alter Mäuse 18 Wochen mit ENR und ASS kultiviert (N8 ENR18 + ASS) und die Δbp Scores und Wachstumsmuster mit *in vitro*-gealterten Organoiden ohne Substitution von ASS (N8 ENR18) verglichen.

Organoide, die mit ASS kultiviert wurden (N8 ENR18 + ASS) zeigen seltener und kürzer ein zystisch-ähnliches oder zystisches Wachstum als *in vitro*-gealterte Organoide ohne ASS (N8 ENR18). Das ist in allen drei Genotypen zu beobachten. Der deutlichste Unterschied zeigt sich in *Msh2*^{-/-}-Organoiden (Abb. 20).

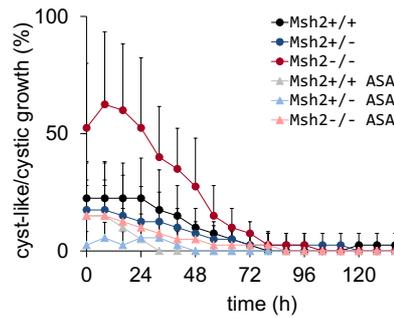


Abbildung 20: prozentualer Anteil (+ SD) zystisch-ähnlich oder zystisch wachsender Organoide der Fraktionen N8 ENR18 und N8 ENR18 + ASS aller Genotypen (n=3 Mäuse/Fraktion und Genotyp, n=10 Organoide/Maus)^[1]

Die Δbp Scores der mit ASS kultivierten *in vitro*-gealterten Organoide (N8 ENR18 + ASS) unterscheiden sich nicht von denen der *in vitro*-gealterten Organoide ohne Substitution von ASS (N8 ENR18) (Abb. 21).

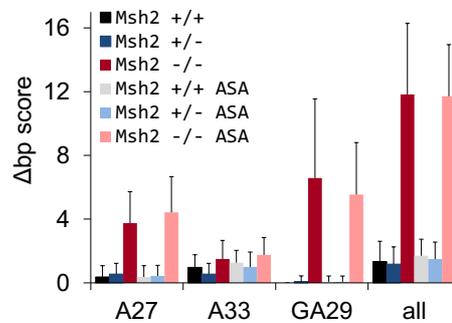


Abbildung 21: Mittelwert der Δbp Scores (+ SEM) der drei Marker und deren Summe von Organoiden der Fraktionen N8 ENR18 und N8 ENR18 + ASS aller Genotypen (n=3 Mäuse/Fraktion und Genotyp, n=10 Organoide/Maus)^[1]

Das bedeutet, dass ASS die während einer Langzeitkultivierung auftretende MSI weder verhindert noch korrigiert, aber das zystisch-ähnliche oder zystische Wachstumsmuster von Organoiden verringert.

5. Diskussion

Unter MMR-D akkumulieren Mutationen durch die Fehlfunktion eines betroffenen MMR-Gens in Abhängigkeit von der Zeit, welche beispielsweise unter *MSH2*-Defizienz zum Auftreten von MSI im intestinalen Gewebe führt^[7]. Derzeit ist es nicht möglich, die zeitliche Abfolge von MSI unter MMR-D im menschlichen Darm vor dem Auftreten von CRC non-invasiv zu untersuchen. Eine Option der Analyse sind ISC-Organoidkulturen in konditionellen *Knockout*-Mausmodellen unterschiedlicher MMR-Gene, wie *Msh2* oder *Mlh1*^[18]. Die Organoiden können dabei sowohl aus makroskopisch unverändertem als auch Tumorgewebe gewonnen werden^[26].

Der entscheidende Vorteil der Organoidkulturen im Vergleich zu 2D-Monolayer-Kulturen liegt darin, dass sie durch ihre 3D-Struktur die Komplexität des räumlichen, epithelialen Aufbaus des Darmgewebes widerspiegeln. Sie bestehen aus Villusdomänen, zusammengesetzt aus allen differenzierten Zelltypen des Darmepithels, sowie Kryptendomänen, welche ISC beinhalten. Diese ISC ermöglichen eine ständige, villusgerichtete Reproduktion des Darmepithels in der prozentual korrekten zellulären Zusammensetzung. Die daraus resultierende hohe Selbsterneuerungsrate der Organoiden führt zur nahezu unbegrenzten Kultivierungsdauer^[27].

Im Gegensatz zu 2D-Monolayer-Kulturen sind ISC-Organoidkulturen jedoch mit deutlichen höheren Kosten und größerem Aufwand während der Kultivierung verbunden. Wie 2D-Monolayer-Kulturen bilden auch sie das intestinale Stroma, welches wichtig für die intestinale Stammzellfunktion ist, nicht ab. Dadurch sind zur Zelldifferenzierung notwendige Signalwege (Wnt, Notch) nicht aktiviert, sodass während der Kultivierung entsprechende Liganden wie Noggin oder R-Spondin substituiert werden müssen.

Ein wichtiges methodisches Ziel dieser Arbeit war die Etablierung von Methoden zur Quantifizierung von MSI in ISC-Organoiden aus makroskopisch normalem Darm- und Tumorgewebe *Msh2*-defizienter Mäuse. Das Wachstumsmuster einzelner Organoiden wurde zudem über einen Zeitraum von 144 h mithilfe von *3D Life Scanning Microscopy* nach dem Prinzip des *z-stackings* aufgezeichnet. Anschließend wurden diese Organoiden unter optischer Kontrolle aus dem zur Einbettung verwendeten Matrigel gepickt und deren DNA isoliert. In einer Multiplex-PCR wurden die etablierten Mikrosatelliten-Marker A27, A33 und GA29, welche in murinem Gewebe unter *Msh2*-Defizienz bekanntermaßen häufig Mutationen aufweisen, auf MSI mit den neu etablierten Methoden untersucht^[12]. Aus der Anzahl der veränderten Mikrosatelliten wurde der MSI Score und aus der Summe der absoluten Längenänderung der untersuchten Mikrosatelliten der Δbp Score erstellt. Diese Scores wurden anschließend mit dem ermittelten Wachstumsmuster der Organoiden korreliert.

Durch den MSI Score kann in den analysierten Mikrosatelliten A27, A33 und GA29 zwischen MSI-stabil (MSI Score=0) und -instabil (MSI Score > 0) unterschieden werden. Das entspricht dem Vorgehen von *Kucherlapati et al.* (2010) bei der Etablierung einer Methode zur Quantifizierung von MSI unter Msh2-Defizienz im *ECMsh2^{LoxP/LoxP}*-Mausmodell^[14, 18]. In deren Analysen wurden nach Extraktion von DNA aus Schwanzbiopsien der Mäuse die Mikrosatelliten-Marker D7Mit91 sowie TG27 auf Alterationen untersucht. Dabei war das Vorliegen von MSI bei beiden Markern, aber nicht deren Ausmaß relevant. *Kucherlapati et al.* orientierten sich hierbei an der aktuellen Definition der *Revised Bethesda-Guidelines for Hereditary Nonpolypoid Colorectal Cancer and Microsatellite Instability* von *Umar et al.* (2004). Auf deren Grundlage werden Tumore von HNPCC-Patienten in MSI-*high* oder MSI-*low* in Abhängigkeit von der Anzahl der instabilen Mikrosatelliten eingeteilt und dadurch Empfehlungen und Aussagen zur weiteren Therapie sowie das *Outcome* ermöglicht^[14, 18].

Die progrediente Akkumulation von Alterationen in Mikrosatelliten über die Zeit ist durch den MSI Score nicht darstellbar, da er lediglich angibt, ob ein Mikrosatellit verändert ist. Der durch uns etablierte Δbp Score bildet hingegen durch die numerische Angabe der Längenänderung der PCR-Produkte den Umfang der Alterationen in den untersuchten Mikrosatelliten zu jedem einzelnen Zeitpunkt ab. Durch die Analyse von ISC-Organoiden aus 1, 2, 3, 5, 8 und 12 Monate alten Mäusen kann somit der altersabhängige Verlauf der MSI in makroskopisch normalem Darmgewebe verfolgt werden.

Parallel zur Quantifizierung des MSI einzelner Organoiden haben wir das Wachstumsmuster der Organoiden durch *life imaging* und *z-stacking* quantifiziert. Zum Zeitpunkt der Veröffentlichung unserer Daten in *Oncogene* 2017 war dies in der Art zur Analyse der phänotypischen Änderungen von Organoiden unter MMR-D noch nicht durchgeführt worden. Das Wachstumsmuster der Organoiden wurde alle 8 h aufgezeichnet und in verzweigt, zystisch-ähnlich oder zystisch, also tumorähnlich, eingeteilt. Das Wachstumsmuster wurde somit exakt einem jeweiligen Zeitpunkt zugeordnet. Trotz des hohen Aufwandes stellt es eine geeignete und präzise Option zur Evaluierung der morphologischen Veränderungen der ISC-Organoiden dar.

Durch die beschriebenen Methoden sollte der Beginn der MSI, der Verlauf der MSI in Abhängigkeit vom Mausalter sowie der Zusammenhang zwischen der MSI und dem Wachstumsmuster der Organoiden dargestellt werden. Hierfür wurden die MSI Scores und Δbp Scores der ISC-Organoiden aus Normalgewebe von 1, 2, 3, 5, 8 und 12 Monate alten Mäusen ermittelt und mit den dazugehörigen Wachstumsmustern korreliert:

MSI erhöht sich in Abhängigkeit vom Alter und Genotyp der Mäuse.

Msh2-Defizienz (*Msh2*^{-/-}) führt zu progredienter MSI in ISC-Organoiden aus makroskopisch normalen Darmgewebe über die Lebenszeit. Es kann eine im frühen Mausalter beginnende und zunehmende Akkumulation von Mutationen innerhalb der drei untersuchten Mikrosatelliten A27, A33 und GA29 beobachtet werden. Diese basiert dabei, wie in Punkt 1.1.1. beschrieben, auf dem kompletten Funktionsverlust der Heterodimere MutS α und MutS β und einer dadurch bedingten inadäquaten Reparatur der während des Replikationsprozesses entstehenden Alterationen^[28].

In den untersuchten ISC-Organoiden aller 3 Maus-Genotypen sind überwiegend Deletionen in den Mikrosatelliten nachzuweisen. Das entspricht unter anderem den Analysen von *Lynch et al.* (2004), die zeigen, dass in CRC hoher MSI in HNPCC-Patienten ebenfalls vorwiegend Deletionen vorliegen^[13].

Der MSI Score in *Msh2*^{-/-}-Organoiden steigt innerhalb einer kurzen Zeitspanne an. Bereits im Mausalter von 2 Monaten sind alle *Msh2*^{-/-}-Organoiden in mindestens 1 Mikrosatelliten verändert. Die Hälfte der *Msh2*^{-/-}-Organoiden weist einen MSI Score > 1 auf. Der kontinuierliche Anstieg der MSI unter *Msh2*-Defizienz in den Organoiden vor dem makroskopischen Nachweis von Tumoren weist darauf hin, dass Mutationen in den ISC lange vor der Manifestation von CRC vorliegen.

Die Entwicklung der MSI vor der eigentlichen Tumormanifestation ist bis dato im Menschen nicht untersucht worden, was durch fehlende Möglichkeiten zur non- oder minimalinvasiven histomorphologischen Begutachtung von intestinalem Gewebe bedingt ist^[29-32]. Das durch uns beobachtete Auftreten von MSI in *Msh2*^{-/-}-Organoiden in frühem Mausalter entspricht teilweise Ergebnissen aktueller Studien von *Diao et al.* (2020) und *Valle et al.* (2019) in HNPCC-Patienten. Diese zeigten, dass es unter *MSH2*-Defizienz sehr zeitig und zusätzlich im Vergleich zu *MSH6*- oder *PMS2*-Defizienz deutlich eher zum Auftreten CRC hoher MSI kommt^[33-35]. Die dargestellte Progressivität der MSI ist dabei durch den Funktionsverlust und die dadurch verringerte Reparaturfähigkeit von gleich zwei Heterodimeren (MutS α und MutS β) im Vergleich zur Defizienz anderer MMR-Gene zu erklären (Tab. 1)^[7, 8, 12].

In HNPCC-Patienten liegt, im Unterschied zu dem hier genutzten Mausmodell, initial nur eine monoallelische Mutation in einem der MMR-Gene und somit eine Restaktivität der Reparaturmechanismen vor.^[36] Das erklärt den deutlich geringeren MSI Score der *Msh2*^{+/-}-Organoiden im Vergleich zu *Msh2*^{-/-}-Organoiden. Ein kompletter Funktionsverlust der genannten Heterodimere wird in HNPCC-Patienten dabei durch einen *second hit* in einzelnen Zellen induziert^[3]. Der steigende MSI Score der *Msh2*^{+/-}-Organoiden in höherem Mausalter weist darauf hin, dass die Suszeptibilität gegenüber dem *second hit* in

Abhängigkeit vom Alter der Mäuse zunimmt und zu steigender MSI führt. Es ist jedoch anzunehmen, dass es nicht in allen *Msh2*^{+/-}-Organoiden zu einem *second hit* kommt. Hier könnte die bereits beschriebene Restaktivität der Reparaturmechanismen die Heterogenität der *Msh2*^{+/-}-Organoiden bezüglich des MSI Scores bedingen^[8].

Bekannt funktionell relevante Mutationen in humanen ISC unter MMR-D, welche bei HNPCC-Patienten aufgrund von MSI in codierenden Genomabschnitten (*CHEK1*, *GRB14* und *TCF7L2*) entstehen und zur Tumorentstehung führen, waren in unseren Untersuchungen in 8 und 12 Monate alten *Msh2*^{+/-}-Mäusen nicht nachzuweisen^[1, 37].

Organoiden aus Normalgewebe verändern ihr Wachstumsmuster und -geschwindigkeit in Abhängigkeit vom Alter und Genotyp der Mäuse.

Zystisch-ähnliches und zystisches Wachstum von ISC-Organoiden ist ein Zeichen für gesteigerte Unabhängigkeit von R-Spondin durch eine Hyperaktivierung des Wnt-Signalweges. Es tritt vermehrt in alterierten und MMR-defizienten Zellen auf.

Unter *Msh2*-Defizienz (*Msh2*^{-/-}) wachsen 10% der Organoiden aus Normalgewebe von 12 Monate alten Mäusen vermehrt zystisch-ähnlich oder zystisch und mit höherer Geschwindigkeit, ähnlich Organoiden aus Tumorgewebe. Das zeigt, dass es in *Msh2*^{-/-} im Vergleich zu *Msh2*^{+/+}- und *Msh2*^{+/-}-Organoiden über die Zeit vermehrt zur Akkumulation von Alterationen kommt, die zu einer Änderung des Wachstumsmusters, welches für Organoiden aus Tumorgewebe charakteristisch ist.

Das Wachstumsmuster und die Wachstumsgeschwindigkeit einzelner Organoiden korreliert dabei jedoch nicht mit deren Mikrosatellitenstatus, was bedeutet, dass genotypische Veränderungen unter MMR-D nicht zwangsläufig tumorähnliches Wachstum bedingen.

Das entspricht den Hypothesen von *Tomlinson et al.* (1999) sowie *Cerretelli et al.* (2020) im Hinblick auf die generelle Entstehung von Tumoren. Sie beschreiben, dass eine erhöhte Mutationsrate *per se* nicht zwangsläufig zu karzinogenen Prozessen führen muss^[38]. Alterierte Zellen entgehen jedoch häufiger einer Immunantwort und weichen folgend Apoptosesignalen aus, was letztlich in einem erhöhten Risiko der Tumorentstehung resultiert^[8, 39].

In unserer Studie weisen alle normalen Organoiden mit gesteigerter Wachstumsgeschwindigkeit, ähnlich Organoiden aus Tumorgewebe, den maximalen MSI Score 3 auf. Der Δbp Score ist jedoch im Vergleich zu Organoiden mit geringerer Wachstumsgeschwindigkeit nicht erhöht. Das lässt vermuten, dass das lediglich Vorliegen von MSI und nicht das Ausmaß der Alterationen relevant für eine

phänotypische, also karzinogene Veränderung ist. Auch das entspricht den zuvor angeführten Hypothesen^[8, 38].

