

Murine und humane Modellsysteme zur funktionellen Untersuchung von Gehirnzellen

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Laura Petersilie
aus Düsseldorf

Düsseldorf, Januar 2024

aus dem Institut für Neurobiologie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Gedruckt mit der Genehmigung der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Berichterstatter:

1. Prof. Dr. Christine R. Rose

2. Prof. Dr. Alessandro Prigione

Tag der mündlichen Prüfung: 05.07.2024

**“As long as our brain is a mystery, the universe,
the reflection of the structure of the brain
will also be a mystery.”**

— Santiago Ramón y Cajal —

Zusammenfassung

Mäuse sind in der neurowissenschaftlichen Grundlagenforschung das Hauptmodellsystem, um die Physiologie und die Pathophysiologie des Gehirns zu untersuchen. Aufgrund von Spezies-spezifischen Unterschieden, ist die Translation der Ergebnisse aus murinen Studien auf den Menschen jedoch limitiert. So scheitern z.B. bei einem ischämischen Schlaganfall viele Therapien zur Rettung der Zellen in der Penumbra, einer Zone, die den Infarktkern umgibt. Humane induzierte pluripotente Stammzell (hiPS)-basierte Modellsysteme sind eine vielversprechende Alternative, um murine Modellsysteme zu ergänzen bzw. zu ersetzen.

Meine Arbeit widmet sich der Notwendigkeit, humane 3D-Modellsysteme zu charakterisieren und zu etablieren. Des Weiteren wurden murine und humane Gehirnzellen unter pathophysiologischen Konditionen, wie sie in der ischämischen Penumbra vorliegen, untersucht. Die ischämische Penumbra kann *in situ* bzw. *in vitro* simuliert werden. Dazu erfolgte eine Glukose-freie Perfusion der Zellen mit metabolischen Inhibitoren, die die Glykolyse und oxidative Phosphorylierung blockieren („chemische Ischämie“). In Akutschnitten des Mausgehirns konnte zunächst durch konfokale Aufnahmen gezeigt werden, dass Astrozyten nach einer zehnminütigen chemischen Ischämie nicht anschwellen. Bereits nach einer zweiminütigen chemischen Ischämie, konnte mittels des Kalzium-Imagings ein Anstieg von intrazellulärem Ca^{2+} in Astrozyten detektiert werden, der durch verschiedene Manipulationen des Extrazellulärtraums reduziert werden konnte. Um die chemische Ischämie auch in humanen Gehirnzellen induzieren zu können, wurden diese zunächst morphologisch und funktionell charakterisiert. Aufgrund der möglichen Langzeitkultivierung von Gehirnzellen an der Luft-Flüssigkeitsgrenze, habe ich ein verfeinertes Protokoll zur Generierung von kortikalen Gehirnorganoidschnitten (cBOS) etabliert. Die immunhistochemische Analyse zeigte, dass cBOS stark verzweigte Astrozyten und synaptisch verbundene neuronale Strukturen aufweisen. Die Funktionalität der Zellen wurde mittels des Kalzium-Imagings untersucht, wodurch Spontanaktivität, induzierte synchrone Netzwerkaktivität und die Präsenz von ionotropen Glutamat-Rezeptoren verifiziert wurde. Zusätzlich konnte ein genetisch kodierter Nanosensor (ATeam1.03^{YEMK}) zur Überprüfung der intrazellulären ATP-Level in Neuronen exprimiert werden. Nach einer zweiminütigen chemischen Ischämie wurde ein transients Abfall der neuronalen ATP-Level detektiert.

Die Ergebnisse meiner Arbeit zeigen, dass cBOS ein robustes Modellsystem sind, welches Untersuchungen von humanen Gehirnzellen in Netzwerken ermöglicht. So können zukünftig z.B. potentielle pharmakologische Substanzen getestet werden, die zur Reduktion von Zellschäden nach einer metabolischen Inhibition beitragen. Des Weiteren kann dieses Modellsystem auch mit Patienten-abgeleiteten hiPSs generiert werden, wodurch Einblicke in die Mechanismen verschiedenster neurologischer Krankheiten gewonnen werden können.

Abstract

Mice are the main model system in neuroscientific basic research to study the physiology and pathophysiology of the brain. However, the translation of findings from murine model systems to humans is limited due to species-specific differences. For instance, many therapies to rescue the cells in the penumbra, a zone surrounding the core, during an ischemic stroke fail. Human induced pluripotent stem cell (hiPSC)-based model systems are a promising alternative to complement or replace murine model systems.

My work addresses the necessity of characterizing and establishing human 3D model systems. In addition, murine and human brain cells under pathophysiological conditions, like in the ischemic penumbra, should be investigated. The ischemic penumbra can be simulated *in situ* or *in vitro*. Therefore, glucose-free perfusion of the cells with metabolic inhibitors, which block the glycolysis and oxidative phosphorylation, was performed (“chemical ischemia”). Confocal images of astrocytes in acute slices of the mouse brain showed that astrocytes do not swell upon a ten-minute chemical ischemia. Even after a two-minute period of chemical ischemia, an increase of intracellular Ca^{2+} in astrocytes could be detected using calcium imaging, which could be reduced by different manipulations of the extracellular space. To induce chemical ischemia also in human brain cells, a morphological and functional characterization was done first. Due to the possible long-term cultivation of cells at the air-liquid interface, I established a refined protocol to generate cortical brain organoid slices (cBOS). Immunohistochemical analysis revealed highly ramified astrocytes and synaptically-connected neuronal structures in cBOS. The functionality of the cells was analyzed using calcium imaging, which verified spontaneous activity, induced synchronous network activity and the presence of ionotropic glutamate receptors. Additionally, a genetically-encoded nanosensor (ATeam1.03^{YEMK}) to examine intracellular ATP levels in neurons could be expressed. After a two-minute chemical ischemia, a transient reduction of neuronal ATP levels could be detected.

The results of my work show that cBOS are a robust model system which allow investigations of human brain cells in networks. Thus, e.g. potential pharmacological substances that contribute to the reduction of cell damage after metabolic inhibition can be tested in the future. Moreover, this model system can be generated based on patient-derived hiPSCs by which insights of mechanisms of many different neurological diseases can be obtained.

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung / Einheit	Bezeichnung
$[X]_{i/e}$	Intrazelluläre/extrazelluläre Konzentration des Ions
μM	Mikromolar
μm	Mikrometer
2-DG	2-Deoxy-D-Glukose
2D	Zweidimensional
3D	Dreidimensional
ACSF	Artifizielle Zerebrospinalflüssigkeit (Engl.: <i>artificial cerebrospinal fluid</i>)
ALG	Alginat
ALI-CO	Zerebrales Organoid an der Luft-Flüssigkeitsgrenze (Engl.: <i>air-liquid interface cerebral organoid</i>)
AM	Acetoxymethylester
AMPA	α -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolpropionsäure
AP	Aktionspotential
APV	2-Amino-5-phosphonovaleriansäure
ATP	Adenosintriphosphat
bFGF	Basischer Fibroblasten-Wachstumsfaktor (Engl.: <i>basic fibroblast growth factor</i>)
BMPs	Knochenmorphogenetische Proteine (Engl.: <i>bone morphogenetic proteins</i>)
bRG	Basale Radialgliazelle
Ca^{2+}	Kalzium
cBOS	Kortikale Gehirnorganoidschnitte (Engl.: <i>cortical brain organoid slices</i>)
Cl^-	Chlorid
CO_2	Kohlenstoffdioxid
CRISPR	Gehäuft auftretende, regelmäßig unterbrochene, kurze Palindrom- Wiederholungen (Engl.: <i>clustered regularly interspaced short palindromic repeats</i>)
CTIP2	COUP Transkriptionsfaktor interagierendes Protein 2 (Engl.: <i>COUP-TF interacting protein 2</i>)

Cx	Connexin
ER	Endoplasmatisches Retikulum
EZM	Extrazelluläre Matrix
FLIM	Fluoreszenzlebensdauer-Mikroskopie (Engl.: <i>fluorescence lifetime imaging microscopy</i>)
FRET	Förster-Resonanzenergietransfer
FWHM	Halbwertsbreite (Engl.: <i>full duration at half maximum</i>)
GABA	γ -Aminobuttersäure
GFAP	Saures Gliafaserprotein (Engl.: <i>glial fibrillary acidic protein</i>)
GG	Gellangummi
hES	Humane embryonale Stammzelle
hiNPC	Humane hiPS-basierte Vorläuferzelle (Engl.: <i>hiPSC-derived neural progenitor cell</i>)
hiPS	Humane induzierte pluripotente Stammzelle
HOMER1	Homer Protein-Homolog 1
hSyn1	Humanes Synapsin 1
IPC	Intermediäre Vorläuferzelle (Engl.: <i>intermediate progenitor cell</i>)
K ⁺	Kalium
K _d	Dissoziationskonstante
Klf4	Krüppel-ähnlicher Faktor 4 (Engl.: <i>Krüppel-like factor 4</i>)
LAM	Laminin
LSO	Laterale superiore Olive
MAP2	Mikrotubuli-assoziiertes Protein 2 (Engl.: <i>microtubule-associated protein 2</i>)
mM	Millimolar
mOsm	Milliosmol
ms	Millisekunde
mV	Millivolt
Na ⁺	Natrium
NaN ₃	Natriumazid
Navs	Spannungsabhängige Natrium-Kanäle
NBQX	2,3-Dihydroxy-6-nitro-7-sulfamoyl-benzo[f]chinoxalin-2,3-dion

NCX	Natrium-Kalzium-Austauscher (Engl.: <i>Na⁺/Ca²⁺ exchanger</i>)
NKA	Natrium-Kalium-ATPase
nm	Nanometer
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
O ₂	Sauerstoff
OATP1C1	Organische Anionen transportierendes Polypeptid 1C1 (Engl.: <i>organic anion-transporting polypeptide 1C1</i>)
OCT3/4	Organischer Kationentransporter 3/4 (Engl.: <i>organic cation transporter 3/4</i>)
OGB-1	Oregon Grün BAPTA-1 (Engl.: <i>Oregon-Green-BAPTA-1</i>)
pA	Pikoampere
PAX6	Gepaartes Box-Gen 6 (Engl.: <i>paired box gene 6</i>)
PSD95	Postsynaptisches Dichteprotein 95 (Engl.: <i>postsynaptic density protein 95</i>)
ROI	Bereich von Interesse (Engl.: <i>region of interest</i>)
S100β	S100 Kalzium-bindendes Protein B (Engl.: <i>S100 calcium-binding protein B</i>)
SATB	Spezielles AT-sequenzbindendes Protein 2 (Engl.: <i>Special AT-rich sequence-binding protein 2</i>)
SD	Streudepolarisation (Engl.: <i>spreading depolarization</i>)
SOX2	Geschlechtsbestimmende Region Y-Box 2 (Engl.: <i>sex determining region Y (SRY)-box2</i>)
SR101	Sulforhodamin 101
SVZ	Subventrikuläre Zone
SYN1	Synapsin 1
TGFβ	Transformierender Wachstumsfaktor β (Engl.: <i>transforming growth factor β</i>)
TOM20	Translokase der äußeren Mitochondrienmembran 20 (Engl.: <i>translocase of outer mitochondrial membrane 20</i>)
TRPV4	Transienter Rezeptorpotential Vanilloid 4 (Engl.: <i>transient receptor potential vanilloid 4</i>)

TTP	Zeit zur Maximalamplitude (Engl.: <i>time to peak</i>)
TTX	Tetrodotoxin
TUJ1	Beta-III Tubulin
VGLUT1	Vesikulärer Glutamattransporter 1 (Engl.: <i>vesicular glutamate transporter 1</i>)
ZNS	Zentrales Nervensystem

Inhaltsverzeichnis

Kapitel 1	Einleitung	2
	1 Gehirnzellen	2
	1.1 Nervenzellen	3
	1.2 Gliazellen	4
	2 Modellsysteme zur funktionellen Untersuchung von Gehirnzellen	6
	2.1 Murine Modellsysteme	7
	2.1.1 Akutschnitte des Mausgehirns	8
	2.1.2 Limitationen von murinen Modellsystemen	9
	2.2 Humane Modellsysteme	11
	2.2.1 Humane induzierte pluripotente Stammzell (hiPS)-basierte Modellsysteme	11
	2.2.1.1 3D-Zellkulturen	13
	2.2.1.2 3D-Gehirnorganoide	14
	2.2.1.3 Kultivierte Gehirnorganoidschnitte	18
	2.3 Methoden zur funktionellen Untersuchung von Gehirnzellen	20
	2.3.1 Visualisierung und Identifikation von Zelltypen	20
	2.3.2 Ionen-Detektion	21
	2.3.3 Simulation von pathophysiologischen Konditionen – am Beispiel eines Modells des ischämischen Schlaganfalls	23
Kapitel 2	Ziele der Arbeit	26
Kapitel 3	Ergebnisse und Diskussion	28
	3 Pathophysiologische Charakterisierung von Gehirnzellen in Akutschnitten des Mausgehirns	28
	3.1 Astrozyten schwellen während transienter chemisch induzierter Ischämie nicht an	29
	3.2 Intrazellulärer Kalziumanstieg in Astrozyten während transienter chemisch induzierter Ischämie	32
	4 Funktionelle Charakterisierung von neuronalen Netzwerken in humanen 3D-Zellkulturen	35

5	Morphologische Charakterisierung von Gehirnzellen in humanen kortikalen 3D-Gehirnorganoiden	38
5.1	Kortikale Gehirnorganotide weisen Astrozyten und Neurone sowie neurale Vorläufer und gesunde Mitochondrien auf	38
6	Morphologische und funktionelle Charakterisierung von Gehirnzellen in humanen kortikalen Gehirnorganoidschnitten	42
6.1	Generierung von kortikalen Gehirnorganoidschnitten	42
6.2	Kortikale Gehirnorganoidschnitte weisen Astrozyten und Neurone auf	44
6.3	Kortikale Gehirnorganoidschnitte zeigen spontane und synchrone Netzwerkaktivität	47
6.4	Kortikale Gehirnorganoidschnitte besitzen ionotrope Glutamatrezeptoren	48
7	Pathophysiologische Charakterisierung von Gehirnzellen in humanen kortikalen Gehirnorganoidschnitten	50
7.1	Kortikale Gehirnorganoidschnitte exprimieren genetisch-kodierte Sensoren um intrazelluläre ATP-Level zu überprüfen	50
7.2	Intrazellulärer ATP-Abfall in Neuronen während transientser chemisch induzierter Ischämie	50
Kapitel 4	Fazit	53
Kapitel 5	Publikationen und Manuskripte	56

Eitelmann, S., **Petersilie**, L., Rose, C. R., & Stephan, J. (2020). Altered Gap Junction Network Topography in Mouse Models for Human Hereditary Deafness. *International journal of molecular sciences*, 21(19), 7376. doi:10.3390/ijms21197376

Le, S., **Petersilie**, L., Inak, G., Menacho-Pando, C., Kafitz, K. W., Rybak-Wolf, A., Rajewsky, N., Rose, C. R., & Prigione, A. (2021). Generation of Human Brain Organoids for Mitochondrial Disease Modeling. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*(172), e62756. doi:10.3791/62756

Kapr, J., **Petersilie**, L., Distler, T., Lauria, I., Bendt, F., Sauter, C. M., Boccaccini, A. R., Rose, C. R., & Fritsche, E. (2021). Human Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Neural Progenitor Cells Produce Distinct Neural 3D In Vitro Models Depending on Alginate/Gellan Gum/Laminin Hydrogel Blend Properties. *Advanced Healthcare Materials*, 10(16), e2100131. doi:10.1002/adhm.202100131

Engels, M., Kalia, M., Rahmati, S., **Petersilie**, L., Kovermann, P., van Putten, M. J. A. M., Rose, C. R., Meijer, H. G. E., Gensch, T., & Fahlke, C. (2021). Glial Chloride Homeostasis Under Transient Ischemic Stress. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, *15*, 735300. doi:10.3389/fncel.2021.735300

Eitelmann, S., Everaerts, K., **Petersilie**, L., Rose, C. R., & Stephan, J. (2023). Ca²⁺-dependent rapid uncoupling of astrocytes upon brief metabolic stress. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, *17*, 1151608. doi:10.3389/fncel.2023.1151608

Petersilie, L., Heiduschka, S., Nelson, J. S. E., Neu, L. A., Le, S., Anand, R., Kafitz, K. W., Prigione, A., & Rose, C. R. Cortical brain organoid slices (cBOS) are a robust model system for the functional study of human-derived neural cells in intact minimal networks. *iScience*; in Revision.

Anhang

Literaturverzeichnis

199

Danksagung

Eidesstattliche Erklärung

Kapitel 1

Einleitung

1 Gehirnzellen

Das Gehirn, welches zum zentralen Nervensystem (ZNS) gezählt wird, ist die Steuerzentrale für nahezu alle im Körper ablaufenden Prozesse (Purves et al., 2004). Dieses anatomisch hochkomplexe Organ besteht bei Säugetieren hauptsächlich aus zwei Zelltypen: den Nerven- und Gliazellen, welche weiter in Mikro- und Makrogliazellen differenziert werden (Abbildung 1) (Liu et al., 2023). Beim Menschen beläuft sich die Anzahl der Gehirnzellen dabei auf ungefähr 170 Milliarden, wobei die Hälfte Nervenzellen sind, welche auch Neurone genannt werden, und die andere Hälfte nicht-neuronale Zellen sind (Azevedo et al., 2009).

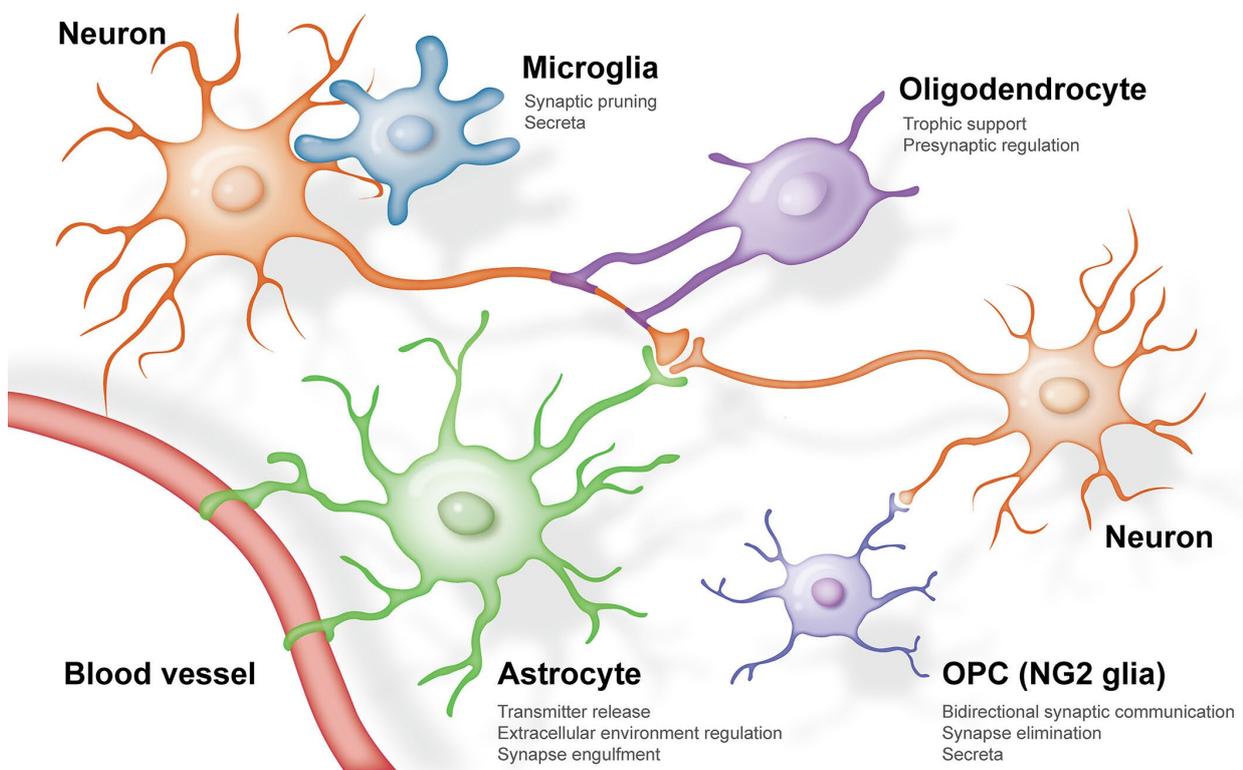


Abbildung 1: Zelltypen im adulten Gehirn. Neben den Neuronen („neurons“) werden im ZNS von Säugetieren die Gliazellen in Mikro- und Makrogliazellen differenziert, zu denen die Astrozyten („astrocytes“), Oligodendrozyten („oligodendrocytes“) und Polydodendrozyten („NG2 glia“) gezählt werden. Verwendet unter den Bedingungen der Creative-Commons-Lizenz ([CC BY-NC 4.0 DEED](https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/)): Liu, Y., Shen, X., Zhang, Y., Zheng, X., Cepeda, C., Wang, Y., Duan, S., & Tong, X. (2023). Interactions of glial cells with neuronal synapses, from astrocytes to microglia and oligodendrocyte lineage cells. *Glia*, 71(6), 1383-1401. doi:[10.1002/glia.24343](https://doi.org/10.1002/glia.24343).

1.1 Nervenzellen

Einer der beiden dominierenden Zelltypen im Gehirn sind die Neurone. Der Begriff „Neurone“ wurde bereits 1891 vom Anatom Wilhelm von Waldeyer-Hartz definiert. Er veröffentlichte basierend auf Untersuchungen des ZNS vom Histologen Santiago Ramón y Cajal, die Neuronentheorie (Waldeyer, 1891). Diese Theorie beschreibt zusammenfassend, dass Neurone die kleinste autonome Funktionseinheit im Gehirn bilden und miteinander kommunizieren können. Bis heute bildet sie mit einigen Korrekturen und Erweiterungen die Grundlage des neurowissenschaftlichen Wissens (Shepherd, 2015; Yuste, 2015).

Neurone sind elektrisch erregbare Zellen, welche für die Reiz- und Informationsleitung im Körper verantwortlich sind (Kandel et al., 2000). Morphologisch zeichnen sich Neurone durch einen Zellkörper, das Soma, aus. Vom Soma zweigen sich mehrere Zellfortsätze ab. Stark verzweigte Fortsätze werden als Dendriten bezeichnet. Über sie erfolgt in der Regel die Aufnahme der Erregungen, welche zum Zellkörper hingeleitet werden (Kandel et al., 2000). Die bei den meisten Neuronen vorhandenen kleinen Membranausstülpungen der Dendriten, werden als Dornenfortsätze (Engl.: *spines*) bezeichnet (Hering & Sheng, 2001). Als Axon wird der Zellfortsatz bezeichnet, über den die Erregungen weitergeleitet werden. Die Weiterleitung der Signale basiert dabei auf Ionenbewegungen über die Membran, gesteuert durch spannungsgesteuerte Ionenkanäle (Bear et al., 2020). Das Ruhemembranpotential der Neurone liegt in der Regel bei ungefähr -70 mV, was eine Spannungsdifferenz zwischen dem Intra- und Extrazellulärraum ist. Diese entsteht wesentlich durch die unterschiedlichen Konzentrationen von Kalium (K^+)- und Natrium (Na^+)-Ionen, welche durch Pumpen aufrechterhalten werden. Wird die Spannungsdifferenz positiver (Depolarisation) und ein Schwellenpotential erreicht, erfolgt die Generierung eines Aktionspotentials (AP) und dessen Weiterleitung. Die Erregungsfortleitung erfolgt dabei entweder langsam (kontinuierlich) an nicht-myelinisierten Axonen oder aufgrund der saltatorischen Erregungsfortleitung bei myelinisierten Axonen deutlich schneller (Kandel et al., 2000). In den Axonterminalen, den präsynaptischen Endigungen, befinden sich bei chemischen Synapsen, der häufigsten Synapsenform, die Botenstoffe. Dies sind meist Neurotransmitter oder Neurohormone, welche in Vesikeln vorliegen. Je nach Neurotransmitter spricht man von exzitatorischen (erregenden) und inhibitorischen (hemmenden) Neuronen, wobei Glutamat als wichtigster exzitatorischer und GABA als wichtigster inhibitorischer Neurotransmitter gilt. Sobald ein AP die Präsynapse erreicht, öffnen sich die spannungsgesteuerten Kalziumkanäle und es kommt zum Kalzium (Ca^{2+})-Einstrom. Die Vesikel

verschmelzen folglich mit der Membran und es kommt zur Freisetzung von Botenstoffen in den synaptischen Spalt. Dies wird als Exozytose bezeichnet. Somit erfolgt schließlich eine Umwandlung von elektrischen Signalen in chemische Signale. In der Postsynapse befinden sich Rezeptoren mit spezifischen Bindungsstellen für die freigesetzten Botenstoffe. Der Informationsaustausch („die Kommunikation“) zwischen Neuronen erfolgt somit über die Synapsen (Purves et al., 2004).

Generell gilt, dass sich Neurone aufgrund von diversen Eigenschaften klassifizieren lassen, was aufgrund der Physiologie, der molekularen Eigenschaften oder der Morphologie erfolgen kann (Zeng & Sanes, 2017).

1.2 Gliazellen

Den zweiten dominierenden Zelltyp im Gehirn machen die Gliazellen aus. Sie wurden erstmals Mitte des 19. Jahrhunderts von Rudolph von Virchow entdeckt und zunächst aufgrund der morphologischen Eigenschaften von den Neuronen unterschieden. Er prägte den Begriff „Neuroglia“ und charakterisierte sie zunächst als eine Art Bindegewebe, welches die Nervenzellen stützt (Virchow, 1858). Derweil ist bekannt, dass Gliazellen essentiell für eine gesunde Hirnfunktion sind und unter anderem an der Hirndurchblutung, der Synapsenformation oder der Myelinisierung von Nervenzellen beteiligt sind (Allen & Barres, 2009; Barres, 2008). Im menschlichen Gehirn machen Gliazellen einen Anteil von circa 50% aus, wobei das Verhältnis von Gliazellen zu Neuronen je nach Hirnareal variiert (Azevedo et al., 2009). Basierend auf dem mesodermalen oder ektodermalen Ursprung, werden die Gliazellen des ZNS in Mikro- und Makrogliazellen klassifiziert. Mikroglia stammen von myeloischen Zellen des extra-embryonalen Dottersacks ab und wandern erst während der frühen Embryonalentwicklung ins Parenchym des ZNS ein (Kettenmann et al., 2011; Ransohoff & Cardona, 2010). Sie werden dem so genannten mononukleären-phagozytären System zugeordnet (Ransohoff & Cardona, 2010). Dieser stark ramifizierte Zelltyp ist hoch dynamisch und motil, und steht im engen Kontakt mit neuronalen Strukturen sowie Blutgefäßen und Makrogliazellen (Nimmerjahn et al., 2005). Mikrogliazellen sind somit entscheidend an der Immunabwehr und an Entzündungsprozessen im ZNS sowie an der Entstehung von neurodegenerativen Erkrankungen beteiligt (Aguzzi et al., 2013; Block & Hong, 2005; Hickman et al., 2018).

Im Vergleich zu den Mikrogliazellen haben Makrogliazellen ebenso wie Neurone einen neuroektodermalen Ursprung. Sie werden weiter unterteilt in Oligodendrozyten,

Polydendrozyten und Astrozyten (Abbildung 1) (Liu et al., 2023; Ransohoff & Cardona, 2010). Oligodendrozyten bilden die Myelinscheiden, welche um die neuronalen Axone gewickelt sind und diese isolieren. Dies ermöglicht die saltatorische Propagation von APs und somit schnelle Signalweiterleitung und Kommunikation zwischen Nervenzellen (Bradl & Lassmann, 2010; Kandel et al., 2000). Polydendrozyten, auch bekannt als NG2-Gliazellen, sind in der grauen und in der weißen Hirnsubstanz sowohl während der Entwicklung als auch im adulten Gehirn vorzufinden. Sie zeichnen sich durch die Expression des Proteoglykans NG2 sowie durch eine stark verzweigte Morphologie aus (Nishiyama et al., 2002). Sie sind an der Bildung neuer Oligodendrozyten und weiteren Funktionen beteiligt (Nishiyama et al., 2009). Den größten Anteil der Makrogliazellen machen die Astrozyten aus, welche an vielen Prozessen beteiligt sind, die essentiell für eine gesunde Hirnfunktion sind.

Astrozyten

Die Bezeichnung Astrozyt erhielten die Zellen aufgrund von ihrer sternförmigen Morphologie (Gr.: *ástron* = Stern, *kýtos* = Zelle) (Lenhossék, 1893). Morphologisch zeichnen sie sich durch ein Soma aus, von dem sich Primärausläufer abzweigen, welche sich immer weiter verzweigen. Gekoppelt sind Astrozyten über so genannte Gap-Junctions, die den Austausch von Ionen und kleinen Molekülen ermöglichen (Giaume et al., 1997). Aufgrund von ihrer heterogenen Morphologie und Lage im Gewebe, werden sie in fibröse und protoplasmatische Astrozyten unterteilt. Fibröse Astrozyten zeichnen sich durch lange und wenig verzweigte Ausläufer aus und sind vornehmlich in der weißen Hirnsubstanz vorzufinden. Protoplasmatische Astrozyten hingegen besitzen dicke Primärausläufer, welche sehr stark verzweigt und hauptsächlich in der grauen Hirnsubstanz vorzufinden sind (Andriezen, 1893; Oberheim et al., 2012). Sie sind in Domänen strukturiert, welche sich nur in den äußeren Rändern überlappen und in denen Interaktionen zu mehreren tausend neuronalen Synapsen bestehen (Bushong et al., 2002). Aufgrund des engen Kontakts von astrozytären Endfüßen zu neuronalen Synapsen wurde das Modell der „dreiteiligen Synapse“ eingeführt. Diese Formation besteht aus einem prä- und postsynaptischem Ende und einem astrozytären Endfuß, welcher die Synapse ummantelt. Astrozyten sind zusammenfassend maßgeblich an der Signalübertragung von Neuronen und der Modulation synaptischer Aktivität beteiligt (Araque et al., 1999; Eroglu & Barres, 2010; Perea et al., 2009) .

2 Modellsysteme zur funktionellen Untersuchung von Gehirnzellen

Um sowohl die morphologischen Charakteristika der Zellen als auch die intra- und interzellulären Mechanismen der Zellen vereinfacht untersuchen zu können, werden Modellsysteme benötigt. Abhängig von der experimentellen Fragestellung, welche sowohl physiologische als auch pathophysiologische Konditionen adressieren kann, stehen unterschiedliche tierische und humane Modellsysteme zur Verfügung. Teilweise ist der Einsatz und Vergleich von mehreren Modellsystemen nötig, um bestimmte Hypothesen verifizieren bzw. falsifizieren zu können.

In diesem Promotionsvorhaben wurde ein murines und mehrere humane Modellsysteme verwendet, welche im nachfolgenden Kapitel weiter erläutert werden. Dies umfasst das *in situ*-Modellsystem die Akutschnitte des Mausgehirns sowie die humanen *in vitro*-Modellsysteme die dreidimensionalen (3D) Zellkulturen, die 3D-Gehirnorganoide und die kultivierten Gehirnorganoidschnitte (Abbildung 2).

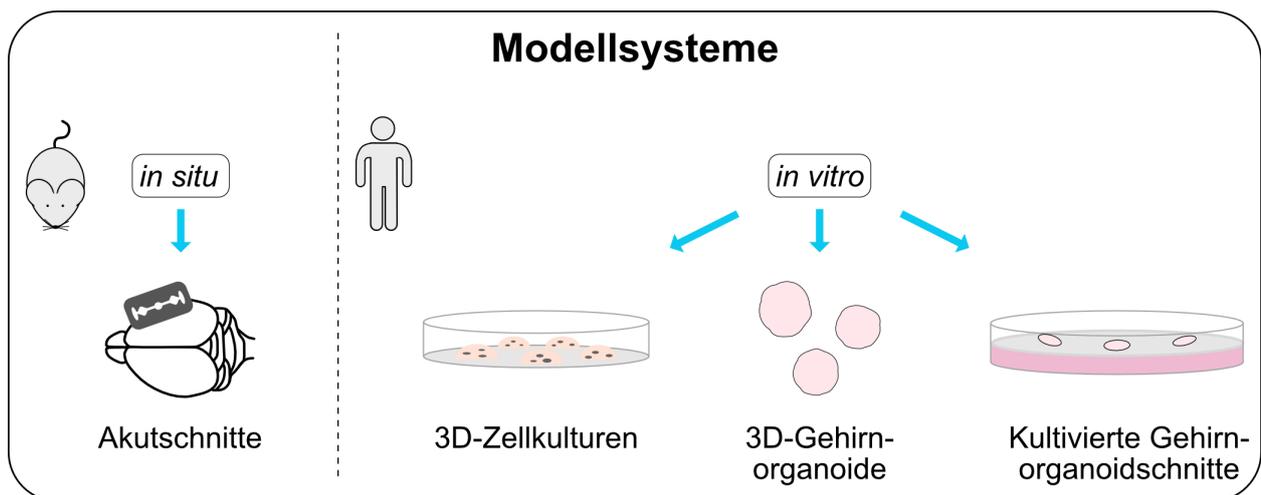


Abbildung 2: Schematische Übersicht über die in diesem Promotionsvorhaben verwendeten Modellsysteme. Links: Murines *in situ*-Modellsystem der Akutschnitte des Mausgehirns. Rechts: Gezeigt sind die drei humanen *in vitro*-Modellsysteme der 3D-Zellkulturen, der 3D-Gehirnorganoide und der kultivierten Gehirnorganoidschnitte. Unveröffentlicht (Petersilie, 2023).

2.1 Murine Modellsysteme

Seit Jahrhunderten wird von Wissenschaftlern die Anatomie und Physiologie des menschlichen Gehirns untersucht. Aufgrund des limitierten Zugangs zu menschlichem Gewebe und des eingeschränkten Durchführens von Experimenten am Menschen, griffen sie bereits im antiken Griechenland auf Tiermodelle zurück. So konnte Alkmaion von Kroton bereits im 6. Jahrhundert v. Chr. anhand von Hundestudien feststellen, dass das Gehirn der Sitz von Intelligenz und Bewusstsein ist (Ericsson et al., 2013).

