

**Aus dem Institut für Anatomie und Zellbiologie  
der Universität Würzburg**

**Vorstand: Prof. Dr. med. Süleyman Ergün**



Vaskularisierung von humanen neuronalen Organoiden  
mit mesodermalen Progenitorzellen

Inauguraldissertation  
zur Erlangung der Doktorwürde der  
Medizinischen Fakultät

der

Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Anna Kern

aus Würzburg

Würzburg, April 2022

**Referent:** Prof. Dr. med. Süleyman Ergün

**Korreferentin:** Prof. Dr. med. Brenda Gerull

**Dekan:** Prof. Dr. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 26.10.2022

Die Promovendin ist Zahnärztin.

*Meiner Familie*

# Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung .....	1
1.1	Stammzellen .....	1
1.1.1	Reprogrammierung von hiPS-Zellen.....	2
1.1.2	Medizinische Relevanz der hiPS-Zellen .....	3
1.1.3	Eigenschaften und Anwendungsgebiet von Organoiden .....	5
1.2	Embryogenese .....	7
1.2.1	Neurale pränatale Entwicklung .....	7
1.2.1.1	Mikroglia .....	14
1.2.1.2	Generierung neuraler Progenitorzellen .....	14
1.2.2	Vaskulo- und Angiogenese .....	18
1.2.2.1	Generierung mesodermaler Progenitorzellen .....	21
1.3	Ziel der Arbeit .....	24
2	Material und Methoden.....	26
2.1	Material .....	26
2.1.1	Geräte.....	26
2.1.2	Zelllinien, Eier .....	30
2.1.3	Puffer, Medien, Lösungen .....	31
2.1.3.1	Induktionsmedien.....	32
2.1.3.2	Lösungen für immunhistochemische Färbung .....	34
2.1.3.3	Lösungen für proteinbiochemische Methode .....	36
2.1.3.4	Lösungen für Clearingverfahren.....	39
2.1.4	Antikörper .....	40
2.1.5	Chemikalien, Small Molecules und Wachstumsfaktoren .....	43
2.2	Methoden .....	46
2.2.1	Zellkultur .....	46

2.2.1.1	Matrigelbeschichtung .....	46
2.2.1.2	Auftauen und Kultivieren der iPS-Zellen .....	46
2.2.1.3	Ablöseverfahren und Auszählen für adhärenente iPS-Zellen.....	47
2.2.1.4	Splitten der Zellaggregate in Einzelzellen .....	47
2.2.1.5	Poly(2-hema) Beschichtung .....	48
2.2.2	Induktion .....	48
2.2.3	Inkubation der Hühnerembryonen .....	50
2.2.4	Immunhistochemische Färbung.....	50
2.2.4.1	Paraffinschnitte der Aggregate/Sphären/Organoide.....	50
2.2.4.2	Entparaffinierung, Rehydrierung, saure Demaskierung .....	50
2.2.4.3	Immunfluoreszenzfärbung .....	51
2.2.4.4	Hämatoxylin (Hämalaun)-Eosin-Färbung.....	52
2.2.5	Fluoreszenzmessung (Fluorescence-activated-cell-scanning) .....	52
2.2.6	Western Blot .....	53
2.2.6.1	Zelllysat.....	53
2.2.6.2	Proteinbestimmung nach Bredford.....	53
2.2.6.3	12,5 % SDS-PAGE .....	54
2.2.6.4	Western Blot (Semidry-Methode).....	54
2.2.6.5	Detektion.....	55
2.2.7	Clearing und Färbung .....	56
2.2.8	Elektronenmikroskopie .....	57
3	Ergebnisse .....	58
3.1	Charakterisierung mesodermaler und neuraler iPS-Zell abgeleiteter Aggregate .....	58
3.1.1	Morphologische Analyse mesodermaler/neuraler Aggregate.....	59
3.1.2	Induktionsnachweis mit Brachyury und SOX1 .....	60

3.1.2.1	Nachweis mittels Fluoreszenzfärbung .....	60
3.1.2.2	Durchflusszytometrische Untersuchung der Zelldifferenzierung .....	62
3.1.2.3	Differenzierungsnachweis mittels Western Blot .....	64
3.2	Zusammensetzung der mesodermalen und neuralen Aggregate .....	66
3.2.1	Kokultur der differenzierten Zellaggregate .....	66
3.2.2	Hypoxische Bedingungen .....	69
3.3	Neuroektodermale Entwicklung im Hühnerembryo .....	71
3.3.1	Perineuraler Plexus .....	72
3.3.2	Vergleich der neuro-mesenchymalen Organoiden mit dem Hühnerembryo .....	73
3.4	Analyse der neuro-mesenchymalen Organoiden .....	75
3.4.1	Lokalisation der Endothelzellen .....	76
3.4.2	Charakterisierung des Neuroepithels.....	77
3.4.3	Entwicklung der Vaskularisation .....	78
3.4.4	Nachweis von Mikroglia .....	79
3.4.5	Differenzierung des Neuroepithels.....	81
3.4.6	Lumenbildung .....	82
4	Diskussion .....	84
4.1	Generierung neurale/mesodermale Zellaggregate aus hiPS-Zellen .....	85
4.2	Vereinigung der generierten hiPS-Zellen.....	89
4.3	Vaskularisierungspotenzial der mesodermalen Progenitorzellen .....	90
4.4	Entwicklungspotential neuro-mesenchymaler Organoiden.....	92
4.5	Vaskularisierung in der Embryonalentwicklung .....	94
4.6	Ausblick.....	98
5	Zusammenfassung.....	101

6	Literaturverzeichnis .....	102
I	Abkürzungen	
II	Abbildungsverzeichnis	
III	Tabellenverzeichnis	
IV	Danksagung	
V	Lebenslauf	
VI	Publikationen	

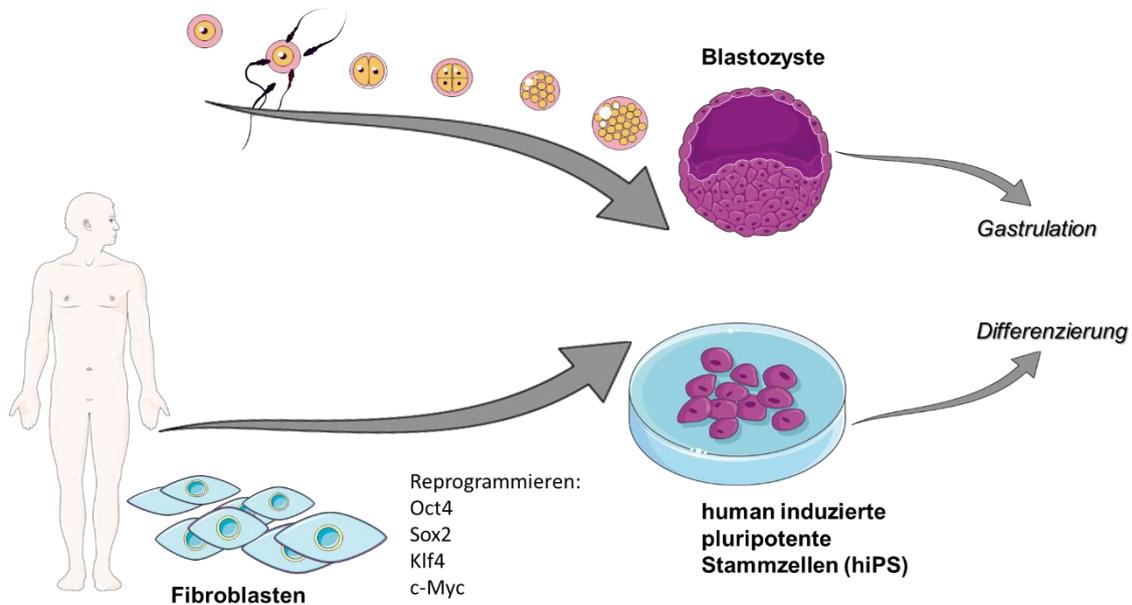
# 1 Einleitung

## 1.1 Stammzellen

Als Stammzellen beschreibt man die undifferenzierten Körperzellen in einem Organismus. Sie können sich unbegrenzt teilen und dieses Selbsterneuerungspotential an ihre Tochterzellen weitergeben. Stammzellen besitzen die Besonderheit, verschiedene differenzierte Zelltypen hervorbringen zu können (Till and McCulloch, 1980; Weissman, 2000). Man unterscheidet embryonale von adulten Stammzellen. Zudem können die embryonalen Stammzellen in totipotente und pluripotente Zellen eingeteilt werden. Die meisten adulten Stammzellen sind multipotent (Eckfeldt et al., 2005).

Nach der Befruchtung sind die embryonalen Stammzellen zunächst totipotent und besitzen somit die Fähigkeit einen vollständigen Organismus bilden zu können (**Abbildung 1**). Nach vier bis sechs Tagen bildet sich die Blastozyste. Die peripheren Zellen der Blastozyste bezeichnet man als Trophoblaststammzellen, die die Plazenta bilden. Die innere Zellmasse bildet den Embryoblast. Die embryonalen Stammzellen des Embryoblasten sind per Definition pluripotent und haben die Möglichkeit alle drei Keimblätter des Embryos hervorzubringen. Die Forschung an embryonalen Stammzellen begann mit der Isolation von pluripotenten Stammzellen aus Blastozysten der Maus (Evans and Kaufman, 1981; Martin, 1981). Es folgte die Isolation embryonaler Stammzellen von Schafen (Handyside et al., 1987), Kaninchen (Giles et al., 1993) und Rindern (Cherny et al., 1994). Mehr als zehn Jahre später konnte schließlich die erste humane embryonale Stammzelllinie gewonnen und stabil kultiviert werden (Thomson et al., 1998).

Im Gegensatz zu embryonalen Stammzellen ist das Differenzierungspotenzial bei adulten Stammzellen eingeschränkt. Sie sind postnatal weiterhin vorhanden und in ihrer Eigenschaft zumeist multipotent. Adulte Stammzellen können dabei nur artverwandte Zelltypen bilden. Sie sind in bestimmten Geweben vorhanden und für deren anhaltende Regeneration entscheidend (Eckfeldt et al., 2005).



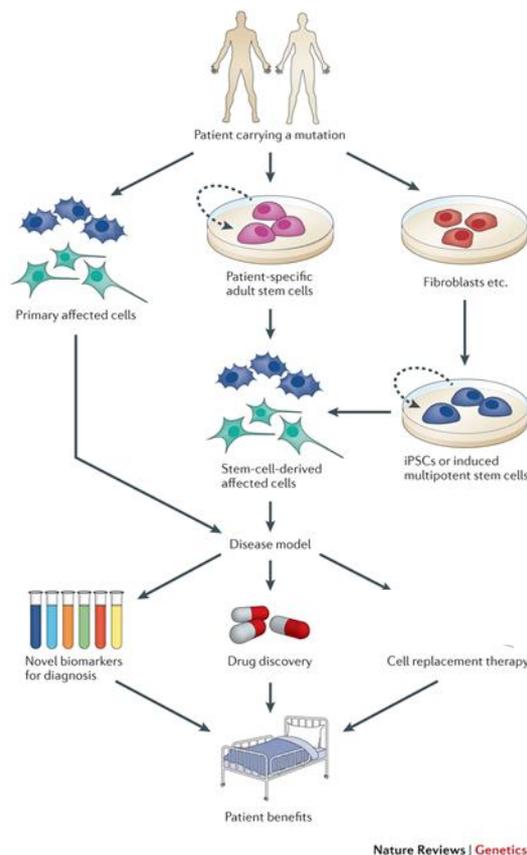
**Abbildung 1: Stammzellen *in vivo* und *in vitro***  
 Überblick über die Entwicklung nach Befruchtung der Eizelle bis zur Blastozyste und der nachfolgenden Gastrulation. Sowie die Gewinnung von hiPS-Zellen aus Fibroblasten, die danach differenziert werden können (eigene Abbildung).

### 1.1.1 Reprogrammierung von hiPS-Zellen

Die Forschung an humanen embryonalen Stammzellen ist ethisch umstritten und daher gesetzlich streng reguliert. Um die kontrovers diskutierten embryonalen Stammzellen zu ersetzen, sind humane induzierte pluripotente Stammzellen (hiPS-Zellen) ein guter alternativer Ansatz (Takahashi et al., 2007). Die Reprogrammierung kann bei verschiedenen terminal differenzierten Zelltypen, wie humanen adulten Fibroblasten (**Abbildung 1**), mononukleären peripheren Blutzellen (Staerk et al., 2010) oder aus Urin (Zhou et al., 2011) angewandt werden. Durch die Überexpression der Transkriptionsfaktoren Oct4, Sox2, c-Myc und Klf4 können aus solchen Zellen pluripotente Stammzellen reprogrammiert werden (Takahashi et al., 2007; Takahashi and Yamanaka, 2006). Die so erzeugten induzierten pluripotenten Stammzellen (iPS-Zellen), weisen einen embryonalen Stammzellcharakter auf und können sich wie diese in alle Zelltypen der drei Keimblätter differenzieren. Außerdem können sie in Kultur stabil expandiert werden.

### 1.1.2 Medizinische Relevanz der hiPS-Zellen

Humane reprogrammierte Stammzellen könnten in vielerlei Hinsicht für die Medizin relevant werden. So kann die biomedizinische Forschung mit Hilfe von hiPS-Zellen verschiedene Zelltypen und künstliche humane Gewebe erzeugen, welche normal nur eingeschränkt zugänglich sind und an diesen Experimente durchführen. Patienteneigene reprogrammierte Zellen und deren Derivate dienen dabei als Krankheitsmodell und können für Screenings nach neuen Biomarkern und patientenspezifischen Medikamenten verwendet werden. Auf diesem Wege könnte die Zahl an Tierversuchen reduziert werden (**Abbildung 2**). Außerdem stellen hiPS-Zellen die zelluläre Ausgangspopulation für neue regenerative Therapieansätze dar. Aus hiPS-Zellen differenzierte Zelltypen dienen dabei als Zellersatz und könnten autolog transplantiert werden (Stadtfeld and Hochedlinger, 2010; Sternecker et al., 2014; Wu and Hochedlinger, 2011).



**Abbildung 2: Überblick stammzellbasierte Krankheitsmodellierungen**

Es können primäre Zellen, adulte Stammzellen oder hiPS-Zellen aus Fibroblasten patientenspezifisch gewonnen werden, um Krankheiten zu modellieren. Nach der krankheitspathologischen Modellation *in vitro* können an diesem Modell neue Biomarker für eine verbesserte Diagnose identifiziert werden. Es dient auch zur Entwicklung neuer patientenspezifischer Medikamente. Ein Vorteil ist auch, dass die gewonnenen Zellen als Zellersatztherapie dienen können. (Sterneckert et al., 2014)

Durch die gesteigerte Lebenserwartung entwickeln Patienten altersbedingt vermehrt neurodegenerative Erkrankungen. Dabei sind hiPS-Zellen sehr interessant, um neurologische Krankheiten wie Morbus Parkinson und Chorea Huntington (Park et al., 2008) zu modellieren und zu verstehen. Humane iPS-Zellen helfen darüber hinaus den Einfluss genetischer Mutationen, wie sie beispielsweise bei Alzheimer-Patienten auftreten können, auf das Krankheitsgeschehen aufzuklären (Israel et al., 2012). Außerdem können neurale Entwicklungsstörungen, wie das Rett- oder Williams-Syndrom, genauer untersucht werden (Chailangkarn et al., 2016; Marchetto et al., 2010).

Auch das Modellieren humaner embryonaler Gewebe ist auf Basis von hiPS-Zellen möglich. Solche Modelle erweitern das Verständnis entwicklungsbiologischer Vorgänge sowie der Interaktion von Zellen innerhalb eines Gewebes. Aus induzierten pluripotenten Stammzellen abgeleitete 3D Gewebe, die wesentliche

organspezifische Strukturmerkmale und Morphologie aufweisen, werden als Organoide bezeichnet (Fatehullah et al., 2016).

### **1.1.3 Eigenschaften und Anwendungsgebiet von Organoiden**

Um einen besseren Einblick in die Entwicklung des menschlichen Organismus sowie in die Grundlagen der Krankheitsentstehung zu bekommen, ist eine 3D Zellkultur unerlässlich. Im menschlichen Körper interagieren verschiedene Zelltypen und extrazelluläre Matrix permanent miteinander. Hier zeigt sich, wie wichtig Zellverbände als Regulatoren des Zellverhaltens sind (Birgersdotter et al., 2005). In der Embryonalentwicklung werden Zelldifferenzierung, Reifung, Migration, Polarisation und Morphogenese durch Interaktion und Sezernierung der umgebenden Zellen und Zellverbände gesteuert und reguliert. Diese Selbstorganisation führt zur Ausreifung komplexer Gewebe (Shahbazi, 2020). Zellaggregate, die auf humanen Zelllinien basieren, stellen außerdem eine Brücke zwischen Tiermodell und Patient dar und helfen bei der korrekten Einordnung präklinischer Ergebnisse.

In den letzten Jahren bekommen humane Organoidmodelle große Aufmerksamkeit, da sie die typische Organmorphogenese wesentliche Organstrukturen und einige organspezifische Funktionen rekapitulieren. Im Labor wurden Organoidmodelle des Darms (Spence et al., 2011), des Gehirns (Lancaster et al., 2013), der Lunge (Dye et al., 2015), der Niere (Takasato et al., 2016) und der Leber (Takebe et al., 2013) generiert.

Die Grundlage für die Organoidmodelle bilden Stammzellen. Es können adulte Stammzellen genutzt werden, um patientenspezifische Organoide hervorzubringen (van de Wetering et al., 2015). Es gibt auch die Möglichkeit, Organoide mit Hilfe spezifischer Differenzierungsprotokolle aus embryonalen pluripotenten Stammzellen zu erzeugen (McCauley and Wells, 2017), da diese jedoch aus ethischen Gründen nur eingeschränkt verwendbar sind, stellen induzierte

pluripotente Stammzellen (Takahashi and Yamanaka, 2006) eine gute Alternative dar, um Organoidmodelle zu generieren.

Mit Hilfe induzierter pluripotenter Stammzellen lassen sich organähnliche Strukturen generieren, die Selbstorganisationsfähigkeit zeigen. Sie setzen sich aus verschiedenen Zelltypen zusammen. Dadurch können menschliche Entwicklung und Krankheiten noch besser modelliert werden. Diese Technologie eröffnet neue Möglichkeiten für wissenschaftliche Entdeckungen in der Entwicklungsbiologie (Huch et al., 2017). Organoide lassen sich aus hiPS-Zellen erzeugen und können dann in einem geeigneten Medium für längere Zeit kultiviert werden. Dabei spiegeln Organoide sehr eindrucksvoll die embryonale Entwicklung wider.

In der Krankheitsforschung spielen Organoide mit menschlichen Blutgefäßen eine entscheidende Rolle. Gerade bei der Vaskulopathie können so die Regulatoren identifiziert und verstanden werden (Wimmer et al., 2019b). Außerdem können zum Beispiel Hirnerkrankungen in Modellorganismen untersucht werden, die in Tiermodellen nur begrenzt nachstellbar sind (Lancaster et al., 2013). Dies weckt auch die Hoffnung, Mechanismen von Krankheiten, die die neurale zelluläre und strukturelle menschliche Entwicklung betreffen, zu verstehen (Tian et al., 2020).

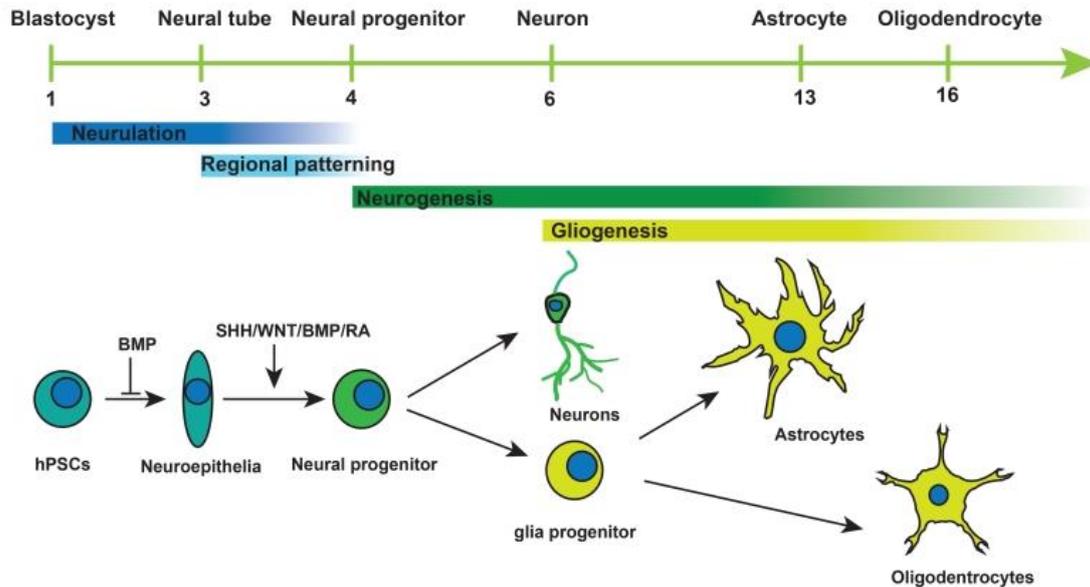
## 1.2 Embryogenese

Die Embryologie ist die Lehre des ungeborenen Menschen. Vor allem beschäftigt sich die Embryologie mit der pränatalen Entwicklung und dem Ausreifen der Strukturen und Organe. Nach der Blastozyste (**Abbildung 1**) entwickelt sich zunächst eine zweiblättrige Keimscheibe aus Hypo- und Epiblast. In dieser Zeit entsteht auch das extraembryonale Mesoderm, das durch das Auswandern von Zellen aus dem Hypoblast gebildet wird. Darauf folgt die Bildung der dreiblättrigen Keimscheibe, die durch den Primitivstreifen eingeleitet wird. Alle drei Keimschichten haben ihren Ursprung im Epiblast. Die Entstehung der drei Keimblätter wird als Gastrulation bezeichnet. Die drei Zellschichten bestehen aus dem äußeren Ektoderm, dem mittleren Mesoderm und dem inneren Blatt, dem Endoderm. Aus der ektodermalen Schicht gehen die Epidermis und das Nervengewebe hervor. Das mesodermale Keimblatt ist der Ursprung von Knochen, Skelettmuskulatur, Herzgewebe, Blutgefäßen und der Hämatopoese. Hierbei bringt das Mesoderm Hämangioblasten hervor, aus denen Endothel- und Blutzellen entstehen, ein Prozess, der als Vaskulogenese bezeichnet wird. Das Endoderm ist für die Bildung des Magen-Darm-Trakts und des Atmungssystems verantwortlich.

### 1.2.1 Neurale pränatale Entwicklung

Der Ursprung des Nervensystems liegt im Ektoderm, wovon erst eine Neuralplatte und dann eine Neuralrinne hervorgeht. Die pränatale neurale Entwicklung (**Abbildung 3**) ist in Neurulation (**Abbildung 4**) und anschließende Neurogenese (**Abbildung 6**) gegliedert. Zwischen den zwei Entwicklungsschritten findet eine regionale Musterung (**Abbildung 5**) der neuralen Vorläuferzellen des Neuralrohres durch Zytokingradienten statt.

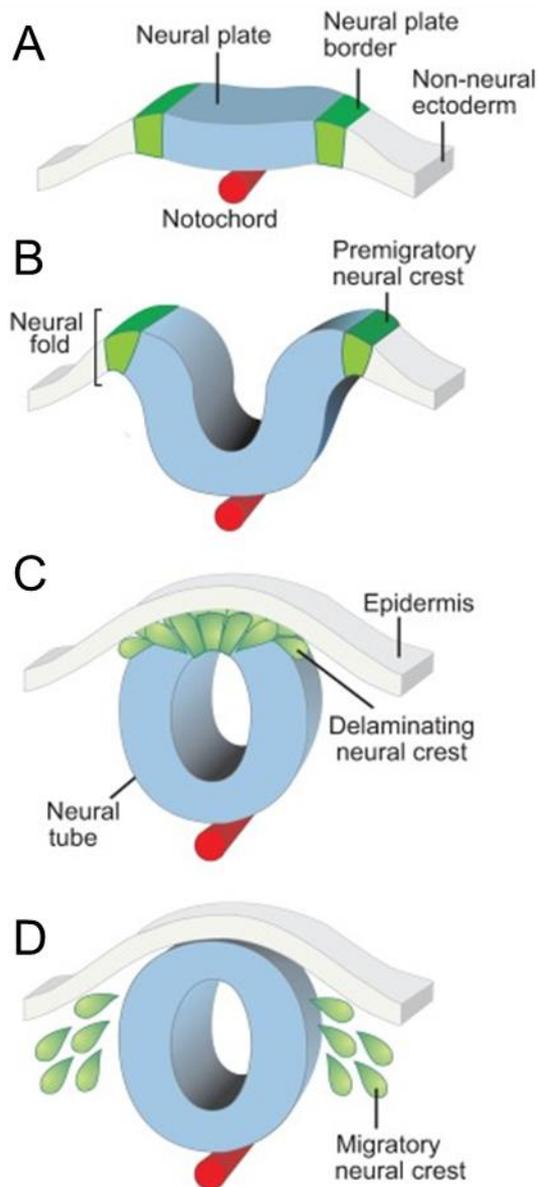
## Neural development in vivo (weeks)



### Abbildung 3: Schematischer Überblick zur neuronalen Entwicklung

Hier dargestellt ist die neurale Entwicklung ab der Blastozyste bis zu den einzelnen Zelltypen des neuronalen Gewebes. Zusätzlich sind die wichtigsten Signalproteine und die damit eingeleitete Veränderung gezeigt. Humane pluripotente Stammzellen entwickeln sich durch BMP zu Neuroepithel. Um neurale Vorläuferzellen zu bekommen, wirken die Signalproteine SHH/WNT/BMP und Vitamin A Säure. Nach den neuronalen Vorläuferzellen werden sich Neuronen und die Vorläuferzellen (radial Gliazellen) zu Astrozyten und Oligodendrozyten ausbilden. Abbildung modifiziert nach (Tao and Zhang, 2016)

Die Neurulation beschreibt die Entwicklung des Neuralrohrs (**Abbildung 4**). Der morphogenetische Ablauf wird in vier Phasen aufgegliedert. Zuerst kommt es zur Bildung der Neuralplatte durch das ektodermale Keimblatt. Danach verdickt sich die Neuralplatte. Anschließend kommt es zur Invagination der Neuralplatte ins darunterliegende Mesenchym und es bilden sich die zentrale Neuralrinne sowie die seitlichen Neuralwülste. Die dorsal gelegenen Zellen heften sich dabei an das darunter liegende Notochord. Das Notochord bestimmt den medianen Scharnierpunkt. Die Neuralfalten verschmelzen miteinander und lösen sich vom übrigen Ektoderm (Smith and Schoenwolf, 1997).

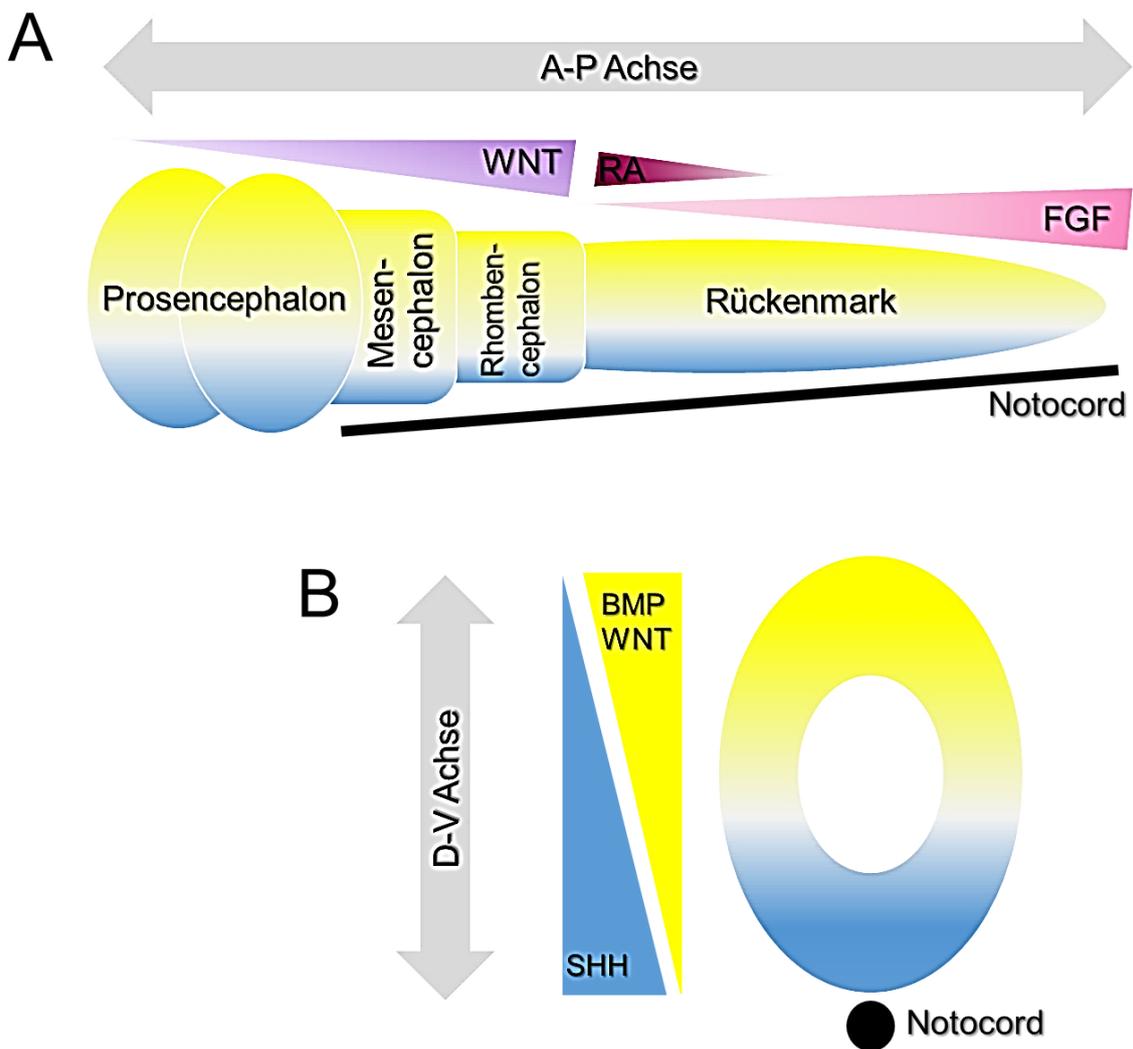


**Abbildung 4: Die Neuralleiste (Querschnitt)**  
**(A)** Die Neurulation beginnt während der Gastrulationsphase mit der Bildung des Neuralplattenrandes. **(B)** Die Neuralplatte schließt sich und es entsteht das Neuralrohr. **(C)** Die Vorläufer der Neuralleiste klassifizieren sich im dorsalen Teil. **(D)** Und anschließend lösen sich die Neuralleistenzellen ab. Abbildung modifiziert nach (Simões-Costa and Bronner, 2015)

Der Prozess der Neurulation wird durch Signale aus dem darunter liegenden dorsalen Mesoderm induziert. (Keller et al., 1992; Smith and Schoenwolf, 1989). Das dorsale Mesoderm bildet das bereits erwähnte Notochord. Die vom Notochord produzierten Signalmoleküle sind Noggin (Smith and Harland, 1992), Follistatin (Hemmati-Brivanlou et al., 1994) und Chordin (Sasai et al., 1994), die BMP hemmen und somit die Neurulation einleiten. Außerdem spielt der FGF Signalweg eine wichtige Rolle beim Einleiten der Neurulation (Levine and Brivanlou, 2007). Während der Neurulation wird das Ektoderm in drei Zellpopulationen unterteilt, die von da an verschiedene Entwicklungsrichtungen einschlagen. Aus den Zellen

des Neuralrohres entsteht das zentrale Nervensystem. Die Neuralleistenzellen sind für die peripheren Neuronen und Gliazellen verantwortlich. Die restlichen Zellen bilden die Epidermis. Das ursprüngliche Neuralrohr besteht aus einem einschichtigen Neuroepithel. Dieses besteht aus sich schnell teilenden neuronalen Stammzellen. Wichtige initiale Transkriptionsfaktoren für die Bildung des Neuroepithels sind SOX1 und Pax 6 (Suter et al., 2009; Yoo et al., 2011; Zhang et al., 2010).

Beim Übergang von Neurulation zur Neurogenese kommt es zu einer regionalen Musterung, dabei entwickeln sich aus dem Neuroepithel die neuronalen Vorläuferzellen (**Abbildung 5**). Dieser Prozess wird durch Morphogengradienten ausgelöst, denen das Neuralrohr ausgesetzt ist. Die neurale Musterung verläuft einerseits in einer anteroposterioren (A-P) Achse mit der Unterteilung in Prosencephalon (Vorderhirn), Mesencephalon (Mittelhirn), Rhombencephalon (Hinterhirn) und Rückenmark und andererseits in der dorsoventralen (D-V) Achse. Die A-P Achse wird von Gradienten der Signalmoleküle WNT, FGF und RA definiert. WNT- und FGF unterdrücken dabei konzentrationsabhängig die Expression von anterioren Genen und aktivieren posteriore Gene (Kudoh et al., 2002). Parallel dazu findet die Strukturierung der D-V Achse statt. Hierbei spielen BMP und WNT Gradienten (Lee and Jessell, 1999) sowie der SHH Signalweg eine zentrale Rolle (Echelard et al., 1993). Während die Signalproteine BMP und WNT vom Oberflächenektoderm sezerniert werden, hat das Signalprotein SHH seinen Ursprung aus dem Notochord und der Bodenplatte des Neuralrohres (Wurst and Bally-Cuif, 2001).



**Abbildung 5: Schematischer Überblick der Prinzipien der Musterbildung im Neuralrohr**  
**A:** Die Musterung entlang der A-P Achse ist abhängig von Gradienten von Morphogenen wie WNT, RA und FGF. Das Neuralrohr wird definiert in zukünftige Hirnregionen: Prosencephalon (Vorderhirn), Mesencephalon (Mittelhirn), Rhombencephalon (Hinterhirn) und Rückenmark.  
**B:** In ähnlicher Weise wird die D-V Achse durch Gradienten von SHH, BMP und WNT beeinflusst. Das dorsal liegende Notocord hat einen Anteil zu Spezifizierung mit Signalproteinen (eigene Abbildung in Anlehnung nach (Tao and Zhang, 2016)).