In der Arbeit sollte weiterhin der Effekt einer Langzeitkultivierung auf die MSI der Organoide quantifiziert werden. Hierfür wurden Organoide aus Normalgewebe 8 Monate alter Mäuse für 18 weitere Wochen kultiviert und anschließend hinsichtlich der MSI und den Δ bp Scores sowie dem Wachstumsmuster mit Organoiden aus Normalgewebe 12 Monate alter Mäuse verglichen.

Eine *in vitro*-Langzeitkultivierung von Organoiden führt zu höherer MSI und ändert das Wachstumsmuster der Organoide.

In vitro-gealterte Organoide aller 3 Genotypen wachsen häufiger zystisch-ähnlich oder zystisch und weisen höhere Δ bp Scores auf als *in vivo*-gealterte Organoide. Das bedeutet, dass sich MSI *in vitro* schneller entwickelt als *in vivo*. Dabei ist zystisch-ähnliches oder zystisches Wachstum durch eine erhöhte Unabhängigkeit von R-Spondin einzelner ISC innerhalb der Organoide charakterisiert. Das könnte durch die Akkumulation von Alterationen verursacht sein, die in Langzeitkultivierung vermehrt zu einer Störung des Ascl2-Autofeedback-Mechanismus führen, wie von *Almeqdad et al.* (2019) und *Schuijers et al.* (2015) beschrieben. Die durch eine Langzeitkultivierung bedingte Hyperaktivierung des kanonischen Wnt-Signalweges resultiert dabei in einer gesteigerten Proliferation der alterierten Zellen und führt zu vermehrtem Auftreten eines zystisch-ähnlichen oder zystischen Wachstumsmusters^[27, 40].

Obwohl zystisch-ähnliches Wachstum vor allem bei *in vitro*-gealterten *Msh2*^{-/-}-Organoide zu beobachten war, trat es sporadisch auch bei *in vitro*-gealterten *Msh2*^{+/-}- und *Msh2*^{+/+}-Organoiden auf. Das bedeutet, dass Alterationen während einer *in vitro*-Langzeitkultivierung auch sporadisch in genetisch unverändertem Gewebe auftreten können und detektierbar werden. Es findet dabei eine positive Selektion der genetisch veränderten, von R-Spondin unabhängig und somit schneller wachsenden ISC-Organoide statt. Es werden somit Faktoren benötigt, die durch eine Langzeitkultivierung bedingte Alterationen und phänotypische Veränderungen verhindern.

Um im makroskopisch normalen Darmgewebe Tumorvorläuferzellen (Adenome) nachzuweisen, wurden Darmproben 8 und 12 Monate alter Mäuse nach Aufschluss mit EDTA zusätzlich enzymatisch verdaut. Aus den hieraus gewonnenen Tumorvorläuferzellen wurden, entsprechend ISC aus Tumorgewebe, ohne Noggin und

R-Spondin Organoide generiert. Die MSI und Δ bp Scores dieser Organoide wurden mit ihrem Wachstumsmuster korreliert und mit denen der Organoide aus Normal- und Tumorgewebe 8 und 12 Monate alter Mäuse verglichen.

Tumorvorläuferzellen liegen in makroskopisch normalen Darmabschnitten vor.

Wir konnten Tumorvorläuferzellen in makroskopisch normalem Gewebe von *Msh2*^{-/-}-Mäusen bereits in 8 Monate alten Mäusen und somit 4 Monate vor der eigentlichen Tumorentstehung detektieren. Das entspricht dem durch *Ahadova et al.* (2018) postulierten dritten molekularen Signalweg der intestinalen Tumorentstehung unter *MSH2*-Defizienz. Dieser beschreibt, dass CRC aus nicht-polypösen, und somit nicht makroskopisch sichtbaren, mukosalen Läsionen aufgrund von MMR-D sowie einer sekundär erworbenen Mutation des *APC*-Gens entstehen^[41]. Organoide aus Tumorvorläuferzellen wachsen dabei ähnlich den Organoiden aus Tumorgewebe unabhängig von R-Spondin mit einem zystisch-ähnlichem Wachstumsmuster und einer gesteigerten Wachstumsrate. Das lässt ebenfalls auf die zuvor beschriebene mutationsbedingte permanente Aktivierung des Wnt-Signalweges schließen^[23, 41].

In diesen Tumorvorläuferzellen sind somit einerseits MMR-D und zusätzlich das Auftreten weiterer Mutationen, beispielweise des *APC*-Gens, zur eigentlichen Tumorformation notwendig. Das stimmt mit Beobachtungen in HNPCC-Patienten überein, bei denen eine monoallelische Inaktivierung der MMR-Gene regelmäßig nachgewiesen wird, diese aber nur in wenigen Fällen und im höheren Alter zur Tumorentstehung führt^[42, 43]. Daraus kann neben einer ausreichenden Restfunktion des betroffenen MMR-Gens zusätzlich auf eine kompetitiv bedingte negative Selektion von genetisch veränderten ISC im Sinne einer intestinalen Schutzfunktion geschlossen werden, wie durch *Lynch et al.* (2006, 2015) in der Theorie der MMR-Genotyp-Phänotyp-Heterogenität beschrieben^[7, 44].

Insgesamt spiegeln die progredienten Alterationen sowie der steigende Anteil von zystisch-ähnlichem und zystischem Wachstum von normalen über Adenom- zu Tumororganoiden einer Altersgruppe die genetischen und morphologischen Änderungen im Rahmen einer Adenom-Karzinom-Sequenz wider, die bei der Entstehung HNPCC-assoziiertes CRC bekannt ist^[3, 7].

In unserer Zucht entwickeln *Msh2*^{-/-}-Mäuse erst im Alter von 12 Monaten makroskopisch sichtbare Tumore, was gemessen am durchschnittlichen möglichen Lebensalter einer Labormaus relativ spät ist. Im Unterschied dazu entstehen in HNPCC-Patienten mit

biallelischer Mutation eines MMR-Gens in allen somatischen Zellen, der sogenannten konstitutionellen MMR-D, HNPCC-assoziierte Tumore bereits teilweise vor dem 6. Lebensjahr, was mit einer deutlich verminderten Lebenserwartung verbunden ist^[7]. Diese Beobachtung ist durch die isoliert auf den Darm beschränkte MMR-D im untersuchten Mausmodell zu erklären und ist vergleichbar mit Ergebnissen aus anderen tierexperimentellen Untersuchungen wie beispielsweise *Kucherlapati et al.* (2010) im *ECMsh2^{LoxP/LoxP}*-Mausmodell, in welchen ebenfalls erst im höheren Mausalter eine intestinale Tumorformation zu beobachten war^[18]. Hieraus kann im Vergleich zu anderen Gewebearten auf eine ausgeprägte, darmspezifische Fähigkeit geschlossen werden, mutierte Zellen über einen langen Zeitraum kompetitiv oder selektiv zu eliminieren und somit einer frühen Tumorentstehung vorzubeugen^[45].

Optimierte Kulturbedingungen stellen eine Möglichkeit dar, um ungewollte genetische Veränderungen während einer *in vitro*-Langzeitkultivierung von Organoiden zu minimieren. Wir untersuchten deshalb den Einfluss von ASS auf die MSI und das Wachstumsmuster von *in vitro*-gealterten Organoiden. Dafür wurden Organoiden 8 Monate alter Mäuse für 18 weitere Wochen unter ASS Substitution kultiviert und deren MSI und Δ bp Scores und das Wachstumsmuster mit *in vitro*-gealterten Organoiden ohne ASS Substitution verglichen.

ASS minimiert zystisch-ähnliches und zystisches Wachstum von Organoiden in *in vitro*-Langzeitkultur, verhindert jedoch nicht das Auftreten von MSI.

ASS verlängert die Lebenszeit der *Msh2^{-/-}*-Mäuse sowie die Zeitspanne bis zur eigentlichen Entstehung von CRC, wie zuvor von *McIlhatton et al.* (2011) im *VC^{+/?}Msh2^{LoxP/LoxP}(Msh2^{-/-})*-Mausmodell beschrieben^[19, 46]. Diese Beobachtung entspricht ebenfalls den Ergebnissen der CaPP2-Studie von *Burn et al.* (2020), in denen die Substitution von ASS das Auftreten von Adenomen und Karzinomen bei HNPCC-Patienten reduziert^[46].

Unter Substitution von ASS wuchsen weniger *Msh2^{-/-}*-Organoiden und Organoiden aller Genotypen zeigten tendenziell weniger zystisch-ähnliches oder zystisches Wachstum. Der Δ bp Score war hingegen nicht erniedrigt.

Kucherlapati et al. (2010) diskutieren, dass die Substitution von ASS durch die gesteigerte Apoptose instabiler Zellen zu einer Selektion von MMR-defizienten, aber stabilen Zellpopulationen mit hoher Mikrosatellitenstabilität *in vivo* führt und dadurch eine verminderte Tumorentstehung bedingt^[18]. In unseren *in vitro*-Untersuchungen kommt es unter Substitution von ASS ebenfalls zu einer Selektion von MMR-defizienten und

stabilen Zellen, die jedoch überwiegend MSI aufweisen. Somit führt die Substitution von ASS zur Stabilisierung MMR-defizienter, zystisch-ähnlich oder zystisch wachsender Zellen *in vitro*. Sie verhindert jedoch nicht die durch die *in vitro*-Langzeitkultivierung erhöhte MSI. *Harris et al.* (2014) postulierten, dass eine Rückkehr vom zystischen zum verzweigten Wachstumsmuster der Organoide auf einer verminderten Proliferationsrate sowie einem erhöhten Elastizitätsmodul der Epithelzellen in dem Organoid beruht^[1, 47]. Beide Effekte treten bekanntermaßen während epithelialer Differenzierung auf^[25, 47]. Unsere Ergebnisse können demnach darauf hindeuten, dass ASS die intestinale Differenzierung von Epithelzellen fördert und so zystisch-ähnliches oder zystisches, also tumorähnliches Wachstum minimiert. ASS könnte dabei weiterhin die Expansion von alterierten Zellen minimieren und dadurch tumorähnlichem Wachstum vorbeugen.

Ausblick

Organoidkulturen MMR-defizienter Mäuse geben Einblick in die gewebsspezifische Akkumulation von Mutationen in Abhängigkeit vom Alter der Tiere und den Kultivierungsbedingungen der Organoide. Im Hinblick auf Untersuchungen im Menschen können sie dabei das Problem der ethischen und gesetzlichen Einschränkungen im Rahmen der Arbeit mit fetalen Stammzellen lösen. Die Verwendung von aus adultem menschlichem Gewebe gewonnenen Organoiden als Diagnostikum sowie Therapeutikum bei Erkrankungen wie chronisch entzündlichen Darmerkrankungen, cystischer Fibrose oder auch CRC ist in den letzten Jahren immer stärker in den Fokus der Wissenschaft gerückt^[27]. Auch virale und bakterielle Ko-Kultivierung von Organoiden mit beispielsweise dem humanen Rotavirus oder *Helicobacter pylori* sind seit längerem möglich und führten hierbei zu zahlreichen Erkenntnissen der Pathophysiologie unterschiedlicher gastrointestinaler Erkrankungen^[48, 49].

Als potentielles medizinisches Therapeutikum bedarf es gerade im Hinblick auf die Methodik und Durchführung der Organoidkultivierung weiterer intensiver Forschung. Spezifisch und individuell festgelegte Kultivierungsbedingungen könnten eine Option darstellen, um genetische Veränderungen in Organoiden innerhalb der Langzeitkultur zu vermeiden. Hierbei könnte beispielsweise eine dosisabhängige Wirkung von ASS, entsprechend der CaPP3-Studie, als Faktor bei Langzeitkultivierung von ISC-Organoiden in weiterführenden Studien untersucht werden^[46].

Auch in anderen medizinischen Fachrichtungen, wie der onkologischen Kopf-/Halschirurgie, werden *in vitro*-langzeitkultivierte Organoide verwendet, um beispielsweise die Effektivität adjuvanter, patientenspezifischer Therapieregime für das orale Plattenepithelkarzinom zu evaluieren^[50]. Somit könnten die in dieser Arbeit

etablierten Methoden zur Quantifizierung von genetischen Alterationen in Organoiden sowie die erzielten Ergebnisse unserer Analysen ebenfalls als Grundlage für Untersuchungen auf anderen medizinischen Gebieten genutzt werden, in denen Organoidkulturen zunehmend eine Rolle spielen.

6. Zusammenfassung

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades
doctor medicinae (Dr. med.)

Mikrosatelliteninstabilität in Organoiden aus murinen intestinalen Stammzellen unter Msh2-Defizienz

eingereicht von Tobias Kreutzmann

angefertigt an der Klinik und Poliklinik für Viszeral-, Transplantations-, Thorax und Gefäßchirurgie, chirurgisches Forschungslabor

betreut von Prof. Dr. rer. nat. Gabriela Aust

Juni 2021

Kurzreferat

Unter *mismatch repair*-Defizienz (MMR-D) akkumulieren Mutationen durch die Fehlfunktion eines betroffenen MMR-Gens in Abhängigkeit von der Zeit und können zum Auftreten von kolorektalen Karzinomen (CRC) führen. Diese Mutationen sind beispielsweise unter *MSH2*-Defizienz als Mikrosatelliteninstabilität (MSI) in nicht codierenden Genomabschnitten im intestinalen Gewebe detektierbar. Die Analyse der Entwicklung der MSI im intestinalen Gewebe unter MMR-D ist im Menschen schwierig und ethisch nicht vertretbar. Eine Option der Analyse stellen Organoidkulturen, als Miniaturausgabe des intestinalen Gewebes *ex vivo*, dar. Ziel der Arbeit ist es, die Häufigkeit von Mutationen in Mikrosatelliten von Organoiden unter *Msh2*-Defizienz aus normalem Darm, Tumorstammzellen und Tumoren in Abhängigkeit vom Alter der Maus, der Dauer und den Bedingungen der Organoidkultur zu quantifizieren. Dazu wurde der Mikrosatellitenstatus einzelner Organoide mit dem dazugehörigen Wachstumsmuster korreliert.

Folgende Fragen sollten beantwortet werden:

- Ab welchem Mausalter tritt MSI auf? Ist sie altersabhängig? Korreliert sie mit dem dazugehörigen Wachstumsmuster?
- Sind Tumorstromvorfürerzellen (Adenome) in makroskopisch normalem Gewebe vorhanden?
- Haben Kultivierungsdauer und -faktoren Einfluss auf die MSI und das Wachstumsmuster der Organotide?

Material und Methodik

Altersidentische *Msh2^{+/+}*-, *Msh2^{+/-}*-, und *Msh2^{-/-}*- Mäuse und daraus generierte Organotide wurde als Triplets generell parallel analysiert. Die Organotidkultivierung erfolgte durch Isolierung von Darmkrypten aus makroskopischem Normal- und Tumorgewebe. Das Wachstum wurde mittels *life imaging* aller 8 h über 144 h für jedes Organotid aufgezeichnet. Wachstumskurven wurden errechnet und das Wachstumsmuster eines Organotids wurde zu jedem Zeitpunkt klassifiziert. Die Organotide wurden nach dem *life imaging* gepickt und mithilfe der Mikrosatellitenmarker A27, A33, GA29 in einer Multiplex-PCR auf Alterationen analysiert. Hieraus konnte ein MSI Score, ein Δbp Score und dazugehörige *heatmaps*, die die qualitativen Änderungen der Marker visuell widerspiegeln, ermittelt werden.

Ergebnisse

MSI ist in ISC-Organotiden von Msh2^{-/-}-Mäusen vor dem Auftreten solider Tumoren in einem Alter von 12 Monaten nachweisbar und steigt über die Lebenszeit an. Bereits in einem Alter von 5 Monaten ist der maximale MSI Score, der lediglich die Anzahl veränderter Mikrosatelliten aufzeigt, erreicht. Der Δbp Score zeigt, dass die Längenveränderungen im Bereich der Mikrosatelliten weiter kontinuierlich zunimmt und ein mit fortschreitendem Alter progressiver Nukleotidverlust auftritt.