Die Ära der modernen biomedizinischen Grundlagenforschung wurde mit Beginn des 20. Jahrhunderts eingeläutet. Zu dieser Zeit haben sich Nagetiere, speziell Mäuse, als gängigstes Modellsystem etabliert (Ericsson et al., 2013). Mäuse sind aufgrund ihrer Körpergröße, einer kurzen Lebens- und Reproduktionszeit und damit einhergehenden geringen Kosten ein ideales Versuchstier. Des Weiteren gibt eine große physiologische Ähnlichkeit zum Menschen sowie viele Analogien von anatomischen Strukturen (Bryda, 2013). Weiterhin lassen sich leicht Inzuchtlinien erzeugen, was zu einer geringen genetischen Varianz zwischen den Versuchstieren führt und somit die Reproduzierbarkeit und Vergleichbarkeit von Ergebnissen vereinfacht (Ericsson et al., 2013; Yoshiki et al., 2022). Seit der vollständigen Entschlüsselung der Genomsequenz der Maus im Jahre 2002 (Mouse Genome Sequencing Consortium et al., 2002) sowie der des Menschen ein Jahr zuvor (Lander et al., 2001; Venter et al., 2001), ist geklärt, dass auch eine genetische Ähnlichkeit zwischen den beiden Spezies vorhanden ist. Die Übereinstimmigkeit der circa 30.000 Protein-kodierenden Gene beträgt ungefähr 95% (Bryda, 2013; Mouse Genome Sequencing Consortium et al., 2002). Bei der Erforschung von Krankheiten wurde durch die Etablierung von Knockout-Mäusen (Capecchi, 1989; Smithies, 1993; Smithies et al., 1985; Kirk R. Thomas & Capecchi, 1987; K. R. Thomas et al., 1986) ein großer Meilenstein erreicht. In diesen Mäusen können gezielt Gene manipuliert werden. Sie bilden die Grundlage für viele Mausstudien, die zur Untersuchung humaner Krankheiten, wie z.B. der angeborenen Taubheit (Eitelmann, **Petersilie** et al., 2020), durchgeführt wurden.

Anwendbar sowohl für das wildtypische als auch das transgene Mausgewebe, haben sich in den letzten Jahrzehnten diverse Techniken zur Untersuchung der Gehirnzellen etabliert. So haben sich neben zweidimensionalen (2D)-Primärkulturen, akute und organotypische Hirnschnitte sowie *in vivo*-Messungen durchgesetzt (Wellbourne-Wood & Chatton, 2018). In meiner Arbeit wurde der Fokus auf das murine Präparat der Akutschnitte des Gehirns gelegt.

2.1.1 Akutschnitte des Mausgehirns

Akutschnitte des Mausgehirns haben sich in den letzten Jahrzehnten der neurowissenschaftlichen Forschung zu einem der wichtigsten *in situ*-Modelle entwickelt. Diese Technik kann für wildtypische und transgene Mäuse jeglichen Altersstadiums angewendet werden und ermöglicht es, durch verschiedene Orientierungen des Gewebes, Schnitte aus jeder Hirnregion zu generieren (Bsp.

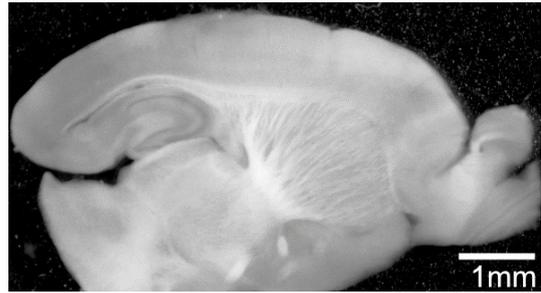


Abbildung 3: Akutschnitt des Mausgehirns. Übersichtsaufnahme eines parasagittalen Hirnschnitts (juvenile Maus). Unveröffentlicht (Petersilie, 2023).

Abbildung 3). Dazu werden die Gehirne unmittelbar nach deren Präparation in eine eiskalte ($3 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$), artifizielle Zerebrospinalflüssigkeit (ACSF, Engl: *artificial cerebrospinal fluid*) überführt. Die Zusammensetzung der ACSF generiert eine Osmolarität von $\sim 310 \text{ mOsm}$ und mit Begasung von Carbogen ($5\% \text{ CO}_2$, $95\% \text{ O}_2$) einen pH-Wert von ~ 7.4 (Eitelmann, Petersilie et al., 2023). Mit Hilfe eines Vibratoms werden Schnitte mit einer Dicke von meist $250 \text{ }\mu\text{m}$ angefertigt, welche für bis zu ungefähr sechs Stunden unter stetiger Perfusion von angepasstem ACSF bei Raumtemperatur (RT, $22 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$) oder physiologischer Temperatur (PT, $37 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$), für Experimente genutzt werden können.

Der Vorteil dieses Präparats ist unter anderem, dass der Zugang zu den Zellmembranen für elektrophysiologische Messungen via Patch-Pipette vereinfacht ist, die Zellen im Vergleich zu isolierten Zellkulturen weiterhin in ihrer ursprünglichen Umgebung vorliegen und die synaptische Konnektivität bestehen bleibt (Edwards et al., 1989). Des Weiteren können einfach Manipulationen des Extrazellulärraums durchgeführt werden. Dafür können die Zusammensetzung des ACSF verändert oder pharmakologische Substanzen hinzugefügt werden (Wellbourne-Wood & Chatton, 2018). Dies ermöglicht es auch mit wildtypischen Akutschnitten pathophysiologische Zustände nachzuahmen sowie pharmakologische Substanzen auszutesten. Mäuse sind daher ein wichtiges Modellsystem in der biomedizinischen Grundlagenforschung.

2.1.2 Limitationen von murinen Modellsystemen

Seit Jahrzehnten werden murine Modellsysteme zur Erforschung der Physiologie des Gehirns verwendet. Zudem werden sie auch zur Erforschung von pathophysiologischen Ursachen neurologischer Krankheiten und zum Austesten von Medikamenten eingesetzt. Bei der Translation von Ergebnissen aus murinen Studien auf den Menschen, kommt es jedoch immer wieder zu Rückschlägen. Neben den vielen Gemeinsamkeiten zwischen Menschen und Mäusen, wie z.B. der großen Übereinstimmung von Protein-kodierenden-Genen (Bryda, 2013; Mouse Genome Sequencing Consortium et al., 2002), gibt es auch einige Spezies-spezifische Unterschiede. Generell gilt, dass Maus und Mensch sich in der Physiologie betreffend der Körpergröße, der metabolischen Rate, der Nahrung, der unterschiedlichen Lebensräume und dementsprechend auch unterschiedlichen Mikrobiomen und Pathogenen unterscheiden (Perlman, 2016).

Im Hinblick auf das Gehirn, speziell beim Vergleich der Großhirnrinde (Kortex) von Mensch und Maus, fällt bereits makroskopisch auf, dass das humane Gehirn im Vergleich zum Mausgehirn deutlich größer und komplexer ist (Abbildung 4) (Wong et al., 2023). Der oberflächliche Teil der grauen Substanz beim menschlichen Gehirn zeichnet sich durch zahlreiche Windungen (*Gyri*) und Furchen (*Syri*) aus, was zu einer Flächenvergrößerung führt und als Gyrifizierung bezeichnet wird (Welker, 1990). Die Gyrifizierung fehlt beim Mausgehirn komplett (Herculano-Houzel, 2009; Herculano-Houzel et al., 2006). Dies wird als lissencephal bezeichnet (Kelava et al., 2013). Die unterschiedliche Oberfläche des Kortex basiert darauf, dass in Mäusen, der in Menschen sehr häufig vorkommende Zelltyp, die basalen Radialgliazellen (bRGs), sehr selten ist. Diese Vorläuferzellen sind maßgeblich am Expandieren des Kortex beteiligt. Das Expandieren bezieht sich dabei insbesondere auf die oberen, subgranulären Schichten. Dabei befinden sich die bRGs hauptsächlich in der äußeren subventrikulären Zone (SVZ), einer im Vergleich zur Maus zusätzlichen proliferierenden Zone beim Menschen (Abbildung 5) (Hansen et al., 2010; Lewitus et al., 2013; Nowakowski et al., 2016; Pollen et al., 2015; Seto & Eiraku, 2019). Im Vergleich zum murinen Gehirn hat sich also der oberflächliche Teil der grauen Hirnsubstanz des Menschen durch die Gyrifizierung stark vergrößert (Tallinen et al., 2014; Welker, 1990). Mit

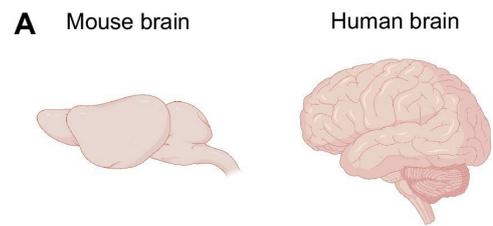


Abbildung 4: Vergleich des murinen und humanen Gehirns. Seitenansicht des Mausgehirns (links) und des menschlichen Gehirns (rechts). Verwendet und modifiziert unter den Bedingungen der Creative-Commons-Lizenz ([CC BY- 4.0 DEED](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)): Wong, H. H., Chou, C. Y. C., Watt, A. J., & Sjoström, P. J. (2023). Comparing mouse and human brains. *eLife*, 12. doi:[10.7554/eLife.90017](https://doi.org/10.7554/eLife.90017).

der Größenexpansion des Neokortex wird heutzutage die Steigerung der kognitiven Fähigkeiten des Menschen assoziiert (Defelipe, 2011).

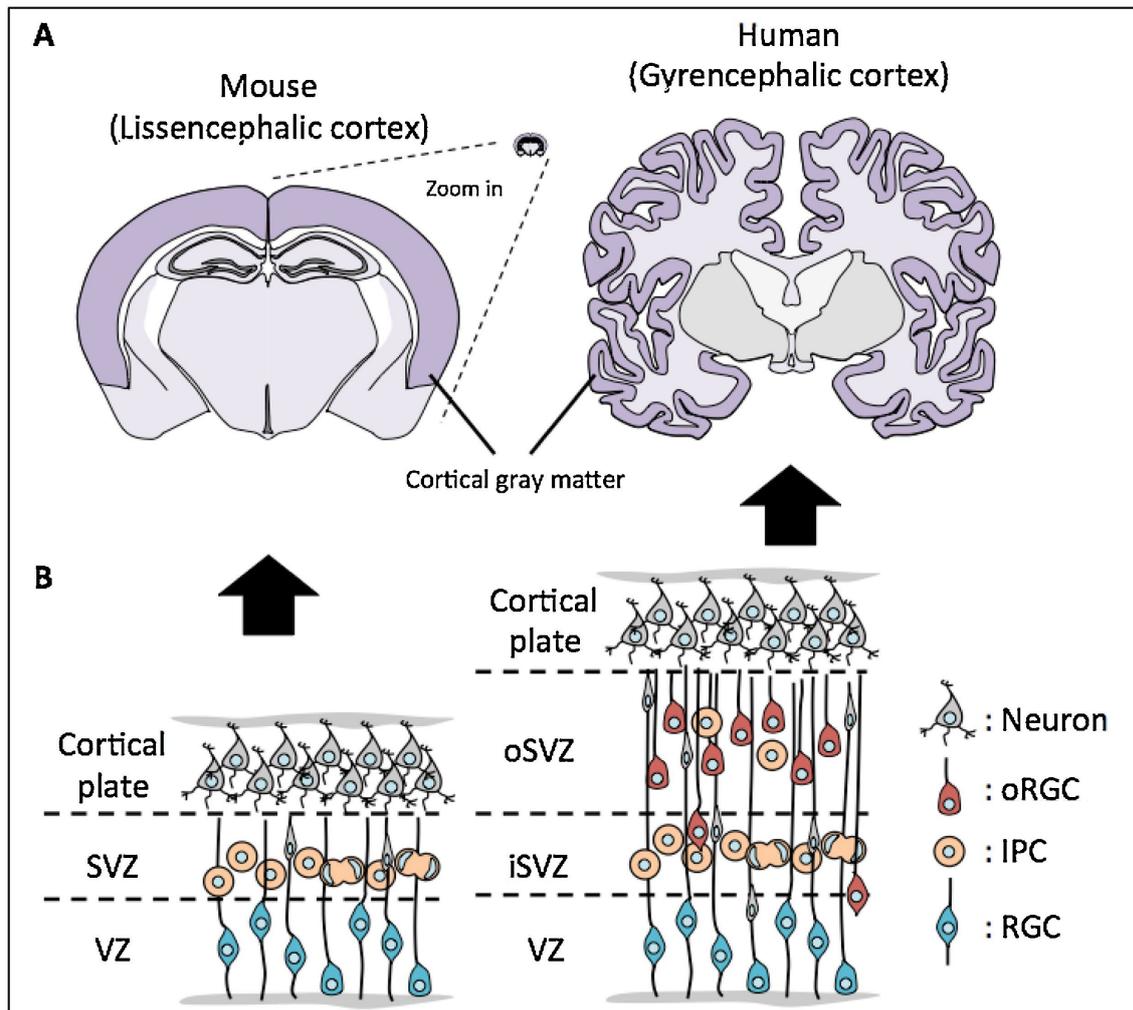


Abbildung 5: Vergleich des murinen und humanen Neokortex. A Querschnitt durch das Mausgehirn (links) und das menschliche Gehirn (rechts). B Spezies-spezifische Unterschiede des sich entwickelnden Neokortex von Maus (links) und Mensch (rechts). Abk.: (o)RGC = (äußere) Radialgliazelle (Engl.: *outer radial glial cells*); IPC = intermediäre Vorläuferzelle (Engl.: *intermediate progenitor cell*); (o/i) SVZ = (äußere/innere) subventrikuläre Zone (Engl.: *outer/inner subventricular zone*). Verwendet mit Genehmigung: Seto, Y., & Eiraku, M. (2019). Human brain development and its in vitro recapitulation. *Neuroscience Research*, 138, 33-42. doi:<https://doi.org/10.1016/j.neures.2018.09.011>.

Auch innerhalb der kortikalen Schaltkreise gibt es trotz konservierter Zelltypen große Unterschiede zwischen den Spezies Mensch und Maus. Dies basiert auf unterschiedlichen Genexpressionen, Verteilungen der Zelltypen in den kortikalen Schichten und Morphologien (Hodge et al., 2019). Auch auf subzellulärer Ebene gibt es Unterschiede. So nehmen z.B. im somatosensorischen Kortex des Menschen die Spines ein 100 % größeres Volumen ein, als die in Mäusen (Defelipe, 2011).

Diese Unterschiede zeigen, dass die Translation von murinen Studien auf den Menschen nur limitiert möglich ist. Reviews berichten immer wieder von der geringen Erfolgsquote bei Medikamenten die im ZNS von Nagetieren getestet wurden und der geringen Eintrittsquote in die klinische Phase I (Geerts, 2009; Kola & Landis, 2004).

Dadurch wird deutlich, dass die Forschung in Richtung alternativer humaner Modellsysteme unabdingbar ist. Des Weiteren gilt es, den Einsatz von Tieren bei tierversuchskundlichen Experimenten auf ein Minimum zu reduzieren. Britische Wissenschaftler haben bereits 1959 das so genannte „3R-Prinzip“ veröffentlicht. Die drei R stehen dabei für vermeiden („*replace*“), verringern („*reduce*“) und verbessern („*refine*“) (Russell & Burch, 1959). So soll ausdrücklich geprüft werden, ob Alternativmethoden für das jeweilige Versuchsvorhaben zur Verfügung stehen, ob die Tieranzahl auf ein Minimum reduziert werden kann sowie ob und wie der Einsatz der Tiere verbessert werden kann. Neue Alternativmethoden bieten humane Modellsysteme.

2.2 Humane Modellsysteme

Die Einführung und Etablierung von humanen Modellsystemen als Alternativmethoden zu murinen Modellsystemen ist unabdingbar. Im Gegensatz zu dem verhältnismäßig einfachen Zugriff auf murines Gewebe, ist das Erhalten von humanen Gewebe durch chirurgische Eingriffe oder *post mortem*-Gewebe erschwert (K. Lee et al., 2020; Wong et al., 2023) und mit deutlich mehr ethischen Restriktionen besetzt. Aufgrund dem begrenzten Zugriff auf das Gewebe wird oftmals pathologisches Gewebe verwendet und Faktoren wie das Alter, das Geschlecht sowie die Hirnregion vernachlässigt (K. Lee et al., 2020). Des Weiteren haben die meisten angewandten Techniken einen geringen Durchsatz (Wong et al., 2023). Viele Studien konnten und können daher nicht an primärem menschlichen Hirngewebe durchgeführt werden. *In vivo*-Messungen, welche mit Manipulationen zum Nachteil des Menschen verbunden sind, sind ebenfalls nicht realisierbar. Eine mögliche Alternative bilden die Stammzell-basierten Modellsysteme.

2.2.1 Humane induzierte pluripotente Stammzell (hiPS)-basierte Modellsysteme

Neben dem eingeschränkten Einsatz von humanem Gewebe, welches direkt vom Menschen gewonnen wird, bieten Stammzell-basierte Modellsysteme eine Alternative, um humane Modellsysteme zu etablieren. Stammzellen besitzen die Eigenschaft sich selbst zu erneuern, in

dem sie sich symmetrisch in zwei identische Stammzellen teilen oder durch eine asymmetrische Teilung eine Stammzelle und eine differenzierte Zelle bilden. Sie haben die Fähigkeit, sich in spezialisierte Zelltypen aus allen drei Keimblättern zu differenzieren. Dies umfasst das: Ektoderm, das Endoderm und das Mesoderm (Wobus & Boheler, 2005).

Takahashi und Yamanaka leisteten 2006 Pionierarbeit, in dem sie erstmals erfolgreich aus murinen Fibroblasten, pluripotente Stammzellen induzieren konnten (Takahashi & Yamanaka, 2006). Sie konnten zeigen, dass sowohl embryonale als auch adulte ausdifferenzierte Zellen (Fibroblasten), durch die retrovirale Transduktion der vier Transkriptionsfaktoren Oct3/4, SOX2, c-Myc und Klf4, in einen humanen embryonalen Stammzell (hES)-ähnlichen Zustand zurückprogrammiert werden können. Diese unterscheiden sich sowohl morphologisch als auch von ihren Wachstumseigenschaften kaum voneinander (Takahashi & Yamanaka, 2006). Im Folgejahr konnten sowohl Takashi und Kollegen, als auch Yu und Kollegen, mit den gleichen Transkriptionsfaktoren beziehungsweise mit einer anderen Faktorkombination, aus Fibroblasten humane induzierte pluripotente Stammzellen (hiPSs) generieren (Takahashi et al., 2007; Yu et al., 2007). Viele der ethischen Restriktionen sollten so überwunden sein, da der Einsatz von embryonalen Stammzellen und damit die Verwendung von humanen Föten und Embryonen aufgrund der Vergleichbarkeit zu hiPSs nicht mehr notwendig ist (J. Choi et al., 2015). Mittlerweile lassen sich gut charakterisierte, gesunde Spenderzelllinien kommerziell erwerben. Diese sollten strengen Richtlinien zur Qualitätssicherung unterliegen, um die Vergleichbarkeit der Zelllinien aus verschiedenen Laboratorien zu gewährleisten (Sullivan et al., 2018).

Ein weiterer Vorteil der hiPS-basierten Modelle ist, dass auch von erkrankten Patienten stammende Fibroblasten, für eine hiPS-Induktion verwendet werden können, welche genetisch bedingte Krankheiten ideal widerspiegeln (Soldner & Jaenisch, 2012; Sternecker et al., 2014). Die Generierung von isogenen Zelllinien durch das CRISPR/Cas9-System ermöglichen so den genauen Vergleich zwischen Kontroll- und Patienten-abgeleiteten Zelllinien (Grobarczyk et al., 2015).

Die neuroektodermale Differenzierung der hiPSs kann schließlich durch die Zugabe von bestimmten Wachstumsfaktoren und Inhibitoren im Medium erfolgen (Distler et al., 2021; Le et al., 2021; Lorenz et al., 2022). Je nach Fragestellung können die Zellen als 2D- oder als 3D-Zellkulturen kultiviert werden. Ein Nachteil der 2D-Zellkulturen ist unter anderem, dass die Biologie und Komplexität des Gehirns nicht widerspiegelt wird (Lovett et al., 2020), die Zell-Zell-Interaktionen fehlen (Kapri, **Petersilie** et al., 2021) und die Organisation von

Gewebsstrukturen nicht untersucht werden kann (Chiaradia & Lancaster, 2020). Diese Charakteristika können jedoch durch die Verwendung von 3D-Zellkulturen erhalten bleiben. In den folgenden Abschnitten werden ausgewählte hiPS-basierte 3D-Modellsysteme beschrieben.

2.2.1.1 3D-Zellkulturen

Eine Möglichkeit, um Zellen als 3D-Modelle zu kultivieren, ist der Einsatz von Biomaterialien, z.B. in Form von Hydrogelen. Hydrogele rekapitulieren aufgrund ihrer spezifischen Eigenschaften Gewebs-ähnliche Strukturen, die die extrazelluläre Matrix (EZM) nachbilden. Ihr poröser Aufbau entsteht durch zahlreiche hydrophile Polymere. Dadurch können Hydrogele große Wassermengen speichern, und weisen eine große Flexibilität auf (Bahram et al., 2016). Aufgrund dieser Eigenschaft lassen sich Zellen einfach in Hydrogele einbetten (Abbildung 6).

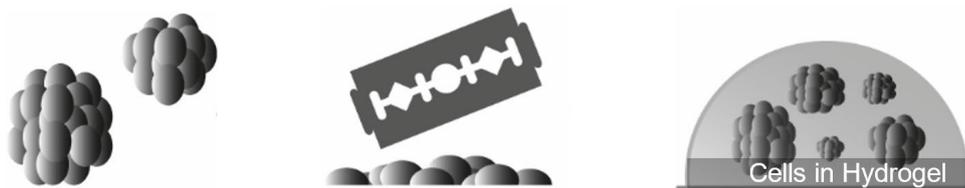


Abbildung 6: Schema von in Hydrogel eingebetteten Zellen. Neurosphären werden kultiviert, geschnitten und in Hydrogel eingebettet. Verwendet und modifiziert unter den Bedingungen der Creative-Commons-Lizenz ([CC BY 4.0 DEED](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)): Distler, T., Lauria, I., Detsch, R., Sauter, C. M., Bendt, F., Kapr, J., Rütten, S., Boccaccini, A. R., & Fritsche, E. (2021). Neuronal Differentiation from Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Neurospheres by the Application of Oxidized Alginate-Gelatin-Laminin Hydrogels. *Biomedicine*, 9(3). doi:[10.3390/biomedicine9030261](https://doi.org/10.3390/biomedicine9030261).

Diese werden weiterhin mit Nährstoffen versorgt und können somit weiter differenzieren (Yla-Outinen et al., 2019). Die fortschreitende Differenzierung, das Zellwachstum sowie die Überlebensrate der Zellen und die daraus resultierende Entwicklung der 3D-Zellkulturmodelle, hängt jedoch stark vom jeweiligen Hydrogelgemisch ab (Kapr, Petersilie et al., 2021). Diverse Studien konnten bereits zeigen, dass sich die Zellen innerhalb der Hydrogele zu Sphäroiden aggregieren können, welche teilweise diverse Zelltypen enthalten (Dingle et al., 2015; Distler et al., 2021; Kim et al., 2023; Wen et al., 2019).

2.2.1.2 3D-Gehirnorganoide

Neben der großen Vielfalt von Biomaterialien zur Entwicklung von 3D-Gewebsmodellen, hat sich auch die Organoid-Technologie stark weiterentwickelt (Lovett et al., 2020). Gehirnorganoide reflektieren dabei die humane Zytoarchitektur des sich entwickelnden Gehirns und weisen eine spezifische humane Genexpression auf. Die Generierung der 3D-Zellaggregatte basiert dabei auf hESs oder hiPSs (Eichmüller & Knoblich, 2022; Lancaster et al., 2013; C. T. Lee, Bendriem, et al., 2017), welche sowohl von gesunden Personen, als auch von erkrankten Patienten mit Gendefekten stammen können. Patienten-hiPS-basierte Gehirnorganoide können so ideal genetische und idiopathische Krankheiten nachbilden (Kelava & Lancaster, 2016). Es konnten bereits 3D-Gehirnorganoide erfolgreich zur Testung von pharmazeutischen Substanzen genutzt werden und Modellsysteme für infektiöse Krankheiten, wie z.B. für das Zika-Virus (Gabriel et al., 2017) oder SARS-CoV2 (Pellegrini, Albecka, et al., 2020), bilden. Sie sind somit ein neues, vielversprechendes Modellsystem in der neurowissenschaftlichen Grundlagenforschung.

Erstmals erfolgreich generiert wurden Gehirnorganoide von Lancaster und Kollegen, wobei sie zunächst zerebrale (ungerichtete, selbstbestimmte Ganzhirnorganoide; Engl.: *unguided self-patterned whole brain organoids*) einführten (Lancaster et al., 2013). Im gleichen Jahr konnte auch ein Protokoll für gerichtete, kortikale Organoide („*guided patterned cortical organoids*“) veröffentlicht werden (Kadoshima et al., 2013). Der Unterschied dieser Differenzierungsmöglichkeiten (Abbildung 7), liegt darin, dass bei ungerichteten Organoiden für die Induktion in zerebrale Strukturen der basische Fibroblasten-Wachstumsfaktor (bFGF, Engl.: *basic fibroblast growth factor*) und Retinolsäure verwendet werden (Del Dosso et al., 2020; Lancaster et al., 2013). Diese Art der Differenzierung führt zur Entwicklung von dorsalen Vorderhirnstrukturen. Dies geht jedoch mit einer großen Variabilität sowohl zwischen den hiPS-Zelllinien als auch zwischen den Organoiden einher. Der Grund dafür ist, dass eine Vielzahl der Zellen in Organoiden entweder ektodermalen Ursprungs (hauptsächlich Nerven- und Gliazellen) oder nicht-ektodermalen Ursprungs (z.B. Mikroglia- und Endothelzellen) sind und aus verschiedenen Hirnregionen stammen. Die Zellvariabilität kann in bestimmten Fragestellungen als Vorteil angesehen werden, erschwert jedoch aufgrund der großen Heterogenität der Organoide die Reproduzierbarkeit von Ergebnissen und den Einsatz für Krankheitsmodelle (Del Dosso et al., 2020).

Demgegenüber stehen Protokolle für die gerichtete Differenzierung, wobei bereits viele Hirnregionen wie z.B. das Zerebellum (Muguruma et al., 2015), der Hippokampus (Sakaguchi et

al., 2015) oder der *Plexus choroideus* (Pellegrini, Bonfio, et al., 2020) nachgebildet werden konnten. Durch die Zugabe von exogenen Faktoren können Entwicklungssignale für das neurale ektodermale Zellschicksal der hESs beziehungsweise hiPSs gesendet werden. Dafür erfolgt eine duale Inhibition des SMAD Signalwegs von knochenmorphogenetischen Proteinen (BMPs, Engl.: *bone morphogenetic proteins*) und dem transformierenden Wachstumsfaktor β (TGF β , Engl.: *transforming growth factor β*) (Chambers et al., 2009). Zusätzliche Morphogene verstärken die Zelltypdiversität von bestimmten Gehirnregionen. Die regionalisierten Gehirnorganoiden bilden somit ein robustes, homogenes Modellsystem, um die Zytoarchitektur und die physiologischen Eigenschaften von Zellen aus bestimmten Hirnregionen zu untersuchen (Del Dosso et al., 2020). Mehrere Studien konnten bereits zeigen, dass durch den Einsatz von so genannten Assembloiden, der Fusion von mehreren Regionen-spezifischen Gehirnorganoiden, auch die Interaktion dieser untersucht werden kann (Birey et al., 2017; Miura et al., 2020; Pasca, 2019). Der Fokus während dieses Promotionsvorhabens lag auf der Charakterisierung von kortikalen Gehirnorganoiden.

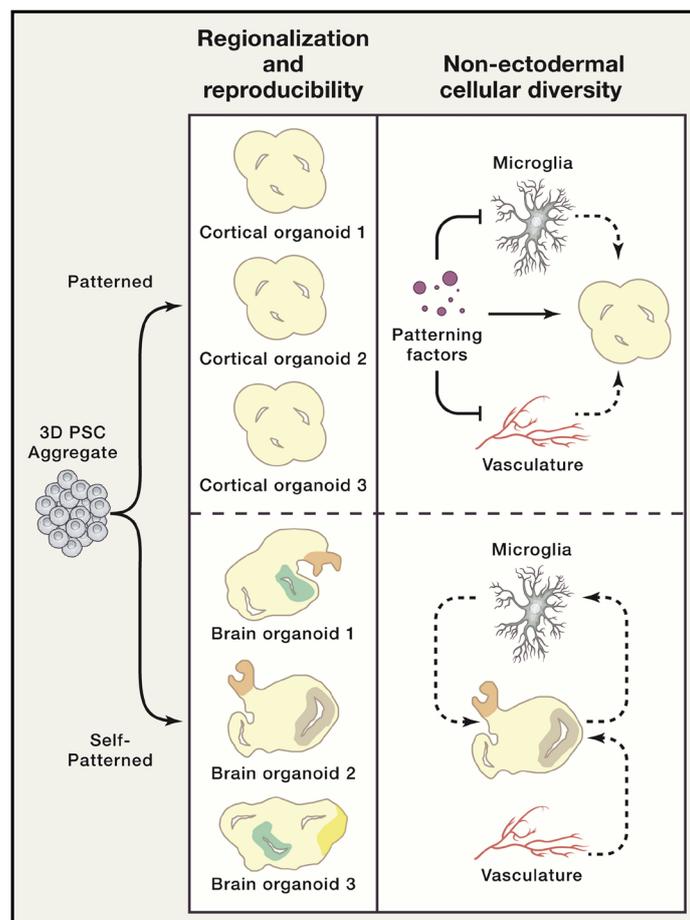
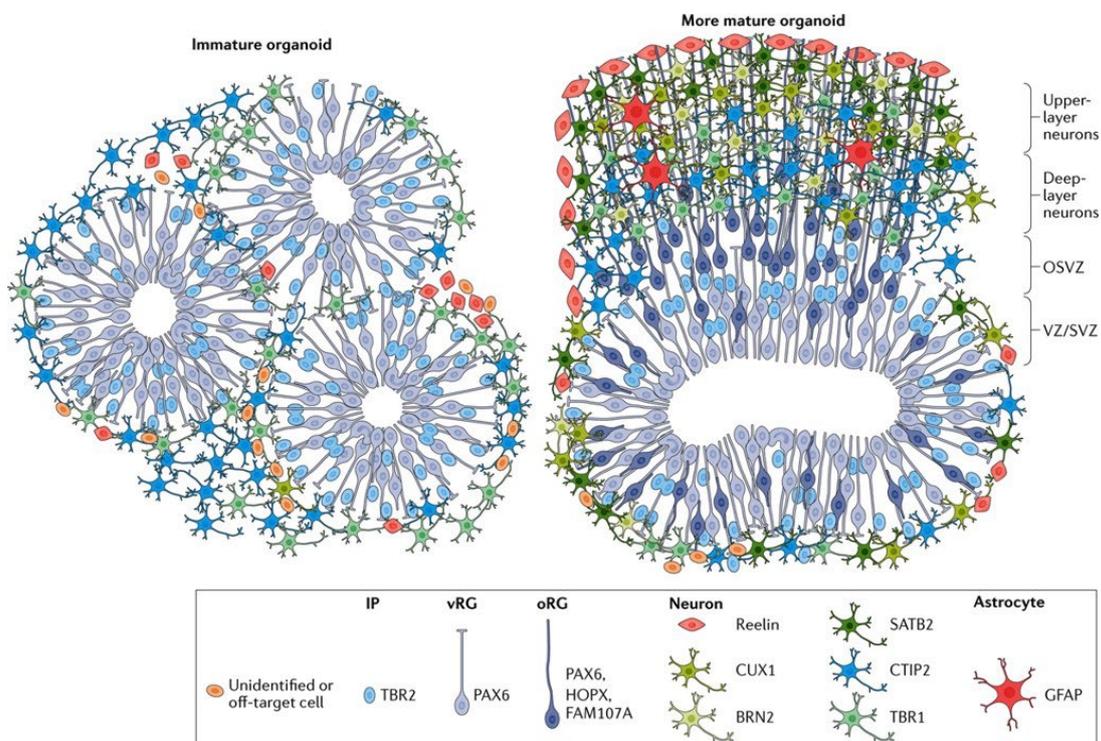


Abbildung 7: Übersicht über verschiedene Differenzierungsmöglichkeiten von Gehirnorganoiden. Vergleich von ungerichteten, selbstbestimmten Gehirnorganoiden („self-patterned“) und gerichteten („patterned“) Gehirnorganoiden. Verwendet mit Genehmigung: Del Dosso, A., Urenda, J. P., Nguyen, T., & Quadrato, G. (2020). Upgrading the Physiological Relevance of Human Brain Organoids. *Neuron*, 107(6), 1014-1028. doi:[10.1016/j.neuron.2020.08.029](https://doi.org/10.1016/j.neuron.2020.08.029).

Kortikale Gehirnorganoid

Kortikale Gehirnorganoid sind der meist verwendete und am besten charakterisierte Gehirnorganoidtyp (Qian et al., 2019). Sie spiegeln einzigartige Eigenschaften des humanen sich entwickelnden Kortex, der kortikalen Platte, wieder. Ein wichtiges Merkmal ist, dass sie die ventrikulären Strukturen rekapitulieren (Benito-Kwiecinski & Lancaster, 2020; Jeong et al., 2020; C. T. Lee, Bendriem, et al., 2017; C. T. Lee, Chen, et al., 2017). In etwas reiferen kortikalen Gehirnorganoiden bilden sich die SVZ, die äußere SVZ sowie Neurone der tiefen und hoch gelegenen Schichten des Kortex. Identifiziert werden können die Neurone durch den Marker des COUP Transkriptionsfaktor interagierenden Proteins 2 (CTIP2, Engl.: *COUP-TF interacting protein 2*), welcher die Neurone der tiefer gelegenen Schichten markiert und durch den Marker des speziellen AT-sequenzbindenden Proteins 2 (SATB2, Engl.: *Special AT-rich sequence-binding protein 2*), welcher die Neurone der oberflächlichen Schichten markiert (Abbildung 8) (Di Lullo & Kriegstein, 2017). Speziell die Entwicklung der äußeren SVZ sowie die große Anzahl der bRGs (s. Abbildung 8: „oRG“) in kortikalen Gehirnorganoiden (s. Abschnitt 2.1.2) (Hansen et al., 2010; Nowakowski et al., 2016; Pollen et al., 2015), zeigen die Bedeutsamkeit dieses Modellsystems.