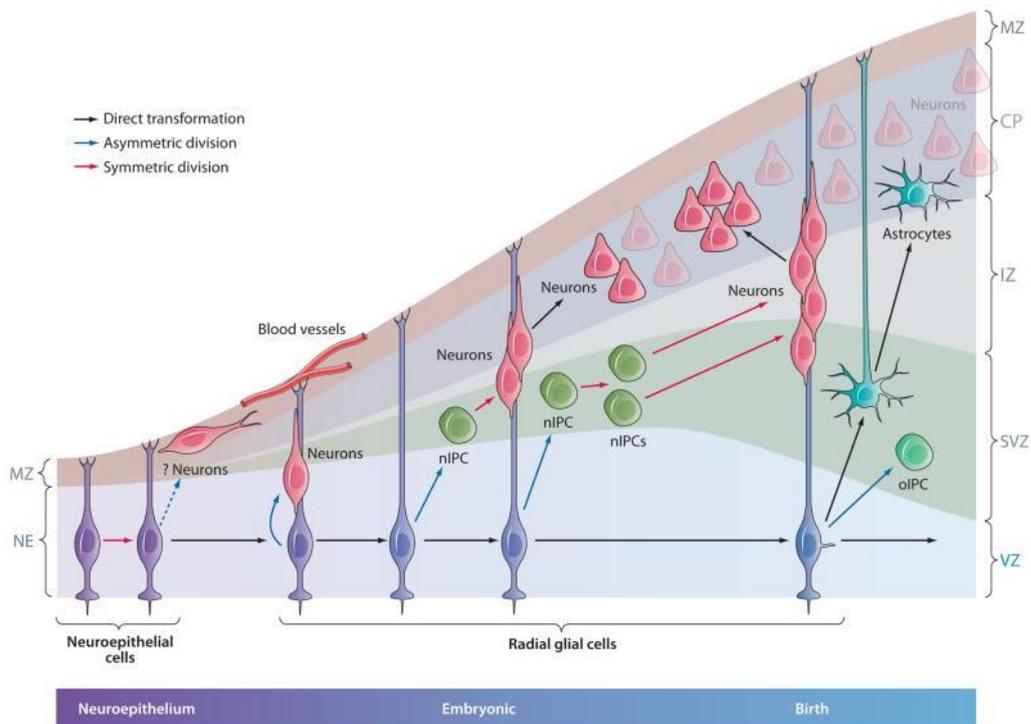
Anschließend beginnt die Neurogenese (**Abbildung 6**) mit Bildung des Neokortex am rostralen Ende des Neuralrohres (Sidman and Rakic, 1973). Die Kortexentwicklung geht von den Zellen des Neuralrohres aus (Bentivoglio and Mazzarello, 1999). Um eine Vergrößerung und Verdickung der Oberfläche zu erreichen, beginnt die Frühentwicklung mit einer exponentiellen Vermehrung der Vorläuferzellen durch symmetrische Teilung (Bystron et al., 2008). Ungefähr zu dem Zeitpunkt, an dem die Neurogenese beginnt, erwerben neuroepitheliale

Zellen die Merkmale der Gliazellen. Diese radialen Gliazellen werden als neurale Vorläuferzellen bezeichnet (Kriegstein and Alvarez-Buylla, 2009).

Ab der fünften Woche wechselt die symmetrische zur asymmetrischen Teilung und die vertikale zur horizontalen Teilung (Haydar et al., 2003; Iacopetti et al., 1999) und die Gliogenese wird eingeleitet. Aus der radialen Gliazelle entsteht eine Tochterzelle und ein postmitotisches Neuron oder eine intermediäre Vorläuferzelle (nIPC) (Pontious et al., 2008). Die radialen Gliazellen können sowohl Neurone, Astrozyten als auch Oligodendrozyten hervorbringen. Während der ganzen Zeit behalten die radialen Gliazellen ihre apikal-basale Polarität (Haubensak et al., 2004; Noctor et al., 2004; Noctor et al., 2007). Sie haben zum einen Kontakt zu den Ventrikeln und gleichzeitig haben sie über radiäre Ausläufer Kontakt zu den Hirnhäuten bzw. der Basallamina der Blutgefäße.

Die Bildung der Neurone kann auf drei verschiedene Arten erfolgen. Erstens kann die Bildung direkt von radialen Gliazellen durch asymmetrische Teilung erfolgen. Zweitens können Neurone auch indirekt aus intermediären Vorläuferzellen (nIPCs) entstehen, welche wiederum selbst aus Radialgliazellen hervorgehen die zur Proliferation befähigt sind. Drittens können sich die intermediären Vorläuferzellen zur Zellvermehrung vor der Bildung von Neuronen symmetrisch teilen (Kriegstein and Alvarez-Buylla, 2009). Die Neurone wandern schließlich entlang der Radialgliazellfortsätze nach außen und bilden von innen nach außen die charakteristische sechsschichtige kortikale Architektur. Am Ende der pränatalen neuronalen Entwicklung löst sich ein großer Teil der Radialgliazellen von der apikalen Basis und wandelt sich zu Astrozyten um (Mission et al., 1991). Die Ausbildung und Ausreifung zu Astrozyten kann *in vitro* nachgewiesen werden (Sloan et al., 2017). Astrozyten sind für die Versorgung der Neurone mit Nährstoffen sowie für die Ausbildung der glialen Grenzschicht (Membrana limitans gliae superficialis und perivascularis) zuständig. Aus diesem Grund besitzen Astrozyten viele sternförmige Ausläufer und stehen mit Blutgefäßen (Budday et al., 2015) sowie Neuronen in direktem Kontakt. Das Intermediärfilamentprotein GFAP ist ein guter Marker für Astrozyten/radialen Gliazellen. Es entwickeln sich außerdem auch

Vorläuferzellen der Oligodendrozyten (oIPCs), deren spätere Aufgabe die Myelinisierung von Axonen ist.



**Abbildung 6: Neurogenese der kortikalen Entwicklung**

Während der kortikalen Entwicklung der Neurogenese entstehen aus dem Neuroepithel des Neuralrohres radiale Gliazellen als Vorläuferzellen von Neuronen, Astrozyten und Oligodendrozyten. Für Neurone gibt es verschiedene Entwicklungswege, mit und ohne Vorläuferzellen nIPC (neurogene intermediäre Progenitorzellen). Astrozyten werden direkt aus radialen Gliazellen gebildet. Oligodendrozyten haben auch Vorläuferzellen (oIPC). Das Neuroepithel (NE) hat eine marginale Zone (MZ). Bei der Geburt unterteilen sich die Schichten in MZ, kortikale Platte (CP), intermediäre Zone (IZ), subventrikuläre Zone (SVZ), und ventrikuläre Zone (VZ) (Kriegstein and Alvarez-Buylla, 2009).

In der pränatalen neuralen Entwicklung entstehen Neuronen und Astrozyten. Oligodendrozyten entwickeln sich erst in der postnatalen Phase. Die Vorläuferzellen der Oligodendrozyten (oIPCs) sind jedoch schon vor der Geburt vorhanden. Sie leiten sich wiederum von den radialen Gliazellen ab (Barateiro et al., 2016).

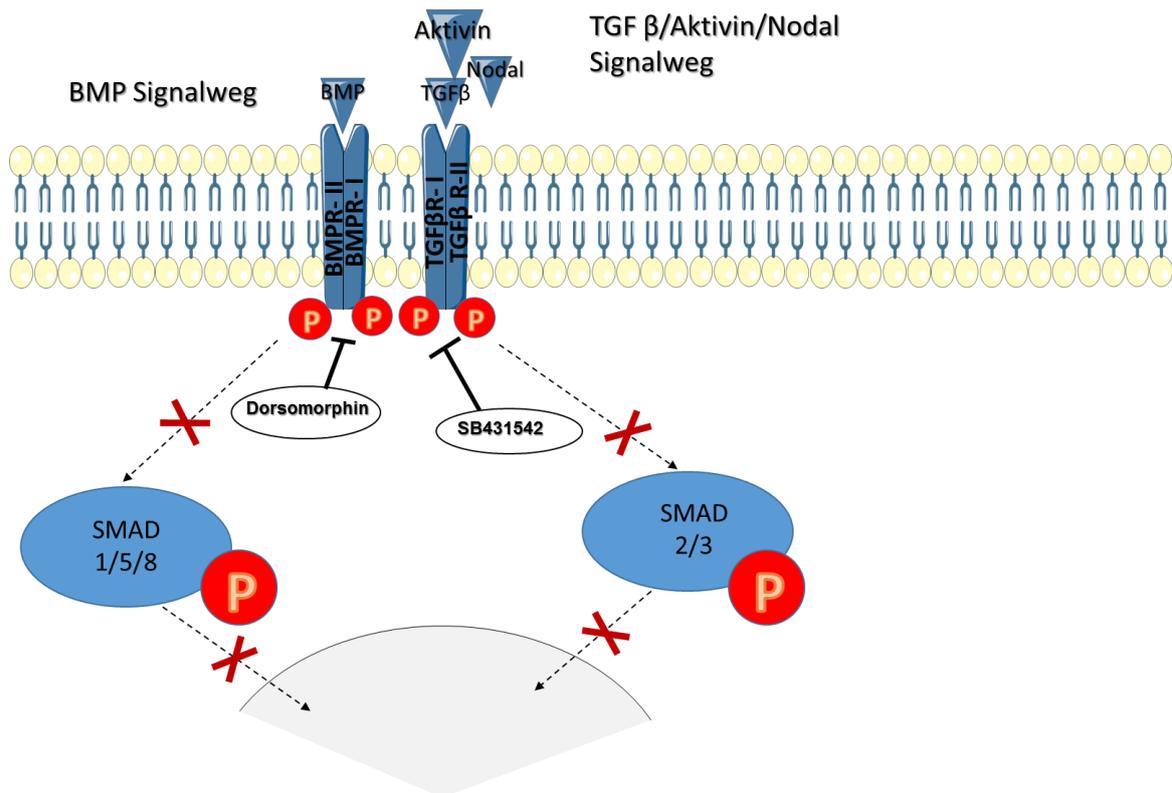
### 1.2.1.1 *Mikroglia*

Das Parenchym des Zentralnervensystems enthält neben Makroglia (Astrozyten und Oligodendrozyten) auch Mikroglia. Hierbei handelt es sich um spezialisierte Gewebsmakrophagen (Davies et al., 2013). Die Mikroglia siedeln sich neben Neuronen, Astrozyten und Oligodendrozyten im Gewebe an (Prinz et al., 2017). Die Aufgabe von Mikroglia ist wie bei allen Gewebsmakrophagen das Abbauen von abgestorbenen Zellen und Fremdkörpern (Lopez-Atalaya et al., 2018). Im inaktiven Zustand besitzen die Mikroglia eine verzweigte Morphologie, dadurch können sie die benachbarte Umgebung erfassen. Im aktivierten Zustand, während der Phagozytoseaktivität, wird die Form durch Verdicken des Zellkörpers und Verkürzen der Ausläufer geändert (Bohatschek et al., 2001). Mikroglia haben durch ihre Phagozytose auch eine regulierende Aufgabe während der Neurogenese (Cunningham et al., 2013). Im Vergleich zu Astrozyten, Oligodendrozyten und Neuronen haben Mikroglia ihren Ursprung nicht im neuralen Ektoderm. Ihre Vorläuferzellen stammen aus dem Dottersack, der sich wie das extraembryonale Mesoderm aus dem Hypoblast bildet (Gomez Perdiguero et al., 2015). Die Besiedelung des Nervengewebes durch Mikrogliazellen korreliert generell mit der Vaskularisierung des menschlichen Gehirns (Rezaie and Male, 1999).

### 1.2.1.2 *Generierung neuraler Progenitorzellen*

Die Generierung neuraler Vorläuferzellen aus pluripotenten Stammzellen erfolgt durch gezielte Aktivierung bzw. Blockade unterschiedlicher Signalkaskaden. Auf diesem Weg ist es möglich eine Differenzierung in verschiedene zentrale und periphere neurale Zelltypen zu erreichen. Durch endogene Signalmoleküle werden verschiedene Genexpressionsmuster in der Zelle aktiviert sowie metabolische Prozesse und die Organisation des Zytoskeletts moduliert. Dies wiederum induziert die neurale Differenzierung und bestimmt die Spezifizierung von neuralen Vorläuferzellen. Für die neurale Induktion ist zunächst die Unterdrückung der epidermalen Bestimmung des Ektoderms erforderlich.

Bei der Erzeugung von neuronalen Vorläuferzellen aus humanen pluripotenten Stammzellen spielt die Blockierung des TGF- $\beta$  (**Abbildung 7**) sowie des BMP Signalweges eine wichtige Rolle, da dessen Aktivität der neuronalen Spezifizierung durch die Aktivierung von SMAD 1/5/8 und SMAD 2/3 entgegenwirkt (Chambers et al., 2009). Verschiedene pharmakologische Wirkstoffe können genutzt werden, um eine SMAD Aktivierung zu unterdrücken. SB431542 ist bspw. ein potenter Inhibitor der ALK (activin receptor-like kinase) Rezeptoren ALK4 (Aktivin-Typ I-Rezeptor), ALK5 (TGF- $\beta$  Typ I-Rezeptor) und ALK7 (Nodal-Typ I-Rezeptor) (Inman et al., 2002). Ein weiteres Molekül, Dorsomorphin, wirkt durch selektive Bindung an BMP-Typ I Rezeptor als spezifischer ALK2, ALK3 und ALK6 Inhibitor (Yu et al., 2008). Die ALK Proteine repräsentieren die sieben Familienmitglieder der Typ I TGF- $\beta$  Rezeptoren. Somit bewirken beide Moleküle in Kombination eine sehr potente Inhibition des nachgeschalteten SMAD Signalwegs („dual SMAD inhibition“) (Madhu et al., 2016).



**Abbildung 7: TGF-β Rezeptor**

*Differenzierung hiPS-Zellen durch Hemmung BMP/TGF-β Signalweg.*

*Verschiedene TypI TGF-β Rezeptoren (ALKs) werden durch Dorsomorphin und SB431542 blockiert. Dadurch werden SMAD 1/5/8 und SMAD 2/3 nicht durch Phosphorylierung aktiviert und können im Zellkern nicht wirken (eigene Abbildung).*

Für die neurale Entwicklung ist Sonic Hedgehog (SHH) ein entscheidender Faktor (Lai et al., 2003). Das Peptidhormon SHH wird im embryonalen Gewebe vom Notochord, der Bodenplatte des Neuralrohres und dem neuralen Ektoderm selbst sezerniert. Bei Anwesenheit von SHH-Liganden wird der kanonische Signalweg unter Beteiligung des Transmembranrezeptors (Patched) und seines Co-Rezeptors (Smoothened) aktiviert. Daraus folgt eine Kerntranslokation des Gliom-assoziierten (Gli) Komplexes (Rimkus et al., 2016). Um eine neurale Induktion *in vitro* zu unterstützen, kann der pharmakologische Wirkstoff Puromorphamin (PMA) verwendet werden. PMA aktiviert den Co-Rezeptor Smoothened und bewirkt folglich eine Translokation des Gli-Komplexes (Sinha and Chen, 2006).

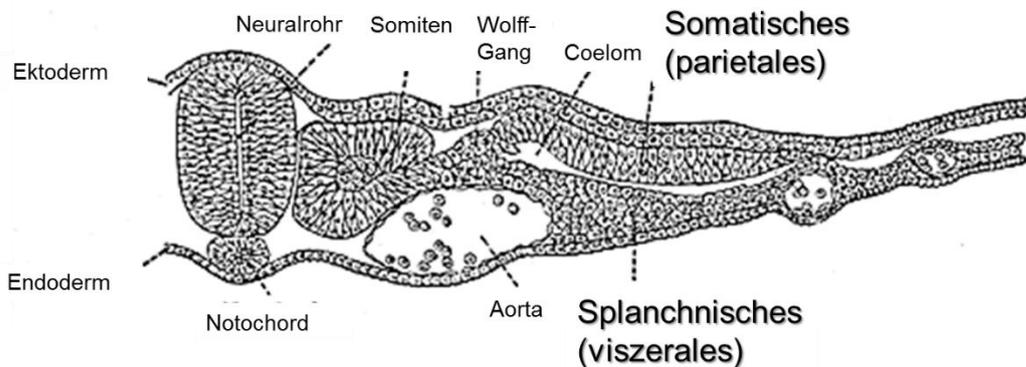
Ein dritter wichtiger Faktor für die Kultur neuraler Vorläuferzellen ist das Protein β-Catenin. Durch β-Catenin wird die Proliferation neuraler Vorläufer angetrieben (Zechner et al., 2003). Durch eine Aktivierung des WNT/β-Catenin Signalwegs

(Abbildung 10) wird  $\beta$ -Catenin in der Zelle stabilisiert. Die Liganden des WNT Signalwegs stammen aus parakriner und autokriner Sekretion. Die vermehrte Translokation von  $\beta$ -Catenin in den Zellkern führt zu einer spezifischen Aktivierung von Zielgenen, welche die Proliferation der neuralen Stammzellen unterstützen (Faigle and Song, 2013). Um  $\beta$ -Catenin *in vitro* zu erhöhen kann beispielsweise der pharmakologische Wirkstoff CHIR99021 verwendet werden (Esfandiari et al., 2012).

### 1.2.2 Vaskulo- und Angiogenese

Die koordinierte Entwicklung des embryonalen Gefäßsystems ist von außerordentlicher Wichtigkeit, da es den heranwachsenden Embryo mit Sauerstoff und Nährstoffen versorgt sowie den Abtransport von Metaboliten gewährleistet. Bereiche der frühen Gefäßbildung finden sich sowohl im extraembryonalen als auch im intraembryonalen Mesenchym. Das viszerale Seitenplattenmesoderm (**Abbildung 8**) sowie der extraembryonale Dottersack und die Plazenta stellen die wichtigsten Quellen für die hämatopoetischen sowie endothelialen Vorläuferzellen dar (Caprioli et al., 2001; Nguyen et al., 2014). Neben dem splanchnischen Anteil besteht das laterale Seitenplattenmesoderm auch aus einem somatischen Teil, aus dem das Beckenskelett und die mesodermalen Komponenten der Gliedmaßen hervorgehen. Weiter ist das Mesoderm in intermediäre, paraxial und Chordamesoderm unterteilt (James and Schultheiss, 2003). Das daneben liegende intermediäre Mesoderm formt das Urogenitalsystem einschließlich Nieren, Geschlechtsdrüsen und den dazugehörigen Harnleiter (Wolff-Gang). Aus dem paraxialem Mesoderm, das auch als Somite bezeichnet wird, entsteht Muskulatur sowie das Binde- und Stützgewebe. Unterhalb des Neuralrohres liegt das Chordamesoderm, das das Notochord bildet (Tani et al., 2020).

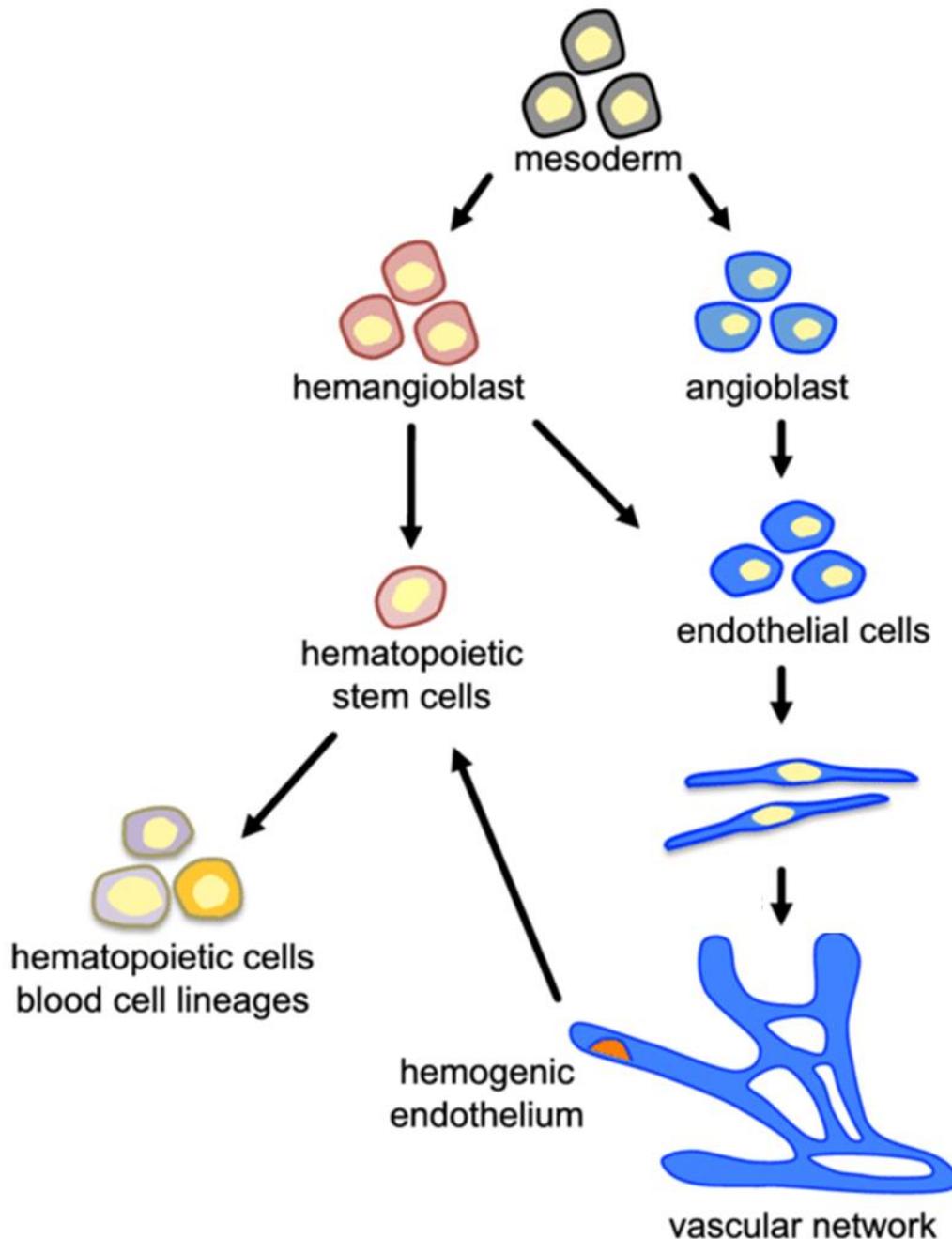
## Seitenplattenmesoderm



### **Abbildung 8: Überblick der mesodermalen Strukturen**

Während der Gastrulation ist das Mesoderm in vier verschiedene Bereiche unterteilt, aus dem unterschiedliche Strukturen hervorgehen. Das Notochord wird vom Chordamesoderm gebildet. Durch das paraxiale Mesoderm werden die Somiten hervorgebracht. Das Urogenitalsystem mit Harnleiter (Wolff-Gang) wird vom intermediären Mesoderm gebildet. Das Seitenplattenmesoderm, in dem der Ursprung der Blutgefäßbildung liegt, unterteilt sich in somatisches und splanchnisches Mesoderm. Abbildung modifiziert nach (Grays et al., 1918).

Zunächst bilden sich Hämangioblasten und Angioblasten als Progenitoren der Endothelzellen sowie der hämatopoetischen Linie (**Abbildung 9**). Daraus formieren sich die sogenannten Blutinseln. Anschließend bildet sich ein einschichtiges Endothel mit tubulären Strukturen, was zur Ausbildung eines primären Gefäßplexus führt. Große Teile der frühen Endothelien sind zur Blutbildung befähigt und bringen hämatopoetische Zelltypen hervor, die ins Gefäßlumen abgegeben werden. Die *de novo* Entwicklung von Blutgefäßen aus den embryonalen Stamm- und Vorläuferzellen wird als Vaskulogenese bezeichnet. Hierbei kommt es durch Differenzierung und Zusammenlagerung von endothelialen Vorläuferzellen zunächst zu Formation von endothelialen Gefäßschläuchen (Risau and Flamme, 1995). Die Vaskulogenese findet nicht ausschließlich während der Embryonalentwicklung statt, sondern kann auch bei pathologischen Prozessen im adulten Organismus beobachtet werden (Nolan et al., 2007). Hier stellt die vaskuläre Adventitia ein Reservoir für Stammzellen dar, welche via Vaskulogenese neue Gefäße generieren können (Wörsdörfer et al., 2017).



**Abbildung 9: Schematisches Modell der frühen Gefäßentwicklung**

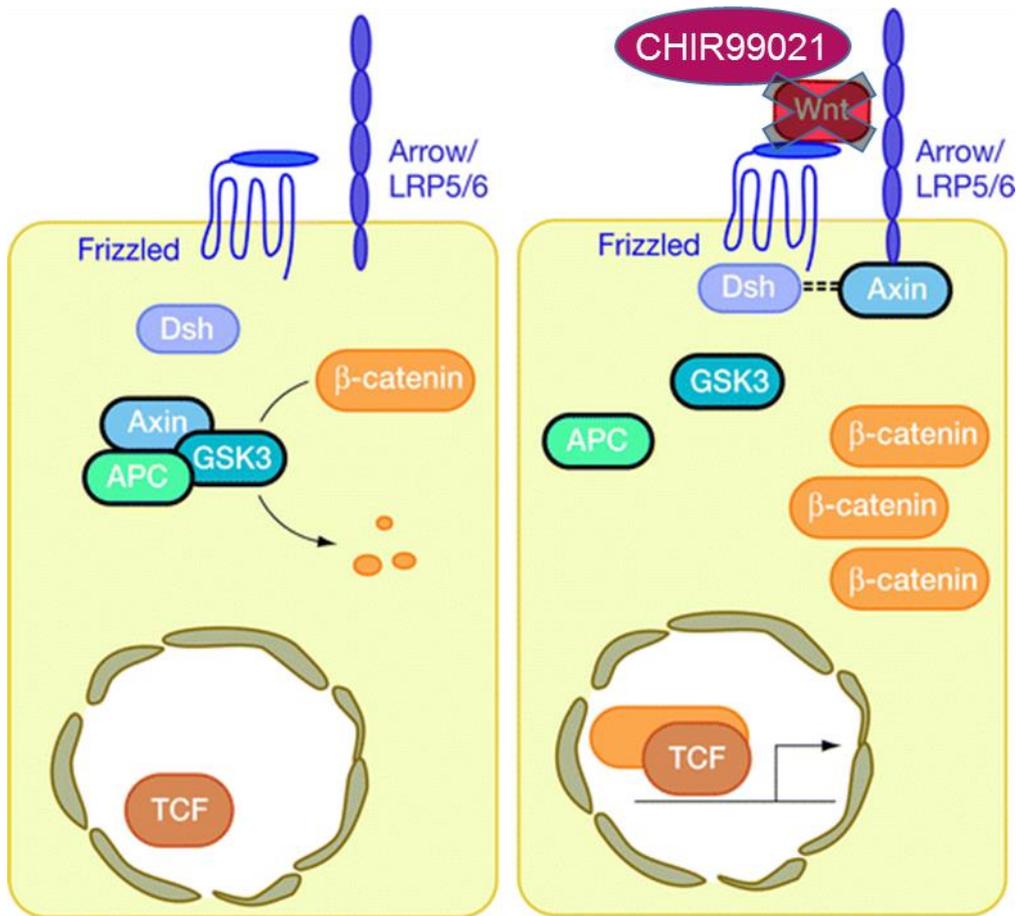
Mesodermale Zellen sind die gemeinsamen Vorläuferzellen von Hämangioblasten und Angioblasten, aus den Endothelzellen entstehen. Die Endothelzellen formieren sich zu einem vaskulären Netzwerk. Die hämatopoetische Linie entspringt aus Hämangioblasten oder aus dem hämogenem Endothel. Abbildung modifiziert nach (Tsuji-Tamura and Ogawa, 2018).

Angiogenese ist im Vergleich zur Vaskulogenese die Entstehung von neuen Gefäßen aus bereits vorhandenen Blutgefäßen. Man spricht hierbei auch von einer Gefäßaussprossung (Risau et al., 1988). Bei der Angiogenese werden die Zell-Zell-Kontakte in bestehenden Gefäßen gelockert, die Proliferation der

endothelialen Gefäßwandzellen angeregt und durch Reorganisation ein erweitertes stabiles Kapillarnetz erzeugt. Nach der Bildung eines primären endothelialen Gefäßplexus kommt es zur Rekrutierung einer oder mehrerer Zellschichten aus Perizyten bzw. glatten Muskelzellen aus dem umliegenden Mesenchym (Risau, 1997). Diese periendothelialen Zellen verstärken die Gefäßwand und formieren die sogenannte *Tunica media*. Außerdem bildet sich die dritte Wandschicht des Gefäßes, die sogenannte *Tunica adventitia*. Diese stellt ein lockeres Bindegewebe dar, welches neben kleinen Blutgefäßen (*Vasa vasorum*) und peripheren Nerven, eine komplexe und vielseitige Stammzellnische beherbergt (Wörsdörfer et al., 2017).

#### 1.2.2.1 *Generierung mesodermaler Progenitorzellen*

Angioblasten entstehen im embryonalen Mesenchym. Dieses wiederum leitet sich vom Mesoderm ab. Daher ist der erste Schritt in der Erzeugung von Blutgefäßen aus pluripotenten Stammzellen die Induktion mesodermaler Progenitoren. Die mesodermale Spezifizierung sowie die darauffolgenden gefäßbildenden Prozesse werden durch verschiedene Signalwege eingeleitet und gesteuert (Patsch et al., 2015; Risau, 1997). Für die mesodermale Induktion spielen insbesondere der TGF- $\beta$  Signalweg sowie der WNT Signalweg eine wichtige Rolle (Tam and Loebel, 2007) (**Abbildung 7, Abbildung 10**).



**Abbildung 10: WNT Signalweg**

Der kanonische WNT Signalweg in inaktiver und aktiver Form. Der WNT Signalweg wird durch das sekretierte lipidmodifizierte Glykoprotein WNT, das extrazellulär gebildet wird, aktiviert. WNT inhibiert GSK3 $\beta$ . Dadurch wird  $\beta$ -Catenin nicht degradiert und kann im Zellkern wirken. Abbildung modifiziert nach (Logan and Nusse, 2004).

Das Schlüsselprotein des kanonischen WNT Signalwegs ist GSK3, das die intrazelluläre Konzentration von  $\beta$ -Catenin reguliert. Das WNT Protein bindet an den Frizzled Rezeptor und dem Low-Density-Lipoprotein verwandte Protein 5/6 (LRP5/6) an. Dessen Aktivierung führt letztlich zu einer Deaktivierung der Proteinkinase GSK3- $\beta$  durch Rekrutierung von Dishevelled (Dvl1-3) und Axin an die Membran und eine Dissoziation des Destruktionskomplex aus Glykogensynthasekinase 3 $\beta$  (GSK3 $\beta$ ), Adenomatosis Polyposis Coli (APC) und Axin (Clevers and Nusse, 2012). GSK3- $\beta$  phosphoryliert normalerweise  $\beta$ -Catenin. Dies führt zu einer Ubiquitylierung von  $\beta$ -Catenin und dessen Abbau im Proteasom. Folglich bewirkt die Aktivierung des WNT Signalweges einen erhöhten intrazellulären  $\beta$ -Catenin-Spiegel. Das stabilisierte  $\beta$ -Catenin kann nun gemeinsam mit TCF als Transkriptionsfaktor im Zellkern agieren. Durch das Inhibieren von GSK3 $\beta$

während der Differenzierung pluripotenter Stammzellen (Sato et al., 2004), bspw. durch Zugabe des pharmakologischen Wirkstoffs CHIR99021, kann eine gezielte Induktion in mesodermale Vorläuferzellen erreicht werden (Patsch et al., 2015).

Die Expression des Transkriptionsfaktors Brachyury (T) während der Differenzierung der pluripotenten Stammzellen ist ein Marker für die erfolgreiche Erzeugung einer mesodermalen Vorläuferpopulation (Faial et al., 2015). Der T-Box-Transkriptionsfaktor (T) Brachyury ist ein Downstream-Faktor des WNT Signalweges und wird im Primitivstreifen und im Notochord exprimiert (Wilkinson et al., 1990). Aus diesem Grund wird aus den Brachyury positiven Zellen das laterale mesodermale Gewebe nach der Gastrulation erzeugt. Das laterale mesodermale Gewebe hat die Fähigkeit Gefäße zu bilden.

Zur Regulierung der embryonalen Blutgefäßneubildung und der Etablierung und Aufrechterhaltung der Integrität der Gefäßwand ist der transformierende Wachstumsfaktor (TGF) ein wesentlicher Bestandteil (Pepper, 1997). Eine Zugabe von TGF- $\beta$  Zytokinen fördert die Mesoderm-Genexpression, während die Endo- und Ektoderm-Genexpression reduziert wird. Die Hemmung der TGF- $\beta$  Signalkaskade durch SB431542 (**Abbildung 7**) resultiert in einer verminderten Expression mesodermaler Gene (Bai et al., 2013). Aus diesem Grund ist ein weiterer wichtiger Faktor BMP4, welcher die Differenzierung pluripotenter Stammzellen in gefäßbildende mesodermale Vorläuferzellen unterstützt (Winnier et al., 1995). Das Protein ist ein Ligand für die Aktivierung des TGF- $\beta$  Rezeptors und induziert durch Expression des Transkriptionsfaktors Foxf1 konzentrationsabhängig das Seitenplattenmesoderm (Wilm et al., 2004). So dient BMP als positiver Vermittler der Links-Seiten-Determinante im Mesoderm und ist für die Nodal-Induktion erforderlich. Das TGF- $\beta$  Familienmitglied Nodal ist für die Mesodermbildung notwendig (Fujiwara et al., 2002). Neben der Gefäßbildung ist TGF- $\beta$  für die Stabilisierung der Gefäßwand erforderlich. Das Fehlen von TGF- $\beta$  Zytokinen als auch TGF- $\beta$  Rezeptoren kann eine Gefäßwandfragilität zuzufolge haben (Pepper, 1997).

### 1.3 Ziel der Arbeit

Studien der letzten 10 Jahre haben gezeigt, dass sich ein Großteil der menschlichen Gewebe im Organoidmodell *in vitro* nachbilden lässt. Organtypische Epithelien werden dabei aus adulten oder pluripotenten Stammzellen gebildet und durch Selbstorganisation entsteht das entsprechende parenchymale Organkompartiment. Jedoch fehlt bei den meisten dieser Mikrogewebe die stromale Komponente und insbesondere ein funktionelles Blutgefäßsystem. Dies ist wichtig, um die Zell- und Gewebestruktur des Organoids dem echten Gewebe und Organ ähnlicher zu machen, womit die wichtigen endothelialen Signalmechanismen ebenfalls in das Organoid integriert werden. Das Stroma beinhaltet neben dem Bindegewebe Blut- und Lymphgefäße, Immunzellen und periphere Nerven. Die meisten Teile des Stromas entstehen aus dem Mesoderm.

Aufgrund des Fehlens des stromalen Anteils, insbesondere des vaskulären Systems, lässt sich beobachten, dass neurale Organoide in Langzeitkultur nekrotische Kerne in der innersten Region aufweisen (Lancaster and Knoblich, 2014; Yin et al., 2016). Darüber hinaus zeigen die Studien der letzten Jahre, dass ein Zusammenspiel von Endothelzellen, mesenchymalen Zellen und Parenchymzellen zur funktionellen und strukturellen Ausreifung der Organoide unerlässlich ist. Vor allem Endothelzellen und Mikroglia beeinträchtigen die funktionelle Differenzierung der neuronalen Vorläuferzellen und die Ausreifung funktioneller Neurone (Reemst et al., 2016; Shen et al., 2004). Organoidmodelle, die nicht alle Organkompartimente beinhalten, bleiben auch nach langen Kulturzeiten nur Ansätze ihres Originals. Um Organoide näher an die Originalgewebe heranzubringen und ausreichend zu versorgen, muss nicht nur das entsprechende Epithel gebildet werden, sondern auch eine Vaskularisierung durch einen stromalen Anteil realisiert werden.

Das Ziel meiner Arbeit war es, eine Strategie zu entwickeln, eine Blutgefäßbildung als eine stromale Komponente in neurale Organoide zu integrieren.

Dadurch sollte im Organoidmodell eine erfolgreiche Vaskularisierung erreicht werden.