Die Wachstumsraten und -muster der Organotide von Msh2^{-/-}-Mäusen werden mit zunehmendem Alter heterogen. Bis zu einem Mausalter von 8 Monaten zeigen die Organotide aus dem Normalgewebe der Mäuse ein homogenes, verzweigtes Wachstum. Im Alter von 12 Monaten wachsen jedoch etwa 10 % der Organotide initial zystisch, ähnlich Organotiden aus Tumorgewebe. Dieses inhomogene Wachstumsmuster ist unabhängig vom ermittelten MSI Score.

Tumorstromvorfürerzellen akkumulieren in normalem Epithel von Msh2^{-/-}-Mäusen weit vor dem Auftreten solider Tumoren. Organotide, die ohne den Zusatz von Noggin und

R-Spondin aus enzymatisch verdauten Normalgewebe anwachsen, stammen von Tumorvorläuferzellen ab. Sie können aus 8 und 12 Monate alten *Msh2*^{-/-}, jedoch nicht *Msh2*^{+/-}- und *Msh2*^{+/+}-Mäusen isoliert werden, und weisen ein zystisches, tumorähnliches Wachstum auf. Die Wachstumsrate sowie der Δbp Score der Organoide ist im Vergleich zu Organoiden aus Normalgewebe erhöht.

Alterationen in ISC nehmen unter Langzeitkultivierung zu und akkumulieren in vitro schneller als in vivo. Organoide 8 Monate alter Mäuse wurden für weitere 18 Wochen *in vitro* kultiviert. Es konnte gezeigt werden, dass nach dieser Zeit im Vergleich zu 12 Monate alten Organoiden vermehrt zystisch-ähnliches Wachstum auftritt. Der Δbp Score steigt *in vitro* schneller als *in vivo*.

Acetylsalicylsäure (ASS) vermindert das Auftreten und die Länge von zystisch-ähnlichem Wachstum, verändert jedoch nicht den Δbp Score. Nach Langzeitkultur mit ASS über 18 weitere Wochen wachsen Organoide 8 Monate alter Mäuse aller drei Genotypen seltener zystisch-ähnlich. ASS vermindert die Anwachsrate von *Msh2*^{-/-}-Organoiden. Der Δbp Score ändert sich unter Substitution von ASS nicht.

Fazit

Organoidkulturen MMR-defizienter Mäuse geben Einblick in die gewebsspezifische Akkumulation von Mutationen in Abhängigkeit vom Alter der Tiere und den Kultivierungsbedingungen der Organoide. Sie lösen dabei ethische und gesetzliche Probleme im Umgang mit fetalen Stammzellen und stehen durch die Darstellung physiologischer und pathologischer Mechanismen, beispielsweise bei zystischer Fibrose, oralen Plattenepithelkarzinomen oder CRC im Mittelpunkt von Betrachtungen verschiedener medizinischer Fachrichtungen.

Durch diese Arbeit wurden Methoden zur Quantifizierung genetischer Alterationen in ISC-Organoiden unter *Msh2*-Defizienz etabliert sowie Kultivierungsbedingungen zur Beeinflussung einer *in vitro*-Langzeitkultivierung von ISC-Organoiden charakterisiert, die als Grundlagen zur weiteren Forschung im Hinblick auf die Behandlung von HNPCC-Patienten als auch anderen Erkrankungen dienen können.

7. Literaturverzeichnis

1. Keysselt, K., et al., *Different in vivo and in vitro transformation of intestinal stem cells in mismatch repair deficiency*. *Oncogene*, 2017. **36**(19): p. 2750-2761.
2. Krebsregisterdaten, Z.f. „Krebs in Deutschland“ - Darmkrebs (2016). 2019 17.12.2019; Available from: https://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Krebsarten/Darmkrebs/darmkrebs_node.html.
3. Muller, M.F., A.E. Ibrahim, and M.J. Arends, *Molecular pathological classification of colorectal cancer*. *Virchows Arch*, 2016. **469**(2): p. 125-34.
4. Binder, H., et al., *Genomic and transcriptomic heterogeneity of colorectal tumours arising in Lynch syndrome*. *J Pathol*, 2017. **243**(2): p. 242-254.
5. Pawlik, T.M., C.P. Raut, and M.A. Rodriguez-Bigas, *Colorectal carcinogenesis: MSI-H versus MSI-L*. *Dis Markers*, 2004. **20**(4-5): p. 199-206.
6. Bui, Q.M., D. Lin, and W. Ho, *Approach to Lynch Syndrome for the Gastroenterologist*. *Dig Dis Sci*, 2017. **62**(2): p. 299-304.
7. Lynch, H.T., et al., *Milestones of Lynch syndrome: 1895-2015*. *Nat Rev Cancer*, 2015. **15**(3): p. 181-94.
8. Cerretelli, G., et al., *Molecular Pathology of Lynch Syndrome*. *J Pathol*, 2020.
9. Heinimann, K., *Toward a molecular classification of colorectal cancer: the role of microsatellite instability status*. *Front Oncol*, 2013. **3**: p. 272.
10. Sigve Nakken, E.H., Pål Møller. *Prospective Lynch Syndrome Database (PLSD) - cumulative risk for cancer by age, genetic variant, and gender in carriers*. 2019; Available from: https://sigven78.shinyapps.io/plsd_v4/.
11. Bacher, J.W., et al., *Use of mononucleotide repeat markers for detection of microsatellite instability in mouse tumors*. *Mol Carcinog*, 2005. **44**(4): p. 285-92.
12. Kabbarah, O., et al., *A panel of repeat markers for detection of microsatellite instability in murine tumors*. *Mol Carcinog*, 2003. **38**(4): p. 155-9.
13. Lynch, H.T., et al., *A founder mutation of the MSH2 gene and hereditary nonpolyposis colorectal cancer in the United States*. *JAMA*, 2004. **291**(6): p. 718-24.
14. Umar, A., et al., *Revised Bethesda Guidelines for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (Lynch syndrome) and microsatellite instability*. *J Natl Cancer Inst*, 2004. **96**(4): p. 261-8.
15. Burn, J., et al., *Long-term effect of aspirin on cancer risk in carriers of hereditary colorectal cancer: an analysis from the CAPP2 randomised controlled trial*. *Lancet*, 2011. **378**(9809): p. 2081-7.

16. Boland, C.R., *A knockout for Lynch syndrome*. *Gastroenterology*, 2010. **138**(3): p. 820-2.
17. Lee, K., E. Tosti, and W. Edelmann, *Mouse models of DNA mismatch repair in cancer research*. *DNA Repair (Amst)*, 2016. **38**: p. 140-146.
18. Kucherlapati, M.H., et al., *An Msh2 conditional knockout mouse for studying intestinal cancer and testing anticancer agents*. *Gastroenterology*, 2010. **138**(3): p. 993-1002 e1.
19. McIlhatton, M.A., et al., *Aspirin and low-dose nitric oxide-donating aspirin increase life span in a Lynch syndrome mouse model*. *Cancer Prev Res (Phila)*, 2011. **4**(5): p. 684-93.
20. Daoud, A. and J.O. Munera, *Insights Into Human Development and Disease From Human Pluripotent Stem Cell Derived Intestinal Organoids*. *Front Med (Lausanne)*, 2019. **6**: p. 297.
21. Sato, T. and H. Clevers, *Growing self-organizing mini-guts from a single intestinal stem cell: mechanism and applications*. *Science*, 2013. **340**(6137): p. 1190-4.
22. Sato, T., et al., *Single Lgr5 stem cells build crypt-villus structures in vitro without a mesenchymal niche*. *Nature*, 2009. **459**(7244): p. 262-5.
23. Takahashi, T. and A. Shiraishi, *Stem Cell Signaling Pathways in the Small Intestine*. *Int J Mol Sci*, 2020. **21**(6).
24. Wang, Y., et al., *Self-renewing Monolayer of Primary Colonic or Rectal Epithelial Cells*. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol*, 2017. **4**(1): p. 165-182 e7.
25. Sato, T., et al., *Long-term expansion of epithelial organoids from human colon, adenoma, adenocarcinoma, and Barrett's epithelium*. *Gastroenterology*, 2011. **141**(5): p. 1762-72.
26. Drost, J. and H. Clevers, *Organoids in cancer research*. *Nat Rev Cancer*, 2018. **18**(7): p. 407-418.
27. Almeqdadi, M., et al., *Gut organoids: mini-tissues in culture to study intestinal physiology and disease*. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2019. **317**(3): p. C405-C419.
28. Chikatani, K., et al., *A Model for Predicting DNA Mismatch Repair-deficient Colorectal Cancer*. *Anticancer Res*, 2020. **40**(8): p. 4379-4385.
29. Battaglin, F., et al., *Microsatellite instability in colorectal cancer: overview of its clinical significance and novel perspectives*. *Clin Adv Hematol Oncol*, 2018. **16**(11): p. 735-745.
30. Currey, N., et al., *Microsatellite Instability in Mouse Models of Colorectal Cancer*. *Can J Gastroenterol Hepatol*, 2018. **2018**: p. 6152928.

31. Pecriaux, A., et al., *Detection of microsatellite instability in a panel of solid tumours with the Idylla MSI Test using extracted DNA*. J Clin Pathol, 2021. **74**(1): p. 36-42.
32. Serra, S., et al., *Unique MLH1 mutations in colonic adenomas in an obligate germline Lynch syndrome carrier*. J Clin Pathol, 2020. **73**(5): p. 291-295.
33. Diao, Z., et al., *The clinical utility of microsatellite instability in colorectal cancer*. Crit Rev Oncol Hematol, 2020. **157**: p. 103171.
34. Valle, L., et al., *Update on genetic predisposition to colorectal cancer and polyposis*. Mol Aspects Med, 2019. **69**: p. 10-26.
35. Valle, L., et al., *Genetic predisposition to colorectal cancer: syndromes, genes, classification of genetic variants and implications for precision medicine*. J Pathol, 2019. **247**(5): p. 574-588.
36. Liu, D., G. Keijzers, and L.J. Rasmussen, *DNA mismatch repair and its many roles in eukaryotic cells*. Mutat Res, 2017. **773**: p. 174-187.
37. Woerner, S.M., et al., *Detection of coding microsatellite frameshift mutations in DNA mismatch repair-deficient mouse intestinal tumors*. Mol Carcinog, 2015. **54**(11): p. 1376-86.
38. Tomlinson, I. and W. Bodmer, *Selection, the mutation rate and cancer: ensuring that the tail does not wag the dog*. Nat Med, 1999. **5**(1): p. 11-2.
39. Seth, S., et al., *Lynch syndrome - cancer pathways, heterogeneity and immune escape*. J Pathol, 2018. **246**(2): p. 129-133.
40. Schuijers, J., et al., *Ascl2 acts as an R-spondin/Wnt-responsive switch to control stemness in intestinal crypts*. Cell Stem Cell, 2015. **16**(2): p. 158-70.
41. Ahadova, A., et al., *Three molecular pathways model colorectal carcinogenesis in Lynch syndrome*. Int J Cancer, 2018. **143**(1): p. 139-150.
42. Kloor, M., et al., *Prevalence of mismatch repair-deficient crypt foci in Lynch syndrome: a pathological study*. Lancet Oncol, 2012. **13**(6): p. 598-606.
43. Staffa, L., et al., *Mismatch repair-deficient crypt foci in Lynch syndrome--molecular alterations and association with clinical parameters*. PLoS One, 2015. **10**(3): p. e0121980.
44. Lynch, H.T., et al., *American founder mutation for Lynch syndrome. Prevalence estimates and implications*. Cancer, 2006. **106**(2): p. 448-52.
45. Tao, S., et al., *Wnt activity and basal niche position sensitize intestinal stem and progenitor cells to DNA damage*. EMBO J, 2017. **36**(19): p. 2920-2921.
46. Burn, J., et al., *Cancer prevention with aspirin in hereditary colorectal cancer (Lynch syndrome), 10-year follow-up and registry-based 20-year data in the*

- CAPP2 study: a double-blind, randomised, placebo-controlled trial.* Lancet, 2020. **395**(10240): p. 1855-1863.
47. Harris, A.R., A. Daeden, and G.T. Charras, *Formation of adherens junctions leads to the emergence of a tissue-level tension in epithelial monolayers.* J Cell Sci, 2014. **127**(Pt 11): p. 2507-17.
48. Saxena, K., et al., *Human Intestinal Enteroids: a New Model To Study Human Rotavirus Infection, Host Restriction, and Pathophysiology.* J Virol, 2016. **90**(1): p. 43-56.
49. Wroblewski, L.E., et al., *Helicobacter pylori targets cancer-associated apical-junctional constituents in gastroids and gastric epithelial cells.* Gut, 2015. **64**(5): p. 720-30.
50. Driehuis, E., et al., *Oral Mucosal Organoids as a Potential Platform for Personalized Cancer Therapy.* Cancer Discov, 2019. **9**(7): p. 852-871.

8. Publikation - Different *in vivo* and *in vitro* transformation of intestinal stem cells in mismatch repair deficiency

Keysselt, K.* , Kreutzmann, T.* , Rother, K.* , Kerner, C., Krohn, K., Przybilla, J., Buske, P., Löffler-Wirth, H., Löffler, M., Galle, J.* , Aust, G.* *Different in vivo and in vitro transformation of intestinal stem cells in mismatch repair deficiency*. *Oncogene*, 2017. **36**(19): p. 2750-2761.
(*geteilte Autorenschaft)

Oncogene (2016), 1–12
© 2016 Macmillan Publishers Limited, part of Springer Nature. All rights reserved 0950-9232/16
www.nature.com/onc

ORIGINAL ARTICLE

Different *in vivo* and *in vitro* transformation of intestinal stem cells in mismatch repair deficiency

K Keysselt^{1,5}, T Kreutzmann^{1,5}, K Rother^{1,2,5}, C Kerner¹, K Krohn³, J Przybilla², P Buske², H Löffler-Wirth², M Loeffler⁴, J Galle^{2,5} and G Aust^{1,5}

Mutations in mismatch repair (MMR) genes result in microsatellite instability (MSI) and early onset of colorectal cancer. To get mechanistic insights into the time scale, sequence and frequency of intestinal stem cell (ISC) transformation, we quantified MSI and growth characteristics of organoids of *Msh2*-deficient and control mice from birth until tumor formation and related them to tissue gene expression. Although in *Msh2*-deficient organoids MSI continuously increased from birth, growth characteristics remained stable at first. Months before tumor onset, normal *Msh2*-deficient tissue contained tumor precursor cells forming organoids with higher MSI, cystic growth and growth rates resembling temporarily those of tumor organoids. Consistently, *Msh2*-deficient tissue exhibited a tumor-like gene signature. Normal *Msh2*-deficient organoids showed increased inheritable transient cyst-like growth, which became independent of R-spondin. ISC transformation proceeded faster *in vitro* than *in vivo* independent of the underlying genotype but more under MMR deficiency. Transient cyst-like growth but not MSI was suppressed by aspirin. In summary, as highlighted by organoids, molecular alterations continuously proceeded long before tumor onset in MMR-deficient intestine, thus increasing its susceptibility for ISC transformation.

Oncogene advance online publication, 12 December 2016; doi:10.1038/onc.2016.429

INTRODUCTION

Lynch syndrome/hereditary nonpolyposis colorectal cancer is the most frequent cause of inherited colorectal cancers.^{1,2} It originates in heterozygous germline mutations in mismatch repair (MMR) genes. Among them, mutations of *MutS homolog 2 (MSH2)* and *MutL homolog 1 (MLH1)* are the most common lesions.^{1,2} Loss of MMR activity results in the fast accumulation of mutations throughout the genome, generating a mutator phenotype. This phenotype also includes length variations in microsatellite repeats, referred to as microsatellite instability (MSI), which occurs in over 90% of Lynch syndrome patients.^{1,3}

Most of the studies published on the consequences of MMR deficiency in the intestine focus on tumor development and progression as well as testing potential anti-cancer agents.^{1,2} Relatively little is known on the relationship between MMR deficiency and the regulation of the intestinal epithelium. In human colon tissue crypt foci showing biallelic loss of MMR genes have been frequently observed,^{4,5} which rarely progress to cancer. However, in human this multistep process cannot easily be followed up over time.