Nature Reviews | Neuroscience

Abbildung 8: Vergleich von unreifen („immature“) und weiterentwickelten („more mature“) kortikalen Gehirnorganoiden. Gezeigt sind die Ventrikel-ähnlichen Strukturen und deren Schichtung sowie die Identifikation der Zelltypen durch spezifische Marker. Verwendet mit Genehmigung: Di Lullo, E., & Kriegstein, A. R. (2017). The use of brain organoids to investigate neural development and disease. *Nature Reviews Neuroscience*, 18(10), 573-584. doi:[10.1038/nrn.2017.107](https://doi.org/10.1038/nrn.2017.107).

Limitationen von 3D-Gehirnorganoiden

Der Einsatz der kortikalen sowie der ungerichteten zerebralen Gehirnorganoiden wird jedoch auch durch einige Faktoren limitiert. Bei den Regionen-spezifischen Gehirnorganoiden fehlt meist die akkurate Gewebearchitektur, obgleich die genetische Vielfalt widerspiegelt wird. So fehlt z.B. bei den kortikalen Organoiden trotz Vorhandensein der äußeren SVZ (Di Lullo & Kriegstein, 2017), die Gyrifizierung der kortikalen Oberfläche (Li et al., 2017; Scott & Huang, 2022). Studien argumentieren damit, dass Gehirnorganoiden noch nicht das Entwicklungsstadium erreicht haben, in dem die primären *Gyri* entstehen. Dies erfolgt beim Menschen in der Mitte der Schwangerschaft (Andrews & Nowakowski, 2019; Qian et al., 2019). Eine weitere Hypothese ist, dass die kortikalen Gehirnorganoiden mit einer Größe von circa 3-4 mm zu klein sind (Qian et al., 2019). Das könnte damit zusammenhängen, dass die Gyrifizierung des Kortexes mit der Dicke und der Oberflächengröße skaliert (Mota & Herculano-Houzel, 2015). Es existieren bereits viele Studien, die diese Limitation adressieren (Karzbrun et al., 2018; Li et al., 2017; Qian et al., 2019; Scott & Huang, 2022).

Eine weitere Limitation ist, dass nicht-neuronale Zellen wie Mikroglia- und Endothelzellen in vielen Gehirnorganoiden fehlen, da sie nicht ektodermalen Ursprungs sind. Erste Studien konnten bereits erfolgreich Mikroglia in Gehirnorganoiden generieren (Marton et al., 2019; Schafer et al., 2023; Wenzel et al., 2023). Der Faktor der fehlenden Vaskularisierung wurde ebenfalls in einigen Studien adressiert, in dem Endothelzellen hinzugefügt wurden und sich dadurch Gefäß-ähnliche Strukturen gebildet haben (Cakir et al., 2019; Pham et al., 2018; Ye, 2023). Weiteren Studien gelingt dies durch den Einsatz von Biomaterialien wie Silk-Mikrofasern (Sozzi et al., 2022) oder durch das Transplantieren von Organoiden ins Mausgehirn (Mansour et al., 2018; Revah et al., 2022).

Die größte Limitation der Gehirnorganoiden ist jedoch, dass sich mit einer längeren Kultivierungszeit und somit mit zunehmender Größe, ein nekrotischer Kern im Inneren bildet. Dieser entsteht durch eine verminderte Nährstoff- und Sauerstoffzufuhr (Lancaster & Knoblich, 2014; Qian et al., 2019). Der Einsatz von Bioreaktoren oder Rüttelplatten während der Kultivierungszeit der Gehirnorganoiden verbessert zwar die Diffusion im Gewebe, verhindert jedoch nicht die Entwicklung der Nekrose (Lancaster & Knoblich, 2014). Durch die Generierung von kultivierten Schnittpräparaten ist eine Langzeitkultivierung ohne nekrotischen Kern möglich.

2.2.1.3 Kultivierte Gehirnorganoidschnitte

Kultivierte Hirnschnitte, welche auch als organotypische Hirnschnitte bezeichnet werden, sind ein vor Jahren etabliertes Vorgehen, welches sowohl für das Gehirn von Nagetieren (Lerchundi, Kafitz, Farfers, et al., 2019; Stoppini et al., 1991) als auch von Menschen (Schwarz et al., 2017) angewendet wird. Das Prinzip basiert darauf, dass die Schnitte auf semipermeablen Membranen an der Luft-Flüssigkeits-Grenze kultiviert werden, wobei sich das Medium unter der Membran befindet (Humpel, 2015; Stoppini et al., 1991). Durch diese Technik können die Schnitte, vor allem im Vergleich zu Akutschnitten, welche nur einige Stunden vital sind, länger kultiviert werden und so die Maturation der Zellen verbessert werden (Humpel, 2015). Des Weiteren ermöglicht diese Technik den einfachen Zugang zu den Zellen, wodurch viele Methoden wie elektrophysiologische Messungen (K. Lee et al., 2020), Virus-Transduktionen (Lerchundi, Kafitz, Farfers, et al., 2019), Immunfluoreszenzfärbungen und Langzeit-Zeitrafferaufnahmen (Gordon et al., 2021), einfach durchgeführt werden können. Erstmals für Gehirnorganoiden eingeführt wurde diese Technik von Giandomenico und Kollegen (Giandomenico et al., 2019). Sie nutzten zerebrale Ganzhirnorganoiden und kultivierten sie an der Luft-Flüssigkeitsgrenze (ALI-COs, Engl.: *air-liquid interface cerebral organoids*) (Abbildung 9). Sie konnten zeigen, dass im Vergleich zu den ganzen Organoiden, die Überlebensrate der Zellen in den ALI-COs deutlich erhöht werden konnte, dass sich reife Neuronen schneller entwickelt haben, dass verschiedene Neuronentypen und Gliazellen vorhanden waren und dass sich funktionale Axonstränge gebildet haben. Des Weiteren konnten sie zeigen, dass diese Präparate für einen sehr langen Zeitraum von bis zu einem Jahr in Kultur gehalten werden können (Giandomenico et al., 2019; Giandomenico et al., 2021). Mittlerweile konnten auch andere Gruppen erfolgreich dieses Modellsystem basierend auf zerebralen Gehirnorganoiden anwenden und auch für die Erforschung von Krankheiten verwenden (Szebenyi et al., 2021). Die Etablierung und Charakterisierung von kortikalen Gehirnorganoidschnitten ist weiterhin notwendig.

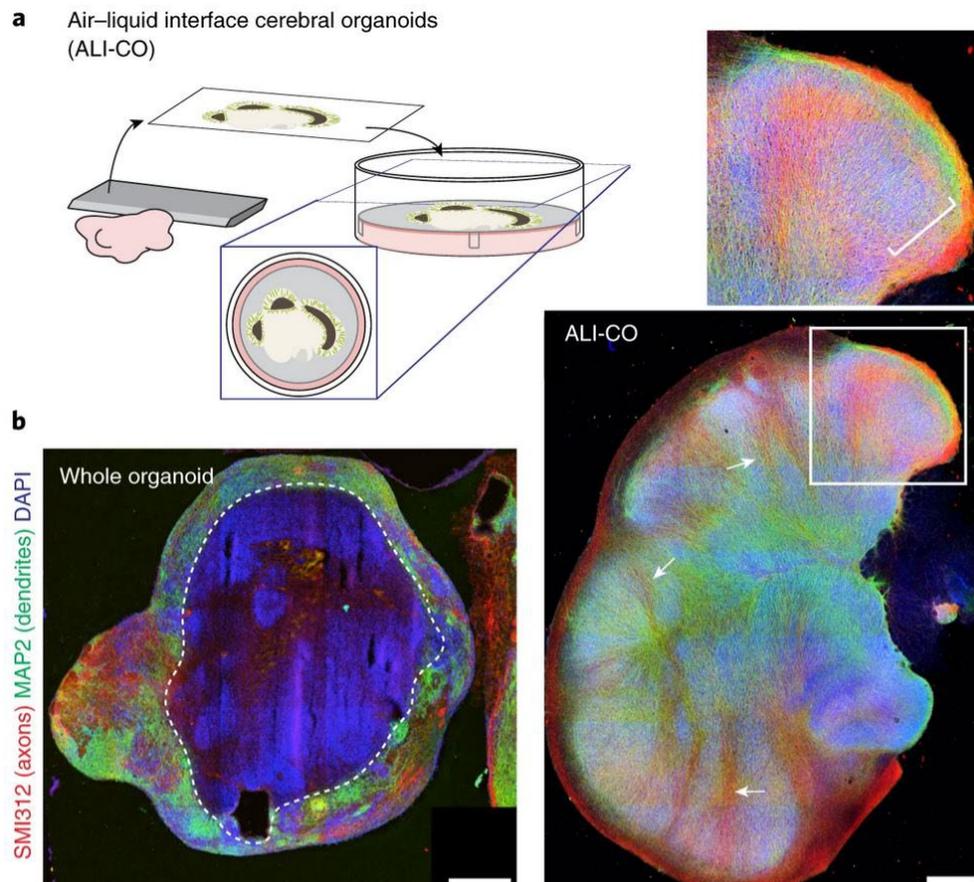


Abbildung 9: Vergleich von einem ganzen Gehirnorganoid und ALI-CO. **A** Schema der Generierung und des Transfers von ALI-COs. **B** Immunohistochemische Färbungen von Axonen (rot), Dendriten (grün) und Zellkernen (blau) in einem ganzen Organoid (links) und in einem ALI-CO (rechts). Maßstabsbalken: 500 µm. Verwendet mit Genehmigung und modifiziert: Giandomenico, S. L., Mierau, S. B., Gibbons, G. M., Wenger, L. M. D., Masullo, L., Sit, T., Sutcliffe, M., Boulanger, J., Tripodi, M., Derivery, E., Paulsen, O., Lakatos, A., & Lancaster, M. A. (2019). Cerebral organoids at the air-liquid interface generate diverse nerve tracts with functional output. *Nature neuroscience*, 22(4), 669-679. doi:[10.1038/s41593-019-0350-2](https://doi.org/10.1038/s41593-019-0350-2).

2.3 Methoden zur funktionellen Untersuchung von Gehirnzellen

Die Etablierung und Charakterisierung von neuen Modellsystemen geht mit dem Einsatz von diversen Techniken zur funktionellen Untersuchung von Gehirnzellen einher. Je nach experimenteller Fragestellung kann die Analyse sowohl von einzelnen Zellen als auch von zellulären Netzwerken erfolgen. In der Regel wird zunächst die zelluläre Organisation der vorhandenen Zelltypen sowohl in murinen als auch humanen Präparaten untersucht.

2.3.1 Visualisierung und Identifikation von Zelltypen

Um eine Analyse der Organisation der Zelltypen durchführen zu können, muss zunächst die Visualisierung und Identifikation erfolgen. In der Vergangenheit erfolgte die Unterscheidung der Zelltypen hauptsächlich durch den Einsatz der klassischen histologischen Färbetechniken wie der Golgi- und Nissl-Färbung (Pilati et al., 2008; Schröder et al., 2020). Diese Techniken geben insbesondere über die Morphologie der Zellen Aufschluss, wodurch die Unterscheidung von Zelltypen nicht immer eindeutig ist.

Dafür wird heutzutage vornehmlich die Immunfluoreszenztechnik sowohl für murines als auch humanes Gewebe verwendet. Basierend auf dem Einsatz von fluoreszierenden Antikörpern, können Epitope von spezifischen Antigenen im Gewebe detektiert und sichtbar gemacht werden (Schröder et al., 2020). Dadurch können Erkenntnisse über die zelluläre Organisation im Gewebe, die Zellmorphologie oder die Expression von spezifischen Proteinen generiert werden (Ramos-Vara, 2005). So können immunohistochemische Untersuchungen auch zur Identifikation von verschiedenen Zelltypen, wie z.B. Neurone und Astrozyten, genutzt werden. Dies erfolgt jedoch ausschließlich im fixierten Gewebe (Lyck et al., 2008).

Um im lebenden Gewebe zwischen Neuronen und Astrozyten unterschieden zu können, können Akutschnitte des Maushirns mit dem vitalen Fluoreszenzfarbstoff Sulforhodamin 101 (SR101) inkubiert werden. Dieser wird unter Einhaltung eines bestimmten Protokolls (Kafitz et al., 2008) von Astrozyten in akuten Mausgehirnschnitten durch das organische Anionentransportierende Polypeptid 1C1 (OATP1C1, Engl.: *organic anion-transporting polypeptide 1C1*) aufgenommen (Schnell et al., 2012; Schnell et al., 2015). Visualisiert werden können so die astrozytären Somata, die Primärausläufer und die Endfüße an den Blutgefäßen (Abbildung 10B) (Kafitz et al., 2008; Nimmerjahn et al., 2004).

2.3.2 Ionen-Detektion

Neben der Visualisierung von Zelltypen können zusätzlich auch die physiologischen Eigenschaften von Zellen untersucht werden. Dazu kann die Injektion mit einem chemischen fluoreszierenden Ionenindikator durchgeführt werden (Abbildung 10A). Dies kann in der ausgewählten Region an mehreren Stellen im Präparat erfolgen. Dadurch kann das gesamte ausgewählte Netzwerk mit dem Indikator beladen werden (Grienberger & Konnerth, 2012). Durch die Kombination mit SR101 in Akutschnitten des Mausgehirns kann so eine Zelltyp-spezifische Signaldetektion erfolgen.

Mittels der Fluoreszenzmikroskopie und dem dynamischen Imaging kann so eine Ionen-spezifische Detektion von intrazellulären Veränderungen erfolgen (Lakowicz, 2006). Bei den chemischen Indikatoren bildet die Basis ein Chelator und ein Fluophor. Durch die Bindung des zu detektierenden Ions (z.B. Ca^{2+}), ändert sich die emittierende Fluoreszenz (Grienberger & Konnerth, 2012; Tsien, 1980). So wird beispielsweise einer der etabliertesten hochaffinen Ca^{2+} -Indikatoren Oregon Grün Bapta-1 Acetoxymethyl (OGB-1 AM), mit einem K_d von 170 nM, bei einer Wellenlänge von 488 nm angeregt und die Emission bei > 520 nm gesammelt (Paredes et al., 2008). Neben OGB-1 AM wurde in diesem Promotionsvorhaben der ratiometrische Ca^{2+} -Indikator Fura-2 AM, mit einem K_d von 140 nM, verwendet (Grienberger & Konnerth, 2012). Dieser wird bei 357/380 nm angeregt und die Emission bei > 440 nm gesammelt. Der isosbestische Punkt bzw. die insensitive Wellenlänge liegt dabei bei 357 nm und die Ca^{2+} -sensitive Wellenlänge bei 380 nm (Haack et al., 2014).

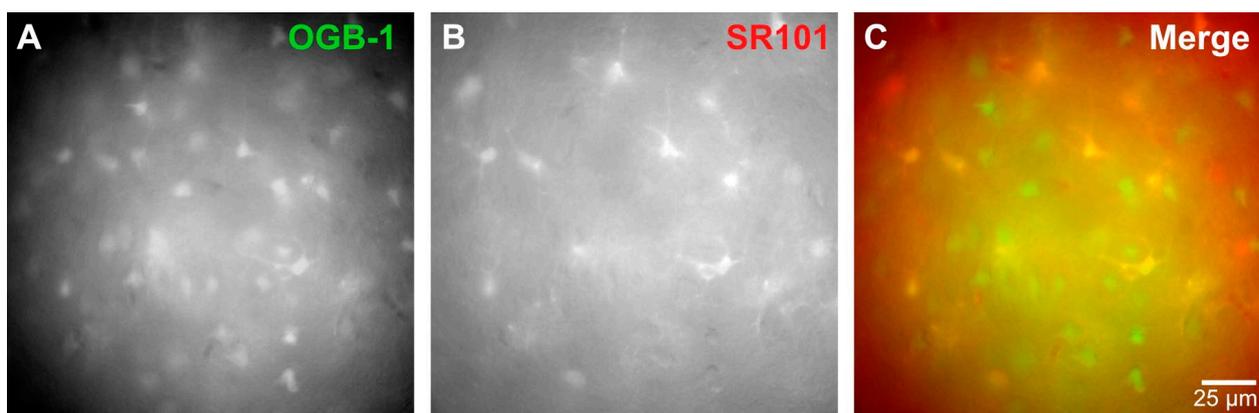


Abbildung 10: Zellen im Akutschnitt des Mausgehirns. A, B OGB-1- und SR101-beladene Zellen bzw. Astrozyten im somatosensorischen Neokortex (Schicht II/III) der Maus. C Überlagerung der in B und C gezeigten Kanäle. Unveröffentlicht (Petersilie, 2023).

Der nicht-invasive Eintritt des Indikators durch die Membran der Zellen wird durch das Anhängen einer AM-Gruppe ermöglicht, wodurch ein polarer, geladener und fluoreszierender Ca^{2+} -

sensitiver Komplex entsteht. Erst durch den Prozess der Hydrolyse, bei dem die intrazellulären Esterasen die AM-Gruppe abspalten, können Ca^{2+} -Signale detektiert werden (Tsien, 1981). Dies kann z.B. durch den Einsatz der Weitfeld-Mikroskopie erfolgen, wobei das Präparat vollständig durchleuchtet wird (Lakowicz, 2006). Xenon-Lampen werden dafür am häufigsten als Lichtquelle verwendet. Die Trennung der Exzitations- und Emissionswellenlängen erfolgt durch einen dichroischen Spiegel (Grienberger & Konnerth, 2012) und die Bildakquisition via CCD-Kamera (Lasser-Ross et al., 1991).

Kalzium als Marker für Aktivität

Für die physiologische Charakterisierung von murinen und humanen Modellsystemen wurde in diesem Promotionsvorhaben das Weitfeld-Kalzium-Imaging gewählt. Dieses ermöglicht die Detektion von intrazellulären Signalen und folglich die Untersuchung der Netzwerkaktivität (Grienberger & Konnerth, 2012). Ca^{2+} -Ionen sind an vielen Prozessen, wie z.B. der Regulation von Gedächtnis- und Lernprozessen und der neuronalen Plastizität beteiligt (Zundorf & Reiser, 2011) sowie in der Entwicklung des ZNS involviert (Spitzer, 2006). Des Weiteren ist Ca^{2+} als sekundärer Botenstoff maßgeblich an der Signalübertragung im Gehirn beteiligt und dessen Konzentration daher von großer Bedeutung. Intrazellulär liegt diese bei ~ 100 nM, während die extrazelluläre Konzentration im Bereich von mM liegt. Dieser starke Konzentrationsgradient wird durch Ca^{2+} -puffernde Proteine sowie Membran-eigene Mechanismen aufrechterhalten, die die Ca^{2+} -Ionen vom Zytosol in den Extrazellulärraum transportieren können (Purves et al., 2004). Intrazellulär sind das endoplasmatische Retikulum (ER) und die Mitochondrien die größten Speicher für Ca^{2+} -Ionen. So ist neben der Bewegung über die Plasmamembran auch eine Bewegung der Ca^{2+} -Ionen zwischen den Organellen an vielen Zellfunktionen beteiligt. Zusammenfassend sind an der Regulation von Ca^{2+} -Bewegungen über die Membranen zahlreiche G-Protein-gekoppelte Rezeptoren, Ionenkanäle und -Austauscher, Ca^{2+} -bindende Proteine sowie Transkriptionsnetzwerke beteiligt (Zundorf & Reiser, 2011). Die basale $[\text{Ca}^{2+}]_i$ kann demnach durch elektrische oder Rezeptor-vermittelte Stimulation ansteigen (Marambaud et al., 2009). Generell gilt, dass das Aufrechterhalten der Ionen-Homöostase in Gehirnzellen essentiell für eine gesunde Hirnfunktion ist (Bear et al., 2020). Unter pathophysiologischen Bedingungen, wie z.B. während eines ischämischen Schlaganfalls, kommt es zu einem Zusammenbrechen der Ionen-Homöostase, wodurch Zellschädigungen- und -tod die Folge sein können (Pietrobon & Moskowitz, 2014; Rossi et al., 2007).

2.3.3 Simulation von pathophysiologischen Konditionen – am Beispiel eines Modells des ischämischen Schlaganfalls

Durch die Verwendung von Modellsystemen können auch pathophysiologische Konditionen, wie sie z.B. während eines ischämischen Schlaganfalls vorliegen, untersucht werden. Der ischämische Schlaganfall ist der häufigste Subtyp der Schlaganfälle (Durukan & Tatlisumak, 2007) und einer der häufigsten Ursachen für Behinderungen und Todesfälle beim Menschen weltweit (Murray & Lopez, 1997). Ausgelöst wird dieser meist durch eine Embolie oder Thrombose der mittleren Gehirnschlagader (Durukan & Tatlisumak, 2007). Dies geht mit einer verminderten Durchblutung einher, welches eine reduzierte Sauerstoff- und Glukosezufuhr in dem betroffenen Hirnareal zur Folge hat (Dreier & Reiffurth, 2015; Moskowitz et al., 2010). Dies führt folglich dazu, dass die Hauptproduktion von Adenosintriphosphat (ATP), dem Hauptenergeträger im Gehirn, während der oxidativen Phosphorylierung der Mitochondrien

zum Erliegen kommt. Der hohe Energieverbrauch des Gehirns kann durch den raschen ATP-Abfall nicht mehr gedeckt werden (Moskowitz et al., 2010). In Folge kommen ATP-abhängige Prozesse wie die Aktivität der Natrium-Kalium-ATPase (NKA) zum Erliegen. Die NKA gilt als Hauptkonsument von ATP im Gehirn und ist für das Aufrechterhalten des Natrium- und Kaliumgradienten verantwortlich (Erecinska & Silver, 1994). Dies führt zu einem Anstieg der intrazellulären Natriumkonzentration ($[Na^+]_i$) sowie der extrazellulären Kaliumkonzentration ($[K^+]_e$). Die Neurone depolarisieren und die Glutamatfreisetzung ist erhöht, was zur Aktivierung von NMDA- und AMPA-Rezeptoren führt und zum weiteren Einstrom von Na^+ und Ca^{2+} in die Zellen. Die erhöhte $[Ca^{2+}]_i$ kann exzitotoxische Prozesse einleiten die zum Zelltod im Infarktkern führen können (D. W. Choi & Rothman, 1990; Durukan & Tatlisumak, 2007; J. M. Lee et al., 1999).

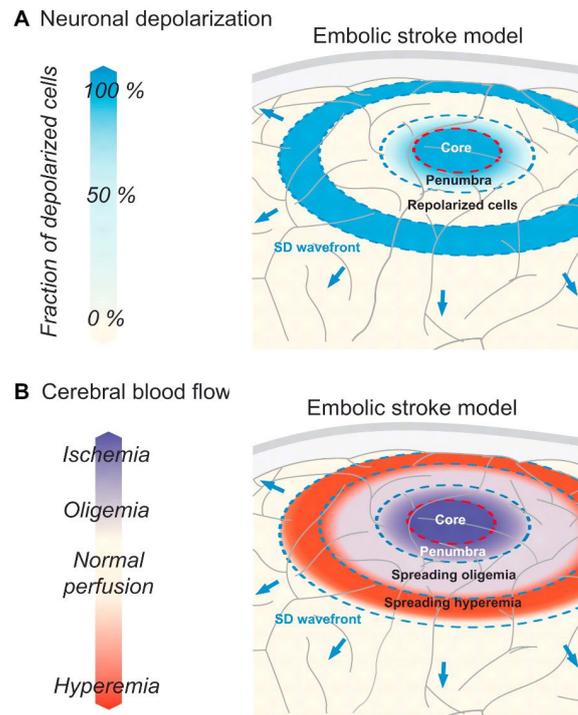


Abbildung 11: Schema der sich ausbreitenden Streudepolarisationen (SDs) im embolischen Schlaganfallmodell. **A** Anteil der depolarisierten Neurone. Vom Kern („core“) ausgehende SDs breiten sich in das umliegende, gesunde Gewebe aus. Zellen im Kern bleiben dauerhaft depolarisiert. **B** Zonen des zerebralen Blutflusses. Zellen im Kern befinden sich in der ischämischen Zone. Verwendet mit Genehmigung und modifiziert: Dreier, J. P., & Reiffurth, C. (2015). The stroke-migraine depolarization continuum. *Neuron*, 86(4), 902-922. doi:[10.1016/j.neuron.2015.04.004](https://doi.org/10.1016/j.neuron.2015.04.004).

Im ischämischen Kern sind die Zellen dauerhaft depolarisiert, der Blutfluss komplett inhibiert und der Zelltod nicht mehr vermeidbar (Abbildung 11) (Dreier & Reiffurth, 2015).

Der Fokus aktueller Forschungsarbeiten wird immer mehr auf die Penumbra, die Zone die den Kern umgibt gelegt. In der Regel ist in dieser Zone eine Rettung der Gehirnzellen noch möglich und die Zellen können sich potentiell erholen, sobald die verminderte Durchblutung gestoppt wird (Moskowitz et al., 2010; Rakers & Petzold, 2017). Der zeitliche Faktor ist hier entscheidend, da sich der Infarktkern immer weiter ausbreitet. So genannte Streudepolarisationen (SDs) werden durch das ionische Ungleichgewicht ausgelöst, welche sich über die Region ausbreiten und zu zusätzlichem metabolischen Stress führen (Lauritzen et al., 2011; Rakers & Petzold, 2017). SDs sind durch Depolarisationen der Zellmembranen, erhöhte $[K^+]_e$ und Glutamatkonzentrationen sowie verminderte extrazelluläre Konzentrationen Natrium ($[Na^+]_e$), Chlorid ($[Cl^-]_e$) und Kalzium ($[Ca^{2+}]_e$) gekennzeichnet (Pietrobon & Moskowitz, 2014). Begleitet wird dies meist durch eine Ansäuerung der Zellen sowie von einem Zellschwellen (Zhou et al., 2010), welches Hirnödeme zur Folge hat (Unterberg et al., 2004). Momentan existiert keine standardmäßige Behandlung von Patienten, welche gezielt für die Rettung der Zellen in der Penumbra während eines ischämischen Schlaganfalls angewendet wird (Passarelli et al., 2022). Dies basiert hauptsächlich darauf, dass die frühen Prozesse nach einer metabolischen Inhibition noch weitestgehend unerforscht sind.

Chemisch können die kurzzeitigen metabolischen Inhibitionen in der Penumbra durch pharmakologische Substanzen *in situ* und *in vitro* induziert werden. Um die zelluläre ATP-Produktion zu inhibieren wird zu einer Glukose-freien ACSF 2 mM des Glukoseanaloges 2-Deoxy-D-Glukose (2-DG) hinzugefügt, um die Glykolyse zu blockieren sowie 5 mM des Cytochrom-C-Oxidase (Komplex IV)-Blockers Natriumazid (NaN_3), um die mitochondriale Atmung zu blockieren („chemische Ischämie“) (Gerkau et al., 2018). Die Gewebe können für einen definierten Zeitraum mit dieser modifizierten ACSF perfundiert werden. Zusammenfassend können so die Effekte des ischämischen Zustands auf die Gehirnzellen untersucht werden.

Kapitel 2

Ziele der Arbeit

Murine Modellsysteme die zur Erforschung der Physiologie und Pathophysiologie des Gehirns verwendet werden sind unerlässlich. Die Translation von Ergebnissen auf den Menschen, speziell aus Studien die neurologischen Krankheiten adressieren, ist jedoch aufgrund von Spezies-spezifischen Unterschieden der Gehirne, limitiert. So gilt auch in der Schlaganfallforschung, dass viele neuroprotektive Therapien, die erfolgreich in Nagetieren getestet wurden, in klinischen Studien fehlschlagen (Braeuninger & Kleinschnitz, 2009; Sommer, 2017; Wang et al., 2015; Xu & Pan, 2013). hiPSs bilden die Grundlage für zahlreiche neue humane Modellsysteme, die die murinen Modellsysteme ergänzen bzw. ersetzen könnten. Ein Hauptziel der Arbeit ist es zunächst ein murines, gut charakterisiertes Modellsystem (Akutschnitte des Mausgehirns) zu verwenden, um den Einfluss einer kurzzeitigen metabolischen Inhibition auf die Gehirnzellen zu untersuchen. Dazu soll ein bereits bestehendes Versuchsprotokoll verwendet werden, welches chemisch die Penumbra in einem ischämischen Schlaganfall *in vitro* simuliert („chemische Ischämie“) (Gerkau et al., 2018). Durch den schnellen Beginn einer medikamentösen Therapie während eines ischämischen Schlaganfalls können die Zellschäden in dieser Zone gerettet werden (Moskowitz et al., 2010). Weitere Hauptziele sind es mehrere hiPS-basierte Gehirnzellen von 3D humanen Modellsystemen zu charakterisieren, wozu in Hydrogel eingebettete neurale Netzwerke, 3D-Gehirnorganoide und kortikale Gehirnorganoidschnitte zählen. Schließlich sollen die Auswirkungen der metabolischen Inhibition auf Gehirnzellen in einem humanen Modellsystem untersucht werden. Zur morphologischen und funktionellen Untersuchung der murinen und humanen Gehirnzellen sollen diverse Techniken und Bildgebungsverfahren angewendet werden. Die Hauptziele dieser Arbeit lassen sich folgendermaßen gliedern:

1. Pathophysiologische Charakterisierung von Gehirnzellen in Akutschnitten des Mausgehirns.
2. Funktionelle Charakterisierung von neuronalen Netzwerken in humanen 3D-Zellkulturen.
3. Morphologische Charakterisierung von Gehirnzellen in humanen kortikalen 3D-Gehirnorganoiden.
4. Morphologische und funktionelle Charakterisierung von Gehirnzellen in humanen kortikalen Gehirnorganoidschnitten.
5. Pathophysiologische Charakterisierung von Gehirnzellen in humanen kortikalen Gehirnorganoidschnitten.

Kapitel 3

Ergebnisse und Diskussion

Im folgenden Kapitel werden die konkreten Beiträge von mir zu den während des Promotionsvorhabens veröffentlichten Publikationen bzw. eingereichten Manuskripten beschrieben.

3 Pathophysiologische Charakterisierung von Gehirnzellen in Akutschnitten des Mausgehirns

Akutschnitte des Mausgehirns sind ein bereits seit Jahrzehnten verwendetes Modellsystem, um die Physiologie des Gehirns zu untersuchen. Zudem werden sie auch zur Erforschung pathophysiologischer Ursachen von Krankheiten eingesetzt, wobei transgene Mäuse einen großen Beitrag leisten. So konnten auch in der Studie Eitelmann, **Petersilie** et al. (2020) durch Mausmodelle der menschlichen erblichen Taubheit neue Erkenntnisse über die astrozytäre Netzwerk-Topographie der auditorischen Hirnstammkerne gewonnen werden (Eitelmann, **Petersilie** et al., 2020). Die Netzwerke (Synzytien) von Astrozyten werden durch Gap-Junction-Kanäle gebildet, wobei Connexine (Cxs) die kleinste Einheit der Kanäle bilden (Bennett et al., 2003). In der Cochlea, ein Teil des Innenohrs, definieren die Netzwerke deren Physiologie und beeinflussen somit auch das Hörvermögen (Nickel & Forge, 2008; Verkhratsky & Nedergaard, 2018). Die in dieser Studie verwendeten KO-Mäuse tragen jeweils Mutationen in sich, die die erbliche Taubheit verursachen. Um die Netzwerke analysieren zu können habe ich in dieser Studie die Immunoreaktivität von Cx43 und Cx30 in Hirnschnitten im Wildtyp sowie in zwei KO-Mauslinien dokumentiert (siehe Abbildung 1A_a-C_b in Eitelmann, **Petersilie** et al., 2020). Dies habe ich mittels eines Weitfelds- und Konfokalmikroskops durchgeführt. Durch die Expressionsmuster der Cxs gezeigt konnte gezeigt werden, dass teilweise die Größe der Kerne und die Expressionslevel der Cxs im Vergleich zum Wildtyp in den Mutanten verändert sind (Eitelmann, **Petersilie** et al., 2020).

Neben dem Einsatz von transgenen Mäusen zur Erforschung von Krankheiten, können auch *in situ*- bzw. *in vitro*-Modelle genutzt werden, um pathophysiologische Konditionen von Gehirnzellen zu simulieren. Ein Hauptziel dieses Promotionsvorhabens war es, die Auswirkungen eines kurzzeitigen Energiemangels, welcher chemisch induziert wird, auf Gehirnzellen zu untersuchen. Die frühen Prozesse nach einer metabolischen Inhibition, ausgelöst durch den

raschen ATP-Abfall, sind noch weitestgehend unerforscht. Dazu wurde das *in situ*-Modell der ischämischen Penumbra in einem gut charakterisierten Mausmodell, den Akutschnitten des Mausgehirns, angewandt. Die Ergebnisse in den nachfolgenden Abschnitten wurden in parasagittalen Schnitten des somatosensorischen Kortex von Balb/C Mäusen beiden Geschlechts und im Alter von 14-21 postnatalen Tagen erhoben.

3.1 Astrozyten schwellen während transienter chemisch induzierter Ischämie nicht an

Die Bildung von Hirnödemen zählt zu einem der ersten Ereignisse, was während des pathophysiologischen Zustands des ischämischen Schlaganfalls auftritt (Unterberg et al., 2004). Hirnödeme werden durch Wasseransammlungen sowohl in Neuronen als auch in Astrozyten ausgelöst (Klatzo, 1987; Liang et al., 2007).

Studien deuten darauf hin, dass Hirnödeme mitunter durch Volumenveränderungen von Gliazellen ausgelöst werden (Benesova et al., 2009; Kimelberg, 2005; Panickar & Norenberg, 2005; Risher et al., 2009). Speziell Astrozyten reagieren aufgrund der Beteiligung an der Wasserhomöostase und der hohen Wasserpermeabilität schnell mit Volumenveränderungen auf veränderte intra- und extrazelluläre Osmolaritäten (Hirrlinger et al., 2008; MacAulay & Zeuthen, 2010; Risher et al., 2009). Der Ein- oder Ausstrom von Wasser in die Astrozyten ist dabei immer mit dem Ein- bzw. Ausstrom von Chlorid (Cl^-) verbunden (van Putten et al., 2021). Daher rücken Astrozyten bei der Entwicklung von neuen therapeutischen Ansätzen zur Behandlung von Hirnödemen nach einem Schlaganfall immer mehr in den Fokus aktueller Studien.

