

# **Ein humanes 3D Kokultursystem mit Neuronen und Mikrogliazellen zur in vitro Modellierung von Morbus Alzheimer**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

der Hohen Medizinischen Fakultät

der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität

Bonn

**Viola Isabella Kamin**

aus Mainz

2023

Angefertigt mit der Genehmigung  
der Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: Prof. Dr. med. Oliver Brüstle
2. Gutachter: Prof. Dr. Christian Steinhäuser

Tag der Mündlichen Prüfung: 16.08.2023

Aus dem Institut für Rekonstruktive Neurobiologie

Direktor: Prof. Dr. med. Oliver Brüstle

Gewidmet meiner Familie und meinem Freund



## Inhaltsverzeichnis

### Abkürzungsverzeichnis

|           |                                                                                                             |    |
|-----------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>1.</b> | <b>Einleitung</b>                                                                                           | 12 |
| 1.1       | Die Alzheimersche Erkrankung                                                                                | 12 |
| 1.1.1     | Die Amyloid-Kaskaden-Hypothese                                                                              | 13 |
| 1.2       | Neuroinflammation und die Rollen von humanen Mikrogliazellen und Astrozyten                                 | 14 |
| 1.3       | Induzierte pluripotente Stammzellen in der Krankheitsmodellierung                                           | 16 |
| 1.4       | Komplexe 3D Modelle der Alzheimererkrankung                                                                 | 17 |
| 1.5       | Vorarbeiten zur Etablierung eines humanen 3D Kokultursystems zur in vitro Modellierung von Morbus Alzheimer | 19 |
| 1.5.1     | Etablierung eines humanen von iPSZ abgeleiteten 3D Kultursystems                                            | 19 |
| 1.5.2     | Generierung von humanen Mikrogliazellen                                                                     | 22 |
| 1.6       | Zielsetzung der Arbeit                                                                                      | 24 |
| <b>2.</b> | <b>Material und Methoden</b>                                                                                | 26 |
| 2.1       | Material                                                                                                    | 26 |
| 2.1.1     | Technische Geräte                                                                                           | 26 |
| 2.1.2     | Zellkulturmaterial                                                                                          | 28 |
| 2.1.3     | Chemikalien und Zellkultur-Agenzien                                                                         | 29 |
| 2.1.4     | Antikörper                                                                                                  | 31 |
| 2.1.5     | Zellkulturmedien und -reagenzien                                                                            | 33 |
| 2.1.6     | Software                                                                                                    | 35 |
| 2.2       | Methoden                                                                                                    | 35 |
| 2.2.1     | iPSZ-abgeleitete neuronale Zellkultur                                                                       | 35 |
| 2.2.2     | It-NES Kultivierung                                                                                         | 36 |

|           |                                                                                                                 |           |
|-----------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 2.2.3     | Herstellung von human induzierten pluripotenten stammzellabgeleiteten Mikrogliazellen (iPSdMiG)                 | 37        |
| 2.2.4     | Virtuelle Karyotypisierung mittels SNP-Arraydaten                                                               | 38        |
| 2.2.5     | Anlage der 3D Kultur                                                                                            | 38        |
| 2.2.6     | Anlage der Geltrex-3D Kontrollkultur und Neuronen-Mikrogliazellen Kokultur                                      | 39        |
| 2.2.7     | Immunhistochemie                                                                                                | 40        |
| 2.2.8     | Mikroskopie                                                                                                     | 41        |
| 2.2.9     | Bildverarbeitung und -analyse                                                                                   | 42        |
| 2.2.10    | Protein- und Zytokinanalyse mit Meso Scale Diagnostics (MSD)                                                    | 42        |
| 2.2.11    | Durchflusszytometrie                                                                                            | 43        |
| 2.2.12    | Statistische Analyseverfahren                                                                                   | 44        |
| <b>3.</b> | <b>Ergebnisse</b>                                                                                               | <b>45</b> |
| 3.1       | Validierung des 3D Matrixmodells für AD: FAD-Transgenexpression führt zur Bildung von 6E10-positiven Aggregaten | 45        |
| 3.1.1     | Induktion der FAD-Transgene erhöht die Sekretion von A $\beta$ 38/40/42 sowie den A $\beta$ 42/40 Quotienten    | 47        |
| 3.1.2     | Transgeninduktion verstärkt cCaspase-3 Aktivierung in neuronalen 3D Matrixkulturen                              | 50        |
| 3.1.3     | Transgeninduktion führt zu verstärkter GFAP Expression                                                          | 50        |
| 3.2       | Implementierung und Validierung der iPSdMiG Kontroll- und Kokulturen                                            | 52        |
| 3.2.1     | Mikrogliazellen überleben und integrieren sich in der 3D Matrixkultur                                           | 54        |
| 3.2.2     | Mikrogliazellen nehmen apoptotische Zellen im Kokultursystem auf                                                | 56        |
| 3.2.3     | Mikrogliazellen umgeben und phagozytieren 6E10-positive Aggregate                                               | 58        |
| 3.2.4     | Mikrogliazellen verringern die A $\beta$ 42/40 Ratio in 3D Kokulturen                                           | 60        |
| 3.2.5     | iPSdMiG zeigen in induzierten AD-Kokulturen verstärkt eine amöboide Morphologie                                 | 62        |

|            |                                                                                                                         |            |
|------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| 3.2.6      | imAP-Zellen weisen in Mikroglia-Kokultur in Anwesenheit von Doxycylin weniger TUBB3+ Partikel auf                       | 63         |
| 3.2.7      | Humane Mikrogliazellen zeigen in 3D Kokulturen eine verringerte Expression typischer Oberflächenmarker                  | 65         |
| 3.2.8      | iPSdMiG zeigen in induzierten Kokulturen unter LPS-Stimulation eine reduzierte Zytokinsekretion                         | 69         |
| <b>4.</b>  | <b>Diskussion</b>                                                                                                       | <b>74</b>  |
| 4.1        | Erhöhte Amyloid $\beta$ Sezernierung führt zur Aggregatbildung im vorliegenden 3D AD Matrixmodell                       | 74         |
| 4.2        | Dox-induzierte Kulturen zeigen Anzeichen einer verstärkten Astrogliose                                                  | 75         |
| 4.3        | Erfolgreiche Integration der iPSdMiG in das 3D Matrixmodell                                                             | 76         |
| 4.4        | Kolokalisationsanalysen weisen im 3D AD Kokultursystem auf phagozytotische Aktivität der Mikrogliazellen hin            | 77         |
| 4.5        | iPSdMiG und Neurone zeigen morphologische Veränderungen in Anwesenheit der A $\beta$ -Pathologie                        | 80         |
| 4.6        | Kokultivierte iPSdMiG weisen an ihrer Zelloberfläche ein vermindertes Niveau der Rezeptoren CD11B, CX3CR1 und TREM2 auf | 83         |
| 4.7        | Das Kokultursystem weist im Vergleich zu iPSdMiG Monokulturen unter LPS-Stimulation verringerte Zytokinwerte auf        | 84         |
| <b>5.</b>  | <b>Zusammenfassung</b>                                                                                                  | <b>87</b>  |
| <b>6.</b>  | <b>Abbildungsverzeichnis</b>                                                                                            | <b>89</b>  |
| <b>7.</b>  | <b>Tabellenverzeichnis</b>                                                                                              | <b>90</b>  |
| <b>8.</b>  | <b>Literaturverzeichnis</b>                                                                                             | <b>91</b>  |
| <b>9.</b>  | <b>Danksagung</b>                                                                                                       | <b>106</b> |
| <b>10.</b> | <b>Publikationen/Poster</b>                                                                                             | <b>107</b> |

## Abkürzungsverzeichnis

|           |                                                                                         |
|-----------|-----------------------------------------------------------------------------------------|
| 3D        | 3-dimensional                                                                           |
| AAVS1     | Adeno-assoziierte Virusintegrationsstelle 1 (Adeno-associated virus integration site 1) |
| AD        | Morbus Alzheimer (Alzheimer's disease)                                                  |
| AICD      | APP intrazelluläre Domäne                                                               |
| AK        | Antikörper                                                                              |
| ApoE      | Apolipoprotein E                                                                        |
| APP       | Amyloid Vorläuferprotein (Amyloid precursor protein)                                    |
| A $\beta$ | Amyloid $\beta$ Peptid                                                                  |
| BDNF      | Vom Gehirn stammender neurotropher Faktor (Brain derived neurotrophic factor)           |
| BMP       | Knochenmorphogenetisches Protein (Bone morphogenetic protein)                           |
| BSA       | Bovines Serumalbumin                                                                    |
| cCAS3     | Aktive Caspase 3 (Cleaved caspase 3)                                                    |
| ck        | Hühnchen (Chicken)                                                                      |
| DAPI      | 4,6-Diamidino-2-phenylindol                                                             |
| DAPT      | N-[N-(3,5-difluorphenacetyl)-l-alanyl]-S-phenylglycine t-butyl Ester                    |
| DMEM      | Dulbecco's modifiziertes Eagle Medium                                                   |
| DMSO      | Dimethylsulfoxid                                                                        |
| DNA       | Desoxyribonukleinsäure (Deoxyribonucleic acid)                                          |

|         |                                                                                    |
|---------|------------------------------------------------------------------------------------|
| Dox     | Doxycyclin                                                                         |
| EBiSC   | Europäische Bank für induziert pluripotente Stammzellen                            |
| EDTA    | Ethylendiamintetraessigsäure (Ethylene diamine tetraacetic acid)                   |
| EGF     | Epidermaler Wachstumsfaktor (Epidermal growth factor)                              |
| FAD     | Familiäre Alzheimer Erkrankung (Familiar Alzheimer`s Disease)                      |
| FBS     | Fetales Kälberserum (Fetal bovines Serum)                                          |
| FDG-PET | Fluorodeoxyglucose- Positronen-Emissions-Tomographie                               |
| FGF2    | Fibroblasten-Wachstumsfaktor 2 (Fibroblast growth factor 2)                        |
| FL      | Fluoreszenz                                                                        |
| Fn      | Fibronektin                                                                        |
| GABA    | Gamma-Aminobuttersäure ( $\gamma$ -Aminobutyric acid)                              |
| G-CSF   | Granulozyten-Kolonie-stimulierender Faktor (Granulocyte-Colony Stimulating Factor) |
| GFAP    | Saures Gliafaserprotein (Glial fibrillary acidic protein)                          |
| GFP     | Grün fluoreszierendes Protein                                                      |
| hESZ    | Humane embryonale Stammzelle                                                       |
| hiPSZ   | Humane induziert pluripotenten Stammzelle                                          |
| hu      | Mensch (Human)                                                                     |
| IBA1    | Ionisiertes Calcium bindendes Adapter Molekül 1                                    |
| IFN     | Interferon                                                                         |

|         |                                                                                                                       |
|---------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| IL      | Interleukin                                                                                                           |
| imAP    | Induzierbares APP-PS1-mCherry Konstrukt                                                                               |
| iNZ     | Induzierte neuronale Zelle                                                                                            |
| iPSdMiG | Induziert pluripotente stammzellabgeleitete Mikrogliazelle<br>(Induced pluripotent stem cell-derived microglia)       |
| iPSZ    | Induziert pluripotenten Stammzelle                                                                                    |
| kb      | Kilobasen                                                                                                             |
| kDa     | Kilodalton                                                                                                            |
| l       | Liter                                                                                                                 |
| LN      | Laminin                                                                                                               |
| LPS     | Lipopolysaccharide                                                                                                    |
| lt-NES  | Langfristig selbsterneuernde neuroepitheliale Stammzelle<br>(Long-term self-renewing neuroepithelial -like stem cell) |
| MAPT    | Mikrotubuli assoziiertes Tauprotein                                                                                   |
| MCI     | Mildes kognitives Defizit (Mild cognitive impairment)                                                                 |
| min     | Minuten                                                                                                               |
| ml      | Milliliter                                                                                                            |
| mRNA    | Boten Ribonukleinsäure (Messenger ribonucleic acid)                                                                   |
| MRT     | Magnetresonanztomographie                                                                                             |
| ms      | Maus                                                                                                                  |
| NMDA    | N-methyl-D-aspartate                                                                                                  |
| NPC     | Neuronale Vorläuferzelle (Neural precursor cell)                                                                      |

|               |                                                                                 |
|---------------|---------------------------------------------------------------------------------|
| NSC           | Neuronale Stammzelle                                                            |
| PBS           | Phosphatgepufferte Salzlösung (Phosphate-buffered saline)                       |
| PFA           | Paraformaldehyd                                                                 |
| pg            | Pikogramm                                                                       |
| PO            | Poly-L-ornithine                                                                |
| PSEN 1/2      | Presenilin-1 und -2                                                             |
| PSD95         | Postsynaptisches dichte Protein 95                                              |
| P-TAU         | (Hyper-) phosphoryliertes Mikrotubuli-assoziiertes Tau-Protein                  |
| PV            | Parvalbumin                                                                     |
| rb            | Hase (Rabbit)                                                                   |
| rpm           | Umdrehungen pro Minute (revolutions per minute)                                 |
| SAD           | Sporadische Alzheimer Erkrankung (Sporadic Alzheimer`s Disease)                 |
| SE            | Standardfehler (Standard error)                                                 |
| SNP           | Einzelnukleotid-Polymorphismus (Single nucleotide polymorphism)                 |
| TGF- $\beta$  | Transformierender Wachstumsfaktor $\beta$ (Transforming growth factor $\beta$ ) |
| TNF- $\alpha$ | Tumornekrosefaktor $\alpha$                                                     |
| TUBB3         | Tubulin $\beta$ 3                                                               |
| USA           | Vereinigte Staaten von Amerika (United States of America)                       |
| ZNS           | Zentrales Nervensystem                                                          |

# 1. Einleitung

## 1.1 Die Alzheimersche Erkrankung

Morbus Alzheimer (Alzheimer's disease, AD) ist eine häufige neurodegenerative Erkrankung, die mit progressiver kognitiver Beeinträchtigung bis hin zur Demenz einhergeht. Bereits 2014 lebten schätzungsweise 44 Millionen Menschen weltweit mit Alzheimer, die Tendenz ist weiterhin steigend (Prince et al., 2014). Man unterscheidet die erbliche, meist autosomal dominant vererbte, familiäre Alzheimer Variante (FAD), bei der Mutationen im Amyloid Vorläufer Protein (APP), Presenilin 1 (PSEN1) oder Presenilin 2 (PSEN2) vorliegen, von der sporadischen Alzheimer Form (SAD), bei der das Risiko zu erkranken ein Zusammenspiel aus patientenspezifischer Genetik und Umwelteinflüssen ist (Bateman et al., 2011). Als histopathologische Merkmale beider Varianten im Hirn gelten extrazelluläre Amyloid  $\beta$  (A $\beta$ ) Plaques, dystrophische Neuriten, intrazelluläre neurofibrilläre Tau-Fasern (tangles) und eine signifikante Neurodegeneration. Des Weiteren spielt in der Pathogenese die Aktivierung von Mikrogliazellen und Astrozyten (Astrogliose) im Rahmen der Neuroinflammation eine entscheidende Rolle (Huang und Mucke, 2012, Serrano-Pozo et al., 2011). Diese Veränderungen führen in ihrer Gesamtheit zum Untergang von neuronalen Strukturen und zu einer Abnahme des Hirnvolumens. Dieser Verlust dominiert besonders im Temporal- und Parietalkortex und wird klinisch durch bildgebende Verfahren (z.B. Magnetresonanztomographie (MRT) und Fluorodeoxyglucose-Positronen-Emissions-Tomographie (FDG-PET)) sichtbar (Matsuda, 2016, McKhann et al., 2011). Neben den bildgebenden Verfahren und klinischen Untersuchungen der Gedächtnisleistung stellen besonders die Untersuchung der Demenzbiomarker Amyloid  $\beta$  und der Tau-Proteine (gesamte Tau-Menge und phosphoryliertes Tau) im Liquor weitere Diagnosekriterien dar (McKhann et al., 2011). Da jedoch die Interventions- und Therapiemöglichkeiten bei fortgeschrittener Alzheimerdemenz limitiert sind und aktuell auf rein symptomatischen Therapien mit Acetylcholinesterase Inhibitoren und *N*-Methyl d-Aspartat Antagonisten beschränkt sind, wird zum einen versucht, AD bereits im Frühstadium als milde kognitive Beeinträchtigung (MCI) zu diagnostizieren und eine gezielte Lebensstiländerung zur Reduktion der Risikofaktoren durchzuführen (Breijyeh und Karaman, 2020, Khoury et al., 2018). Zum

anderen werden weitere Modelle zur Modellierung der Erkrankung etabliert, um die zu Grunde liegende Pathologie und weitere potenzielle Therapieoptionen zu erforschen (Cenini et al., 2021).