Die erste Aufgabe dabei war das Etablieren neuraler Vorläuferzellen aus iPS-Zellen, wofür ein vorhandenes Induktionsprotokoll angepasst und optimiert wurde (Reinhardt et al., 2013). Die Generierung soll ausschließlich in 3D Aggregaten erfolgen, die sich aus neuralen primitiven Vorläuferzellen zusammensetzen.

Für die Vaskularisierung des Organoids sollten mesodermale Vorläuferzellen genutzt werden. Hierzu sollten iPS-Zellen im 3D Aggregat in mesodermale Vorläuferzellen differenziert werden. Da das viszerale Seitenplattenmesoderm für die Vaskularisierung im Embryo verantwortlich ist, sollte eine entsprechende Identität der mesodermalen Vorläufer angestrebt werden. Hierzu musste ebenfalls ein geeignetes mesodermales Induktionsprotokoll (Patsch et al., 2015) etabliert und an die 3D Zellkultur angepasst werden.

Nach erfolgreicher Etablierung beider Induktionsmethoden sollten die neuralen und mesenchymalen Aggregate zu sogenannten Assembloids zusammengeführt und gemeinsam kultiviert werden. Anschließend erfolgte eine ausführliche Analyse und Charakterisierung der resultierenden Gewebe zu verschiedenen Zeitpunkten der Organoidreifung. Dazu sollten die neuro-mesenchymalen Organoide bis zu zehn Monate kultiviert werden.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

Die Chemikalien wurden von Sigma-Aldrich (St. Louis, USA) erworben und Lösungen wurden mit sterilem Wasser (Ampuwa®) von Fresenius Kabi (Bad Homburg, Deutschland) hergestellt. (Bei Abweichung werden entsprechende Angaben gemacht.)

#### 2.1.1 Geräte

##### ***Autoklaven***

DX-23	Sytec (Wettenberg, Deutschland)
Hiclave HG-133	HMC Europa (Tüßling, Deutschland)
Varioklav® Classic 400E	HP-Medizintechnik (Oberschleißheim, Deutschland)
CO <sub>2</sub> - Inkubator Heracell 240i	Thermo Scientific (Waltham, USA)

##### ***Brutapparat***

Halbautomatischer Motorbrüter	Schuhmann
-------------------------------	-----------

##### ***Chemilumineszenz***

Fusion Solo 4M	Vilber Lourmat (Eberhardzell, Deutschland)
----------------	-----------------------------------------------

##### ***Durchflusszytometer***

BD FACSCanto II	BD Biosciences (Franklin Lakes, New Jersey, USA)
-----------------	-----------------------------------------------------

### ***Elektrophorese-System***

Mini-PROTEAN Tetra System	Bio-Rad Laboratories (Hercules, USA)
PowerPac™ Basic	Bio-Rad Laboratories (Hercules, USA)
Trans-Blot Turbo	Bio-Rad Laboratories (Hercules, USA)

### ***Eisbereiter***

AF-100	Scotsman (Pogliano, Italien)
--------	------------------------------

### ***Folienschweißgerät***

PFS-300	Dongguan Boro Plastic Products (Dongguan, Volksrepublik China)
---------	-------------------------------------------------------------------

### ***Inkubator***

B 6120 (I)	Heraeus (Hanau, Deutschland)
C150	Binder (Tuttlingen, Deutschland)
G25 Incubator Shaker	New Brunswick Scientific (Edison, USA)
MCO-19AICUV-PE	Panasonic Healthcare Co. (Ora-Gun, Gunma, Japan)

### ***Magnetrührer***

WiseStir® MS-20A	Witeg (Wertheim, Deutschland)
------------------	-------------------------------

### ***Mikroskope***

Axiovert 40 CFL	Carl Zeiss AG (Oberkochen, Deutschland)
-----------------	--------------------------------------------

Axioskop 2 mot plus

Carl Zeiss AG

(Oberkochen, Deutschland)

11 090 137 002

Leica Microsystems CMS

(Wetzlar, Deutschland)

ECLIPSE Ti confocal

Nikon (Chiyoda, Japan)

laser scanning microscope

### ***Mikrowelle***

NN-E201WM

Panasonic (Kadoma, Japan)

### ***Pipetten***

Accu-Jet Pro

Brand (Wertheim, Deutschland)

Neon™ Pipette

Invitrogen™ (Carlsbad, USA)

Research plus

Eppendorf (Hamburg, Deutschland)

Transferpette S

Brand (Wertheim, Deutschland)

### ***Rocker***

Rocker 3D digital

IKA®-Werke GmbH & Co. KG

(Staufen, Deutschland)

### ***Rotatoren***

Rotavapor EL

Büchi Labortechnik

(Essen, Deutschland)

Tube Revolver 88881002

Thermo Fisher Scientific

(Waltham, USA)

### ***Rotoren***

JA-25.50

Beckman Coulter (Brea, USA)

J-Lite® JLA-16.250

Beckman Coulter (Brea, USA)

### ***Sicherheitswerkbänke***

Airstream

BSB4

Esco Micro (Singapur)

elaire® Flow Laboratories  
(Kew, Australien)

### ***Spektrophotometer***

SmartSpec Plus

Bio Rad (Hercules, Kalifornien, USA)

### ***Stickstoffbehälter***

ARPEGE 110

Cryo 1 °C freezing container

Air Liquide (Paris, Frankreich)

Nalgene (Roskilde, Dänemark)

### ***Thermoschüttler***

PHMT

Grant Instruments Ltd.

(Shepreth, Großbritannien)

### ***Thermostat***

TDB-100

Biosan (Riga, Lettland)

### ***Transfektionssystem***

Neon™ Transfection

System MPK5000

Invitrogen™ (Carlsbad, USA)

### ***Vortexmischer***

RS-VA10

VortexGenie® 2 G560E

Phoenix Instruments

(Garbsen, Deutschland)

Scientific Industries (New York, USA)

### **Waage**

EG 2200-2NM

Kern & Sohn

(Balingen, Deutschland)

### **Wasserbad**

WNB 14

Memmert

(Schwabach, Deutschland)

### **Zählkammer**

Neubauer-Zählkammer

Marienfeld Superior

(Lauda-Königshofen, Deutschland)

### **Zentrifuge**

Avanti J-26SXP

Beckman Coulter™ (Brea, USA)

Heraeus Multifuge X1R

Thermo Fisher Scientific

(Waltham, USA)

Heraeus Pico 17

Thermo Fisher Scientific

(Waltham, USA)

## **2.1.2 Zelllinien, Eier**

Humane Foreskin-iPS-Zellen

1c/2 p31 von Chee Keong Kwok

SPF Eggs

Valo BioMedia (Osterholz-

Scharmbeck Deutschland)

### 2.1.3 Puffer, Medien, Lösungen

*Tabelle 1: PBS-Puffer 7,4 pH*

Natriumchlorid	137 mM
Kaliumchlorid	2,68 mM
Di-Natriumhydrogenphosphat	9,58 mM
Kaliumdihydrogenphosphat	1,47 mM

*Tabelle 2: Matrigel-Haftlösung*

Matrigel® Matrix	287 µl, Aliquot: 1:85
DMEM/F12 (1x)	24 ml

*Tabelle 3: Einfriermedium*

Knockout™ Serum Replacement	90 %
DMSO	10 %

*Tabelle 4: MACS-Medium*

StemMACS™ iPS-Brew XF, human	500 ml
StemMACS™ iPS-Brew XF 50x supplement	10 ml

### 2.1.3.1 Induktionsmedien

#### Generierung neurale Progenitorzellen

Tabelle 5: NI-Medium 1

<i>Bestandteile</i>	<i>Konzentration</i>	<i>Volumen für 50 ml</i>
DMEM/F12	50 %	24 ml
Neurobasalmedium	50 %	24 ml
B27 ohne Vitamin A (50x)	1x	1 ml
N2-supplement (100x)	1x	0,5 ml
L-Glutamin (200 mM)	2 mM	0,5 ml
CHIR99021 (10 mM)	3 $\mu$ M	15 $\mu$ l
SB431542 (50 mM)	10 $\mu$ M	10 $\mu$ l
Dorsomorphin (10 mM)	1 $\mu$ M	5 $\mu$ l
PMA (10 mM)	0,5 $\mu$ M	2,5 $\mu$ l

Tabelle 6: NI-Medium 2

<i>Bestandteile</i>	<i>Konzentration</i>	<i>Volumen für 50 ml</i>
DMEM/F12	50 %	24 ml
Neurobasalmedium	50 %	24 ml
B27 ohne Vitamin A (50x)	1x	1 ml
N2-supplement (100x)	1x	0,5 ml
L-Glutamin (200 mM)	2 mM	0,5 ml
Vitamin C (25 mg/ml)	0,0625 mg/ml	125 $\mu$ l
CHIR99021 (10 mM)	3 $\mu$ M	15 $\mu$ l
PMA (10 mM)	0,5 $\mu$ M	2,5 $\mu$ l

*Tabelle 7: ND-Medium*

<i>Bestandteile</i>	<i>Konzentration</i>	<i>Volumen für 50 ml</i>
DMEM/F12	50 %	24 ml
Neurobasalmedium	50 %	24 ml
B27 ohne Vitamin A (50x)	1x	1 ml
N2-supplement (100x)	1x	0,5 ml
L-Glutamin (200 mM)	2mM	0,5 ml
Vitamin C (25mg/ml)	0,0625 mg/ml	125 µl
Penicillin/Streptomycin (100x)	1x	500 µl

### **Generierung mesodermale Progenitorzellen**

*Tabelle 8: MI-Medium*

<i>Bestandteile</i>	<i>Konzentration</i>	<i>Volumen für 50 ml</i>
Advanced DMEM/F12	100 %	50 ml
L-Glutamin (200 mM)	2 mM	500 µl
Vitamin C (25 mg/ml)	0.0625 mg/ml	120 µl
CHIR99021 (10 mM)	10 µM	50 µl
BMP4 (50 µg/ml)	25 ng/ml	0,75 µl in 1,5 ml

### 2.1.3.2 Lösungen für immunhistochemische Färbung

*Tabelle 9: PFA-Lösung (4 %)*

PFA	4 %
PBS	96 %

*Tabelle 10: Citratpuffer (Demaskierung IF) pH 6,0*

0.1 M Zitronensäure	18 ml
0.1 M Tri-Natriumcitrat	82 ml
dH <sub>2</sub> O	900 ml

*Tabelle 11: Blockinglösung*

4 % BSA	1 ml
PBS	19 ml
0,1 % Triton X-100 (Triton entfällt bei Oberflächenmarkern)	124 µl

*Tabelle 12: Mowiol*

Glycerol	6 g
Mowiol® 4-88 (SigmaAldrich; St. Louis, USA)	2,4 g
H2O	6 ml
0.2 M Tris-HCL, pH 8,5	12 ml
DABCO® (Carl Roth; Karlsruhe, Deutschland)	25 mg

*Tabelle 13: H.-E.-Färbung*

Hämalaun nach Mayer	Hämatoxilin	1 g/l
	NaIO3	0,2 g/l
	Kaliumaluminiumsulfat	50 g/l
	Chloralhydrat	50 g/l
	Kristalline Zitronensäure	1 g/l
Eosin, 0,1 % wässrig	Eosin	1 g/l

### 2.1.3.3 Lösungen für proteinbiochemische Methode

#### Probepvorbereiten

*Tabelle 14: Blockinglösung*

TBST (1x)	50 ml
BSA	2,5 g

*Tabelle 15: Inkubationslösung*

TBST (1x)	50 ml
Magermilchpulver	2,5 g

*Tabelle 16: Bradford-Lösung*

Roti®-Quant (5x)	5 ml
Ampuwa®	20 ml

*Tabelle 17: Lämmli-Ladepuffer 5x*

Tris(hydroxymethyl)-aminmethan-HCl pH 6,8	125 mM
2-Mercaptoethanol	10 %
SDS	4 %
Glycerol	20 %
Bromphenol	0,2 %

#### SDS Gele

*Tabelle 18: Trenngelbuffer*

Tris-HCl/SDS pH 8,8	1,5 M Tris-HCl pH 8,8 0,4 % SDS
---------------------	------------------------------------

*Tabelle 19: Sammelgelpuffer*

Tris HCl/SDS pH 6,8	0,5 M Tris-HCl pH 6,8 0,4 % SDS
---------------------	------------------------------------

*Tabelle 20: 5x Laufpuffer*

Tris(hydroxymethyl)aminomehtan	125 mM
Glycin	1 M
SDS	0,5 %

*Tabelle 21: 10x TBST*

Tris-HCl	100 mM
NaCl	1,5 M
Tween 20	0,5 %

*Tabelle 22: Transferpuffer für Western Blot*

Tris-HCl pH 8,3	25 mM
Glycin	150 mM
MeOH	10 %

*Tabelle 23: Ponceau Färbelösung*

Trichloressigsäure	3 %
Ponceaus	0,5 %
dH2O	96,5 %

## Entwicklung

*Tabelle 24: ECL1*

Luminol	500 µl
Coumeric acid	220 µl
1M Tris-HCl pH 8,5	5 ml
dH2O	50 ml

*Tabelle 25: ECL2*

H2O2 30 %	32 µl
1 M Tris-HCl pH 8,5	5 ml
dH2O	50 ml

#### 2.1.3.4 Lösungen für Clearingverfahren

*Tabelle 26: Penetration Puffer*

Triton X-100	4 µl
1.5 M Glycin	400 µl
DMSO	400 µl
PBS	1196 µl

*Tabelle 27: Blocking Puffer*

Triton X-100	4 µl
BSA	120 mg
DMSO	200 µl
PBS	1676 µl

*Tabelle 28: Washing Puffer*

0,2 % Tween-20	4 µl
PBS	49,9 ml

*Tabelle 29: Antibody Puffer*

Tween-20	4 µl
BSA	60 mg
DMSO	100 µl
PBS	1,836 ml

*Tabelle 30: Staining Puffer 5 % NDS*

PBS	50 ml
Normal Donkey Serum	2,5 ml

## 2.1.4 Antikörper

Tabelle 31: Primärantikörper

<i>Antikörper/Antigen</i>	<i>Ursprung</i>	<i>Anwendung</i>	<i>Verdünnung</i>	<i>Firma</i>
Beta-Actin	Mouse	WB	1:20000	BD Biosciences Ordering no.: 610153
Brachyury	Goat	FACS WB IF	1:100 1:500 1:100	R&D Systems AF 2085
CD31	Mouse	IHC	1:200	Dako M0823
GFAP	Rabbit	IHC	1:1000	Dako Z0334
IBA1	Rabbit	IHC	1:500	Wako Ordering no: 019-19741
PAX6	Rabbit	IHC WB	1:100 1:1000 oder 1:3000	BioLegend 907301
SOX1	Goat	WB IF	1:400 1:200	R&D Systems AF3369
TUJ1	Mouse	IF	1:1000	BioLegend 801202
$\alpha$ -Smooth Muscle Actin	Rabbit	IF	1:200	Abcam ab5694
MAP2	Rabbit	IF	1:500	Abcam Ab32454

Tabelle 32: Sekundärantikörper

<i>Antikörper/Antigen</i>	<i>Ursprung</i>	<i>Anwendung</i>	<i>Verdünnung</i>	<i>Firma</i>
Cy2	Goat Anti-Mouse Goat Anti-Rabbit, Donkey Anti-Goat	IF	1:300	Dianova
Cy3	Goat Anti-Mouse, Goat Anti-Rabbit, Donkey- Anti-Goat	IF	1:800	Dianova
Peroxidase konjugierte Goat Anti-Rabbit		WB	1:5000	Dianova
Peroxidase konjugierte Goat Anti-Mouse		WB	1:10000	Dianova

*Tabelle 33: konjugierte Antikörper*

<i>Antikörper/Antigen</i>	<i>Ursprung</i>	<i>Anwendung</i>	<i>Verdünnung</i>	<i>Firma</i>
SOX1		FACS, IHC	1:50	Milteny Bio- tec, Ordering no: 130-111-158
REA Control (I)-APC human (background)		FACS	1:10	Milteny Bio- tec, Ordering no: 130-104-615

## 2.1.5 Chemikalien, Small Molecules und Wachstumsfaktoren

Advanced DMEM	Gibco™ (Karlsruhe, Deutschland)
Agarose	Biozym (Hessisch Oldendorf, Deutschland)
Ammoniumpersulfat (APS) 10 %	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland)
Aprotinin (Proteaseninhibitor)	Sigma-Aldrich (München, Deutschland)
B27 ohne Vitamin A supplement	Gibco (Karlsruhe, Deutschland)
BMP4 50 µg/ml 50 µg/ml in 4 mM HCl, 0.1 % BSA in d H <sub>2</sub> O	PeproTech (Rocky Hill, USA)
Bovine serum albumin (BSA)	Sigma-Aldrich (, Deutschland)
CHIR99021 10 mM	AxonMedchem (Groningen, Niederlande)
DAPI 1:5000	Roche Diagnostics (Mannheim, Deutschland)
Dimethyl sulphoxide (DMSO)	Carl Roth (Karlsruhe Deutschland)
DMEM	Gibco™ (Karlsruhe, Deutschland)
DMEM/F12	Gibco™ (Karlsruhe, Deutschland)
Dorsomorphin 10 mM	Tocris (Bristol, England)
Dulbecco's PBS	Sigma-Aldrich (München, Deutschland)
Ethanol	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland)
Ethylcinnamat	Sigma-Aldrich (München, Deutschland)
Fetal calf serum (FCS)	Biochrom (Berlin, Deutschland)
Hämatoxylin	Chroma
Knockout™ Serum Replacement	Gibco™ (Karlsruhe, Deutschland)

Leupeptin (Proteaseninhibitor)	Sigma-Adrich (München, Deutschland)
L-Glutamin 200 mM	Gibco™ (Karlsruhe, Deutschland)
Lysispuffer CellLytic™M	Sigma-Adrich (München, Deutschland)
Matrigel® Matrix	BD (Heidelberg, Deutschland)
Miltenyi Biotec	(Bergisch Gladbach, Deutschland)
Molekulargewichtsmarker PageRuler™ Prestained Protein Ladder	Thermo Scientific (Schwerte, Deutschland)
Mowiol	Sigma-Aldrich (München, Deutschland)
N2-Supplement	Gibco™ (Karlsruhe, Deutschland)
Natural Donkey Serum	Sigma-Aldrich (München, Deutschland)
Neurobasalmedium	Gibco™ (Karlsruhe, Deutschland)
Non-essential amino acids (NEAA; 100X) L-Glutamin	Thermo Scientific™ (Schwerte, Deutschland)
Paraformaldehyde (PFA)	Applichem (Darmstadt, Deutschland)
Penicillin/Streptomycin (Pen/Strep; 100X)	Gibco™ (Karlsruhe, Deutschland)
Pepstatin (Proteaseninhibitor)	Sigma-Adrich (München, Deutschland)
Poly-2hydroxyethyl methacrylat	Sigma-Aldrich (München, Deutschland)
Polyacrylamid 30 % Rotiphorese® Gel 30 (37,5:1)	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland)
PonceauS	AppliChem GmbH (Darmstadt, Deutschland)
Purmophamin (PMA) 10 mM	Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, Deutschland)

PVDF-Membran Amersham™	Sigma-Aldrich (München, Deutschland)
SB 431542 50 mM (SB)	Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, Deutschland)
SDS	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
StemMACS™ iPS-Brew XF 50x supplement	Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, Deutschland)
StemMACS™ iPS-Brew XF, human (Macs Brew)	Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, Deutschland)
StemPro™ Accutase™	Gibco™ (Karlsruhe, Deutschland)
TEMED	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland)
Tetraacetic acid (EDTA)	Serva (Heidelberg, Deutschland)
Tris	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
TritonX100	Sigma-Aldrich (München, Deutschland)
Trypsin	Biochrom (Berlin, Deutschland)
Tween® 20	Sigma-Aldrich (München, Deutschland)
Viobility 405/452	Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, Deutschland)
Vitamin C 25 mg/ml	Sigma-Aldrich (München, Deutschland)
Y27632 Rock Inhibitor (RI)	Millipore (Darmstadt, Deutschland)
β-mercaptoethanol 50 mM	Gibco™ (Karlsruhe, Deutschland)

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Zellkultur

Für diese Arbeit wurden von menschlicher Vorhaut abgeleitete, induzierte, pluripotente Stammzellen (hFSiPS-Zellen) verwendet. Die iPS-Zellen wurden bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> im Brutschrank inkubiert. Als Kulturmedium wurde StemMACS™-Medium verwendet. Nach dem Supplementieren wurde das *MACS-Medium* täglich gewechselt.

#### 2.2.1.1 Matrigelbeschichtung

Für die Kultivierung iPS-Zellen wurden Matrigel-beschichtete 6-Well Platten verwendet. Die Beschichtung wurde mit *Matriegel-Haftlösung* bei andauernder Kühlung durchgeführt. Die Verdünnung erfolgte nach den Angaben des Herstellers. Anschließend wurden die Wells jeweils mit 1,5 ml Suspension benetzt. Die beschichteten Platten wurden mit Paraffin versiegelt bei 4 °C gelagert. Die Matrigel-suspension konnte bis zu dreimal verwendet werden. Alle verwendeten Pipettenspitzen und Falconröhrchen wurden vorher gekühlt.

#### 2.2.1.2 Auftauen und Kultivieren der iPS-Zellen

Zur längeren Aufbewahrung werden die iPS-Zellen bei -160 °C in flüssigem Stickstoff gehalten. Für den Auftauprozess wurden Medium und Matrigelplatten vorbereitet. Das eingefrorene Zellaliquot wurde langsam bei 37 °C in einem Wasserbad aufgetaut. Die aufgetauten Zellen wurden in 2 ml DMEM aufgenommen und bei 900 rpm für 3 min bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde anschließend verworfen. Das Zellpellet wurde in 1,5 ml MACS-Medium mit 10 µM RI Y27632 aufgenommen und in einem befeuchteten Inkubator (5 % CO<sub>2</sub> und 20 % O<sub>2</sub>) kultiviert. Sobald die Zelldichte bei 80 % lag, wurden die Zellen gesplittet und für

eine weitere Stammhaltung oder zur Induktion von Organoiden verwendet. Die Zellen wurden dafür mit 1 ml StemPro™ Accutase™ für 3 min bei 37 °C abgelöst, anschließend wie zuvor beschrieben zentrifugiert wieder in Kultur genommen oder erneut als Backup eingefroren. Zum Einfrieren wurde das Zellpallet in 1 ml *Einfriermedium* aufgenommen und in einem Cryo-Tube in eine kleine Gefrierbox, welche mit Isopropanol gefüllt ist, für 1-2 Tage bei -80 °C eingefroren. Für eine Lagerung über einen längeren Zeitraum wurden die Zellen nach dem ersten Einfrierprozess in flüssigen Stickstoff überführt.

#### 2.2.1.3 *Ablöseverfahren und Auszählen für adhärente iPS-Zellen*

Zuerst wurde das Medium vollständig abgesaugt und die iPS-Zellen mit PBS gewaschen. Es wurden dann zum Ablösen auf die 6-Well Platte 800 µl StemPro™ Accutase™ pro Well auf die iPS-Zellen gegeben und für 10 min in den Inkubatur bei +37 °C gestellt. So wurden die Zell-Zell und Zell-Matrix Verbindungen gelöst. Zum Stoppen wurde das gleiche Volumen DMEM/F12 Medium hinzugefügt. Die Zellsuspension wurde zentrifugiert (800 rpm; 4 °C; 3 min) und der Überstand verworfen. Das Zellpellet wurde in MACS-Medium resuspendiert und die gewünschte Zellzahl weiterverwendet.

#### 2.2.1.4 *Splitten der Zellaggregate in Einzelzellen*

Damit eine Analyse mit Western Blot oder Fluoreszenzmessung durchgeführt werden konnte, mussten die mesodermalen/neuralen Aggregate in Einzelzellen gesplittet werden. Zuerst wurden die Aggregate mit PBS gewaschen. Anschließend wurde auf die Aggregate, je nach Objektgröße mehr oder weniger, StemPro™ Accutase™ für mindestens 5 min bei +37 °C gegeben. Nach den ersten 5 min wurden die Aggregate mechanisch mit einer 1 ml Pipette zerkleinert und weitere 5 min in den Inkubator gegeben. Um die StemPro™ Accutase™ zu stoppen, wurde die gleiche Menge des Mediums DMEM/F12 dazu gegeben. Danach wurden die Zellen zentrifugiert. Dafür sind sie in ein 15 ml Falcon überführt worden.

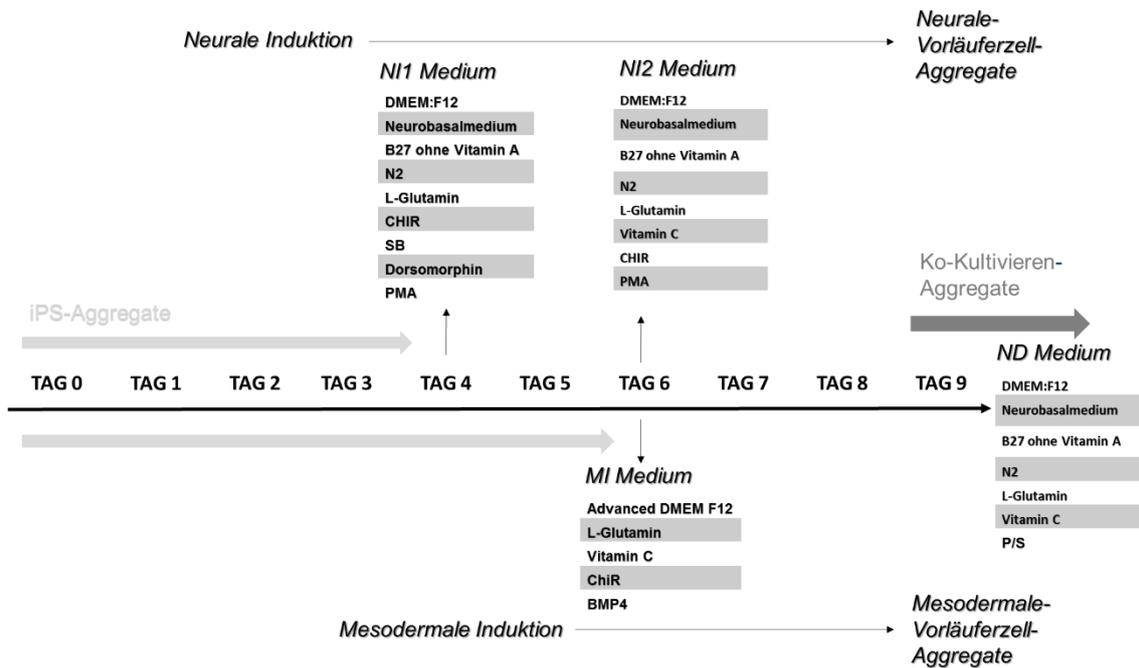
Nach dem Absaugen des Überstandes wurde das Zellpellet mit 5 ml PBS resuspendiert. Die resuspendierten Zellen wurden durch den EASYstrainer 40 µm gepresst.

#### 2.2.1.5 *Poly(2-hema) Beschichtung*

Für die Kultivierung der Aggregate wurden die 6-Well Platten mit einer adhäsiven Lösung beschichtet. Dafür wurden 100 mg Poly(2-hydroxyethylmethacrylat) in 100 ml 100 % Ethanol über Nacht in einem Rotator gelöst und anschließend auf die Platten zu 1 ml pro Well verteilt. Die überschüssige Suspension wurde sofort abgezogen. Die Platten wurden nach Beschichtung für ca. 2 h bei 37 °C getrocknet. Getrocknet konnten die Platten mehrere Monate verwendet werden. Vor Verwendung wurden überschüssige Monomere mit sterilem PBS abgewaschen.

### 2.2.2 **Induktion**

Bevor die Induktion der Aggregate in mesodermale/neurale Vorläuferzell-Aggregate gestartet wird, ist die Bildung von iPS-Zellaggregaten notwendig (**Abbildung 11**). Für die Bildung von iPS-Zellaggregaten wurde die humanen iPS-Zellen bei einer Dichte von ca. 80 % von der Matrigelplatte abgelöst und anschließend auf einer poly-hema beschichteten 6-Well Platte ausgesät.



**Abbildung 11: Protokoll für die Herstellung von iPS-Zellaggregaten, die Induktion in neurale und mesodermale Vorläuferzell-Aggregate und die Ko-Kultivierung der Aggregate**  
 Vor der Induktion mit entsprechenden Induktionsmedien wurden iPS-Zellaggregate ab Tag 0 hergestellt. Die neurale Induktion beginnt am Tag 4 mit NI1-Medium für 48 h und anschließend NI2-Medium für 72 h. Die mesodermale Induktion startet am Tag 6 mit dem MI-Medium für 72 h. Am Tag 9 werden die differenzierten Aggregate zusammengebracht und in ND-Medium kultiviert.

Für die Induktion neuraler Vorläuferzell-Aggregate beträgt die iPS-Zell Aggregatbildung vier Tage. Am vierten Tag wurde mit einem Wechsel des Mediums zu dem *NI-Medium 1* die neurale Differenzierung gestartet. Nach 48 h wurde das Medium erneut gewechselt zu dem *NI-Medium 2* und die Aggregate für weitere 72 h inkubiert. Zeitgleich wird die andere Hälfte nach sechs Tagen der iPS-Zell Aggregatbildung mit einem Mediumwechsel zu dem *MI-Medium* die Differenzierung der Aggregate gestartet. Den Start der Aggregatbildung für die mesodermalen Differenzierung erfolgt zeitlich versetzt zu der Aggregatbildung der neuralen Differenzierung. Beim Zusammenführen wurde auf *ND-Medium* als Langzeit-Kultivierungsmedium gewechselt. Das Ausgangsmaterial für die Ko-Kultivierung sind neurale Vorläuferzell- sowie mesodermale Vorläuferzell-Aggregate am Tag 9. Die unterschiedlichen induzierten Aggregate werden in einem Langzeitmedium *ND-Medium* mit einer Cellstar® Serological Pipette 50 ml überführt. Es werden drei verschiedene Strategien für eine optimale Zusammenführung wie in 3.2.1 beschrieben getestet. Für die Strategien 2 und 3 werden die Vorläuferzell-

Aggregate in eine Einzelzellsuspension mit Hilfe StemPro™ Accutase™ gesplittet. Das *ND-Medium* wurde jeden Tag erneuert.

### **2.2.3 Inkubation der Hühnerembryonen**

Die befruchteten Eier wurden bei +38 °C und einer Luftfeuchtigkeit von 70 % inkubiert. Für den Entwicklungsvergleich wurden die Embryonen nach 4 Tagen entnommen und über Nacht mit *PFA-Lösung (4 %)* fixiert. Anschließend wurden sie in Paraffin eingebettet.

### **2.2.4 Immunhistochemische Färbung**

Die Methode der immunhistochemischen Färbungen basiert auf der Identifizierung von Substanzen mit Hilfe einer Antigen-Antikörper-Reaktion.

#### **2.2.4.1 Paraffinschnitte der Aggregate/Sphären/Organoide**

Für die Paraffinschnitte wurden die Aggregate/Sphären/Organoide im 1,5 ml Eppendorf Reaktionsgefäß gesammelt und mit PBS gewaschen. Die Aggregate/Sphären/Organoide wurden mit *PFA-Lösung (4 %)* für 15 - 30 min (je nach Größe) fixiert. Anschließend wurden die Aggregate erneut mit PBS gewaschen und mit wässriger Agarose (1 %) versetzt. Danach wurden diese in Paraffin eingebettet und histologische Schnitte für die immunhistochemische Färbungen angefertigt.

#### **2.2.4.2 Entparaffinierung, Rehydrierung, saure Demaskierung**

Die Gewebeschnitte werden für jeweils 10 min in Xylol I und Xylol II entparaffiniert. Anschließend werden die Schnitte durch eine absteigende Alkoholreihe (100 % II EtOH, 100 % I EtOH, 96 % EtOH, 80 % EtOH, 70 % EtOH, Aquadest) für je 5

min rehydriert. Danach werden die Schnitte zweimal für je 5 min mit Aquadest gewaschen siehe *Entparaffinierung und Rehydrierung*. Nun erfolgt die saure Demaskierung.

Tabelle 34: *Entparaffinierung und Rehydrierung*

Xylol II	Xylol I	100 % Ethanol II	100 % Ethanol I	96 % Ethanol	80 % Ethanol	70 % Ethanol	dH <sub>2</sub> O
10 min	10 min	5 min	5 min	5 min	5 min	5 min	5 min

Nach der *Entparaffinierung und Rehydrierung* wurden die Gewebsschnitte mittels *Citratpuffer* sauer demaskiert. Dafür wurde der *Citratpuffer* in einer Mikrowelle für 10 Sekunden zum Kochen gebracht. Anschließend erfolgte eine Abkühlzeit von 50 Sekunden. Dieser Vorgang wurde siebenmal wiederholt. Danach werden die Präparate in dem *Citratpuffer* für 30 min bei (Raumtemperatur) RT abgekühlt und mit fließendem Aquadest für 5 min gespült. Vor der Immunfluoreszenzfärbung wurden die Schnitte in PBS gewaschen.

#### 2.2.4.3 Immunfluoreszenzfärbung

Zuerst wurden die Schnitte mit dreimal PBS (0,01 M) gewaschen, danach wurden die unspezifischer Bindungen für 1 h RT mittels *Blockinglösung* in einer feuchten Kammer blockiert. Anschließend erfolgte die Primärantikörperinkubation in der *Blockinglösung* über Nacht bei +4 °C in einer Dunkelkammer. Am nächsten Tag wurden die Schnitte jeweils dreimal mit PBS gewaschen und daraufhin mit dem Zweitantikörper für 1 h versetzt. Um eine Kernfärbung zu erhalten, wurde in den letzten 10 min DAPI 1:5000 zu dem Zweitantikörpergemisch hinzugefügt. Die Negativkontrollen werden parallel dazu durchgeführt, indem auf den Primärantikörper verzichtet wird. Zum Eindecken wurde *Mowiol* verwendet. Die getrockneten Schnitte konnten bei +4 °C aufbewahrt werden.

#### 2.2.4.4 Hämatoxylin (Hämalaun)-Eosin-Färbung

Mit Hilfe von Hämatoxylin (Hämalaun)-Eosin-Färbung werden einzelne Strukturen der Gewebsschnitte lichtmikroskopisch sichtbar und dies dient somit als Übersichtsfärbung. Nach analoger Entparaffinierung und Rehydrierung werden die Gewebsschnitte für 10 min in *Hämalaun nach Mayer* eingetaucht. Anschließend werden die Schnitte mit Aquadest gespült, für 10 min mit Leitungswasser gewaschen und wieder mit Aquadest gespült. Als nächster Schritt werden die Präparate für 10 min in 0,1 % Eosin getaucht und mit Aquadest gewaschen. Mittels einer aufsteigenden Alkoholreihe (96 % EtOH für 2 min, 100 % I EtOH, 100 % II EtOH für je 5 min) erfolgt das Dehydrieren der Schnitte. Zum Schluss werden die Schnitte mit Depex eingedeckt.