In einer Kooperation mit dem Institut für Biologische Informationsprozesse (IBI-1) unter der Leitung von Prof. Christoph Fahlke (Forschungszentrum (FZ) Jülich GmbH), konnten neue Erkenntnisse zu Volumenveränderungen von Astrozyten in der ischämischen Penumbra generiert werden (Engels, Kalia, Rahmati, **Petersilie** et al., 2021). Aufgrund des Zusammenhangs von $[\text{Cl}^-]_i$ und der astrozytären Volumenveränderungen, wurde von Dr. Miriam Engels (IBI-1, FZ Jülich GmbH, Jülich) zunächst die $[\text{Cl}^-]_i$ unter physiologischen Konditionen sowie nach einer zehnminütigen Perfusion mit metabolischen Inhibitoren („chemische Ischämie“, s.2.3.3) mittels der Fluoreszenzlebensdauer-Mikroskopie (FLIM) gemessen. Es konnte gezeigt werden, dass in neokortikalen Astrozyten eine zehnminütige chemische Ischämie nur einen leichten Anstieg der $[\text{Cl}^-]_i$ von 14.0 auf 19.3 mM auslöste (Engels, Kalia, Rahmati, **Petersilie** et al., 2021). Um zusätzlich

zu überprüfen, ob die Astrozyten nach einer zehnmütigen chemischen Ischämie schwellen, wurden von mir im nächsten Schritt die Volumenveränderungen analysiert.

Dafür habe ich zusammengefasst parasagittale Akutschnitte des Mausgehirns angefertigt, die Astrozyten mit SR101 gefärbt und die Akutschnitte konstant mit ACSF perfundiert. Die chemische Ischämie wurde durch die Perfusion mit metabolischen Inhibitoren induziert. Die Dokumentation der SR101-gefärbten neokortikalen Astrozyten habe ich mittels einem motorisierten Konfokalmikroskop durchgeführt und Z-Stapel zu drei Zeitpunkten angefertigt. Erstens unter Kontrollbedingungen, zweitens fünf Minuten nach der chemischen Ischämie sowie nach einer zwanzigminütigen Erholungsphase. Für die Auswertung habe ich Maximum-Intensitätsprojektionen der konfokalen Z-Stapel angefertigt und entfaltet (für Details siehe Engels, Kalia, Rahmati, **Petersilie** et al., 2021).

Ich konnte zeigen, dass eine zehnmütige chemische Ischämie im Mittel weder eine signifikante Veränderung des Volumens der Somata, noch der Form und Lage der Ausläufer auslöste. (Abbildung 12A, B). Es ist jedoch zu erwähnen, dass einige Astrozyten mit einem Schwellen, andere mit einem Schrumpfen der Zellsomata reagierten (Abbildung 12B) (Engels, Kalia, Rahmati, **Petersilie** et al., 2021).

Im Gegensatz dazu konnte ich ein reversibles Schwellen der astrozytären Somata sowie eine Veränderung der Lage der primären und sekundären Ausläufer durch eine zehnmütige Perfusion mit einem hypoosmolaren ACSF (Osmolarität: 220 mOsm) auslösen (Abbildung 12C,D) (Engels, Kalia, Rahmati, **Petersilie** et al., 2021).

Zusammenfassend zeigen die Daten dieser Studie, dass Astrozyten während einer kurzzeitigen metabolischen Inhibition, welche chemisch induziert wurde, die $[Cl^-]_i$ kontrollieren und ihr Zellvolumen aufrechterhalten können (Engels, Kalia, Rahmati, **Petersilie** et al., 2021). Basierend darauf, dass Volumenveränderungen einen Wassereinstrom benötigen, welcher auf dem Fluss von elektroneutralen Elektrolyten basiert, ist ein Zellschwellen ohne große Veränderungen von $[Cl^-]_i$ nicht möglich (Hamann et al., 2010; MacAulay et al., 2004; Simard & Nedergaard, 2004). Diese Hypothese kann durch die in dieser Studie aufgezeigten Ergebnisse verifiziert werden.

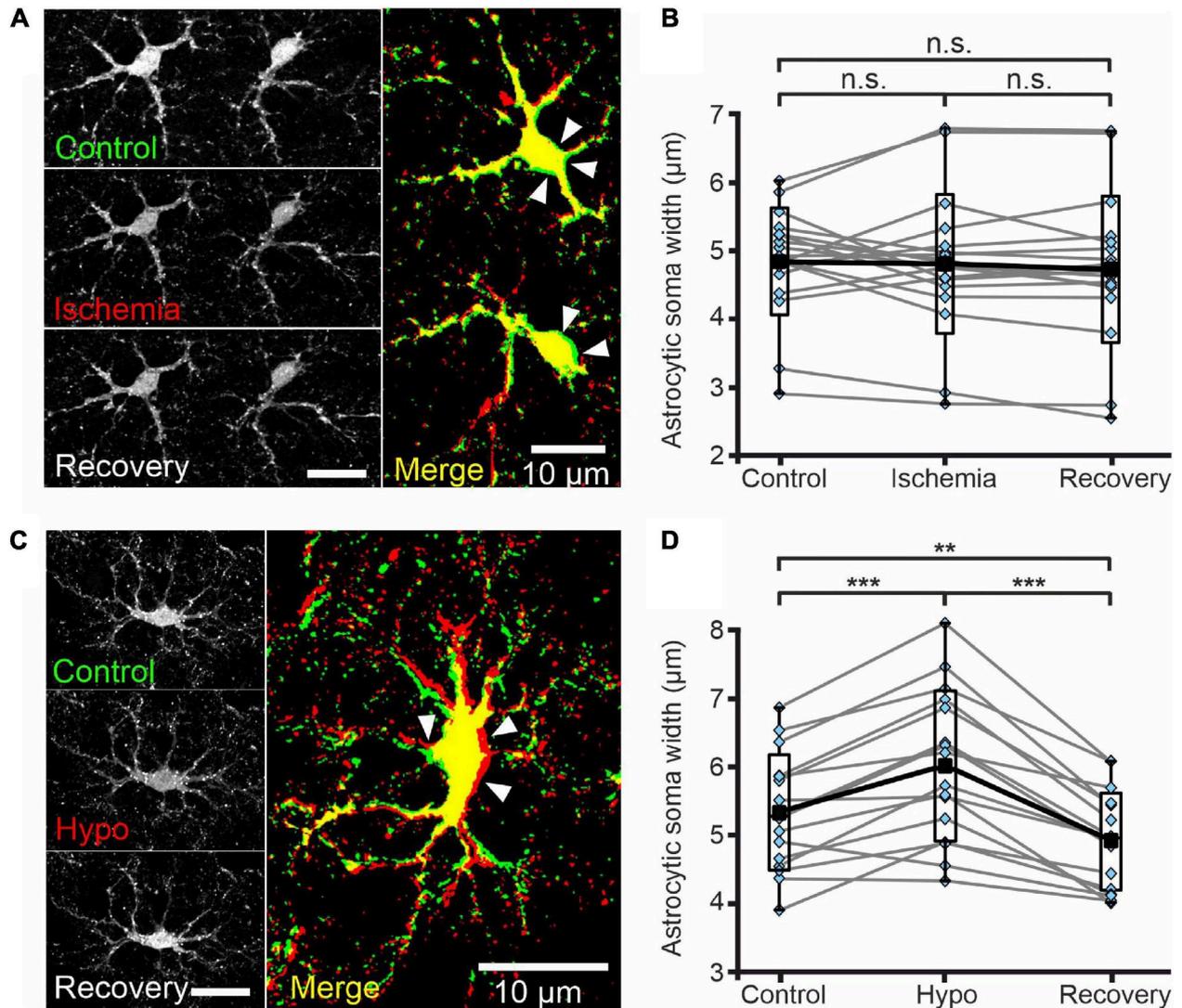


Abbildung 12: Astrozyten schwellen bei transienter chemischer Ischämie nicht an. A SR101-positive Astrozyten in Schicht II/III des Neokortex der Maus unter Kontrollbedingungen („control“), fünf Minuten nach einer zehnminütigen chemischen Ischämie („ischemia“) und nach einer zwanzigminütigen Erholungsphase („recovery“). Pfeile markieren die leicht geschrumpften Somata nach der chemischen Ischämie. Das überlagerte Bild („merge“) zeigt die gleiche Zelle unter Kontrollbedingungen (in grün) und unter ischämischen Bedingungen (in rot). **B** Boxplots zeigen die astrozytären Somatadurchmesser (in µm) zu den drei in A gezeigten Zeitpunkten. **C** SR101-positive Astrozyten in der neokortikalen Schicht II/III des Neokortexes der Maus unter Kontrollbedingungen („control“), fünf Minuten nach einer zehnminütigen Perfusion mit einer hypoosmotischem ACSF („hypo“) und nach einer zwanzigminütigen Erholungsphase („recovery“). Pfeile markieren die geschwollenen Somata. Das überlagerte Bild („merge“) zeigt die gleiche Zelle unter Kontrollbedingungen (in grün) und unter hypoosmotischen Bedingungen (in rot). **D** Boxplots zeigen die astrozytären Somatadurchmesser (in µm) zu den drei in C gezeigten Zeitpunkten. **B, D** Boxplots zeigen die Mittelwerte (schwarze Quadrate), Mediane (schwarze Linien), Minimal- und Maximaldatenpunkte (Whisker), die Standardabweichung (Box) und die einzelnen Datenpunkte (blaue Diamanten). Abk.: n.s. = nicht signifikant; $p \geq 0.05$; $**p \leq 0.01$; $***p \leq 0.001$, einfache ANOVA mit Bonferroni Post-hoc-Test. Verwendet unter den Bedingungen der Creative-Commons-Lizenz ([CC BY 4.0 DEED](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)): Engels, M., Kalia, M., Rahmati, S., Petersilie, L., Kovermann, P., van Putten, M. J. A. M., Rose, C. R., Meijer, H. G. E., Gensch, T., & Fahlke, C. (2021). Glial Chloride Homeostasis Under Transient Ischemic Stress. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 15, 735300. doi:[10.3389/fncel.2021.735300](https://doi.org/10.3389/fncel.2021.735300).

3.2 Intrazellulärer Kalziumanstieg in Astrozyten während transienter chemisch induzierter Ischämie

Das initiale Schwellen von Astrozyten sowie die astrozytären Veränderungen der $[Cl^-]_i$ zählen zu den ersten Ereignissen, die bei einem ischämischen Schlaganfall durch die sich vom Kern ausbreitenden SDs ausgelöst werden (Engels, Kalia, Rahmati, **Petersilie** et al., 2021). Des Weiteren lösen die SDs auch einen Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$ und eine Ansäuerung in Astrozyten aus (Gerkau et al., 2018; Pietrobon & Moskowitz, 2014; Rakers & Petzold, 2017). Momentan ist ungeklärt, welchen Einfluss die SDs auf die Gap-Junction-Verbindungen von Astrozyten haben, deren Leitfähigkeit sensitiv auf intrazelluläre pH- und Ca^{2+} -Veränderungen reagieren (Giaume et al., 1997).

In der Studie Eitelmann, Everaerts, **Petersilie** et al. (2023) konnte ich durch das Weitfeld-Kalzium-Imaging Mechanismen adressieren, welche die Veränderungen der Gap-Junction-Kanäle auslösen könnten. Um Fluoreszenzänderungen in $[Ca^{2+}]_i$ konvertieren zu können, habe ich zunächst wie zuvor beschrieben (Ziemens et al., 2019) eine *in situ*-Kalibrierung mit OGB-1 AM durchgeführt (Ziemens et al., 2019). Die Auswirkungen der zweiminütigen chemischen Ischämie auf die $[Ca^{2+}]_i$ wurden schließlich in neokortikalen Astrozyten analysiert. Dafür habe ich parasagittale Akutschnitte des Mausgehirns angefertigt, die Astrozyten mit SR101 gefärbt, mit OGB-1 AM beladen und die Akutschnitte konstant mit ACSF perfundiert. Die chemische Ischämie wurde durch die Perfusion mit metabolischen Inhibitoren induziert. Wie bereits zuvor gezeigt, konnte ich einen Anstieg von $[Ca^{2+}]_i$ verzeichnen (Gerkau, Rakers, Durry, Petzold, & Rose, 2018; Pietrobon & Moskowitz, 2014; Rakers & Petzold, 2017). Durch die Cluster-Analyse, welche Dr. Sara Eitelmann (Institut für Neurobiologie (INB), Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf (HHU), Düsseldorf) auf meine ausgewerteten Daten anwandte, konnten zwei Cluster von Astrozyten identifiziert werden. Eine Gruppe reagierte mit einem moderaten (~ 60 nM) und eine mit einem fünffach höheren Anstieg (~ 320 nM) von $[Ca^{2+}]_i$ (Abbildung 13A_{1,2}, A₆, B). Durch das Entfernen von $[Ca^{2+}]_e$ konnte der Ca^{2+} -Einstrom reduziert und nur noch ein vergleichbarer Anstieg (~ 50 nM) wie in Cluster 1 detektiert werden (Abbildung 13A₃, A₆, B). Eine stärkere Reduktion auf ~ 31 nM konnte durch die Zugabe des NCX-Blockers KB-R7943, des NMDA-Rezeptor-Blockers APV und des TRPV4-Kanal-Blockers HC-067047 erzeugt werden (Abbildung 13A₄, A₆, B) (Eitelmann, Everaerts, **Petersilie** et al., 2023). Dr. Jonathan Stephan (INB, HHU, Düsseldorf) hat zusätzlich Experimente mit Trifluoperazin, einem Inhibitor für das kalziumbindende Protein und Gap-Junction Modulator

Calmodulin (Zou et al., 2014), durchgeführt. Damit konnte die Kalziumbeladung auf ein Cluster von ~ 46 nM reduziert werden (Abbildung 13A₅, A₆, B) (Eitelmann, Everaerts, **Petersilie** et al., 2023).

Dass eine Reduktion von $[Ca^{2+}]_i$ einen schützenden Effekt während der SDs hat, konnte bereits von Rakers und Kollegen gezeigt werden (Rakers & Petzold, 2017). Weitere Studien konnten zeigen, dass sich die Gap-Junction-Verbindungen von Astrozyten in Reaktion auf eine erhöhte $[Ca^{2+}]_i$ schließen und die Zellen so elektrisch und metabolisch voneinander entkoppeln (Cotrina et al., 1998; Zou et al., 2014). Dies konnte ebenfalls in dieser Studie belegt werden, in dem der Zusammenhang zwischen $[Ca^{2+}]_i$ und dem Entkoppeln von Astrozyten verifiziert und gezeigt werden konnte, dass die Konzentration und dementsprechend die Entkopplung der Astrozyten durch Manipulationen des ACSF, reduziert werden konnte (Eitelmann, Everaerts, **Petersilie** et al., 2023). Die Schlussfolgerung, dass die Entkopplung einen protektiven Effekt hat oder dass sie zum Propagieren der SDs beitragen, wird kontrovers diskutiert. So zeigten einige Studien, dass durch das Entkoppeln die gesunden Zellen von den beschädigten Zellen isoliert und so geschützt werden (Nakase et al., 2003; Peracchia, 2004). Andere zeigten, dass Zellschäden durch bereits betroffene Zellen vergrößert werden (Lin et al., 1998).

Aufgrund der Ergebnisse dieser Studie schlagen wir vor, dass die Astrozyten während einer kurzzeitigen metabolischen Inhibition entkoppeln und somit die Ausbreitung der Zellschäden in der ischämischen Penumbra reduziert werden kann (Eitelmann, Everaerts, **Petersilie** et al., 2023). Demnach können die astrozytären Kalziumwege als mögliche therapeutische Ansätze in der Schlaganfalltherapie genutzt werden. Dies konnten auch bereits z.B. Rakers und Kollegen aufzeigen (Rakers & Petzold, 2017).

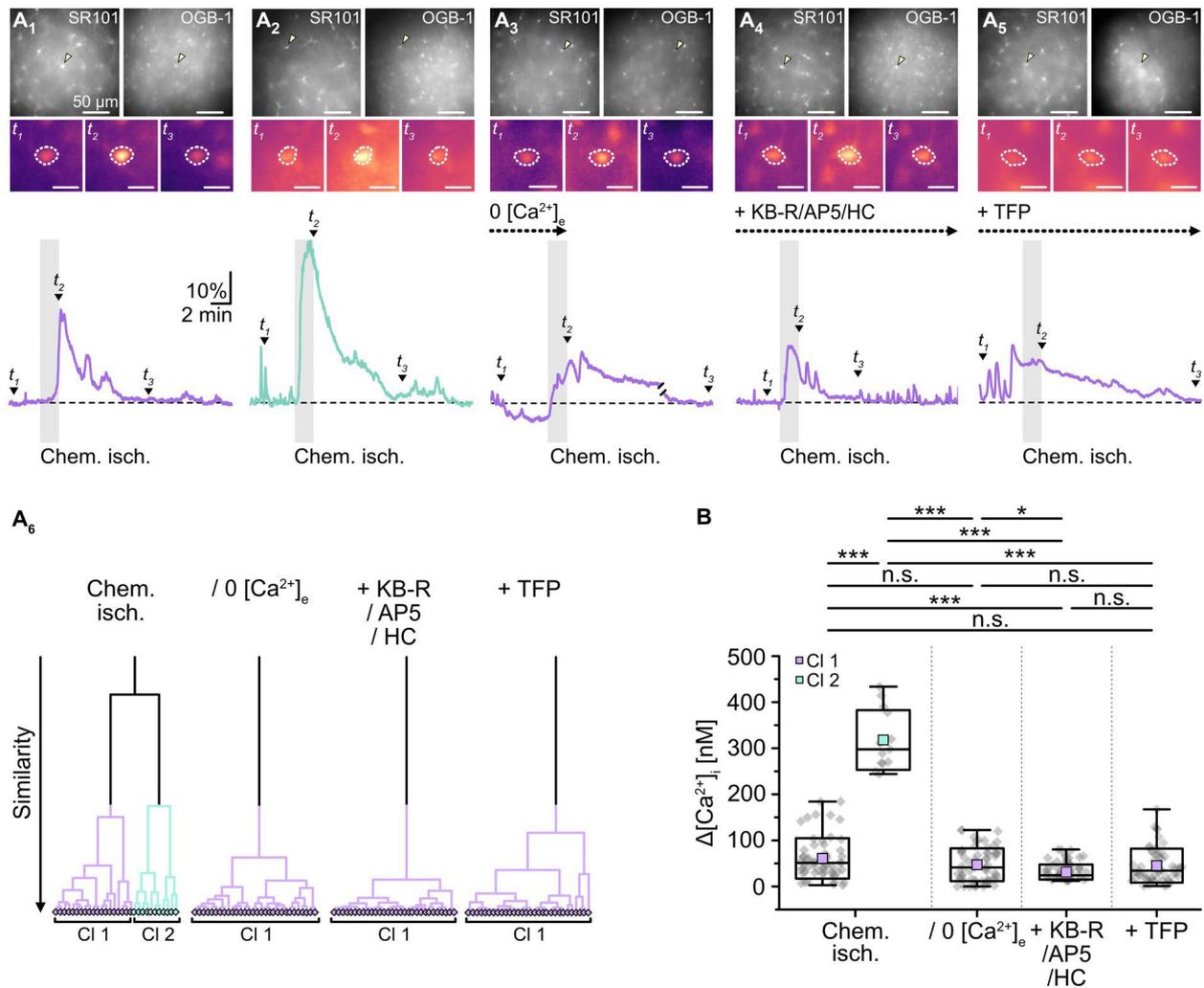


Abbildung 13: Einfluss der chemisch induzierten Ischämie auf [Ca²⁺]_i. A₁-A₅ Gezeigt sind die SR101-gefärbten und mit OGB-1 AM beladenen Astrozyten sowie drei Zeitpunkte unter Kontrollbedingungen („t₁“), kurz nach einer zweiminütigen chemischen Ischämie („t₂“) und nach einer Erholungsphase („t₃“). ROIs markieren die ausgewählten Zellen, dessen Beispielspuren visualisiert wurden Gezeigt sind vier verschiedene Konditionen. A₆ Cluster-Analyse der vier gezeigten Konditionen. B Boxplots zeigen die Mittelwerte (bunte Quadrate), Mediane (schwarze Linien), Minimal- und Maximaldatenpunkte (Whisker), die Standardabweichung (Box) und einzelnen Datenpunkte (graue Diamanten). Abk.: ROI = Bereich von Interesse (Engl.: *region of interest*); n.s. = nicht signifikant; *p<0.005; ***p<0.001. Verwendet unter den Bedingungen der Creative-Commons-Lizenz (CC BY 4.0 DEED): Eitelmann, S., Everaerts, K., Petersilie, L., Rose, C. R., & Stephan, J. (2023). Ca²⁺-dependent rapid uncoupling of astrocytes upon brief metabolic stress. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 17, 1151608. doi:10.3389/fncel.2023.1151608.

Zusammenfassend konnten in den zwei Studien erfolgreich Pfade untersucht werden, die nach einem kurzzeitigen Energiemangel beim Zellschwellen von Astrozyten bzw. bei der Kalziumbeladung in Astrozyten im Mausgehirn mitwirken. Die Ergebnisse der Studien könnten in Zukunft dazu beitragen potentielle therapeutische Ziele zu identifizieren, die die Zellschäden in der ischämischen Penumbra reduzieren.

4 Funktionelle Charakterisierung von neuronalen Netzwerken in humanen 3D-Zellkulturen

Ein weiteres Ziel dieses Promotionsvorhabens war es, zur Etablierung und Charakterisierung von 3D humanen Modellsystemen beizutragen. Diese sollen die Translation der Ergebnisse aus murinen Studien auf den Menschen verbessern und eine Alternativmethode zu Tierversuchen bilden. Dazu habe ich in mehreren Modellsystemen mittels verschiedener Techniken morphologische und physiologische Charakterisierungen von hiPS-basierten Gehirnzellen durchgeführt. Humane 3D-Zellkulturen ermöglichen es, die Zytoarchitektur von Geweben zu erhalten und Zell-Zellinteraktionen zu studieren (Dingle et al., 2015; Distler et al., 2021). Dazu wurde eine Kooperation mit der Arbeitsgruppe (AG) „Entwicklung von Alternativmethoden zur umwelttoxikologischen Testung“ unter der Leitung von Prof. Ellen Fritsche (IUF, Leibniz-Institut für umweltmedizinische Forschung gGmbH) eingegangen, welche intensiv an Alternativmethoden zu Tierversuchen forscht. In der Studie Kapr, **Petersilie** et al. (2021) konnten neue Erkenntnisse über die Verwendung von Biomaterialien in Bezug auf die Differenzierung von humanen hiPS-basierten Vorläuferzellen (hiNPCs, Engl.: *hiPSC-derived neural progenitor cells*) gemacht werden. Der Fokus dieser Studie wurde auf den Einsatz von Hydrogelmischungen gelegt, um ein humanes 3D-Zellkulturmodell zu etablieren (Kapr, **Petersilie** et al., 2021). Als Alternative zu Monoschichten von Neurosphären, welches Zellaggregate aus hiNPCs sind, kann durch den Einsatz von Hydrogelen eine EZM erzeugt werden, wodurch die Struktur der Neurosphären im Netzwerk erhalten bleibt (Zhuang et al., 2018).

Dafür wurden in dieser Studie zwei verschiedene Alginate/Gellan-Gummi/Laminin (ALG/GG/LAM)-Hydrogelmischungen verwendet. ALG und GG sind jeweils natürlich vorkommende Polysaccharide, wobei ALG aus Braunalgen (*Phaeophyceae*) extrahiert wird (K. Y. Lee & Mooney, 2012) und GG aus einem Bakterium namens *Sphingomonas elodea* produziert wird (Bajaj et al., 2007). Durch ein so genanntes „Cross-linking“, der Zugabe von Ca^{2+} -Ionen, können Polysaccharide in Gele konvertiert werden (Smith et al., 2007). Diese Gele haben eine geringe Dichte, ermöglichen somit den Sauerstoffaustausch und weisen eine ähnliche Elastizität wie das Gehirn auf (Lovett et al., 2020). LAM unterstützt das Zellwachstum und die Entstehung von Netzwerken (Wen et al., 2019). Neben dem Austesten verschiedener Hydrogelkompositionen (1.5% ALG/0.5% GG/0.01% LAM und 0.3% ALG/0.8% GG/0.01% LAM) wurden auch verschiedene Differenzierungsstrategien für hiNPCs ausgetestet. Dabei wurde der Vergleich

zwischen hiNPCs gemacht die entweder direkt eingebettet und für 21 Tage kultiviert wurden oder nach einer einwöchigen 3D neuronalen Vordifferenzierung für eine weitere Woche eingebettet wurden. Um die Funktionalität der eingebetteten hiNPC-basierten Netzwerke zu untersuchen, habe ich in dieser Studie das Weitfeld-Kalzium-Imaging angewendet (Kapr, **Petersilie** et al., 2021). Die physiologische Aktivität der Zellen in Form von Ca^{2+} -Signalen kann somit detektiert werden.

Nach unserem Wissen bin ich die Erste, die das Kalzium-Imaging in Schnitten von 3D-kultivierten neuronalen Zellverbänden etabliert hat. Dafür habe ich von Julia Kapr (IUF – Leibniz-Institut für umweltmedizinische Forschung gGmbH) die Hydrogele samt eingebetteter hiNPCs erhalten. Diese habe ich mit einem Vibratom geschnitten und die Zellen mit Fura-2 AM beladen (Abbildung 14A, B). Die Kondition der vordifferenzierten hiNPCs in der 0.3% ALG/0.8% GG/0.01% LAM Mischung konnte nicht geschnitten werden, da die Gele zu weich waren und somit konnte kein Kalzium-Imaging durchgeführt werden. Meine Auswertung zeigt, dass in allen anderen drei Konditionen spontane Ca^{2+} -Signale detektiert werden konnten, wobei die in 1.5% ALG/0.5% GG/0.01% LAM vordifferenzierten hiNPCs mit 74% spontanaktiven Zellen und einer Frequenz von 3,2 Signalen pro Minute die stärkste Aktivität aufzeigten (Abbildung 14C, D, E). Ein möglicher Ansatz, um auch mehr Aktivität in nicht vordifferenzierten Zellen zu detektieren wäre, die Kultivierungszeit zu erhöhen. Die heterogenen Signale innerhalb der Hydrogele lässt sich vermutlich darauf zurückzuführen, dass die Signale von verschiedenen Zelltypen detektiert wurden. Die Präsenz von neuronalen Subtypen (dopaminerge Neurone) und Astrozyten konnte in dieser Studie durch immunohistochemische Färbungen identifiziert werden (Kapr, **Petersilie** et al., 2021).

Zusammenfassend konnte durch meine Ergebnisse in dieser Studie gezeigt werden, dass sich drei der vier getesteten Hydrogelkompositionen als EZM für die Etablierung von 3D-Zellkulturen eignen, welche lebende, aktive Zellnetzwerke ausbilden. Diese Alternativmethode zu Tiermodellen kann in Zukunft weiterentwickelt werden und somit die Grundlage für z.B. Neurotoxizitätsstudien bilden (Kapr, **Petersilie** et al., 2021). Durch die kurze Generierungs- und Kultivierungszeit eignen sich die hier vorgestellten Modelle für Hochdurchsatztestungen. Eine Limitation der Hydrogele ist jedoch unter anderem, dass Hydrogele nicht für eine Langzeitkultivierung von Zellen geeignet sind, da sie relativ schnell degradieren. Des Weiteren ist die Sauerstoff- und Nährstoffzufuhr in den Gelen vermindert, je dichter die Zellbesiedlung ist (Lovett et al., 2020).

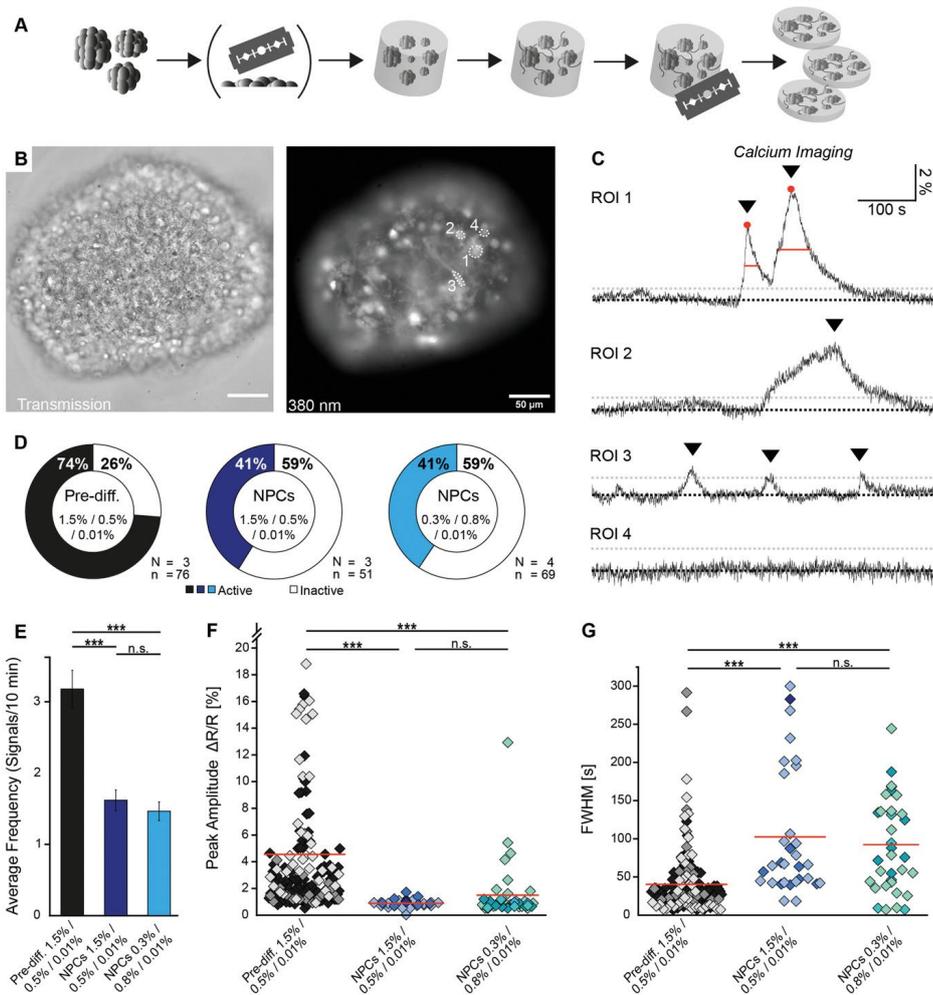


Abbildung 14: hiNPCs-basierte neurale Netzwerke in 1.5% ALG/0.5% GG/0.01% LAM und 0.3% ALG/0.8% GG/0.01% LAM Hydrogelen. **A** hiNPCs wurden auf eine Größe 0.1 mm geschnitten und anschließend in die jeweiligen Hydrogelmischungen eingebettet. hiNPCs wurden für 21 Tage innerhalb der Gele differenziert, dann 250 μm-dicke Schnitte angefertigt und das Kalzium-Imaging durchgeführt. 0.3 mm große vordifferenzierte Sphären wurden nicht geschnitten, sondern für eine Woche in Abwesenheit von Wachstumsfaktoren vordifferenziert. Anschließend wurden sie in die jeweiligen Hydrogelmischungen eingebettet und für eine weitere Woche differenziert. **B** Transmissions- und Weitfeldaufnahme, die die Fura2-Fluoreszenz (Anregung bei 380 nm) in einem vordifferenzierten neuronalen Netzwerk in einem 1.5% ALG/0.5% GG Hydrogel zeigt. ROIs 1-4 wurden in C analysiert. **C** ROIs zeigen die spontanen Ca²⁺-Signale während einer zehninütigen Messung. Eingezeichnet sind die Basislinien (gepunktete schwarze Linien), die 5x Standardabweichung der Basislinie (gepunktete graue Linie), die Maximalamplituden ΔR/R (in %, rote Punkte) und die FWHM (in s, rote Linien) in zwei exemplarischen Spuren. **D** Kreisdiagramme zeigen das Verhältnis von aktiven zu inaktiven ROIs in allen analysierten Proben von vordifferenzierten Sphären, welche in 1.5% ALG/0.5% GG/0.01% LAM Gelen differenziert wurden (schwarz, links), von nicht vordifferenzierten hiNPCs, welche in 1.5% ALG/0.5% GG/0.01% LAM Gelen (dunkelblau, Mitte) differenziert wurden und von nicht differenzierten hiNPCs, welche in 0.3% ALG/0.8% GG/0.01% LAM Gelen (hellblau, rechts) differenziert wurden. Diagramme zeigen die Durchschnittsfrequenz („average frequency“; Durchschnittswerte ± Standardfehler) der Ca²⁺-Signale innerhalb von 10 Minuten (**E**), die Auswertung der Maximalamplituden von einzelnen Ca²⁺-Signalen (in %, „Peak Amplitude“ ΔR/R,) (**F**) und die Auswertung der Halbwertsbreite von einzelnen Ca²⁺-Signalen (in s, „FWHM“) (**G**). **F, G** Jede Farbe repräsentiert einzelne Ns. Aus Illustrationszwecken wurden sieben Datenpunkte der vordifferenzierten hiNPCs in 1.5% ALG/0.5% GG Hydrogelen, die Maximalamplituden von über 20% überschritten haben, nicht gezeigt. Abk.: ROI = Bereich von Interesse (Engl.: *region of interest*); FWHM = Halbwertsbreite (Engl.: *full duration at half maximum*); ALG = Alginate; GG = Gellangummi; LAM = Laminin; N = Anzahl der Gele; n = Anzahl der Zellen; *p < 0.05; **p < 0.01; ***p < 0.001. Verwendet unter den Bedingungen der Creative-Commons-Lizenz ([CC BY-NC 4.0 DEED](https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/)): Kapr, J., Petersilie, L., Distler, T., Lauria, I., Bendt, F., Sauter, C. M., Boccaccini, A. R., Rose, C. R., & Fritsche, E. (2021). Human Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Neural Progenitor Cells Produce Distinct Neural 3D In Vitro Models Depending on Alginate/Gellan Gum/Laminin Hydrogel Blend Properties. *Advanced Healthcare Materials*, 10(16), e2100131. doi:[10.1002/adhm.202100131](https://doi.org/10.1002/adhm.202100131).

5 Morphologische Charakterisierung von Gehirnzellen in humanen kortikalen 3D-Gehirnorganoiden

5.1 Kortikale Gehirnorganoiden weisen Astrozyten und Neurone sowie neurale Vorläufer und gesunde Mitochondrien auf

In der in Kapitel 4 aufgeführten Studie konnte erfolgreich gezeigt werden, dass Biomaterialien zur Bildung von 3D-Zellnetzwerken eingesetzt werden können. Die Zellen zeigten spontane Kalziumaktivität und wiesen neuronale und gliale Zelltypen auf (Kapr, **Petersilie** et al., 2021).