### 1.1.1 Die Amyloid-Kaskaden-Hypothese

Die Pathogenese von AD ist bis heute nicht vollständig geklärt, allerdings gibt es eine Reihe von Hypothesen. Zum aktuellen Zeitpunkt steht Amyloid als histopathologisches Merkmal weiterhin im Fokus vieler Forschungsgruppen.

Amyloide Plaques sind Aggregate, bestehend aus Amyloid  $\beta$  (A $\beta$ )-Peptiden, die bei der physiologischen Verarbeitung des Amyloidvorläuferproteins (Amyloid Precursor Protein, APP) entstehen und vermehrt in Patienten mit AD nachweisbar sind (Finder und Glockshuber, 2007). APP kann durch drei unterschiedliche Sekretasen, die  $\alpha$ ,  $\beta$  und  $\gamma$ -Sekretase, proteolytisch geschnitten werden. Dabei gilt die  $\alpha$ -Sekretase als anti-amyloidogen (Haass et al., 2012). Im pathologischen Kontext kommt es zu einer vermehrten  $\beta$ - und  $\gamma$ - Sekretaseaktivität und damit zu einem Ungleichgewicht zwischen der Bildung und dem Abbau von Amyloid  $\beta$ , was mit einer Erhöhung der Amyloid Konzentration einhergeht (Scheuner et al., 1996). Die Amyloid Kaskaden-Hypothese nach Hardy und Higgins (1992) besagt, dass diese erhöhte Amyloid Konzentration zur Akkumulation und Oligomerisierung führt; dabei kommt es zu Beeinträchtigungen der synaptischen Integrität und zur Plaquebildung. Auf diese Vorgänge folgen Prozesse der Neuroinflammation mit Aktivierung von Mikrogliazellen und Astrozyten sowie Prozesse oxidativen Stresses im zentralen Nervensystem (ZNS), die die Modulation von Kinase-Phosphataseaktivität zur Folge haben. Diese führt zur verstärkten Phosphorylierung des Tau-Proteins und damit zum Zelltod (Hardy und Selkoe, 2002, Hardy und Higgins, 1992, Selkoe und Hardy, 2016). Eine wichtige Ergänzung zu dieser Hypothese ist, dass der neurotoxische Effekt nicht mehr den Plaques, sondern den kleineren, löslichen Oligomeren zugeschrieben wird (Klein, 2013, White et al., 2005). Ein starker Indikator für die Relevanz von A $\beta$  in Bezug auf die Pathogenese von Alzheimer liefert die Genetik, da alle dominanten Mutationen, besonders bei FAD, im APP-Substrat oder im Presenilin vorliegen und damit einen direkten Einfluss auf die Amyloid Konzentration haben (Selkoe

und Hardy, 2016). Die Bedeutung des Amyloids spiegelt sich ebenfalls klinisch wider. Neben der Bestimmung der totalen A $\beta$  40 und A $\beta$  42 Konzentration, wird zunehmend der A $\beta$  42/40 Quotient im Liquor als Indikator zur Diagnosesicherung und der Krankheitsprogression herangezogen (Hansson et al., 2019, Spies et al., 2010, Wiltfang et al., 2007).

## 1.2 Neuroinflammation und die Rollen von humanen Mikrogliazellen und Astrozyten

Neuroinflammatorische Prozesse spielen in der aktuellen Alzheimerforschung zunehmend eine entscheidende Rolle, wobei eine Reihe kontroverser Standpunkte vertreten werden (Calsolaro und Edison, 2016). Eine der am häufigsten verfolgten Theorien vermutet, dass die chronische Exposition des A $\beta$ -Reizes zu einer neurotoxischen Dysregulation des Immunsystems führt (Minter et al., 2016). Besonders Mikrogliazellen und Astrozyten weisen in Zusammenhang mit der AD Pathologie eine Reihe von funktionellen und morphologischen Veränderungen auf, die im folgenden Text näher beleuchtet werden. Dabei liegt der Fokus der Arbeit insbesondere auf der Rolle der Mikrogliazellen und wird den Einfluss einer erhöhten A $\beta$ - Exposition auf verschiedene Parameter der Zellfunktionen weiter beleuchten.

Mikrogliazellen gelten als angeborene Immunzellen des ZNS und sind in der Lage, ihre Umgebung zu überwachen und Zelldetritus, fehlgefaltete Proteine wie A $\beta$  und nicht funktionale Neurone zu phagozytieren (Nayak et al., 2014, Shaffer et al., 1995, Zuroff et al., 2017). Dabei erfolgt ein enges Zusammenspiel von aktivierenden und hemmenden Signalwegen, die es den Zellen ermöglichen, dynamisch auf sowohl physiologische als auch pathologische Gegebenheiten zu reagieren (Linnartz-Gerlach et al., 2014). Besonders das Oberflächenexpressionsprofil der Zellen unterliegt einem stetigen Wandel. Genomweite Studien identifizierten dabei eine Reihe von Risikogenen, darunter auch den Oberflächenrezeptor TREM2, der durch eine gezielte Signaltransduktion sowohl die Phagozytose, als auch Chemotaxis mediiert und für das Überleben der Immunzellen von entscheidender Bedeutung ist (Colonna und Wang, 2016, Jay et al., 2017, Karch und Goate, 2015, Lessard et al., 2018, Tian et al., 2013, Ulland und Colonna, 2018, Wang et al., 2016). Obwohl der genaue Einfluss des TREM2 Rezeptors in Bezug auf die AD

Pathologie noch nicht abschließend geklärt ist, konnte in Mausmodellen gezeigt werden, dass ein Verlust dieses Rezeptors zu einer Verschlimmerung der Erkrankung und gesteigerter Neurodegeneration führt (Griciuc et al., 2019). Neben diesen Eigenschaften sind Mikrogliazellen ebenfalls in der Lage, ihre Morphologie funktional an die Umgebung anzupassen. Man unterscheidet grob einen amöboiden von einem bipolaren und langgestreckten Phänotyp. Insgesamt wird der bipolare Phänotyp mit proliferativen und neuroprotektiven Eigenschaften in Verbindung gebracht und kann in der Anfangsphase von neurodegenerativen Erkrankungen beobachtet werden. Der amöboide Phänotyp kann hingegen im Anfangs- und Endstadium solcher Erkrankungen nachgewiesen werden, wobei die phänotypischen Eigenschaften die Mobilität sowie die Phagozytoseeigenschaften zu verbessern scheinen (Au und Ma, 2017, Kettenmann et al., 2011, Tam et al., 2016, Tam und Ma, 2014). Weiterhin zeigen Mikrogliazellen eine Tendenz, sich um amyloide Plaques zu gruppieren (Serrano-Pozo et al., 2011). Neue Erkenntnisse implizieren, dass dieses Verhalten eine schützende Barriere um Amyloidablagerungen bildet und damit die Toxizität sowie das Plaquewachstum begrenzt (Condello et al., 2015). Neben diesen neuroprotektiven Eigenschaften können Mikrogliazellen jedoch auch zur weiteren Progression der Erkrankung beitragen. Dabei ist die Sekretion von proinflammatorischen Zytokinen, wie zum Beispiel  $\text{TNF}\alpha$ ,  $\text{IL-1}\beta$  und  $\text{IL6}$ , zentral. Diese Entzündungsmediatoren rekrutieren anfangs weitere Gliazellen. Im späteren Verlauf scheint es jedoch zunehmend zum Verlust der neuroprotektiven Eigenschaften zu kommen und es ist ein stärkerer Abbau von intakten Neuronen und somit eine vermehrte Neurodegeneration zu beobachten (Hansen et al., 2018, Smith et al., 2012, Solito und Sastre, 2012). Diese Veränderungen im neuroinflammatorischen Milieu und des Aktivierungszustands der Mikrogliazellen sind weiterhin zentraler Bestandteil der aktuellen AD Forschung. Besonders für potentielle Therapieoptionen, wie die immunmodulatorische Behandlung, ist der Zeitpunkt der Intervention relevant. Dabei gilt es, die neuroprotektiven Eigenschaften zu unterstützen und die neurodegenerativen Prozesse einzudämmen (Minter et al., 2016).

Neben den Mikrogliazellen reagieren ebenfalls die Astrozyten sensibel auf Erkrankungen des ZNS. Astrozyten sind an der Übertragung und dem Recycling der Neurotransmitter sowie an diversen Stoffwechselprozessen beteiligt. Weiterhin bilden sie ein neurotrophes Stützgerüst, um die Aufrechterhaltung der gesunden Gehirnstruktur zu gewährleisten

(Maragakis und Rothstein, 2006, Minter et al., 2016). Im Rahmen von neurodegenerativen Erkrankungen wie AD kommt es zu Veränderungen in den Zellen, die gesammelt als reaktive Astroglieose bezeichnet werden. Dabei proliferieren die Astrozyten und erhöhen die Expression des sauren Gliafaserproteins GFAP (Eng und Ghirnikar, 1994, Hansen et al., 2018). Reaktive Astroglieose tritt dabei, unabhängig von der AD Pathologie, in weniger betroffenen Arealen als auch um die Amyloid  $\beta$  Plaques, ähnlich der Mikrogliazellen, auf (Kamphuis et al., 2014, Morales et al., 2014). Gemeinsam mit den Mikrogliazellen zeigt sich ein enges Zusammenspiel zwischen der neuroprotektiven und der fehlregulierten Entzündungsreaktion, die weiterhin Bestandteil aktueller Forschungen sind, um ein genaueres Verständnis des tatsächlichen Beitrags der einzelnen Zellarten zu erlangen und neue Therapieoptionen zu entwickeln (Minter et al., 2016).

### 1.3 Induzierte pluripotente Stammzellen in der Krankheitsmodellierung

Eine Voraussetzung für die Modellierung von humanspezifischen Erkrankungen wie AD ist die Verfügbarkeit von relevantem humanem Gewebe. Dies ist nach aktuellem Stand der Forschung besonders wichtig, da die bereits viel genutzten Mausmodelle eine vom Menschen abweichende Physiologie aufweisen und Erkrankungen, wie die AD Pathologie, nicht im gesamten Umfang rekapitulieren können (Onos et al., 2016). Die weiter identifizierten AD-spezifischen Risikogene zeigen weiterhin, dass viele der mit AD assoziierten Proteine primär humanspezifisch sind (Hollingworth et al., 2011, Naj et al., 2011). Diese Beispiele belegen, dass AD-relevante Prozesse bevorzugt mit humanen Zellen modelliert werden sollten.

Die heute sinnvollste Quelle dafür sind pluripotente Stammzellen (PSZ), wie humane embryonale Stammzellen (hESZ) (Thomson et al., 1998) bzw. humane induzierte pluripotente Stammzellen (hiPSZ). Einen Meilenstein dafür lieferten die 2006 etablierten Yamanaka-Faktoren (Oct3/4, Sox2, Klf4, and c-Myc) (Takahashi et al., 2007), die es ermöglichen, auch aus menschlichen Fibroblasten induzierte pluripotente Stammzellen herzustellen (Takahashi et al., 2007). Damit ist es im weiteren Verlauf gelungen, ein großes Spektrum verschiedenster Zelltypen, inklusive neuraler Zellen, in vitro abzuleiten und in vitro Modelle für Forschungszwecke zu generieren. In den letzten Jahren wurden dabei sowohl Verfahren für die Herstellung stabiler neuraler Intermediate, wie neurale

Stammzellen (iPSZ), inklusive davon abgeleiteter neuronaler Kulturen (Koch et al., 2009), als auch Protokolle zur Herstellung von Mikroglia-ähnlichen Zellen, die die Funktionen von humanen Mikrogliazellen schon teilweise rekapitulierten sowie seit geraumer Zeit auch „ready-to-use“ Mikrogliazellen entwickelt (Mathews et al., 2023; Speicher et al., 2019). Diese Zellen können entweder ohne bekannte Mutationen, lediglich mit den bereits im Patienten exprimierten Risikofaktoren oder durch spezifisches Einbringen der bekannten Risikogene (FAD-Mutationen) in Bezug auf die Erkrankung modifiziert, vorliegen. Dadurch ist es möglich, die genaue Bedeutung der zugrunde liegenden Mutation bzw. der einzelnen Zelltypen für die Erkrankung zu erforschen (McComish und Caldwell, 2018). In den letzten Jahren wurden so diverse humane Modelle entwickelt, die die bereits existierenden Mausmodelle um human spezifische Gesichtspunkte der AD Pathologie ergänzen (Cenini et al., 2021).