*Tabelle 35: HE-Färbung*

Häma- laun nach Mayer	dH <sub>2</sub> O	Leitungs- wasser	dH <sub>2</sub> O	Eosin 0,1 % wässrig	dH <sub>2</sub> O	96 % Ethanol	100 % Ethanol I	100 % Ethanol II	Xylol I	Xylol II
10 min	spülen	10 min	spülen	10 min	spülen	2 min	5 min	5 min	5 min	5 min

#### 2.2.5 Fluoreszenzmessung (Fluorescence-activated-cell-scanning)

Zuerst wurden wie in 2.2.1.4 beschrieben die Zellaggregate in Einzelzellen gesplittet. Anschließend ist ein Zählen der Zellen in einer Neubaukammer möglich. Für die Analyse werden  $3 \times 10^6$  Zellen benötigt. Pro Probe:  $1 \times 10^6$  Zellen für die ungefärbte Kontrolle,  $1 \times 10^6$  Zellen für die Hintergrundkontrolle und  $1 \times 10^6$  Zellen für die Antikörperfärbung. Danach wurden die Zellen in drei verschiedene 15 ml Falcons (unstained, background, marker) mit jeweils 100  $\mu$ l PBS aufgeteilt. Um eine Unterscheidung von lebenden und toten Zellen zu bekommen, wurden jeweils zu den 100  $\mu$ l PBS bei background und marker 1  $\mu$ l Viobility 405/452 von Milteny für 15 min bei RT hinzugefügt. Anschließend wurde zum Stoppen zweimal mit 1 ml Staining Puffer gewaschen. Das Zentrifugieren erfolgte immer bei 300 g, 3 min, +4 °C. Für das Fixieren wurden die Zellen mit 100  $\mu$ l 4 % PFA für 15 min bei RT versetzt. Als nächstes erfolgten wieder zwei Waschschrte mit 2 ml PBS

pro Falcon. Für den Permeabilisationsschritt wurde dem Staining Puffer 0,1 % Triton X-100 hinzugefügt, die Zellen mit jeweils 100 µl pro Falcon damit resuspendiert und für 15 min bei RT inkubiert. Jetzt erfolgte die Inkubation mit dem Erstantikörper nur bei dem Falcon marker für 30 min bei +4 °C, danach wurde der Erstantikörper zweimal mit Staining Puffer abgewaschen. Für den Zweitantikörper wurde marker und background Falcon mit 100 µl PBS für 15 min bei +4 °C inkubiert. Es erfolgten wieder zwei Waschschrirte mit Staining Puffer. Zum Schluss wurden die Zellen in 1 ml PBS aufgenommen und resuspendiert.

## **2.2.6 Western Blot**

### *2.2.6.1 Zellysat*

Die induzierten Aggregate wurden entnommen, mit PBS gewaschen und mit StemPro™ Accutase™ gesplittet. Danach wurde der 100 µl pro Well Lysispuffer CellLytic™M sowie Proteaseninhibitor (Aprotinin, Leupeptin, Pepstatin) 1:1000 darauf gegeben und für 15 min bei +4 °C unter Bewegung inkubiert. Mit Hilfe einer 1 ml Pipette sowie 21G und 26G Kanülen wurden Zellen und Zellverbände zusätzlich mechanisch aufgespalten. Anschließend wurden die Zellen bei 13000 rpm für 20 min zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Das Zellysat diente für die Proteinbestimmung und für die Western Blot Analyse.

### *2.2.6.2 Proteinbestimmung nach Bradford*

Für die Proteinbestimmung wurde eine Standard-Reihe von 0,1; 0,25; 0,5; 0,75; 1,0 mg/ml BSA in PBS verwendet. Die Messung am Photometer wurde mit einer 1:5 *Bradford-Lösung* durchgeführt und anhand einer BSA Proteinstandardkurve bestimmt. Zuerst wurde 1 ml Bradford Lösung in Eppendorf Reaktionsgefäß vorgelegt und mit der 10 µl Standard-Reihe sowie den Proben versetzt. Nach einer Wartezeit von 10 min konnte die Proteinbestimmung am Spektrophotometer

erfolgen. Nach der Bestimmung wurde die verwendete Menge mit *Lämmli-Ladepuffer 5x* für 5 min bei 95 °C erhitzt.

#### 2.2.6.3 12,5 % SDS-PAGE

Nach dem Probenauftrag wurde die Gelelektrophorese bei einer Spannung von 50 V durchgeführt. Nachdem die Front des Bromphenolblau-Farbstoffs vom Probenpuffer bis zum Trenngel gewandert war, wurde die Spannung auf 100 V gestellt, bis der Blaumarker aus dem Gel ausgetreten ist.

*Tabelle 36: Trenngel*

Polyacrylamid 30 %	2083 µl
dH <sub>2</sub> O	1618 µl
Tris-HCl/SDS pH 8,8	1300 µl
TEMED	3 µl
Ammoniumpersulfat (APS) 10 %	25 µl

*Tabelle 37: Sammelgel*

Polyacrylamid 30 %	417 µl
dH <sub>2</sub> O	1741 µl
Tris-HCl/SDS pH 6,8	313 µl
TEMED	5 µl
Ammoniumpersulfat (APS) 10 %	25 µl

#### 2.2.6.4 Western Blot (Semidry-Methode)

Die Übertragung von elektrophoretisch aufgetrennten Proteinen aus Polyacrylamidgelen auf Nitrocellulosemembranen erfolgte im Semi-Dry-Verfahren.

Dabei wurden zur Vorbereitung je sechs Blatt Filterpapier und ein Blatt Nitrocellulosemembran für mindestens 5 min in Trenngelpuffer getränkt. Auf die Anode der Apparatur wurden nacheinander drei Lagen Filterpapier, die Nitrocellulosemembran und das Gel passgenau aufgelegt.

Schließlich folgten drei Lagen Filterpapier zur Kathode hin. Die Proteine wurden für 2 h bei 2,5 mA/cm<sup>2</sup> auf die Membran übertragen. Zur Kontrolle des vollständigen Transfers erfolgte eine anschließende reversible Proteinfärbung durch eine einminütige Inkubation mit *Ponceau Färbelösung*. Zur Entfärbung des Hintergrunds wurde mit H<sub>2</sub>O gewaschen, die komplette Entfernung der Proteinfärbung erfolgte schließlich mit TBST.

#### 2.2.6.5 *Detektion*

Zur Immundetektion von Proteinen auf Nitrocellulosemembranen wurden zunächst unspezifische Proteinbindungsstellen auf der Membran durch die Inkubation mit 5 % Milchpulver in 10x TBST für 1 h bei RT abgeblockt. Anschließend erfolgte die Inkubation mit dem in der *Blockinglösung* verdünnten Primärantikörper Brachyury und SOX1 über Nacht unter Schwenken bei +4 °C. Überschüssige Antikörperlösung wurde danach in drei Waschsritten für je 5 min in 10x TBST abgewaschen, woraufhin die Inkubation mit peroxidasegekoppeltem Sekundärantikörper in TBST für 1 h unter Schwenken bei RT folgte. Erneut wurde dreimal für je 5 min in TBST gewaschen, worauf die Membran in eine trockene Schale überführt wurde. Die auf der Membran immobilisierten Immunkomplexe aus Antigen, Primär- und Sekundärantikörper wurden durch eine Chemilumineszenzreaktion nachgewiesen. Dazu wurde die Membran mit der Reaktionslösung aus ECL1 und ECL2 1:1 für 1 min bei RT inkubiert und nach vollständigem Entfernen der Flüssigkeit von Klarsichtfolie bedeckt in eine Kassette gegeben. Das durch die Oxidation des Substrats Luminol emittierte Licht wurde dann mit unterschiedlichen Expositionszeiten detektiert, die Entwicklung erfolgte in einer Fusion Solo 4M Entwicklermaschine.

Die Nitrocellulosemembranen wurden danach zur Aufbewahrung getrocknet oder für einen erneuten Antigen-Nachweis prozessiert. Dazu erfolgte die Inkubation in

Stripping Puffer für 30 min bei +60 °C. Die Membranen wurden dann für je 30 min zweimal in H<sub>2</sub>O und schließlich für 30 min in TBST gewaschen. Die erneute Immundetektion konnte dann wie oben beschrieben wiederholt werden.

### **2.2.7 Clearing und Färbung**

Das Ausgangsmaterial für das Clearing waren neuro-mesenchymale Organoide mit einer Durchschnittsgröße von 5 mm. Nach dem Abnehmen wurden die Organoide mit PBS gewaschen und danach mit 4 % PFA eine h bei RT fixiert. Bei allen Flüssigkeitswechseln wurden die Organoide auf einer Wippe in Bewegung gehalten. Danach wurden sie für eine weitere h und 30 min in PBS bei RT gewaschen. Anschließend wurden die Organoide jeweils 30 min in einer Methanol/PBS Reihe mit 50 % MeOH, 80 % MeOH, 100 % MeOH vorbehandelt. Bei 100 % MeOH wurde die Lösung nach 30 min erneut ausgetauscht. Darauffolgend wurden die Proben in fünf Schritten gewaschen. Zuerst wurde 20 % DMSO/MeOH für zweimal 30 min verwendet, danach 80 % MeOH/PBS, 50 % MeOH/PBS und PBS für jeweils 30 min. Zum Schluss wurden die Organoide zweimal 30 min in 0,2 % Triton X-100/PBS behandelt. Die ersten 24 h wurden die Sphären mit Penetrations Puffer, die nächsten 24 h mit Blocking Puffer bei +37 °C versetzt. Anschließend wurde der Washing Puffer zweimal für eine h bei RT auf die Organoide gegeben. Die Organoide wurden in den Antibody Puffer für 24 h mit den Antikörpern inkubiert. Am nächsten Tag wurde 5x 30 min mit Washing Puffer gewaschen und der Zweitantikörper für 24 h darauf gegeben. Ab jetzt wurden die Proben vor Licht geschützt gelagert. Am darauffolgenden Tag wurden die Proben wieder 5x30 min mit dem Washing Puffer gewaschen und DAPI 1:5000 für 24 h darauf gegeben. Danach erfolgte dreimal 30 min Washing Puffer und eine aufsteigende Reihe MeOH/PBS dreimal 30 min zuerst mit 50 %, dann 80 % und abschließend mit 100 %. Zum Schluss wurde das MeOH vollständig von den Organoiden entfernt und Ethylcinnamat für 24 h darauf gegeben.

### **2.2.8 Elektronenmikroskopie**

Die Analyse der neuro-mesenchymalen Organoide mit Transmissionselektronenmikroskopie wurden in Zusammenarbeit mit der TEM Abteilung am Institut für Anatomie und Zellbiologie der Universität Würzburg im Labor von Priv.-Doz. Dr. Nicole Wagner durchgeführt. Die neuro-mesenchymalen Organoide wurden nach einmaliger Waschung mit PBS mit einer elektronenmikroskopischen Fixierlösung aus 2,5 % Glutaraldehyd, 4 % PFA in 0.1 M Cacodylat-Puffer (50 mM Cacodylat, 50 mM KCl, 2.5 mM MgCl<sub>2</sub>, pH 7,2) fixiert. Nach der Fixierung wurden die neuro-mesenchymalen Organoide im Labor von Priv.-Doz. Dr. Nicole Wagner weiterbehandelt und TEM-Bilder angefertigt.

Die TEM-Bilder sind mit freundlicher Genehmigung von Priv.-Doz. Dr. Nicole Wagner verwendet worden.

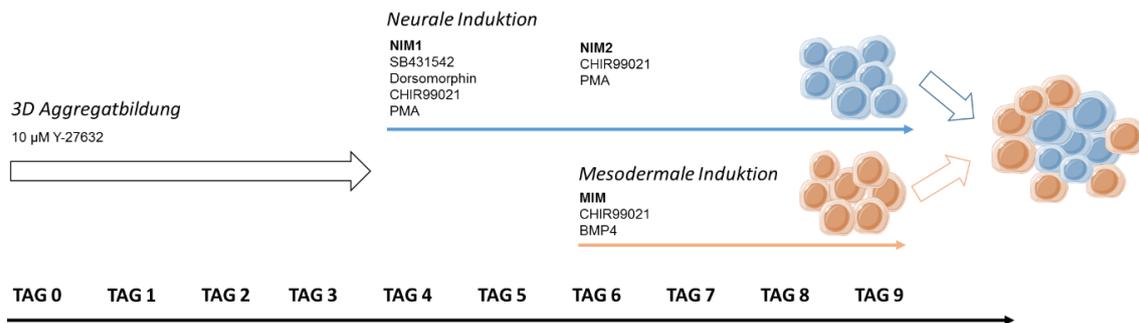
### 3 Ergebnisse

Ziel der Arbeit war es, neurale, komplexe Organoidmodelle zu generieren, die stromale Anteile, vor allem Blutgefäße, aber auch Immunzellen wie Makrophagen/Mikroglia besitzen. Für die Versuche wurden induzierte pluripotente Stammzellen (iPS-Zellen) verwendet, die durch Reprogrammierung humaner Vorhautfibroblasten gewonnen wurden. Diese iPS-Zellen wurden gezielt in neurale und mesodermale Vorläuferzellen differenziert und dann in Kokultur gebracht, um neuro-mesenchymale Organoiden zu erzeugen. Die daraus resultierenden Mikrogewebe wurden zu verschiedenen Zeitpunkten analysiert und histologisch charakterisiert.

#### 3.1 Charakterisierung mesodermaler und neuraler iPS-Zell abgeleiteter Aggregate

Für die Differenzierung der mesodermalen Vorläuferzellen wurde ein bereits bestehendes Protokoll für die iPS-Zell Differenzierung in 2D Kultur (Patsch et al., 2015) so modifiziert, dass es für eine Differenzierung im 3D Zellaggregat anwendbar ist. Die Erzeugung neuraler Aggregate gelang durch die Modifizierung eines entsprechenden Protokolls für die Generierung neuroepithelialer Stammzellen in 2D Zellkultur (Reinhardt et al., 2013) und dessen Adaptation an 3D Bedingungen. Um die Bildung von 3D Aggregaten zu ermöglichen, wurden die Zellen auf antiadhäsiv beschichtete Platten ausgesät und in Suspensionskultur auf einem Wippschüttler kultiviert. Wie in **Abbildung 12** schematisch gezeigt, wurden die iPS-Zellen zunächst für vier Tage (neurale Induktion) bzw. sechs Tage (mesodermale Induktion) als 3D Aggregat in iPS-Zell Medium kultiviert. Um zu verhindern, dass die iPS-Zellen während der initialen Aggregationsphase apoptotisch werden, wurden sie in Gegenwart eines Rho Kinase (ROCK) Inhibitors (Y-27632) kultiviert. Für die neurale Induktion wurden die pharmakologischen Wirkstoffe CHIR99021, SB431542 und Dorsomorphin hinzugefügt. Die mesodermale Differenzierung wurde mit CHIR99021 und rekombinant hergestelltem BMP4

induziert. Aufgrund des längeren neuronalen Differenzierungsprotokolls wurde mit der neuronalen Induktion zwei Tage früher begonnen. Dadurch erreichen am Tag der Zusammenführung alle Zellaggregate das optimale Differenzierungslevel. Am Tag neun erfolgte die Zusammenführung der induzierten Aggregate.

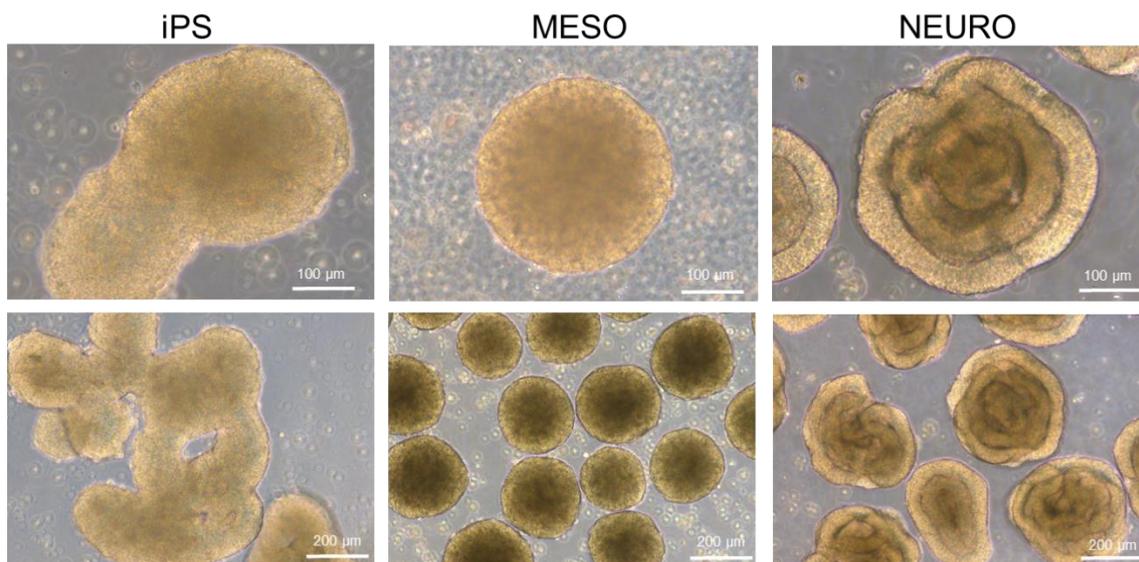


**Abbildung 12: Schematische Darstellung der Erzeugung neuroepithelialer und mesodermaler Aggregate aus iPS-Zellen**

Induktionsschema und zeitlicher Verlauf für das Erzeugen von mesodermalen/neuronalen Aggregaten aus Stammzellen. Bis Tag vier wurden 3D Zellaggregate aus iPS-Zellen in der Gegenwart eines ROCK Inhibitors (Y-27632) kultiviert. An Tag 4 beginnt die neurale Induktion, an Tag sechs startet die mesodermale Induktion. Am Ende der Induktion wurden die Zellaggregate zusammengeführt.

### 3.1.1 Morphologische Analyse mesodermaler/neuraler Aggregate

Zur Analyse der Zelldifferenzierung in iPS-Zell abgeleiteten Aggregaten wurden diese zunächst anhand lichtmikroskopisch sichtbarer morphologischer Veränderungen bewertet (**Abbildung 13**). Dabei lassen diese, je nach verwendetem Induktionsprotokoll, deutliche Unterschiede erkennen. Nicht differenzierte iPS-Zellaggregate weisen eine scharf abgegrenzte, jedoch morphologisch unregelmäßige Form auf. Bei Zellaggregaten, die in mesodermale Richtung induziert wurden, ist eine kugelige Form sichtbar. Weitere Strukturen sind in den mesodermalen Zellaggregaten jedoch noch nicht erkennbar. Die deutlichste Veränderung zeigten die neural-induzierten Zellaggregate. Die typischen, neuronalen Rosetten werden nach vier Tagen deutlich sichtbar.



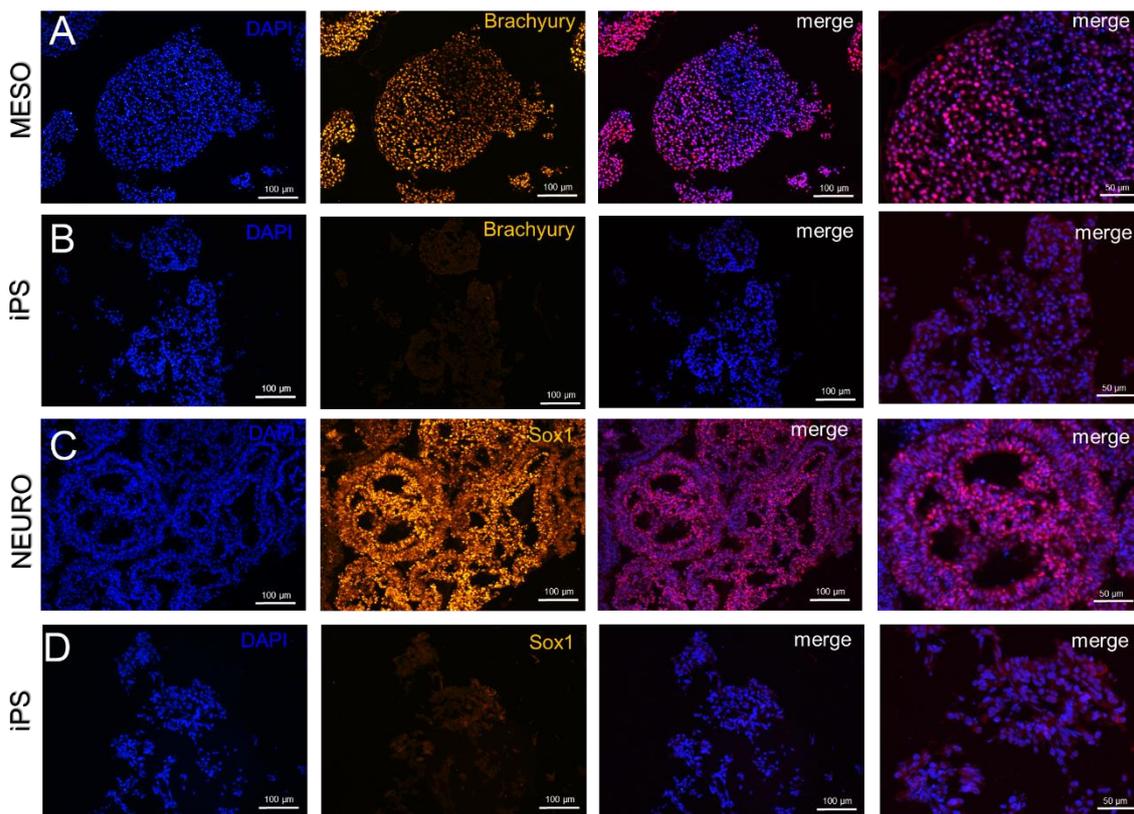
**Abbildung 13: Aggregate aus iPS-Zellen sowie mesodermal und neural-induzierte Aggregate am Tag 9 in Kultur**

Übersicht der verschiedenen Aggregatbildungen in 3D Zellkultur im Vergleich. Die Differenzierung der 3D Aggregate Richtung Mesoderm (MESO) bzw. Neuroepithel (NEURO) führt zu deutlich sichtbaren morphologischen Veränderung.

### 3.1.2 Induktionsnachweis mit Brachyury und SOX1

#### 3.1.2.1 Nachweis mittels Fluoreszenzfärbung

Um die neurale bzw. mesodermale Differenzierung der Zellaggregate zu bestätigen, wurde die Expression der Transkriptionsfaktoren Brachyury und SOX1 mittels Immunfluoreszenzanalyse untersucht (**Abbildung 14**).



**Abbildung 14: Immunhistochemische Analyse der induzierten Aggregate mit spezifischen Antikörpern gegen Brachyury und SOX1.**

**A:** Zellaggregat nach 72 h mesodermaler Induktion. Die Bilder zeigen eine Immunfluoreszenzanalyse mit spezifischem Antikörper gegen das mesodermale Markerprotein Brachyury (orange). Zellkerne wurden mit DAPI (blau) gegengefärbt.

**B:** iPS-Zellaggregate. Die Bilder zeigen eine Immunfluoreszenzanalyse mit spezifischem Antikörper gegen das mesodermale Markerprotein Brachyury (orange). Zellkerne wurden mit DAPI (blau) gegengefärbt.

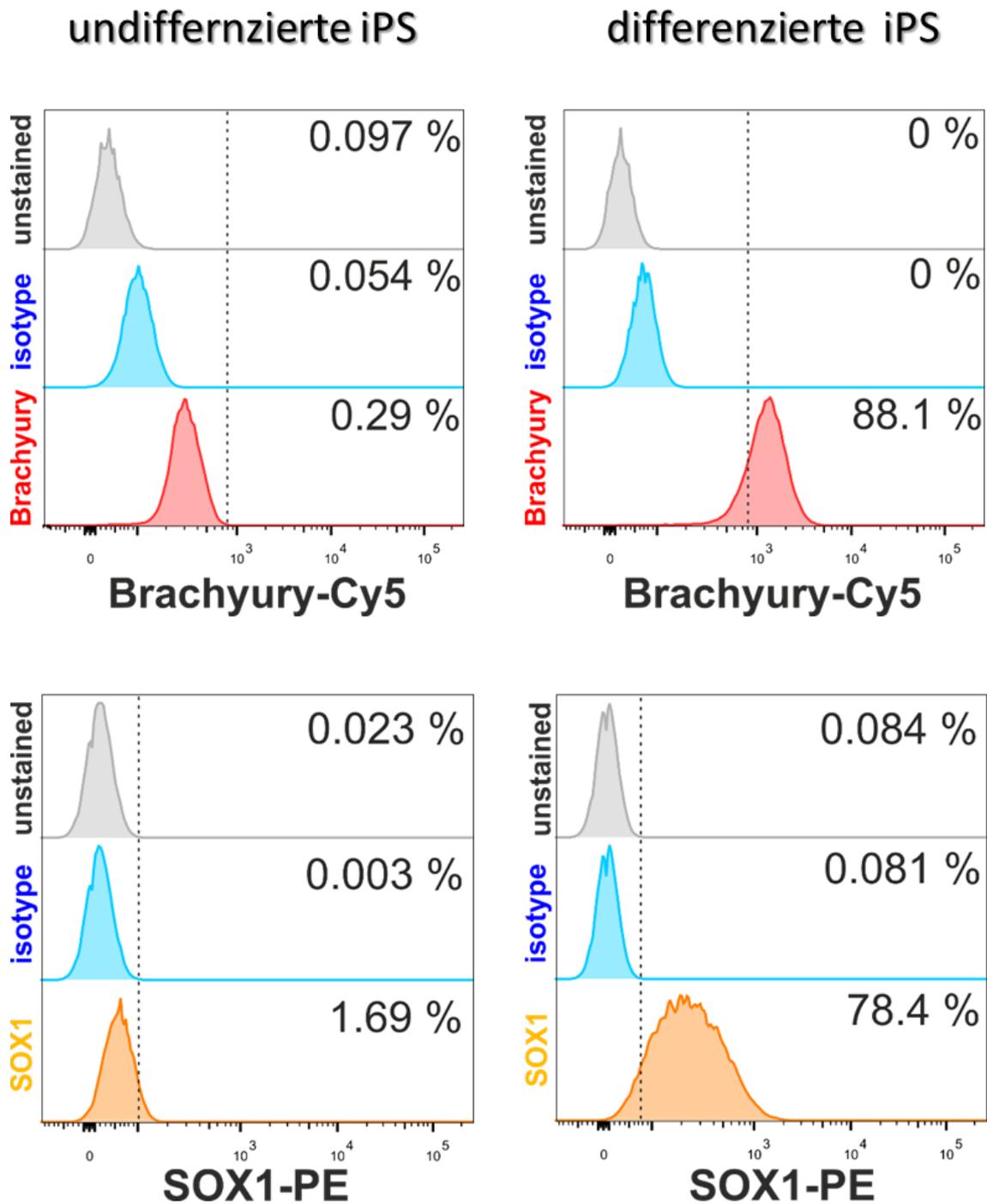
**C:** Zellaggregat nach 120 h neuraler Induktion. Zellkerne wurden mit DAPI (blau) gegengefärbt. Die Bilder zeigen eine Immunfluoreszenzanalyse mit einem spezifischen Antikörper gegen das neuroepitheliale Markerprotein Sox1 (orange).

**D:** iPS-Zellaggregate. Die Bilder zeigen eine Immunfluoreszenzanalyse mit einem spezifischem Antikörper gegen das neuroepitheliale Markerprotein Sox1 (orange). Zellkerne wurden mit DAPI (blau) gegengefärbt.

Die Zellkerne wurden mit Hilfe des Farbstoffes DAPI angefärbt und sind bei jedem Schnitt zu erkennen. Eine Detektion des Brachyury Proteins zeigt sich deutlich in den mesodermal differenzierten Aggregaten (**A**). Die als Negativkontrolle verwendeten iPS-Zellaggregate zeigen keine spezifische Färbung für Brachyury (**B**). Bei den neural-induzierten Aggregaten konnte der neuroepitheliale Transkriptionsfaktor SOX1 im Nukleus nachgewiesen werden (**C**). Auch hier zeigt die Negativkontrolle nur eine leichte Hintergrundfärbung (**D**).

### 3.1.2.2 *Durchflusszytometrische Untersuchung der Zelldifferenzierung*

Um die Effizienz der gerichteten Induktion mesodermaler bzw. neuraler Aggregate zu quantifizieren, wurde das Verfahren der Durchflusszytometrie (**Abbildung 15**) angewendet. Dazu wurden die Zellaggregate zunächst mittels Accutaseverdauer in Einzelzellsuspension überführt. Für den Nachweis mesodermaler sowie neuraler Vorläuferzellen wurden, wie bereits für die Immunfluoreszenzanalyse beschrieben, spezifische Antikörper gegen SOX1 und Brachyury verwendet. Bei dem neuralen Marker SOX1 wurde auf einen direkt konjugierten Antikörper zurückgegriffen. Bei der ersten Probe (unstained) wurde keine Inkubation mit Antikörpern durchgeführt und die Zellen wurden lediglich mit Hilfe der Durchflusszytometrie gezählt. Bei der zweiten Probe (isotype) wurde zum einen zwischen lebenden und toten Zellen unterschieden, sowie zum anderen der Zweitantikörper auf eine mögliche Hintergrundfluoreszenz überprüft. Bei der dritten Probe wurden die spezifischen Primärantikörper gegen Brachyury bzw. SOX1 zugesetzt, um eine Expression in den Zellen nachzuweisen. Als Negativkontrolle wurden Zellen aus undifferenzierten iPS-Zellaggregaten verwendet. Für die durchflusszytometrischen Untersuchungen wurden immer mindestens 20.000 lebende Einzelzellen pro Probe analysiert.



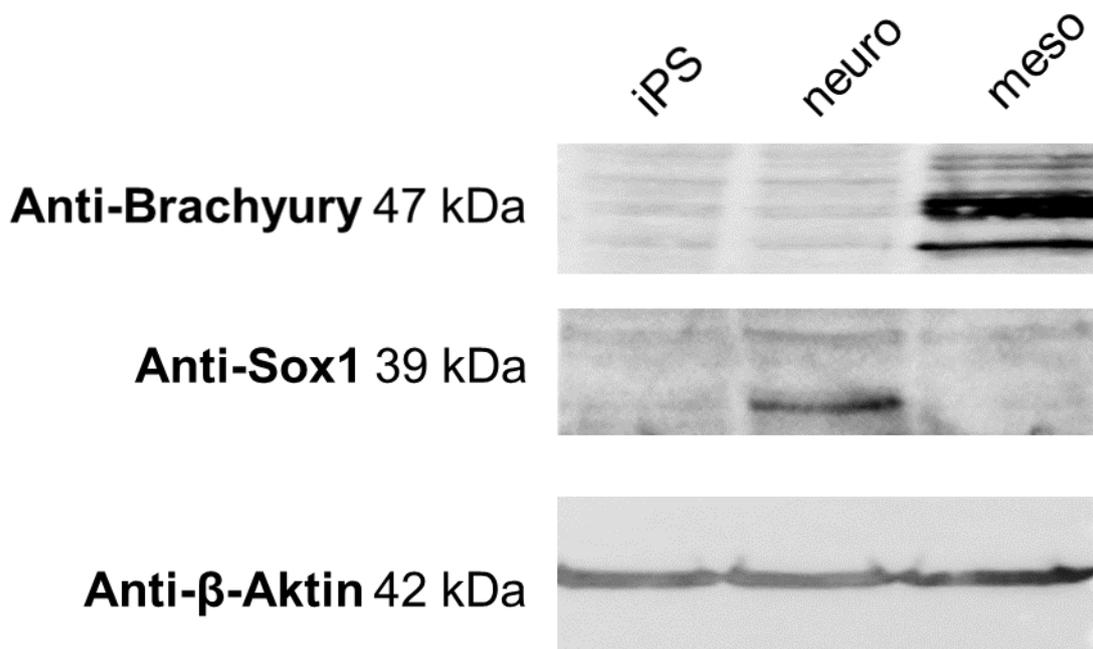
**Abbildung 15: Durchflusszytometrische Untersuchungen zur Detektion von Brachyury und SOX1 am Tag 9**

Im Diagramm ist dargestellt, wie hoch der prozentuale Anteil von lebenden Einzelzellen ist, welche für Cy5 sowie PE positiv erscheinen. Die „unstained“ Probe ist ungefärbt und dient dem generellen Nachweis von lebenden Zellen sowie einer Einschätzung der Autofluoreszenz. Die „isotype“ Probe dient der Bestimmung einer möglichen unspezifischen Bindung des Sekundärantikörpers sowie der daraus resultierenden Hintergrundfluoreszenz.

Als Negativkontrolle für die Expression von Brachyury und SOX1 wurden undifferenzierte iP5-Zellaggregate verwendet. Beim Brachyury Antikörper zeigte sich dabei eine leichte Verschiebung des Signals nach rechts, welches als unspezifisch bewertet wurde. Das Gating wurde entsprechend angepasst. Die anschließend durchgeführte durchflusszytometrische Analyse ergab schließlich 88 % Brachyury positive Zellen in den mesodermal-induzierten Aggregaten. In den neural-induzierten Aggregaten konnten 78 % SOX1 positive Zellen detektiert werden. So konnte mit Hilfe der Durchflusszytometrie eine effiziente Differenzierung der Aggregate in die gewünschte Richtung nachgewiesen werden.

### 3.1.2.3 *Differenzierungsnachweis mittels Western Blot*

Zusätzlich zu den oben beschriebenen Untersuchungen wurde zum Nachweis der Expression von Brachyury und SOX1 auf Proteinebene eine Western Blot Analyse durchgeführt (**Abbildung 16**). Nach dem Transfer der aufgetrennten Proteinlysate auf eine Nitrozellulosemembran wurde die Membran entweder mit einem spezifischen Brachyury Antikörper oder einem SOX1 Antikörper und anschließend mit einem peroxidasegekoppelten Sekundärantikörper inkubiert und entwickelt.



**Abbildung 16: Western Blot Analyse der mesodermalen und neuralen Aggregate am Tag 9**  
 Untersuchung der Expression von Brachyury und SOX1 in iPS-Zellen sowie in mesodermal (meso) und neural (neuro) induzierten Zellaggregaten mittels Western Blot Analyse. Die Analyse der Expression von  $\beta$ -Aktin diente als Ladekontrolle.

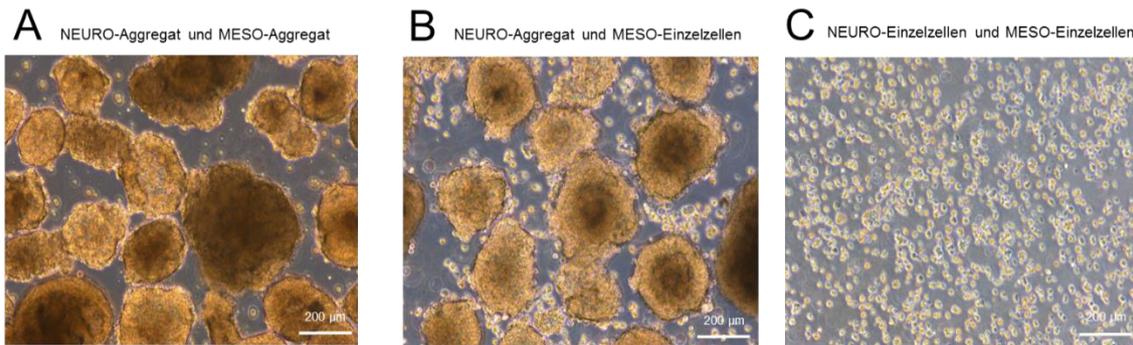
Die Inkubation mit dem Brachyury Antikörper diente wieder dem Nachweis mesodermaler Vorläuferzellen. Zu erwarten ist eine Bande bei ca. 47 kDa, die sich deutlich zeigte. Außerdem ist zu erkennen, dass sowohl iPS-Zellen als auch neurale Vorläuferzellen keine Bande vorweisen. Neurale Vorläuferzellen wurden durch Inkubation mit dem SOX1 Antikörper nachgewiesen. Hierbei konnte eine Bande von 39 kDa exklusiv bei den neural-induzierten Aggregaten, nicht aber in iPS-Zellen oder mesodermal-induzierten Aggregaten detektiert werden. Als Ladekontrolle wurde  $\beta$ -Aktin mittels eines spezifischen Antikörpers nachgewiesen. Der Abgleich zeigte eine vergleichbare Menge Protein in allen Proben.