The intestinal epithelium is maintained by intestinal stem cells (ISCs). The identification of signaling pathways responsible for their self-renewal enabled ISC cultures from isolated crypts to form organoids.⁶ Kinetics and cell-type composition of these organoids reflect the *in vivo* situation,⁷ making them an advantageous model to study ISC transformation following MMR gene inactivation over time.

In the present study, we examined intestinal organoids and tissue of *VCMsh2^{LoxP/LoxP} (Msh2^{-/-})* and their respective heterozygous *Msh2^{+/-}* and control *Msh2^{+/+}* mice⁸ to study the time scale, sequence and frequency of ISC transformation and tissue alteration under MMR deficiency and in a normal genetic background. Ninety percent of the *Msh2^{-/-}* mice, in which inactivation of this MMR gene is limited to the intestinal mucosa, developed tumors in the small intestine with a multiplicity of 1.6 when they were older.⁸ The tumor frequency was decreased by the nonsteroidal anti-inflammatory drug acetylsalicylic acid, that is, aspirin, thus increasing mouse lifespan.⁹

We examined the time scale, sequence and extension of molecular and phenotypic changes in the epithelium preceding the onset of intestinal tumors. We hypothesized: (i) that MMR deficiency causes accumulation of genetic alterations in ISCs throughout life, leading to tissue alterations long before tumor onset and (ii) that these processes can be observed in organoid culture in the form of changes of MSI and growth characteristics of the organoids. To validate our hypotheses, changes in the MSI status as well as the growth rate and pattern were quantified in single organoids depending on mouse age and genotype. We analyzed the influence of long-term culture, R-spondin withdrawal and application of aspirin on these evaluated parameters. Gene expression profiles, raised from tissue biopsies of the macroscopic normal tissue and tumors, were related to the quantified ISCs alterations. The study design is shown in Figure 1a; the various organoids obtained were named according to Supplementary Information S1.

¹Department of Surgery, Research Laboratories, University of Leipzig, Leipzig, Germany; ²Interdisciplinary Center for Bioinformatics (IZBI), University of Leipzig, Leipzig, Germany; ³Interdisciplinary Center for Clinical Research Leipzig (IZKF), Core-Unit DNA Technologies, University of Leipzig, Leipzig, Germany and ⁴Institute for Medical Statistics, Informatics and Epidemiology, University of Leipzig, Leipzig, Germany. Correspondence: Professor G Aust, Department of Surgery, Research Laboratories, Faculty of Medicine, University of Leipzig, Liebigstr. 19, 04103 Leipzig, Germany.
E-mail: gabriela.aust@medizin.uni-leipzig.de

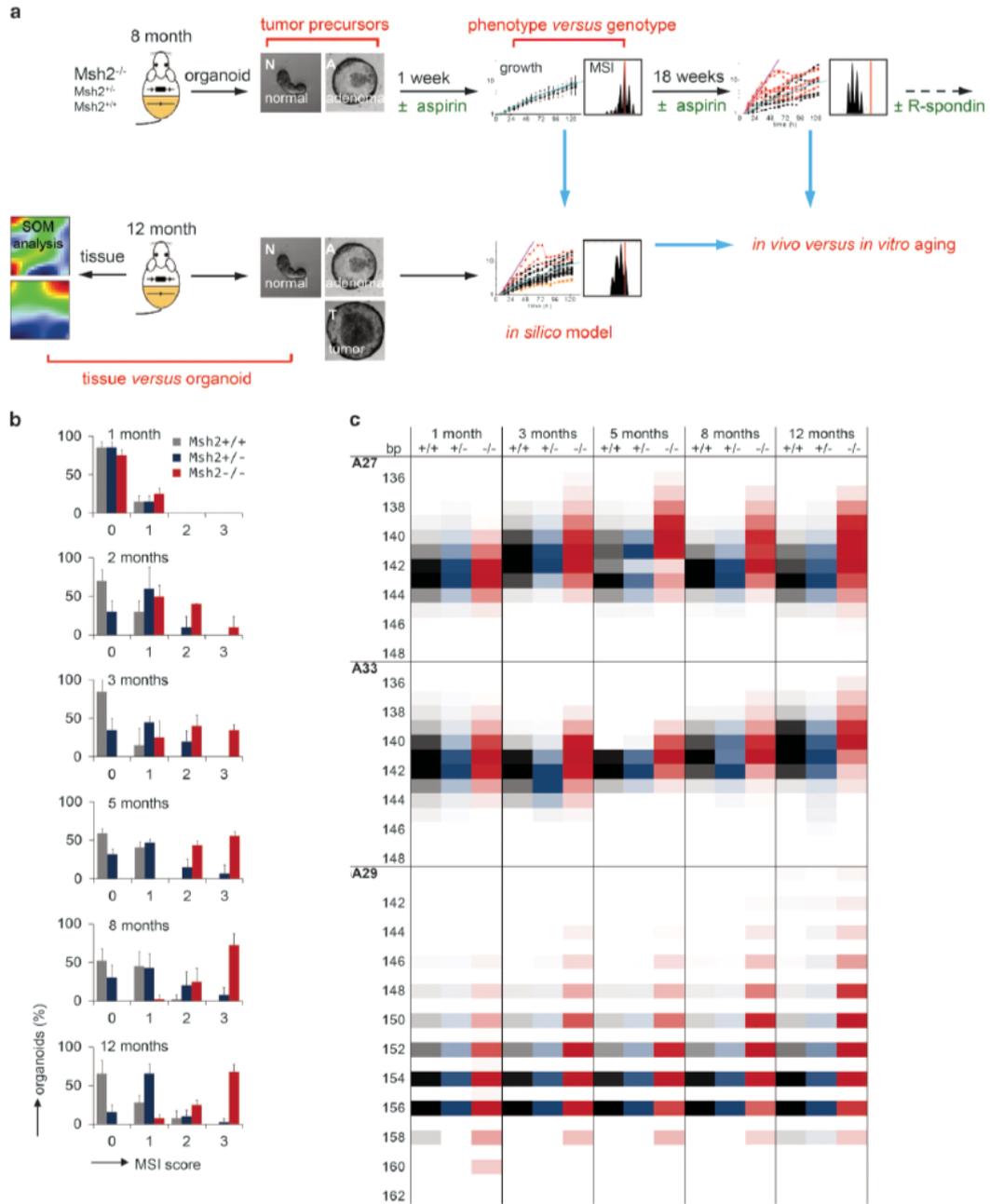
⁵These authors contributed equally to this work.

Received 20 April 2016; revised 27 September 2016; accepted 19 October 2016

RESULTS

MSI in *Msh2*^{-/-} organoids increased over the entire life time. First, we examined the development of MSI by means of the well-established nucleotide repeat markers A27, A33 and GA29¹⁰ (Supplementary Information S2) in organoids from macroscopic

normal intestinal tissue. At the age of 1 month, 80% of the organoids were microsatellite stable, that is, their MSI score was zero, independent of the underlying genotype. Afterwards, the MSI score increased continuously in *Msh2*^{-/-} and *Msh2*^{+/-}, but only marginally in *Msh2*^{+/+} organoids (Figure 1b). Already at the



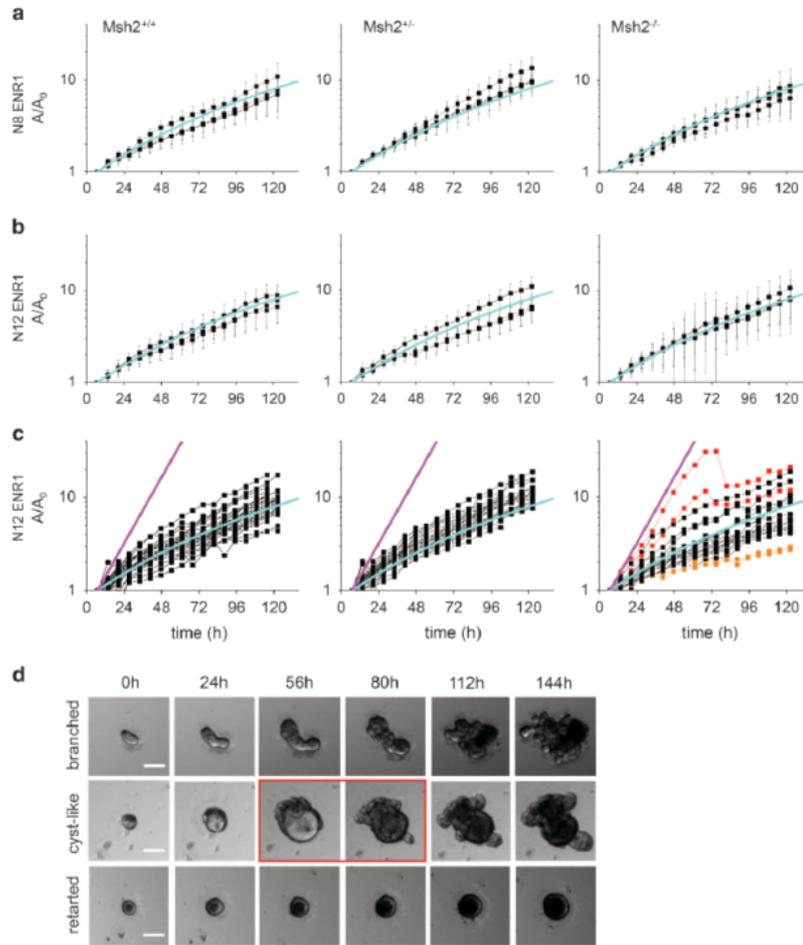


Figure 2. Organoid growth rate curves become heterogeneous in *Msh2*^{-/-} mice. **(a, b)** Growth curves of organoids derived from 8- **(a)** and 12-month-old mice cultured for 1 week with ENR (N8 ENR1, N12 ENR1). Each curve represents one mouse ($n=3$ mice/genotype, $n=15$ organoids/mouse, mean \pm s.d.). The area A of the stacked cross-section of each organoid was quantified relative to that of the first time point A_0 . The cyan line represents an exponential growth curve fitted to N12 ENR1 with an area doubling time of $\tau_A = (30+0.1t)/h$. **(c)** Growth curves of individual organoids of one 12-month-old mouse. All analyzed organoids of one mouse are shown (*Msh2*^{+/+} $n=28$, *Msh2*^{+/-} $n=32$, *Msh2*^{-/-} $n=20$). Ten percent of the *Msh2*^{-/-} organoids grew transient cyst-like (red curves) or retarded (orange curves). All other organoids grew branched as *Msh2*^{-/-} and *Msh2*^{+/+} organoids (black curves). The magenta line represents an exponential growth curve with a constant area doubling time of $\tau_A = 12$ h, characteristic for tumor organoids. **(d)** Snapshots of typical *Msh2*^{-/-} organoids; scale bar 100 μ m. The marked sequence from an initially cystic to a finally branched growth is modeled *in silico* (Figures 5c and d) to understand the causes underlying this transition.

Figure 1. MSI in *Msh2*-deficient mice increased after birth. **(a)** Schematic overview of the study design (MSI: analysis of microsatellite instability of single organoids; growth: quantitation of growth rate and pattern of single organoids by life imaging; SOM: self-organizing map analysis of microarray data). Normal organoids of an 8-month-old mouse were analyzed after 1 week and additionally after 18 weeks long-term culture; that is, these organoids were from a single mouse, and at the end the long-term cultured organoids had an age of 12 months. Normal, adenoma and tumor (only *Msh2*^{-/-}) organoids from mice aged 12 months were cultured; that is, these organoids were also from a single mouse. **(b)** Distribution of the MSI score in normal organoids. The score of three nucleotide repeat markers (A27, A33, GA29) was determined from each single organoid. Every marker was scored to show MSI (1) or not (0). The maximum MSI score was 3, the lowest 0 ($n=3$ mice/genotype 1–5 months; $n=4$ mice/genotype 8 and 12 months, 10 organoids/mouse; mean \pm s.d.). **(c)** Heatmap of the frequency of occurrence of PCR product sizes of the three nucleotide repeat markers determined in normal organoids of *Msh2*^{+/+}, *Msh2*^{+/-} and *Msh2*^{-/-} mice at increasing age. To obtain a heatmap for a certain organoid culture, the PCR product sizes and the corresponding peak heights of each marker of all organoids were determined. A present PCR product of a certain size was assessed as 1. The peak height of these present PCR products of a certain size was visualized in a heatmap. The allele size is indicated left ($n=3$ mice/genotype 1–5 months; $n=4$ mice/genotype 8 and 12 months, $n=10$ organoids/mouse).

age of 2 months, each *Msh2*^{-/-} organoid showed deletions in at least one out of the three examined nucleotide repeat markers. The MSI score reached a plateau value of 0.9 after 3 months in *Msh2*^{+/-} and 2.6 after 5 months in *Msh2*^{-/-} organoids. Because the MSI score was not informative at an older mouse age, we introduced the Δbp score and generated heatmaps to illustrate further alterations (Figure 1c). With higher mouse age the Δbp score increased in *Msh2*^{-/-} mice, that is, mutations accumulated further. This was seen especially for the marker GA29. These results characterize MSI in *Msh2*^{-/-} tissue as a fast developing and continuous process. Small-nucleotide repeat markers located in coding regions remained unchanged (Supplementary Information S2 and S3).

Growth rates and pattern of *Msh2*^{-/-} organoids became heterogeneous in aged mice

Next, we examined whether the established MSI resulted in growth changes of normal organoids depending on mouse age. Organoids of mice up to 8 months always showed a branched growth pattern and nearly identical growth rates (Figure 2a). The initial doubling time of their cross-sectional area τ_A was 30 ± 6 h. It increased during expansion by about 0.1 ± 0.05 h per hour,

indicating differentiation that increased the fraction of terminal differentiated and thus non-proliferative cells.

At an age of 12 months, growth pattern and rates of normal *Msh2*^{-/-} organoids became heterogeneous (Figures 2b–d). As shown for one representative mouse of each genotype in Figure 2c, about 10% of the organoids showed fast and another 10% retarded growth, whereas the majority had growth rates still similar to organoids of 12-month-old *Msh2*^{+/+} and *Msh2*^{+/-} mice. While these organoids grew in a branched fashion, fast growing *Msh2*^{-/-} organoids showed an initially spherical, afterwards transient cyst-like growth which almost always transferred into branched growth. Thus, regardless of the fast developing MSI, changes in growth properties were detected only at higher age.

Tumor precursor cells accumulated in normal epithelium of *Msh2*^{-/-} mice months before onset of tumors

Solid tumors were detected only in 12-month-old *Msh2*^{-/-} mice. Tumor organoids had the highest MSI score (2.8 ± 0.4) and showed predominantly cystic growth (Figure 3a) with a short and nearly constant area doubling time τ_A close to 12 h. A few cystic tumor organoids collapsed and continued to grow with a cyst-like and later even branched pattern (Figure 3b).