Hierfür wurden zuerst eine Vielzahl von iPSZ abgeleiteten 2D Modellen eingesetzt, welche unterschiedliche genetische Hintergründe und Risikofaktoren aufwiesen. Dabei war es bereits möglich, verschiedene Aspekte der Erkrankung zu modellieren (Bassil et al., 2021, Cenini et al., 2021). Bereits 2011 gelang es durch die Verwendung von iPSZ-abgeleiteten Neuronen, die aus Fibroblasten von FAD Patienten mit Mutationen in PS1 (A246E) und PS2 (N141I) generiert wurden, eine verstärkte Amyloidpathologie nachzuweisen (Yagi et al., 2011). In den folgenden Jahren konnten mehrere pathognomonische Eigenschaften der AD-Erkrankungen wiedergespiegelt werden. So gelang es mit der APPV717I Mutation sowohl eine veränderte APP-Verarbeitung und daraus resultierend eine verstärkte A $\beta$  42 und A $\beta$  38 Konzentration, als auch eine verstärkte Tau-Pathologie in einem iPSZ-Modell nachzuweisen (Koch et al., 2009; Mertens et al., 2013; Muratore et al., 2014).

#### 1.4 Komplexe 3D Modelle der Alzheimererkrankung

Die fehlende Dreidimensionalität klassischer Alzheimer-Modellsysteme stellt eine entscheidende Limitierung dar, weil die strukturelle und morphologische Korrelation zum menschlichen Gehirn sowie amyloide Aggregate nicht oder nur geringfügig ausgeprägt sind (Cenini et al., 2021). Die Kombination aus amyloiden Aggregaten und Tau-Pathologie konnte erstmals 2014 in einem Matrigel-basierten 3D Modell mit menschlichen immortalisierten neuronalen Vorläuferzellen nachgestellt werden (Choi et al., 2014). Dabei

wurde vermutet, dass die 3-dimensionale (3D) Matrix zu einem geringeren Auswaschen der sekretierten A $\beta$ -Peptide und die daraus resultierende, höhere lokale A $\beta$ -Konzentration zur Ausbildung amyloider Aggregate führt. Weiterhin ist relevant, dass das Modell lediglich die FAD-assoziierten Risikogene APP<sub>Swe/Lon</sub> und PSEN1(DE9) ohne eine weitere Tau-Mutante überexprimiert, was ein Indiz für die Amyloid-Kaskaden Hypothese darstellen könnte, die besagt, dass die A $\beta$ -Pathologie, die Tau-pathologie hervorbringt (Choi et al., 2014). In späteren Arbeiten wurde besonders die Rolle des A $\beta$  42/40 Verhältnisses als treibende Kraft für die Ausbildung der Tau-Pathologie herausgestellt. Dabei konnte gezeigt werden, dass die Tau Akkumulation stärker mit dem A $\beta$  42/40 Verhältnis als mit dem gesamten Amyloidgehalt korreliert (Kwak et al., 2020).

Als weiteres 3D Modell wurden kürzlich aus hiPSZ abgeleitete Organoide verwendet, welche die sporadische Form der Alzheimererkrankung rekapitulieren. Die Organoide können, als Organ-ähnliche Mikrostruktur, die Zellorganisation und Entwicklung des Gehirns widerspiegeln und waren unter Serumexposition - als Simulation für eine gestörte Bluthirnschranke - ebenfalls in der Lage, sowohl A $\beta$  Aggregate als auch ein erhöhtes p-Tau Level sowie Aspekte der Neurodegeneration (insbesondere Synapsen- und Neuronenverlust) darzustellen (Chen et al., 2021).

Um weitere Aspekte der AD Pathologie, wie neuroinflammatorische Prozesse in vitro zu modellieren, ist eine Kokultur mit Immunzellen, vor allem Mikrogliazellen, entscheidend. An Organoiden, ohne zugrunde liegende Pathologie, konnte gezeigt werden, dass eine Kokultivierung mit Mikrogliazellen in einem „Gehirn-Organoid-Modell“ möglich ist und potenziell später für die weitere Erforschung einer Vielzahl von neurologischen Erkrankungen zur Verfügung steht (Bodnar et al., 2021, Xu et al., 2021). Besonders in jüngerer Vergangenheit wird zunehmend versucht, dreidimensionale AD-Modelle zu entwickeln, die neben Neuronen auch Mikrogliazellen und Astrozyten enthalten, um die genauen Zellinteraktionen und Pathomechanismen der AD Pathologie zu erforschen (Bassil et al., 2021, Park et al., 2018).

## 1.5 Vorarbeiten zur Etablierung eines humanen 3D Kokultursystems zur in vitro Modellierung von Morbus Alzheimer

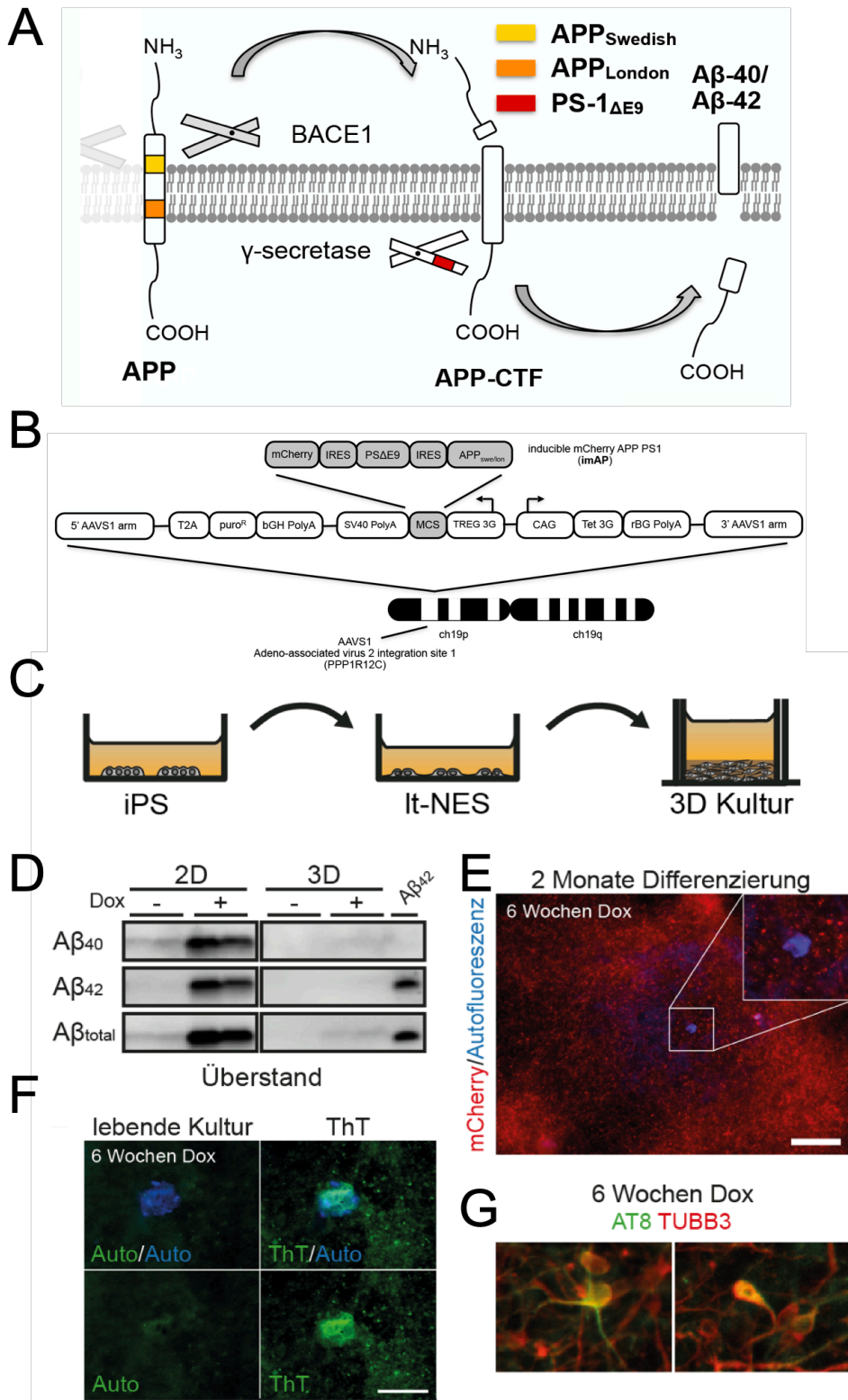
Im Rahmen laufender Projekte am Institut für Rekonstruktive Neurobiologie wurden bereits wichtige Vorarbeiten für die Etablierung eines 3D Neuronen-Mikrogliazellen-Kokultursystems für AD geleistet. Es wurde begonnen, ein 3D AD-Matrixmodell auf Grundlage transgener humaner neuraler Stammzellen (It-NES) zu etablieren. Ein Teil der Charakterisierung und der Etablierung stellt einen Bestandteil der vorliegenden Dissertation dar und wird im Ergebnisteil gesondert gewürdigt.

Des Weiteren wurden im Haus Verfahren zur Herstellung und Validierung von humanen Mikrogliazellen (iPSdMiG) aus iPSZ entwickelt (Mathews et al., Patentantrag: WO2021/180781A). Die genaue Charakterisierung der iPSdMiG und das dazugehörige Protokoll werden in Mathews et al. (2023) (Patentantrag: WO2021/180781A) beschrieben.

### 1.5.1 Etablierung eines humanen von iPSZ abgeleiteten 3D Kultursystems

Für das humane AD-Modell wurden aus iPSZ neurale Vorläuferzellen abgeleitet. Diese exprimieren nach gezielter Genmanipulation im „Safe harbour“ Lokus in der Adeno-assoziierten Virusintegrationsstelle 1 (AAVS1), unter Doxycyclininduktion, ein Tandemkonstrukt, bestehend aus mutiertem APP (K670N/M671L und V717I; die „Schwedische“ und die „London“ Mutation) und Presenilin1 (dE9) sowie dem Fluoreszenzreporter mCherry (Abb. 1A, B). Diese transgenen It-NES können in einer dreidimensionalen Matrix ausgesät und mindestens 6 Wochen differenziert werden (Abb. 1C). Die Zugabe von Doxycyclin ab Tag 10 führt zu einer starken Sekretion von A $\beta$ . In 2D Kulturüberständen ist dabei eine starke Auswaschung des A $\beta$  nachweisbar. Werden die Zellen allerdings in eine 3D Matrix eingegossen, verbleibt das sekretierte A $\beta$  überwiegend im Gel, was zu einer lokalen Akkumulation und innerhalb von 6 Wochen zur Ablagerung von A $\beta$  Aggregaten führt (Abb. 1D). Die nähere mikroskopische Analyse dieser Aggregationsstrukturen weist auf einen amyloiden Charakter hin. Dabei zeigt sich eine Autofluoreszenz im UV-Bereich und die Eigenschaft, Thioflavin T (ThT) spezifisch zu

binden (Abb. 1E, F). Weiterhin finden sich in den für 6 Wochen induzierten Kulturen vereinzelt Neurone mit intrazellulärer Akkumulation von phospho-Tau (AT8 Antikörper, Abb. 1G). Dies kann als erstes Anzeichen einer Tau-Pathologie in dem Modell interpretiert werden (Hebisch, Kamin et al., in Vorbereitung).



**Abb. 1:** Das 3D AD-Modell beinhaltet ein Genkonstrukt aus mutiertem APP (K670N/M671L und V717I) und Presenilin1 (dE9) sowie dem Fluoreszenzreporter mCherry

(A) APP, das die „Schwedische“ und die "London“ Mutation trägt, wird sequentiell von der  $\beta$ - (BACE1) und der  $\gamma$ -Sekretase (enthält die PS-1 $\Delta$ E9-Mutation) geschnitten. Dies führt zu einer erhöhten A $\beta$  40- und A $\beta$  42-Freisetzung. (B) Gezielte Insertion des APP<sup>Swe/Lon</sup>-PS-1 $\Delta$ E9-mCherry-Konstrukts in den AAVS1-„Safe Harbour“ Locus. (C) Transgene humane iPSC werden in It-NES Zellen differenziert und in einer 3D Matrix für insgesamt 8 Wochen zu neuronalen Kulturen ausgereift. Doxycyclin-Induktion findet in den letzten 6 Wochen der Differenzierung statt. (D) Western-Blot Analyse von A $\beta$ -Spezies im Überstand von konventionellen 2D Kulturen und 3D Kulturen. (E) UV-autofluoreszente Aggregate 3D Kulturen nach Doxycyclin-Induktion. (F) Die UV-autofluoreszenten Strukturen fluoreszieren nicht nach Anregung eines Lasers mit einer Wellenlänge von 488 nm und binden Thioflavin T. (G) Immunfärbungen mit dem AT8 Antikörper (anti phospho-Tau Ser202/Thr205) in induzierten 3D Kulturen (M. Hebisch, V. Kamin et al., in Vorbereitung).

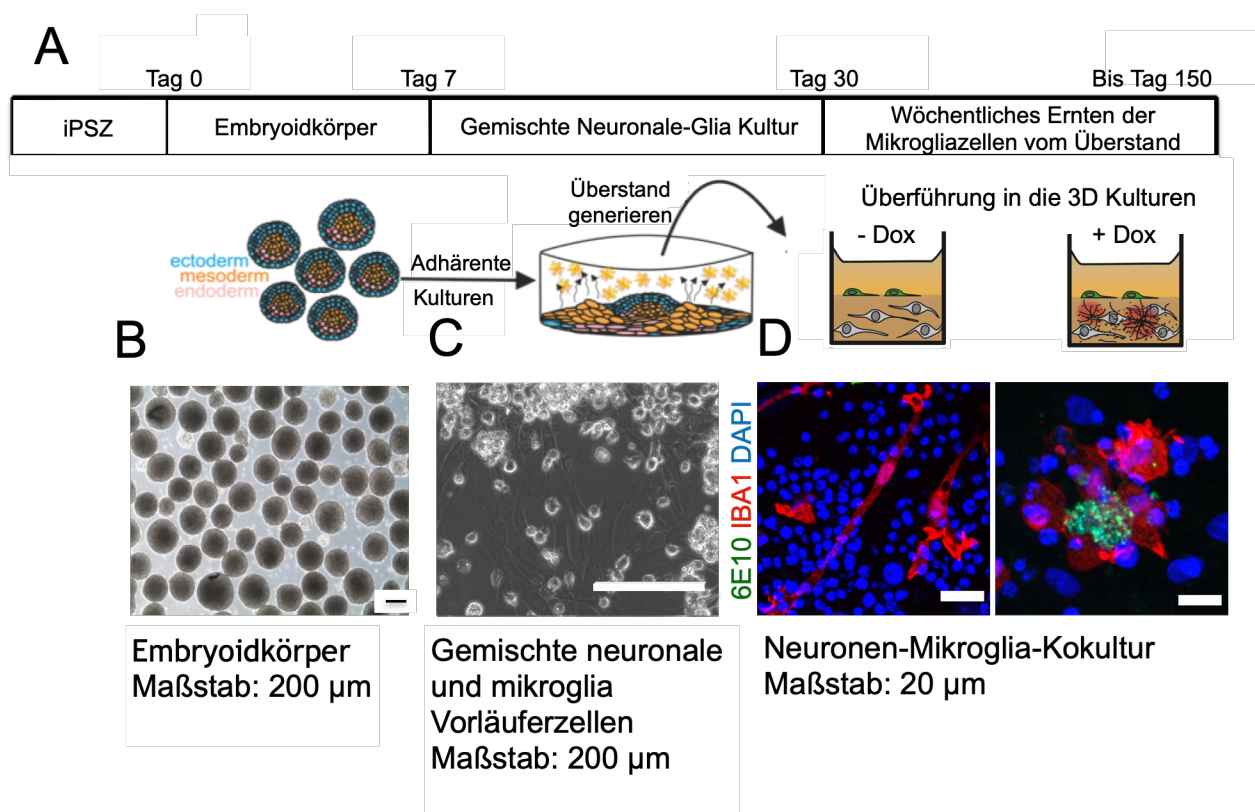
### 1.5.2 Generierung von humanen Mikrogliazellen

In der vorliegenden Dissertation werden iPSC-abgeleitete Mikrogliazellen verwendet. Diese haben den Vorteil laborchemisch generiert werden zu können und so den Mangel an primären menschlichen Mikrogliazellen zu umgehen (Mathews et al., 2023).