## 3.2 Zusammensetzung der mesodermalen und neuralen Aggregate

Im Anschluss an die Charakterisierung der einzelnen Aggregate wurde das Verhalten der Aggregate in Kokultur untersucht. Die mesodermalen Vorläuferzellen sowie die neuralen Vorläuferzellen wurden für ihre Erzeugung zunächst in verschiedenen Medien gezüchtet. Nach dem Zusammensetzen wurde für die gemeinsame Kultur das ND-Medium verwendet.

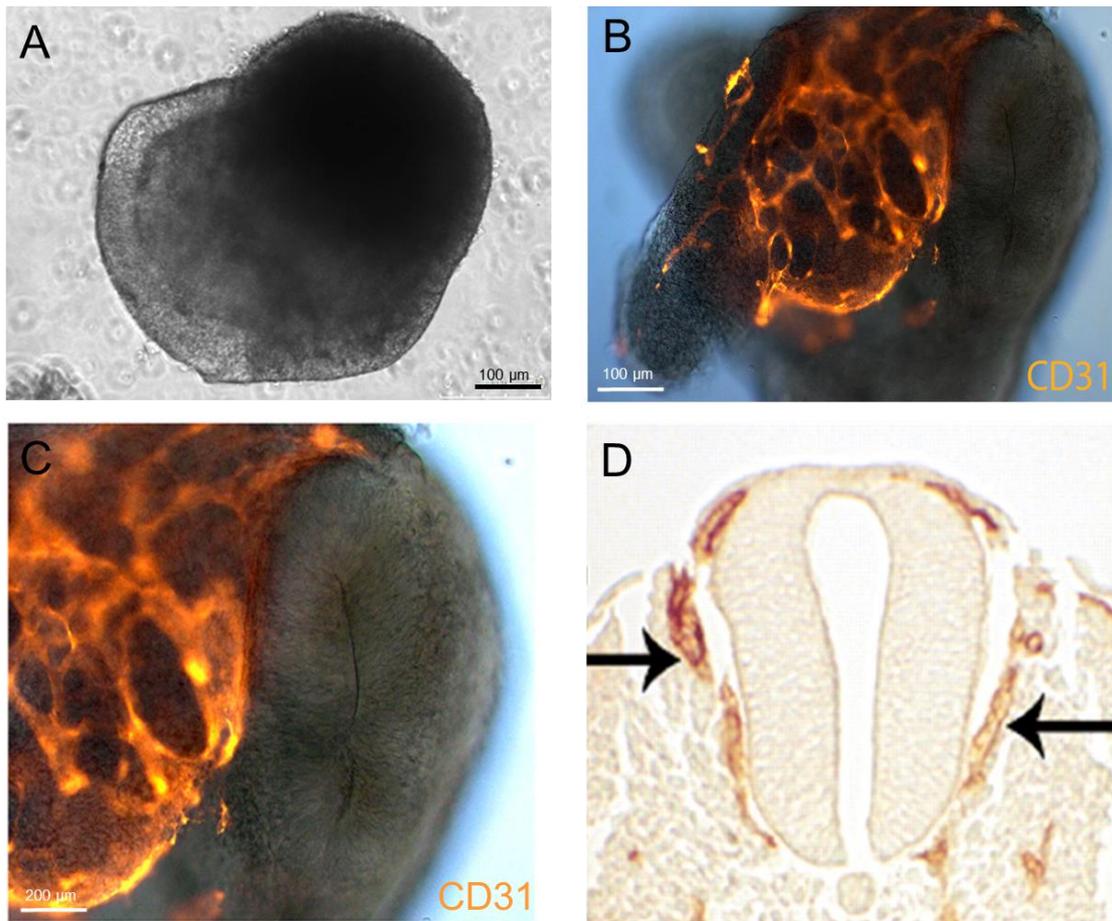
### 3.2.1 Kokultur der differenzierten Zellaggregate

Um die optimale Methode für eine Zusammenführung der unterschiedlichen Gewebearten zu bestimmen, wurden drei verschiedene Strategien getestet (**Abbildung 17**). Während der embryonalen Entwicklung *in vivo* kommt es zu einer Invagination des sich entwickelnden Neuralrohrs in das darunterliegende Mesenchym. Um das entstehende neuro-mesenchymale Interface *in vitro* zu imitieren, wurden die neuralen sowie mesodermalen Aggregate in Strategie 1 in Kokultur gebracht. In Strategie 2 wurden die mesodermalen Aggregate durch Accutasebehandlung in Einzelzellsuspension überführt und dann mit den neuralen Aggregaten zusammengebracht. In Strategie 3 wurden beide Aggregattypen in Einzelzellen gesplittet und dann zur Reaggregation zusammengeführt. In allen Bedingungen wurde das ND-Medium verwendet. Ab diesem Zeitpunkt erfolgte die Kultivierung in poly(2-hema) beschichteten Cellstar® 6 Well Zellkulturschalen auf einem Wippschüttler, um ein Anwachsen der Aggregate zu vermeiden. Alle Strategien führten zu neuro-mesenchymalen Aggregaten. Für die folgenden Analysen wurden jedoch vornehmlich Aggregate aus Strategie 1 verwendet.



**Abbildung 17: Kokultur der mesodermal und neural vordifferenzierten Zellaggregate**  
 Darstellung der neuro-mesenchymalen Kokulturen. Es wurden drei unterschiedliche Strategien verwendet. **A:** Strategie 1 (neuraler Aggregat + mesenchymaler Aggregat), **B:** Strategie 2 (neuraler Aggregat + mesodermale Einzelzellen), **C:** Strategie 3 (neurale Einzelzellen + mesenchymale Einzelzellen). Dargestellt sind lichtmikroskopische Aufnahmen mit Phasenkontrastfilter.

Zuerst konnte anhand lichtmikroskopischer Untersuchung festgestellt werden, dass Aggregate unterschiedlicher Gewebsstrukturen eine Einheit bilden (**Abbildung 18**) (**A**). Die typische epitheliale Rosettenstruktur gibt einen Hinweis auf die Lage des neuralen Anteils. Um die Identität des mesodermalen Anteils zu bestätigen, wurde eine immunzytochemische Färbung der kompletten Sphären auf das Endothelzellen-Adhäsionsmolekül CD31 durchgeführt (**B**). Die Expression von CD31 im mesodermalen Anteil zeigt ein kontinuierliches Endothelzellnetz. Neben dem Nachweis der Proteinexpression war auch die genaue Lokalisation des endothelialen Netzwerks im Aggregat von Interesse (**C**). Dabei zeigte sich, dass das endotheliale Netzwerk bis direkt an das Neuroepithel heranreichte. Die Zellen des Neuralrohrs im Embryo stellen eine Quelle für VEGF dar und sind somit für die Induktion des perineuralen Gefäßplexus verantwortlich (Hogan et al., 2004) (**D**). Die Gefäßanordnung im hier untersuchten neuro-mesenchymalen Sphäroid zeigt ein vergleichbares Muster. Dies legt nahe, dass auch im *in vitro* Modell ähnliche Mechanismen wie im Embryo am Werk sind. Nachdem sich ein Verwachsen des mesodermalen Aggregates mit dem neuralen Aggregat bestätigte, wurden die entstandenen neuro-mesenchymale Sphären isoliert und in ND-Medium kultiviert.



**Abbildung 18: Zusammenwachsen mesodermaler/neuraler Zellaggregate**

**A:** Neuro-mesenchymaler Sphäroid an Tag 14 in Kokultur. Dargestellt ist einer lichtmikroskopische Aufnahme mit Phasenkontrastfilter.

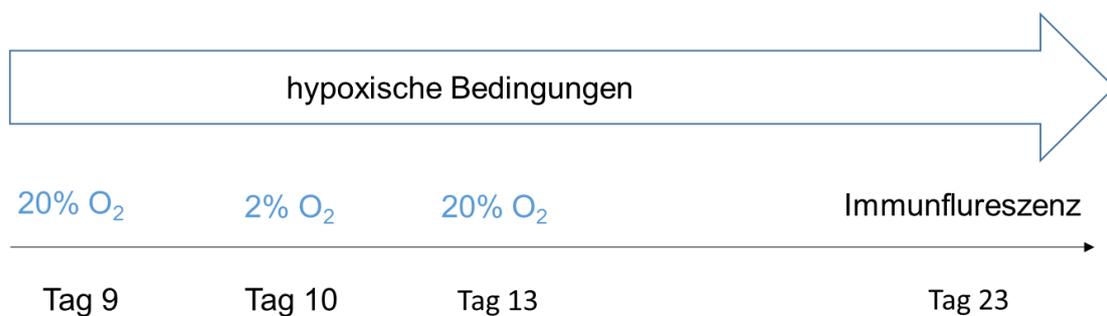
**B:** Neuro-mesenchymaler Sphäroid an Tag 20 in Kokultur. Das entstehende Netzwerk aus Endothelzellen wurde durch Immunfluoreszenz Analyse mit spezifischem Antikörper gegen den Endothelzellmarker CD31 (orange) dargestellt.

**C:** Neuro-mesenchymaler Sphäroid an Tag 20 in Kokultur. Das entstehende Netzwerk aus Endothelzellen wurde durch Immunfluoreszenz Analyse mit spezifischem Antikörper gegen den Endothelzellmarker CD31 (orange) dargestellt. Das Bild zeigt eine höhere Vergrößerung aus B.

**D:** Maus Neuralrohr mit mittels Immunhistochemie hervorgehobenem perineuralem Gefäßplexus (braun, Pfeile) (Hogan et al., 2004).

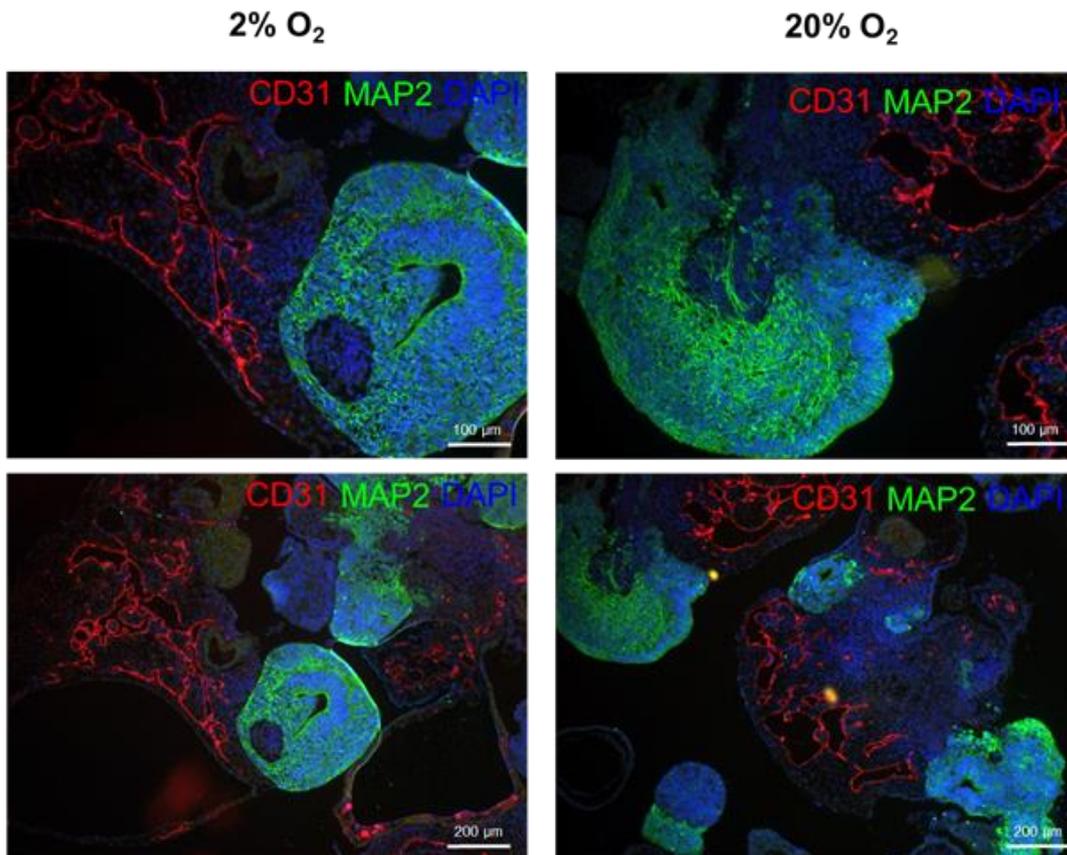
### 3.2.2 Hypoxische Bedingungen

Mit den neuro-mesenchymalen Sphären stand ein geeignetes Modell zu Verfügung, um die Vaskularisierung zu untersuchen und gegebenenfalls zu verbessern. Nach dem anfänglichen Befund von CD31 positiven Zellen im mesodermalen Anteil (**Abbildung 18**), sollte eine hypoxische Stimulation die Steigerung an CD31 positiven Zellen und die Bildung eines endothelialen Netzwerks verbessern (**Abbildung 19**). Unter hypoxischen Bedingungen wird das Protein HIF1- $\alpha$  vermehrt exprimiert. Infolgedessen kommt es zu einer höheren Konzentration an VEGF im Gewebe, was die Kapillarbildung steigert (Iyer et al., 1998). Auf Grundlage dieser Erkenntnis wurden die neuro-mesenchymalen Sphären nach dem Zusammensetzen für einen Zeitraum von drei Tagen in einen Inkubator mit 2 % Sauerstoff überführt und anschließend wieder unter Standardbedingungen (20 % Sauerstoff) weiter kultiviert. An Tag 23 wurde eine immunhistochemische Analyse gegen CD31 durchgeführt, um den Grad der Vaskularisierung zu ermitteln (**Abbildung 20**).



**Abbildung 19: Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus zur Verbesserung der Vaskularisierung der neuro-mesenchymalen Sphäroide unter hypoxischen Bedingungen.**

*Hypoxische Bedingung und zeitlicher Ablauf des Versuches nach Induktion und Zusammenführen in Kokultur. Bis Tag 9 wurden die induzierten Aggregate unter Normalbedingungen (20 % Sauerstoff) kultiviert. An Tag 9 nach der Zusammenführung werden die neuro-mesenchymalen Sphären bei 2 % Sauerstoff für 72 h unter hypoxischen Bedingungen kultiviert. Anschließend wurden die Zellaggregate wieder unter atmosphärischen Sauerstoffkonzentrationen kultiviert.*



**Abbildung 20: Untersuchung zum Einfluss von Hypoxie auf die Vaskularisierung der neuro-mesenchymalen Sphäroide**

Dreifach Immunfluoreszenz Analyse an Paraffinschnitten von 23 Tage alten neuro-mesenchymalen Sphäroiden. Es wurden spezifische Antikörper gegen CD31 (rot) und MAP2 (grün) verwendet. Zellkerne wurden mit DAPI (blau) gegengefärbt.

Der neurale Teil der Sphäre wird durch eine immunhistochemische Analyse gegen microtubule associated protein 2 (Map2) identifiziert. Zur besseren Übersicht wurden die Zellkerne mit DAPI gegengefärbt. Im Vergleich zu den Sphären unter Standardbedingungen (20 % Sauerstoff) hatte der hypoxische Stress keine nennenswerte Auswirkung auf die Vaskularisierung. Die Anzahl der CD31 positiven Zellen ist im Verhältnis vergleichbar. Daher wurde in den folgenden Experimenten auf die aufwendigere Kultur im Hypoxieschrank verzichtet.

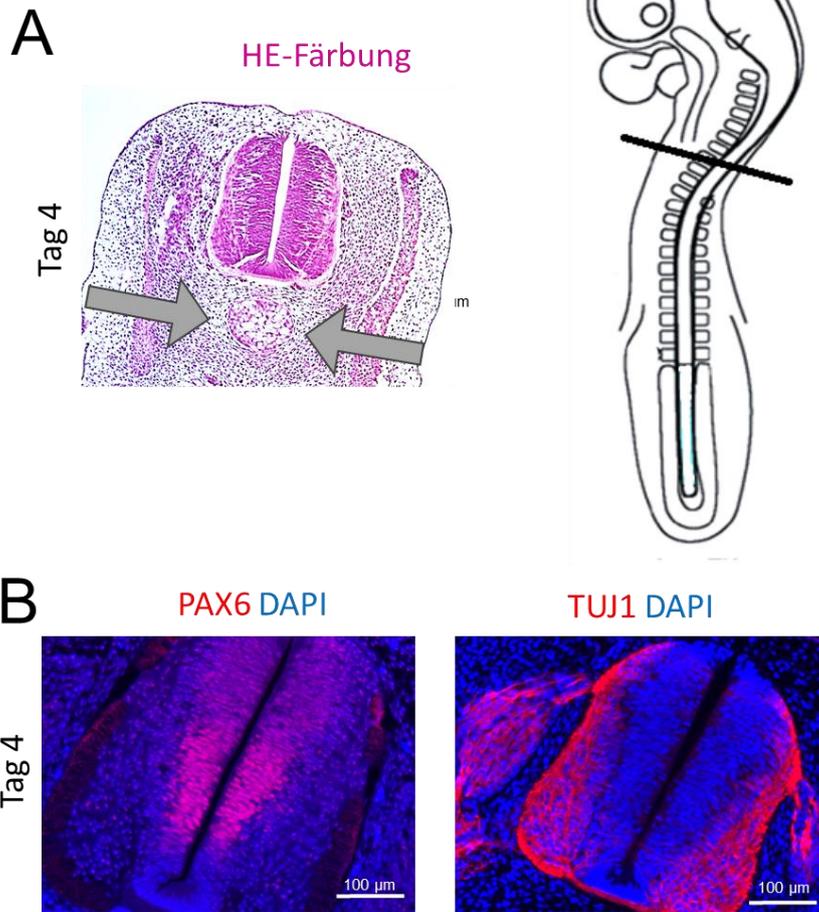
### 3.3 Neuroektodermale Entwicklung im Hühnerembryo

Um die morphogenetischen Prozesse in den humanen neuro-mesenchymalen Organoiden beurteilen und mit der *in vivo* Situation vergleichen zu können, wurden Schnittpräparate von Hühnerembryonen angefertigt und als Vergleichsgebe herangezogen (**Abbildung 21**, **Abbildung 22**, **Abbildung 23**). Die weiter entwickelten neuro-mesenchymalen Sphären werden als Organoide bezeichnet, da es sich um Zellverbände handelt, die sich selbst organisieren und eine dem Nervengewebe ähnliche Morphologie aufweisen.

Für das Vergleichsgebe wurden Hühnerembryonen an Tag 4 der Entwicklung gewählt und mit humanen neuro-mesenchymalen Organoiden an Tag 60 in Kultur verglichen. Zu diesem Zeitpunkt sollten beide Gewebe in etwa das gleiche Entwicklungsstadium aufweisen.

Die HE-Färbung (**A**) gibt eine Übersicht über die Strukturen und die Dimensionen und lässt die verschiedenen Gewebeanteile des Hühnerembryos nach 4 Tagen erkennen. Neben dem deutlich sichtbaren Neuralrohr zeigt sich kaudal davon die Chorda dorsalis.

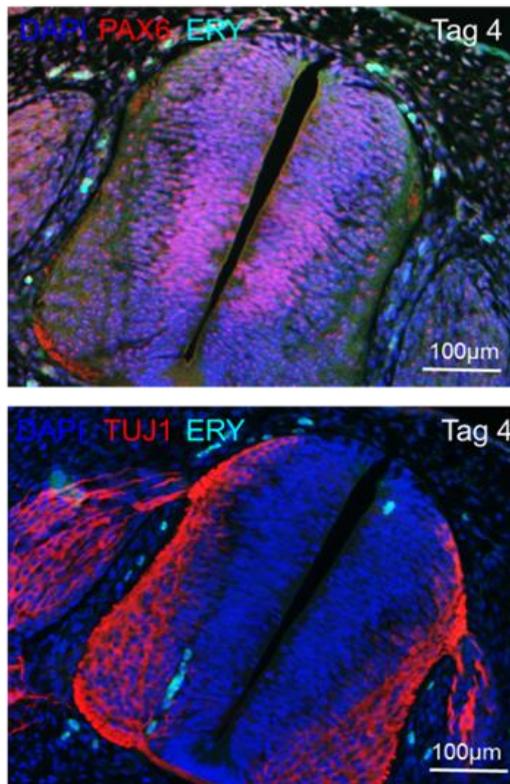
Mittels Fluoreszenzfärbung konnte das Neuralrohr des Hühnerembryos weiter charakterisiert werden (**B**). Dazu wurden die neuronalen Marker PAX6 und TUJ1 verwendet. Die DNA der Zellkerne wurde mit Hilfe von DAPI dargestellt. Die neuroepithelialen Stammzellen der ventrikulären Zone sind positiv für PAX6. Die Expression des neuronalen Markers TUJ1 ließ sich sowohl marginal als auch im Bereich des Spinalganglions detektieren.



**Abbildung 21: Darstellung des Neuralrohres eines Hühnerembryos nach 4 Tagen**  
**A:** HE-Färbung des Paraffinschnittes nach 4 Tagen. Kaudal vom Neuralrohr Chorda dorsalis (graue Pfeile). Darstellung Hühnerembryo modifiziert nach (Teillet et al., 1998). **B:** Immunfluoreszenzanalyse an Paraffinschnitten des Neuralrohres mit spezifischen Antikörpern gegen die neuronalen Marker PAX6 (magenta) und TUJ1 (rot). Pax6 positive Zellen befinden sich im Bereich der Ventrikularzone des Neuralrohrs als proliferativer Zellpool. TUJ1 positive Zellen sind marginal sowie im Spinalganglion zu finden. Die DNA in den Zellkernen ist mittels DAPI-Färbung (blau) dargestellt.

### 3.3.1 Perineuraler Plexus

Bei der Neurulation bildet das umliegende Mesenchym den perineuralen Plexus. Dieser Gefäßplexus lagert sich um das Neuralrohr. Da keine funktionstüchtigen Antikörper für den Nachweis von Gefäßendothelien im Hühnerembryo verfügbar waren, wurde der Gefäßplexus anhand der starken grünen Autofluoreszenz der Erythrozyten sichtbar gemacht (**Abbildung 22**).



**Abbildung 22: Neuralrohr und perineuraler Plexus eines Hühnerembryos an Tag 4 der Entwicklung**

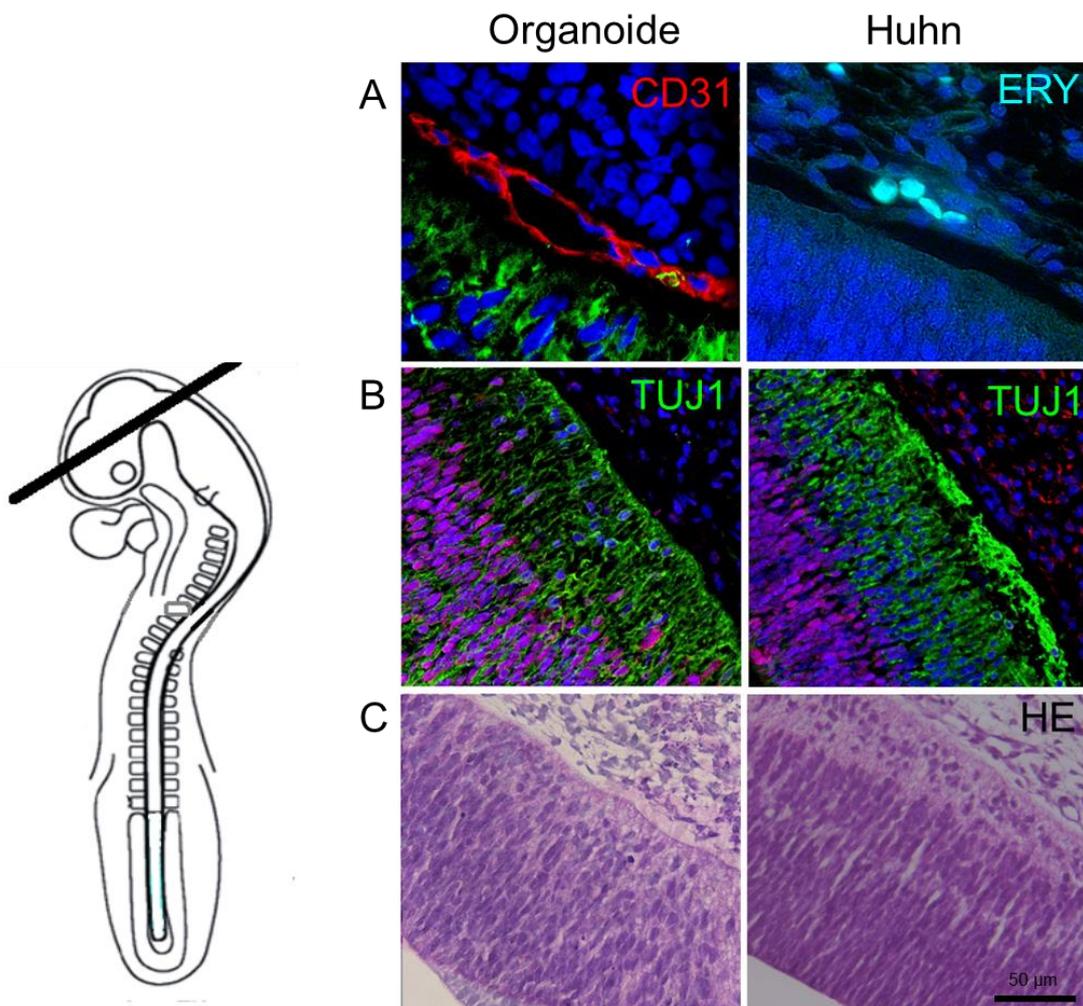
Darstellung der Erythrozyten über ihre Autofluoreszenz (grün). Die Lage des perineuralen Plexus lässt sich somit erahnen. Neurale Zellen werden mittels Immunfluoreszenz Analyse zum Nachweis von PAX6 (magenta) und TUJ1 (rot) dargestellt. Es lässt sich erkennen, dass die Gefäße des perineuralen Plexus das Neuralrohr umgeben und von dorsal an der Grenze zwischen Neuroepithel und Neuronen ins Nervengewebe einziehen.

### 3.3.2 Vergleich der neuro-mesenchymalen Organoiden mit dem Hühnerembryo

Da es sich bei den entstehenden Strukturen in neuralen Organoiden in der Regel um zerebrale Epithelien handelt, wurden zusätzlich Schnittpräparate des sich entwickelnden Großhirns eines Hühnerembryos angefertigt, analysiert und mit den neuro-mesenchymalen Organoiden verglichen. Dabei ist eine bemerkenswerte morphologische Ähnlichkeit zwischen Organoid und Hühnergehirn zu erkennen (**Abbildung 23**).

Wie zuvor erläutert, wird der perineurale Plexus im Hühnerembryo durch die autofluoreszierenden Erythrozyten sichtbar (**A**). In humanen neuro-mesenchymalen Organoiden wurde der perineurale Plexus durch CD31 Färbung gegen die Endothelzellen des Blutgefäßsystems dargestellt. Dabei konnte ein dichtes Kapillarnetz an der Grenzfläche zwischen Mesenchym und Neuroepithel gezeigt werden. Außerdem lässt sich im Schnittpräparat eine deutliche Lumenbildung erkennen. Im Hühnerembryo wird das Lumen der Gefäße durch die zentral

liegenden autofluoreszierenden Erythrozyten markiert. In den **Abbildungen 23 (B) und (C)** ist ein Vergleich zwischen kortikalen Strukturen im Hühnerembryo und deren morphologischem Korrelat im Organoidmodell dargestellt. Die Bilder zeigen einen nahezu identischen Aufbau. Es zeigt sich, dass die neuronalen Zellen in den Organoiden ein ähnliches Verhalten wie im Hühnerembryo aufweisen.



**Abbildung 23: Vergleich humaner neuro-mesenchymaler Organoide mit dem sich entwickelnden Gehirn im Hühnerembryo**

**A:** Der perineurale Plexus, dargestellt mittels CD31 (rot) Immunhistochemie in humanen neuro-mesenchymalen Organoide bzw. mittels Autofluoreszenz der Erythrozyten (türkis) im Hühnerembryo. **B:** TUJ1 (grün) markiert die entstehenden kortikalen Neurone. **C:** HE-Färbung des Neuroepithels. Darstellung Hühnerembryo modifiziert nach (Teillet et al., 1998).

### 3.4 Analyse der neuro-mesenchymalen Organoide

Die oben beschriebenen neuro-mesenchymalen Organoide wurden in ND-Medium bis zu 280 Tage kultiviert. Um die neuro-mesenchymalen Organoide hinsichtlich der Zelltypzusammensetzung zu charakterisieren, wurden zu verschiedenen Zeitpunkten Proben entnommen und mit Paraformaldehyd fixiert. Für die Zelltypbestimmung standen immunzytochemische Färbungen in 2D als auch in 3D zur Verfügung.

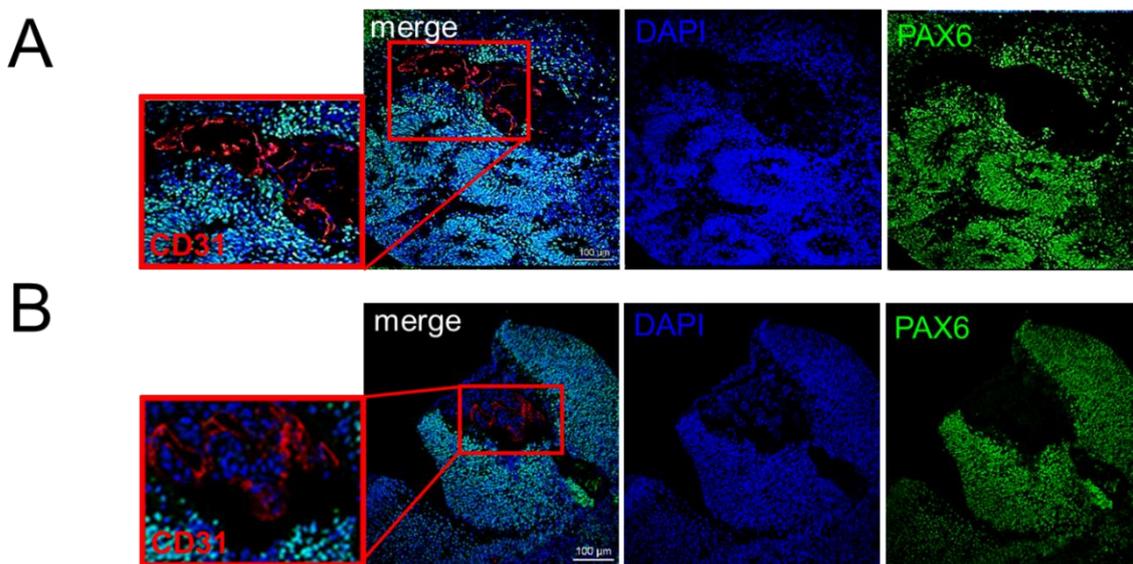
Nach Sicherstellung der erfolgreichen Induktion der iPS-Zellen, wie im Kapitel 3.1 der Ergebnisse beschrieben, wurden die neuro-mesenchymalen Organoide nun auf die fortschreitende Differenzierung der Zellen untersucht.

Um die Entwicklung von Blutgefäßen, sowie das Einwandern der mesodermalen Vorläuferzellen in die neuralen Organoide zu zeigen, wurden neben dem Nachweis von Endothelzellen, auch auf glatte Muskelzellen und Mikroglia getestet. Die glatten Muskelzellen, die in enger Verbindung mit den Endothelzellen stehen, wurden mittels spezifischer Antikörper gegen  $\alpha$ -SMA nachgewiesen. Für den Nachweis von Mikroglia wurden IBA1 Antikörper verwendet.

Gleichzeitig wurde auch der Anteil der unterschiedlichen neuralen Zelltypen in den Organoiden durch immunzytochemische Analyse gegen verschiedene Zelltypmarker ermittelt, um einerseits die Entwicklung der neuralen Zellen nachzuweisen und andererseits einen Hinweis auf die räumliche Verteilung der verschiedenen Zelltypen zu erlangen. Für den Nachweis von proliferativen neuralen Vorläuferzellen wurde die Expression der Transkriptionsfaktoren SOX1, PAX6 und TUJ1 detektiert. Die Differenzierung in Gliazellen wurde schließlich anhand der Expression von glial fibrillary acidic protein (GFAP, Astrozyten) nachgewiesen. Um den Verlauf der Organoidentwicklung zeitlich zu verfolgen, wurden die Immunfluoreszenzanalysen an verschiedenen Tagen der Entwicklung durchgeführt.

### 3.4.1 Lokalisation der Endothelzellen

Nach der beschriebenen Anlagerung des mesenchymalen Anteils in Kapitel 3.2.2 wurde die Lokalisation der Endothelzellen nach 60 Tagen mittels CD31 wieder dargestellt (**Abbildung 24**). Es konnte weiterhin ein endotheliales Netzwerk beobachtet werden, dass sich zentral im neuro-mesenchymalen Organoid befindet. Zur Darstellung des Neuroepithels wurde der für neurale Stammzellen typische Transkriptionsfaktor PAX6 nachgewiesen.

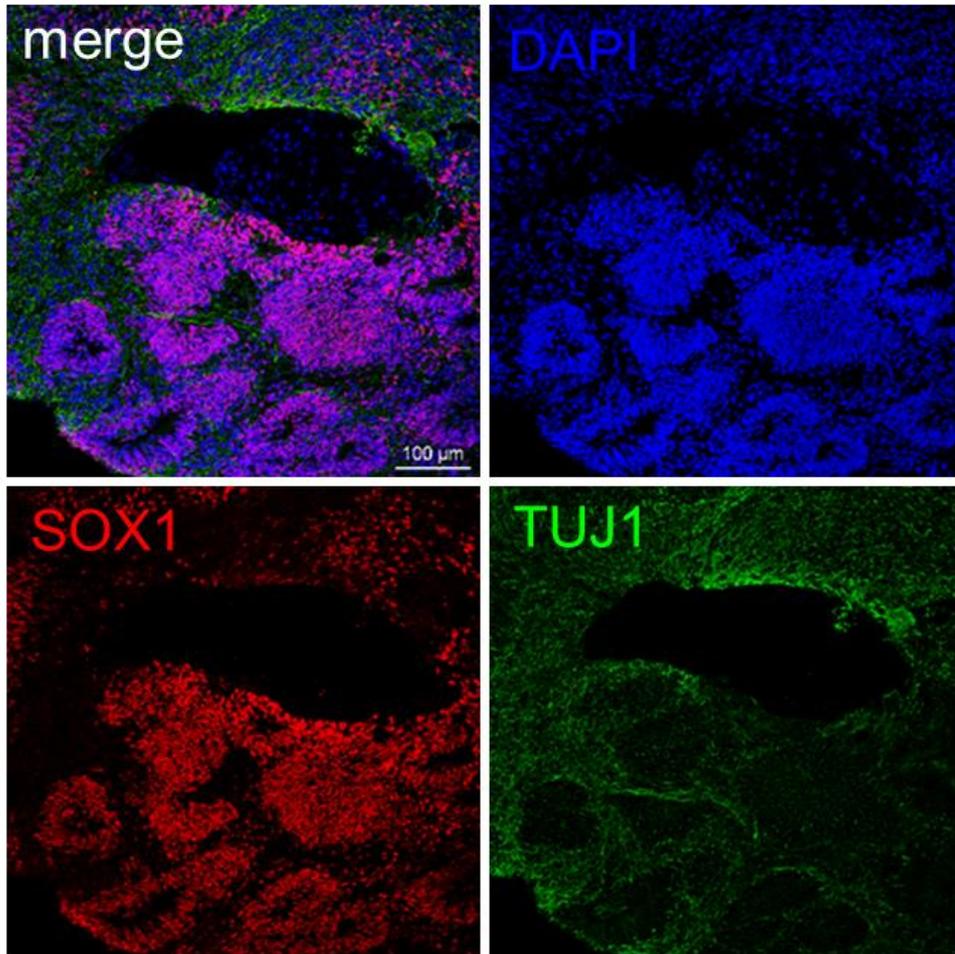


**Abbildung 24: Überprüfung der Lokalisation der CD31 positiven Zellen**

**A:** Neuro-mesenchymale Organoid am Tag 60. Das entstehende Netzwerk aus Endothelzellen wurde durch Immunfluoreszenz Analyse an Paraffinschnitte mit spezifischem Antikörper gegen den Endothelzellmarker CD31 (rot) dargestellt. Für das Neuroepithel wurde PAX6 (grün) verwendet. Zellkerne wurden mit DAPI (blau) gefärbt.