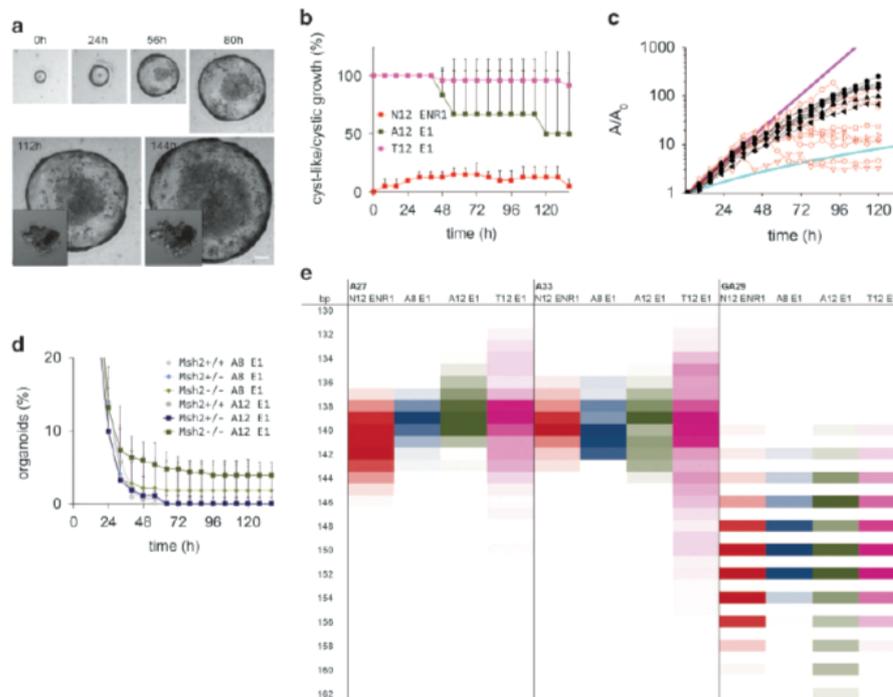


Figure 3. Tumor precursor cells accumulated in macroscopic normal tissue of *Msh2*^{-/-} mice. **(a)** Snapshots of a growing tumor organoid; scale bar 100 μ m. The insets show a normal organoid at the same time point. **(b)** Average percentages \pm s.d. of normal (N12 ENR1), adenoma (A12 E1) and tumor (T12 E1) organoids of identical *Msh2*^{-/-} mice that grew with a cystic/cyst-like pattern ($n=4$ mice/time point for N12, A12 and T12 were analyzed, with $n=10$ normal, $n=5$ adenoma, $n=10$ tumor organoids/mouse). **(c)** Growth curves of organoids derived from two tumors of one *Msh2*^{-/-} mouse. Organoids from tumor 1 (black curves) grew nearly identically. Organoids from tumor 2 initially grew similarly but stopped growth at individual time points (orange curves). The cyan and the magenta lines represent the growth curves of normal and tumor organoids, respectively, as shown in Figures 2a and b. **(d)** Percentage of adenoma organoids surviving culture in EGF only (E). Results are shown for organoids of 8- and 12-month-old mice cultured over 1 week (A8 E1, A12 E1; $n=4$ mice/genotype and age; $n=20$ organoids/mouse). **(e)** Heatmap of the PCR product sizes of three nucleotide repeat markers of normal (N), adenoma (A) and tumor (T) organoids of *Msh2*^{-/-} mice at the age of 8 (A8 E1) and 12 (N12 ENR1, A12 E1, T12 E1) months. Adenoma and tumor organoids grew with EGF (E) only ($n=4$ mice/age; that is, for N12, A12 and T12 the identical mice were analyzed; $n=10$ normal, $n=5$ adenoma, $n=10$ tumor organoids/mouse).

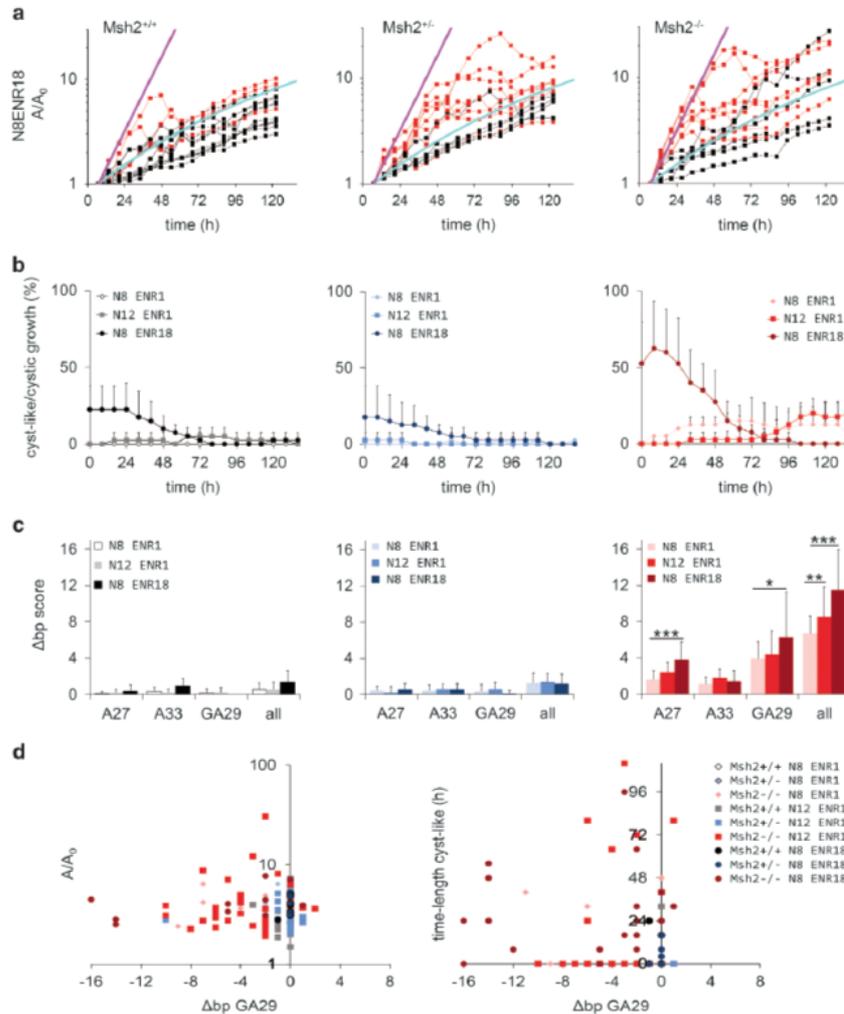


Figure 4. Enrichment of transient cyst-like growth during long-term organoid culture. (a) Growth curves of individual organoids of one typical 8-month-old mouse (N8 ENR18). After 18 weeks of culture, organoids frequently acquired transient cyst-like growth (red curves), especially those obtained from *Msh2*^{-/-} mice. Initially, these organoids grew similarly to tumor organoids (magenta line). The cyan line represents the growth curve of normal organoids of 12-month-old *Msh2*^{+/+} mice as shown in Figure 2a. Black curves: organoids with branched growth. (b) Average percentages \pm s.d. of normal organoids showing transient cyst-like growth. Results are shown for organoids of 8- and 12-month-old mice, which were cultured for 1 week (N8 ENR1, N12 ENR1) or 18 weeks (N8 ENR18) ($n=4$ mice/time point and genotype; $n=10$ organoids/mouse). (c) To generate the Δ bp score, changes of the PCR product size of a certain marker determined in one organoid compared with the standard allele size of *Msh2*^{+/+} gDNA of this marker was expressed in units of 1 (mononucleotide markers A27, A33) or 2 bp (dinucleotide marker GA29). Thus, for each marker a Δ bp score for a single organoid could be given. Here, the Δ bp score was determined in single organoids of 8-month-old (N8 ENR1) and 12-month-old mice (N12 ENR1) and in organoids from 8-month-old mice that have been cultivated for 18 weeks (N8 ENR18) ($n=4$ mice/genotype and age; i.e. for N8 ENR1 and N8 ENR18 the identical mice were analyzed; $n=10$ organoids/fraction; comparison at the inter-organoid level, mean \pm s.d., *T*-test, * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$). (d) The growth characteristics of individual organoids of the three different genotypes were correlated to Δ bp, here exemplarily shown for GA29. The Δ bp score did not correlate with the growth rate (left), determined as cross-sectional organoid area at time point 80 h, and to the period of cyst-like growth (right), which was assessed every 8 h over 1 week ($n=1$ typical mouse/genotype and age; that is, for N8 ENR1 and N8 ENR18 the identical mouse is shown; all analyzed organoids/fraction are shown).

In a few cases, we observed a growth stop of tumor organoids after about 2 days (Figure 3c). Thus, the growth characteristics not only varied markedly between organoids established from different tumors but also between organoids from the same tumor, indicating tumor heterogeneity and different adaption to culture.

Then, we determined when tumor precursor cells, capable of growing as adenoma organoids from macroscopic normal tissue with EGF only, appeared. Neither adenoma organoid grew from *Msh2*^{-/-} mice younger than 8 months nor from any *Msh2*^{+/+} and *Msh2*^{+/-} mouse. However, 1.8% of the crypt fragments of

8-month-old and 3.9% of those of 12-month-old *Msh2*^{-/-} mice resulted in organoids (Figure 3d). They grew with a cystic pattern after seeding and most of them retained it for many days (Figure 3b). After 48–72 h adenoma organoids of single mice continued to grow with a branched pattern leading to high variance between different mice. The growth rate of adenoma organoids was always higher compared with normal organoids of the same mouse. In adenoma organoids the PCR product sizes of the nucleotide repeat markers A27, A33 and GA29 became smaller compared with normal organoids. Overall, in *Msh2*^{-/-} mice nucleotides were lost continuously in the sequence from normal organoids to adenoma organoids of 8- and of 12-month-old mice and tumor organoids (Figure 3e). Two out of three (2/3) nucleotide repeat markers located in coding regions remained unchanged, even in tumor organoids. Only the marker A10 in *Grb14* showed in 9/40 tumor organoids a Δ bp score of 1 (Supplementary Information S2 and S3).

Alterations of ISCs enriched during long-term culture of organoids and proceeded faster *in vitro* than *in vivo*

To verify whether the transformation of the intestinal epithelium also arises *in vitro* during long-term culture, normal organoids of 8-month-old mice were cultured for a further 18 weeks. After this time, transient cyst-like but not retarded growth appeared with a higher frequency, and the growth rates varied more, compared with freshly isolated normal organoids of age-matched 12-month-

old *Msh2*^{-/-} mice (Figures 2c, 4a and b). Compared with *in vivo*, this indicates that transformation also arose *in vitro* and even at a shorter time scale.

Strikingly, transient cyst-like growth was also seen after long-term culture of normal *Msh2*^{+/-} and even *Msh2*^{+/+} organoids of 8-month-old mice (Figures 4a and b). The changes in the growth characteristics of long-term cultured *Msh2*^{+/-} organoids were even obvious in *Msh2*^{+/+} organoids. The period of cyst-like growth was longer in *Msh2*^{-/-} compared with *Msh2*^{+/-} and *Msh2*^{+/+} organoids.

In parallel, the mean Δ bp score of the markers A27, A33 and GA29 increased in long-term cultured compared with freshly isolated organoids of 8- and 12-month-old *Msh2*^{-/-} mice (Figure 4c), suggesting faster accumulation of MSI *in vitro* than *in vivo*. Surprisingly, the Δ bp score did not correlate with the growth characteristics when considering individual organoids (Figure 4d), suggesting that growth and MSI are regulated in part independently. The data are shown exemplarily for the marker GA29. Small-nucleotide repeat markers located in coding regions remained unchanged during long-term culture (Supplementary Information S3).

Cystic growth of intestinal organoids is a consequence of hyperactivated Wnt.^{6,11–13} Thus, transient cyst-like growth of normal organoids suggests that the cells acquired temporary independence from the external Wnt activator R-spondin. To verify this assumption, after 5, 20 and 30 weeks long-term culture the amount of R-spondin was reduced for 1 week. The percentage

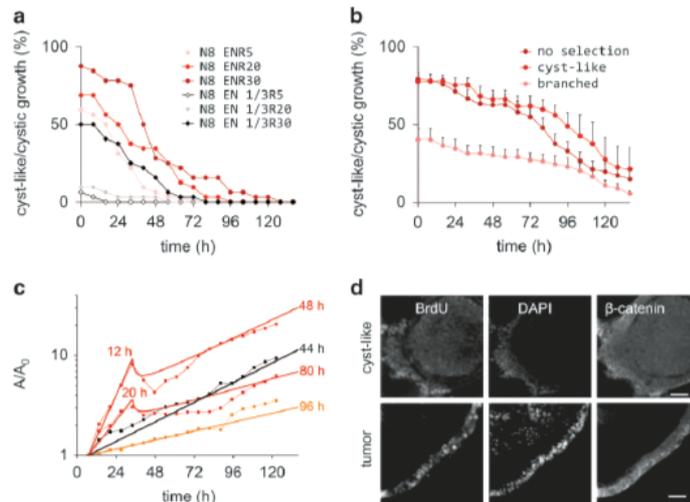


Figure 5. Transient cyst-like growth resembles growth characteristics of tumor organoids. **(a)** Transient cyst-like growth appeared under modified culture conditions. Organoids of one 8-month-old *Msh2*^{-/-} mouse were cultured for 5, 20 or 30 weeks in ENR and afterwards for 1 week either in ENR or EN with reduced R-spondin (1/3 R) ($n = 30$ organoids/fraction, mean). **(b)** Transient cyst-like growth enriched in selective cultures. Single organoids from 18-week long-term cultures of 8-month-old *Msh2*^{-/-} mice (N8 ENR18) showing either transient cyst-like or branched growth were selected once a week at day 3 and cultured separately. Average percentages \pm s.d. of organoids showing transient cyst-like growth were assessed before (no selection) and after four selection rounds ($n = 4$ mice, $n = 20$ organoids/mouse). **(c)** Comparison of individual normal organoid growth curves (N12 ENR1; thin lines with symbols) and their fits (thick lines) by the *in silico* organoid growth model (see Supplementary Online Material). Organoids showing branched (black curve) and retarded growth (orange curve) were characterized by a constant cell doubling time τ_{cell} (44 and 96 h, respectively) and a presumed pressure/elastic module ratio (P/E) of $0.003/\mu\text{m}$. Organoids with an initially cystic but finally branched growth (red curves), as shown in Figure 2d, initially had a short effective τ_{cell} of 12 and 20 h, respectively, and higher values of P/E of $0.04/\mu\text{m}$. At the transition to branched growth, effective τ_{cell} increased from 12 to 48 h and from 20 to 80 h. In parallel, P/E also decreased to $0.003/\mu\text{m}$, which is consistent with a more than 10-fold increase of E . For the model calculations, we assumed that the change of τ_{cell} was immediate, while that of P/E took 24 h. **(d)** Normal cyst-like and tumor organoids were treated with $10 \mu\text{M}$ BrdU for 16 and 1 h, respectively. Organoids were stained for BrdU using the BrdU *in situ* Detection Kit (BD Biosciences, Heidelberg, Germany) and for β -catenin (antibody sc-7199; Santa Cruz Biotech, Heidelberg, Germany) by double-fluorescence immunolabeling. Nuclei were counterstained with 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI). Images were taken with an LSM 700 laser scanning microscope (Carl Zeiss, Jena, Germany). Scale bar $20 \mu\text{m}$.

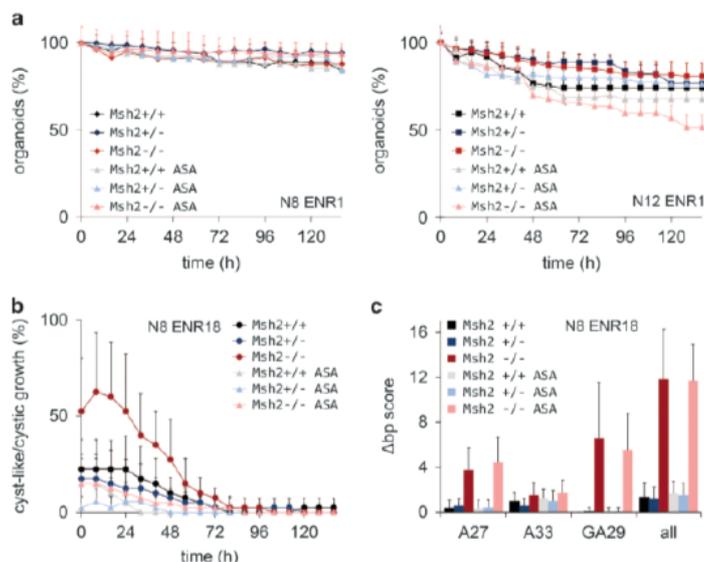


Figure 6. Aspirin decreased transient cyst-like growth in long-term cultured organoids. **(a)** The average percentage \pm s.d. of growing organoids from 8-month-old (left) and 12-month-old mice (right) cultured with aspirin for 1 week (N8 and N12 ENR1 ASA). $n=3$ mice/genotype, $n=20$ organoids/mouse). **(b)** After 18-week long-term culture with aspirin (N8 ENR18 ASA), the percentage of *Msh2*^{-/-} organoids with transient cyst-like growth decreased compared with controls. The effect was also seen in *Msh2*^{+/-} and *Msh2*^{+/+} organoids. The average percentage of organoids \pm s.d. showing transient cyst-like growth was assessed every 8 h for 1 week ($n=3$ mice/genotype, $n=10$ organoids/mouse). **(c)** Aspirin did not decrease the Δ bp score of the nucleotide repeat markers after 18-week long-term culture ($n=3$ mice/genotype, $n=10$ organoids/mouse, comparison at the inter-organoid level, mean \pm s.d.).

of *Msh2*^{-/-} organoids with initial cyst-like growth under reduced R-spondin was considerably higher when cultured for 30 compared with 20 or 5 weeks only, suggesting an increasing independence of R-spondin with proceeding long-term culture (Figure 5a).