Die Generierung von Mikrogliazellen aus humanen iPSC dauert 30 Tage (Vgl. 2.2.3.2 Generierung der iPSC-abgeleiteten Mikrogliazellen). Der Prozess erfolgt über mehrere Zwischenstufen (Abb. 2 und 2.2.3.2 Generierung der iPSC-abgeleiteten Mikrogliazellen), bei denen zuerst Embryoidkörper (Abb. 2B) in einer Suspensionskultur entstehen. Dafür wurden die iPSC initial unter Bedingungen kultiviert, die sowohl frühe neuroepitheliale Zellen, als auch hämatopoetische Derivate des Dottersacks ergeben. Besonders die Entwicklung der Dottersack-Derivate ist entscheidend für die Entwicklung der Mikrogliazellen. Während des weiteren Reifungsprozesses geben die adhären Kulturen Mikrogliazellen in den Überstand ab (Abb. 2C und 2.2.3.2 Generierung der iPSC-abgeleiteten Mikrogliazellen). Die dabei entstehenden Mikrogliazellen weisen eine hohe Reinheit mit Expression typischer hämatopoetischer Oberflächenmarker, wie CD11B und CD45, und Rezeptoren (IBA1, CD68, CX3CR1) sowie eine typische Zellmorphologie mit gestrecktem, bipolarem Zellkörper auf. Ebenfalls ist eine adäquate funktionelle Immunantwort, phagozytische Aktivität und die Freisetzung von reaktiven

Sauerstoffspezies der Zellen in Kultur nachweisbar (Mathews et al., 2023. WO2021/180781A).

Die reinen iPsdMiG werden nach dem 30. Tag aus dem Überstand gewonnen und für die Krankheitsmodellierung verwendet. Dafür werden die iPsdMiG in das hier etablierte Kokultursystem überführt, über einen Zeitraum von 5 Tagen kokultiviert und anschließend analysiert (Vgl. 2.2.6 Anlage der Geltrex-3D Kontroll-Kultur; 2.2.7 Anlage der 3D Neuronen-Mikrogliazellen Kokultur).



**Abb. 2:** Kultivierungsplan der iPsdMiG

(A) Humane iPSZ werden über einen Kultivierungszeitraum von 30 Tagen zu iPsdMiG differenziert und anschließend aus dem Überstand in die 3D Matrix überführt. (B) Phasenkontrastaufnahme der Embryoidkörper in Suspensionskultur. Maßstab: 200 µm. (C) Phasenkontrastaufnahme der gemischten neuronalen und glialen Zellen in adhärenter Kultur (Tag 7 bis Tag 30). Maßstab: 200 µm (D) Beispielkonfokalaufnahmen von 3D Matrixkulturen mit iPsdMiG in Kokultur mit differenzierten It-NES Zellen. Maßstab: 20 µm

## 1.6 Zielsetzung der Arbeit

Die vorliegende Dissertationsarbeit hat das zentrale Ziel der Etablierung und Charakterisierung eines neuartigen, aus humanen iPSZ abgeleiteten, 3D Kokultursystems für AD. Dafür soll das iPSZ-abgeleitete Matrixmodell, welches die FAD Pathologie rekapituliert um humane Mikrogliazellen ergänzt werden. Ziel ist es, die zugrunde liegende Pathologie von Morbus Alzheimer unter human pathologischen Gesichtspunkten weiter zu erforschen und dabei den Einfluss von Mikrogliazellen herauszuarbeiten.

Zu Beginn dieser Dissertation sollte dafür das bereits bestehende 3D AD-Matrixmodell weiter charakterisiert und validiert werden. Dabei sollen die zugrunde liegende A $\beta$  Menge, die degenerativen Prozesse sowie die vorhandenen Zellarten analysiert und der Fragestellung nachgegangen werden, welche Stimuli auf die iPSdMiG im Rahmen der Kokultivierung einwirken können.

Bevor die iPSdMiG zu den iPSZ-abgeleiteten Matrixmodellen hinzugefügt werden, sollte überprüft werden, ob die Zellen in die verwendete Gelmatrix einwandern und unter den gegebenen Bedingungen überleben können. Anschließend sollte im Rahmen der Kokultivierung die Phagozytosefähigkeit (Aufnahme von cCaspase 3 -positiven Zellen bzw. A $\beta$ ) der Mikrogliazellen untersucht werden. Vor dem Hintergrund, dass in AD Patientengehirnen und in gängigen Mausmodellen amyloide Plaques unmittelbar von Mikrogliazellen umgeben sind (Condello et al., 2015), sollte ebenfalls bestimmt werden, inwiefern die Mikrogliazellen im vorliegenden AD-Kokultursystem mit den vorhandenen amyloiden Aggregaten kolokalisieren bzw. interagieren.

Anschließend sollten sowohl die iPSdMiG als auch die Neurone auf morphologische Veränderungen im Rahmen der Kokulturbedingungen untersucht und der Fragestellung nachgegangen werden, ob dabei phänotypische Veränderungen sowie Anzeichen für neurodegenerative Prozesse nachweisbar sind.

Zusätzlich werden die iPSdMiG, in Kontroll- und in Kokulturbedingungen auf die Expression typischer mikroglialer Oberflächenmarker (IBA1, TREM2 und CX3CR1) untersucht. Ein besonderes Augenmerk liegt hierbei auf der TREM2 Expression, da TREM2 im inflammatorischen Kontext die Phagozytose durch Mikrogliazellen

unterstützen kann und die Aufnahme von apoptotischen Neuronen sowie A $\beta$  verbessert (Neumann und Takahashi, 2007).

Abschließend sollte als weiterer funktioneller Parameter die Zytokinsekretion in uninduzierten und induzierten Kokulturen sowie deren Modulierbarkeit unter Hinzunahme eines weiteren akuten Stimulus (Lipopolysacchariden (LPS)) ermittelt werden.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Technische Geräte

**Tab. 1:** Technische Geräte

| <b>Gerät</b>                                                       | <b>Name</b>                                                      | <b>Hersteller</b>                          | <b>Hauptsitz</b>                                                                 |
|--------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------|
| Cellavista                                                         | Cellavista V 3.1                                                 | SynenTec                                   | Elmshorn,<br>Deutschland                                                         |
| Fluoreszenz-<br>mikroskope                                         | EVOS                                                             | Thermo Fisher<br>(life technologies)       | Waltham,<br>Massachusetts,<br>USA                                                |
| Flow cytometer                                                     | Canto II                                                         | BD                                         | Franklin Lakes,<br>USA                                                           |
| Fluoreszenz-<br>mikroskope                                         | InCELL Analyzer                                                  | GE Healthcare Life<br>Sciences             | München,<br>Deutschland                                                          |
| Inkubator                                                          | HeraCell                                                         | Heraeus                                    | Hanau,<br>Deutschland                                                            |
| Inverses<br>Lichtmikroskop                                         | Axiovert 40C                                                     | Zeiss                                      | Jena, Deutschland                                                                |
| Konfokales<br>Mikroskop                                            | Olympus IX81<br>FluoView FV1000                                  | Olympus                                    | Hamburg,<br>Deutschland                                                          |
| Kühlschrank/<br>Gefrierschrank<br>4°C,<br>-20°C, -80°C, -<br>150°C | G2013 Comford/<br>HERAfreeze/<br>HERAfreeze/ MDF-<br>C2156VAN-PE | Liebherr/Heraeus/<br>Heraeus/<br>Panasonic | Lindau, Hanau<br>Deutschland<br>Hanau,<br>Deutschland<br>Hamburg,<br>Deutschland |

|                                     |                                                       |                                    |                                          |
|-------------------------------------|-------------------------------------------------------|------------------------------------|------------------------------------------|
| Quickplex SQ120                     | Meso Scale<br>Discovery                               | Meso Scale<br>Diagnostics LLC      | Maryland, USA                            |
| Pipetten                            | Labmate                                               | Abimed                             | Langenfeld,<br>Deutschland               |
| Pipettierhelfer                     | Accu-Jet                                              | Brand                              | Wertheim,<br>Deutschland                 |
| Sterile<br>Sicherheitswerk-<br>bank | HeraSafe                                              | Heraeus                            | Hanau,<br>Deutschland                    |
| Stickstofftank                      | MVE 611 K Series,<br>Cryostorage<br>System            | Chart Industries<br>Taylor-Wharton | Burnsville, USA<br>Husum,<br>Deutschland |
| Tischzentrifuge                     | Centrifuge 5415R                                      | Eppendorf                          | Hamburg,<br>Deutschland                  |
| Vacuumpumpe                         | Vacuubrand, PC<br>2004 Vario                          | Brand                              | Wertheim,<br>Deutschland                 |
| Vortexmischer                       | Vortex Genie                                          | Scientific Industries              | New York, USA                            |
| Wasserbad                           | WB14                                                  | Memmert                            | Schwabach,<br>Deutschland                |
| Zählkammer                          | Fuchs-Rosenthal                                       | Faust                              | Halle, Deutschland                       |
| Zentrifuge 1                        | Megafuge 1.0R<br>Rotor #2704 Rotor<br>BS4402/A        | Heraeus                            | Hanau,<br>Deutschland                    |
| Zentrifuge 2                        | RC 26 Plus RC5B<br>Plus Rotor SS-34<br>Rotor SLA-3000 | Sorvall                            | Newtown, USA                             |

## 2.1.2 Zellkulturmaterial

**Tab. 2:** Zellkulturmaterial

| <b>Verbrauchsmaterial</b>    | <b>Hersteller</b>              | <b>Hauptsitz</b>                |
|------------------------------|--------------------------------|---------------------------------|
| Kryovials 1ml / 2ml          | Nunc, Thermo Fisher            | Waltham, Massachusetts, USA     |
| PCR Softtubes 0,2ml          | Biozym Scientific              | Hessisch Oldendorf, Deutschland |
| Petrischalen                 | BD Biosciences                 | Franklin Lakes, New Jersey, USA |
| Serologische Pipetten        | BD Biosciences                 | Franklin Lakes, New Jersey, USA |
| Spritze                      | BD Biosciences                 | Franklin Lakes, New Jersey, USA |
| Spritzenvorsatzfilter 0,2µm  | PALL                           | New York, USA                   |
| Spritzenvorsatzfilter 0,45µm | Whatman Schleicher and Schuell | London, England                 |
| Sterile Filtrationseinheit   | Millipore                      | Burlington, Massachusetts, USA  |
| Zellkulturplatte, 6 Well     | Nunc, Thermo Fisher            | Waltham, Massachusetts, USA     |
| Zellkulturplatte, 96 Well    | Greiner                        | Kremsmünster, Österreich        |
| Zellsieb 40 µm               | BD Biosciences                 | Franklin Lakes, New Jersey, USA |
| Zentrifugenröhrchen          | Beckman                        | Krefeld, Deutschland            |

## 2.1.3 Chemikalien und Zellkultur-Agenzien

**Tab. 3:** Chemikalien und Zellkultur-Agenzien

| <b>Substanz</b>           | <b>Hersteller</b> | <b>Hauptsitz</b>                      |
|---------------------------|-------------------|---------------------------------------|
| Accutase                  | Gibco             | Carlsbad, Kalifornien, USA            |
| Ampuwa Wasser             | Fresenius KABI    | Bad Homburg vor der Höhe, Deutschland |
| B-27 Supplement           | Gibco             | Carlsbad, Kalifornien, USA            |
| BSA                       | Sigma             | St. Louis, USA                        |
| DAPT                      | Axon MedChem      | Groningen, Niederlande                |
| DMEM                      | Gibco             | Carlsbad, Kalifornien, USA            |
| DMEM/F12                  | Gibco             | Carlsbad, Kalifornien, USA            |
| DMEM/F12 + Hepes          | Gibco             | Carlsbad, Kalifornien, USA            |
| DMSO                      | Sigma             | St. Louis, USA                        |
| Doxycycline               | Sigma             | St. Louis, USA                        |
| EDTA                      | Sigma             | St. Louis, USA                        |
| EGF                       | R&D Systems       | Wiesbaden, Deutschland                |
| Ethanol                   | Roth              | Karlsruhe, Deutschland                |
| FBS                       | Gibco             | Carlsbad, Kalifornien, USA            |
| FGF                       | R&D Systems       | Wiesbaden, Deutschland                |
| Fibronectin, Human plasma | Sigma             | St. Louis, USA                        |
| Geltrex                   | Gibco             | Carlsbad, Kalifornien, USA            |
| Glukose                   | Sigma             | St. Louis, USA                        |
| GlutaMAX-I                | Gibco             | Carlsbad, Kalifornien, USA            |
| FBS                       | Gibco             | Carlsbad, Kalifornien, USA            |
| Insulin                   | Sigma             | St. Louis, USA                        |
| Knockout DMEM             | Gibco             | Carlsbad, Kalifornien, USA            |

|                                                     |                       |                                |
|-----------------------------------------------------|-----------------------|--------------------------------|
| Knockout Serum Replacement                          | Gibco                 | Carlsbad, Kalifornien, USA     |
| Kollagenase IV                                      | Gibco                 | Carlsbad, Kalifornien, USA     |
| L-Glutamin                                          | Thermo Fisher         | Waltham, Massachusetts, USA    |
| Laminin                                             | Sigma                 | St. Louis, USA                 |
| LPS                                                 | Invivogen             | San Diego, USA                 |
| MSCF                                                | Peptotech             | New Jersey, USA                |
| N2 Supplement                                       | Gibco                 | Carlsbad, Kalifornien, USA     |
| Natrium Azide                                       | Sigma                 | St. Louis, USA                 |
| Neurobasal Medium                                   | Gibco                 | Carlsbad, Kalifornien, USA     |
| Nukleasenfreies Wasser                              | BioRad                | Hercules, Kalifornien, USA     |
| PBS                                                 | Gibco                 | Carlsbad, Kalifornien, USA     |
| PFA                                                 | Sigma                 | St. Louis, USA                 |
| PO                                                  | Sigma                 | St. Louis, USA                 |
| Rock Inhibitor                                      | Biotechnie            | Ollon, Schweiz                 |
| RIPA                                                | Sigma                 | St. Louis, USA                 |
| RIPA-Inhibitor                                      | Thermo Fisher         | Waltham, Massachusetts, USA    |
| STEMdiff APEL2 Medium                               | STEMCELL Technologies | Canada                         |
| StemMACS iPS-Brew XF (Stembrew) Medium & Supplement | Miltenyi Biotec       | Bergisch Gladbach, Deutschland |
| Triton-X-100                                        | Sigma                 | St. Louis, USA                 |
| Tryplan Blau                                        | Gibco                 | Carlsbad, Kalifornien, USA     |
| Trypsin                                             | Gibco                 | Carlsbad, Kalifornien, USA     |
| Trypsin Inhibitor                                   | Invitrogen            | Carlsbad, Kalifornien, USA     |