**B:** Neuro-mesenchymale Organoid am Tag 60. Das entstehende Netzwerk aus Endothelzellen wurde durch Immunfluoreszenz Analyse an Paraffinschnitte mit spezifischem Antikörper gegen den Endothelzellmarker CD31 (rot) dargestellt. Für das Neuroepithel wurde PAX6 (grün) verwendet. Zellkerne wurden mit DAPI (blau) gefärbt.

### 3.4.2 Charakterisierung des Neuroepithels

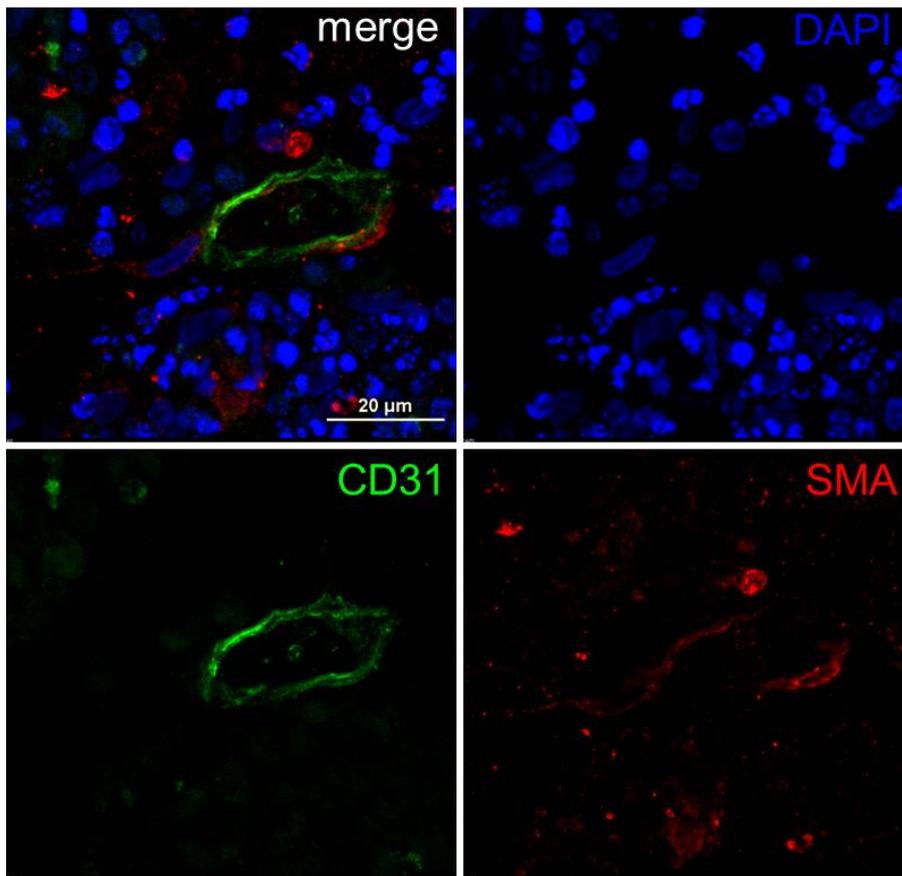


**Abbildung 25: Doppelfärbung der neuro-mesenchymalen Organoide in Paraffinschnitten mit Immunfluoreszenz zur Charakterisierung des Neuroepithels**  
Darstellung des Neuroepithels mit spezifischen Immunfluoreszenzmarkern am Tag 60 vom neuro-mesenchymalen Organoid mittels SOX1 (rot) und TUJ1 (grün). Zellkerne wurden mit DAPI (blau) gegengefärbt.

Mittels Fluoreszenzfärbung konnten die Zellen des Neuroepithel der neuro-mesenchymalen Organoide zu einem gewissen Grad charakterisiert werden (**Abbildung 25**). Der Transkriptionsfaktor SOX1 markiert die neuroepithelialen Bereiche mit typischer Rosettenstruktur. Der neuronenspezifische Marker TUJ1 ist im Gegensatz dazu im ganzen neuralen Organoid erkennbar und verdeutlicht die Ausmaße des neuro-mesenchymalen Organoids.

### 3.4.3 Entwicklung der Vaskularisation

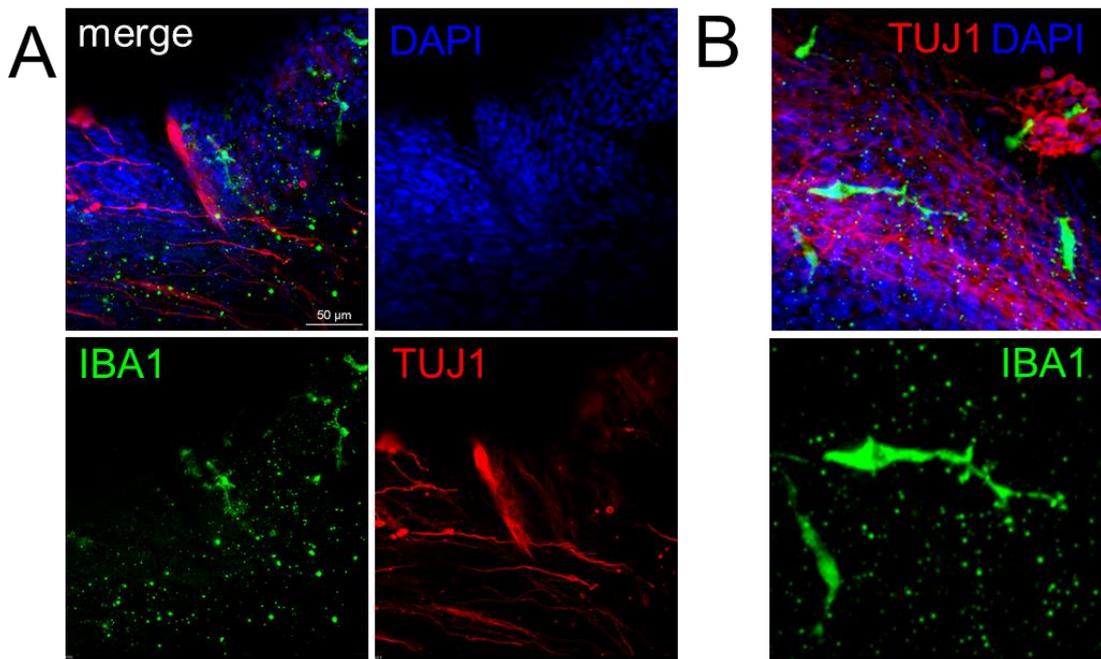
Das Vorhandensein periendothelialer glatter Muskelzellen bzw. Perizyten ist ein wichtiges Merkmal funktioneller Blutgefäße. Um die periendothelialen Zellen darstellen zu können, erfolgte die Detektierung mit spezifischen Antikörpern gegen  $\alpha$ -smooth muscle actin ( $\alpha$ -SMA) (**Abbildung 26**). Direkt angrenzend an die CD31 positiven Endothelzellen konnten glatte Muskelzellen mit einer intrazellulären Expression von  $\alpha$ -SMA nachgewiesen werden. Außerdem ist ein Gefäßlumen klar zu erkennen.



**Abbildung 26: Fluoreszenzanalyse auf Vaskularisierungsentwicklung**  
Fluoreszenzgefärbte neuro-mesenchymale Organoide am Tag 160 nach Clearingverfahren. Der Nachweis von Endothelzellen wurde mit CD31 (grün) und die daran angrenzenden glatte Muskelzellen mit  $\alpha$ -SMA (rot) detektiert. Zellkerne wurden mit DAPI (blau) gefärbt.

### 3.4.4 Nachweis von Mikroglia

Zusätzlich zur Darstellung der Blutgefäße wurden anschließend die neuro-mesenchymalen Organoiden gegen den spezifischen Mikroglia Marker IBA1 gefärbt (**Abbildung 27**). Bei Mikroglia handelt es sich um Makrophagen des Zentralen Nervensystems. Diese wandern während der embryonalen Entwicklung in das Nervengewebe ein. Die Anwesenheit von Mikroglia im neuralen Anteil zeigt die Parallele der neuro-mesenchymalen Organoiden zur humanen Embryonalentwicklung des zentralen Nervensystems.



**Abbildung 27: Nachweis Mikroglia im neuralen Anteil der neuro-mesenchymalen Organoiden**

Fluoreszenzgefärbte neuro-mesenchymale Organoiden am Tag 220 nach Clearingverfahren.

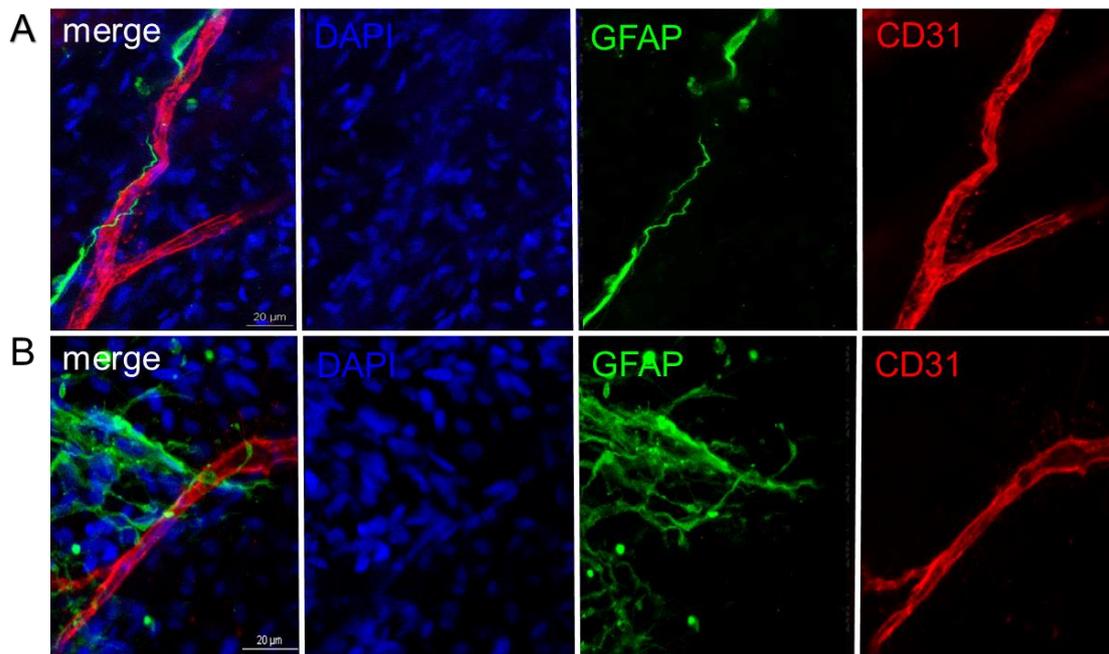
**A** Mikroglia wurde durch Immunfluoreszenz Analyse im neuralen Anteil der neuro-mesenchymalen Organoiden durch Nachweis des Mikroglia Markers IBA1 (grün) dargestellt. Der neurale Anteil ist durch die Expression des neuronenspezifischen Markers TUJ1 (rot) charakterisiert. In der Färbung zeigten sich IBA1 positive Zellen mit einer gleichmäßigen Verteilung in enger Nachbarschaft zu TUJ1 positiven Zellen. Zellkerne wurden mit DAPI (blau) gegengefärbt.

**B** Mikroglia wurde durch Immunfluoreszenz Analyse im neuralen Anteil der neuro-mesenchymalen Organoiden durch Nachweis des Mikroglia Markers IBA1 (grün) dargestellt. Der neurale Anteil ist durch Expression des neuronenspezifischen Markers TUJ1 (rot) charakterisiert. Die IBA1 positiven Zellen zeigen eine teils amöbenartige, teils verzweigte Morphologie. Zellkerne wurden mit DAPI (blau) gegengefärbt.

Nach Darstellung des Neuronenmarkers TUJ1 wird der neurale Teil der neuro-mesenchymalen Organoiden deutlich. Die Expression von IBA1 im neuronalen Anteil zeigt eine homogene Verteilung und verzweigte Morphologie der Mikroglia (**A**). Zusätzlich wurden bei der Analyse mit IBA1 Gewebemakrophagen mit amöben-artiger Morphologie beobachtet (**B**).

### 3.4.5 Differenzierung des Neuroepithels

Um die weitere Reifung des Nervengewebes nachzuweisen, wurde die Fluoreszenzanalyse ab Tag 220 um den Astrozytenmarker GFAP erweitert (**Abbildung 28**). GFAP Expression findet sich sowohl in reifen radialen Gliazellen als auch in Astrozyten. Der Blutgefäßanteil wurde mittels Nachweises von CD31 sichtbar gemacht.



**Abbildung 28: Doppelfärbung von neuro-mesenchymalen Organoiden mit spezifischen Antikörpern für radiale Gliazellen/Astrozyten am Tag 220**

Fluoreszenzgefärbte neuro-mesenchymale Organoide am Tag 220 nach Clearingverfahren.

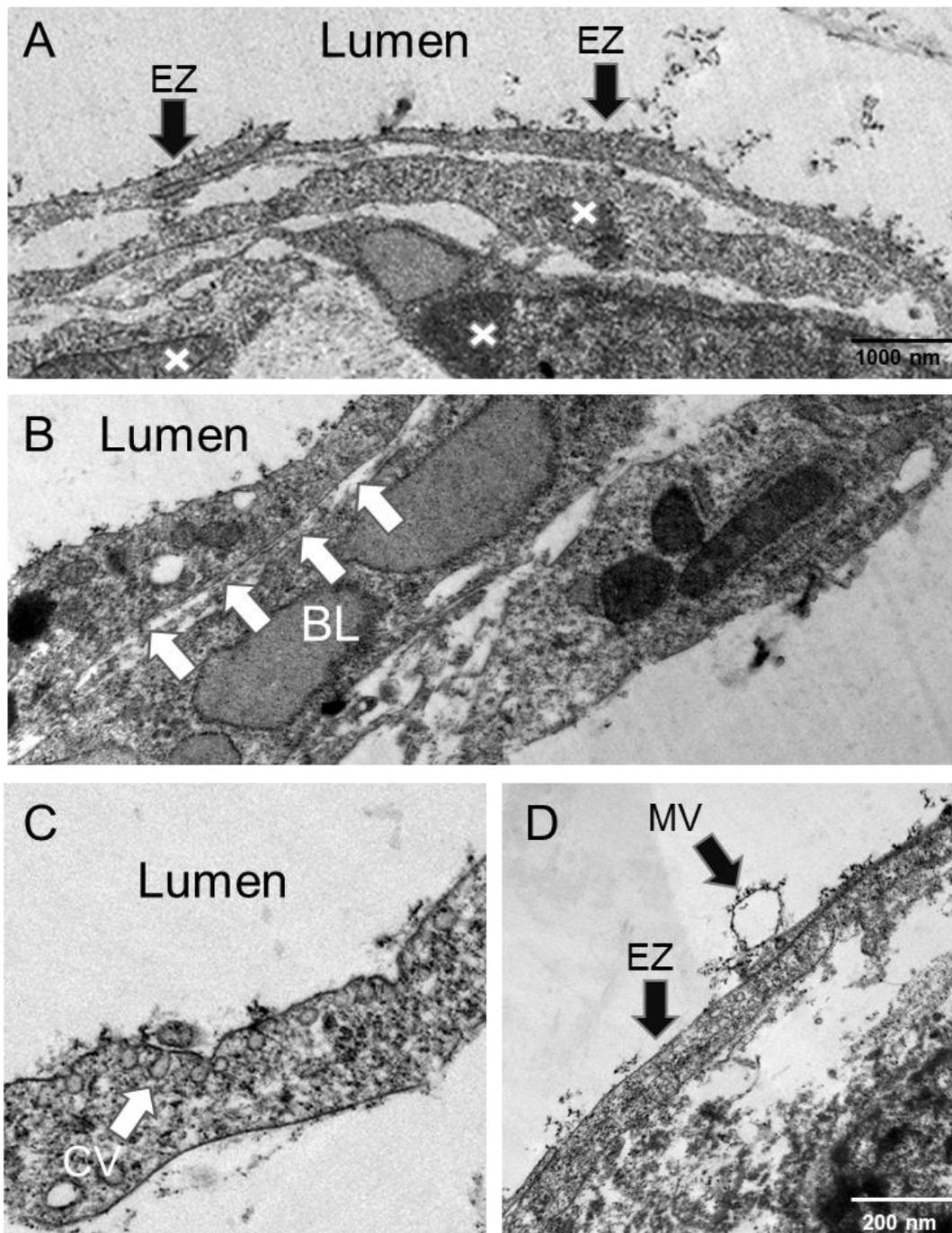
**A:** Neural-mesenchymale Organoide, die mit dem Clearingverfahren behandelt wurden. Die Astrozyten/Radialgliazellen wurden mit GFAP gefärbt. Zusätzlich wurden die Endothelzellen mit CD31 dargestellt. Gegenfärbung der Zellkerne mit DAPI (blau).

**B:** Neural-mesenchymale Organoide, die mit dem Clearingverfahren behandelt wurden. Die Astrozyten/Radialgliazellen wurden mit GFAP gefärbt. Zusätzlich wurden die Endothelzellen mit CD31 dargestellt. Gegenfärbung der Zellkerne mit DAPI (blau).

Der Nachweis von GFAP zeigt eine Weiterentwicklung der neuralen Zellen. Nach den neural-induzierten Vorläuferzellen entstanden radiale Gliazellen/Astrozyten, die mit fingerförmigen Ausläufern direkt mit den Endothelzellen (CD31) in Kontakt treten. Das Endothelzellnetz zeigt Verzweigungen und eine Hierarchie von größeren und kleineren Gefäßstrukturen.

### 3.4.6 Lumenbildung

Die oben beschriebene Analyse mit spezifischen Antikörpern lässt ein von Endothelzellen begrenztes Gefäßlumen erahnen. Um dies weiter zu bestätigen wurde eine Ultrastrukturanalyse mittels Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) durchgeführt (**Abbildung 29**). Die Analyse zeigt eindeutig ein Lumen, das von Zellen mit typischer Endothelzellmorphologie ausgekleidet ist. Angrenzend zeigen sich periendotheliale Zellen wie in Kapitel 3.4.3, die mit fingerartigen Fortsätzen bis ans Endothel heranreichen (**A**). Neben dem deutlich sichtbaren Endothelzellen zeigt sich unterhalb eine Basallamina, an die die Endothelzellen mit ihrer basalen Seite angeheftet sind (**B**). Außerdem lassen sich in den TEM-Aufnahmen Caveolae als omegaförmige Einstülpungen erkennen, die häufig im vaskulären Endothel vorkommen (Sowa, 2012) (**C**). Das Vorhandensein von Mikrovesikeln ist ein weiteres Merkmal eines gebildeten Gefäßlumens (Raposo and Stoorvogel, 2013) (**D**).



**Abbildung 29: Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen von neuro-mesenchym Organoiden**

**A:** Darstellung von Gefäßlumen im neuro-mesenchymalen Organoid. Das entstandene Lumen wird von Endothelzellen (EZ) umgeben. Es sind außerdem noch periendotheliale Zellen (x) zu erkennen.

**B:** Darstellung von Gefäßlumen im neuro-mesenchymalen Organoid. Die Endothelzellen sind mit der basalen Seite an eine Basallamina (BL) angeheftet.

**C:** Darstellung von Gefäßlumen im neuro-mesenchymalen Organoid mit omega-förmigen Caveolae (CV).

**D:** Darstellung von Gefäßlumen im neuro-mesenchymalen Organoid. Neben den Endothelzellen (EZ) sind angrenzend Mikrovesikel (MV) erkennbar.

## 4 Diskussion

Die Erforschung der embryonalen Entwicklung wird meist an Modellorganismen (Maus, Zebrafisch, Drosophila, Xenopus etc.) durchgeführt und diese Erkenntnisse auf den menschlichen Organismus übertragen. Die humane Entwicklung mit Tiermodellen zu erforschen ist allerdings nur begrenzt möglich, da die Embryogenese verschiedener Spezies zwar in großen Teilen konserviert abläuft, jedoch in Details voneinander abweicht. Um die menschliche Entwicklung *in vitro* nachstellen zu können und besser zu ergründen, sind Zellkulturmodelle, die aus Stammzellen abgeleitet werden, sehr bedeutsam. In den letzten Jahrzehnten wurden dazu Modellsysteme entwickelt, sogenannte Organoide. Diese spiegeln die menschliche Gewebe- und Organentwicklung in Zellkultur wider.

Die pränatale neurale Organogenese ist ein komplexer Vorgang aus zellulärer Differenzierung und Gewebemorphogenese, der durch unterschiedliche Signalwege präzise gesteuert abläuft. Ebenso ist die Gefäßentwicklung ein signalinduzierter Prozess. Die besondere Herausforderung dieser Arbeit besteht darin beide entwicklungsbiologischen Vorgänge in einem Organoidmodell zu vereinen und somit eine Vaskularisierung von neuronalen humanen Organoiden zu erreichen. Die präzise gesteuerte Vaskularisierung ist ein wichtiger Schritt während der Entwicklung des Gehirns. Sie stellt während der Embryogenese eine Versorgung mit Sauerstoff und Nährstoffen sicher, erlaubt die Verteilung von Signalmolekülen und ermöglicht den Abtransport unerwünschter Metabolite.

Im Zuge dieser Dissertationsarbeit sollte zunächst ein Protokoll für die Generierung iPS-Zell abgeleiteter neuraler und mesodermaler Aggregate erarbeitet werden. Anschließend sollte das Verhalten dieser Zellaggregate in direkter Kokultur analysiert werden. Dieses Modell bietet die Möglichkeit den Einfluss von Blutgefäßen auf das Nervengewebe sowie andersherum den Einfluss der neuronalen Zellen auf die Entwicklung des Gefäßplexus zu erforschen. Außerdem bietet das Modell die Möglichkeit Mechanismen der Einwanderung bzw. Einsprossung mesenchymaler Zellen wie bspw. Endothelzellen oder Mikroglia ins Hirngewebe

zu erforschen. Um ein Vergleichsgewebe zur Verfügung zu haben, wurden Paraffinschnitte eines Hühnerembryos angefertigt. Ein weiteres Ziel war es, die Kulturbedingungen für die Organoide an die natürlichen Gegebenheiten im Embryo anzupassen. Deshalb wurde mit hypoxischen Bedingungen experimentiert. Die Hypoxie sollte eine Erhöhung von HIF-1 $\alpha$  und somit eine Verbesserung der Vaskularisierung zu Folge haben (Iyer et al., 1998).

Die neuro-mesenchymalen Organoide wurden histologisch analysiert und charakterisiert. Da Organoide die embryonale und fetale Entwicklung in Echtzeit imitieren, können die eingangs beschriebenen Experimente sehr zeitintensiv sein. Es kann durchaus mehrere Monate dauern, bis embryologisch späte Zelltypen wie Astrozyten entstehen und das künstliche Hirngewebe komplettieren (Pasca et al., 2015; Sloan et al., 2017).

#### **4.1 Generierung neurale/mesodermale Zellaggregate aus hiPS-Zellen**

Verschiedene aktuelle Forschungsarbeiten befassen sich mit der Frage, ob und wie neurale Organoide vaskularisierbar sind (Cakir et al., 2019; Mansour et al., 2018; Pham et al., 2018). Schon einige Forschungsgruppen haben sich mit diesem Thema beschäftigt und Protokolle für die Vaskularisierung von Organoiden publiziert. Eine Möglichkeit ist, neurale Organoide in einen Wirtsorganismus (Maus, Ratte) zu transplantieren und auf diesem Weg eine Vaskularisierung des transplantierten Gewebes durch den Wirt zu erreichen (Mansour et al., 2018). Der Nachteil bei diesem Modell ist, dass neurale und mesenchymale Komponenten unterschiedlicher Spezies entstammen und somit letztlich ein chimäres Gewebe entsteht, das als Modell für das humane Gehirn daher nur begrenzt von Nutzen ist. Eine weitere Strategie ist es, Endothelzellen autolog zu den neuronalen Organoiden zu generieren und in Kokultur zu bringen (Pham et al., 2018). Die Problematik bei diesem Modell besteht darin, dass Blutgefäße weitaus komplexer sind und nicht nur aus Endothelzellen bestehen. Zu einer vollständigen

Blutgefäßwand gehören außer Endothelzellen auch glatte Muskelzellen bzw. Perizyten sowie adventitielles Bindegewebe. Es zeigt sich, dass selbst kleine Kapillaren von Perizyten ummantelt werden, und dass das adventitielle Bindegewebe Vorläuferzellen enthält, die zur Gefäßneubildung beitragen (Mekala et al., 2018; Wörsdörfer et al., 2017). Eine wirklichkeitsnahe und funktionelle Vaskularisierung von Organoiden sollte also idealerweise auf eine andere Weise erreicht werden.

In der vorliegenden Arbeit wurden aus hiPS-Zellen zunächst neurale und mesodermale Progenitorzellen erzeugt und anschließend in Kokultur gebracht. Ein großer Vorteil dieser Methode besteht darin, dass alle Zellen humanen Ursprungs sind. Außerdem können mesodermale Vorläuferzellen sich in allen gefäßspezifischen Zelltypen differenzieren. So kann eine Vaskularisierung des Organoids mit komplett ausgebildeten Blutgefäßen gewährleistet werden. Darüber hinaus können die mesodermalen Vorläuferzellen neben den Zellen der Gefäßwand auch Zelltypen des Bindegewebes sowie einige hämatopoietische Zelltypen hervorbringen.

Am Anfang der Arbeit wurden hFSiPS-Zellen in neurale und mesodermale Progenitorzellen differenziert. Die genutzten iPS-Zellen wurden aus humanen juvenilen Vorhautfibroblasten generiert (Kwok et al., 2018).

Für die Einleitung der gerichteten Differenzierung ist eine Manipulation verschiedener Signalwege erforderlich, um den hiPS-Zellen eine neue Identität zuzuweisen. Dazu wurden die iPS-Zellen zunächst in nicht adhäsiven 6-Well-Platten kultiviert, wobei sich die Zellen in Suspension zu Aggregaten zusammenlagerten. Anschließend wurden die Aggregate in ein geeignetes Zellkulturmedium überführt, welches mit entsprechenden pharmakologischen Signalwegsmodulatoren bzw. Zytokinen versetzt wurde. So konnten erfolgreich Vorläuferaggregate generiert werden. An dieser Stelle muss angemerkt werden, dass die Anzahl der anfangs für die Aggregation verwendeten iPS-Zellen nicht bestimmt wurde. Da die Aggregatgröße für die weitere Differenzierung von Einfluss sein kann, sollten in zukünftigen Experimenten gezielt Aggregate bestimmter Zellgröße, bspw. nach

dem Hanging-Drop Prinzip bzw. in sogenannten Aggrewell Platten, erzeugt werden (Antonchuk, 2013; Foty, 2011). Die Experimente dieser Arbeit beschränken sich auf die Etablierung eines geeigneten Differenzierungsprotokolls und auf die Analyse der Reifung der neuro-mesenchymalen Organoide.

Die iPS-Zellaggregate wurden zunächst in neurale Vorläuferzellen differenziert. Um eine neurale Differenzierung im 3D Aggregat zu erreichen, wurde auf ein vorhandenes Protokoll zur neuralen Induktion in konventioneller 2D Kultur zurückgegriffen (Reinhardt et al., 2013). Das Protokoll verwendet geeignete Differenzierungsmedien, welche mit pharmakologischen Inhibitoren versetzt werden. In den ersten 48 h wurde der TGF- $\beta$  Signalweg mit SB431542 und der BMP Signalweg mit Dorsomorphin inhibiert. Zusätzlich wurde für den ganzen Zeitraum der Induktion der WNT Signalweg mittels CHIR99021 aktiviert. CHIR99021 ist ein selektiver GSK3 Inhibitor. Der SHH Rezeptor wurde darüber hinaus durch Purmorphamin (PMA) stimuliert.

Parallel wurden weitere iPS-Zellaggregate mithilfe eines angepassten Differenzierungsprotokolls erfolgreich in mesodermale Progenitorzellaggregate differenziert (Patsch et al., 2015). Hier wurde ebenfalls der WNT Signalweg mit Hilfe von CHIR99021 angetrieben. Außerdem wurde durch Zugabe des rekombinant hergestellten Zytokins BMP4 für die Aktivierung des TGF- $\beta$  Rezeptors gesorgt. Die Dauer des Induktionsprotokolls für die mesodermalen Zellen beträgt drei Tage. Daher wurde die neurale Induktion bereits früher begonnen, um einen perfekten zeitlichen Rahmen für die Zusammenführung beider Aggregate zu schaffen.

Um die erfolgreiche Induktion in neurale und mesodermalen Vorläuferzellen zu bestätigen, wurde zuerst die Morphologie der Aggregate betrachtet (**Abbildung 13**). Dabei sind deutliche Unterschiede zu erkennen. Nicht induzierte Aggregate haben eine unregelmäßige Form, mesodermale Aggregate hingegen zeigen eine homogene Struktur. Dies zeigt, dass mit der zellulären Differenzierung auch eine charakteristische Morphogenese einhergeht. Noch deutlicher wird es bei der neuralen Induktion, da hier die typischen neuronalen Rosetten zu erkennen

sind (Reinhardt et al., 2013). Diese entstehen ähnlich wie bei der Entwicklung des Neuralrohrs durch zelluläre Polarisierung und Lumenbildung.

Um eine genauere Charakterisierung der Aggregate vorzunehmen, wurden eine Fluoreszenzfärbung (**Abbildung 14**), eine durchflusszytometrische Untersuchung (**Abbildung 15**) und eine Western-Blot Analyse (**Abbildung 16**) durchgeführt.

Ein gebräuchlicher Indikator für frühe neuroektodermale Entwicklung und Differenzierung ist der Transkriptionsfaktor SOX1 (Kan et al., 2004; Pevny et al., 1998). In späteren Entwicklungsstadien gilt SOX1 auch als Markerprotein für undifferenzierte neurale Vorläuferzellen (Elkouris et al., 2011). Während der mesodermalen Differenzierung gilt Brachyury als Schlüsselmarker und Indikator für die Ausprägung des Primitivstreifens (Faial et al., 2015). Bei der immunzytochemischen Fluoreszenzfärbung und bei der FACS-Analyse konnten beide Marker jeweils in ca. 80 % der Zellen detektiert werden. Dies zeigt eine relativ effiziente Induktion der gewünschten Zelltypen. Allerdings enthält jeder Typ von Aggregat somit auch ca. 20 % unerwünschte bzw. nicht vollständig differenzierte Zelltypen. Hier sollte in Zukunft weiter an der Effizienz der Induktion gearbeitet werden, um unerwünschte Zelltypen zu reduzieren und somit den Ausgang der Experimente reproduzierbarer zu gestalten.

Bei der Western-Blot Analyse konnte das Brachyuryprotein bei ca. 47 kDA detektiert werden. Allerdings zeigte die Analyse noch eine unspezifische Bande unterhalb der erwarteten Hauptbande. Die schwachen Banden unterhalb der Brachyury-Bande können auf eine Fragmentierung des Brachyury-Proteins hinweisen.

Die Bestätigung der neuralen und mesodermalen Induktion war für die weiterführenden Experimente von großer Bedeutung. So konnte sichergestellt werden, dass die spätere Charakterisierung der entstandenen Organoide aus einer erfolgreichen Differenzierung der hiPS-Zellen abgeleitet werden kann.

## 4.2 Vereinigung der generierten hiPS-Zellen

Nach erfolgreicher Induktion erfolgte die Zusammenführung der neuralen und mesenchymalen Zellkomponenten auf verschiedenen Wegen in Kokultur (**Abbildung 17**). Die Konfrontation wurde unter drei verschiedenen Bedingungen durchgeführt:

Aggregat + Aggregat (1)

Aggregat + Einzelzellen (2)

Einzelzellen + Einzelzellen (3)

Hintergrund hierfür war, die Entwicklung des Embryos *in vitro* möglichst genau nachzustellen. Bei Wirbeltieren wird ein Gefäßbett um das Neuralrohr gebildet. Dieser perineurale Gefäßplexus entstammt dem embryonalen Mesenchym und ist ein Kapillarnetzwerk, dass sich um Rückenmark und Gehirn spannt und somit das Nervengewebe mit Nährstoffen und Sauerstoff versorgt (Bar, 1980; Risau, 1986).

Bei der Zusammenführung sollte untersucht werden, ob sich das Zusammenwachsen der differenzierten Aggregate bzw. Einzelzellen bei den verschiedenen Bedingungen unterscheidet.

Dabei wurde zunächst Strategie 2 (Aggregat + Einzelzellen) favorisiert, da vermutet wurde, dass sich die mesenchymalen Einzelzellen um das neurale Aggregat anlagern. Grund hierfür ist, dass das Neuralrohr *in vivo* ebenfalls vom mesenchymalen Bindegewebe umgeben vorliegt und eine wichtige Quelle von induktiven Signalen für die Entwicklung des perineuralen Gefäßplexus darstellt (Hogan et al., 2004). Interessanterweise hat sich allerdings gezeigt, dass sich die mesodermalen sowie neuralen Zellen unter jeder Bedingung zunächst während weniger Stunden mit ihresgleichen zu Aggregaten zusammenlagerten und diese Aggregate dann zu einem späteren Zeitpunkt miteinander verschmelzen (**Abbildung 18(A)**). Eine ausgeprägte Neigung mesenchymaler Stammzellen zur Selbstaggregation wurde bereits zuvor in der Literatur beschrieben (Tsai et al.,

2015). Aus diesem Grund wurden in den folgenden Experimenten nur noch mesodermale mit neuronalen Aggregaten fusioniert (Strategie 1) und auf eine Verwendung von Einzelzellen (Strategie 2 und 3) wurde verzichtet.

### **4.3 Vaskularisierungspotenzial der mesodermalen Progenitorzellen**

Um die weitere Differenzierung der Brachyury positiven mesodermalen Progenitorzellen in reife Endothelzellen, sowie die Entstehung endothelialer Netzwerke nachzuweisen, wurden die zusammengeführten Aggregate zu verschiedenen Zeitpunkten geerntet und mittels Immunfluoreszenzanalyse untersucht.