Im weiteren Verlauf dieses Promotionsvorhabens habe ich mich auf die Etablierung und Charakterisierung eines weiteren 3D humanen Modellsystems, die 3D-Gehirnorganoiden, fokussiert. In einer Kooperation mit der AG Prigione (Klinik für Allgemeine Pädiatrie, Neonatologie und Kinderkardiologie, UK Düsseldorf) wurde ein Gehirnorganoidprotokoll charakterisiert (Le, **Petersilie** et al., 2021), welches eine modifizierte Version des Protokolls von Velasco und Kollegen ist (Velasco et al., 2019) und robuste, runde kortikale Organoiden generiert (Abbildung 15). Der Vorteil dieses Protokolls ist, dass kein Einbetten der Organoiden in eine EZM notwendig ist und die Organoiden als Alternative zu Bioreaktoren, in Wellplatten auf Schüttelplatten kultiviert werden können (Le, **Petersilie** et al., 2021)

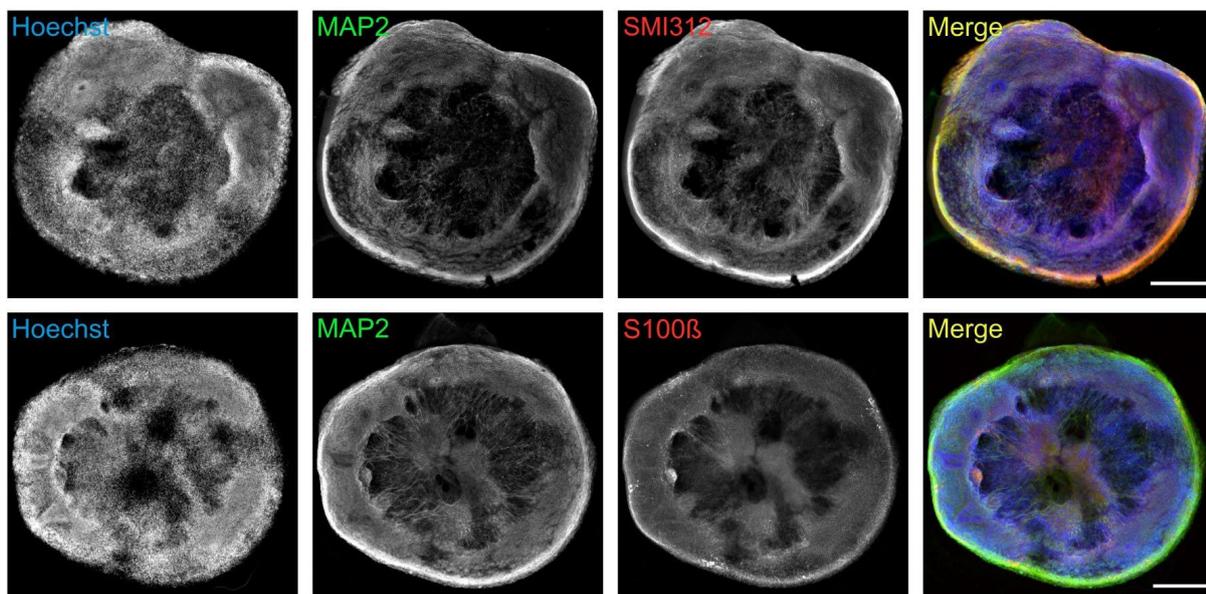


Abbildung 15: Gesamtstruktur von kortikalen Gehirnorganoiden. Repräsentative zusammengefügte Weitfeld-aufnahmen zeigen das Verhältnis zwischen Dendriten (MAP2-positive Strukturen) und Axonen (SMI312-positive Strukturen) sowie zwischen Dendriten und vermeintlichen Astrozyten (S100β-positive Strukturen) in 78-Tage- alten Gehirnorganoiden. Hoechst-Färbungen identifizieren die Zellkerne. Die überlagerten Bilder („merge“) zeigen alle drei Kanäle. Maßstabsbalken: 500 μ m. Abk.: MAP2 = Mikrotubuli-assoziiertes Protein 2; S100 β = S100 Kalzium-bindendes Protein B. Verwendet mit Genehmigung und modifiziert: Le, S., **Petersilie**, L., Inak, G., Menacho-Pando, C., Kafitz, K. W., Rybak-Wolf, A., Rajewsky, N., Rose, C. R., & Prigione, A. (2021). Generation of Human Brain Organoids for Mitochondrial Disease Modeling. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*(172), e62756. doi:[10.3791/62756](https://doi.org/10.3791/62756).

Zunächst wurde die zelluläre Organisation der kortikalen Organoiden mittels immunohistochemischer Färbungen untersucht. Dafür wurden von Stephanie Le (Klinik für Allgemeine Pädiatrie, Neonatologie und Kinderkardiologie, UK Düsseldorf) Organoiden generiert sowie die immunohistochemischen Färbungen durchgeführt. Die Vorbereitungen für die Färbungen, was die Fixierung, das Einbetten, die Schnittgenerierung und den Transfer auf Objektträger umfasst, wurden von mir durchgeführt. Die anschließende Dokumentation wurde ebenfalls von mir übernommen, wofür ich sowohl ein Weitfeld- als auch ein Konfokalmikroskop verwendet habe (Abbildung 15, 16).

Es konnte gezeigt werden, dass 78-Tage-alte Gehirnorganoiden, welche mit dem zuvor charakterisierten Protokoll generiert wurden, reife Neurone enthalten. Diese wurden durch die Markierungen von Axonen (SMI312), Dendriten (Mikrotubuli-assoziiertes Protein 2, MAP2) und neuronalen Mikrotubulielementen (Beta-III Tubulin, TUJ1) identifiziert (Abbildung 15, 16A, B, C) (Le, **Petersilie** et al., 2021). Zusätzlich konnten S100 Kalzium-bindendes Protein B (S100 β)-positive Strukturen identifiziert werden (Abbildung 15, 16A), welche charakteristisch für Astrozyten sind (Hagiwara & Sueoka, 1995). Die neuronalen Vorläufer in den kortikalen Organoiden konnten durch Geschlechtsbestimmende Region Y-Box 2 (SOX2)-positive Strukturen identifiziert werden, welche in Ventrikel-ähnlichen Strukturen angeordnet waren (Abbildung 16B) (Le, **Petersilie** et al., 2021; **Petersilie** et al., in Revision). Diese Erkenntnisse stimmen auch mit anderen Studien überein, die ebenfalls zeigen konnten, dass Organoiden proliferierende neuronale Vorläufer besitzen (Lancaster et al., 2013; Mariani et al., 2015), welche in den Ventrikel-ähnlichen Strukturen angeordnet sind (Camp et al., 2015; Mariani et al., 2015; Velasco et al., 2019). Zuletzt konnte die gesunde Mitochondrienmorphologie der Zellen, durch das Färbemuster des Mitochondrien-markers TOM20 verifiziert werden (Abbildung 16C) (Le, **Petersilie** et al., 2021).

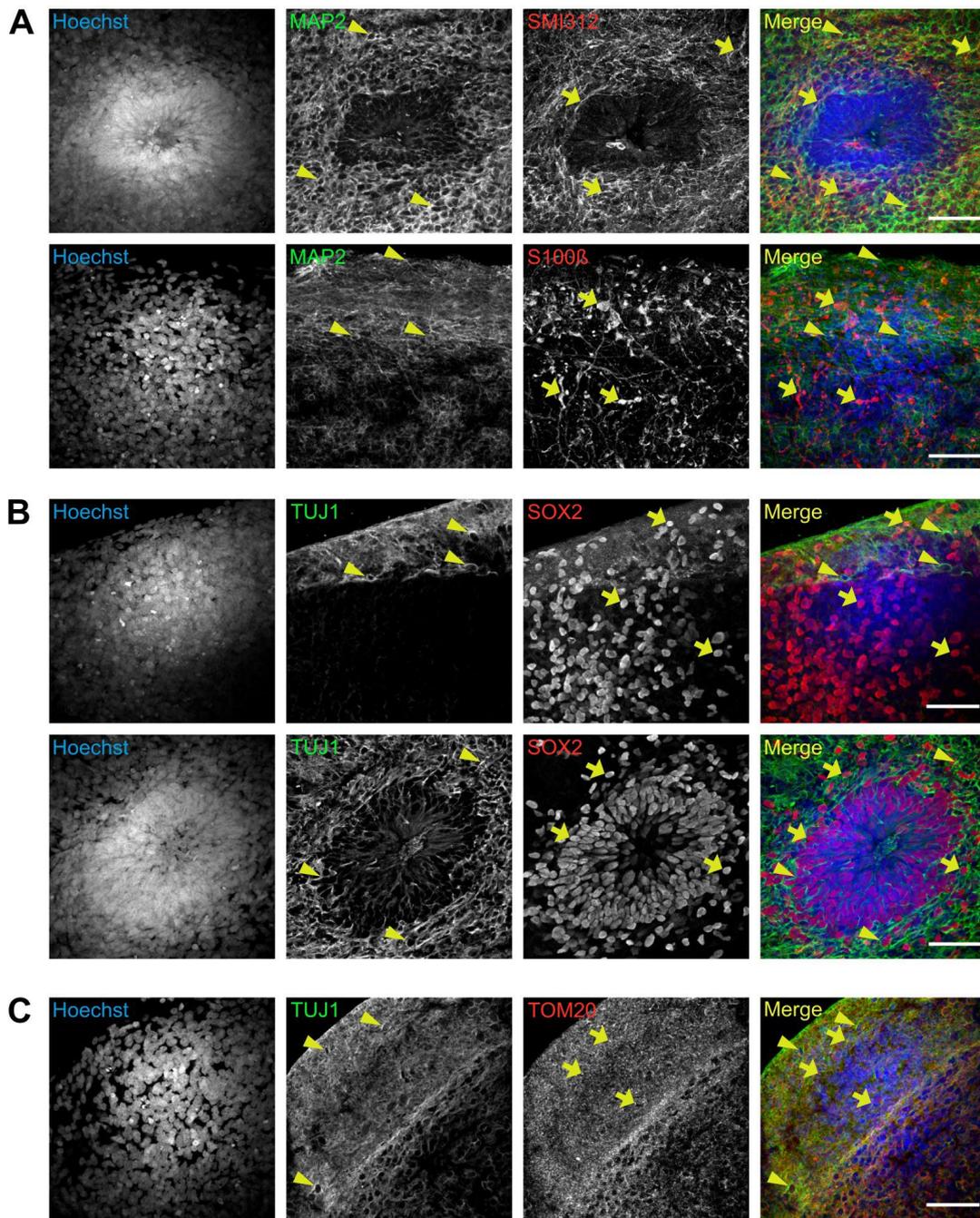


Abbildung 16: Zelluläre Organisation von kortikalen Gehirnorganoiden. **A** Repräsentative konfokale Maximumintensitätsprojektionen zeigen im Detail das Verhältnis zwischen Dendriten (MAP2-positive Strukturen, Dreiecke) und Axonen (SMI312-positive Strukturen, Pfeile) sowie zwischen Dendriten und vermeintlichen Astrozyten (S100 β -positive Strukturen) in 78-Tage-alten Gehirnorganoiden. **B** Repräsentative konfokale Maximumintensitätsprojektionen zeigen die Anordnung von Neuronen (TUJ1-positive Strukturen, Dreiecke) sowie von neuronalen Vorläuferzellen (SOX2-positive Strukturen, Pfeile). **C** Repräsentative konfokale Maximumintensitätsprojektionen zeigen die Anordnung von Neuronen (TUJ1-positive Strukturen, Dreiecke) sowie von Mitochondrien (TOM20-positive Strukturen, Pfeile). **A, B, C** Hoechst-Färbungen identifizieren die Zellkerne. Die überlagerten Bilder („merge“) zeigen jeweils alle drei Kanäle. Maßstabsbalken: 50 μ m. Abk.: MAP2 = Mikrotubuli-assoziiertes Protein 2; S100 β = S100 Kalzium-bindendes Protein B. TUJ1 = Beta-III Tubulin; SOX2 = Geschlechtsbestimmende Region Y-Box 2 (Engl.: *sex determining region Y (SRY)-box2*); TOM20 = Translokase der äußeren Mitochondrienmembran 20 kDA Untereinheit (Engl.: *translocase of outer mitochondrial membrane 20*). Verwendet mit Genehmigung und modifiziert: Le, S., Petersilie, L., Inak, G., Menacho-Pando, C., Kafitz, K. W., Rybak-Wolf, A., Rajewsky, N., Rose, C. R., & Prigione, A. (2021). Generation of Human Brain Organoids for Mitochondrial Disease Modeling. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*(172), e62756. doi:[10.3791/62756](https://doi.org/10.3791/62756).

In der Studie **Petersilie** et al. (in Revision) wurden die Organoide weiter charakterisiert. Dabei konnte Dr. Ruchika Anand (Institut für Biochemie und Molekularbiologie I, UK Düsseldorf) durch den Einsatz von Elektronenmikroskopie (EM) die längliche Morphologie von Mitochondrien mit lamellenartigen Cristae visualisieren und somit die Präsenz von gesunden Mitochondrien bestätigen (**Petersilie** et al., in Revision). Diese morphologischen Eigenschaften sind charakteristisch für reife Mitochondrien (Duong et al., 2021). Sonja Heiduschka (Klinik für Allgemeine Pädiatrie, Neonatologie und Kinderkardiologie, UK Düsseldorf) hat in dieser Studie immunohistochemische Färbungen der kortikalen Organoide durchgeführt und die zelluläre Organisation dokumentiert.

Dabei konnte das Vorhandensein der neuralen Vorläufer durch PAX6-positive Strukturen in Ventrikel-Formation verifiziert werden (**Petersilie** et al., in Revision). Da die Organisation von Vorläuferzonen in ventrikulären Strukturen ein spezifisches Merkmal für die menschliche Hirnentwicklung ist (Hansen et al., 2010; Zecevic et al., 2005), kann mit diesem Ergebnis bestätigt werden, dass dieses Protokoll Gehirnanorganoide generiert, welche diese Strukturen rekapitulieren (Le, **Petersilie** et al., 2021; **Petersilie** et al., in Revision). Das Vorhandensein von vermeintlichen Astrozyten konnte mit dem Marker GFAP und die Formation der kortikalen Platte mit dem Marker CTIP2 verifiziert werden, welche Neurone der tief gelegenen Schichten markiert (Giandomenico et al., 2019; Szebenyi et al., 2021). Zuletzt wurde die Präsenz von chemischen Synapsen und Synapsen-haltiger Neurone durch die Visualisierung von prä- (SYN1 & VGLUT1) und postsynaptischen (HOMER1 & PSD95) Marken verifiziert (Quadrato et al., 2017; Yakoub & Sadek, 2019).

Zusammenfassend wird in den zwei Studien ein verbessertes Protokoll zur Generierung von humanen kortikalen Gehirnanorganoiden vorgestellt, welche wichtige Merkmale der humanen Neuroentwicklung rekapitulieren, diverse Zelltypen enthalten und gesunde Mitochondrien aufweisen (Le, **Petersilie** et al., 2021; **Petersilie** et al., in Revision). Auch hier gilt, dass dies eine Alternativmethode zu Tiermodellen darstellt und dass das Protokoll auch für Gehirnanorganoide von Patienten-abgeleiteten hiPSs angewendet werden kann, um Krankheiten zu erforschen.

6 Morphologische und funktionelle Charakterisierung von Gehirnzellen in humanen kortikalen Gehirnorganoidschnitten

6.1 Generierung von kortikalen Gehirnorganoidschnitten

Je nach experimenteller Fragestellung ist ein gewisser Reifegrad der Zellen notwendig, welches mit einer Langzeitkultivierung der Gehirnorganoiden einhergeht. Dies ist auch für das weitere Hauptziel dieses Promotionsvorhabens zutreffend, welches war, ein humanes Modell zu etablieren mit dem ebenfalls die frühen Ereignisse nach einer metabolischen Inhibition studiert werden sollten. Die größte Limitation der Gehirnorganoiden ist jedoch, dass sich mit zunehmender Größe der 3D-Strukturen ein nekrotischer Kern bildet (Lancaster & Knoblich, 2014; Qian et al., 2019), wodurch die weitere Differenzierung und Reifung der Gehirnzellen begrenzt ist. Um dies zu umgehen, wurden kürzlich ALI-COs, basierend auf zerebralen Gehirnorganoiden, eingeführt (Giandomenico et al., 2019; Giandomenico et al., 2021). Zerebrale Organoiden enthalten überwiegend Zellen des gesamten Großhirns und bauen den morphogenetischen Gradienten selber auf. Dieser ist entscheidend für die neuroektodermale Identität und führt dementsprechend bei der Generierung der Organoiden zu sehr heterogenen Kulturansätzen, wodurch die Reproduzierbarkeit von Ergebnissen sowie die Identifikation von möglichen Phänotypen in Krankheitsmodellen erschwert ist (Del Dosso et al., 2020). Für das Austesten der pharmakologischen Substanzen z.B. zur Behandlung der ischämischen Penumbra ist die Reproduzierbarkeit von Ergebnissen essentiell. Aus diesem Grund habe ich das Prinzip der ALI-COs für regionalisierte, kortikale Gehirnorganoiden angewandt. Diese bilden ein homogenes und robustes Grundgerüst (Le, **Petersilie** et al., 2021; Velasco et al., 2019), um kultivierte Schnitte anzufertigen (Petersilie et al., 2023). Dafür wurden die in der Kooperation mit der AG Prigione generierten kortikalen Gehirnorganoiden als Grundlage verwendet und mir die Organoiden von Stephanie Le und Sonja Heiduschka (beide Klinik für Allgemeine Pädiatrie, Neonatologie und Kinderkardiologie, UK Düsseldorf) zur Verfügung gestellt (Le, **Petersilie** et al., 2021). Die Herstellung der kultivierten Gehirnorganoidschnitte (cBOS, Engl.: „*cortical brain organoid slices*“) erfolgte auf Basis von einem von mir verfeinerten Protokoll aus vorherigen murinen und humanen Studien (Giandomenico et al., 2019; Lerchundi, Kafitz, Winkler, et al., 2019; Stoppini et al., 1991). In Kürze wurden zwischen 70- und 79-Tage-alte kortikale Gehirnorganoiden gewaschen, in Agar eingebettet und mit Hilfe eines Vibratoms 300 µm-dicke Schnitte generiert, welche anschließend auf eine Membran transferiert und in der Regel für einen weiteren Monat kultiviert

wurden (Abbildung 17). Die Präparation von mehreren cBOS aus einem Gehirnanorganoid erhöht weiter die Robustheit des Modells und den Durchsatz (**Petersilie et al.**, in Revision).

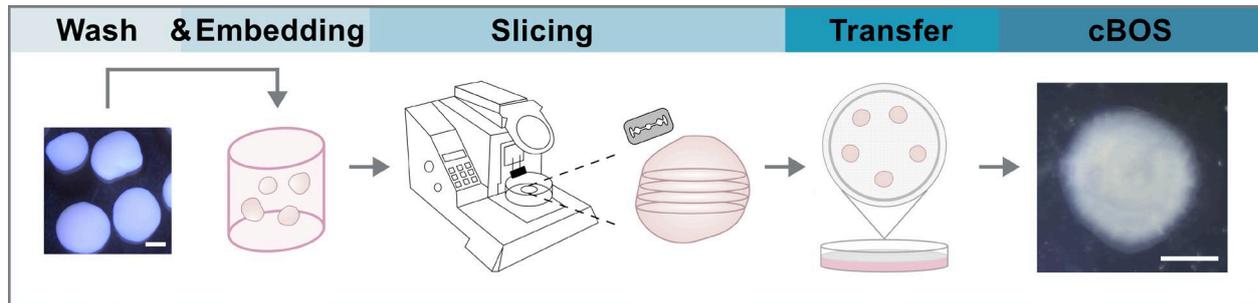


Abbildung 17: Generierung von kortikalen Gehirnanorganoidschnitten (cBOS). Die kortikalen Gehirnanorganoide wurden gewaschen, in Agarose mit niedrigem Schmelzpunkt eingebettet und mit einem Vibratom geschnitten. Die Schnitte wurden anschließend auf eine Membran transferiert und für bis zu 315-Tage kultiviert. Maßstabsbalken: 1 mm. Abbildung aus eingereichtem Manuskript entnommen und modifiziert: **Petersilie, L., Heiduschka, S., Nelson, J. S. E., Neu, L. A., Le, S., Anand, R., Kafitz, K. W., Prigione, A., & Rose, C. R. (2023).** Cortical brain organoid slices (cBOS) are a robust model system for the functional study of human-derived neural cells in intact minimal networks. *iScience*; in Revision.

cBOS behielten dabei ihre runde Form und konnten bis zu zehn Monate in Kultur gehalten werden, wobei sie weiterhin ein dichtes Netzwerk aus DAPI-positiven Zellen im Schnittinneren zeigten (Abbildung 19A) (**Petersilie et al.**, in Revision).

Zusammenfassend wird eine einfache Generierung von cBOS vorgestellt. Die homogenen DAPI-Färbungen im Schnittinneren deuten darauf hin, dass in cBOS trotz einer langen Kultivierungszeit, eine reduzierte Form des nekrotischen Kerns vorzufinden ist (Giandomenico et al., 2019; Szebenyi et al., 2021). Bereiche mit starker Nekrose wurden dagegen bei der Langzeitkultivierung von 3D-Gehirnanorganoiden vorgefunden (Bhaduri et al., 2020; Lancaster & Knoblich, 2014),

6.2 Kortikale Gehirnorganoidschnitte weisen Astrozyten und Neurone auf

Neben der erfolgreichen Etablierung des Protokolls zur Generierung von cBOS erfolgte von mir eine Analyse der zellulären Organisation von cBOS mittels Immunfluoreszenzfärbungen. Diese habe ich durch den Einsatz eines Weitfeld- und Konfokalmikroskops dokumentiert. Die Analyse zeigte, dass cBOS ein dichtes Geflecht aus MAP2-positiven neuronalen Strukturen aufweisen (Abbildung 19B, C), welche Filopodien und Spine-ähnliche Strukturen entlang der Dendriten zeigen (Abbildung 20B). Im Vergleich zu den S100 β -positiven Strukturen in ganzen Gehirnorganoiden (Abbildung 16A), befinden sich in cBOS Astrozyten (GFAP- und S100 β -positive Strukturen) mit

sehr stark verzweigten Ausläufern (Abbildung 19B, C). Diese Beobachtungen konnten ebenfalls in 10-Monate-alten cBOS gemacht werden (Abbildung 18). Das Vorhandensein von reifen chemischen Synapsen wurde durch die eindeutigen Färbungen der prä- (SYN1 & VGLUT1) und postsynaptischen (HOMER1 & PSD95) Marker verifiziert (Abbildung 20A) (Petersilie et al., in Revision).

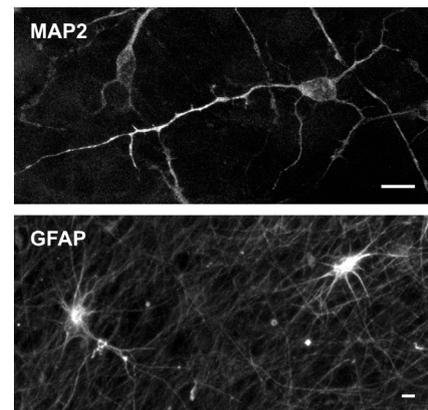


Abbildung 18: MAP2- und GFAP-positive Zellen in einem 10-Monate-alten cBOS. Maßstabsbalken: 10 μ m. Abk.: MAP2 = Mikrotubuli-assoziiertes Protein 2; GFAP = Saures Gliafaserprotein (Engl.: *glial fibrillary acidic protein*). Unveröffentlicht (Petersilie, 2023).

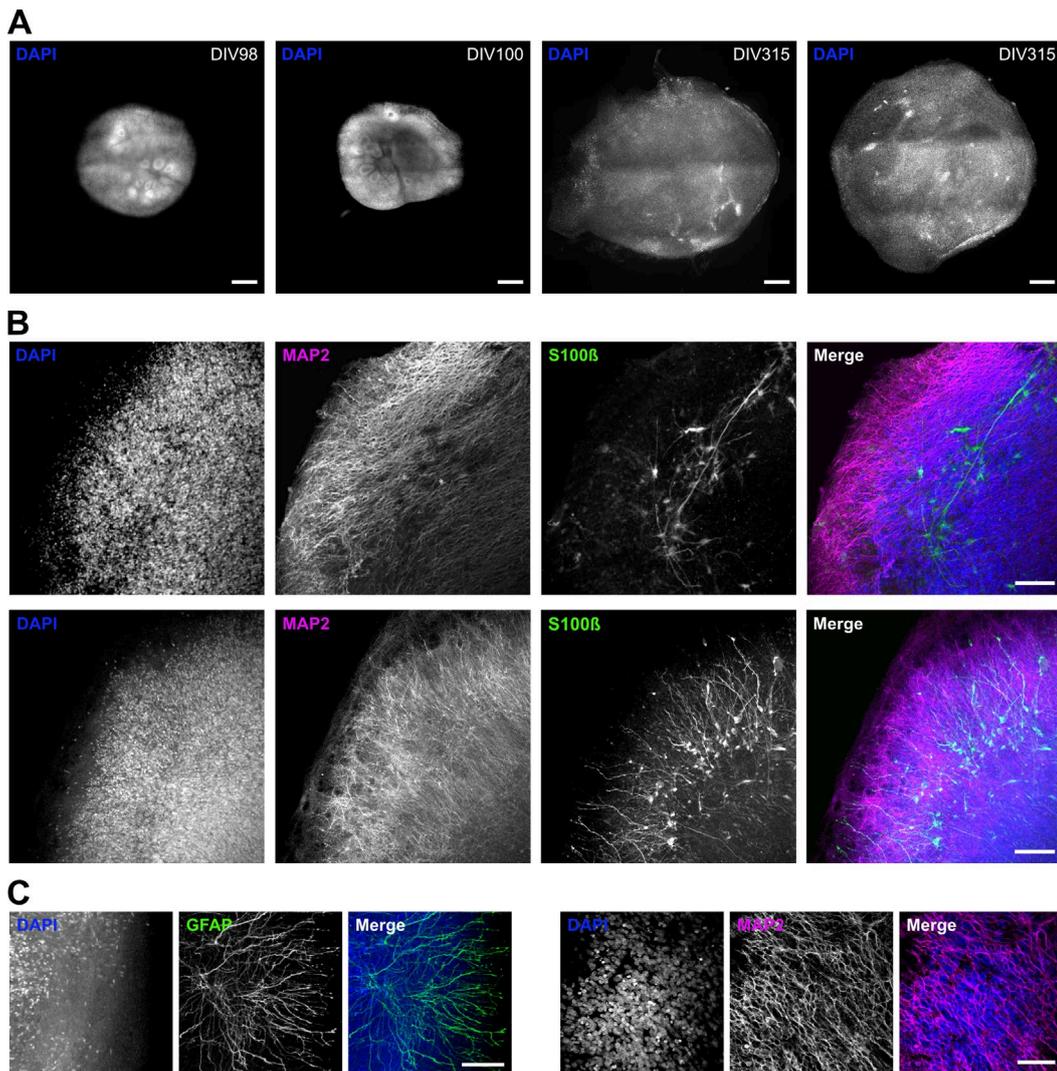


Abbildung 19: cBOS beinhalten reife Neurone und Astrozyten. **A** Repräsentative zusammengefügte Weitfeldaufnahmen zeigen die Gesamtstruktur und Größe von cBOS zu verschiedenen Kultivierungszeitpunkten (DIV98 bis DIV 315). Zellkerne sind mit DAPI markiert. Maßstabsbalken: 500 μm . **B** Repräsentative konfokale Maximumintensitätsprojektionen zeigen die zelluläre Organisation von MAP2- und S100 β -positiven Zellen in 98-100-Tage-alten cBOS. Die überlagerten Bilder („merge“) zeigen jeweils alle drei Kanäle. Maßstabsbalken: 100 μm . **C** Repräsentative konfokale Maximumintensitätsprojektionen zeigen detailreich die zelluläre Organisation von GFAP- und MAP2-positiven Zellen in 98-102-Tage-alten cBOS. Die überlagerten Bilder („merge“) zeigen jeweils zwei Kanäle. Maßstabsbalken: 100 μm (links), 50 μm (rechts). Abk.: MAP2 = Mikrotubuli-assoziiertes Protein 2; S100 β = S100 Kalzium-bindendes Protein B. GFAP = Saures Gliafaserprotein (Engl.: *glial fibrillary acidic protein*). Abbildung aus eingereichten Manuskript entnommen: **Petersilie, L., Heiduschka, S., Nelson, J. S. E., Neu, L. A., Le, S., Anand, R., Kafitz, K. W., Prigione, A., & Rose, C. R. (2023).** Cortical brain organoid slices (cBOS) are a robust model system for the functional study of human-derived neural cells in intact minimal networks. *iScience*; in Revision.

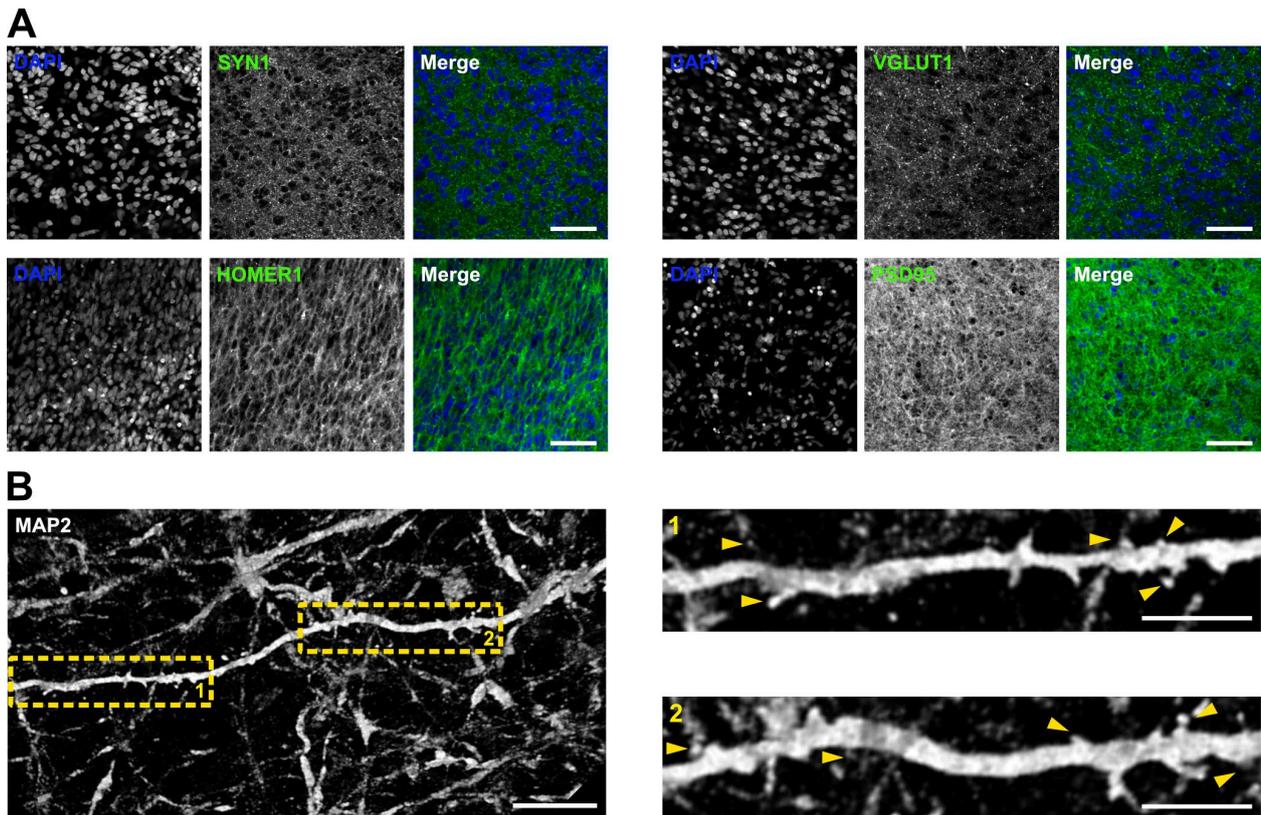


Abbildung 20: cBOS zeigen prä- und postsynaptische Marker und mutmaßliche dendritische Spines. A Immunfluoreszenzmarkierungen für die Prä- (SYN1 und VGLUT1) und Postsynapse (HOMER1 und PSD95) in 125-Tage- alten cBOS. Zellkerne sind mit DAPI markiert. Die überlagerten Bilder („merge“) zeigen jeweils beide Kanäle. Maßstabsbalken: 50 μm . **B** Schnappschuss der Volumenansicht identifiziert die neuronale Morphologie durch MAP2-positive Markierungen in einem 112-Tage-alten cBOS. Im Detail sind Filopodien sowie mutmaßliche dendritische Spines sichtbar, welche sich durch einen Hals und Köpfchen auszeichnen (B1, B2; gelbe Dreiecke). Maßstabsbalken: 15 μm (links), 5 μm (rechts). Abk.: SYN1 = Synapsin 1; VGLUT1 = Vesikulärer Glutamattransporter 1; HOMER1 = Homer-Protein-Homolog 1; PSD95 = Postsynaptisches Dichteprotein-95. MAP2 = Mikrotubuli-assoziiertes Protein 2. Abbildung aus eingereichten Manuskript entnommen: **Petersilie**, L., Heiduschka, S., Nelson, J. S. E., Neu, L. A., Le, S., Anand, R., Kafitz, K. W., Prigione, A., & Rose, C. R. (2023). Cortical brain organoid slices (cBOS) are a robust model system for the functional study of human-derived neural cells in intact minimal networks. *iScience*; in Revision.

Zusammenfassend kann gezeigt werden, dass cBOS intakte, synaptisch verbundene Netzwerke beherbergen, welche aus Neuronen und Astrozyten bestehen (**Petersilie et al.**, in Revision).