## 2.1.4 Antikörper

**Tab. 4:** Primäre Antikörper

| <b>Name des Antikörpers</b> | <b>Zielstruktur</b>                          | <b>Wirt</b>    | <b>Verdünnung</b> | <b>Hersteller</b>              |
|-----------------------------|----------------------------------------------|----------------|-------------------|--------------------------------|
| 6E10                        | A $\beta$                                    | ms             | 1:200             | BioLegend                      |
| AT8                         | p-Tau                                        | ms             | 1:1000            | ThermoFisher                   |
| cCas3                       | cCas3                                        | rb             | 1:250             | Promega                        |
| CD14                        | Oberflächenrezeptor                          | ms             | 1:200             | ExBio<br>11-293-C100           |
| CD11B                       | Oberflächenrezeptor/<br>zytosolischer Marker | Rat-Anti-ms/hu | 1:200             | BD<br>Pharmingen<br>(BD553307) |
| CD68                        | Lysosomaler Marker                           | ms             | 1:50              | DAKO<br>M0718<br>Clone EBM 11  |
| CX3CR1                      | Oberflächenrezeptor                          | rb             | 1:500             | ProSci Inc<br>2093             |
| DAPI                        | Zellkern                                     |                | 1:10,000          | Sigma-Aldrich<br>D9542         |
| GFAP                        | GFAP                                         | rb             | 1:1000            | Millipore                      |
| IBA1                        | Oberflächenrezeptor                          | rb             | 1:500             | Synaptic Systems               |
| IBA1                        | Oberflächenrezeptor                          | ck             | 1:500             | Synaptic Systems               |
| Ki67                        | Proliferationsmarker                         | ms             | 1:100             | Millipore,<br>AB9260           |
| S100 $\beta$                | Zytoplasma-protein                           | ms             | 1:500             | Sigma-Aldrich<br>S2532         |

|       |                                          |     |        |                             |
|-------|------------------------------------------|-----|--------|-----------------------------|
| TREM2 | Oberflächen-<br>rezeptor/<br>zytosolisch | rat | 1:200  | R&D systems<br>1729 mab1828 |
| TUJ1  | Tubulin                                  | ck  | 1:500  | Millipore<br>AB9354         |
| TUJ1  | Tubulin                                  | rb  | 1:1000 | Biologend<br>802001         |
| TUJ1  | Tubulin                                  | ms  | 1:1000 | Biologend<br>801202         |

**Tab. 5:** Sekundäre Antikörper

| <b>Name des Antikörpers</b> | <b>Wirt</b> | <b>Farbstoff</b>   | <b>Verdünnung</b> | <b>Hersteller</b>    |
|-----------------------------|-------------|--------------------|-------------------|----------------------|
| Anti-ck IgG                 | Ziege       | Alexa Fluor<br>647 | 1:500             | Life<br>technologies |
| Anti-ms IgG                 | Ziege       | Alexa Fluor<br>488 | 1:1000            | Life<br>technologies |
| Anti-ms IgG                 | Ziege       | Alexa Fluor<br>647 | 1:500             | Life<br>technologies |
| Anti-rat IgG                | Ziege       | Alexa Fluor<br>488 | 1:500             | Invitrogen           |
| Anti-rb IgG                 | Ziege       | Alexa Fluor<br>488 | 1:1000            | Invitrogen           |
| Anti-rb IgG                 | Ziege       | Alexa Fluor<br>647 | 1:500             | Life<br>technologies |

## 2.1.5 Zellkulturmedien und -reagenzien

**Tab. 6:** Antibiotika

| Bestandteil                      | Konzentration | Lösungsmittel    |
|----------------------------------|---------------|------------------|
| Doxycyclin                       | 2 mg/ml       | H <sub>2</sub> O |
| Haltbarkeit: 6 Monate bei -20 °C |               |                  |

**Tab. 7:** FEB-Medium

| Bestandteil                  | Zusammensetzung |
|------------------------------|-----------------|
| N2 Medium                    | 500 ml          |
| EGF (10µg/ml)                | 500 µl          |
| FGF (10µg/ml)                | 500 µl          |
| B27 (50x)                    | 500 µl          |
| Haltbarkeit: 3 Tage bei 4 °C |                 |

**Tab. 8:** Glukose Stammlösung (100x)

| Bestandteil | Zusammensetzung |
|-------------|-----------------|
| DMEM/F12    |                 |
| Glukose     | 16 g/l          |

**Tab. 9:** Lt-NES Gefriermedium

| Bestandteil                                 | Zusammensetzung |
|---------------------------------------------|-----------------|
| Knock-out Serumersatz                       | 65 %            |
| N2 Medium                                   | 25 %            |
| DMSO                                        | 10 %            |
| Haltbarkeit: Muss frisch zubereitet werden. |                 |

**Tab. 10:** N2-Medium

| Bestandteil                      | Zusammensetzung |
|----------------------------------|-----------------|
| DMEM/F12                         | 500 ml          |
| N2 Supplement (100x)             | 1 x             |
| Glukose Ausgangslösung (1,6 g/l) | 5 ml            |
| Haltbarkeit: 14 Tage bei 4 °C    |                 |

**Tab. 11:** NGMC – Medium

| <b>Bestandteil</b>            | <b>Zusammensetzung</b> |
|-------------------------------|------------------------|
| N2 Medium                     | 50 %                   |
| Neurobasal Medium             | 50 %                   |
| Glutamin (200 mM)             | 1 mM                   |
| B27 Supplement (50x)          | 1 x                    |
| Haltbarkeit: 30 Tage bei 4 °C |                        |

**Tab. 12:** PBS-EDTA

| <b>Bestandteil</b>  | <b>Zusammensetzung</b> |
|---------------------|------------------------|
| PBS                 | 500 ml                 |
| EDTA (Stock: 0,5 M) | 0,5 ml                 |

Plattenbeschichtung

**Tab. 13:** Fibronektin/ Poly-L-Ornithin Beschichtung

| <b>Bestandteil</b>         | <b>Zusammensetzung</b>                                        |
|----------------------------|---------------------------------------------------------------|
| Poly-L-Ornithin            | 15 µg/ml in dd H <sub>2</sub> O                               |
| Fibronektin (0,1 % Lösung) | 1:500 in PBS                                                  |
|                            | <b>Handlungsablauf</b>                                        |
| Inkubation 1.              | Polyornithin für mind. 2h bei 37°C inkubieren                 |
| Zwischenschritt            | 3 x Waschen mit PBS                                           |
| Inkubation 2.              | Fibronektin für mind. 2h oder über Nacht bei 37 °C inkubieren |

**Tab. 14:** Laminin/ Poly-LOrnithin Beschichtung

| <b>Bestandteil</b> | <b>Zusammensetzung</b>                                            |
|--------------------|-------------------------------------------------------------------|
| Poly-L-Ornithin    | 15 µg/ml in dd H <sub>2</sub> O                                   |
| Laminin            | 2 µg/ml in PBS                                                    |
|                    | <b>Handlungsablauf</b>                                            |
| Inkubation 1.      | Poly-L-Ornithin für mind. 1h bei 37°C inkubieren                  |
| Zwischenschritt    | 2 x Waschen mit PBS                                               |
| Inkubation 2.      | Laminin für mind. 1h bei 37°C oder über Nacht bei 4 °C inkubieren |

**Tab. 15:** Stem Brew Medium

| Bestandteil                   | Zusammensetzung |
|-------------------------------|-----------------|
| Stem MACS iPS-Brew XF         | 500 ml          |
| Stem Brew Supplement          | 10 ml           |
| Haltbarkeit: 14 Tage bei 4 °C |                 |

**Tab. 16:** Trypsin

| Bestandteil                    | Zusammensetzung |
|--------------------------------|-----------------|
| PBS                            | 90 %            |
| Trypsin 10x Stockkonzentration | 10 %            |

### 2.1.6 Software

**Tab. 17:** Software

| Zweck                         | Name des Programms | Hersteller    | Hauptsitz              |
|-------------------------------|--------------------|---------------|------------------------|
| Abbildungen                   | Adobe Photoshop    | Adobe Systeme | Berkeley, USA          |
|                               | Inkscape           |               |                        |
| Bildbearbeitung               | Adobe Photoshop    | Adobe Systeme | Berkeley, USA          |
|                               | FIJI               | Freeware      | /                      |
|                               | Olympus Flouview   | Olympus       | Hamburg, Deutschland   |
|                               | IN CELL Analyzer   | GE Healthcare | Freiburg, Deutschland  |
| SNP Analyse                   | Genome Studio      | Illumina Inc. | San Diego, USA         |
| Textbearbeitung               | Microsoft-Word     | Microsoft     | Redmond, USA           |
| Tabellenherstellung           | Numbers            | Apple         | Cupertino, USA         |
| Literaturverzeichnis          | Mendeley           | Elsevier      | Amsterdam, Niederlande |
| Statistische Analyseverfahren | RStudio            | The R project | /                      |

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 iPSZ-abgeleitete neuronale Zellkultur

Das in dieser Dissertation beschriebene 3D Matrix Modell beruht auf den Vorarbeiten von Matthias Hebisch, Viola Kamin et al. (Manuskript in Vorbereitung).

Die Grundlage für das 3D Matrix Modell stellen FAD-assoziierte Risikogene dar, genauer PSEN1 (Delta E9), sowie das humane APP<sub>695</sub>. Diese APP-Variante enthält sowohl die

schwedische K670N/M671 als auch die London-Mutation V7171I. Diese Risikogene wurden zusammen mit einem mCherry Fluoreszenzprotein in den AAVS1 „Safe harbour“ Locus eingebracht. Eine stabile Genexpression erfolgt Tetrazyklin-gesteuert über ein Tet-On System. Als Tetrazyklin-Derivat wird Doxycyclin verwendet, welches einen zellgängigen Liganden darstellt. Die so generierten iPSZ-Kulturen wurden von M. Hebisch nach dem von Roese-Koerner et al. (2016) publizierten Protokoll zu Lt-NES Zellen differenziert.

Als Kontrolle dienten nicht transgene Lt-NES (Zelllinie: iLB-C14m-s11 p42 Lt-NES), welche von unserer technischen Assistentin C. Thiele generiert worden waren. Beide Lt-NES Varianten finden in meiner Dissertation Anwendung.

### 2.2.2 Lt-NES Kultivierung

Um die Lt-NES Zellen kultivieren zu können, werden diese zunächst aufgetaut. Dafür wird ein bei -150 °C gelagertes Kryovial mit 5 ml N2 Medium resuspendiert und für 3 min bei 1200 rpm zentrifugiert. Anschließend wird der Überstand abgenommen und das Pellet mit 1,5 ml FEB Medium in ein Well, einer vorbereiteten PO/Ln Zellkulturplatte (6 Well), gegeben. Die PO/Ln Platten wurden zuvor mit PO, welches in der Konzentration 15 µg/ml in destilliertem Wasser gelöst wurde, für 1h bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde die Platte zweimalig mit PBS gewaschen und dann mit 1 ml Laminin- PBS Lösung (2 µg/ml) für 1h bei 37 °C inkubiert. Die Ln-PBS Lösung wird vor Zellzugabe entfernt.

Die Inkubation der Zellen erfolgt bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub>. Alle 2 Tage werden die Zellen passagiert bis maximal die zwanzigste Passage erreicht ist. Für diesen Vorgang wird das alte FEB Medium abgenommen und die Platte anschließend 3-mal mit PBS gewaschen. Das PBS wird entfernt und anschließend wird 1ml 0,05 %iges Trypsin/Well für 8 min bei 37 °C hinzugegeben. Anschließend erfolgt die Beendigung der Reaktion mit 1ml/Well Trypsin-Inhibitor. Nach diesem Schritt lassen sich die Zellen von der 6-Well Platte lösen und werden in ein 15 ml Zentrifugenröhrchen überführt und bei 1200 rpm für 3 min zentrifugiert. Als letzter Schritt wird der Überstand im Zentrifugenröhrchen entfernt und das Zellpellet mit FEB-Medium resuspendiert, und auf eine neue PO/Ln Platte ausgesät. Je nach Zelldichte werden die Zellen 1:2 bzw. 1:3 subkultiviert.

Am nächsten Tag werden pro Well je 0,5 ml FEB-Medium hinzugegeben, um die Zellen mit ausreichend Nährstoffen zu versorgen.

Um die Lt-NES Kultur einfrieren zu können, werden die Zellen erneut (wie oben beschrieben) von der 6-Well Platte gelöst und anschließend nach der Zentrifugation in das Lt-NES Gefriermedium überführt. Das Kryovial wird dann sofort bei  $-80^{\circ}\text{C}$  eingefroren und am nächsten Tag bei  $-150^{\circ}\text{C}$  eingelagert.

### 2.2.3 Herstellung von human induzierten pluripotenten stammzell-abgeleiteten Mikrogliazellen (iPSdMiG)

#### Kultivierung von iPSZ zur Generierung von iPSZ abgeleiteten Mikrogliazellen

Die humanen iPSZ, welche für die Generierung der Mikrogliazellen verwendet werden, wurden vorher, mit der Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität Bonn (Genehmigungsnummer 275/08 für iLB-C133bm-S4), generiert. Bei allen Experimenten wurde die Zelllinie iLB-C133bm-S4 verwendet.

Für die Differenzierung der iPSZ wurden diese auf 6-Well Zellkulturplatten, welche mit Geltrex in DMEM/F12 (180  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) beschichtet worden sind, ausgesät und in StemMACS iPS-Brew Medium kultiviert. Das Medium wurde jeden zweiten Tag gewechselt. Die Expansion und Passagierung der iPSZ erfolgte zweimal wöchentlich. Dafür wurde 0,5 mM Ethylendiamintetra-Essigsäure (EDTA) in phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) dissoziiert.