Die innerste Schicht der Wand von Blutgefäßen wird von den Endothelzellen gebildet. Die erfolgreiche Differenzierung in Endothelzellen konnte mittels Immunfluoreszenzanalyse gegen CD31 nachgewiesen werden (**Abbildung 18(B)(C)**). CD31 ist ein Thrombozyten-Endothelzellen-Adhäsionsmolekül (PECAM), welches auf der Oberfläche von Endothelzellen ausgeprägt wird (Newman et al., 1990). Die Färbungen zeigten darüber hinaus ein gewisses Selbstorganisationsverhalten der Endothelzellen im Zellaggregat. Die CD31 positiven Zellen ordnen sich zu sogenannten Endothelsträngen (endothelial cords) an, die sich zu einem Netzwerk zusammenschließen. Sämtliche Blutgefäße der Wirbeltiere werden durch Anlage von Endothelsträngen gebildet, welche später ein Lumen formieren (Lammert and Axnick, 2012). Durch Rekrutierung umliegender mesenchymaler Zellen bilden sich anschließend, begünstigt durch die Perfusion der Blutgefäße, die weiteren Schichten der Gefäßwand. Schließlich besteht das Blutgefäß aus der innen liegenden Tunica Intima, einer darum gelagerten Schicht glatter Muskelzellen (Tunica Media) sowie der äußersten bindegewebigen Schicht, der sogenannten Tunica Adventitia.

Um die Vaskularisierung der Aggregate weiter zu begünstigen, wurden die zusammengesetzten Organoide unter hypoxischen Bedingungen kultiviert. Durch Hypoxie wird die VEGF-Transkription stimuliert und somit Angio- und

Vaskulogenese moduliert. Der Sauerstoffmangel sollte die Ausreifung der Hämagioblasten fördern (Ramirez-Bergeron et al., 2004), sowie die Proliferation und Migration der Endothelzellen anregen. Daher wurde die Hälfte der zusammengeführten Aggregate für 72 h in einen Inkubator mit 2 % sauerstoffhaltiger Atmosphäre überführt. Die andere Hälfte wurde bei normalen Sauerstoffstandardbedingungen (21 %) kultiviert. Bei der anschließenden Immunfluoreszenzanalyse mit spezifischen Antikörpern gegen CD31 konnte allerdings keine augenscheinliche Auswirkung der Hypoxiebehandlung auf die Gefäßbildung nachgewiesen werden (**Abbildung 20**). Allerdings ist anzumerken, dass keine statistische Auswertung der Gefäßentwicklung vorgenommen wurde. Daher kann ein geringfügiger positiver Effekt der hypoxischen Kulturbedingungen auf die Gefäßbildung nicht ausgeschlossen werden. Allerdings rechtfertigt ein möglicher geringer Nutzen dieser Kulturmethode nicht den deutlich höheren finanziellen und experimentellen Aufwand, der mit der Kultur unter hypoxischen Bedingungen verbunden ist. Aus diesem Grund wurde in den folgenden Experimenten auf eine Kultur der Organoide im Hypoxieschrank verzichtet.

Blutgefäße haben *in vivo* einen mehrschichtigen Aufbau, der bisher bei anderen publizierten vaskularisierten Organoidmodellen in dieser Komplexität nicht, oder nur ansatzweise, nachgeahmt werden konnte. Neben den Endothelzellen befinden sich in der Gefäßwand auch sogenannte Muralzellen wie Perizyten und glatte Muskelzellen. Kapillaren und neu gebildete Blutgefäße werden mit Perizyten ummantelt. Größere Gefäße wie Arterien werden von glatten Muskelzellen umgeben. Diese periendothelialen Zellen ermöglichen eine Gefäßfunktion und die Regulation des Blutflusses (Hirschi and D'Amore, 1996).

Daher wurde in weiteren Analysen auch auf die Anwesenheit muraler Zelltypen getestet. Dazu wurden die Organoide nach 160 Tagen mittels Immunfluoreszenzanalyse untersucht (**Abbildung 26**). Dabei konnten  $\alpha$ -SMA positive Zellen in direkter Nachbarschaft zu den CD31 positiven Endothelzellen nachgewiesen werden. Die  $\alpha$ -SMA Expression weist auf glatte Muskelzellen oder Perizyten hin (Alarcon-Martinez et al., 2018). Ferner zeigte sich eine kapillarähnliche Struktur mit einer Lumenbildung durch die CD31 positiven Zellen.

Um die Lumenbildung sowie den mehrschichtigen Gefäßwandaufbau zu verifizieren, wurden die neuro-mesenchymalen Organoiden mittels Transmissionselektronenmikroskopie ultrastrukturell untersucht (**Abbildung 29**). Das Gefäßlumen ist ein bedeutender Faktor, um ein funktionierendes Kapillarnetzwerk zu erzeugen. Neben der Lumenbildung zeigten die elektronenmikroskopischen Aufnahmen Zellen mit einer für Endothelzellen typischen Morphologie, sowie darum gelagerte periendotheliale Zellen (**A**). Ebenfalls typisch für den charakteristischen Wandaufbau von Blutgefäßen ist die Anwesenheit einer zwischen Endothelzellen und periendothelialen Zellen gelegenen Basallamina (**B**). Um die Endothelzellen noch besser charakterisieren zu können, wurden die Aufnahmen mit höherer Vergrößerung angefertigt. Dabei ließen sich omega-förmige Einstülpungen der Zellmembran erkennen, die als Caveolea identifiziert wurden (**C**). Caveolea lassen sich häufig im vaskulären Endothel nachweisen (Sowa, 2012). Ein weiteres typisches Merkmal von Endothelzellen ist das Abschnüren von Mikrovesikeln in das Gefäßlumen (Raposo and Stoorvogel, 2013). (**D**) Ein solcher Vorgang ist ebenfalls auf den elektronenmikroskopischen Aufnahmen zu erkennen.

#### 4.4 Entwicklungspotential neuro-mesenchymaler Organoiden

Um das Organoidmodell mit der Situation *in vivo* vergleichen zu können, wurden Hühnerembryonen präpariert und Schnittpräparate von Hirn und Rückenmark erstellt um den perineuralen Plexus um das Nervengewebe sichtbar zu machen (**Abbildung 21**). Da keine Antikörper zur Darstellung von Gefäßen im Hühnerembryo verfügbar waren, wurde der perineurale Plexus anhand der Autofluoreszenz der Erythrozyten dargestellt.

Für die Charakterisierung des neuralen Anteils des neuro-mesenchymalen Organoids war es essenziell, solche Gewebeteile zu betrachten, die in der Entwicklung klar definiert sind. Das Pendant zur Neurulation stellt im Organoidmodell die Ausbildung der neuralen Rosetten dar (**Abbildung 13**, **Abbildung 14**). In der

Folge kommt es zu einer ausgeprägten Lumenbildung entsprechend der Entwicklung des Neuralrohrs bzw. der Ventrikelräume *in vivo* (**Abbildung 18**). Anschließend beginnt die Neurogenese, die mit der Bildung des Neokortex in den neuro-mesenchymalen Organoiden einhergeht. Dabei beobachtet man im zeitlichen Verlauf die Entstehung der sogenannten ventrikulären Zone (VZ), der subventrikulären Zone (SVZ), sowie, später einsetzend, der beginnenden kortikalen Schichtung (Lancaster et al., 2013; Pasca et al., 2015).

In den Organoiden finden sich SOX1 positive neurale Stammzellen in der VZ- und SVZ-ähnlichen Zone und TUJ1 positive Zellen im sich entwickelnden kortexartigen Areal (**Abbildung 25(C)**). Das Ergebnis zeigt, dass die neurale Entwicklung nach 60 Tagen erwartungsgemäß vorangeschritten ist. Beim Vergleich der Organoiden mit dem Hühnerembryo zeigen sich erstaunliche Ähnlichkeiten im Gewebeaufbau (**Abbildung 23(B)**). Auch in der HE-Färbung ist die Schichtung gut zu erkennen.

Ab diesem Stadium (Tag 60) wurden die Organoiden auch regelmäßig mittels CD31 Immunfärbung auf gefäßähnliche Strukturen untersucht. Der Gefäßplexus fand sich dabei größtenteils im mesenchymalen Teil des Aggregats, verstärkt ausgeprägt an der Grenzfläche zum neuronalen Organoid (**Abbildung 24**). Wie in der Literatur beschrieben befinden sich die CD31 positiven Zellen in der Nähe der ventrikulären Zone des neuronalen Anteils des Organoids (Cakir et al., 2019).

Um das Entwicklungspotenzial der neuro-mesenchymalen Organoiden noch mehr zu verdeutlichen, wurden die Organoiden auf einen spät entwickelnden Zelltyp untersucht. Astrozytenvorläuferzellen sind schon nach 12 Wochen zu beobachten, jedoch funktionelle Astrozyten, die durch die Expression von GFAP definiert sind, werden erst nach 6 Monaten beobachtet (Krencik et al., 2011). An Tag 220 konnten Astrozyten durch die Expression des sauren Gliafaserproteins (GFAP) im Organoid nachgewiesen werden (**Abbildung 28**).

Eine wichtige Funktion von Astrozyten ist die Versorgung der Neurone mit Nährstoffen sowie für die Ausbildung der glialen Grenzschicht (Membrana limitans

gliae superficialis und perivascularis). So konnte auch ein enger Kontakt der Astrozyten zu den Gefäßen beobachtet werden. Astrozyten sind ein Gliazelltyp, der in enger Verbindung mit dem Blutgefäßsystem des Gehirns steht. Die Endfüße des Basalfortsatzes der Astrozyten umhüllen dabei den Gefäßschlauch fast vollständig (Daneman and Prat, 2015) und sind somit an der Ausbildung der Bluthirnschranke beteiligt (Janzer and Raff, 1987). So konnte nicht nur eine erfolgreiche Vaskularisierung erreicht, sondern möglicherweise auch die Voraussetzung für die Bildung einer funktionellen Bluthirnschranke geschaffen werden.

Zusammenfassend lässt sich demnach feststellen, dass nach erfolgreicher Erzeugung neuro-mesenchymaler Aggregate eine Organoidbildung mit Differenzierung und Weiterentwicklung stattgefunden hat. Durch das Entwicklungspotenzial können die neuro-mesenchymalen Organoiden als Modellorganismus für die humane Entwicklung dienen.

#### **4.5 Vaskularisierung in der Embryonalentwicklung**

Während der Embryonalentwicklung spielt die Vaskularisierung der einzelnen Organe durch das stromale Gewebe eine entscheidende Rolle. Einerseits ist sie für die Versorgung des Embryos wichtig, auf der anderen Seite gibt es eine mesenchymal-parenchymale Interaktion innerhalb der Organe.

Das hier beschriebene Organoidmodell besteht aus einem mesodermal differenzierten Aggregat und einem neural differenzierten Aggregat. Das mesodermale Aggregat soll dem mesenchymalen Gewebekompartiment entsprechen. Die Aggregate werden schließlich in Kokultur zu einem neuro-mesenchymalen Organoid zusammengesetzt. Anschließend können morphogenetische Veränderungen und zelluläre Differenzierungsprozesse an der Schnittstelle zwischen neuralem und mesenchymalem Anteil sowie die Interaktionen zwischen den Gewebekompartimenten betrachtet werden. Dies imitiert den sich entwickelnden Embryo

und bietet somit eine geeignete Möglichkeit die komplexen entwicklungsbiologischen Prozesse nachzuvollziehen.

Die besondere Wichtigkeit der stromalen Komponenten zeigt sich in verschiedenen Organoidmodellen. Bspw. zeigte sich bei Leberorganoiden, dass Hepatoblasten funktioneller und reifer werden, wenn diese mit mesenchymalen Stammzellen und Endothelzellen kultiviert werden. So konnte nachgewiesen werden, dass eine Kommunikation zwischen mesenchymalem und parenchymalem Gewebe durch parakrine Signale für die Entwicklung ein ausschlaggebender Faktor ist (Asai et al., 2017). In einem anderen Leberorganoidmodell wurde gezeigt, dass VEGF, welches von mesenchymalen Zellen und Hepatoblasten freigesetzt wird, einen positiven Einfluss auf die Stimulation des endothelialen Netzwerks hat (Camp et al., 2017).

Ein weiteres Beispiel findet sich in der Lungenentwicklung. Mesenchymalen Zellen interagieren hier mit Lungenprogenitorzellen, die daraufhin eine verbesserte alveoläre Differenzierung zeigen (Leeman et al., 2019).

Auch bei der Gehirnentwicklung spielt das Gefäßsystem eine entscheidende Rolle. Die Anwesenheit eines gefäßähnlichen Systems kann die Reifung von neuronalen Organoiden entscheidend beeinflussen (Cakir et al., 2019). Schon bei der Neurulation wird von Vorläuferzellen des Neuralrohres VEGF ausgeschüttet, um einen perineuralen Plexus zu bilden (Hogan et al., 2004). Dieses Phänomen lässt sich auch *in vitro* nach der Anlagerung des mesodermalen Aggregats an das neurale Aggregat erkennen (**Abbildung 18**). Bei der weiteren Gewebereifung werden zusätzliche Faktoren ausgeschüttet. Das Neuroepithel produziert Liganden, um den WNT Signalweg zu aktivieren und die Blutgefäßentwicklung im zentralen Nervensystem weiter anzutreiben (Daneman et al., 2009; Stenman et al., 2008). Radiale Gliazellen produzieren außerdem TGF- $\beta$ , welches für die Entwicklung des neuronalen Gefäßsystems essenziell ist (Siqueira et al., 2018). Bei den in dieser Arbeit beschriebenen Analysen ist die enge Beziehung der radialen Gliazellen zum Gefäßsystem aufgefallen, was einen Hinweis darauf gibt, dass

die entstandenen radialen Gliazellen die Angiogenese mit Signalstoffen beeinflussen könnten (**Abbildung 28**).

Neben Blutgefäßen enthält das Stroma weitere Zelltypen, welche einen entscheidenden Einfluss auf die Gewebeentwicklung haben können. Es handelt sich dabei um eine Klasse von ortsansässigen Immunzellen, die sogenannten geweberesidenten Makrophagen. Diese sollen einen Einfluss auf die Gewebeentwicklung und Morphogenese haben (Mekala et al., 2018; Wynn et al., 2013). Makrophagen entstehen in der Regel aus Monozyten, die im Knochenmark gebildet werden und somit auch der mesodermalen Linie entspringen. Nach dem Einwandern in das Interstitium reifen die Makrophagen vollständig aus. Bei gewebsresidenten Makrophagen wird vermutet, dass sie schon während der embryonalen Entwicklung ihr Zielgewebe infiltrieren und dort lebenslang als Zellpool erhalten bleiben (Stremmel et al., 2018).

Im neuralen Gewebe werden die residenten Makrophagen als Mikroglia bezeichnet und zusammen mit der Makroglia (Astrozyten und Oligodendrozyten) des Hirngewebes unter dem Begriff Gliazellen zusammengefasst. Diese spezialisierten Gewebemakrophagen können aufgrund des fehlenden mesenchymalen Anteils nicht in normalen parenchymalen neuralen Organoiden detektiert werden. Bei Anwesenheit von mesodermalen Vorläuferzellen kann jedoch eine Infiltration von Makrophagen gezeigt werden (**Abbildung 27**). Mit Hilfe einer Zellcharakterisierung, nach einem Clearingverfahren des Organoids, konnten Mikroglia durch Nachweis des Markerproteins IBA1 an Tag 220 gezeigt werden. Dabei nehmen die IBA1 positiven Zellen eine mikrogliaähnliche Morphologie an. Mikroglia entstehen normalerweise aus erythromyeloide Vorläuferzellen in Blutinseln des Dottersacks (Gomez Perdiguero et al., 2015). In unserem Fall kann angenommen werden, dass der Ursprung mikrogliaartiger Zellen im hier beschriebenen neuro-mesenchymalen Organoid im blutbildenden Seitenplattenmesoderm liegt. Gerade die Inkorporation von Mikroglia in den neuralen Anteil des Organoids zeigt eine erfolgreiche Interaktion der zusammengeführten unterschiedlichen Gewebeanteile. Dies konnte zuvor nur bei der Transplantation in das Gehirn einer Maus

erreicht werden (Mansour et al., 2018). Zeitgleich mit dieser Arbeit erschienene Studien konnten bestätigen, dass aus iPS-Zellen generierte Mikroglia in humane neurale Organoiden immigrieren. Darüber hinaus zeigt diese Arbeit, dass Mikroglia das Verhalten der neuronalen Zellen im Organoid beeinflussen (Fagerlund et al., 2020).

## 4.6 Ausblick

Die Forschung mit Organoiden steht zurzeit noch am Anfang, trotzdem stellt sie schon jetzt eine vielversprechende Plattform dar, um *in vitro* Krankheiten sowie embryonale Entwicklungsprozesse zu erforschen und zu verstehen. Eine der größten Schwachstellen herkömmlicher Organoidmodelle stellt das Fehlen des stromalen Gewebes dar. Denn hierdurch sind die funktionelle Reifung, die Spezifikation von zellulären Subtypen sowie die maximale Organoidgröße begrenzt.

Diese Doktorarbeit beschreibt die Differenzierung und Entwicklung neuraler und mesodermaler Organoide. Des Weiteren zeigt die vorliegende Arbeit, dass neurale und mesodermale Aggregate zu Assembloiden verschmolzen werden können, um bspw. einen perineuralen Gefäßplexus zu generieren und ausgehend von diesem eine Vaskularisierung des neuralen Teils zu erreichen. Es erscheint von großem Interesse, die Forschung im Bereich der neuralen Organoide voranzutreiben und dabei möglichst beständige Modelle zu etablieren. Bei den Modellen sollte eine gute und günstige Reproduzierbarkeit gewährleistet werden. Die ausgebildeten Gefäße sollte das neurale Organoid funktionell mit Sauerstoff und Nährstoffen versorgen, um apoptotische und nekrotische Gewebssareale bei steigender Organoidgröße zu verhindern. Ferner zielführend erscheint es, den Einfluss mesenchymaler und endothelialer Zellen auf die neuralen Zelltypen noch genauer zu untersuchen. Alle Verbesserungen sollten schlussendlich dazu beitragen, realistische neurale Organoide zu schaffen.

Vaskulogenese bzw. Angiogenese werden durch mehrere Wachstumsfaktoren beeinflusst. Einen großen Einfluss für die endotheliale Kapillarnetzbildung hat hierbei VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor), insbesondere VEGF-A, das von mesenchymalen Zellen sezerniert wird (Bautch, 2012). Das vaskuläre endotheliale Zytokin kann sich an zwei hochaffine Rezeptor-Tyrosinkinasen (VEGFR-1 und VEGFR-2) binden. Vor allem VEGFR-2 (Flk-1) steigert die Proliferation, die Migration und das Bestehen von Endothelzellen (Shalaby et al., 1997). Sowohl der Hämangioblast als auch der Angioblast exprimieren den Flk1

Rezeptor für VEGF (Millauer et al., 1993). Aus diesem Grund würde es eine weitere Verbesserung des Modells darstellen, die mesodermalen Aggregate mit VEGF-A zu behandeln. So könnte eine effizientere Differenzierung der mesodermalen Vorläuferzellen in Endothelzellen erreicht werden.

Wesentlich ist nicht nur die Blutgefäßbildung zu fördern, sondern auch die Blutzellentwicklung zu verstärken. Die spezialisierten Gewebsmakrophagen in den neuralen Organoiden, die aus mesodermalen Blutinseln stammen, könnten durch Zugabe von stimulierenden Zytokinen wie Interleukin 7 (IL7), Stammzellofaktor (SCF), insulinähnlicher Wachstumsfaktor 2 (IGF2) und Fibroblasten-Wachstumsfaktor 2 (FGF2) weiter gesteigert werden (Motazedian et al., 2020).

In Zukunft sollten die Organoiden mittels Immunfluoreszenzanalyse neben Makrophagen auch auf weitere hämatopoietische Zelltypen getestet werden. Für den mesodermalen Anteil des Organoids wäre es darüber hinaus interessant zu wissen, ob Kollagen-I oder Kollagen-IV vorhanden sind. Kollagen-I findet sich generell im Bindegewebe sowie in der vaskulären Adventitia (Farquharson and Robins, 1989). Bei Kollagen-IV handelt es sich um einen Hauptbestandteil der Basalmembran unterhalb der Endothelzellschicht (Steffensen and Rasmussen, 2018). Des Weiteren könnte der mesodermale Anteil auf VE-Cadherin positive Zellen untersucht werden. VE-Cadherin ist eine wichtige Komponente der endothelialen Adhärenzverbindungen (Giannotta et al., 2013). Jedoch wäre es auch nötig, auf CD34 zu färben, um die Entwicklung von Endothelzellen besser verfolgen zu können. CD34 kann als Adhäsionsmolekül sowohl auf Endothelzellen als auch auf hämatopoetischen Vorläuferzellen vorkommen (Fina et al., 1990).

Ferner wäre es interessant, die neuro-mesenchymalen Organoiden in einen Wirtorganismus zu transplantieren. Somit könnten die Funktionalität und die Perfundierbarkeit des bestehenden vaskulären Netzwerkes überprüft werden. Darüber hinaus würde die natürliche mechanische Belastung der Blutgefäße nachgeahmt. Durch den pulsierenden Blutfluss wird Scherstress ausgelöst und es werden zirkumferentielle Wanddehnung erreicht. Diese Ereignisse induzieren eine weitere

Reifung der Gefäßwand (Lu and Kassab, 2011). In von anderen Arbeitsgruppen kürzlich publizierten Ergebnissen zu Blutgefäßorganoiden, konnte bereits ein erfolgreicher Anschluss an einen Wirtsorganismus gezeigt werden (Wimmer et al., 2019a; Wimmer et al., 2019b).

Die Blut-Hirn-Schranke stellt eine wichtige und klinische höchstrelevante Barriere im Gehirn dar. Es wäre bedeutsam, die Ausbildung und Beschaffenheit dieser Barriere in neuralen Organoiden zu untersuchen. Die enge Beziehung, die zwischen Astrozyten und Endothelzellen festgestellt wurde, deutet auf eine mögliche Blut-Hirn-Schrankenbildung hin. Es wäre interessant, ob sich die Endothelzellen des neuralen Organoids wie zerebrale Kapillaren verhalten und eine Barriere bilden. Mittels Elektronenmikroskopie bzw. durch den Nachweis von tight junction Proteinen wie bspw. Occludin, Claudin 5 sowie ZO-1 könnte dies festgestellt werden (Jiao et al., 2011).

## 5 Zusammenfassung

Viele Organotide sind bisher nur stark vereinfachte Modelle der Originalgewebe, da sie nur aus dem Gewebsparenchym bestehen. Um neurale Organotide näher an das Originalgewebe zu bringen, ist ein wichtiger Schritt mesenchymale Anteile zu integrieren. In dieser Arbeit war die wichtige Fragenstellung, ob neurale Organotide sich mit mesodermalen Progenitorzellen zu einem gemeinsamen Gewebe vereinigen lassen.

Um die Generierung von neuro-mesenchymalen Organotiden zu erreichen, wurden geeignete Differenzierungsprotokolle zur Erzeugung neuroepithelialer und mesodermaler Aggregate aus humanen induzierten pluripotenten Stammzellen etabliert. Anschließend wurden die Spharioide vereinigt und eingehend histologisch charakterisiert. Darüber hinaus wurde die Organotidentwicklung unter dem Einfluss von Hypoxie analysiert. Um die Organotide anschaulich mit der tatsächlichen Embryogenese vergleichen zu können, wurden Schnitte von Hühnerembryonen angefertigt. Die neuro-mesenchymalen Organotide wurden insgesamt 280 Tage kultiviert und an verschiedenen Zeitpunkten untersucht.

Die hier präsentierten Daten zeigen, dass die erzeugten neuro-mesenchymalen Organotide viele Aspekte der natürlichen Embryogenese in Zellkultur nachahmen können. So wurde die Ausbildung neuralrohrahnlicher Strukturen, die von einem perineuralen Gefäßplexus umgeben sind, gezeigt. Des Weiteren wurde eine Interaktion von Astrozyten/radiale Gliazellen mit dem entstehenden Gefäßnetz beobachtet. Schließlich zeigten sich das Einwandern von mikrogliaartigen Zellen aus dem mesenchymalen Organotidteil in das Nervengewebe.

Diese Arbeit bildet die Basis für die Generierung neuro-mesenchymaler Organotide als realistisches Modellsystem für die Entwicklung des Nervensystems. Solche Modellsysteme können für die Erforschung von Krankheiten, Toxizitätsstudien sowie Medikamententests verwendet werden.

## 6 Literaturverzeichnis

Alarcon-Martinez, L., Yilmaz-Ozcan, S., Yemisci, M., Schallek, J., Kılıç, K., Can, A., Di Polo, A., and Dalkara, T. (2018). Capillary pericytes express  $\alpha$ -smooth muscle actin, which requires prevention of filamentous-actin depolymerization for detection. *Elife* 7.

Antonchuk, J. (2013). Formation of embryoid bodies from human pluripotent stem cells using AggreWell™ plates. *Methods in molecular biology* (Clifton, NJ) 946, 523-533.

Asai, A., Aihara, E., Watson, C., Mourya, R., Mizuochi, T., Shivakumar, P., Phelan, K., Mayhew, C., Helmrath, M., Takebe, T., *et al.* (2017). Paracrine signals regulate human liver organoid maturation from induced pluripotent stem cells. *Development* (Cambridge, England) 144, 1056-1064.

Bai, H., Xie, Y.L., Gao, Y.X., Cheng, T., and Wang, Z.Z. (2013). The balance of positive and negative effects of TGF- $\beta$  signaling regulates the development of hematopoietic and endothelial progenitors in human pluripotent stem cells. *Stem cells and development* 22, 2765-2776.

Bar, T. (1980). The vascular system of the cerebral cortex. *Adv Anat Embryol Cell Biol* 59, I-VI,1-62.

Barateiro, A., Brites, D., and Fernandes, A. (2016). Oligodendrocyte Development and Myelination in Neurodevelopment: Molecular Mechanisms in Health and Disease. *Current pharmaceutical design* 22, 656-679.

Bautch, V.L. (2012). VEGF-directed blood vessel patterning: from cells to organism. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine* 2, a006452.

Bentivoglio, M., and Mazzarello, P. (1999). The history of radial glia. *Brain research bulletin* 49, 305-315.

Birgersdotter, A., Sandberg, R., and Ernberg, I. (2005). Gene expression perturbation in vitro--a growing case for three-dimensional (3D) culture systems. *Seminars in cancer biology* 15, 405-412.

Bohatschek, M., Kloss, C.U., Kalla, R., and Raivich, G. (2001). In vitro model of microglial deramification: ramified microglia transform into amoeboid phagocytes following addition of brain cell membranes to microglia-astrocyte cocultures. *Journal of neuroscience research* 64, 508-522.

Budday, S., Steinmann, P., and Kuhl, E. (2015). Physical biology of human brain development. *Frontiers in cellular neuroscience* 9, 257.

Bystron, I., Blakemore, C., and Rakic, P. (2008). Development of the human cerebral cortex: Boulder Committee revisited. *Nature reviews Neuroscience* 9, 110-122.

Cakir, B., Xiang, Y., Tanaka, Y., Kural, M.H., Parent, M., Kang, Y.J., Chapeton, K., Patterson, B., Yuan, Y., He, C.S., *et al.* (2019). Engineering of human brain organoids with a functional vascular-like system. *Nat Methods* 16, 1169-1175.

Camp, J.G., Sekine, K., Gerber, T., Loeffler-Wirth, H., Binder, H., Gac, M., Kanton, S., Kageyama, J., Damm, G., Seehofer, D., *et al.* (2017). Multilineage communication regulates human liver bud development from pluripotency. *Nature* 546, 533-538.

Caprioli, A., Minko, K., Drevon, C., Eichmann, A., Dieterlen-Lievre, F., and Jaffredo, T. (2001). Hemangioblast commitment in the avian allantois: cellular and molecular aspects. *Developmental biology* 238, 64-78.

Chailangkarn, T., Trujillo, C.A., Freitas, B.C., Hrvoj-Mihic, B., Herai, R.H., Yu, D.X., Brown, T.T., Marchetto, M.C., Bardy, C., McHenry, L., *et al.* (2016). A human neurodevelopmental model for Williams syndrome. *Nature* 536, 338-343.

Chambers, S.M., Fasano, C.A., Papapetrou, E.P., Tomishima, M., Sadelain, M., and Studer, L. (2009). Highly efficient neural conversion of human ES and iPS cells by dual inhibition of SMAD signaling. *Nat Biotechnol* 27, 275-280.

Cherny, R.A., Stokes, T.M., Merei, J., Lom, L., Brandon, M.R., and Williams, R.L. (1994). Strategies for the isolation and characterization of bovine embryonic stem cells. *Reproduction, fertility, and development* 6, 569-575.

Clevers, H., and Nusse, R. (2012). Wnt/ $\beta$ -catenin signaling and disease. *Cell* 149, 1192-1205.

Cunningham, C.L., Martinez-Cerdeno, V., and Noctor, S.C. (2013). Microglia regulate the number of neural precursor cells in the developing cerebral cortex. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 33, 4216-4233.

Daneman, R., Agalliu, D., Zhou, L., Kuhnert, F., Kuo, C.J., and Barres, B.A. (2009). Wnt/ $\beta$ -catenin signaling is required for CNS, but not non-CNS, angiogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106, 641-646.

Daneman, R., and Prat, A. (2015). The blood-brain barrier. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 7, a020412.

Davies, L.C., Jenkins, S.J., Allen, J.E., and Taylor, P.R. (2013). Tissue-resident macrophages. *Nature immunology* 14, 986-995.

Dye, B.R., Hill, D.R., Ferguson, M.A., Tsai, Y.H., Nagy, M.S., Dyal, R., Wells, J.M., Mayhew, C.N., Nattiv, R., Klein, O.D., *et al.* (2015). In vitro generation of human pluripotent stem cell derived lung organoids. *Elife* 4.

Echelard, Y., Epstein, D.J., St-Jacques, B., Shen, L., Mohler, J., McMahon, J.A., and McMahon, A.P. (1993). Sonic hedgehog, a member of a family of putative signaling molecules, is implicated in the regulation of CNS polarity. *Cell* 75, 1417-1430.

Eckfeldt, C.E., Mendenhall, E.M., and Verfaillie, C.M. (2005). The molecular repertoire of the 'almighty' stem cell. *Nature reviews Molecular cell biology* 6, 726-737.

Elkouris, M., Balaskas, N., Poulou, M., Politis, P.K., Panayiotou, E., Malas, S., Thomaidou, D., and Remboutsika, E. (2011). Sox1 maintains the undifferentiated state of cortical neural progenitor cells via the suppression of Prox1-mediated cell cycle exit and neurogenesis. *Stem cells (Dayton, Ohio)* 29, 89-98.

Esfandiari, F., Fathi, A., Gourabi, H., Kiani, S., Nemati, S., and Baharvand, H. (2012). Glycogen synthase kinase-3 inhibition promotes proliferation and neuronal differentiation of human-induced pluripotent stem cell-derived neural progenitors. *Stem cells and development* 21, 3233-3243.

Evans, M.J., and Kaufman, M.H. (1981). Establishment in Culture of Pluripotential Cells from Mouse Embryos. *Nature* 292, 154-156.

Fagerlund, I., Dougalis, A., Shakirzyanova, A., Gómez-Budía, M., Konttinen, H., Ohtonen, S., Feroze, F., Koskivi, M., Kuusisto, J., Hernández, D., *et al.* (2020). Microglia orchestrate neuronal activity in brain organoids. 2020.2012.2008.416388.

Faial, T., Bernardo, A.S., Mendjan, S., Diamanti, E., Ortmann, D., Gentsch, G.E., Mascetti, V.L., Trotter, M.W., Smith, J.C., and Pedersen, R.A. (2015). Brachyury and SMAD signalling collaboratively orchestrate distinct mesoderm and endoderm gene regulatory networks in differentiating human embryonic stem cells. *Development (Cambridge, England)* 142, 2121-2135.

Faigle, R., and Song, H. (2013). Signaling mechanisms regulating adult neural stem cells and neurogenesis. *Biochimica et biophysica acta* 1830, 2435-2448.

Farquharson, C., and Robins, S.P. (1989). Immunolocalization of collagen types I and III in the arterial wall of the rat. *The Histochemical journal* 21, 172-178.

Fatehullah, A., Tan, S.H., and Barker, N. (2016). Organoids as an in vitro model of human development and disease. *Nature cell biology* 18, 246-254.

Fina, L., Molgaard, H.V., Robertson, D., Bradley, N.J., Monaghan, P., Delia, D., Sutherland, D.R., Baker, M.A., and Greaves, M.F. (1990). Expression of the CD34 gene in vascular endothelial cells. *Blood* 75, 2417-2426.

Foty, R. (2011). A simple hanging drop cell culture protocol for generation of 3D spheroids. *Journal of visualized experiments : JoVE*.

Fujiwara, T., Dehart, D.B., Sulik, K.K., and Hogan, B.L. (2002). Distinct requirements for extra-embryonic and embryonic bone morphogenetic protein 4 in the formation of the node and primitive streak and coordination of left-right asymmetry in the mouse. *Development (Cambridge, England)* 129, 4685-4696.

Giannotta, M., Trani, M., and Dejana, E. (2013). VE-cadherin and endothelial adherens junctions: active guardians of vascular integrity. *Developmental cell* 26, 441-454.

Giles, J.R., Yang, X., Mark, W., and Foote, R.H. (1993). Pluripotency of cultured rabbit inner cell mass cells detected by isozyme analysis and eye pigmentation of fetuses following injection into blastocysts or morulae. *Molecular reproduction and development* 36, 130-138.

Gomez Perdiguero, E., Klapproth, K., Schulz, C., Busch, K., Azzoni, E., Crozet, L., Garner, H., Trouillet, C., de Bruijn, M.F., Geissmann, F., *et al.* (2015). Tissue-resident macrophages originate from yolk-sac-derived erythro-myeloid progenitors. *Nature* 518, 547-551.

Grays, Henry, Lewis, J.A., Warren, C.R., and Harmon (1918). *Anatomy of the human body, The Notochord (Human Anatomy Gray's Anatomy, Philadelphia : Lea & Febiger)*.

Handyside, A., Hooper, M.L., Kaufman, M.H., and Wilmut, I. (1987). Towards the isolation of embryonal stem cell lines from the sheep. *Roux's archives of developmental biology : the official organ of the EDBO* 196, 185-190.

Haubensak, W., Attardo, A., Denk, W., and Huttner, W.B. (2004). Neurons arise in the basal neuroepithelium of the early mammalian telencephalon: a major site

of neurogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *101*, 3196-3201.

Haydar, T.F., Ang, E., Jr., and Rakic, P. (2003). Mitotic spindle rotation and mode of cell division in the developing telencephalon. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *100*, 2890-2895.

Hemmati-Brivanlou, A., Kelly, O.G., and Melton, D.A. (1994). Follistatin, an antagonist of activin, is expressed in the Spemann organizer and displays direct neuralizing activity. *Cell* *77*, 283-295.

Hirschi, K.K., and D'Amore, P.A. (1996). Pericytes in the microvasculature. *Cardiovascular research* *32*, 687-698.

Hogan, K.A., Ambler, C.A., Chapman, D.L., and Bautch, V.L. (2004). The neural tube patterns vessels developmentally using the VEGF signaling pathway. *Development (Cambridge, England)* *131*, 1503-1513.

Huch, M., Knoblich, J.A., Lutolf, M.P., and Martinez-Arias, A. (2017). The hope and the hype of organoid research. *Development (Cambridge, England)* *144*, 938-941.