6.3 Kortikale Gehirnorganoidschnitte zeigen spontane und synchrone Netzwerkaktivität

Neben der zellulären Organisation und Morphologie der Zellen in cBOS, wurde die Funktionalität der Zellen untersucht. cBOS ermöglichen den direkten Zugang zu einzelnen Zellen und dem Netzwerk. Somit ist ein invasiver Eingriff, wie es zum Beispiel bei den 3D-MEA-Messungen der Fall ist, nicht nötig (Passaro & Stice, 2020). Die Validierung der Funktionalität und Aktivität einzelner kortikaler Zellen, wurde zunächst mittels der Patch-Clamp-Technik durchgeführt. Diese wurden von Joel Nelson (INB, HHU, Düsseldorf) in den von mir hergestellten und kultivierten cBOS untersucht. Dabei konnte durch Ganzzell-Patch-Clamp Messungen im Current-Clamp Modus ein durchschnittliches Ruhemembranpotential von -51.5 ± 12.5 mV der Zellen gemessen werden (**Petersilie** et al., in Revision). Eine ähnliche Beobachtung konnte in der Studie von Giandomenico und Kollegen gemacht werden, wobei Zellen in ALI-COs ein Ruhemembranpotential von -62.5 ± 1.3 mV aufwiesen (Giandomenico et al., 2019). Des Weiteren zeigten einige der Zellen spontane Aktionspotentiale, die in Präsenz von Tetrodotoxin (TTX), ein Blocker für spannungsabhängige Natrium-Kanäle (Na_vs), geblockt werden konnten. Außerdem zeigten die Zellen spontane Einwärtsströme sowie unterschwellige Depolarisationen; beides konnte in Präsenz von TTX geblockt werden. Diese Beobachtungen sind ein Hinweis dafür, dass cBOS reife Neurone beherbergen, die funktionelle Na_vs exprimieren (**Petersilie** et al., in Revision). Das Vorhandensein dieser konnte auch in weiteren Gehirnorganoidstudien durch unterschiedliche Methoden, wie z.B. MEA-Elektroden (Sharf et al., 2022; Trujillo et al., 2019) oder extrazelluläre Messungen mit Silizium-Mikroelektroden, verifiziert werden (Quadrato et al., 2017).

Zusätzlich zu den elektrophysiologischen Messungen von einzelnen Zellen, sollte von mir die Funktionalität der Zellen im Netzwerk untersucht werden. Dafür habe ich das konventionelle Fluoreszenzbildgebungsverfahren des Kalzium-Imagings verwendet. Wie bereits in den zuvor aufgeführten Studien gezeigt, ist Kalzium ein Indikator für neurale Aktivität und kann Aufschlüsse über viele Mechanismen geben. Dazu habe ich die Zellen mit OGB-1 AM beladen (Abbildung 21A) und zunächst die Spontanaktivität bei Raumtemperatur (RT, 22 ± 1 °C) und physiologischer Temperatur (PT, 37 ± 1 °C) detektiert. Dabei zeigten 32% der analysierten Zellen bei RT Spontansignale. Eine vermehrte Aktivität konnte bei PT mit 51% detektiert werden. Diese konnte in Präsenz von TTX auf 34% reduziert werden (Abbildung 21B, C). Die Schlussfolgerung, dass die

Zellen Navs exprimieren und spontane Aktivität aufweisen, stimmt mit den Beobachtungen der Patch-Clamp-Messungen überein (**Petersilie** et al., in Revision). Die Netzwerkaktivität in Gehirnorganoiden konnte auch in anderen Studien belegt werden (Samarasinghe et al., 2021; Sharf et al., 2022; Trujillo et al., 2019).

Um eine synchrone Netzwerkaktivität zu induzieren, habe ich die Zellen mit einem magnesiumfreien ACSF, welcher mit dem GABA_A-Rezeptor-Blocker Bicucullin-Methiodid (BIC) versetzt wurde, perfundiert (**Petersilie** et al., in Revision). Dabei handelt es sich um ein in murinen Modellsystemen etabliertes Protokoll, welches Glutamat-getriebene Netzwerkaktivität induziert (Gerkau et al., 2019; Karus et al., 2017; Karus et al., 2015). Zellen in cBOS reagierten nach einigen Minuten mit großen, synchronen Ca²⁺-Oszillationen (Abbildung 21D) (**Petersilie** et al., in Revision).

Zusammenfassend zeigen die Daten, dass eine Disinhibition der NMDA-Rezeptoren und das Blockieren der GABA_A-Rezeptoren in cBOS zu einer synchronisierten Netzwerkaktivität führt (**Petersilie** et al., in Revision).

6.4 Kortikale Gehirnorganoidschnitte besitzen ionotrope Glutamatrezeptoren

Um zu überprüfen, ob cBOS dafür verwendet werden können die zellulären Prozesse an glutamatergen Synapsen nach einer metabolischen Inhibition zu adressieren, habe ich die Präsenz von ionotropen Glutamatrezeptoren verifiziert. Dies erfolgte durch Badapplikationen von Glutamat. Dabei konnten transiente Glutamat-induzierte Signale detektiert werden, welche sowohl in alleiniger Präsenz von APV als auch in Kombination mit dem AMPA-Rezeptor-Blocker NBQX stark reduziert werden konnten (Abbildung 21E, F).

Die Ergebnisse verifizieren die Expression von NMDA-Rezeptoren in cBOS sowie die starke Kopplung der Zellen im Netzwerk (**Petersilie** et al., in Revision). Obwohl glutamaterge Neurone meist den häufigsten Zelltyp ausmachen, berichten andere Studien auch von der Präsenz von GABAergen Neuronen sowie Interneuronen in Gehirnorganoiden (Chiaradia & Lancaster, 2020; Giandomenico et al., 2019; Trujillo et al., 2019).

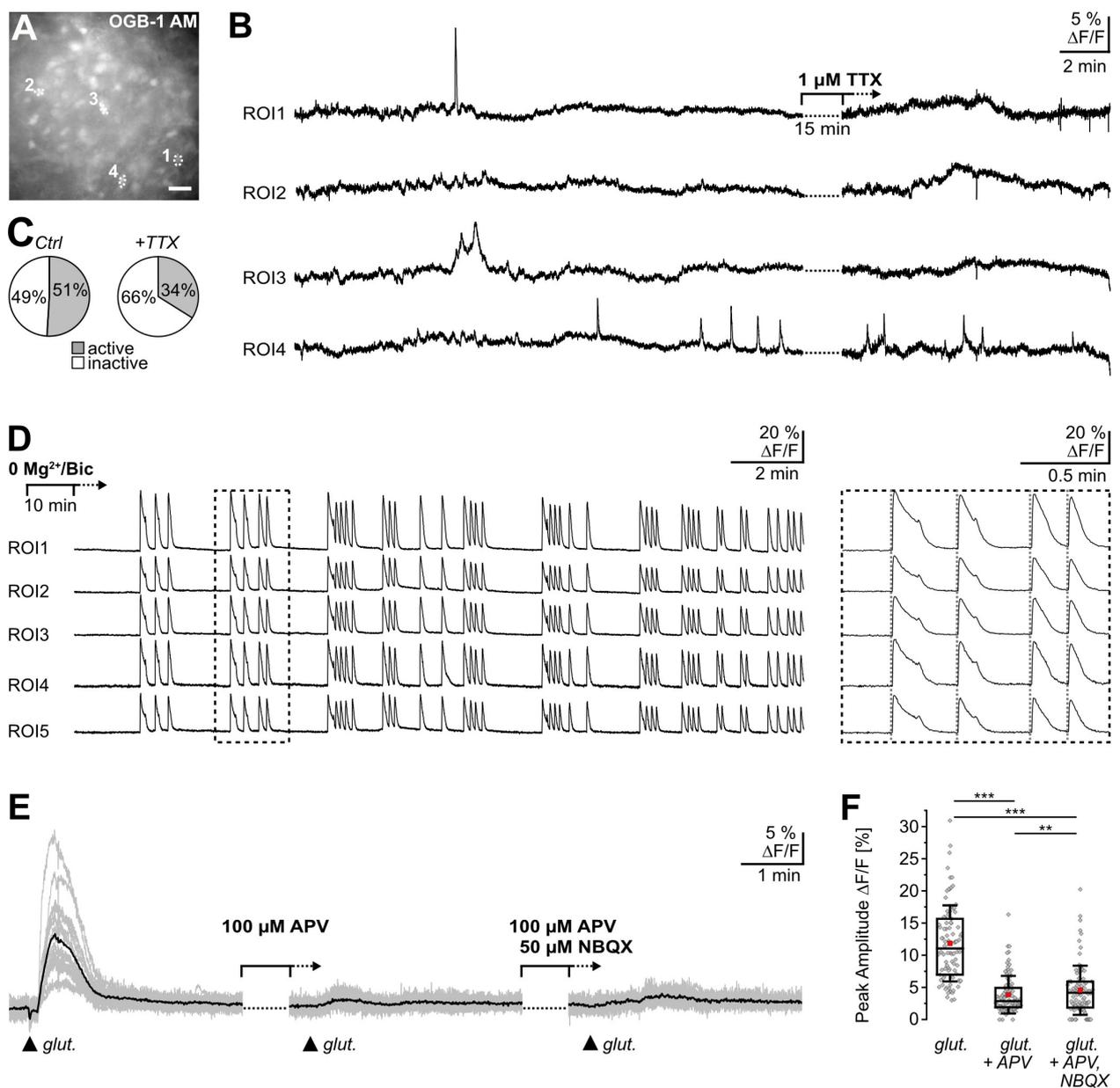


Abbildung 21. cBOS zeigen spontane und evozierte Netzwerk-Kalziumsignale. **A** Weitfeldaufnahme (MIP der ersten fünf Aufnahmen) einer OGB-1 AM beladenen Zelle in einem 147-Tage-alten cBOS. Gestrichelte Linien umranden die Bereiche von Interesse („ROIs“) 1-4. Maßstabsbalken: 25 μm. **B** ROIs zeigen die spontanen Ca²⁺-Signale unter Kontrollbedingungen (links) und nach der Badperfusion mit TTX (rechts). **C** Kreisdiagramme zeigen das Verhältnis von aktiven zu inaktiven ROIs unter Kontrollbedingungen („Ctrl“) und in Präsenz von TTX („+TTX“). **D** Synchronische Kalziumoszillationen in fünf Zellen (ROIs 1-5), welche durch eine Perfusion mit Magnesiumfreien ACSF und 10 μM des GABA_A-rezeptor Antagonist Bicucullin-Methiodid („0 Mg²⁺/Bic“). Der Einsatz zeigt die Signale in höherer Auflösung. **E** Ca²⁺-Veränderungen ausgelöst durch repetitive Badapplikationen von Glutamat (1 mM/ 10 Sek., schwarze Dreiecke). Links: Kontrollbedingungen; Mitte: nach dem Einwasch des NMDA-Rezeptor-Blockers APV (100 μM) und rechts: nach dem Einwasch von APV und dem AMPA-Rezeptor-Blockers NBQX (50 μM). Gezeigt ist eine Beispielmessung mit 22 Einzelzellen (graue Linien) und die Mittelspur (schwarze Linien). **F** Boxplots zeigen die Auswertung der Maximalamplituden ΔF/F (in %) der durch Glutamat-induzierten Ca²⁺-Signale in Kontrollbedingungen („glut“) und in Präsenz der Blocker („glut + APV“, „glut + APV, NBQX“). Illustriert sind die Mittelwerte (rote Quadrate), Mediane (schwarze Linien), 25/75 Perzentile (Boxen), 1x Standardabweichung (Whiskers) und einzelne Datenpunkte (graue Diamanten). N = 93, n = 3. Abk.: TTX = Tetrodotoxin; APV = 2-Amino-5-phosphonovaleriansäure; NBQX = 2,3-Dihydroxy-6-nitro-7-sulfamoyl-benzo[f]chinoxalin-2,3-dion; N = Anzahl der Schnitte; n = Anzahl der Zellen. Abbildung aus eingereichten Manuskript entnommen: **Petersilie, L., Heiduschka, S., Nelson, J. S. E., Neu, L. A., Le, S., Anand, R., Kafitz, K. W., Prigione, A., & Rose, C. R. (2023). Cortical brain organoid slices (cBOS) are a robust model system for the functional study of human-derived neural cells in intact minimal networks. *iScience*: in Revision.**

7 Pathophysiologische Charakterisierung von Gehirnzellen in humanen kortikalen Gehirnanatomischen Schnitten

7.1 Kortikale Gehirnanatomische Schnitte exprimieren genetisch-kodierte Sensoren um intrazelluläre ATP-Level zu überprüfen

Die Charakterisierung der diversen humanen 3D-Modellsysteme, wozu in Hydrogel eingebettete neurale Netzwerke, 3D-Gehirnanatomische Organoide und cBOS zählen zeigte, dass cBOS eine Langzeitkultivierung und Untersuchungen von glutamatergen Synapsen ermöglichen. Aus diesem Grund wurde sich im weiteren Verlauf des Promotionsvorhabens auf cBOS konzentriert, um dem letzten Hauptziel nachzugehen: ein humanes Modellsystem anzuwenden, mit dem die Auswirkungen einer kurzzeitigen metabolischen Inhibition auf humane Gehirnzellen erforscht werden können. Aufgrund dessen, dass die frühen Ereignisse nach einer metabolischen Inhibition hauptsächlich durch den raschen ATP-Abfall ausgelöst werden, haben wir zunächst das ATP-Imaging in cBOS etabliert. Dafür habe ich cBOS generiert, kultiviert und in Zusammenarbeit mit Louis Neu (INB, HHU, Düsseldorf) die Transduktion eines genetisch-kodierten Sensors in cBOS etabliert. Die Neurone konnten erfolgreich mit dem unter dem humanen Synapsin 1-Promotor (hSyn1) exprimierten und FRET-basierten Nanosensor ATeam1.03^{YEMK} transduziert werden, wodurch zelltypspezifische ATP-Level detektiert werden konnten (Abbildung 22A, B) (**Petersilie et al.**, in Revision).

7.2 Intrazellulärer ATP-Abfall in Neuronen während transients chemisch induzierter Ischämie

Durch die erfolgreiche Transduktion des Nanosensors ATeam konnte Louis Neu (INB, HHU, Düsseldorf) unter meiner Anleitung die ATP-Messungen durchführen. Eine zweiminütige chemische Ischämie führte dabei zu einem Abfall der ATeam-Ratio, was indikativ für die intrazellulären ATP-Level ist. Nach einigen Minuten erreichten diese wieder den Grundlinienwert (Abbildung 22C) (**Petersilie et al.**, in Revision). Neben dem Einsatz von chemischen Ionenindikatoren wie z.B. beim Kalzium-Imaging, wobei die Ergebnisse aus allen Zelltypen stammen, konnten durch den Einsatz eines genetisch-kodierten Sensors, nun auch Zelltypspezifische Signale in cBOS detektiert werden. Basierend auf der Kalibrierung des Sensors in organotypischen Schnitten des Mausgehirns (Lerchundi et al., 2020), und einem angenommenen ATP-Grundlevel von 2.5 mM, ergaben die Messungen einen transienten ATP-Abfall von 0.11 mM

(Petersilie et al., in Revision). Die Anwendung des gleichen Protokolls bei 33 ± 1 °C führte in organotypischen Mausschnitten in neokortikalen Neuronen zu einem doppelt so starken Abfall (Pape & Rose, 2023).

Die Ergebnisse dieser Studie deuten darauf hin, dass sich die Neurone in cBOS nicht in einem beeinträchtigten Stoffwechselzustand befinden, welches einige Studien berichten (Bhaduri et al., 2020; Pollen et al., 2019). Neurone in cBOS konnten nach der temporären Inhibition der Hauptstoffwechselwege für die ATP-Produktion, ihr ATP-Grundlevel wiederherstellen (Petersilie et al., in Revision).

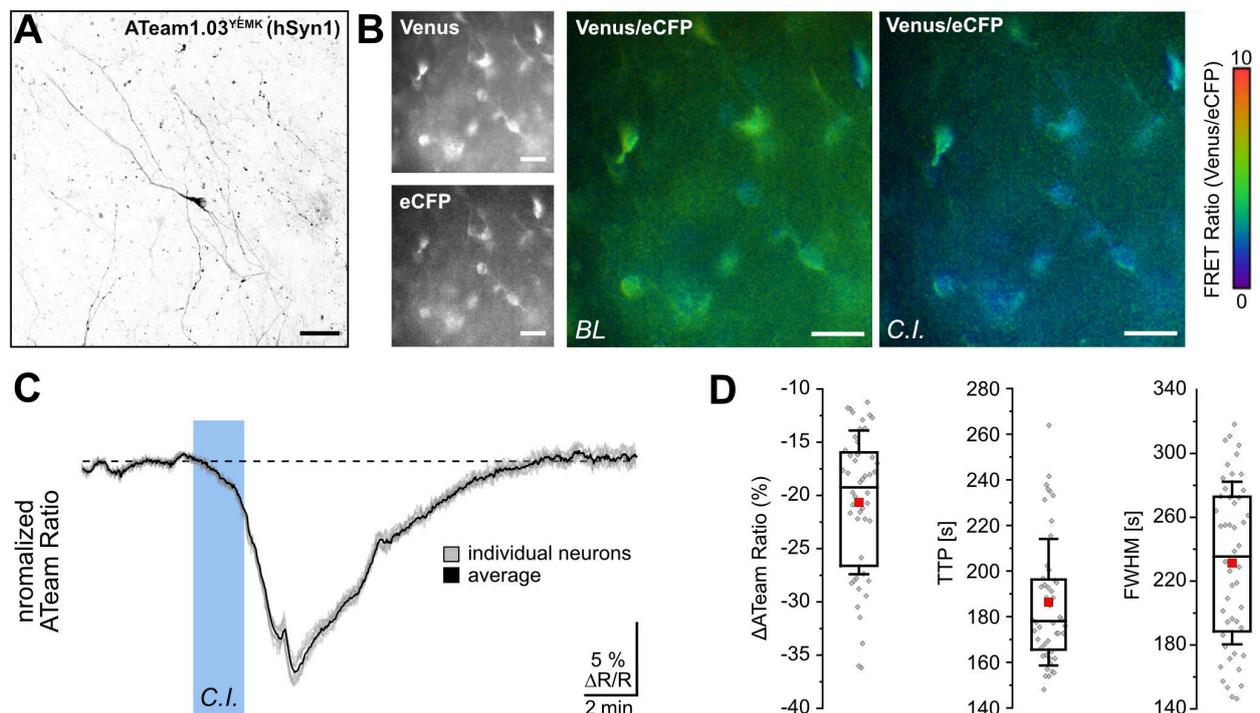


Abbildung 22: cBOS ermöglichen die Expression von genetisch-kodierten Sensoren um intrazelluläres ATP zu überprüfen. **A** Konfokalaufnahme von ATeam1.03^{YEMK}-transduzierten Neuronen (Anregung bei 488 nm) unter der Expression des humanen Synapsin1-Promotors („hSyn1“). Aus Illustrationsgründen wurde das Bild invertiert. Maßstabsbalken: 25 µm. **B** Links: Weitfeldaufnahmen der Fluoreszenzemissionen (oben: Venus/527 nm; unten: eCFP/475 nm) von ATeam1.03^{YEMK}-transduzierten Neuronen. Mitte & rechts: Weitfeldaufnahmen der Fluoreszenz-Ratio von Venus/eCFP beim Basislevel („BL“) und während der chemischen Ischämie („C.I.“). Die gefärbte Skala zeigt die FRET-Ratio (Venus/eCFP), wobei blau niedrige und rot hohe Werte repräsentiert. Maßstabsbalken: 25 µm. **C** Relative Änderungen der ATeam1.03^{YEMK}-Ratio welche durch eine zweiminütige chemische Ischämie (blauer Balken) in acht Neuronen in einem 120-Tage alten cBOS induziert wurden. Graue Linien zeigen einzelne Spuren, die schwarze Linie zeigt die Mittelspur. **D** Auswertung der relativen Veränderungen in der ATeam1.03^{YEMK}-Ratio, welche durch eine chemische Ischämie induziert wurden. Analysiert wurden die Maximalamplituden $\Delta R/R$ (in %), Zeit zur Maximalamplitude („TTP“) und Halbwertsbreite („FWHM“). Boxplots zeigen die Mittelwerte (rote Quadrate), Mediane (schwarze Linien), 25/75 Perzentile (Boxen), 1x Standardabweichung (Whiskers) und einzelne Datenpunkte (graue Diamanten). N = 48, n = 7. Abk.: N = Anzahl der Schnitte; n = Anzahl der Zellen. Abbildung aus eingereichten Manuskript entnommen: Petersilie, L., Heiduschka, S., Nelson, J. S. E., Neu, L. A., Le, S., Anand, R., Kafitz, K. W., Prigione, A., & Rose, C. R. (2023). Cortical brain organoid slices (cBOS) are a robust model system for the functional study of human-derived neural cells in intact minimal networks. *iScience*; in Revision.

Kapitel 4

Fazit

Aufgrund der Komplexität des Gehirns werden Modellsysteme benötigt, um vereinfacht zelluläre Mechanismen unter physiologischen und pathophysiologischen Konditionen untersuchen zu können. So sind z.B. auch die frühen Prozesse nach einer metabolischen Inhibition auf die Gehirnzellen beim ischämischen Schlaganfall noch weitestgehend unerforscht und die Therapiemöglichkeiten limitiert. Um potentielle neue therapeutische Ziele zu identifizieren, stehen wie zuvor ausführlich beschrieben unterschiedliche Modellsysteme zur Verfügung. Mausmodelle haben sich dabei in der biomedizinischen Grundlagenforschung am meisten etabliert. Sie sind aktuell und zukünftig die Grundlage für viele Studien oder zusätzlich notwendig, um gewisse Hypothesen adressieren zu können.

In dieser Arbeit konnten zunächst im murinen Präparat der akuten Hirnschnitte die Auswirkungen des kurzzeitigen Energiemangels auf Volumenveränderungen von Astrozyten (Engels, Kalia, Rahmati, **Petersilie** et al., 2021) und den Anstieg von intrazellulärem Kalzium in neokortikalen Astrozyten analysiert werden (Eitelmann, Everaerts, **Petersilie** et al., 2023). Ergänzend dazu sollten humane Alternativmethoden zu Tiermodellen etabliert werden, wozu in dieser Arbeit mehrere humane 3D-Modellsysteme charakterisiert wurden. Dies beinhaltete in Hydrogel eingebettete neurale Netzwerke (Kapri, **Petersilie** et al., 2021), 3D-Gehirnorganoide (Le, **Petersilie** et al., 2021) und cBOS (**Petersilie** et al., in Revision). Mit cBOS konnte ein humanes Modellsystem vorgestellt werden mit dem eine Langzeitkultivierung sowie die morphologische und funktionelle Analyse von menschlichen Gehirnzellen in intakten Netzwerken möglich ist. Schließlich sollten die Auswirkungen der chemischen Ischämie auf humane Gehirnzellen untersucht werden. Dafür konnte erfolgreich eine kurzzeitige metabolische Inhibition in humanen Zellen ausgelöst werden und ein rascher ATP-Abfall in Neuronen detektiert werden (**Petersilie** et al., in Revision).

Das Vorhandensein dieses neuen humanen Modellsystems kann eine Grundlage dafür bilden, die Auswirkungen einer metabolischen Inhibition auf menschliche Gehirnzellen während eines ischämischen Schlaganfalls zu untersuchen. In zukünftigen Studien können, wie z.B. in Abschnitt 3.2 in einem Mausmodell gezeigt, Pfade untersucht werden, die nach einem kurzzeitigen Energiemangel zu Zellschäden beitragen. Des Weiteren können potentielle pharmakologische Substanzen ausgetestet werden, die zur Reduktion dieser beitragen. Neben

der chemischen Simulation von pathophysiologischen Zuständen kann das Modell der cBOS auch für Patienten-abgeleitete Gehirnorganoiden verwendet werden. So könnten neue Einblicke in die Mechanismen von neurologischen Krankheiten geliefert werden. In künftigen Studien sollten auch die Limitationen von 3D-Gehirnorganoiden bzw. von cBOS adressiert werden.

Kapitel 5

Publikationen und Manuskripte

Die vorliegende Dissertation basiert auf fünf Publikationen und einem Manuskript in Revision. Im folgenden Kapitel sind die während des Promotionsvorhabens erfolgten Publikationen sowie das eingereichte Manuskript anti-chronologisch aufgeführt:

Aus urheberrechtlichen Gründen sind keine Nachdrucke der Publikationen und des Manuskripts in der Veröffentlichung dieser Dissertation enthalten.

1. Altered Gap Junction Network Topography in Mouse Models for Human Hereditary Deafness

Autoren:	Sara Eitelmann, Laura Petersilie , Christine R. Rose & Jonathan Stephan
Art der Autorenschaft:	Koautorin
Journal:	International Journal of Molecular Sciences
Publikationsstatus:	Veröffentlicht am 06.10.2020
DOI:	https://doi.org/10.3390/ijms21197376
Impact-Faktor:	5.924 (2020)
Beteiligungen:	<ul style="list-style-type: none">• Methodik (Abbildung 1A_a-C_b)• Untersuchungen (Abbildung 1A_a-C_b)• Datenkuration (Abbildung 1A_a-C_b)• Schreiben - Überprüfung & Bearbeitung

2. Generation of Human Brain Organoids for Mitochondrial Disease Modeling

Autoren:	Stephanie Le, Laura Petersilie , Gizem Inak, Carmen Menachopando, Karl W. Kafitz, Agnieszka Rybak-Wolf, Nikolaus Rajewsky, Christine R. Rose, Alessandro Prigione
Art der Autorenschaft:	Koautorin
Journal:	JoVE – Journal of Visualized Experiments
Publikationsstatus:	Veröffentlicht am 21.06.2021
DOI:	https://doi.org/10.3791/62756
Impact-Faktor:	1.424 (2021)
Beteiligungen:	<ul style="list-style-type: none">• Untersuchungen (Abbildung 1B und 2A-C)• Datenkuration (Abbildung 1B und 2A-C)• Visualisierung (Abbildung 1B und 2A-C)• Schreiben - Überprüfung & Bearbeitung

3. Human Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Neural Progenitor Cells Produce Distinct Neural 3D In Vitro Models Depending on Alginate/Gellan Gum/Laminin Hydrogel Blend Properties

Autoren:	Julia Kapr, Laura Petersilie , Thomas Distler, Ines Lauria, Farina Bendt, Clemens M. Sauter, Aldo R Boccaccini, Christine R. Rose & Ellen Fritsche
Art der Autorenschaft:	Koautorin
Journal:	Advanced Healthcare Materials
Publikationsstatus:	Veröffentlicht am 01.07.2021
DOI:	https://doi.org/10.1002/adhm.202100131
Impact-Faktor:	11.092 (2021)
Beteiligungen:	<ul style="list-style-type: none"> • Methodik (Abbildung 4B-G) • Untersuchungen (Abbildung 4B-G) • Analyse (Abbildung 4B-G) • Ressourcen (Abbildung 4B-G) • Visualisierung (Abbildung 4B-G) • Schreiben - Überprüfung & Bearbeitung

4. Glial Chloride Homeostasis Under Transient Ischemic Stress

Die Erhebung der Daten in Abbildung 6 dargestellten Ergebnisse erfolgte während meiner praktischen Masterarbeit im Institut für Neurobiologie (HHU, Düsseldorf). Die erneute Auswertung und Interpretation sowie die Veröffentlichung der Daten erfolgte während des Promotionsvorhabens.

Autoren:	Miriam Engels, Manu Kalia, Sarah Rahmati, Laura Petersilie , Peter Kovermann, Michel J. A. M. van Putten, Christine R. Rose, Hil G. E. Meijer, Thomas Gensch & Christoph Fahlke
Art der Autorenschaft:	Koautorin
Journal:	Frontiers in Cellular Neuroscience
Publikationsstatus:	Veröffentlicht am 16.09.2021
DOI:	https://doi.org/10.3389/fncel.2021.735300
Impact-Faktor:	5.78 (2021)
Beteiligungen:	<ul style="list-style-type: none"> • Methodik (Abbildung 6) • Untersuchungen (Abbildung 6) • Analyse (Abbildung 6) • Schreiben - Überprüfung & Bearbeitung

5. Ca²⁺-dependent rapid uncoupling of astrocytes upon brief metabolic stress

Autoren:	Sara Eitelmann, Katharina Everaerts, Laura Petersilie , Christine R. Rose* & Jonathan Stephan* *: geteilte Senior-Autorenschaft
Art der Autorenschaft:	Koautorin
Journal:	Frontiers in Cellular Neuroscience
Publikationsstatus:	Veröffentlicht am 11.10.2023
DOI:	https://doi.org/10.3389/fncel.2023.1151608
Impact-Faktor:	6.147 (2023)
Beteiligungen:	<ul style="list-style-type: none"> • Methodik (Abbildung 6A₁₋₄) • Untersuchungen (Abbildung 6A₁₋₄) • Analyse (Abbildung 6A₁₋₄) • Schreiben - Überprüfung & Bearbeitung

6. Cortical brain organoid slices (cBOS) are a robust model system for the functional study of human-derived neural cells in intact minimal networks

Das Manuskript befindet sich aktuell in Revision. Angehängt ist die Version des Manuskripts, die am 08.08.2023 bei iScience eingereicht wurde.

Autoren:	Laura Petersilie , Sonja Heiduschka, Joel S. E. Nelson, Louis A. Neu, Stephanie Le, Ruchika Anand, Karl W. Kafitz, Alessandro Prigione* & Christine R. Rose* *: geteilte Senior-Autorenschaft
Art der Autorenschaft:	Erstautorin
Journal:	iScience
Publikationsstatus:	Eingereicht am 08.08.2023; in Revision
Impact-Faktor:	5.8 (2022)
Beteiligungen:	<ul style="list-style-type: none"> • Konzeptualisierung • Methodik (Abbildung 3, 4 & 6) • Validierung • Analyse (Abbildung 3, 4 & 6) • Untersuchungen (Abbildung 3, 4 & 6) • Ressourcen (Abbildung 1, 3, 4 & 6) • Datenkuration • Visualisierung (Graphical Abstract, Abbildung 1, 2, 3, 4, 5, 6 & 7) • Schreiben – Original-Entwurf / Überprüfung & Bearbeitung

Anhang

Literaturverzeichnis

- Aguzzi, A., Barres, B. A., & Bennett, M. L. (2013). Microglia: scapegoat, saboteur, or something else? *Science*, *339*(6116), 156-161. doi:10.1126/science.1227901
- Allen, N. J., & Barres, B. A. (2009). Neuroscience: Glia - more than just brain glue. *Nature*, *457*(7230), 675-677. doi:10.1038/457675a
- Andrews, M. G., & Nowakowski, T. J. (2019). Human brain development through the lens of cerebral organoid models. *Brain research*, *1725*, 146470. doi:10.1016/j.brainres.2019.146470
- Andriezen, W. L. (1893). The Neuroglia Elements in the Human Brain. *British medical journal*, *2*(1700), 227-230. doi:10.1136/bmj.2.1700.227
- Araque, A., Parpura, V., Sanzgiri, R. P., & Haydon, P. G. (1999). Tripartite synapses: glia, the unacknowledged partner. *Trends in neurosciences*, *22*(5), 208-215. doi:10.1016/s0166-2236(98)01349-6
- Azevedo, F. A., Carvalho, L. R., Grinberg, L. T., Farfel, J. M., Ferretti, R. E., Leite, R. E., Jacob Filho, W., Lent, R., & Herculano-Houzel, S. (2009). Equal numbers of neuronal and nonneuronal cells make the human brain an isometrically scaled-up primate brain. *Journal of Comparative Neurology*, *513*(5), 532-541. doi:10.1002/cne.21974
- Bahram, M., Mohseni, N., & Moghtader, M. (2016). An introduction to hydrogels and some recent applications. In *Emerging concepts in analysis and applications of hydrogels*: IntechOpen.
- Bajaj, I. B., Survase, S. A., Saudagar, P. S., & Singhal, R. S. (2007). Gellan gum: Fermentative production, downstream processing and applications. *Food Technology and Biotechnology*, *45*(4), 341-354.
- Barres, B. A. (2008). The mystery and magic of glia: a perspective on their roles in health and disease. *Neuron*, *60*(3), 430-440. doi:10.1016/j.neuron.2008.10.013
- Bear, M., Connors, B., & Paradiso, M. A. (2020). *Neuroscience: exploring the brain, enhanced edition: exploring the brain*: Jones & Bartlett Learning.
- Benesova, J., Hock, M., Butenko, O., Prajerova, I., Anderova, M., & Chvatal, A. (2009). Quantification of astrocyte volume changes during ischemia in situ reveals two populations of astrocytes in the cortex of GFAP/EGFP mice. *Journal of neuroscience research*, *87*(1), 96-111. doi:10.1002/jnr.21828
- Benito-Kwiecinski, S., & Lancaster, M. A. (2020). Brain Organoids: Human Neurodevelopment in a Dish. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, *12*(8), a035709. doi:10.1101/cshperspect.a035709
- Bennett, M. V. L., Contreras, J. E., Bukauskas, F. F., & Sáez, J. C. (2003). New roles for astrocytes: gap junction hemichannels have something to communicate. *Trends in neurosciences*, *26*(11), 610-617.
- Bhaduri, A., Andrews, M. G., Mancía Leon, W., Jung, D., Shin, D., Allen, D., Jung, D., Schmunk, G., Haeussler, M., Salma, J., Pollen, A. A., Nowakowski, T. J., & Kriegstein, A. R. (2020). Cell stress in cortical organoids impairs molecular subtype specification. *Nature*, *578*(7793), 142-148. doi:10.1038/s41586-020-1962-0
- Birey, F., Andersen, J., Makinson, C. D., Islam, S., Wei, W., Huber, N., Fan, H. C., Metzler, K. R. C., Panagiotakos, G., Thom, N., O'Rourke, N. A., Steinmetz, L. M., Bernstein, J. A., Hallmayer, J., Huguenard, J. R., & Pasca, S. P. (2017). Assembly of functionally integrated human forebrain spheroids. *Nature*, *545*(7652), 54-59. doi:10.1038/nature22330