#### Generierung der iPSZ-abgeleiteten Mikrogliazellen

Humane Mikrogliazellen (iPSdMiG) werden aus induzierten pluripotenten Stammzellen (iPSZ) (Vgl. 2.2.3.1) abgeleitet; dafür wird ein neues Protokoll, welches in der Life&Brain GmbH etabliert worden ist, verwendet. Das genaue Protokoll und die weitere Charakterisierung sind aktuell Bestandteil einer Publikation und können in der daliegenden Dissertation nur umrissen werden (Mathews et al., 2023. Patentantrag: WO2021/180781A). Die Differenzierung der Zellen erfolgte in Zusammenarbeit mit M. Mathews.

Für den Differenzierungsbeginn der iPSdMiG werden die iPSZ bis zu einer Dichte von 70-80% pro Well kultiviert. Anschließend werden die Zellen über einen Zeitraum von 30 Minuten mit Kollagenase IV (1mg/ml in DMEM/F-12) gelöst und auf unbeschichtete Kulturplatten überführt. Bei diesem Schritt bilden sich gleich große, adhärenente Kolonien aus iPSZ. Während der weiteren Differenzierung lösen sich die adhärenenten Kulturen und bilden eine Suspensionskultur aus Embryoidkörpern.

Über weitere 4-6 Wochen bildet sich erneut eine adhärenente Kultur aus neuronalen und Gliazellen, welche in der „Produktionsphase“ kontinuierlich differenzierte Mikrogliazellen (iPSdMiG) ins Medium abgibt. Diese können aus dem Überstand über einen Zeitraum von 7 Wochen für anschließende Experimente gewonnen werden.

Für die Experimente werden die Mikrogliazellen mittels einer Fuchs-Rosenthal Zählkammer gezählt und in einer Dichte von  $2 \times 10^4$  Zellen pro Well in Relation 1: 10 in Bezug auf die Lt-NES Zellen ausgesät (Vgl. 2.2.6 Anlage der Geltrex-3D Kontrollkultur und 2.2.7 Anlage der 3D Neuronen-Mikrogliazellen Kokultur).

#### 2.2.4 Virtuelle Karyotypisierung mittels SNP-Arraydaten

Ebenfalls wird der oben beschriebene Vorgang zur Generierung eines Zellpellets für die Qualitätskontrolle verwendet. Dafür wird aus dem Zellpellet mit dem „QiaQuick“ Blut- und Gewebe-Kit gemäß den Anwendungshinweisen DNA extrahiert. 60 ng/ $\mu$ l DNA werden anschließend in 30  $\mu$ l Waschpuffer gegeben und dem Humangenetischen Institut der Universität Bonn zur Analyse geschickt (Chip: GSA, Infinium Global Screening Array v2.0). Die so generierten Daten werden mit der „Illumina Genome Studio“ Software ausgewertet. Für jedes Chromosom wird anschließend die b-Allel Frequenz, sowie die logR Ratio graphisch dargestellt und analysiert.

#### 2.2.5 Anlage der 3D Kultur

Zur Anlage der 3D Kulturen werden ebenfalls Lt-NES Zellen verwendet, die nach dem oben beschriebenen Vorgang in 2D kultiviert worden sind (Vgl. 2.2.2). Dafür wurden sowohl genetisch modifizierte als auch nicht transgene Lt-NES Zellen verwendet. Die

Zellen wurden vor dem Zentrifugieren manuell gezählt, um sicherzustellen, dass die 3D Kulturen konstant  $2 \times 10^5$  Zellen pro Well einer 96 Well Zellkulturplatte enthalten. Dazu werden 25  $\mu$ l der Zellsuspension in ebenfalls 25  $\mu$ l Trypanblau verdünnt (1:1 Verdünnung) und mit der Fuchs-Rosenthal Zählkammer unter Zuhilfenahme eines Durchlichtmikroskops gezählt. Die benötigte Zellzahl wird anschließend, wie oben beschrieben, zentrifugiert. Danach wird der Überstand entfernt und die Zellen für 2 Minuten auf Eis gekühlt. Dieser Kühlprozess verringert die spätere Bildung von Geltrex-Präzipitaten. Nach dem Kühlen werden die Zellen sofort in dem ebenfalls gekühlten Geltrex/ FEB Medium (1:10), resuspendiert und je 100  $\mu$ l/Well auf eine 96 Well Platte gegeben. Im Anschluss werden die 96 Well Platten für mind. 30 Minuten bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert und nachfolgend mit FEB-Medium versorgt. Am zweiten Tag nach der Anlage der 3D Kultur wird das FEB-Medium weitestgehend mit NGMC Medium ersetzt. Ab diesem Zeitpunkt beginnt die neuronale Differenzierung der Kultur und es erfolgt jeden zweiten Tag ein Wechsel des Mediums mit NGMC über einen Zeitraum von 10 Tagen. Anschließend werden die FAD-Risikogene, unter Zugabe von 2  $\mu$ g/ml Doxycyclin in NGMC, für weitere 42 Tage induziert. Der Mediumwechsel erfolgt weiterhin jeden zweiten Tag.

Ein Teil der Kulturen wird als neuronale Kontrollkultur unter NGMC ohne Doxycyclinzugabe für den gleichen Zeitraum weiter kultiviert. Innerhalb dieser 42 Tage erfolgt der Wechsel des Mediums ebenfalls alle 2 Tage.

#### 2.2.6 Anlage der Geltrex-3D Kontrollkultur und Neuronen-Mikrogliazellen Kokultur

Mit dem Ziel der Etablierung einer Neuronen-Mikrogliazellen Kokultur werden ebenfalls Kontrollkulturen ohne Lt-NES Zellen, mit ausschließlich Mikrogliazellen, angelegt. Dafür werden zuerst die 3D Kulturen ohne Zellen für 52 Tage (wie in 2.2.5) kultiviert. Anschließend werden die iPSdMiG auf die Geltrex-3D Kontrollkultur gegeben. Dies dient der Quantifizierung der Interaktion der iPSdMiG mit den Umgebungsbedingungen.

Für diese Kontrollkulturen ohne neuronale Zellen werden exakt die oben beschriebenen Bestandteile und die gleichen Zeiträume gewählt. Am 52. Tag werden die humanen

Mikrogliazellen hinzugegeben und für 5 Tage kultiviert. Dafür werden je  $2 \times 10^4$  Zellen/ Well unter Zuhilfenahme der Fuchs-Rosenthal Zählkammer gezählt und in NGMC plus MCSF (100 ng/ml) zu den jeweiligen Wells hinzugefügt. Am nächsten Tag erfolgt ein Wechsel des Mediums erneut mit NGMC plus MCSF (100 ng/ml). Am 3. und 4. Tag folgt kein Mediumwechsel. Erst am 5. Tag wird das Medium erneut mit NGMC oder NGMC plus Lipopolysaccharide (LPS) (1  $\mu$ g/ml) gewechselt. Die LPS-Zugabe dient der Analyse des Verhaltens der Mikrogliazellen unter einem weiteren inflammatorischen Stimulus.

Neben den Kontrollkulturen mit nur Neuronen oder Mikrogliazellen werden 3D Neuronen-Mikrogliazellen Kokulturen angelegt, um den Hauptfragestellungen dieser Dissertation nachzugehen. Dafür wird ebenfalls dem Protokoll „Anlage der 3D Kultur“ (Vgl. 2.2.5) gefolgt. Am 52. Tag werden zu den oben beschriebenen neuronalen Kulturen 20.000 humane iPsdMiG pro Well hinzugefügt. Der Wechsel des Mediums erfolgt wie in 2.2.6 beschrieben.

## 2.2.7 Immunhistochemie

**Tab. 18:** Blocking-Lösung für Membranantigene

| Bestandteil                                           | Konzentration |
|-------------------------------------------------------|---------------|
| steril PBS                                            | 1 X           |
| Triton-X-100                                          | 0,1 %         |
| FBS                                                   | 10 %          |
| Na-Azid (10% Stock Konzentration, in PBS)             | 0,01 %        |
| Bei der Herstellung zu beachten:<br>steril filtrieren |               |

**Tab. 19:** Blocking-Lösung für intranukleäre Marker

| Bestandteil                                        | Konzentration |
|----------------------------------------------------|---------------|
| steriles PBS                                       | 1 X           |
| Triton-X-100                                       | 0,5 %         |
| FBS                                                | 10 %          |
| Na-Azid (10% Stock Konzentration)                  | 0,01 %        |
| Bei der Herstellung zu beachten: steril filtrieren |               |

Für die Immunfärbung werden die Kulturen nach dem Entfernen des Mediums über Nacht bei 4°C mit 4% PFA fixiert. Am nächsten Tag werden die Kulturen über 1 h mit der jeweiligen Blocking-Lösung vorbehandelt, um die Zellen zu permeabilisieren und unspezifische Bindungen zu minimieren. Anschließend wird in der Blocking-Lösung der primäre Antikörper gelöst und über Nacht bei 4°C inkubiert. Am folgenden Tag wird der primäre Antikörper abgesaugt. Die einzelnen Wells werden dann 3x mit PBS für 5 Minuten gewaschen. Danach wird der sekundäre Antikörper in der gleichen Blocking-Lösung gelöst und für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Die einzelnen Wells werden nach dem Entfernen des Antikörpers erneut 3x mit PBS für 5 Minuten gewaschen.

Für weitere Antikörper erfolgt eine sequentielle Färbung nach dem gleichen Protokoll. Abschließend werden die Platten mit DAPI für 1 Minute gefärbt. Die DAPI Lösung wird durch 3-malige PBS Anwendung ausgewaschen (je 5 min). Nun wird auf die Platte PBS und 0,01% Na-Azid gegeben und diese anschließend mit Parafilm umwickelt, um das Austrocknen zu verhindern.

### 2.2.8 Mikroskopie

Für die Analyse der unterschiedlichen Zelltypen wurde die gefärbte und fixierte Kultur mit dem Konfokalmikroskop (Olympus IX81 FluoView FV1000) aufgenommen. Dabei wurde das zwanziger, vierziger und sechziger Objektiv verwendet. Es ist zu beachten, dass die vierziger und sechziger Objektive nur mit einer Wasserimmersion funktionieren. Alle Bilder wurden unter gleichen und randomisierten Bedingungen aufgenommen, um die unterschiedlichen Fluoreszenzsignale innerhalb einer Färbung vergleichen zu können. Dabei wurde ein zufällig gewähltes Bildareal unter der Verwendung einer DAPI Gegenfärbung scharfgestellt. Es wurden sowohl zweidimensionale Bilder, als auch Z-Stacks aufgenommen. Die dabei verwendete Software des Konfokalmikroskops heißt Olympus Fluoview.

Für die Zusammensetzung der Einzelaufnahmen eines Wells wurden zum einen der IN CELL Analyzer 2200, sowie der Cellavista verwendet. Beide Mikroskope ermöglichen Aussagen über die Zellmorphologie und zeigen die Verteilung der Mikrogliazellen bzw. der 6E10 positiven Aggregate. Für dieses Ziel wurden die Kulturen, sowohl mit Verwendung des Phasenkontrastes, als auch unter Laseranregung aufgenommen. Dabei

wurde beim IN CELL Analyzer 2200 das 10X Objektiv unter der Option 2,5 D Deconvolution verwendet.

Um bei den jeweiligen Zelllinien bzw. -typen die Differenzierungsschritte nachvollziehen zu können, wurden in regelmäßigen Abständen Aufnahmen mit dem EVOS Mikroskop angefertigt.

### 2.2.9 Bildverarbeitung und -analyse

Für die Bildverarbeitung und die Analyse der konfokalen Einzelbilder und Z-Stacks wurde Fiji (Bildverarbeitungssoftware) (Schindelin et al., 2012) verwendet. Die Z-Stacks wurden durch maximale Projektion zu einem Einzelbild verarbeitet und anschließend automatisiert analysiert.

Dafür wurden zunächst in den Aufnahmen des Konfokalmikroskops die zu analysierenden Zellen über die IBA1 Färbung regelbasiert und automatisiert (Grenzwerte: größer 10% und kleiner 99% maximale Fluoreszenzintensität; zusammenliegender Pixelverbund größer 30 Pixel) identifiziert. Auf Basis dessen wurde eine pixelbasierte binäre Maske erzeugt. Diese Maske wurde auf die einzelnen Kanäle der Aufnahme angewendet, sodass in den folgenden Auswertungen ausschließlich Pixel betrachtet wurden, die innerhalb von IBA1-positiven Zellen liegen. Dabei wurde der zu untersuchende Marker erneut mittels der Fluoreszenzintensität (Grenzwerte: größer 10% und kleiner 99% maximale Fluoreszenzintensität) identifiziert und quantifiziert.

Zellzählungen erfolgten Anhand von DAPI-positiven Zellen.

### 2.2.10 Protein- und Zytokinanalyse mit Meso Scale Diagnostics (MSD)

Für die Protein- und Zytokinanalyse wurden die Kulturen wie oben beschrieben kultiviert und am letzten Tag mit flüssigem Stickstoff eingefroren. Dieser Schritt ist relevant, damit die Zellen sofort tiefgefroren sind und keine weitere Zytokinproduktion erfolgt.

Je 3 technische Replikate (entsprechen  $n=1$ ) wurden zusammen in einem Vial eingefroren. Dabei wurde die 3D Kultur vom Überstand separiert, getrennt eingefroren und zu einem späteren Zeitpunkt separat analysiert. Dieser Vorgang wurde dreimal durchgeführt ( $n=3$ ).

Es wurden sowohl Mikrogliazell-Monokulturen, Neuronen-Monokulturen, als auch Mikrogliazell-Neuronen-Kokulturen in allen Bedingungen (-DOX/-LPS; -DOX/+LPS; +DOX/-LPS; +DOX/+LPS) für die spätere Analyse generiert.

Danach werden die einzelnen Proben (n=3) auf Eis aufgetaut und für die Analyse vorbereitet. Dabei bleiben die Überstände unverdünnt und aus den 3D Kulturen werden Zelllysate hergestellt. Dafür werden zu jeder Probe je 250 µl RIPA Puffer + Inhibitor hinzugefügt und für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Dabei gelangen die Proteine und Zytokine in den Überstand. Im Anschluss erfolgt die Zentrifugation bei 10.000 g für 10 Minuten bei 4 °C. Abschließend werden die neuen Überstände der Zelllysate in ein neues Eppendorf Tube überführt und können bis zur Messung bei -20 °C gelagert werden. Vor der eigentlichen Messung erfolgen Verdünnungsreihen, um auch sehr hohe Proteinmengen angemessen detektieren zu können. Für die eigentliche Analyse wurde dem Herstellerprotokoll gefolgt.