Iacopetti, P., Michelini, M., Stuckmann, I., Oback, B., Aaku-Saraste, E., and Huttner, W.B. (1999). Expression of the antiproliferative gene TIS21 at the onset of neurogenesis identifies single neuroepithelial cells that switch from proliferative to neuron-generating division. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *96*, 4639-4644.

Inman, G.J., Nicolas, F.J., Callahan, J.F., Harling, J.D., Gaster, L.M., Reith, A.D., Laping, N.J., and Hill, C.S. (2002). SB-431542 is a potent and specific inhibitor of transforming growth factor-beta superfamily type I activin receptor-like kinase (ALK) receptors ALK4, ALK5, and ALK7. *Molecular pharmacology* *62*, 65-74.

Israel, M.A., Yuan, S.H., Bardy, C., Reyna, S.M., Mu, Y., Herrera, C., Hefferan, M.P., Van Gorp, S., Nazor, K.L., Boscolo, F.S., *et al.* (2012). Probing sporadic and familial Alzheimer's disease using induced pluripotent stem cells. *Nature* *482*, 216-220.

Iyer, N.V., Kotch, L.E., Agani, F., Leung, S.W., Laughner, E., Wenger, R.H., Gassmann, M., Gearhart, J.D., Lawler, A.M., Yu, A.Y., *et al.* (1998). Cellular and developmental control of O<sub>2</sub> homeostasis by hypoxia-inducible factor 1 alpha. *Genes Dev* *12*, 149-162.

James, R.G., and Schultheiss, T.M. (2003). Patterning of the avian intermediate mesoderm by lateral plate and axial tissues. *Developmental biology* 253, 109-124.

Janzer, R.C., and Raff, M.C. (1987). Astrocytes induce blood-brain barrier properties in endothelial cells. *Nature* 325, 253-257.

Jiao, H., Wang, Z., Liu, Y., Wang, P., and Xue, Y. (2011). Specific role of tight junction proteins claudin-5, occludin, and ZO-1 of the blood-brain barrier in a focal cerebral ischemic insult. *Journal of molecular neuroscience : MN* 44, 130-139.

Kan, L., Israsena, N., Zhang, Z., Hu, M., Zhao, L.R., Jalali, A., Sahni, V., and Kessler, J.A. (2004). Sox1 acts through multiple independent pathways to promote neurogenesis. *Developmental biology* 269, 580-594.

Keller, R., Shih, J., Sater, A.K., and Moreno, C. (1992). Planar induction of convergence and extension of the neural plate by the organizer of *Xenopus*. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists* 193, 218-234.

Krencik, R., Weick, J.P., Liu, Y., Zhang, Z.J., and Zhang, S.C. (2011). Specification of transplantable astroglial subtypes from human pluripotent stem cells. *Nat Biotechnol* 29, 528-534.

Kriegstein, A., and Alvarez-Buylla, A. (2009). The glial nature of embryonic and adult neural stem cells. *Annual review of neuroscience* 32, 149-184.

Kudoh, T., Wilson, S.W., and Dawid, I.B. (2002). Distinct roles for Fgf, Wnt and retinoic acid in posteriorizing the neural ectoderm. *Development (Cambridge, England)* 129, 4335-4346.

Kwok, C.K., Ueda, Y., Kadari, A., Günther, K., Ergün, S., Heron, A., Schnitzler, A.C., Rook, M., and Edenhofer, F. (2018). Scalable stirred suspension culture for the generation of billions of human induced pluripotent stem cells using single-use bioreactors. *Journal of tissue engineering and regenerative medicine* 12, e1076-e1087.

Lai, K., Kaspar, B.K., Gage, F.H., and Schaffer, D.V. (2003). Sonic hedgehog regulates adult neural progenitor proliferation in vitro and in vivo. *Nature neuroscience* 6, 21-27.

Lammert, E., and Axnick, J. (2012). Vascular lumen formation. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine* 2, a006619.

Lancaster, M.A., and Knoblich, J.A. (2014). Generation of cerebral organoids from human pluripotent stem cells. *Nat Protoc* 9, 2329-2340.

Lancaster, M.A., Renner, M., Martin, C.A., Wenzel, D., Bicknell, L.S., Hurles, M.E., Homfray, T., Penninger, J.M., Jackson, A.P., and Knoblich, J.A. (2013). Cerebral organoids model human brain development and microcephaly. *Nature* 501, 373-379.

Lee, K.J., and Jessell, T.M. (1999). The specification of dorsal cell fates in the vertebrate central nervous system. *Annual review of neuroscience* 22, 261-294.

Leeman, K.T., Pessina, P., Lee, J.H., and Kim, C.F. (2019). Mesenchymal Stem Cells Increase Alveolar Differentiation in Lung Progenitor Organoid Cultures. *Sci Rep* 9, 6479.

Levine, A.J., and Brivanlou, A.H. (2007). Proposal of a model of mammalian neural induction. *Developmental biology* 308, 247-256.

Logan, C.Y., and Nusse, R. (2004). The Wnt signaling pathway in development and disease. *Annual review of cell and developmental biology* 20, 781-810.

Lopez-Atalaya, J.P., Askew, K.E., Sierra, A., and Gomez-Nicola, D. (2018). Development and maintenance of the brain's immune toolkit: Microglia and non-parenchymal brain macrophages. *Developmental neurobiology* 78, 561-579.

Lu, D., and Kassab, G.S. (2011). Role of shear stress and stretch in vascular mechanobiology. *J R Soc Interface* 8, 1379-1385.

Madhu, V., Dighe, A.S., Cui, Q., and Deal, D.N. (2016). Dual Inhibition of Activin/Nodal/TGF- $\beta$  and BMP Signaling Pathways by SB431542 and Dorsomorphin Induces Neuronal Differentiation of Human Adipose Derived Stem Cells. *Stem cells international* 2016, 1035374.

Mansour, A.A., Goncalves, J.T., Bloyd, C.W., Li, H., Fernandes, S., Quang, D., Johnston, S., Parylak, S.L., Jin, X., and Gage, F.H. (2018). An in vivo model of functional and vascularized human brain organoids. *Nat Biotechnol* 36, 432-441.

Marchetto, M.C., Carromeu, C., Acab, A., Yu, D., Yeo, G.W., Mu, Y., Chen, G., Gage, F.H., and Muotri, A.R. (2010). A model for neural development and treatment of Rett syndrome using human induced pluripotent stem cells. *Cell* 143, 527-539.

Martin, G.R. (1981). Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells.

Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 78, 7634-7638.

McCauley, H.A., and Wells, J.M. (2017). Pluripotent stem cell-derived organoids: using principles of developmental biology to grow human tissues in a dish. *Development (Cambridge, England)* 144, 958-962.

Mekala, S.R., Wörsdörfer, P., Bauer, J., Stoll, O., Wagner, N., Reeh, L., Loew, K., Eckner, G., Kwok, C.K., Wischmeyer, E., *et al.* (2018). Generation of Cardiomyocytes From Vascular Adventitia-Resident Stem Cells. *Circulation research* 123, 686-699.

Millauer, B., Witzmann-Voos, S., Schnurch, H., Martinez, R., Moller, N.P., Risau, W., and Ullrich, A. (1993). High affinity VEGF binding and developmental expression suggest Flk-1 as a major regulator of vasculogenesis and angiogenesis. *Cell* 72, 835-846.

Mission, J.P., Takahashi, T., and Caviness, V.S., Jr. (1991). Ontogeny of radial and other astroglial cells in murine cerebral cortex. *Glia* 4, 138-148.

Motazedian, A., Bruveris, F.F., Kumar, S.V., Schiesser, J.V., Chen, T., Ng, E.S., Chidgey, A.P., Wells, C.A., Elefanty, A.G., and Stanley, E.G. (2020). Multipotent RAG1+ progenitors emerge directly from haemogenic endothelium in human pluripotent stem cell-derived haematopoietic organoids. *Nature cell biology* 22, 60-73.

Newman, P.J., Berndt, M.C., Gorski, J., White, G.C., 2nd, Lyman, S., Paddock, C., and Muller, W.A. (1990). PECAM-1 (CD31) cloning and relation to adhesion molecules of the immunoglobulin gene superfamily. *Science (New York, NY)* 247, 1219-1222.

Nguyen, P.D., Hollway, G.E., Sonntag, C., Miles, L.B., Hall, T.E., Berger, S., Fernandez, K.J., Gurevich, D.B., Cole, N.J., Alaei, S., *et al.* (2014). Haematopoietic stem cell induction by somite-derived endothelial cells controlled by meox1. *Nature* 512, 314-318.

Noctor, S.C., Martinez-Cerdeno, V., Ivic, L., and Kriegstein, A.R. (2004). Cortical neurons arise in symmetric and asymmetric division zones and migrate through specific phases. *Nature neuroscience* 7, 136-144.

Noctor, S.C., Martinez-Cerdeno, V., and Kriegstein, A.R. (2007). Contribution of intermediate progenitor cells to cortical histogenesis. *Archives of neurology* 64, 639-642.

Nolan, D.J., Ciarrocchi, A., Mellick, A.S., Jaggi, J.S., Bambino, K., Gupta, S., Heikamp, E., McDevitt, M.R., Scheinberg, D.A., Benezra, R., *et al.* (2007). Bone marrow-derived endothelial progenitor cells are a major determinant of nascent tumor neovascularization. *Genes Dev* 21, 1546-1558.

Park, I.H., Arora, N., Huo, H., Maherali, N., Ahfeldt, T., Shimamura, A., Lensch, M.W., Cowan, C., Hochedlinger, K., and Daley, G.Q. (2008). Disease-specific induced pluripotent stem cells. *Cell* 134, 877-886.

Pasca, A.M., Sloan, S.A., Clarke, L.E., Tian, Y., Makinson, C.D., Huber, N., Kim, C.H., Park, J.Y., O'Rourke, N.A., Nguyen, K.D., *et al.* (2015). Functional cortical neurons and astrocytes from human pluripotent stem cells in 3D culture. *Nat Methods* 12, 671-678.

Patsch, C., Challet-Meylan, L., Thoma, E.C., Urich, E., Heckel, T., O'Sullivan, J.F., Grainger, S.J., Kapp, F.G., Sun, L., Christensen, K., *et al.* (2015). Generation of vascular endothelial and smooth muscle cells from human pluripotent stem cells. *Nature cell biology* 17, 994-1003.

Pepper, M.S. (1997). Transforming growth factor-beta: vasculogenesis, angiogenesis, and vessel wall integrity. *Cytokine & growth factor reviews* 8, 21-43.

Pevny, L.H., Sockanathan, S., Placzek, M., and Lovell-Badge, R. (1998). A role for SOX1 in neural determination. *Development (Cambridge, England)* 125, 1967-1978.

Pham, M.T., Pollock, K.M., Rose, M.D., Cary, W.A., Stewart, H.R., Zhou, P., Nolte, J.A., and Waldau, B. (2018). Generation of human vascularized brain organoids. *Neuroreport* 29, 588-593.

Pontious, A., Kowalczyk, T., Englund, C., and Hevner, R.F. (2008). Role of intermediate progenitor cells in cerebral cortex development. *Developmental neuroscience* 30, 24-32.

Prinz, M., Erny, D., and Hagemeyer, N. (2017). Ontogeny and homeostasis of CNS myeloid cells. *Nature immunology* 18, 385-392.

Ramirez-Bergeron, D.L., Runge, A., Dahl, K.D., Fehling, H.J., Keller, G., and Simon, M.C. (2004). Hypoxia affects mesoderm and enhances hemangioblast specification during early development. *Development (Cambridge, England)* 131, 4623-4634.

Raposo, G., and Stoorvogel, W. (2013). Extracellular vesicles: exosomes, microvesicles, and friends. *The Journal of cell biology* 200, 373-383.

Reemst, K., Noctor, S.C., Lucassen, P.J., and Hol, E.M. (2016). The Indispensable Roles of Microglia and Astrocytes during Brain Development. *Frontiers in human neuroscience* 10, 566.

Reinhardt, P., Glatza, M., Hemmer, K., Tsytsyura, Y., Thiel, C.S., Höing, S., Moritz, S., Parga, J.A., Wagner, L., Bruder, J.M., *et al.* (2013). Derivation and expansion using only small molecules of human neural progenitors for neurodegenerative disease modeling. *PloS one* 8, e59252.

Rezaie, P., and Male, D. (1999). Colonisation of the developing human brain and spinal cord by microglia: a review. *Microscopy research and technique* 45, 359-382.

Rimkus, T.K., Carpenter, R.L., Qasem, S., Chan, M., and Lo, H.W. (2016). Targeting the Sonic Hedgehog Signaling Pathway: Review of Smoothed and GLI Inhibitors. *Cancers* 8.

Risau, W. (1986). Developing brain produces an angiogenesis factor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 83, 3855-3859.

Risau, W. (1997). Mechanisms of angiogenesis. *Nature* 386, 671-674.

Risau, W., and Flamme, I. (1995). Vasculogenesis. *Annual review of cell and developmental biology* 11, 73-91.

Risau, W., Sariola, H., Zerwes, H.G., Sasse, J., Ekblom, P., Kemler, R., and Doetschman, T. (1988). Vasculogenesis and angiogenesis in embryonic-stem-cell-derived embryoid bodies. *Development (Cambridge, England)* 102, 471-478.

Sasai, Y., Lu, B., Steinbeisser, H., Geissert, D., Gont, L.K., and De Robertis, E.M. (1994). *Xenopus* chordin: a novel dorsalizing factor activated by organizer-specific homeobox genes. *Cell* 79, 779-790.

Sato, N., Meijer, L., Skaltsounis, L., Greengard, P., and Brivanlou, A.H. (2004). Maintenance of pluripotency in human and mouse embryonic stem cells through activation of Wnt signaling by a pharmacological GSK-3-specific inhibitor. *Nat Med* 10, 55-63.

Shahbazi, M.N. (2020). Mechanisms of human embryo development: from cell fate to tissue shape and back. *Development (Cambridge, England)* 147.

Shalaby, F., Ho, J., Stanford, W.L., Fischer, K.D., Schuh, A.C., Schwartz, L., Bernstein, A., and Rossant, J. (1997). A requirement for Flk1 in primitive and definitive hematopoiesis and vasculogenesis. *Cell* 89, 981-990.

Shen, Q., Goderie, S.K., Jin, L., Karanth, N., Sun, Y., Abramova, N., Vincent, P., Pumiglia, K., and Temple, S. (2004). Endothelial cells stimulate self-renewal and expand neurogenesis of neural stem cells. *Science (New York, NY)* 304, 1338-1340.

Sidman, R.L., and Rakic, P. (1973). Neuronal migration, with special reference to developing human brain: a review. *Brain research* 62, 1-35.

Simões-Costa, M., and Bronner, M.E. (2015). Establishing neural crest identity: a gene regulatory recipe. *Development (Cambridge, England)* 142, 242-257.

Sinha, S., and Chen, J.K. (2006). Purmorphamine activates the Hedgehog pathway by targeting Smoothened. *Nature chemical biology* 2, 29-30.

Siqueira, M., Francis, D., Gisbert, D., Gomes, F.C.A., and Stipursky, J. (2018). Radial Glia Cells Control Angiogenesis in the Developing Cerebral Cortex Through TGF- $\beta$ 1 Signaling. *Molecular neurobiology* 55, 3660-3675.

Sloan, S.A., Darmanis, S., Huber, N., Khan, T.A., Birey, F., Caneda, C., Reimer, R., Quake, S.R., Barres, B.A., and Pasca, S.P. (2017). Human Astrocyte Maturation Captured in 3D Cerebral Cortical Spheroids Derived from Pluripotent Stem Cells. *Neuron* 95, 779-790.e776.

Smith, J.L., and Schoenwolf, G.C. (1989). Notochordal induction of cell wedging in the chick neural plate and its role in neural tube formation. *The Journal of experimental zoology* 250, 49-62.

Smith, J.L., and Schoenwolf, G.C. (1997). Neurulation: coming to closure. *Trends in neurosciences* 20, 510-517.

Smith, W.C., and Harland, R.M. (1992). Expression cloning of noggin, a new dorsalizing factor localized to the Spemann organizer in *Xenopus* embryos. *Cell* 70, 829-840.

Sowa, G. (2012). Caveolae, caveolins, cavins, and endothelial cell function: new insights. *Frontiers in physiology* 2, 120.

Spence, J.R., Mayhew, C.N., Rankin, S.A., Kuhar, M.F., Vallance, J.E., Tolle, K., Hoskins, E.E., Kalinichenko, V.V., Wells, S.I., Zorn, A.M., *et al.* (2011). Directed differentiation of human pluripotent stem cells into intestinal tissue in vitro. *Nature* 470, 105-109.

- Stadtfeld, M., and Hochedlinger, K. (2010). Induced pluripotency: history, mechanisms, and applications. *Genes Dev* 24, 2239-2263.
- Staerk, J., Dawlaty, M.M., Gao, Q., Maetzel, D., Hanna, J., Sommer, C.A., Mostoslavsky, G., and Jaenisch, R. (2010). Reprogramming of human peripheral blood cells to induced pluripotent stem cells. *Cell stem cell* 7, 20-24.
- Steffensen, L.B., and Rasmussen, L.M. (2018). A role for collagen type IV in cardiovascular disease? *American journal of physiology Heart and circulatory physiology* 315, H610-h625.
- Stenman, J.M., Rajagopal, J., Carroll, T.J., Ishibashi, M., McMahon, J., and McMahon, A.P. (2008). Canonical Wnt signaling regulates organ-specific assembly and differentiation of CNS vasculature. *Science (New York, NY)* 322, 1247-1250.
- Sternecker, J.L., Reinhardt, P., and Scholer, H.R. (2014). Investigating human disease using stem cell models. *Nat Rev Genet* 15, 625-639.
- Stremmel, C., Schuchert, R., Wagner, F., Thaler, R., Weinberger, T., Pick, R., Mass, E., Ishikawa-Ankerhold, H.C., Margraf, A., Hutter, S., *et al.* (2018). Yolk sac macrophage progenitors traffic to the embryo during defined stages of development. *Nat Commun* 9, 75.
- Suter, D.M., Tirefort, D., Julien, S., and Krause, K.H. (2009). A Sox1 to Pax6 switch drives neuroectoderm to radial glia progression during differentiation of mouse embryonic stem cells. *Stem cells (Dayton, Ohio)* 27, 49-58.
- Takahashi, K., Tanabe, K., Ohnuki, M., Narita, M., Ichisaka, T., Tomoda, K., and Yamanaka, S. (2007). Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* 131, 861-872.
- Takahashi, K., and Yamanaka, S. (2006). Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 126, 663-676.
- Takasato, M., Er, P.X., Chiu, H.S., Maier, B., Baillie, G.J., Ferguson, C., Parton, R.G., Wolvetang, E.J., Roost, M.S., Lopes, S.M., *et al.* (2016). Kidney organoids from human iPS cells contain multiple lineages and model human nephrogenesis. *Nature* 536, 238.
- Takebe, T., Sekine, K., Enomura, M., Koike, H., Kimura, M., Ogaeri, T., Zhang, R.R., Ueno, Y., Zheng, Y.W., Koike, N., *et al.* (2013). Vascularized and functional human liver from an iPSC-derived organ bud transplant. *Nature* 499, 481-484.

Tam, P.P., and Loebel, D.A. (2007). Gene function in mouse embryogenesis: get set for gastrulation. *Nat Rev Genet* 8, 368-381.

Tani, S., Chung, U.I., Ohba, S., and Hojo, H. (2020). Understanding paraxial mesoderm development and sclerotome specification for skeletal repair. *Experimental & molecular medicine* 52, 1166-1177.

Tao, Y., and Zhang, S.C. (2016). Neural Subtype Specification from Human Pluripotent Stem Cells. *Cell stem cell* 19, 573-586.

Teillet, M.-A., Lapointe, F., and Le Douarin, N.M. (1998). The relationships between notochord and floor plate in vertebrate development revisited. *95*, 11733-11738.

Thomson, J.A., Itskovitz-Eldor, J., Shapiro, S.S., Waknitz, M.A., Swiergiel, J.J., Marshall, V.S., and Jones, J.M. (1998). Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science (New York, NY)* 282, 1145-1147.

Tian, A., Muffat, J., and Li, Y. (2020). Studying Human Neurodevelopment and Diseases Using 3D Brain Organoids. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 40, 1186-1193.

Till, J.E., and McCulloch, E.A. (1980). Hemopoietic stem cell differentiation. *Biochimica et biophysica acta* 605, 431-459.

Tsai, A.C., Liu, Y., Yuan, X., and Ma, T. (2015). Compaction, fusion, and functional activation of three-dimensional human mesenchymal stem cell aggregate. *Tissue engineering Part A* 21, 1705-1719.

Tsuji-Tamura, K., and Ogawa, M. (2018). Morphology regulation in vascular endothelial cells. *Inflammation and regeneration* 38, 25.

van de Wetering, M., Francies, H.E., Francis, J.M., Bounova, G., Iorio, F., Pronk, A., van Houdt, W., van Gorp, J., Taylor-Weiner, A., Kester, L., *et al.* (2015). Prospective derivation of a living organoid biobank of colorectal cancer patients. *Cell* 161, 933-945.

Weissman, I.L. (2000). Stem cells: units of development, units of regeneration, and units in evolution. *Cell* 100, 157-168.

Wilkinson, D.G., Bhatt, S., and Herrmann, B.G. (1990). Expression pattern of the mouse T gene and its role in mesoderm formation. *Nature* 343, 657-659.

Wilm, B., James, R.G., Schultheiss, T.M., and Hogan, B.L. (2004). The forkhead genes, *Foxc1* and *Foxc2*, regulate paraxial versus intermediate mesoderm cell fate. *Developmental biology* 271, 176-189.

Wimmer, R.A., Leopoldi, A., Aichinger, M., Kerjaschki, D., and Penninger, J.M. (2019a). Generation of blood vessel organoids from human pluripotent stem cells. *Nature Protocols* 14, 3082-3100.

Wimmer, R.A., Leopoldi, A., Aichinger, M., Wick, N., Hantusch, B., Novatchkova, M., Taubenschmid, J., Hammerle, M., Esk, C., Bagley, J.A., *et al.* (2019b). Human blood vessel organoids as a model of diabetic vasculopathy. *Nature* 565, 505-510.

Winnier, G., Blessing, M., Labosky, P.A., and Hogan, B.L. (1995). Bone morphogenetic protein-4 is required for mesoderm formation and patterning in the mouse. *Genes Dev* 9, 2105-2116.

Wörsdörfer, P., Mekala, S.R., Bauer, J., Edenhofer, F., Kuerten, S., and Ergün, S. (2017). The vascular adventitia: An endogenous, omnipresent source of stem cells in the body. *Pharmacology & therapeutics* 171, 13-29.

Wu, S.M., and Hochedlinger, K. (2011). Harnessing the potential of induced pluripotent stem cells for regenerative medicine. *Nature cell biology* 13, 497-505.

Wurst, W., and Bally-Cuif, L. (2001). Neural plate patterning: upstream and downstream of the isthmus organizer. *Nature reviews Neuroscience* 2, 99-108.

Wynn, T.A., Chawla, A., and Pollard, J.W. (2013). Macrophage biology in development, homeostasis and disease. *Nature* 496, 445-455.

Yin, X., Mead, B.E., Safaee, H., Langer, R., Karp, J.M., and Levy, O. (2016). Engineering Stem Cell Organoids. *Cell stem cell* 18, 25-38.

Yoo, Y.D., Huang, C.T., Zhang, X., Lavaute, T.M., and Zhang, S.C. (2011). Fibroblast growth factor regulates human neuroectoderm specification through ERK1/2-PARP-1 pathway. *Stem cells (Dayton, Ohio)* 29, 1975-1982.

Yu, P.B., Hong, C.C., Sachidanandan, C., Babitt, J.L., Deng, D.Y., Hoynig, S.A., Lin, H.Y., Bloch, K.D., and Peterson, R.T. (2008). Dorsomorphin inhibits BMP signals required for embryogenesis and iron metabolism. *Nature chemical biology* 4, 33-41.

Zechner, D., Fujita, Y., Hulsken, J., Muller, T., Walther, I., Taketo, M.M., Crenshaw, E.B., 3rd, Birchmeier, W., and Birchmeier, C. (2003). beta-Catenin

signals regulate cell growth and the balance between progenitor cell expansion and differentiation in the nervous system. *Developmental biology* 258, 406-418.

Zhang, X., Huang, C.T., Chen, J., Pankratz, M.T., Xi, J., Li, J., Yang, Y., Lavaute, T.M., Li, X.J., Ayala, M., *et al.* (2010). Pax6 is a human neuroectoderm cell fate determinant. *Cell stem cell* 7, 90-100.

Zhou, T., Benda, C., Duzinger, S., Huang, Y., Li, X., Li, Y., Guo, X., Cao, G., Chen, S., Hao, L., *et al.* (2011). Generation of induced pluripotent stem cells from urine. *J Am Soc Nephrol* 22, 1221-1228.

## I Abkürzungen

%	Prozent
°C	Grad Celsius
μ	Mikro
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
μm	Mikrometer
μM	Mikromolar
3D	dreidimensional
ALK	activin receptor-like kinase
A-P	anterior-posterior
APS	Ammoniumpersulfat
BMP	Bone morphogenetic protein
BSA	Bovines Serumalbumin
bspw.	beispielsweise
CD31 cluster of differentiation	Thrombozyten-Endothelzellen-Adhäsionsmolekül
CHIR	CHIR99021
cm <sup>2</sup>	Quadratzentimeter
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
Cy	Cyanine Dyes
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole
dH <sub>2</sub> O	demineralisiertes Wasser
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
D-V	dorsal-ventral
ECL	Enhanced Chemiluminescence
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EtOH	Ethanol
EZ	Endothelzellen
FACs	Fluorescence Activated Cell Sorting

FCS	Fetales Kälberserum
FGF	Fibroblast Growth Factor
FLK1	Fetal Liver Kinase 1
g	Gramm
GFAP	saures Gliafaserprotein
Gli	Gliom-assoziierten
GSK3	Glykogensynthase-Kinase 3
h	Stunde
H <sub>2</sub> O	Wasser
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
HCl	Salzsäure
HE	Hämatoxylin-Eosin
hES	humane embryonale Stammzellen
hFSiPS-Zellen	Humane Foreskin iPS
hiPS-Zellen	Humane iPS
IBA1	Ionisiertes Calcium-bindendes Adaptermolekül 1
iPS-Zellen	Induzierte pluripotente Stammzellen
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilodalton
L	Liter
M	Molar
mA	Milliampere
MAP2	Mikrotubuli-assoziierte Proteine
MeOH	Methanol
MG	Matrigel
mg	Milligramm
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid
MI-Medium	mesodermales Induktionsmedium
min	Minute
Mio	Millionen
ml	Milliliter

mM	Millimolar
n	nano
NaCl	Natriumchlorid
NaIO <sub>3</sub>	Natriumiodat
ND-Medium	neurales Differenzierungsmedium
ng	Nanogramm
NI-Medium	neurales Induktionmedium
nm	Nanometer
O <sub>2</sub>	Sauerstoff
PAGE	Polyacrylamide-Gelelektrophorese
PAX	Paired-Box-Protein-6
PB	Sodium Phosphate buffer
PBS	Phosphate buffered saline
PE	Phycoerythrin
Pen/Strep	Penicillin/Streptomycin
PFA	Paraformaldehyde
pH	Potentia Hydrogenii
PMA	Purmorphamine
RA	Retinsäure
RI	Rho-associated protein kinase inhibitor Y-27632
ROCK	Rho-associated protein kinase
rpm	Umdrehung pro Minute
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
SB	SB431542
SDS	Natriumdodecylsulfat
SHH	Sonic Hedgehog
SMAD-Proteine	Small mothers against decapentaplegic-Proteine
SOX	SRY-Box Transkription Faktor 1
SPF	Spezifisch-Pathogen-Frei

TBST	Tris buffered saline with Tween-20
TEM	Transmissionselektronenmikroskop
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TGF- $\beta$	Transforming Growth Factor beta
Tris	tris(hydroxymethyl)aminomethane
TUJ1	Neuron-spezifisches Beta-Tubulin Klasse III
UV	ultraviolett
V	Volt
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
WNT	Wingless verbunden mit MMTV
ZNS	Zentrales Nervensystem
$\alpha$ -SMA	Alpha-Aktin der glatten Muskulatur

## II Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Stammzellen in vivo und in vitro .....	2
Abbildung 2: Überblick stammzellbasierte Krankheitsmodellierungen .....	4
Abbildung 3: Schematischer Überblick zur neuronalen Entwicklung .....	8
Abbildung 4: Die Neuralleiste (Querschnitt).....	9
Abbildung 5: Schematischer Überblick der Prinzipien der Musterbildung im Neuralrohr.....	11
Abbildung 6: Neurogenese der kortikalen Entwicklung .....	13
Abbildung 7: TGF- $\beta$ Rezeptor.....	16
Abbildung 8: Überblick der mesodermalen Strukturen .....	19
Abbildung 9: Schematisches Modell der frühen Gefäßentwicklung .....	20
Abbildung 10: WNT Signalweg .....	22
Abbildung 11: Protokoll für die Herstellung von iPS-Zellaggregaten, die Induktion in neurale und mesodermale Vorläuferzell- Aggregate und die Ko-Kultivierung der Aggregate.....	49
Abbildung 12: Schematische Darstellung der Erzeugung neuroepithelialer und mesodermaler Aggregate aus iPS-Zellen .....	59
Abbildung 13: Aggregate aus iPS-Zellen sowie mesodermal und neural- induzierte Aggregate am Tag 9 in Kultur .....	60
Abbildung 14: Immunhistochemische Analyse der induzierten Aggregate mit spezifischen Antikörpern gegen Brachyury und SOX1. ....	61
Abbildung 15: Durchflusszytometrische Untersuchungen zur Detektion von Brachyury und SOX1 am Tag 9 .....	63
Abbildung 16: Western Blot Analyse der mesodermalen und neuronalen Aggregate am Tag 9 .....	65
Abbildung 17: Kokultur der mesodermal und neural vordifferenzierten Zellaggregate.....	67
Abbildung 18: Zusammenwachsen mesodermaler/neuraler Zellaggregate.....	68
Abbildung 19: Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus zur Verbesserung der Vas-kularisierung der neuro- mesenchymalen Sphäroide unter hypoxischen Bedingungen. ....	69

Abbildung 20: Untersuchung zum Einfluss von Hypoxie auf die Vaskularisierung der neuro-mesenchymalen Sphäroide.....	70
Abbildung 21: Darstellung des Neuralrohres eines Hühnerembryos nach 4 Tagen.....	72
Abbildung 22: Neuralrohr und perineuraler Plexus eines Hühnerembryos an Tag 4 der Entwicklung.....	73
Abbildung 23: Vergleich humaner neuro-mesenchymaler Organoiden mit dem sich entwickelnden Gehirn im Hühnerembryo .....	74
Abbildung 24: Überprüfung der Lokalisation der CD31 positiven Zellen .....	76
Abbildung 25: Doppelfärbung der neuro-mesenchymalen Organoiden in Paraffinschnitten mit Immunfluoreszenz zur Charakterisierung des Neuroepithels .....	77
Abbildung 26: Fluoreszenzanalyse auf Vaskularisierungsentwicklung .....	78
Abbildung 27: Nachweis Mikroglia im neuronalen Anteil der neuro-mesenchymalen Organoiden.....	79
Abbildung 28: Doppelfärbung von neuro-mesenchymalen Organoiden mit spezifischen Antikörpern für radiale Gliazellen/Astrozyten am Tag 220.....	81
Abbildung 29: Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen von neuro-mesenchym Organoiden .....	83

Abbildung 1, 7, 12 besteht aus grafischen Elementen der Bilddatenbank Servier Medical Art (<https://smart.servier.com/>), die unter einer Creative Commons Attribution 3.0 Unported License (<https://creativecommons.org/licenses/by/3.0/>) lizenziert sind.

Die Abbildungen 2 ,3 sind aus den angegebenen Quellen entnommen, mit freundlicher Genehmigung von Springer Nature und Elsevier.

Die Abbildungen 4,18 ist aus den angegebenen Quellen entnommen, mit freundlicher Genehmigung von The Company of Biologists Ltd.

Die Abbildung 6,10 sind aus den angegebenen Quellen entnommen, mit freundlicher Genehmigung von Annual Reviews, Inc.

Die Abbildungen 9 ist aus den angegebenen Quellen entnommen und keine Genehmigung erforderlich. (Open-Access-Artikel)

Die Abbildungen 21, 23 sind aus den angegebenen Quellen entnommen, mit freundlicher Genehmigung von PNAS.

Die Abbildung 8 ist in seinem Herkunftsland, als auch Deutschland lizenzfrei. Das Urheberrecht ist auf die Lebensdauer des Autors und weitere 70 Jahre beschränkt.

### III Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: PBS-Puffer 7,4 pH.....	31
Tabelle 2: Matrigel-Haftlösung .....	31
Tabelle 3: Einfriermedium .....	31
Tabelle 4: MACS-Medium.....	31
Tabelle 5: NI-Medium 1 .....	32
Tabelle 6: NI-Medium 2 .....	32
Tabelle 7: ND-Medium.....	33
Tabelle 8: MI-Medium .....	33
Tabelle 9: PFA-Lösung (4 %).....	34
Tabelle 10: Citratpuffer (Demaskierung IF) pH 6,0 .....	34
Tabelle 11: Blockinglösung .....	34
Tabelle 12: Mowiol.....	35
Tabelle 13: H.-E.-Färbung .....	35
Tabelle 14: Blockinglösung .....	36
Tabelle 15: Inkubationslösung .....	36
Tabelle 16: Bradford-Lösung .....	36
Tabelle 17: Lämmli-Ladepuffer 5x .....	36
Tabelle 18: Trenngelpuffer .....	36
Tabelle 19: Sammelgelpuffer .....	37
Tabelle 20: 5x Laufpuffer .....	37
Tabelle 21: 10x TBST .....	37
Tabelle 22: Transferpuffer für Western Blot .....	37
Tabelle 23: Ponceau Färbelösung .....	37
Tabelle 24: ECL1 .....	38
Tabelle 25: ECL2 .....	38
Tabelle 26: Penetration Puffer .....	39
Tabelle 27: Blocking Puffer .....	39
Tabelle 28: Washing Puffer.....	39
Tabelle 29: Antibody Puffer .....	39
Tabelle 30: Staining Puffer 5 % NDS .....	39
Tabelle 31: Primärantikörper.....	40

Tabelle 32: Sekundärantikörper.....	41
Tabelle 33: konjugierte Antikörper .....	42
Tabelle 34: Entparaffinierung und Rehydrierung .....	51
Tabelle 35: HE-Färbung .....	52
Tabelle 36: Trenngel .....	54
Tabelle 37: Sammelgel .....	54

## **IV Danksagung**

## **V Lebenslauf**

## VI Publikationen

Wörsdörfer P, Dalda N, **Kern A**, et al. Generation of complex human organoid models including vascular networks by incorporation of mesodermal progenitor cells. *Sci Rep.* 2019;9(1):15663. Published 2019 Oct 30. doi:10.1038/s41598-019-52204-7

Wörsdörfer P, Rockel A, Alt Y, **Kern A**, Ergün S. Generation of Vascularized Neural Organoids by Co-culturing with Mesodermal Progenitor Cells. *STAR Protoc.* 2020;1(1):100041. Published 2020 Jun 3. doi:10.1016/j.xpro.2020.100041