An intriguing question was, whether the observed changes were inheritable. After four rounds of selection for organoids with cyst-like growth, we found a slight enrichment of this growth pattern in both, *Msh2*^{-/-} (Figure 5b) and *Msh2*^{+/-} organoids compared with unselected cultures. Selected organoids of either genotype with branched growth also tended to maintain this pattern.

Transient increased growth rates in normal cyst-like organoids

In order to understand the changes from an initially cystic into a finally branched growth (Figure 2d), we formulated and applied a theoretical growth model that is capable of describing such growth curves (Supplementary Information S4 and Figure 5c). Transition from initially cystic to branched growth was found to be associated with: (i) an increase of the effective cell doubling time by a factor of about 4, that is, a decrease of the proliferation activity within the organoid and (ii) a decrease in the ratio P/E by a factor larger than 10. Thus, our data are in accordance with an interpretation of the transition as a differentiation event because cell differentiation: (i) increases the effective cell doubling time by decreasing the fraction of proliferative cells and (ii) increases the elastic module E of the tissue due to reorganization of cell-cell contacts.¹⁴

During cystic growth many organoids showed area doubling times close to 12 h, that is, growth rates similar to those of tumor organoids. Thus, we examined whether an initially cystic growth of normal organoids may be attributed to a reversible tumor

precursor state. BrdU incorporation revealed that the proliferating cells within such organoids were clustered in a cap, whereas in tumor organoids they were distributed homogeneously. Moreover, the uniform cell size and distribution of nuclei distinguished normal organoids with cyst-like growth clearly from tumor organoids (Figure 5d).

Aspirin decreased the frequency and period of transient cyst-like growth but not the Δ bp score

Application of aspirin for 1 week tendentially decreased the percentage of outgrowing organoids in 12-, but not 8-month-old *Msh2*^{-/-} mice (Figure 6a). It had no effect on the number of *Msh2*^{+/-} and *Msh2*^{+/+} organoids.

In normal *Msh2*^{-/-} organoids of 8-month-old mice cultured for a further 18 weeks with aspirin, the percentage of organoids with a transient cyst-like pattern and the period of this growth pattern decreased compared with controls (Figure 6b). The effect was also seen in *Msh2*^{+/-} and *Msh2*^{+/+} organoids. Aspirin did not change the Δ bp score of the markers A27, A33 and GA29 in *Msh2*^{-/-} organoids, indicating that it could not correct nucleotide loss *in vitro* (Figure 6c).

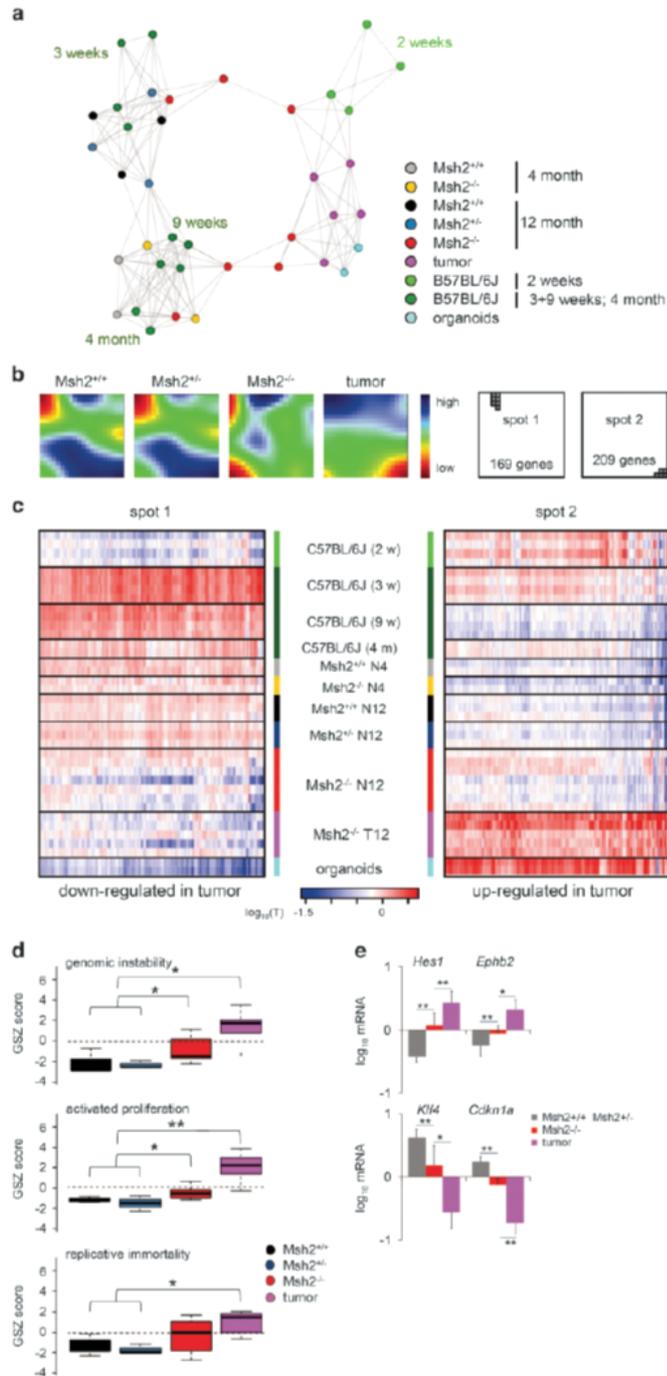
Aged *Msh2*^{-/-} normal tissue showed tumor-like gene expression profiles

To characterize alterations in *Msh2*^{-/-} mice in more detail, we quantified gene expression of tissue samples and performed a self-organizing map analysis. The correlation graph, calculated on the base of the self-organizing map, showed two main clusters (Figure 7a). One of these clusters was formed by all samples of normal intestinal tissue of *Msh2*^{+/-} and *Msh2*^{+/+} as well as of C57BL/6J mice older than 3 weeks. Tissue of 4-month-old

8

Msh2^{-/-} mice also belonged to this cluster. The second cluster comprised all tumors and organoids. Gene expression profiles of organoids obtained from adult tissue have been demonstrated to

share properties with profiles of the fetal intestine.¹⁵ Consistently, tissue of 2-week-old C57BL/6J mice was closely linked to the second cluster. The two clusters were connected via samples of



normal tissue of 12-month-old *Msh2*^{-/-} mice demonstrating that tissue of these mice shared expression properties of both, normal and tumor tissue. These similarities were evaluated in more detail by analyzing the average portraits for global gene expression (Figure 7b). Actually, the genes associated with selected spots of the self-organizing map showed induced and repressed expression in *Msh2*^{-/-} normal tissue similar to tumor tissue for 169 and 209 genes, respectively (Figures 7b and c).

Further detailed expression analysis showed that gene sets associated with hallmarks of cancer as genomic instability, activated proliferation and replicative immortality (Supplementary Information S5) were enriched from normal *Msh2*^{+/+} and *Msh2*^{+/-} to *Msh2*^{-/-} tissue and tumors (Figure 7d). For other hallmarks, no clear trend was observed. Strikingly, normal *Msh2*^{-/-} compared with *Msh2*^{+/+} and *Msh2*^{+/-} tissue showed enhanced expression of *Hes1* and *Ephb2*, oncogenes at early tissue transformation,^{16,17} indicating active Notch signaling and activated proliferation, respectively (Figure 7e). In parallel, well-known tumor suppressors such as *Klf4* and *Cdkn1A*¹⁸ were downregulated, confirming a former study.¹⁹ In summary, tissue transformation in *Msh2*^{-/-} mice also manifests at the level of global gene expression.

DISCUSSION

We demonstrated that MMR deficiency, caused by a conditional knock-out of *Msh2*, leads to progressive alterations of ISCs throughout the intestine. Hallmarks of these alterations, followed up in intestinal organoids, are: (i) a continuously increasing MSI established immediately after birth, which occurs months before changes in growth characteristics appeared, (ii) a frequent transient cyst-like growth, that is, higher growth rates, in normal *Msh2*^{-/-} organoids which accumulates with the age of the mice and (iii) occurrence of tumor precursors in macroscopic normal tissue months before tumor onset.

The Cancer Genome Atlas (TCGA) project classified human colorectal cancers into two major groups.²⁰ The first group (~16%) includes hypermutated cancers (such as those of the *Msh2*^{-/-} mouse) either with (i) high MSI, usually combined with *MLH1*-silencing by hypermethylation or (ii) somatic MMR gene and polymerase ϵ (*POLE*) mutations. The second group (~84%) includes non-hypermutated microsatellite stable (MSS) but chromosomal unstable (CIN) cancers, mostly caused by *APC* mutations. A more detailed classification based on gene expression analysis was recently provided by the Consensus Molecular Subtypes Consortium.²¹ Irrespective of the subtype and classification, sequential pathologic neoplastic changes have been observed in most tumors to be associated with the accumulation of sequential genetic and epigenetic molecular alterations in ISCs.²²⁻²⁴ Our results suggest a very early accumulation of genetic alterations already in ISCs of normal tissue of 2-month-old *Msh2*^{-/-} mice. Functional relevant mutations in MMR-deficient ISCs might result from unstable microsatellites in coding regions.²⁵ However, even in long-term cultured normal organoids of 8-month-old *Msh2*^{-/-} mice or normal organoids of 12-month-old *Msh2*^{-/-} mice,

we did not observe changes in three analyzed microsatellites known to become unstable in human MMR-deficient colorectal cancers.²⁰

In contrast, MMR deficiency caused alterations of three selected, large nucleotide repeat markers¹⁰ in all organoids already at the age of 2 months. Almost always a nucleotide loss appeared, confirming a formerly suggested mechanistic bias of repair efficiency between deletions and insertions under MMR deficiency.²⁶ Changes in the size of the markers accumulated further during aging. Moreover, nucleotide loss in microsatellite markers of *Msh2*^{-/-} mice increased from normal organoids to adenoma organoids and tumor organoids. In parallel to these changes, the mean percentage and period of *Msh2*^{-/-} organoids showing transient cyst-like growth increased. This suggests an increasing genetic susceptibility for tumor development under MMR deficiency. However, the score and growth characteristics did not correlate at the level of individual organoids. Thus, the changes in the genotype cause not mandatory changes in the organoid growth characteristics, that is, phenotype. The faster increase in MSI *in vitro* compared with *in vivo* cannot be explained by positive selection via faster growth and represents a unique feature of the mouse model.

In the presence of exogenous Wnt3a, which activates the canonical Wnt pathway, mouse intestinal organoids form rounded cysts.¹¹ Furthermore, organoids with permanent active Wnt, for example, due to *APC* loss, can be selected by withdrawal of Wnt3a and R-spondin from the culture.²⁷ In our study the enrichment of cyst-like growth in long-term cultured *Msh2*^{-/-} organoids came along with increasing independency from R-spondin. Thus, transient cyst-like growth appears to be characteristic for organoids containing altered ISCs that are less dependent on exogenous Wnt than their normal counterparts. Consistently, the susceptibility for cyst-like growth was an inherited feature.

Most likely, this growth pattern originates from alterations of Wnt signaling. Recently, Schuijers *et al.*²⁸ observed that the bistable switch between high and low expression of an ISC-related subset of Wnt target genes, which is observed at the border of the ISC niche, originates from a positive auto-feedback of the transcription factor *Ascl2*, and depends on the level of exogenous Wnt stimulation, for example, by R-spondin. We hypothesize that specific alterations of this regulatory circuit, which comes along with a competitive advantage of the altered ISCs, progressively increase the range of the bistable states, and eventually lead to independence of the high Wnt target gene expression state from exogenous Wnt stimulation (Figure 8). Obviously, these alterations are in part a consequence of the present genetic instability, causing transcriptional deregulation, but might in parallel refer to general age-related drifts of the epigenome.²⁹ They increase the susceptibility to tumor formation but do not seem to be sufficient to induce it.

Whole tissue gene expression profiles indicate that the observed alterations in ISCs occur in the entire intestine. Intestinal tissue of 12-month-old *Msh2*^{-/-} mice had a gene expression profile with tumor features. Upregulated *Hes1* indicates activated

Figure 7. Gene expression profiles of *Msh2*^{-/-} normal intestine indicate tissue transformation. (a) Correlation based clustering of gene expression profiles for intestinal tissue of the various *Msh2* and C57BL/6J mice and organoids including normal tissue and tumor expression profiles. (b) Average self-organizing map (SOM) portraits for global gene expression in aged normal *Msh2*^{+/+}, *Msh2*^{+/-} and *Msh2*^{-/-} intestine and tumors and the positions of the two spots selected for further analysis. (c) Heatmaps of the expression of genes associated with spot 1 and 2. Genes enclosed in the two spots showed decreased (spot 1) or increased (spot 2) expression from *Msh2*^{+/+} and *Msh2*^{+/-} to *Msh2*^{-/-} tissue and tumors. The average expression of the individual genes over all samples used in the SOM was used as reference. (d) Standard box plots of gene expression of curated gene sets associated with hallmarks of cancer given as gene set Z (GSZ) scores. Expression within normal *Msh2*^{+/+} and *Msh2*^{+/-} intestinal tissue was compared with *Msh2*^{-/-} tissue and tumors ($n = 6$ mice/genotype, mean \pm s.d., Mann Whitney *U*-test, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$). (e) Induction of oncogenes at early tissue transformation (left) and repression of tumor suppressors (right) quantified in tumor tissue compared with normal *Msh2*^{-/-} and to *Msh2*^{+/-} and *Msh2*^{+/+} tissues. The latter showed a nearly identical expression pattern and were thus merged to one group ($n = 6$ mice/genotype; mean \pm s.d., Mann Whitney *U*-test, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$).

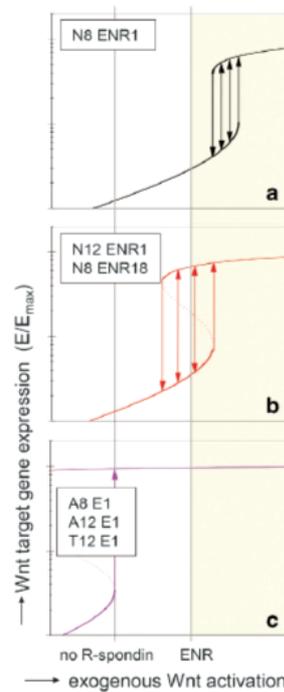


Figure 8. The regulatory circuit of ISCs becomes altered during ageing and long-term culture. ISCs are capable of translating an exogenous Wnt gradient into discrete fate decisions by utilizing an *Ascl2* auto-feedback loop.²⁸ These decisions are in general reversible. (a) Normal organoids of mice ≤ 8 months require ENR (EGF, noggin, R-spondin) for growth. Secretion of Wnt activators by the organoid cells themselves; for example, Wnt3a secretion by Paneth cells^{11,40} is not sufficient to enable a state of high Wnt target gene expression (E/E_{max}) as required for ISC self-renewal. The colored area indicates the level of exogenous Wnt activation realized in normal organoid culture with addition of ENR. (b) We suggest that during mouse ageing (N12 ENR1) and long-term culture of normal organoids (N8 ENR18), the *Ascl2* regulatory circuit becomes altered by accumulating mutations, particularly in *Msh2*^{-/-} tissue or organoids. Alterations that enable an increased independence from exogenous Wnt activation by ENR stabilize the ISC state and thus provide the ISCs with a competitive advantage. Accordingly, clones of these ISCs will expand during long-term organoid culture and cyst-like growth will become more and more frequent. (c) Only in *Msh2*^{-/-} mice a few ISCs reached complete independence from exogenous Wnt activation (no R-spondin) after 8 months, being then rarely capable of forming adenoma or tumor organoids (A8 E1, A12 E1, T12 E1). The high Wnt target gene expression state becomes locked, even in a culture without the addition of R-spondin. For simplification, the accessible range of exogenous activation by Wnt producing cells in the organoids is assumed to be equal for all organoids.