Die statistische Analyse der Daten erfolgte mathematisch mit einer Sigmoidfunktion unter Zuhilfenahme der Internetseite: <https://elisaanalysis.com/app> .

**Tab. 20:** MSD Kits

| <b>MSD Kits</b>                                       | <b>Messung</b>                                                      |
|-------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------|
| Human inflammatory 7plex Tissue culture kit K15008B   | IL8, TNF $\alpha$ , IL10, IFN $\gamma$ , IL1 $\beta$ , IL12p70, IL6 |
| V-PLEX A $\beta$ Peptide Panel (6E10) Kit (#K0080979) | A $\beta$ 40, A $\beta$ 38, A $\beta$ 42                            |

### 2.2.11 Durchflusszytometrie

Für die Durchflusszytometrie wurden die Kulturen, wie oben beschrieben, bis Tag 57 kultiviert und anschließend einmal mit PBS gewaschen. Im nächsten Schritt erfolgt die Lebendfärbung der Zellen. Dafür wird der primäre Antikörper, in den oben genannten Konzentrationen, in PBS gelöst und für 1 h auf Eis inkubiert. Dabei ist zu beachten, dass für jede Bedingung ungefärbte Kontrollen vorliegen, um später die einzelnen Zelltypen anhand ihrer Zelleigenschaften (Größe und Granularität) zu identifizieren. Daraufhin werden die Kulturen 3-mal für je 5 min mit PBS gewaschen. Nun wird der sekundäre

Antikörper wiederum in PBS gelöst und für 30 min auf Eis inkubiert. Pro Well wird je 100 $\mu$ l der Antikörper- PBS- Lösung hinzu pipettiert. Abschließend werden die Zellen durch ein Zellsieb (40 $\mu$ m) in je ein Durchflusszytometrie-Röhrchen überführt und vor dem Messen mit dem Vortexer für insgesamt 10 Sekunden auf der mittleren Stufe gemischt.

### 2.2.12 Statistische Analyseverfahren

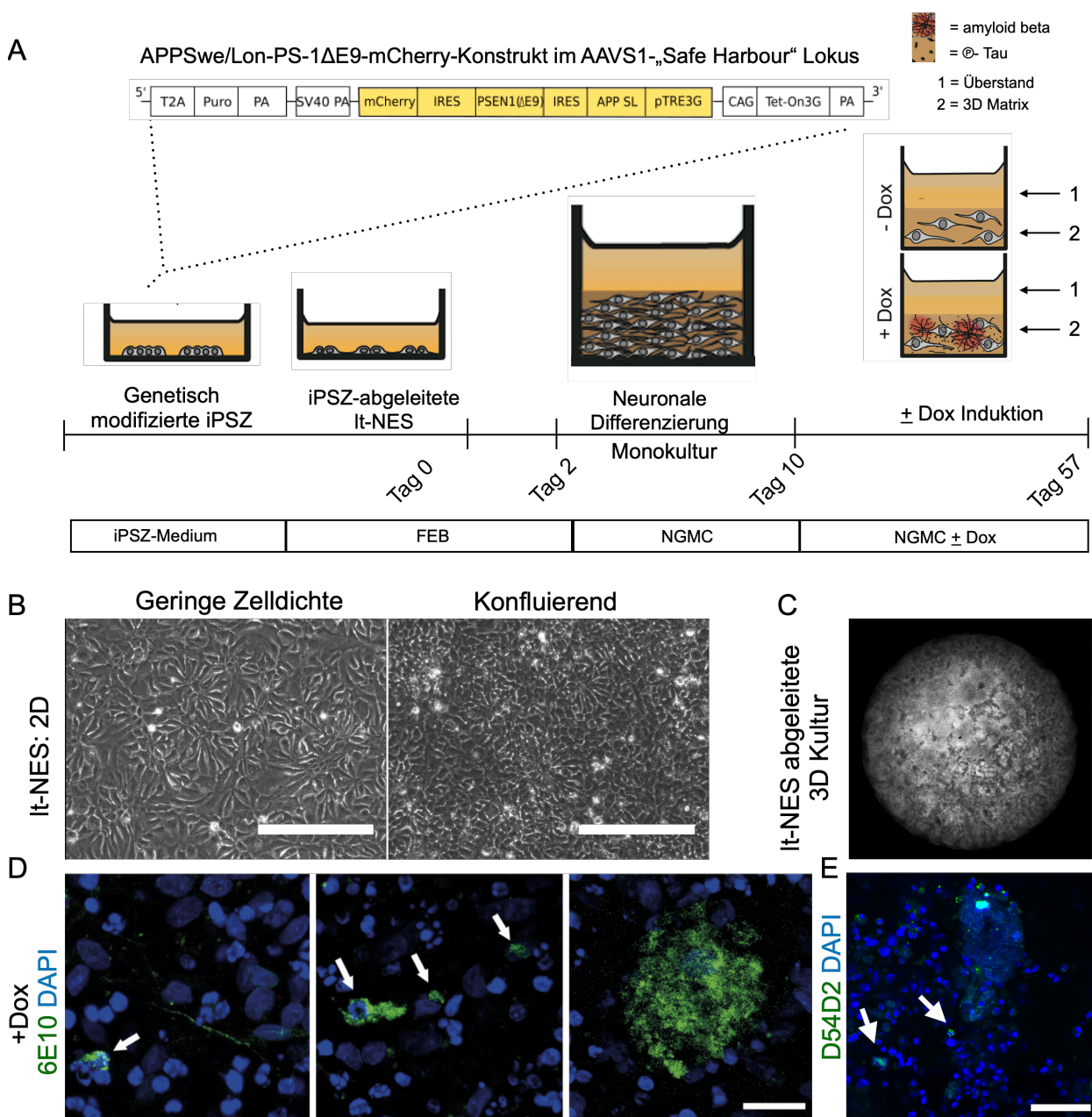
Die statistische Analyse erfolgte mit GraphPad und der R Software (ANOVA). Datensätze wurden mit dem Shapiro-Wilk Test auf Normalverteilung geprüft. Für einen Teil der Analysen wurde der Kruskal-Wallis Test mit Nemenyi's Nachtest verwendet. Diese Tests werden für nichtparametrische Analysen mit nicht normal verteilten Messwerten benötigt, wenn die Voraussetzungen für eine Varianzanalyse nicht erfüllt werden. Zusätzlich wurde der Wilcoxon-Mann-Whitney Test als nichtparametrisch statischer Test angewandt, wenn die Voraussetzungen für einen t-Test nicht erfüllt waren. Die Daten werden mit dem  $\pm$  Standardfehler des Mittelwerts ( $\pm$ SEM) gezeigt. Statistische Signifikanz ist wie folgt definiert: \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$  und. \*\*\*\*  $p < 0.0001$

### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Validierung des 3D Matrixmodells für AD: FAD-Transgenexpression führt zur Bildung von 6E10-positiven Aggregaten

Im Institut für Rekonstruktive Neurobiologie wurde ein induzierbares 3D Kultursystem etabliert, welches auf Basis transgener menschlicher Neurone eine fortgeschrittene AD Pathologie rekapitulieren kann.

Der erste Schritt der daliegenden Dissertation war es, dieses 3D AD Matrixmodell zu implementieren und anschließend zu validieren. Dafür wurden ebenfalls die bereits generierten It-NES Zellen verwendet, welche nach Roese-Koerner et al. (2016) aus iPSZ abgeleitet worden sind. Diese iPSZ tragen ein Tandemkonstrukt, bestehend aus mutiertem APP (K670N/M671L und V717I) und Presenilin1 (dE9) sowie dem Fluoreszenzreporter mCherry im AAVS1 „Safe harbour“ Lokus (induzierbares APP-PS1-mCherry Konstrukt (imAP)) (Abb. 3A). Die Transgenexpression kann über Zugabe von Doxycyclin, einem membranpermeablen Tetrazyklinderivat, gesteuert werden. Die Induktion erfolgt chronisch, sodass die Kasette 6 Wochen lang die FAD-assoziierten Risikogene exprimiert (Abb. 3A). Um 3D Kulturen anzulegen, werden die It-NES zuerst in 2D unter EGF und FGF2 Zugabe kultiviert, um den Stammzellcharakter während der Expansion zu erhalten. Wenn die Kulturen Konfluenz erreichen (Abb. 3B), können 3D Kulturen angelegt werden (Abb. 3C). Während eines Zeitraums von 57 Tagen erfolgt die neuronale Differenzierung der Zellen und es bilden sich nach Doxycyclin-Zugabe sukzessive A $\beta$ -Aggregate (Abb. 3D). A $\beta$ -Aggregation wurde mittels Immunfärbungen (Antikörper: 6E10 und D54D2) in induzierten und uninduzierten Kulturen bestätigt (Abb. 3D, 3E). Ohne Doxycyclin traten 6E10-positive Aggregate nur selten und in geringer Größe auf. (Hebisch, Kamin et al., in Vorbereitung).



**Abb. 3:** FAD-Transgenexpression führt im 3D AD-Modell zur Bildung von 6E10-positiven Aggregaten

(A) Induktionsschema. Transgene humane iPSZ werden in It-NES (It-NES Zellen) überführt und 57 Tage in einer 3D Matrix zu neuronalen Kulturen differenziert. (B) Phasenkontrastaufnahme der It-NES Kulturen in unterschiedlichen Dichten in 2D. Maßstab: 200  $\mu$ m (C) Repräsentative Phasenkontrastaufnahme einer neu angelegten 3D Kultur mit It-NES Zellen. Aufnahme eines Wells einer 96 Well Zellkulturplatte. (D) Repräsentative Konfokalaufnahmen von 6E10 positiven Aggregaten in 7 Wochen induzierten 3D Kulturen. Pfeile verweisen auf 6E10 positive Strukturen. Maßstab: 25  $\mu$ m (E) Repräsentative Konfokalaufnahmen von D54D2 positiven Aggregaten in 7 Wochen induzierten 3D Kulturen. Pfeile zeigen D54D2 positive Strukturen. Maßstab: 50  $\mu$ m (M. Hebisch, V. Kamin et al., in Vorbereitung)

### 3.1.1 Induktion der FAD-Transgene erhöht die Sekretion von A $\beta$ 38/40/42 sowie den A $\beta$ 42/40 Quotienten

Um den Ausgangswert der A $\beta$ -Konzentration in den 6 Wochen alten 3D Kulturen zu validieren, wurden sowohl der Überstand, der für insgesamt 24h konditioniert wurde, als auch die 3D Matrix mit dem MSD V-PLEX A $\beta$  Peptide Panels (6E10) Kit analysiert. Es wurden die Konzentrationen der A $\beta$  Spezies 38/40/42 sowie der A $\beta$  42/40 Quotient ermittelt, welcher einen guten Indikator für die A $\beta$ -Toxizität darstellt.

Sowohl im Überstand der 3D Kulturen als auch in der 3D Matrix ließen sich signifikant erhöhte Konzentrationen aller ermittelten A $\beta$  Spezies unter Doxycyclinzugabe (+Dox) feststellen. Die 3D Matrix wies durchgehend höhere Amyloidkonzentrationen im Vergleich zum korrespondierenden Überstand auf.

Für die A $\beta$  38 Spezies ließ sich im Überstand ein vierfacher Anstieg von  $0,22 \pm 0,08$  ng/ml (Standardfehler (SE)) (-Dox) auf  $0,82 \pm 0,42$  ng/ml (+Dox) detektieren. Die A $\beta$  38 Konzentration in der uninduzierten 3D Matrix war unter der Detektionsgrenze und lag unter Doxycyclinzugabe bei  $5,14 \pm 2,49$  ng/ml (+Dox) (Abb. 4A).

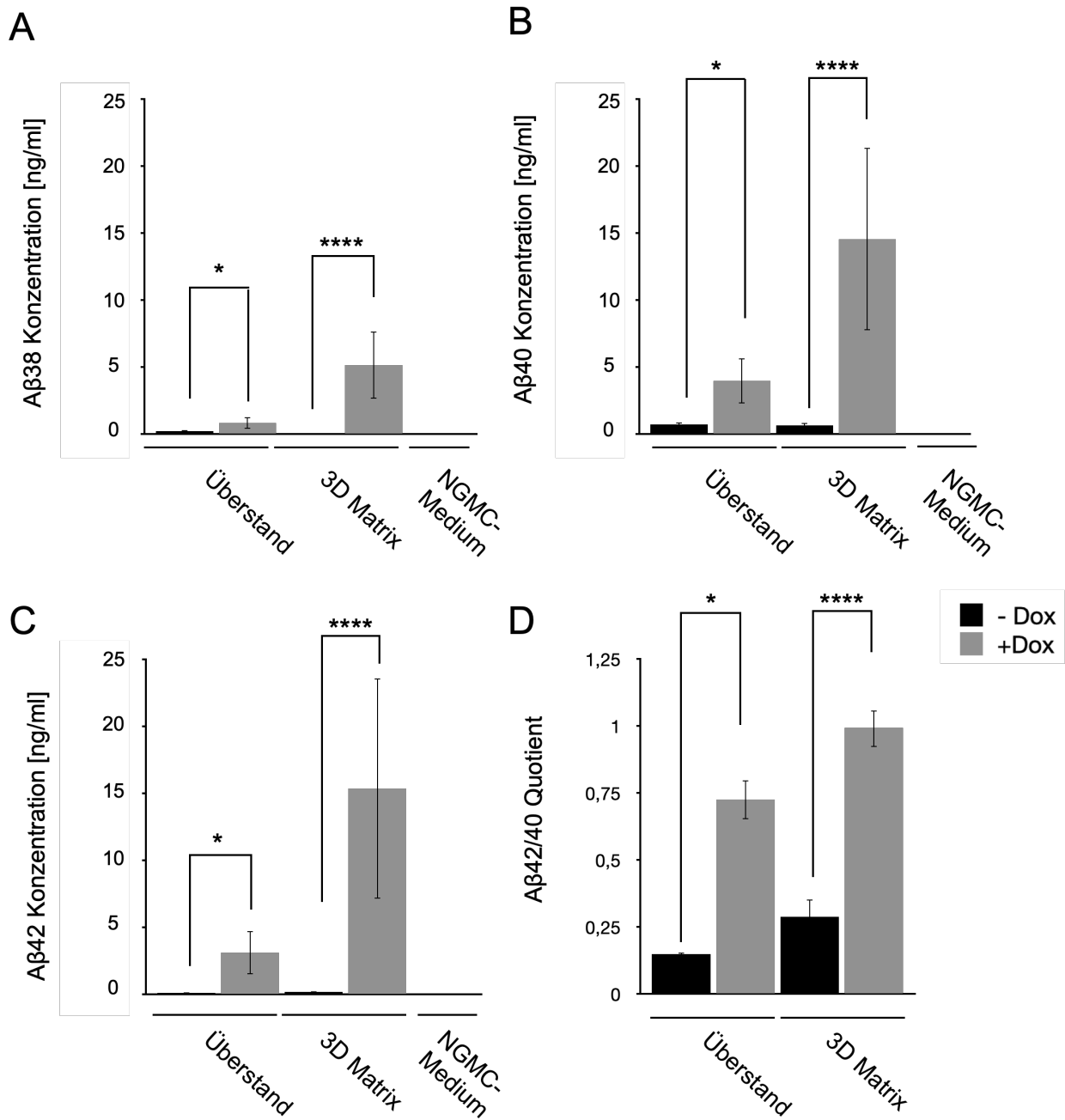
Für A $\beta$  40 ließ sich im Überstand eine Erhöhung um den Faktor 5,6 (von  $0,7 \pm 0,17$  ng/ml (-Dox) auf  $3,95 \pm 1,68$  ng/ml (+Dox)) feststellen. Die Matrixfraktion zeigte einen Wert von  $0,64 \pm 0,18$  ng/ml (-Dox) in Abwesenheit von Doxycyclin und stieg signifikant auf  $14,54 \pm 6,8$  ng/ml (+Dox) unter Doxycyclin (Abb. 4B).