- Block, M. L., & Hong, J. S. (2005). Microglia and inflammation-mediated neurodegeneration: multiple triggers with a common mechanism. *Progress in neurobiology*, *76*(2), 77-98. doi:10.1016/j.pneurobio.2005.06.004
- Bradl, M., & Lassmann, H. (2010). Oligodendrocytes: biology and pathology. *Acta neuropathologica*, *119*(1), 37-53. doi:10.1007/s00401-009-0601-5
- Braeuninger, S., & Kleinschnitz, C. (2009). Rodent models of focal cerebral ischemia: procedural pitfalls and translational problems. *Experimental & translational stroke medicine*, *1*(1), 1-11.
- Bryda, E. C. (2013). The Mighty Mouse: the impact of rodents on advances in biomedical research. *Missouri medicine*, *110*(3), 207-211. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23829104>
- Bushong, E. A., Martone, M. E., Jones, Y. Z., & Ellisman, M. H. (2002). Protoplasmic astrocytes in CA1 stratum radiatum occupy separate anatomical domains. *Journal of Neuroscience*, *22*(1), 183-192. doi:10.1523/JNEUROSCI.22-01-00183.2002
- Cakir, B., Xiang, Y., Tanaka, Y., Kural, M. H., Parent, M., Kang, Y. J., Chapeton, K., Patterson, B., Yuan, Y., He, C. S., Raredon, M. S. B., Dengelegi, J., Kim, K. Y., Sun, P., Zhong, M., Lee, S., Patra, P., Hyder, F., Niklason, L. E., Lee, S. H., Yoon, Y. S., & Park, I. H. (2019). Engineering of human brain organoids with a functional vascular-like system. *Nature methods*, *16*(11), 1169-1175. doi:10.1038/s41592-019-0586-5
- Camp, J. G., Badsha, F., Florio, M., Kanton, S., Gerber, T., Wilsch-Brauninger, M., Lewitus, E., Sykes, A., Hevers, W., Lancaster, M., Knoblich, J. A., Lachmann, R., Paabo, S., Huttner, W. B., & Treutlein, B. (2015). Human cerebral organoids recapitulate gene expression programs of fetal neocortex development. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *112*(51), 15672-15677. doi:10.1073/pnas.1520760112
- Capecchi, M. R. (1989). Altering the genome by homologous recombination. *Science*, *244*(4910), 1288-1292. doi:10.1126/science.2660260
- Chambers, S. M., Fasano, C. A., Papapetrou, E. P., Tomishima, M., Sadelain, M., & Studer, L. (2009). Highly efficient neural conversion of human ES and iPS cells by dual inhibition of SMAD signaling. *Nature Biotechnology*, *27*(3), 275-280. doi:10.1038/nbt.1529
- Chiaradia, I., & Lancaster, M. A. (2020). Brain organoids for the study of human neurobiology at the interface of in vitro and in vivo. *Nat Neurosci*, *23*(12), 1496-1508. doi:10.1038/s41593-020-00730-3
- Choi, D. W., & Rothman, S. M. (1990). The role of glutamate neurotoxicity in hypoxic-ischemic neuronal death. *Annual review of neuroscience*, *13*(1), 171-182. doi:10.1146/annurev.ne.13.030190.001131
- Choi, J., Lee, S., Mallard, W., Clement, K., Tagliazucchi, G. M., Lim, H., Choi, I. Y., Ferrari, F., Tsankov, A. M., Pop, R., Lee, G., Rinn, J. L., Meissner, A., Park, P. J., & Hochedlinger, K. (2015). A comparison of genetically matched cell lines reveals the equivalence of human iPSCs and ESCs. *Nature Biotechnology*, *33*(11), 1173-1181. doi:10.1038/nbt.3388
- Cotrina, M. L., Kang, J., Lin, J. H., Bueno, E., Hansen, T. W., He, L., Liu, Y., & Nedergaard, M. (1998). Astrocytic gap junctions remain open during ischemic conditions. *Journal of Neuroscience*, *18*(7), 2520-2537. doi:10.1523/JNEUROSCI.18-07-02520.1998
- Defelipe, J. (2011). The evolution of the brain, the human nature of cortical circuits, and intellectual creativity. *Frontiers in neuroanatomy*, *5*, 29. doi:10.3389/fnana.2011.00029
- Del Dosso, A., Urenda, J. P., Nguyen, T., & Quadrato, G. (2020). Upgrading the Physiological Relevance of Human Brain Organoids. *Neuron*, *107*(6), 1014-1028. doi:10.1016/j.neuron.2020.08.029

- Di Lullo, E., & Kriegstein, A. R. (2017). The use of brain organoids to investigate neural development and disease. *Nature Reviews Neuroscience*, *18*(10), 573-584. doi:10.1038/nrn.2017.107
- Dingle, Y. T., Boutin, M. E., Chirila, A. M., Livi, L. L., Labriola, N. R., Jakubek, L. M., Morgan, J. R., Darling, E. M., Kauer, J. A., & Hoffman-Kim, D. (2015). Three-Dimensional Neural Spheroid Culture: An In Vitro Model for Cortical Studies. *Tissue Engineering Part C: Methods* *21*(12), 1274-1283. doi:10.1089/ten.TEC.2015.0135
- Distler, T., Lauria, I., Detsch, R., Sauter, C. M., Bendt, F., Kapr, J., Rütten, S., Boccaccini, A. R., & Fritsche, E. (2021). Neuronal Differentiation from Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Neurospheres by the Application of Oxidized Alginate-Gelatin-Laminin Hydrogels. *Biomedicines*, *9*(3). doi:10.3390/biomedicines9030261
- Dreier, J. P., & Reiffurth, C. (2015). The stroke-migraine depolarization continuum. *Neuron*, *86*(4), 902-922. doi:10.1016/j.neuron.2015.04.004
- Duong, A., Evstratova, A., Sivitilli, A., Hernandez, J. J., Gosio, J., Wahedi, A., Sondheimer, N., Wrana, J. L., Beaulieu, J. M., Attisano, L., & Andrezza, A. C. (2021). Characterization of mitochondrial health from human peripheral blood mononuclear cells to cerebral organoids derived from induced pluripotent stem cells. *Scientific reports*, *11*(1), 4523. doi:10.1038/s41598-021-84071-6
- Durukan, A., & Tatlisumak, T. (2007). Acute ischemic stroke: overview of major experimental rodent models, pathophysiology, and therapy of focal cerebral ischemia. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, *87*(1), 179-197. doi:10.1016/j.pbb.2007.04.015
- Edwards, F. A., Konnerth, A., Sakmann, B., & Takahashi, T. (1989). A thin slice preparation for patch clamp recordings from neurones of the mammalian central nervous system. *Pflügers Archiv*, *414*(5), 600-612. doi:10.1007/BF00580998
- Eichmüller, O. L., & Knoblich, J. A. (2022). Human cerebral organoids - a new tool for clinical neurology research. *Nature Reviews Neurology*, *18*(11), 661-680. doi:10.1038/s41582-022-00723-9
- Eitelmann, S., Everaerts, K., Petersilie, L., Rose, C. R., & Stephan, J. (2023). Ca²⁺-dependent rapid uncoupling of astrocytes upon brief metabolic stress. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, *17*, 1151608. doi:10.3389/fncel.2023.1151608
- Eitelmann, S., Petersilie, L., Rose, C. R., & Stephan, J. (2020). Altered Gap Junction Network Topography in Mouse Models for Human Hereditary Deafness. *International journal of molecular sciences*, *21*(19), 7376. doi:10.3390/ijms21197376
- Engels, M., Kalia, M., Rahmati, S., Petersilie, L., Kovermann, P., van Putten, M. J. A. M., Rose, C. R., Meijer, H. G. E., Gensch, T., & Fahlke, C. (2021). Glial Chloride Homeostasis Under Transient Ischemic Stress. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, *15*, 735300. doi:10.3389/fncel.2021.735300
- Erecinska, M., & Silver, I. A. (1994). Ions and energy in mammalian brain. *Progress in neurobiology*, *43*(1), 37-71. doi:10.1016/0301-0082(94)90015-9
- Ericsson, A. C., Crim, M. J., & Franklin, C. L. (2013). A brief history of animal modeling. *Missouri medicine* *110*(3), 201-205. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23829102>
- Eroglu, C., & Barres, B. A. (2010). Regulation of synaptic connectivity by glia. *Nature*, *468*(7321), 223-231. doi:10.1038/nature09612
- Gabriel, E., Ramani, A., Karow, U., Gottardo, M., Natarajan, K., Gooi, L. M., Goranci-Buzhala, G., Krut, O., Peters, F., Nikolic, M., Kuivanen, S., Korhonen, E., Smura, T., Vapalahti, O., Papantonis, A., Schmidt-Chanasit, J., Riparbelli, M., Callaini, G., Kronke, M., Utermohlen,

- O., & Gopalakrishnan, J. (2017). Recent Zika Virus Isolates Induce Premature Differentiation of Neural Progenitors in Human Brain Organoids. *Cell stem cell*, *20*(3), 397-406 e395. doi:10.1016/j.stem.2016.12.005
- Geerts, H. (2009). Of Mice and Men. *CNS Drugs*, *23*(11), 915-926. doi:10.2165/11310890-000000000-00000
- Gerkau, N. J., Lerchundi, R., Nelson, J. S. E., Lantermann, M., Meyer, J., Hirrlinger, J., & Rose, C. R. (2019). Relation between activity-induced intracellular sodium transients and ATP dynamics in mouse hippocampal neurons. *The Journal of physiology*, *597*(23), 5687-5705. doi:10.1113/JP278658
- Gerkau, N. J., Rakers, C., Durry, S., Petzold, G. C., & Rose, C. R. (2018). Reverse NCX Attenuates Cellular Sodium Loading in Metabolically Compromised Cortex. *Cerebral Cortex*, *28*(12), 4264-4280. doi:10.1093/cercor/bhx280
- Giandomenico, S. L., Mierau, S. B., Gibbons, G. M., Wenger, L. M. D., Masullo, L., Sit, T., Sutcliffe, M., Boulanger, J., Tripodi, M., Derivery, E., Paulsen, O., Lakatos, A., & Lancaster, M. A. (2019). Cerebral organoids at the air-liquid interface generate diverse nerve tracts with functional output. *Nature neuroscience*, *22*(4), 669-679. doi:10.1038/s41593-019-0350-2
- Giandomenico, S. L., Sutcliffe, M., & Lancaster, M. A. (2021). Generation and long-term culture of advanced cerebral organoids for studying later stages of neural development. *Nature protocols*, *16*(2), 579-602. doi:10.1038/s41596-020-00433-w
- Giaume, C., Taberner, A., & Medina, J. M. (1997). Metabolic trafficking through astrocytic gap junctions. *Glia*, *21*(1), 114-123. Retrieved from <Go to ISI>://WOS:A1997XU47500013
- Gordon, A., Yoon, S. J., Tran, S. S., Makinson, C. D., Park, J. Y., Andersen, J., Valencia, A. M., Horvath, S., Xiao, X., Huguenard, J. R., Pasca, S. P., & Geschwind, D. H. (2021). Long-term maturation of human cortical organoids matches key early postnatal transitions. *Nature neuroscience*, *24*(3), 331-342. doi:10.1038/s41593-021-00802-y
- Grienberger, C., & Konnerth, A. (2012). Imaging calcium in neurons. *Neuron*, *73*(5), 862-885. doi:10.1016/j.neuron.2012.02.011
- Grobarczyk, B., Franco, B., Hanon, K., & Malgrange, B. (2015). Generation of Isogenic Human iPS Cell Line Precisely Corrected by Genome Editing Using the CRISPR/Cas9 System. *Stem Cell Reviews and Reports*, *11*(5), 774-787. doi:10.1007/s12015-015-9600-1
- Haack, N., Dublin, P., & Rose, C. R. (2014). Dysbalance of astrocyte calcium under hyperammonemic conditions. *PloS one*, *9*(8), e105832. doi:10.1371/journal.pone.0105832
- Hagiwara, N., & Sueoka, N. (1995). Regulation of the rat S100 β gene expression: The role of the 2 kb 5'-upstream sequence in glial specific expression. *Journal of neuroscience research*, *42*(5), 603-612.
- Hamann, S., Herrera-Perez, J. J., Zeuthen, T., & Alvarez-Leefmans, F. J. (2010). Cotransport of water by the Na⁺-K⁺-2Cl⁻ cotransporter NKCC1 in mammalian epithelial cells. *The Journal of physiology*, *588*(Pt 21), 4089-4101. doi:10.1113/jphysiol.2010.194738
- Hansen, D. V., Lui, J. H., Parker, P. R., & Kriegstein, A. R. (2010). Neurogenic radial glia in the outer subventricular zone of human neocortex. *Nature*, *464*(7288), 554-561. doi:10.1038/nature08845
- Herculano-Houzel, S. (2009). The human brain in numbers: a linearly scaled-up primate brain. *Frontiers in Human Neuroscience*, *3*, 31. doi:10.3389/neuro.09.031.2009
- Herculano-Houzel, S., Mota, B., & Lent, R. (2006). Cellular scaling rules for rodent brains. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *103*(32), 12138-12143. doi:10.1073/pnas.0604911103

- Hering, H., & Sheng, M. (2001). Dendritic spines: structure, dynamics and regulation. *Nature Reviews Neuroscience*, *2*(12), 880-888.
- Hickman, S., Izzy, S., Sen, P., Morsett, L., & El Khoury, J. (2018). Microglia in neurodegeneration. *Nature neuroscience*, *21*(10), 1359-1369. doi:10.1038/s41593-018-0242-x
- Hirrlinger, P. G., Wurm, A., Hirrlinger, J., Bringmann, A., & Reichenbach, A. (2008). Osmotic swelling characteristics of glial cells in the murine hippocampus, cerebellum, and retina in situ. *Journal of neurochemistry*, *105*(4), 1405-1417. doi:10.1111/j.1471-4159.2008.05243.x
- Hodge, R. D., Bakken, T. E., Miller, J. A., Smith, K. A., Barkan, E. R., Graybuck, L. T., Close, J. L., Long, B., Johansen, N., Penn, O., Yao, Z., Eggermont, J., Holt, T., Levi, B. P., Shehata, S. I., Aevermann, B., Beller, A., Bertagnolli, D., Brouner, K., Casper, T., Cobbs, C., Dalley, R., Dee, N., Ding, S. L., Ellenbogen, R. G., Fong, O., Garren, E., Goldy, J., Gwinn, R. P., Hirschstein, D., Keene, C. D., Keshk, M., Ko, A. L., Lathia, K., Mahfouz, A., Maltzer, Z., McGraw, M., Nguyen, T. N., Nyhus, J., Ojemann, J. G., Oldre, A., Parry, S., Reynolds, S., Rimorin, C., Shapovalova, N. V., Somasundaram, S., Szafer, A., Thomsen, E. R., Tieu, M., Quon, G., Scheuermann, R. H., Yuste, R., Sunkin, S. M., Lelieveldt, B., Feng, D., Ng, L., Bernard, A., Hawrylycz, M., Phillips, J. W., Tasic, B., Zeng, H., Jones, A. R., Koch, C., & Lein, E. S. (2019). Conserved cell types with divergent features in human versus mouse cortex. *Nature*, *573*(7772), 61-68. doi:10.1038/s41586-019-1506-7
- Humpel, C. (2015). Organotypic brain slice cultures: A review. *Neuroscience*, *305*, 86-98. doi:10.1016/j.neuroscience.2015.07.086
- Jeong, H. J., Jimenez, Z., Mukhambetiyar, K., Seo, M., Choi, J. W., & Park, T. E. (2020). Engineering Human Brain Organoids: From Basic Research to Tissue Regeneration. *Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, *17*(6), 747-757. doi:10.1007/s13770-020-00250-y
- Kadoshima, T., Sakaguchi, H., Nakano, T., Soen, M., Ando, S., Eiraku, M., & Sasai, Y. (2013). Self-organization of axial polarity, inside-out layer pattern, and species-specific progenitor dynamics in human ES cell-derived neocortex. *Proceedings of the National Academy of Sciences* *110*(50), 20284-20289. doi:10.1073/pnas.1315710110
- Kafitz, K. W., Meier, S. D., Stephan, J., & Rose, C. R. (2008). Developmental profile and properties of sulforhodamine 101--Labeled glial cells in acute brain slices of rat hippocampus. *Journal of Neuroscience Methods* *169*(1), 84-92. doi:10.1016/j.jneumeth.2007.11.022
- Kandel, E. R., Schwartz, J. H., Jessell, T. M., Siegelbaum, S., Hudspeth, A. J., & Mack, S. (2000). *Principles of neural science* (Vol. 4): McGraw-hill New York.
- Kapr, J., Petersilie, L., Distler, T., Lauria, I., Bendt, F., Sauter, C. M., Boccaccini, A. R., Rose, C. R., & Fritsche, E. (2021). Human Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Neural Progenitor Cells Produce Distinct Neural 3D In Vitro Models Depending on Alginate/Gellan Gum/Laminin Hydrogel Blend Properties. *Advanced Healthcare Materials*, *10*(16), e2100131. doi:10.1002/adhm.202100131
- Karus, C., Gerkau, N. J., & Rose, C. R. (2017). Differential contribution of GLAST and GLT-1 to network sodium signaling in the early postnatal hippocampus. *Opera Medica et Physiologica*(3-4), 71-83.
- Karus, C., Mondragao, M. A., Ziemens, D., & Rose, C. R. (2015). Astrocytes restrict discharge duration and neuronal sodium loads during recurrent network activity. *Glia*, *63*(6), 936-957. doi:10.1002/glia.22793
- Karzbrun, E., Kshirsagar, A., Cohen, S. R., Hanna, J. H., & Reiner, O. (2018). Human Brain Organoids on a Chip Reveal the Physics of Folding. *Nature Physics*, *14*(5), 515-522. doi:10.1038/s41567-018-0046-7

- Kelava, I., & Lancaster, M. A. (2016). Dishing out mini-brains: Current progress and future prospects in brain organoid research. *Developmental biology*, 420(2), 199-209. doi:10.1016/j.ydbio.2016.06.037
- Kelava, I., Lewitus, E., & Huttner, W. B. (2013). The secondary loss of gyrencephaly as an example of evolutionary phenotypical reversal. *Frontiers in neuroanatomy*, 7, 16.
- Kettenmann, H., Hanisch, U. K., Noda, M., & Verkhratsky, A. (2011). Physiology of microglia. *Physiological reviews*, 91(2), 461-553. doi:10.1152/physrev.00011.2010
- Kim, J. T., Cho, S. M., Youn, D. H., Hong, E. P., Park, C. H., Lee, Y., Jung, H., & Jeon, J. P. (2023). Therapeutic effect of a hydrogel-based neural stem cell delivery sheet for mild traumatic brain injury. *Acta Biomaterialia*, 167, 335-347. doi:10.1016/j.actbio.2023.06.027
- Kimelberg, H. K. (2005). Astrocytic swelling in cerebral ischemia as a possible cause of injury and target for therapy. *Glia*, 50(4), 389-397. doi:10.1002/glia.20174
- Klatzo, I. (1987). Pathophysiological aspects of brain edema. *Acta neuropathologica*, 72(3), 236-239. doi:10.1007/BF00691095
- Kola, I., & Landis, J. (2004). Can the pharmaceutical industry reduce attrition rates? *Nature reviews Drug discovery*, 3(8), 711-716.
- Lakowicz, J. R. (2006). *Principles of fluorescence spectroscopy*: Springer.
- Lancaster, M. A., & Knoblich, J. A. (2014). Generation of cerebral organoids from human pluripotent stem cells. *Nature protocols*, 9(10), 2329-2340. doi:10.1038/nprot.2014.158
- Lancaster, M. A., Renner, M., Martin, C. A., Wenzel, D., Bicknell, L. S., Hurler, M. E., Homfray, T., Penninger, J. M., Jackson, A. P., & Knoblich, J. A. (2013). Cerebral organoids model human brain development and microcephaly. *Nature*, 501(7467), 373-379. doi:10.1038/nature12517
- Lander, E. S., Linton, L. M., Birren, B., Nusbaum, C., Zody, M. C., Baldwin, J., Devon, K., Dewar, K., Doyle, M., FitzHugh, W., Funke, R., Gage, D., Harris, K., Heaford, A., Howland, J., Kann, L., LeHoczeky, J., LeVine, R., McEwan, P., McKernan, K., Meldrim, J., Mesirov, J. P., Miranda, C., Morris, W., Naylor, J., Raymond, C., Rosetti, M., Santos, R., Sheridan, A., Sougnez, C., Stange-Thomann, Y., Stojanovic, N., Subramanian, A., Wyman, D., Rogers, J., Sulston, J., Ainscough, R., Beck, S., Bentley, D., Burton, J., Clee, C., Carter, N., Coulson, A., Deadman, R., Deloukas, P., Dunham, A., Dunham, I., Durbin, R., French, L., Grafham, D., Gregory, S., Hubbard, T., Humphray, S., Hunt, A., Jones, M., Lloyd, C., McMurray, A., Matthews, L., Mercer, S., Milne, S., Mullikin, J. C., Mungall, A., Plumb, R., Ross, M., Shownkeen, R., Sims, S., Waterston, R. H., Wilson, R. K., Hillier, L. W., McPherson, J. D., Marra, M. A., Mardis, E. R., Fulton, L. A., Chinwalla, A. T., Pepin, K. H., Gish, W. R., Chissole, S. L., Wendl, M. C., Delehaunty, K. D., Miner, T. L., Delehaunty, A., Kramer, J. B., Cook, L. L., Fulton, R. S., Johnson, D. L., Minx, P. J., Clifton, S. W., Hawkins, T., Branscomb, E., Predki, P., Richardson, P., Wenning, S., Slezak, T., Doggett, N., Cheng, J. F., Olsen, A., Lucas, S., Elkin, C., Uberbacher, E., Frazier, M., Gibbs, R. A., Muzny, D. M., Scherer, S. E., Bouck, J. B., Sodergren, E. J., Worley, K. C., Rives, C. M., Gorrell, J. H., Metzker, M. L., Naylor, S. L., Kucherlapati, R. S., Nelson, D. L., Weinstock, G. M., Sakaki, Y., Fujiyama, A., Hattori, M., Yada, T., Toyoda, A., Itoh, T., Kawagoe, C., Watanabe, H., Totoki, Y., Taylor, T., Weissenbach, J., Heilig, R., Saurin, W., Artiguenave, F., Brottier, P., Bruls, T., Pelletier, E., Robert, C., Wincker, P., Smith, D. R., Doucette-Stamm, L., Rubenfield, M., Weinstock, K., Lee, H. M., Dubois, J., Rosenthal, A., Platzer, M., Nyakatura, G., Taudien, S., Rump, A., Yang, H., Yu, J., Wang, J., Huang, G., Gu, J., Hood, L., Rowen, L., Madan, A., Qin, S., Davis, R. W., Federspiel, N. A., Abola, A. P., Proctor, M. J., Myers, R. M., Schmutz, J., Dickson, M., Grimwood, J., Cox, D. R., Olson, M. V., Kaul, R., Raymond, C., Shimizu, N., Kawasaki, K.,

- Minoshima, S., Evans, G. A., Athanasiou, M., Schultz, R., Roe, B. A., Chen, F., Pan, H., Ramser, J., Lehrach, H., Reinhardt, R., McCombie, W. R., de la Bastide, M., Dedhia, N., Blocker, H., Hornischer, K., Nordsiek, G., Agarwala, R., Aravind, L., Bailey, J. A., Bateman, A., Batzoglou, S., Birney, E., Bork, P., Brown, D. G., Burge, C. B., Cerutti, L., Chen, H. C., Church, D., Clamp, M., Copley, R. R., Doerks, T., Eddy, S. R., Eichler, E. E., Furey, T. S., Galagan, J., Gilbert, J. G., Harmon, C., Hayashizaki, Y., Haussler, D., Hermjakob, H., Hokamp, K., Jang, W., Johnson, L. S., Jones, T. A., Kasif, S., Kasprzyk, A., Kennedy, S., Kent, W. J., Kitts, P., Koonin, E. V., Korf, I., Kulp, D., Lancet, D., Lowe, T. M., McLysaght, A., Mikkelsen, T., Moran, J. V., Mulder, N., Pollara, V. J., Ponting, C. P., Schuler, G., Schultz, J., Slater, G., Smit, A. F., Stupka, E., Szustakowki, J., Thierry-Mieg, D., Thierry-Mieg, J., Wagner, L., Wallis, J., Wheeler, R., Williams, A., Wolf, Y. I., Wolfe, K. H., Yang, S. P., Yeh, R. F., Collins, F., Guyer, M. S., Peterson, J., Felsenfeld, A., Wetterstrand, K. A., Patrinos, A., Morgan, M. J., de Jong, P., Catanese, J. J., Osoegawa, K., Shizuya, H., Choi, S., Chen, Y. J., Szustakowki, J., & International Human Genome Sequencing, C. (2001). Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature*, *409*(6822), 860-921. doi:10.1038/35057062
- Lasser-Ross, N., Miyakawa, H., Lev-Ram, V., Young, S. R., & Ross, W. N. (1991). High time resolution fluorescence imaging with a CCD camera. *Journal of neuroscience methods*, *36*(2-3), 253-261. doi:10.1016/0165-0270(91)90051-z
- Lauritzen, M., Dreier, J. P., Fabricius, M., Hartings, J. A., Graf, R., & Strong, A. J. (2011). Clinical relevance of cortical spreading depression in neurological disorders: migraine, malignant stroke, subarachnoid and intracranial hemorrhage, and traumatic brain injury. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, *31*(1), 17-35. doi:10.1038/jcbfm.2010.191
- Le, S., Petersilie, L., Inak, G., Menacho-Pando, C., Kafitz, K. W., Rybak-Wolf, A., Rajewsky, N., Rose, C. R., & Prigione, A. (2021). Generation of Human Brain Organoids for Mitochondrial Disease Modeling. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*(172), e62756. doi:10.3791/62756
- Lee, C. T., Bendriem, R. M., Wu, W. W., & Shen, R. F. (2017). 3D brain Organoids derived from pluripotent stem cells: promising experimental models for brain development and neurodegenerative disorders. *Journal of biomedical science*, *24*(1), 59. doi:10.1186/s12929-017-0362-8
- Lee, C. T., Chen, J., Kindberg, A. A., Bendriem, R. M., Spivak, C. E., Williams, M. P., Richie, C. T., Handreck, A., Mallon, B. S., Lupica, C. R., Lin, D. T., Harvey, B. K., Mash, D. C., & Freed, W. J. (2017). CYP3A5 Mediates Effects of Cocaine on Human Neocortigenesis: Studies using an In Vitro 3D Self-Organized hPSC Model with a Single Cortex-Like Unit. *Neuropsychopharmacology*, *42*(3), 774-784. doi:10.1038/npp.2016.156
- Lee, J. M., Zipfel, G. J., & Choi, D. W. (1999). The changing landscape of ischaemic brain injury mechanisms. *Nature*, *399*(6738 Suppl), A7-14. doi:10.1038/399a007
- Lee, K., Park, T. I., Heppner, P., Schweder, P., Mee, E. W., Dragunow, M., & Montgomery, J. M. (2020). Human in vitro systems for examining synaptic function and plasticity in the brain. *Journal of Neurophysiology*, *123*(3), 945-965. doi:10.1152/jn.00411.2019
- Lee, K. Y., & Mooney, D. J. (2012). Alginate: properties and biomedical applications. *Progress in polymer science*, *37*(1), 106-126. doi:10.1016/j.progpolymsci.2011.06.003
- Lenhossék, M. (1893). *Der feinere Bau des Nervensystems im Lichte neuester Forschungen*: Fischer.
- Lerchundi, R., Huang, N., & Rose, C. R. (2020). Quantitative Imaging of Changes in Astrocytic and Neuronal Adenosine Triphosphate Using Two Different Variants of ATeam. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, *14*, 80. doi:10.3389/fncel.2020.00080

- Lerchundi, R., Kafitz, K. W., Farfers, M., Beyer, F., Huang, N., & Rose, C. R. (2019). Imaging of Intracellular ATP in Organotypic Tissue Slices of the Mouse Brain using the FRET-based Sensor ATeam1.03YEMK. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*(154), e60294. doi:10.3791/60294
- Lerchundi, R., Kafitz, K. W., Winkler, U., Färfers, M., Hirrlinger, J., & Rose, C. R. (2019). FRET-based imaging of intracellular ATP in organotypic brain slices. *Journal of neuroscience research*, 97(8), 933-945.
- Lewitus, E., Kelava, I., & Huttner, W. B. (2013). Conical expansion of the outer subventricular zone and the role of neocortical folding in evolution and development. *Frontiers in Human Neuroscience*, 7, 424.
- Li, Y., Muffat, J., Omer, A., Bosch, I., Lancaster, M. A., Sur, M., Gehrke, L., Knoblich, J. A., & Jaenisch, R. (2017). Induction of Expansion and Folding in Human Cerebral Organoids. *Cell stem cell*, 20(3), 385-396 e383. doi:10.1016/j.stem.2016.11.017
- Liang, D., Bhatta, S., Gerzanich, V., & Simard, J. M. (2007). Cytotoxic edema: mechanisms of pathological cell swelling. *Neurosurgical focus*, 22(5), E2. doi:10.3171/foc.2007.22.5.3
- Lin, J. H., Weigel, H., Cotrina, M. L., Liu, S., Bueno, E., Hansen, A. J., Hansen, T. W., Goldman, S., & Nedergaard, M. (1998). Gap-junction-mediated propagation and amplification of cell injury. *Nature neuroscience*, 1(6), 494-500. doi:10.1038/2210
- Liu, Y., Shen, X., Zhang, Y., Zheng, X., Cepeda, C., Wang, Y., Duan, S., & Tong, X. (2023). Interactions of glial cells with neuronal synapses, from astrocytes to microglia and oligodendrocyte lineage cells. *Glia*, 71(6), 1383-1401. doi:10.1002/glia.24343
- Lorenz, C., Zink, A., Henke, M. T., Staeger, S., Mlody, B., Bunning, M., Wanker, E., Diecke, S., Schuelke, M., & Prigione, A. (2022). Generation of four iPSC lines from four patients with Leigh syndrome carrying homoplasmic mutations m.8993T > G or m.8993T > C in the mitochondrial gene MT-ATP6. *Stem Cell Research*, 61, 102742. doi:10.1016/j.scr.2022.102742
- Lovett, M. L., Nieland, T. J. F., Dingle, Y. L., & Kaplan, D. L. (2020). Innovations in 3-Dimensional Tissue Models of Human Brain Physiology and Diseases. *Advanced functional materials*, 30(44), 1909146. doi:10.1002/adfm.201909146
- Lyck, L., Dalmau, I., Chemnitz, J., Finsen, B., & Schroder, H. D. (2008). Immunohistochemical markers for quantitative studies of neurons and glia in human neocortex. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* 56(3), 201-221. doi:10.1369/jhc.7A7187.2007
- MacAulay, N., Hamann, S., & Zeuthen, T. (2004). Water transport in the brain: role of cotransporters. *Neuroscience*, 129(4), 1031-1044. doi:10.1016/j.neuroscience.2004.06.045
- MacAulay, N., & Zeuthen, T. (2010). Water transport between CNS compartments: contributions of aquaporins and cotransporters. *Neuroscience*, 168(4), 941-956. doi:10.1016/j.neuroscience.2009.09.016
- Mansour, A. A., Gonçalves, J. T., Bloyd, C. W., Li, H., Fernandes, S., Quang, D., Johnston, S., Parylak, S. L., Jin, X., & Gage, F. H. (2018). An in vivo model of functional and vascularized human brain organoids. *Nature Biotechnology*, 36(5), 432-441.
- Marambaud, P., Dreses-Werringloer, U., & Vingtdeux, V. (2009). Calcium signaling in neurodegeneration. *Molecular neurodegeneration*, 4(1), 20. doi:10.1186/1750-1326-4-20
- Mariani, J., Coppola, G., Zhang, P., Abyzov, A., Provini, L., Tomasini, L., Amenduni, M., Szekely, A., Palejev, D., Wilson, M., Gerstein, M., Grigorenko, E. L., Chawarska, K., Pelphrey, K. A., Howe, J. R., & Vaccarino, F. M. (2015). FOXP1-Dependent Dysregulation of

- GABA/Glutamate Neuron Differentiation in Autism Spectrum Disorders. *Cell*, 162(2), 375-390. doi:10.1016/j.cell.2015.06.034
- Marton, R. M., Miura, Y., Sloan, S. A., Li, Q., Revah, O., Levy, R. J., Huguenard, J. R., & Pasca, S. P. (2019). Differentiation and maturation of oligodendrocytes in human three-dimensional neural cultures. *Nature neuroscience*, 22(3), 484-491. doi:10.1038/s41593-018-0316-9
- Miura, Y., Li, M. Y., Birey, F., Ikeda, K., Revah, O., Thete, M. V., Park, J. Y., Puno, A., Lee, S. H., Porteus, M. H., & Pasca, S. P. (2020). Generation of human striatal organoids and cortico-striatal assembloids from human pluripotent stem cells. *Nature Biotechnology*, 38(12), 1421-1430. doi:10.1038/s41587-020-00763-w
- Moskowitz, M. A., Lo, E. H., & Iadecola, C. (2010). The science of stroke: mechanisms in search of treatments. *Neuron*, 67(2), 181-198. doi:10.1016/j.neuron.2010.07.002
- Mota, B., & Herculano-Houzel, S. (2015). BRAIN STRUCTURE. Cortical folding scales universally with surface area and thickness, not number of neurons. *Science*, 349(6243), 74-77. doi:10.1126/science.aaa9101
- Mouse Genome Sequencing Consortium, Waterston, R. H., Lindblad-Toh, K., Birney, E., Rogers, J., Abril, J. F., Agarwal, P., Agarwala, R., Ainscough, R., Alexandersson, M., An, P., Antonarakis, S. E., Attwood, J., Baertsch, R., Bailey, J., Barlow, K., Beck, S., Berry, E., Birren, B., Bloom, T., Bork, P., Botcherby, M., Bray, N., Brent, M. R., Brown, D. G., Brown, S. D., Bult, C., Burton, J., Butler, J., Campbell, R. D., Carninci, P., Cawley, S., Chiaromonte, F., Chinwalla, A. T., Church, D. M., Clamp, M., Clee, C., Collins, F. S., Cook, L. L., Copley, R. R., Coulson, A., Couronne, O., Cuff, J., Curwen, V., Cutts, T., Daly, M., David, R., Davies, J., Delehaunty, K. D., Deri, J., Dermitzakis, E. T., Dewey, C., Dickens, N. J., Diekhans, M., Dodge, S., Dubchak, I., Dunn, D. M., Eddy, S. R., Elnitski, L., Emes, R. D., Eswara, P., Eyas, E., Felsenfeld, A., Fewell, G. A., Flicek, P., Foley, K., Frankel, W. N., Fulton, L. A., Fulton, R. S., Furey, T. S., Gage, D., Gibbs, R. A., Glusman, G., Gnerre, S., Goldman, N., Goodstadt, L., Grafham, D., Graves, T. A., Green, E. D., Gregory, S., Guigo, R., Guyer, M., Hardison, R. C., Haussler, D., Hayashizaki, Y., Hillier, L. W., Hinrichs, A., Hlavina, W., Holzer, T., Hsu, F., Hua, A., Hubbard, T., Hunt, A., Jackson, I., Jaffe, D. B., Johnson, L. S., Jones, M., Jones, T. A., Joy, A., Kamal, M., Karlsson, E. K., Karolchik, D., Kasprzyk, A., Kawai, J., Keibler, E., Kells, C., Kent, W. J., Kirby, A., Kolbe, D. L., Korf, I., Kucherlapati, R. S., Kulbokas, E. J., Kulp, D., Landers, T., Leger, J. P., Leonard, S., Letunic, I., Levine, R., Li, J., Li, M., Lloyd, C., Lucas, S., Ma, B., Maglott, D. R., Mardis, E. R., Matthews, L., Mauceli, E., Mayer, J. H., McCarthy, M., McCombie, W. R., McLaren, S., McLay, K., McPherson, J. D., Meldrim, J., Meredith, B., Mesirov, J. P., Miller, W., Miner, T. L., Mongin, E., Montgomery, K. T., Morgan, M., Mott, R., Mullikin, J. C., Muzny, D. M., Nash, W. E., Nelson, J. O., Nhan, M. N., Nicol, R., Ning, Z., Nusbaum, C., O'Connor, M. J., Okazaki, Y., Oliver, K., Overton-Larty, E., Pachter, L., Parra, G., Pepin, K. H., Peterson, J., Pevzner, P., Plumb, R., Pohl, C. S., Poliakov, A., Ponce, T. C., Ponting, C. P., Potter, S., Quail, M., Raymond, A., Roe, B. A., Roskin, K. M., Rubin, E. M., Rust, A. G., Santos, R., Sapojnikov, V., Schultz, B., Schultz, J., Schwartz, M. S., Schwartz, S., Scott, C., Seaman, S., Searle, S., Sharpe, T., Sheridan, A., Shownkeen, R., Sims, S., Singer, J. B., Slater, G., Smit, A., Smith, D. R., Spencer, B., Stabenau, A., Stange-Thomann, N., Sugnet, C., Suyama, M., Tesler, G., Thompson, J., Torrents, D., Trevaskis, E., Tromp, J., Ucla, C., Ureta-Vidal, A., Vinson, J. P., Von Niederhausern, A. C., Wade, C. M., Wall, M., Weber, R. J., Weiss, R. B., Wendl, M. C., West, A. P., Wetterstrand, K., Wheeler, R., Whelan, S., Wierzbowski, J., Willey, D., Williams, S., Wilson, R. K., Winter, E., Worley, K. C., Wyman, D., Yang, S., Yang, S. P., Zdobnov, E. M., Zody, M. C., & Lander, E. S. (2002).

- Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome. *Nature*, 420(6915), 520-562. doi:10.1038/nature01262
- Muguruma, K., Nishiyama, A., Kawakami, H., Hashimoto, K., & Sasai, Y. (2015). Self-organization of polarized cerebellar tissue in 3D culture of human pluripotent stem cells. *Cell reports*, 10(4), 537-550. doi:10.1016/j.celrep.2014.12.051
- Murray, C. J., & Lopez, A. D. (1997). Mortality by cause for eight regions of the world: Global Burden of Disease Study. *The lancet*, 349(9061), 1269-1276. doi:10.1016/S0140-6736(96)07493-4
- Nakase, T., Fushiki, S., Sohl, G., Theis, M., Willecke, K., & Naus, C. C. (2003). Neuroprotective role of astrocytic gap junctions in ischemic stroke. *Cell communication & adhesion*, 10(4-6), 413-417. doi:10.1080/cac.10.4-6.413.417
- Nickel, R., & Forge, A. (2008). Gap junctions and connexins in the inner ear: their roles in homeostasis and deafness. *Current Opinion in Otolaryngology & Head and Neck Surger*, 16(5), 452-457. doi:10.1097/MOO.0b013e32830e20b0
- Nimmerjahn, A., Kirchhoff, F., & Helmchen, F. (2005). Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma in vivo. *Science*, 308(5726), 1314-1318. doi:10.1126/science.1110647
- Nimmerjahn, A., Kirchhoff, F., Kerr, J. N., & Helmchen, F. (2004). Sulforhodamine 101 as a specific marker of astroglia in the neocortex in vivo. *Nature methods*, 1(1), 31-37. doi:10.1038/nmeth706
- Nishiyama, A., Komitova, M., Suzuki, R., & Zhu, X. (2009). Polydendrocytes (NG2 cells): multifunctional cells with lineage plasticity. *Nature Reviews Neuroscience*, 10(1), 9-22. doi:10.1038/nrn2495
- Nishiyama, A., Watanabe, M., Yang, Z., & Bu, J. (2002). Identity, distribution, and development of polydendrocytes: NG2-expressing glial cells. *Journal of Neurocytology* 31(6-7), 437-455. doi:10.1023/a:1025783412651
- Nowakowski, T. J., Pollen, A. A., Sandoval-Espinosa, C., & Kriegstein, A. R. (2016). Transformation of the Radial Glia Scaffold Demarcates Two Stages of Human Cerebral Cortex Development. *Neuron*, 91(6), 1219-1227. doi:10.1016/j.neuron.2016.09.005
- Oberheim, N. A., Goldman, S. A., & Nedergaard, M. (2012). Heterogeneity of astrocytic form and function. *Methods in Molecular Biology*, 814, 23-45. doi:10.1007/978-1-61779-452-0_3
- Panickar, K. S., & Norenberg, M. D. (2005). Astrocytes in cerebral ischemic injury: morphological and general considerations. *Glia*, 50(4), 287-298. doi:10.1002/glia.20181
- Pape, N., & Rose, C. R. (2023). Activation of TRPV4 channels promotes the loss of cellular ATP in organotypic slices of the mouse neocortex exposed to chemical ischemia. *The Journal of physiology*, 601(14), 2975-2990. doi:10.1113/JP284430
- Paredes, R. M., Etzler, J. C., Watts, L. T., Zheng, W., & Lechleiter, J. D. (2008). Chemical calcium indicators. *Methods*, 46(3), 143-151. doi:10.1016/j.ymeth.2008.09.025
- Pasca, S. P. (2019). Assembling human brain organoids. *Science*, 363(6423), 126-127. doi:10.1126/science.aau5729
- Passarelli, J. P., Nimjee, S. M., & Townsend, K. L. (2022). Stroke and Neurogenesis: Bridging Clinical Observations to New Mechanistic Insights from Animal Models. *Translational Stroke Research*. doi:10.1007/s12975-022-01109-1
- Passaro, A. P., & Stice, S. L. (2020). Electrophysiological Analysis of Brain Organoids: Current Approaches and Advancements. *Frontiers in Neuroscience*, 14, 622137. doi:10.3389/fnins.2020.622137

- Pellegrini, L., Albecka, A., Mallery, D. L., Kellner, M. J., Paul, D., Carter, A. P., James, L. C., & Lancaster, M. A. (2020). SARS-CoV-2 Infects the Brain Choroid Plexus and Disrupts the Blood-CSF Barrier in Human Brain Organoids. *Cell stem cell*, 27(6), 951-961 e955. doi:10.1016/j.stem.2020.10.001
- Pellegrini, L., Bonfio, C., Chadwick, J., Begum, F., Skehel, M., & Lancaster, M. A. (2020). Human CNS barrier-forming organoids with cerebrospinal fluid production. *Science*, 369(6500), eaaz5626. doi:10.1126/science.aaz5626
- Peracchia, C. (2004). Chemical gating of gap junction channels; roles of calcium, pH and calmodulin. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes* 1662(1-2), 61-80. doi:10.1016/j.bbamem.2003.10.020
- Perea, G., Navarrete, M., & Araque, A. (2009). Tripartite synapses: astrocytes process and control synaptic information. *Trends in neurosciences*, 32(8), 421-431. doi:10.1016/j.tins.2009.05.001
- Perlman, R. L. (2016). Mouse models of human disease: an evolutionary perspective. *Evolution, medicine, and public health*, 2016(1), 170-176.
- Petersilie, L., Heiduschka, S., Nelson, J. S. E., Neu, L. A., Le, S., Anand, R., Kafitz, K. W., Prigione, A., & Rose, C. R. Cortical brain organoid slices (cBOS) are a robust model system for the functional study of human-derived neural cells in intact minimal networks. *iScience*; in Revision.
- Pham, M. T., Pollock, K. M., Rose, M. D., Cary, W. A., Stewart, H. R., Zhou, P., Nolta, J. A., & Waldau, B. (2018). Generation of human vascularized brain organoids. *Neuroreport*, 29(7), 588.
- Pietrobon, D., & Moskowitz, M. A. (2014). Chaos and commotion in the wake of cortical spreading depression and spreading depolarizations. *Nature Reviews Neuroscience*, 15(6), 379-393. doi:10.1038/nrn3770
- Pilati, N., Barker, M., Panteleimonitis, S., Donga, R., & Hamann, M. (2008). A rapid method combining Golgi and Nissl staining to study neuronal morphology and cytoarchitecture. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 56(6), 539-550. doi:10.1369/jhc.2008.950246
- Pollen, A. A., Bhaduri, A., Andrews, M. G., Nowakowski, T. J., Meyerson, O. S., Mostajo-Radji, M. A., Di Lullo, E., Alvarado, B., Bedolli, M., Dougherty, M. L., Fiddes, I. T., Kronenberg, Z. N., Shuga, J., Leyrat, A. A., West, J. A., Bershteyn, M., Lowe, C. B., Pavlovic, B. J., Salama, S. R., Haussler, D., Eichler, E. E., & Kriegstein, A. R. (2019). Establishing Cerebral Organoids as Models of Human-Specific Brain Evolution. *Cell*, 176(4), 743-756 e717. doi:10.1016/j.cell.2019.01.017
- Pollen, A. A., Nowakowski, T. J., Chen, J., Retallack, H., Sandoval-Espinosa, C., Nicholas, C. R., Shuga, J., Liu, S. J., Oldham, M. C., Diaz, A., Lim, D. A., Leyrat, A. A., West, J. A., & Kriegstein, A. R. (2015). Molecular identity of human outer radial glia during cortical development. *Cell*, 163(1), 55-67. doi:10.1016/j.cell.2015.09.004
- Purves, D., Augustine, G. J., Fitzpatrick, D., Hall, W. C., LaMantia, A.-S., McNamara, J. O., & Williams, S. M. (2004). *Neuroscience*, 3rd ed. Sunderland, MA, US: Sinauer Associates.
- Qian, X., Song, H., & Ming, G. L. (2019). Brain organoids: advances, applications and challenges. *Development*, 146(8), dev166074. doi:10.1242/dev.166074
- Quadrato, G., Nguyen, T., Macosko, E. Z., Sherwood, J. L., Min Yang, S., Berger, D. R., Maria, N., Scholvin, J., Goldman, M., Kinney, J. P., Boyden, E. S., Lichtman, J. W., Williams, Z. M., McCarroll, S. A., & Arlotta, P. (2017). Cell diversity and network dynamics in photosensitive human brain organoids. *Nature*, 545(7652), 48-53. doi:10.1038/nature22047

- Rakers, C., & Petzold, G. C. (2017). Astrocytic calcium release mediates peri-infarct depolarizations in a rodent stroke model. *The Journal of Clinical Investigation*, *127*(2), 511-516. doi:10.1172/JCI89354
- Ramos-Vara, J. A. (2005). Technical aspects of immunohistochemistry. *Veterinary pathology*, *42*(4), 405-426. doi:10.1354/vp.42-4-405
- Ransohoff, R. M., & Cardona, A. E. (2010). The myeloid cells of the central nervous system parenchyma. *Nature*, *468*(7321), 253-262. doi:10.1038/nature09615
- Revah, O., Gore, F., Kelley, K. W., Andersen, J., Sakai, N., Chen, X., Li, M. Y., Birey, F., Yang, X., Saw, N. L., Baker, S. W., Amin, N. D., Kulkarni, S., Mudipalli, R., Cui, B., Nishino, S., Grant, G. A., Knowles, J. K., Shamloo, M., Huguenard, J. R., Deisseroth, K., & Pasca, S. P. (2022). Maturation and circuit integration of transplanted human cortical organoids. *Nature*, *610*(7931), 319-326. doi:10.1038/s41586-022-05277-w
- Risher, W. C., Andrew, R. D., & Kirov, S. A. (2009). Real-time passive volume responses of astrocytes to acute osmotic and ischemic stress in cortical slices and in vivo revealed by two-photon microscopy. *Glia*, *57*(2), 207-221. doi:10.1002/glia.20747
- Rossi, D. J., Brady, J. D., & Mohr, C. (2007). Astrocyte metabolism and signaling during brain ischemia. *Nature neuroscience*, *10*(11), 1377-1386. doi:10.1038/nn2004
- Russell, W. M. S., & Burch, R. L. (1959). *The principles of humane experimental technique*: Methuen.
- Sakaguchi, H., Kadoshima, T., Soen, M., Narii, N., Ishida, Y., Ohgushi, M., Takahashi, J., Eiraku, M., & Sasai, Y. (2015). Generation of functional hippocampal neurons from self-organizing human embryonic stem cell-derived dorsomedial telencephalic tissue. *Nature communications*, *6*(1), 8896. doi:10.1038/ncomms9896
- Samarasinghe, R. A., Miranda, O. A., Buth, J. E., Mitchell, S., Ferando, I., Watanabe, M., Allison, T. F., Kurdian, A., Fotion, N. N., Gandal, M. J., Golshani, P., Plath, K., Lowry, W. E., Parent, J. M., Mody, I., & Novitsch, B. G. (2021). Identification of neural oscillations and epileptiform changes in human brain organoids. *Nature neuroscience*, *24*(10), 1488-1500. doi:10.1038/s41593-021-00906-5
- Schafer, S. T., Mansour, A. A., Schlachetzki, J. C. M., Pena, M., Ghassemzadeh, S., Mitchell, L., Mar, A., Quang, D., Stumpf, S., Ortiz, I. S., Lana, A. J., Baek, C., Zaghal, R., Glass, C. K., Nimmerjahn, A., & Gage, F. H. (2023). An in vivo neuroimmune organoid model to study human microglia phenotypes. *Cell*, *186*(10), 2111-2126 e2120. doi:10.1016/j.cell.2023.04.022
- Schnell, C., Hagos, Y., & Hulsmann, S. (2012). Active sulforhodamine 101 uptake into hippocampal astrocytes. *PloS one*, *7*(11), e49398. doi:10.1371/journal.pone.0049398
- Schnell, C., Shahmoradi, A., Wichert, S. P., Mayerl, S., Hagos, Y., Heuer, H., Rossner, M. J., & Hulsmann, S. (2015). The multispecific thyroid hormone transporter OATP1C1 mediates cell-specific sulforhodamine 101-labeling of hippocampal astrocytes. *Brain Structure and Function*, *220*(1), 193-203. doi:10.1007/s00429-013-0645-0
- Schröder, H., Moser, N., & Huguenberger, S. (2020). *Neuroanatomy of the mouse: An introduction*: Springer Nature.
- Schwarz, N., Hedrich, U. B. S., Schwarz, H., P, A. H., Dammeier, N., Auffenberg, E., Bedogni, F., Honegger, J. B., Lerche, H., Wuttke, T. V., & Koch, H. (2017). Human Cerebrospinal fluid promotes long-term neuronal viability and network function in human neocortical organotypic brain slice cultures. *Scientific reports*, *7*(1), 12249. doi:10.1038/s41598-017-12527-9

- Scott, G., & Huang, Y. (2022). Engineering cerebral folding in brain organoids. *Neural Regeneration Research*, 17(11), 2420-2422. doi:10.4103/1673-5374.335789
- Seto, Y., & Eiraku, M. (2019). Human brain development and its in vitro recapitulation. *Neuroscience Research*, 138, 33-42. doi:https://doi.org/10.1016/j.neures.2018.09.011
- Sharf, T., van der Molen, T., Glasauer, S. M. K., Guzman, E., Buccino, A. P., Luna, G., Cheng, Z., Audouard, M., Ranasinghe, K. G., Kudo, K., Nagarajan, S. S., Tovar, K. R., Petzold, L. R., Hierlemann, A., Hansma, P. K., & Kosik, K. S. (2022). Functional neuronal circuitry and oscillatory dynamics in human brain organoids. *Nature communications*, 13(1), 4403. doi:10.1038/s41467-022-32115-4
- Shepherd, G. M. (2015). *Foundations of the neuron doctrine*: Oxford University Press.
- Simard, M., & Nedergaard, M. (2004). The neurobiology of glia in the context of water and ion homeostasis. *Neuroscience*, 129(4), 877-896. doi:10.1016/j.neuroscience.2004.09.053
- Smith, A. M., Shelton, R. M., Perrie, Y., & Harris, J. J. (2007). An initial evaluation of gellan gum as a material for tissue engineering applications. *Journal of Biomaterials Applications*, 22(3), 241-254. doi:10.1177/0885328207076522
- Smithies, O. (1993). Animal models of human genetic diseases. *Trends in Genetics*, 9(4), 112-116. doi:10.1016/0168-9525(93)90204-u
- Smithies, O., Gregg, R. G., Boggs, S. S., Koralewski, M. A., & Kucherlapati, R. S. (1985). Insertion of DNA-Sequences into the Human Chromosomal Beta-Globin Locus by Homologous Recombination. *Nature*, 317(6034), 230-234. doi:DOI 10.1038/317230a0
- Soldner, F., & Jaenisch, R. (2012). Medicine. iPSC disease modeling. *Science*, 338(6111), 1155-1156. doi:10.1126/science.1227682
- Sommer, C. J. (2017). Ischemic stroke: experimental models and reality. *Acta neuropathologica*, 133(2), 245-261.
- Sozzi, E., Kajtez, J., Bruzelius, A., Wesseler, M. F., Nilsson, F., Birtele, M., Larsen, N. B., Ottosson, D. R., Storm, P., Parmar, M., & Fiorenzano, A. (2022). Silk scaffolding drives self-assembly of functional and mature human brain organoids. *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 10, 1023279. doi:10.3389/fcell.2022.1023279
- Spitzer, N. C. (2006). Electrical activity in early neuronal development. *Nature*, 444(7120), 707-712. doi:10.1038/nature05300
- Sterneckert, J. L., Reinhardt, P., & Scholer, H. R. (2014). Investigating human disease using stem cell models. *Nature Reviews Genetics*, 15(9), 625-639. doi:10.1038/nrg3764
- Stoppini, L., Buchs, P. A., & Muller, D. (1991). A simple method for organotypic cultures of nervous tissue. *Journal of neuroscience methods*, 37(2), 173-182. doi:10.1016/0165-0270(91)90128-m
- Sullivan, S., Stacey, G. N., Akazawa, C., Aoyama, N., Baptista, R., Bedford, P., Bennaceur Griscelli, A., Chandra, A., Elwood, N., Girard, M., Kawamata, S., Hanatani, T., Latsis, T., Lin, S., Ludwig, T. E., Malygina, T., Mack, A., Mountford, J. C., Noggle, S., Pereira, L. V., Price, J., Sheldon, M., Srivastava, A., Stachelscheid, H., Velayudhan, S. R., Ward, N. J., Turner, M. L., Barry, J., & Song, J. (2018). Quality control guidelines for clinical-grade human induced pluripotent stem cell lines. *Regenerative Medicine*, 13(7), 859-866. doi:10.2217/rme-2018-0095
- Szebenyi, K., Wenger, L. M. D., Sun, Y., Dunn, A. W. E., Limegrover, C. A., Gibbons, G. M., Conci, E., Paulsen, O., Mierau, S. B., Balmus, G., & Lakatos, A. (2021). Human ALS/FTD brain organoid slice cultures display distinct early astrocyte and targetable neuronal pathology. *Nature neuroscience*, 24(11), 1542-1554. doi:10.1038/s41593-021-00923-4

- Takahashi, K., Tanabe, K., Ohnuki, M., Narita, M., Ichisaka, T., Tomoda, K., & Yamanaka, S. (2007). Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell*, *131*(5), 861-872. doi:10.1016/j.cell.2007.11.019
- Takahashi, K., & Yamanaka, S. (2006). Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*, *126*(4), 663-676. doi:10.1016/j.cell.2006.07.024
- Tallinen, T., Chung, J. Y., Biggins, J. S., & Mahadevan, L. (2014). Gyrfication from constrained cortical expansion. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *111*(35), 12667-12672. doi:10.1073/pnas.1406015111
- Thomas, K. R., & Capecchi, M. R. (1987). Site-directed mutagenesis by gene targeting in mouse embryo-derived stem cells. *Cell*, *51*(3), 503-512.
- Thomas, K. R., Folger, K. R., & Capecchi, M. R. (1986). High frequency targeting of genes to specific sites in the mammalian genome. *Cell*, *44*(3), 419-428. doi:10.1016/0092-8674(86)90463-0
- Trujillo, C. A., Gao, R., Negraes, P. D., Gu, J., Buchanan, J., Preissl, S., Wang, A., Wu, W., Haddad, G. G., Chaim, I. A., Domissy, A., Vandenberghe, M., Devor, A., Yeo, G. W., Voytek, B., & Muotri, A. R. (2019). Complex Oscillatory Waves Emerging from Cortical Organoids Model Early Human Brain Network Development. *Cell stem cell*, *25*(4), 558-569 e557. doi:10.1016/j.stem.2019.08.002
- Tsien, R. Y. (1980). New calcium indicators and buffers with high selectivity against magnesium and protons: design, synthesis, and properties of prototype structures. *Biochemistry*, *19*(11), 2396-2404. doi:10.1021/bi00552a018
- Tsien, R. Y. (1981). A Non-Disruptive Technique for Loading Calcium Buffers and Indicators into Cells. *Nature*, *290*(5806), 527-528. doi:DOI 10.1038/290527a0
- Unterberg, A. W., Stover, J., Kress, B., & Kiening, K. L. (2004). Edema and brain trauma. *Neuroscience*, *129*(4), 1021-1029. doi:10.1016/j.neuroscience.2004.06.046
- van Putten, M. J. A. M., Fahlke, C., Kafitz, K. W., Hofmeijer, J., & Rose, C. R. (2021). Dysregulation of Astrocyte Ion Homeostasis and Its Relevance for Stroke-Induced Brain Damage. *International journal of molecular sciences*, *22*(11), 5679. doi:10.3390/ijms22115679
- Velasco, S., Kedaigle, A. J., Simmons, S. K., Nash, A., Rocha, M., Quadrato, G., Paulsen, B., Nguyen, L., Adiconis, X., Regev, A., Levin, J. Z., & Arlotta, P. (2019). Individual brain organoids reproducibly form cell diversity of the human cerebral cortex. *Nature*, *570*(7762), 523-527. doi:10.1038/s41586-019-1289-x
- Venter, J. C., Adams, M. D., Myers, E. W., Li, P. W., Mural, R. J., Sutton, G. G., Smith, H. O., Yandell, M., Evans, C. A., Holt, R. A., Gocayne, J. D., Amanatides, P., Ballew, R. M., Huson, D. H., Wortman, J. R., Zhang, Q., Kodira, C. D., Zheng, X. H., Chen, L., Skupski, M., Subramanian, G., Thomas, P. D., Zhang, J., Gabor Miklos, G. L., Nelson, C., Broder, S., Clark, A. G., Nadeau, J., McKusick, V. A., Zinder, N., Levine, A. J., Roberts, R. J., Simon, M., Slayman, C., Hunkapiller, M., Bolanos, R., Delcher, A., Dew, I., Fasulo, D., Flanigan, M., Florea, L., Halpern, A., Hannenhalli, S., Kravitz, S., Levy, S., Mobarry, C., Reinert, K., Remington, K., Abu-Threideh, J., Beasley, E., Biddick, K., Bonazzi, V., Brandon, R., Cargill, M., Chandramouliswaran, I., Charlab, R., Chaturvedi, K., Deng, Z., Di Francesco, V., Dunn, P., Eilbeck, K., Evangelista, C., Gabrielian, A. E., Gan, W., Ge, W., Gong, F., Gu, Z., Guan, P., Heiman, T. J., Higgins, M. E., Ji, R. R., Ke, Z., Ketchum, K. A., Lai, Z., Lei, Y., Li, Z., Li, J., Liang, Y., Lin, X., Lu, F., Merkulov, G. V., Milshina, N., Moore, H. M., Naik, A. K., Narayan, V. A., Neelam, B., Nusskern, D., Rusch, D. B., Salzberg, S., Shao, W., Shue, B., Sun, J., Wang, Z., Wang, A., Wang, X., Wang, J., Wei, M., Wides, R., Xiao, C., Yan, C., Yao, A., Ye, J., Zhan, M.,

- Zhang, W., Zhang, H., Zhao, Q., Zheng, L., Zhong, F., Zhong, W., Zhu, S., Zhao, S., Gilbert, D., Baumhueter, S., Spier, G., Carter, C., Cravchik, A., Woodage, T., Ali, F., An, H., Awe, A., Baldwin, D., Baden, H., Barnstead, M., Barrow, I., Beeson, K., Busam, D., Carver, A., Center, A., Cheng, M. L., Curry, L., Danaher, S., Davenport, L., Desilets, R., Dietz, S., Dodson, K., Doup, L., Ferriera, S., Garg, N., Gluecksmann, A., Hart, B., Haynes, J., Haynes, C., Heiner, C., Hladun, S., Hostin, D., Houck, J., Howland, T., Ibegwam, C., Johnson, J., Kalush, F., Kline, L., Koduru, S., Love, A., Mann, F., May, D., McCawley, S., McIntosh, T., McMullen, I., Moy, M., Moy, L., Murphy, B., Nelson, K., Pfannkoch, C., Pratts, E., Puri, V., Qureshi, H., Reardon, M., Rodriguez, R., Rogers, Y. H., Romblad, D., Ruhfel, B., Scott, R., Sitter, C., Smallwood, M., Stewart, E., Strong, R., Suh, E., Thomas, R., Tint, N. N., Tse, S., Vech, C., Wang, G., Wetter, J., Williams, S., Williams, M., Windsor, S., Winn-Deen, E., Wolfe, K., Zaveri, J., Zaveri, K., Abril, J. F., Guigo, R., Campbell, M. J., Sjolander, K. V., Karlak, B., Kejariwal, A., Mi, H., Lazareva, B., Hatton, T., Narechania, A., Diemer, K., Muruganujan, A., Guo, N., Sato, S., Bafna, V., Istrail, S., Lippert, R., Schwartz, R., Walenz, B., Yooseph, S., Allen, D., Basu, A., Baxendale, J., Blick, L., Caminha, M., Carnes-Stine, J., Caulk, P., Chiang, Y. H., Coyne, M., Dahlke, C., Deslattes Mays, A., Dombroski, M., Donnelly, M., Ely, D., Esparham, S., Fosler, C., Gire, H., Glanowski, S., Glasser, K., Glodek, A., Gorokhov, M., Graham, K., Gropman, B., Harris, M., Heil, J., Henderson, S., Hoover, J., Jennings, D., Jordan, C., Jordan, J., Kasha, J., Kagan, L., Kraft, C., Levitsky, A., Lewis, M., Liu, X., Lopez, J., Ma, D., Majoros, W., McDaniel, J., Murphy, S., Newman, M., Nguyen, T., Nguyen, N., Nodell, M., Pan, S., Peck, J., Peterson, M., Rowe, W., Sanders, R., Scott, J., Simpson, M., Smith, T., Sprague, A., Stockwell, T., Turner, R., Venter, E., Wang, M., Wen, M., Wu, D., Wu, M., Xia, A., Zandieh, A., & Zhu, X. (2001). The sequence of the human genome. *Science*, *291*(5507), 1304-1351. doi:10.1126/science.1058040
- Verkhratsky, A., & Nedergaard, M. (2018). Physiology of Astroglia. *Physiol Rev*, *98*(1), 239-389. doi:10.1152/physrev.00042.2016
- Virchow, R. (1858). *Die Cellularpathologie in ihrer Begründung auf physiologische und pathologische Gewebelehre: 20 Vorlesungen, gehalten während d. Monate Febr., März u. April 1858 im Patholog. Inst. zu Berlin*: Hirschwald.
- Waldeyer, W. (1891). Ueber einige neuere Forschungen im Gebiete der Anatomie des Centralnervensystems. *DMW-Deutsche Medizinische Wochenschrift*, *17*(44), 1213-1218.
- Wang, P.-F., Zhou, Y., Fang, H., Lin, S., Wang, Y.-C., Liu, Y., Xia, J., Eslick, G. D., & Yang, Q.-W. (2015). Treatment of acute cerebral ischemia using animal models: a meta-analysis. *Translational Neuroscience*, *6*(1), 47-58.
- Welker, W. (1990). Why does cerebral cortex fissure and fold? A review of determinants of gyri and sulci. *Cerebral Cortex: comparative structure and evolution of Cerebral Cortex, Part II*, 3-136.
- Wellbourne-Wood, J., & Chatton, J. Y. (2018). From Cultured Rodent Neurons to Human Brain Tissue: Model Systems for Pharmacological and Translational Neuroscience. *ACS Chemical Neuroscience*, *9*(8), 1975-1985. doi:10.1021/acschemneuro.8b00098
- Wen, H., Xiao, W., Biswas, S., Cong, Z. Q., Liu, X. M., Lam, K. S., Liao, Y. H., & Deng, W. (2019). Alginate Hydrogel Modified with a Ligand Interacting with alpha3beta1 Integrin Receptor Promotes the Differentiation of 3D Neural Spheroids toward Oligodendrocytes in Vitro. *ACS Applied Materials & Interfaces* *11*(6), 5821-5833. doi:10.1021/acsami.8b19438
- Wenzel, T. J., Le, J., He, J., Alcorn, J., & Mousseau, D. D. (2023). Fundamental Neurochemistry Review: Incorporating a greater diversity of cell types, including microglia, in brain

- organoid cultures improves clinical translation. *Journal of Neurochemistry* 164(5), 560-582. doi:10.1111/jnc.15741
- Wobus, A. M., & Boheler, K. R. (2005). Embryonic stem cells: prospects for developmental biology and cell therapy. *Physiological reviews*, 85(2), 635-678. doi:10.1152/physrev.00054.2003
- Wong, H. H., Chou, C. Y. C., Watt, A. J., & Sjöström, P. J. (2023). Comparing mouse and human brains. *Elife*, 12. doi:10.7554/eLife.90017
- Xu, S.-y., & Pan, S.-y. (2013). The failure of animal models of neuroprotection in acute ischemic stroke to translate to clinical efficacy. *Medical science monitor basic research*, 19, 37.
- Yakoub, A. M., & Sadek, M. (2019). Analysis of synapses in cerebral organoids. *Cell Transplantation*, 28(9-10), 1173-1182.
- Ye, B. (2023). Approaches to vascularizing human brain organoids. *PLoS Biol*, 21(5), e3002141. doi:10.1371/journal.pbio.3002141
- Ylä-Outinen, L., Tanskanen, J. M. A., Kapucu, F. E., Hyysalo, A., Hyttinen, J. A. K., & Narkilahti, S. (2019). Advances in Human Stem Cell-Derived Neuronal Cell Culturing and Analysis. *Advances in Neurobiology*, 22, 299-329. doi:10.1007/978-3-030-11135-9_13
- Yoshiki, A., Ballard, G., & Perez, A. V. (2022). Genetic quality: a complex issue for experimental study reproducibility. *Transgenic research*, 31(4-5), 413-430. doi:10.1007/s11248-022-00314-w
- Yu, J., Vodyanik, M. A., Smuga-Otto, K., Antosiewicz-Bourget, J., Frane, J. L., Tian, S., Nie, J., Jonsdottir, G. A., Ruotti, V., Stewart, R., Slukvin, I., & Thomson, J. A. (2007). Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science*, 318(5858), 1917-1920. doi:10.1126/science.1151526
- Yuste, R. (2015). From the neuron doctrine to neural networks. *Nature Reviews Neuroscience*, 16(8), 487-497. doi:10.1038/nrn3962
- Zecevic, N., Chen, Y., & Filipovic, R. (2005). Contributions of cortical subventricular zone to the development of the human cerebral cortex. *Journal of Comparative Neurology* 491(2), 109-122. doi:10.1002/cne.20714
- Zeng, H., & Sanes, J. R. (2017). Neuronal cell-type classification: challenges, opportunities and the path forward. *Nature Reviews Neuroscience*, 18(9), 530-546. doi:10.1038/nrn.2017.85
- Zhou, N., Gordon, G. R., Feighan, D., & MacVicar, B. A. (2010). Transient swelling, acidification, and mitochondrial depolarization occurs in neurons but not astrocytes during spreading depression. *Cerebral Cortex*, 20(11), 2614-2624. doi:10.1093/cercor/bhq018
- Zhuang, P., Sun, A. X., An, J., Chua, C. K., & Chew, S. Y. (2018). 3D neural tissue models: From spheroids to bioprinting. *Biomaterials*, 154, 113-133. doi:10.1016/j.biomaterials.2017.10.002
- Ziemens, D., Oschmann, F., Gerkau, N. J., & Rose, C. R. (2019). Heterogeneity of Activity-Induced Sodium Transients between Astrocytes of the Mouse Hippocampus and Neocortex: Mechanisms and Consequences. *Journal of Neuroscience*, 39(14), 2620-2634. doi:10.1523/JNEUROSCI.2029-18.2019
- Zou, J., Salarian, M., Chen, Y., Veenstra, R., Louis, C. F., & Yang, J. J. (2014). Gap junction regulation by calmodulin. *FEBS letters*, 588(8), 1430-1438. doi:10.1016/j.febslet.2014.01.003
- Zundorf, G., & Reiser, G. (2011). Calcium dysregulation and homeostasis of neural calcium in the molecular mechanisms of neurodegenerative diseases provide multiple targets for neuroprotection. *Antioxidants & Redox Signaling*, 14(7), 1275-1288. doi:10.1089/ars.2010.3359

Danksagung

Ein besonderer Dank gilt meiner Doktormutter, Frau Prof. Dr. Christine R. Rose. Sie hat mich in meinen karrieretechnischen Belangen stets unterstützt und dazu beigetragen, dass ich auf eine tolle Promotionszeit zurückblicke. Danke, Christine!

Ein weiterer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Alessandro Prigione für die Übernahme der zweiten Berichterstattung für mein Promotionsvorhaben.

Des Weiteren möchte ich mich bei Herrn Dr. Karl W. Kafitz bedanken. Er hat mich jederzeit bei allen theoretischen und praktischen Herausforderungen unterstützt.

Meinen Kollegen, die teilweise auch zu Freunden geworden sind, möchte ich für diese prägende gemeinsame Zeit danken!

Zuletzt möchte ich mich bei meinen Liebsten bedanken, die in den Jahren immer hinter mir standen 

Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere an Eides Statt, dass die vorliegende Dissertation mit dem Titel „Murine und humane Modellsysteme zur funktionellen Untersuchung von Gehirnzellen“ von mir selbständig und ohne unzulässige fremde Hilfe unter Beachtung der „Grundsätze zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf“ erstellt worden ist.

Die wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen sowie Abbildungen aus anderen Werken wurden als solche kenntlich gemacht. Die Dissertation wurde weder vollständig noch in Teilen einer anderen Fakultät zur Erlangung eines akademischen Grades vorgelegt.

Des Weiteren erkläre ich, dass ich keinen vorausgegangenen Promotionsversuch unternommen habe, und dass kein Promotionsversuch an einer anderen wissenschaftlichen Einrichtung läuft.

Ort und Datum

Unterschrift