Notch. Consistently, active Notch promotes initiation but not persistence of cyst-like organoid growth pattern.¹³ Recently, Notch activity was found to counteract high Wnt in ISCs, thereby suppressing their specification into secretory lineages.³⁰ Thus, high Notch appears to facilitate activation of Wnt signaling, which is required for permanent cystic growth, as seen in 'spheroids' derived from mouse or human tumors.^{6,13,31} Abnormal cellular proliferation in transformed tissue is consistent with our findings of elevated expression of *Ephb2*³² and downregulated *Klf4* and *Cdkn1A*.^{18,33}

Tumor precursor cells, raised from macroscopic normal *Msh2*^{-/-} intestinal epithelium, appeared 4 months earlier than the first tumor. They grew independently of R-spondin towards organoids with a cystic pattern and high growth rates, similar to tumor organoids, suggesting that many of them reached a state of permanent Wnt activation. However, further mutations are obviously required for tumor initiation. Our data on long-term and multistep tissue transformation under MMR deficiency concur with recent findings in Lynch syndrome patients.^{4,5} In these patients lesions with MMR gene inactivation are frequently observed but do rarely progress to tumors. Thus, an astonishing robustness of intestinal function against massive mutation can be stated, which might be based on frequent elimination of mutated ISCs by clonal competition³⁴ and/or selection within the context of DNA damage.³⁵

Although cyst-like growth occurred more frequently in *Msh2*^{-/-}, it was also detected in *Msh2*^{+/-} and *Msh2*^{+/+} organoids following long-term culture. Selection for either cyst-like or branched growing organoids from one culture enriched the specific pattern. This means that accumulation of genomic imbalances also sporadically occurred at normal MMR and reached, most probably due to positive selection, at detectable level during long-term expansion. Thus, our study also addresses safety aspects in gut tissue engineering and regenerative medicine. Application of human intestinal organoids as an advanced therapy medicinal product has the potential to overcome the difficulties as well as ethical and legal concerns associated with the use of human fetal stem cells.^{7,15} To correct unwanted positive selection of altered cells or to suppress genomic imbalances during *in vitro* organoid expansion, adapted specific culture conditions may be one option. Aspirin was found to be effective in preventing colonic adenomas and colorectal cancer in Lynch syndrome patients.³⁶ In the *VC**Msh2*^{LoxP/LoxP} model, aspirin increased lifespan and delayed tumor onset in these mice.⁹ In our study aspirin decreased (i) the outgrowth of *Msh2*^{-/-} organoids in aged mice and (ii) the frequency and period of transient cyst-like growth but not the Δ bp score in organoids irrespective of the mouse genotype. As suggested by modeling, transition from an initially cystic to a finally branched growth can be explained by a reduced effective proliferation rate and an increased elastic module of the epithelium. Both effects are known to occur during epithelial differentiation.^{11,14} Thus, aspirin might promote intestinal differentiation, and thus impedes expansion of altered cells. Mesalazine and thymoquinone, which attenuate *Msh2*^{-/-} tumor development and reduce MSI in *Msh2*^{-/-} mice,³⁷ may be examined to correct unwanted genetic imbalances during organoid expansion.

In summary, intestinal organoids of mice with MMR deficiency and their respective heterozygous carrier and control mice enabled mechanistic insights into the accumulation of genetic imbalances during aging, long-term culture and growth factor withdrawal of ISCs. Early interventions that suppress essential steps in pre-neoplastic transformation in the intestine are depicted.

MATERIALS AND METHODS

Ethics statement

This research complied with the ethics guidelines of the University of Leipzig. For the generation and breeding of transgenic mice we obtained ethics approval from the Landesdirektion Leipzig (TWV 12/15).

Mice

The mouse strains B6.SJL-Tg(Vil-cre)997Gum/J and B6.Cg-Msh2tm2.1Rak/J mice⁸ were obtained from The Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME, USA). By crossing both the conditional *Msh2* allele was placed under the control of the Villin-Cre transgene. Mice were genotyped as described.⁸ *VC*^{+/+}*Msh2*^{LoxP/LoxP} (in short *Msh2*^{-/-}), *VC*^{+/+}*Msh2*^{LoxP/+} (*Msh2*^{+/-}), *VC*^{-/-}*Msh2*^{LoxP/LoxP} (*Msh2*^{+/+}) and wild-type C57BL/6J mice were bred

under specific pathogen-free conditions. In our breeding facility, *Msh2*^{-/-} mice developed spontaneous intestinal tumors after 11 months.

To detect specified effects five mouse triplets of each age were compared, showing only small variability in their MSI status.

Organoid culture

Six centimeters of the jejunum were used to isolate crypts from macroscopically normal tissue by treatment with cold 2 mM EDTA chelation buffer.¹² This fraction was termed N (normal). The remaining tissue pellet potentially containing adenoma cells attached to the mesenchyme was further digested with 75 U/ml collagenase type IX (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Germany) and 125 µg/ml dispase type II (Life Technologies, Darmstadt, Germany).¹² This fraction was termed A (adenoma). In 12-month-old *Msh2*^{-/-} mice, the number and location of the tumors were recorded for the entire small intestine. The two largest tumors were dissected, minced and treated with digestion buffer.¹² The resulting fraction was termed T (tumor). To generate organoids, about 50 isolated normal crypts (N) or adenoma crypt fragments (A) as well as isolated tumor cells (T) were seeded in 10 µl matrigel (BD Biosciences, Heidelberg, Germany) in 96-well plates.⁵ About 50 ng/ml EGF (Life Technologies), 20% Nog-Fc-conditioned medium and 10% Rspo1-Fc-conditioned medium (ENR) were added to the organoid culture medium.⁶ The Rspo1-Fc-expressing and the Nog-Fc-expressing cell lines were kind gifts from Calvin Kuo (Stanford, CA, USA) and Gijb R van den Brink (Amsterdam, Netherlands),³⁸ respectively. The adenoma and tumor organoids were cultivated with EGF only (E). Normal organoids of 8-month-old mice were cultured with or without 1 mM aspirin (Sigma) for a further 18 weeks. At the end, the MSI status and growth characteristics of single organoids derived from normal tissue (N, A) or tumors (T) were available (Supplementary Information S1). All organoids of one specific fraction of one mouse were cultured together. For proliferation analysis, organoids were treated with 10 µM BrdU (Sigma). BrdU incorporation was detected with the BrdU *in situ* Detection Kit (BD Biosciences).

MSI analysis

Single organoids were picked under microscopic control and transferred into 50 µl Quick Extract extraction solution (Epicentre, Madison, WI, USA), which was heated at 65 °C for 6 min and at 98 °C for 2 min. The assessment of the MSI phenotype was accomplished with the three nucleotide repeat markers A27, A33 and GA29.¹⁰ About 2.3 µl of the DNA extraction solution, 1 unit DreamTaq Green DNA polymerase (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA), and 1 µM of the primers (BioTeZ, Berlin, Germany) were used for MSI analysis of a single organoid in a 12.5 µl multiplex qPCR reaction with 59 °C annealing temperature over 28 cycles. The forward primers (Supplementary Information S2) were either ATTO550-, hexachlorofluorescein- or fluorescein-labeled. Supplementary Information S2 also contains information on three mononucleotide repeats located in coding regions (A9 in *CheK1*, A10 in *Grb14*, A9 in *Tcf7l2*). One microliter PCR product was run together with 0.25 µl GeneScan 500 ROX dye Size Standard (Life Technologies) on an ABI 3130XL fluorescence sequencer (Life Technologies). The lengths of the PCR products of each nucleotide repeat marker were determined using GeneMapper Software (Life Technologies). The standard allele size of the markers, determined in gDNA from tail tips of *Msh2*^{+/+} mice (*n* = 10), was 143 (A27), 141 (A33) and 156 bp (GA29). MSI scores (Figure 1b), heatmaps (Figure 1c) and Δbp scores (Figure 4c) were generated to illustrate the extent of alterations in the nucleotide repeat markers.

Video analysis and analysis of growth curves

Growth of organoids was recorded by 3D Life Scanning microscopy consisting of a CKX41 microscope (Olympus, Hamburg, Germany) and an incubation system (ibidi, Martinsried, Germany). Organoids were split 1 day before z-stack series were taken for 6 days every 8 h. All-focus images were generated using the Extended Focus Imaging projection tool of the CellSens software (Olympus) to combine the different z-stacks into one 2D picture. The area *A* of the cross-section of growing organoids within the all-focus image was measured for all time points using an ImageJ-based in-house plugin and quantified relative to that of the first time point *A*₀. Video-observed organoids were picked and analyzed for MSI. The number of growing organoids was counted and the growth pattern of each organoid was assessed every 8 h either as branched, that is, multiple crypt-like structures projecting outward, cyst-like, that is, hollow spheres with few projections, or cystic, that is, hollow spheres by two blinded independent investigators (KK1, TK). Growth curves of the relative

organoid area *A*/*A*₀ were analyzed using Origin7.0 (Origin Lab Corporation, Northampton, MA, USA). Average growth curves were fitted to an exponential growth model, $\ln(A/A_0) = [(t - t_0)/\tau_A] \cdot \ln(2)$ with a linear increasing area doubling time τ_A , where *t* is the organoid growth time and *t*₀ the time at the first time point measured.

Modeling organoid growth

Mathematical modeling of organoid growth was performed to calculate effective cell doubling times and to interpret the observed changes of the area growth rates at transition from an initially cystic to branched organoid growth (Figure 2d). The model enables the quantification of effective cell doubling times within the organoid and the ratio between the pressure *P* inflating the organoids and their surface elastic module *E*, that is, *P*/*E*. It makes no assumption about the local distribution of proliferating cells within an organoid. The model assumptions are summarized in Supplementary Information S4.

Microarray analysis

mRNA from normal intestine samples of 4-month-old *Msh2*^{-/-} (*n* = 2), *Msh2*^{+/+} (*n* = 2), 12-month-old *Msh2*^{-/-} (*n* = 7), *Msh2*^{+/+} (*n* = 3), *Msh2*^{+/+} (*n* = 3) and 2-week-old (*n* = 4), 3-week-old (*n* = 4), 9-week-old (*n* = 4) and 4-month-old (*n* = 2) wild-type C57BL/6J mice, *Msh2*^{-/-} tumors (*n* = 5) as well as from intestinal organoids of a 4-month-old C57BL/6J mouse (*n* = 2) was extracted using Trizol (Thermo) and analyzed partially in replicates with the Bead Chip Array MouseRef-8 v2 (Illumina, San Diego, CA, USA) according to the manufacturer's recommendations. Data were selected by a *P*-value < 5 % from the background corrected raw data. The base-10 logarithmic expression data were analyzed by the *oposSOM* R package.³⁹ We generated and analyzed meta-gene sets from gene ontology and literature gene sets selected according to functions and processes related to cancer hallmarks. Supplementary Information S5 summarizes the hallmark sets in terms of number of genes and the individual gene sets included. Expression within normal *Msh2*^{+/+} and *Msh2*^{+/+} intestinal tissue was compared with *Msh2*^{-/-} tissue and tumors.

Statistics

The inter-mouse variability for the percentages in MSI scores and growth characteristics of the organoids are shown (mean ± s.d., number of mice 3–5; randomly selected organoids of all analyzed organoids, the specific number of mice and organoids was indicated in the figure legends). To calculate inter-mouse variability, first the organoids of a given mouse were averaged. For the Δbp score (Figures 4c and 6c) the genotype and fraction, thus inter-organoid variability, was the level of comparison (*T*-test; SPSS version 20.0; IBM, Ehningen, Germany). To demonstrate variability among all analyzed organoids of one specific fraction, in Figures 2c and 4d the data of all analyzed organoids are shown. For statistical analyses of tissues see Microarray analysis (*P*-values less than 5% were considered as significant and indicated with **P* < 0.05, ***P* < 0.01 or ****P* < 0.001).

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

ACKNOWLEDGEMENTS

The study was supported by the BMBF grants HNPCC-Sys (grant number: 031 6065A) and INDRA (grant number: 031A312).

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Study concept and design: GA. Acquisition of data: KK1, TK, KR and CK. Analysis and interpretation of data: KR, JP, JG and GA. Technical support: KK2, PB, HLW and ML. Drafting of the manuscript: JG and GA.

REFERENCES

- 1 Giardiello FM, Allen JI, Axilbund JE, Boland CR, Burke CA, Burt RW *et al*. Guidelines on genetic evaluation and management of Lynch syndrome: a consensus statement by the US Multi-Society Task Force on colorectal cancer. *Gastroenterology* 2014; **147**: 502–526.

- 2 Lynch HT, Snyder CL, Shaw TG, Heinen CD, Hitchins MP. Milestones of Lynch syndrome: 1895-2015. *Nat Rev Cancer* 2015; **15**: 181–194.
- 3 Bhalla A, Zulfiqar M, Weindel M, Shidham VB. Molecular diagnostics in colorectal carcinoma. *Clin Lab Med* 2013; **33**: 835–859.
- 4 Kloor M, Huth C, Voigt AY, Benner A, Schirmacher P, von Knebel DM *et al*. Prevalence of mismatch repair-deficient crypt foci in Lynch syndrome: a pathological study. *Lancet Oncol* 2012; **13**: 598–606.
- 5 Staffa L, Echterdiek F, Nelius N, Benner A, Werft W, Lahrmann B *et al*. Mismatch repair-deficient crypt foci in Lynch syndrome—molecular alterations and association with clinical parameters. *PLoS One* 2015; **10**: e0121980.
- 6 Sato T, Vries RG, Snippert HJ, van de WM, Barker N, Stange DE *et al*. Single Lgr5 stem cells build crypt-villus structures in vitro without a mesenchymal niche. *Nature* 2009; **459**: 262–265.
- 7 Sato T, Clevers H. Growing self-organizing mini-guts from a single intestinal stem cell: mechanism and applications. *Science* 2013; **340**: 1190–1194.
- 8 Kucherlapati MH, Lee K, Nguyen AA, Clark AB, Hou Jr H, Rosulek A *et al*. An Msh2 conditional knockout mouse for studying intestinal cancer and testing anticancer agents. *Gastroenterology* 2010; **138**: 993–1002.
- 9 McIlhatton MA, Tyler J, Kerepesi LA, Bocker-Edmonston T, Kucherlapati MH, Edelmann W *et al*. Aspirin and low-dose nitric oxide-donating aspirin increase life span in a Lynch syndrome mouse model. *Cancer Prev Res* 2011; **4**: 684–693.
- 10 Kabbarah O, Mallon MA, Pfeifer JD, Edelmann W, Kucherlapati R, Goodfellow PJ. A panel of repeat markers for detection of microsatellite instability in murine tumors. *Mol Carcinog* 2003; **38**: 155–159.
- 11 Sato T, van Es JH, Snippert HJ, Stange DE, Vries RG, van den Born M *et al*. Paneth cells constitute the niche for Lgr5 stem cells in intestinal crypts. *Nature* 2011; **469**: 415–418.
- 12 Sato T, Stange DE, Ferrante M, Vries RG, van Es JH, van den Brink S *et al*. Long-term expansion of epithelial organoids from human colon, adenoma, adenocarcinoma, and Barrett's epithelium. *Gastroenterology* 2011; **141**: 1762–1772.
- 13 Germann M, Xu H, Malaterre J, Sampurno S, Huyghe M, Cheasley D *et al*. Tripartite interactions between Wnt signaling, Notch and Myb for stem/progenitor cell functions during intestinal tumorigenesis. *Stem Cell Res* 2014; **13**: 355–366.
- 14 Harris AR, Daeden A, Charras GT. Formation of adherens junctions leads to the emergence of a tissue-level tension in epithelial monolayers. *J Cell Sci* 2014; **127**: 2507–2517.
- 15 Finkbeiner SR, Hill DR, Altheim CH, Dedhia PH, Taylor MJ, Tsai YH *et al*. Transcriptome-wide analysis reveals hallmarks of human intestine development and maturation in vitro and in vivo. *Stem Cell Rep* 2015. doi: 10.1016/j.stemcr.2015.04.010.
- 16 Fre S, Pallavi SK, Huyghe M, Lae M, Janssen KP, Robine S *et al*. Notch and Wnt signals cooperatively control cell proliferation and tumorigenesis in the intestine. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009; **106**: 6309–6314.
- 17 Genander M, Halford MM, Xu NJ, Eriksson M, Yu Z, Qiu Z *et al*. Dissociation of EphB2 signaling pathways mediating progenitor cell proliferation and tumor suppression. *Cell* 2009; **139**: 679–692.
- 18 Rowland BD, Peeper DS, Peeper DS. KLF4, p21 and context-dependent opposing forces in cancer. *Nat Rev Cancer* 2006; **6**: 11–23.
- 19 Martinez P, Siegl-Cachedenier I, Flores JM, Blasco MA. MSH2 deficiency abolishes the anticancer and pro-aging activity of short telomeres. *Aging Cell* 2009; **8**: 2–17.
- 20 Munzy DM, Bainbridge MN, Chang K, Dinh HH, Drummond JA, Fowler G *et al*. Comprehensive molecular characterization of human colon and rectal cancer. *Nature* 2012; **487**: 330–337.
- 21 Guinney J, Dienstmann R, Wang X, de Reyniès A, Schlicker A, Sonesson C *et al*. The consensus molecular subtypes of colorectal cancer. *Nat Med* 2015; **21**: 1350–1356.
- 22 Vogelstein B, Fearon ER, Hamilton SR, Kern SE, Preisinger AC, Leppert M *et al*. Genetic alterations during colorectal-tumor development. *N Engl J Med* 1988; **319**: 525–532.
- 23 Fearon ER, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 1990; **61**: 759–767.
- 24 Barker N, Ridgway RA, van Es JH, van de WM, Begthel H, van den BM *et al*. Crypt stem cells as the cells-of-origin of intestinal cancer. *Nature* 2009; **457**: 608–611.
- 25 Woerner SM, Tosti E, Yuan YP, Kloor M, Bork P, Edelmann W *et al*. Detection of coding microsatellite frameshift mutations in DNA mismatch repair-deficient mouse intestinal tumors. *Mol Carcinog* 2015; **54**: 1376–1386.
- 26 Lu Y, Soong TD, Elemento O. A novel approach for characterizing microsatellite instability in cancer cells. *PLoS One* 2013; **8**: e63056.
- 27 Schwank G, Koo BK, Sasselli V, Dekkers JF, Heo I, Demircan T *et al*. Functional repair of CFTR by CRISPR/Cas9 in intestinal stem cell organoids of cystic fibrosis patients. *Cell Stem Cell* 2013; **13**: 653–658.
- 28 Schuijers J, Junker JP, Mokry M, Hatzis P, Koo BK, Sasselli V *et al*. Ascl2 acts as an R-spondin/Wnt-responsive switch to control stemness in intestinal crypts. *Cell Stem Cell* 2015; **16**: 158–170.
- 29 Przybylla J, Rohlf T, Loeffler M, Galle J. Understanding epigenetic changes in aging stem cells—a computational model approach. *Aging Cell* 2014; **13**: 320–328.
- 30 Tian H, Biehs B, Chiu C, Siebel CW, Wu Y, Costa M *et al*. Opposing activities of Notch and Wnt signaling regulate intestinal stem cells and gut homeostasis. *Cell Rep* 2015; **11**: 33–42.
- 31 Drost J, van Jaarsveld RH, Ponsioen B, Zimberlin C, van BR, Buijs A *et al*. Sequential cancer mutations in cultured human intestinal stem cells. *Nature* 2015; **521**: 43–47.
- 32 Holmberg J, Genander M, Halford MM, Anneren C, Sondell M, Chumley MJ *et al*. EphB receptors coordinate migration and proliferation in the intestinal stem cell niche. *Cell* 2006; **125**: 1151–1163.
- 33 Ghaleb AM, McConnell BB, Kaestner KH, Yang VW. Altered intestinal epithelial homeostasis in mice with intestine-specific deletion of the Kruppel-like factor 4 gene. *Dev Biol* 2011; **349**: 310–320.
- 34 Vermeulen L, Snippert HJ. Stem cell dynamics in homeostasis and cancer of the intestine. *Nat Rev Cancer* 2014; **14**: 468–480.
- 35 Tao S, Tang D, Morita Y, Sperka T, Omrani O, Lechel A *et al*. Wnt activity and basal niche position sensitize intestinal stem and progenitor cells to DNA damage. *EMBO J* 2015; **34**: 624–640.
- 36 Burn J, Gerdes AM, Macrae F, Mecklin JP, Moeslein G, Olschwang S *et al*. Long-term effect of aspirin on cancer risk in carriers of hereditary colorectal cancer: an analysis from the CAPP2 randomised controlled trial. *Lancet* 2011; **378**: 2081–2087.
- 37 Kortum B, Campregheer C, Lang M, Khare V, Pinter M, Evstatiev R *et al*. Mesalazine and thymoquinone attenuate intestinal tumour development in Msh2loxP/loxP Villin-Cre mice. *Gut* 2015; **64**: 1905–1912.
- 38 Heijmans J, van Lidde de Jeude JF, Koo BK, Rosekrans SL, Wielenga MC, van de Wetering M *et al*. ER stress causes rapid loss of intestinal epithelial stemness through activation of the unfolded protein response. *Cell Rep* 2013; **3**: 1128–1139.
- 39 Cromer A, Carles A, Millon R, Ganguli G, Chalmeil F, Lemaire F *et al*. Identification of genes associated with tumorigenesis and metastatic potential of hypopharyngeal cancer by microarray analysis. *Oncogene* 2004; **23**: 2484–2498.
- 40 Gregorieff A, Pinto D, Begthel H, Destree O, Kielman M, Clevers H. Expression pattern of Wnt signaling components in the adult intestine. *Gastroenterology* 2005; **129**: 626–638.

Supplementary Information accompanies this paper on the Oncogene website (<http://www.nature.com/onc>)

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Vergleich der relevanten MMR-Gene in HNPCC-Patienten ^[7, 8, 10]	2
Tabelle 2: aktuelle Knockout-Mausmodelle für Msh2 und Mlh1; Vergleich der Lokalisation von Tumoren und Ausbildung von MSI ^[17]	4
Tabelle 3: Übersicht der untersuchten Organoide sowie Art und Dauer deren Kultivierung mit dazugehöriger Anzahl und Alter der Ursprungsmäuse; *Tumoren nur aus 12 Monate alten Msh2 ^{-/-} Mäusen, ENR = EGF, Noggin, R-Spondin ^[1]	8
<i>Tabelle 4: Übersicht der analysierten Mikrosatelliten A27, A33 und GA29 im Hinblick auf Lokalisation, dazugehörige Primerpaare, PCR-Produktlänge und Farbmarkierung^[12]</i>	<i>9</i>

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: exemplarische Darstellung der Auswertung eines PCR-Produktes des Markers GA29 (Schwanzbiopsie Msh2 ^{+/+} -Maus), der Hauptpeak liegt bei 156 bp und ist umgeben von scutter bands; rot = Längenstandard, blau = PCR-Produkte unterschiedlicher Länge (die Höhe entspricht dabei der Anzahl der Amplifikate)	10
Abbildung 2: exemplarische Darstellung eines Basenpaarverlustes von 2 bp im Vergleich zum Kontrollwert von 156 bp (oben) auf 154 bp (unten); rote Linie = initiale Länge	11
Abbildung 3: mikroskopische Differenzierung des Wachstumsverhaltens der Organoide in verzweigt, zystisch-ähnlich und retardiert (von oben nach unten) in Abhängigkeit von der Zeit ^[1]	13
Abbildung 4: mikroskopische Differenzierung der unterschiedlichen Querschnittsflächen der Organoide bei verzweigtem und zystischem Wachstumsmuster ^[1]	14
Abbildung 5: Darstellung des prozentualen Anteils (+ SEM) des MSI Scores in Organoiden der Fraktionen N1 ENR1, N2 ENR1, N3 ENR1, N5 ENR1, N8 ENR1 und N12 ENR1 in Abhängigkeit vom Genotyp (n=5 Mäuse/Genotyp 1-5 Monate, n=4 Mäuse/Genotyp 8 und 12 Monate, n=10 Organoide/Maus) ^[1]	16
Abbildung 6: heatmap zur Darstellung der Längenänderung der PCR-Produkte der Marker A27, A33 und GA29 in Organoiden der Fraktionen N1 ENR1, N2 ENR1, N3 ENR1, N5 ENR1, N8 ENR1 und N12 ENR1 in Abhängigkeit vom Genotyp (Msh2 ^{+/+} = schwarz, Msh2 ^{+/-} = blau, Msh2 ^{-/-} = rot; n=3 Mäuse/Genotyp 1-5 Monate, n=4 Mäuse/Genotyp 8 und 12 Monate, n=10 Organoide/Maus) ^[1]	17
Abbildung 7: prozentualer Anteil (+ SEM) zystisch-ähnlicher wachsender Organoide der Fraktion N8 ENR1 aller Genotypen (n=4 Mäuse/Genotyp, n=13 Organoide/Maus)	18
Abbildung 8: prozentualer Anteil (+ SEM) zystisch-ähnlicher und zystisch wachsender Organoide der Fraktion N12 ENR1 aller Genotypen (n=4 Mäuse/Genotyp, n=12 Organoide/Maus)	19
Abbildung 9: Dauer des zystisch-ähnlichen oder zystischen Wachstums und Summe der Δ bp Scores der drei Marker für einzelne Organoide, exemplarisch für Msh2 ^{-/-} -Organoide der Fraktionen N8 ENR1 (n=14 Organoide) und N12 ENR1 (n=8 Organoide)	19
Abbildung 10: Wachstumskurven von Organoiden der Fraktion N8 ENR1 (n=3 Mäuse/Genotyp, n=15 Organoide/Maus) aller Genotypen, jede Kurve repräsentiert die Organoide einer Maus; blau = angepasste exponentielle Wachstumskurve N12 ENR1 mit einer Verdopplungszeit der Querschnittsfläche von 30 h ^[1]	20
Abbildung 11: Wachstumskurven von einzelnen Organoiden der Fraktion N12 ENR1, jede Kurve repräsentiert ein Organoid (Msh2 ^{+/+} n=28, Msh2 ^{+/-} n=32, Msh2 ^{-/-} n=20), schwarz = verzweigt, rot = zystisch-ähnlich/zystisch, orange = retardiert, blau = angepasste exponentielle Wachstumskurve N12 ENR1 mit einer Verdopplungszeit der Querschnittsfläche von 30 h, rosa = angepasste exponentielle	

Wachstumskurve T12 E1 mit einer Verdopplungszeit der Querschnittsfläche von 12 h ^[1]	21
Abbildung 12: Mittelwert der Summe der Δ bp Scores (+ SEM) der drei Marker aller Msh2 ^{-/-} -Organoiden der Fraktion N12 ENR1 in Abhängigkeit vom Wachstumsmuster (verzweigt n=39 Organoiden, zystisch-ähnlich n=5 Organoiden, zystisch n=5 Organoiden, retardiert n=6)	21
Abbildung 13: heatmap zur Darstellung der Längenänderung der PCR-Produkte der Marker A27, A33 und GA29 in Msh2 ^{-/-} -Organoiden der Fraktionen N12 ENR1, A8 E1, A12 E1 und T12 E1 (n=4 Mäuse/Fraktion, n=10 Organoiden aus Normal- und Tumorgewebe/Maus, n=5 Organoiden aus Adenomgewebe/Maus) ^[1]	23
Abbildung 14: Wachstumskurven von einzelnen Organoiden aus zwei Tumoren einer Msh2 ^{-/-} -Maus, jede Kurve repräsentiert ein Organoid (schwarz = Organoiden aus Tumor 1 mit nahezu identischem Wachstum, orange = Organoiden aus Tumor 2 mit frühzeitigem Wachstumsabbruch, blau = gemittelte Wachstumskurve von normalen Organoiden aus 12 Monate alten Mäusen (N12 ENR1) mit einer Verdopplungszeit der Querschnittsfläche von 30 h, pink = gemittelte Wachstumskurve von Tumorganoiden (T12E1) mit einer Verdopplungszeit der Querschnittsfläche von 12 h ^[1]	23
Abbildung 15: prozentualer Anteil (+ SD) zystisch-ähnlich oder zystisch wachsender Msh2 ^{-/-} -Organoiden der Fraktionen N12 ENR1, A12 E1 und T12 E1 (n=4 Mäuse/Fraktion, n=10 Organoiden aus Normal- und Tumorgewebe/Maus, n=5 Organoiden aus Adenomgewebe/Maus)	24
Abbildung 16: prozentualer Anteil (+ SD) zystisch-ähnlich oder zystisch wachsender Organoiden der Fraktionen N8 ENR1, N12 ENR1 und N8 ENR18 aller Genotypen (n=4 Mäuse/Genotyp, n=10 Organoiden/Maus) ^[1]	25
Abbildung 17: Wachstumskurven von einzelnen Organoiden der Fraktion N8 ENR18 einer Maus, jede Kurve repräsentiert ein Organoid (Msh2 ^{+/+} n=18, Msh2 ^{+/-} n=22, Msh2 ^{-/-} n=20), schwarz = verzweigt, rot = zystisch-ähnlich/zystisch, blau = angepasste exponentielle Wachstumskurve N12 ENR1 mit einer Verdopplungszeit der Querschnittsfläche von 30 h, rosa = angepasste exponentielle Wachstumskurve T12 E1 mit einer Verdopplungszeit der Querschnittsfläche von 12 h ^[1]	26
Abbildung 18: Mittelwert der Δ bp Scores (+ SD) der drei Marker und deren Summe von Organoiden der Fraktionen N8 ENR1, N12 ENR1 und N8 ENR18 aller Genotypen (n=4 Mäuse/Fraktion und Genotyp, n=10 Organoiden/Maus; T-Test: * p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001) ^[1]	26
Abbildung 19: Vergrößerung der Querschnittsfläche (links) und Dauer des zystisch-ähnlichen oder zystischen Wachstums (rechts) der Organoiden der Fraktionen N8 ENR1, N12 ENR1 und N8 ENR18 in Abhängigkeit vom Δ bp Score, exemplarisch für den Marker GA29 (n=1 Maus/Fraktion und Genotyp, alle untersuchten Organoiden einer Maus sind dargestellt) ^[1]	27
Abbildung 20: prozentualer Anteil (+ SD) zystisch-ähnlich oder zystisch wachsender Organoiden der Fraktionen N8 ENR18 und N8 ENR18 + ASS aller Genotypen (n=3 Mäuse/Fraktion und Genotyp, n=10 Organoiden/Maus) ^[1]	28
Abbildung 21: Mittelwert der Δ bp Scores (+ SD) der drei Marker und deren Summe von Organoiden der Fraktionen N8 ENR18 und N8 ENR18 + ASS aller Genotypen (n=3 Mäuse/Fraktion und Genotyp, n=10 Organoiden/Maus) ^[1]	28

Selbstständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Ich versichere, das Dritte weder mittelbar noch unmittelbar eine Vergütung oder geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, und dass die vorgelegte Arbeit weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt wurde. Jegliches von anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, auf das direkt Bezug genommen wird oder das in der Arbeit verwendet wurde, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Die aktuellen gesetzlichen Vorgaben in Bezug auf die Zulassung der klinischen Studien, die Bestimmungen des Tierschutzgesetzes, die Bestimmungen des Gentechnikgesetzes und die allgemeinen Datenschutzbestimmungen wurden eingehalten. Ich versichere, dass ich die Regelungen der Satzung der Universität Leipzig zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis kenne und eingehalten habe.

Ort, Datum

Tobias Kreutzmann