Der A $\beta$  42 Gehalt in induzierten Kulturen stieg im Überstand um das 30-fache im Vergleich zu dem Überstand der uninduzierten Kulturen. Es wurden Werte von  $0,11 \pm 0,03$  ng/ml (-Dox) und  $3,1 \pm 1,62$  ng/ml (+Dox) ermittelt. Die 3D Matrix zeigte einen 95-fachen Anstieg unter Doxycyclinzugabe und stieg von  $0,16 \pm 0,03$  ng/ml (-Dox) auf  $15,35 \pm 8,22$  ng/ml (+Dox) (Abb. 4C).

Das Verhältnis des A $\beta$  42/40 Quotienten erhöhte sich in der 3D Matrix unter Doxycyclin um das 3,5 fache von  $0,29 \pm 0,06$  (-Dox) auf  $0,99 \pm 0,07$  (+Dox). Dieses Verhältnis spiegelt sich auch im Überstand der Kulturen wider. Der induzierte Überstand wies ein 5-fach höheres A $\beta$  42/40 Verhältnis auf ( $0,15 \pm 0,01$  (-Dox);  $0,72 \pm 0,07$  (+Dox)) (Abb. 4D).

Das ebenfalls gemessene FEB-Medium diene als Negativkontrolle sowie zum Ausschluss eines Mediumeffekts (Bias) und zeigte erwartungsgemäß keinen messbaren A $\beta$ -Gehalt.

Neben der genauen Bestimmung der A $\beta$  Konzentration und damit der Validierung des neu etablierten 3D Systems, etabliert dieses Experiment Ausgangswerte um eine Veränderung im Rahmen der Kokultur feststellen zu können.

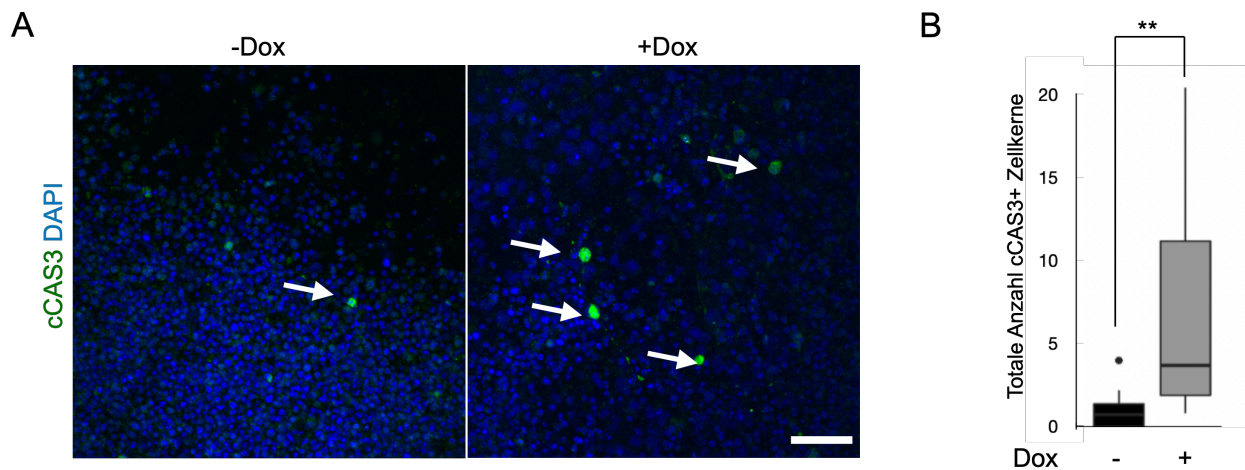


**Abb. 4:** Bestimmung der Aβ Konzentration und des Aβ 42/40 Quotienten in 3D Matrixkulturen

(A) Erhöhte Aβ 38 Konzentration im Überstand und in der 3D Matrix von 6 Wochen induzierten 3D Matrixkulturen. (B) Erhöhte Aβ 40 Konzentration im Überstand und in der 3D Matrix von 6 Wochen induzierten 3D Matrixkulturen. (C) Erhöhte Aβ 42 Konzentration im Überstand und in der 3D Matrix von 6 Wochen induzierten 3D Matrixkulturen. (D) Erhöhte Aβ 42/40 Ratio im Überstand und in der 3D Matrixkultur von 6 Wochen induzierten 3D Matrixkulturen. Der Überstand wurde für insgesamt 24h konditioniert. Messung in ng/ml (M. Hebisch, V. Kamin et al., in Vorbereitung), n=3. Darstellung als Mittelwert ± Standardfehler. Kruskal-Wallis Test mit Nemenyi's Nachtest. \*: p<0.05, \*\*\*\*: p<0.0001.

### 3.1.2 Transgeninduktion verstärkt cCaspase-3 Aktivierung in neuronalen 3D Matrixkulturen

Die zelluläre Degeneration stellt, neben der Bildung von Amyloid und der intrazellulären Akkumulation von phospho-Tau (Vgl. Abb. 1) (Hebisch, 2020), ein bedeutendes Kennzeichen der Alzheimer Erkrankung dar. Um degenerative Prozesse im vorliegenden 3D AD Matrixmodell zu untersuchen, erfolgte eine Färbung der 6 Wochen alten Kulturen für aktive cCaspase-3 (Apoptosemarker) (Abb. 5A). Diese cCaspase gehört zu den Effektorcaspasen und ermöglicht eine geregelte Eliminierung apoptotischer Zellen. Ein positiver Nachweis korreliert somit mit der Anzahl apoptotischer Zellen. Induzierte Kulturen zeigten eine 5-fache Erhöhung der cCAS3-positiven Zellkerne (Abb. 5B).



**Abb. 5:** Erhöhte Apoptoserate in 6 Wochen alten 3D AD Matrixkulturen.

(A) Repräsentative Konfokalaufnahmen der cCAS3-Expression in 6 Wochen-alten 3D Matrixkulturen. Pfeile zeigen cCAS-positiv Zellkerne. Maßstab: 100  $\mu$ m. (B) Manuelle Quantifizierung der cCAS positiven Zellkerne in 6 Wochen-alten 3D Matrixkulturen. Statistische Auswertung in Zusammenarbeit mit M. Hebisch (n = 3, Analyse von 5 randomisiert ausgewählten Konfokalbildern pro Replik, 20er Objektiv, wie dargestellt). Darstellung als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler. Wilcoxon-Mann-Whitney Test \*\*:  $p < 0.01$ .

### 3.1.3 Transgeninduktion führt zu verstärkter GFAP Expression

Analog zu den Arbeiten von Choi und Kollegen (2014) in ReN VM Zellen (Choi et al., 2014) entstehen aus It-NES Zellen unter Wachstumsfaktorentzug neben Neuronen noch andere Zellarten des ZNS, wie z.B. Astrozyten während des Kultivierungszeitraums von 6 Wochen. Um die Anwesenheit der Astrozyten im vorliegenden 3D AD Matrixmodell zu

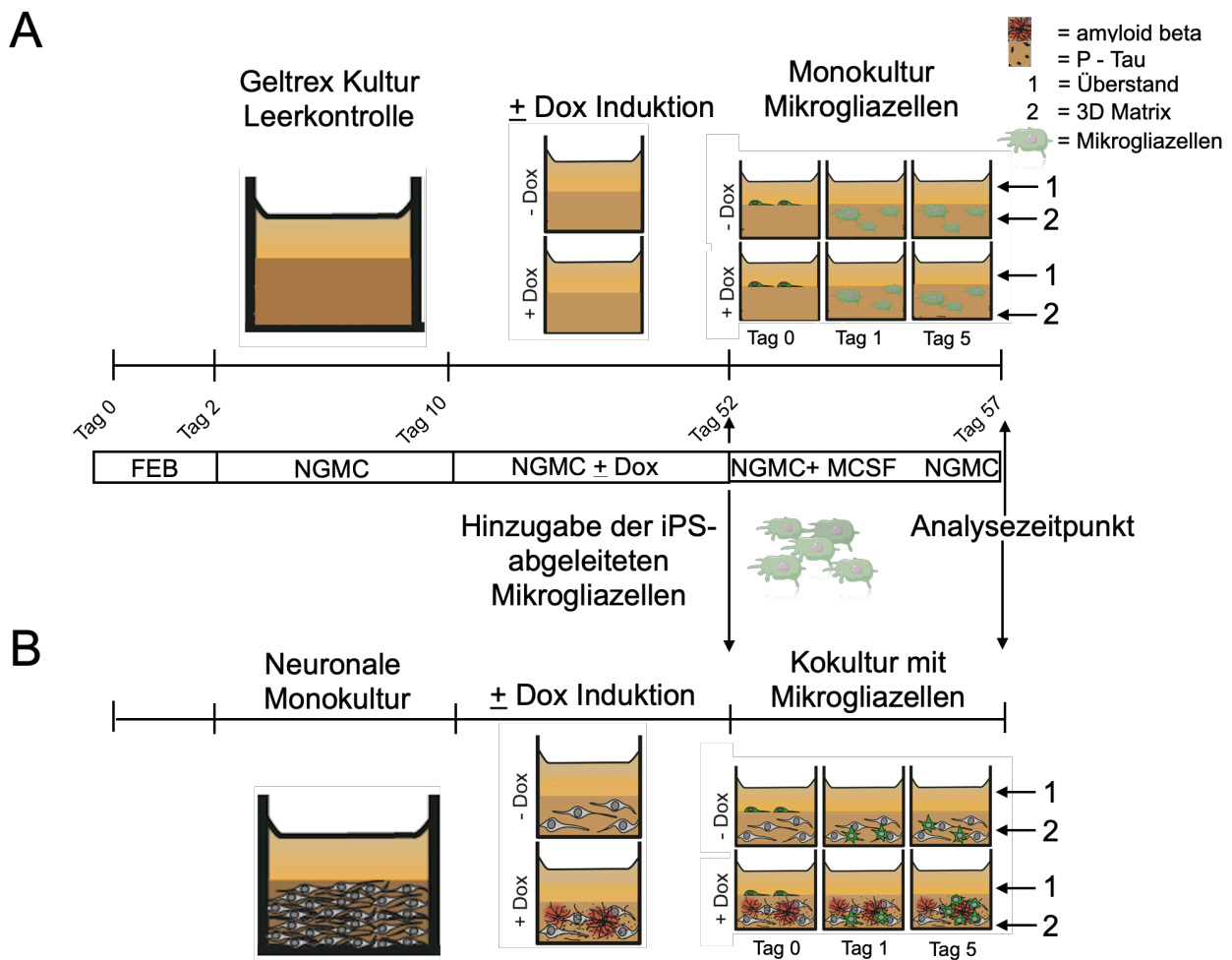
bestätigen, erfolgte eine Färbung mit S100 $\beta$ . Dieser Marker wird vorwiegend im Zytoplasma und im Kern von glialen Zellen, besonders Astrozyten, exprimiert (Steiner et al., 2011). Sowohl in den induzierten, als auch in den uninduzierten Kulturbedingungen konnten S100 $\beta$ -positive Zellen nachgewiesen werden (Abb. 6A). Die Fluoreszenzintensität pro Fläche stieg im 3D AD Matrixmodell (imAP) von  $15 \times 10^6 \pm 3 \times 10^6$  (-Dox) auf einen Wert von  $31 \times 10^6 \pm 5 \times 10^6$  (+Dox) (Abb. 6B).

Als weiterer Marker wurde eine Immunfärbung gegen das saure Gliafaserprotein (GFAP) durchgeführt. In induzierten Kulturen konnte ein signifikant höherer GFAP Wert ( $30 \times 10^6 \pm 7 \times 10^6$  FL/Areal) im Vergleich zu uninduzierten Kulturen ( $9 \times 10^6 \pm 3 \times 10^6$  FL/Areal) nachgewiesen werden (Abb. 6B).

Um einen Doxycyclin Effekt auf Astrozyten ausschließen zu können, wurden nicht transgene It-NES Zellen (Zelllinie: iLB-C14m-s11 p42 It-NES p), welche von C. Thiele generiert worden sind, analog für 6 Wochen in der 3D Matrix, sowohl in An- als auch Abwesenheit von Doxycyclin, kultiviert. Anschließend wurde die S100 $\beta$ - und GFAP-Expression ermittelt. Dabei lag die GFAP Expression bei  $14 \times 10^6 \pm 3 \times 10^6$  (-Dox) und  $6,6 \times 10^6 \pm 2 \times 10^6$  (+Dox); das Niveau der S100 $\beta$  Expression blieb bei  $17 \times 10^6 \pm 10,6 \times 10^6$  (-Dox) bzw.  $14 \times 10^6 \pm 4 \times 10^6$  (+Dox). Es zeigte sich ein stabiles Expressionsniveau beider Marker unter Doxycyclin, dabei waren die Werte mit den nicht induzierten 3D AD Matrixkulturen vergleichbar. Weiterhin konnte eine signifikant erhöhte GFAP Expression in induzierten 3D AD Matrixkulturen in Bezug auf die nicht transgenen It-NES gezeigt werden.



Kokultursystem etabliert. Dafür wurden zum einen 20.000 iPsdMiG pro Well zu 6 Wochen alten 3D Matrixkulturen hinzugegeben, um die Interaktion der iPsdMiG mit den neuronalen Kulturreihen sowohl unter Doxycyclin als auch in Abwesenheit der AD Pathologie (-Dox) zu untersuchen. Zum anderen wurden die iPsdMiG zur Anlage von Monokulturen verwendet, um mögliche Interaktionen mit dem Medium bzw. den Kulturbedingungen an sich auszuschließen. Insgesamt verblieben die iPsdMiG 5 Tage in den oben beschriebenen Kulturen und wurden anschließend analysiert.



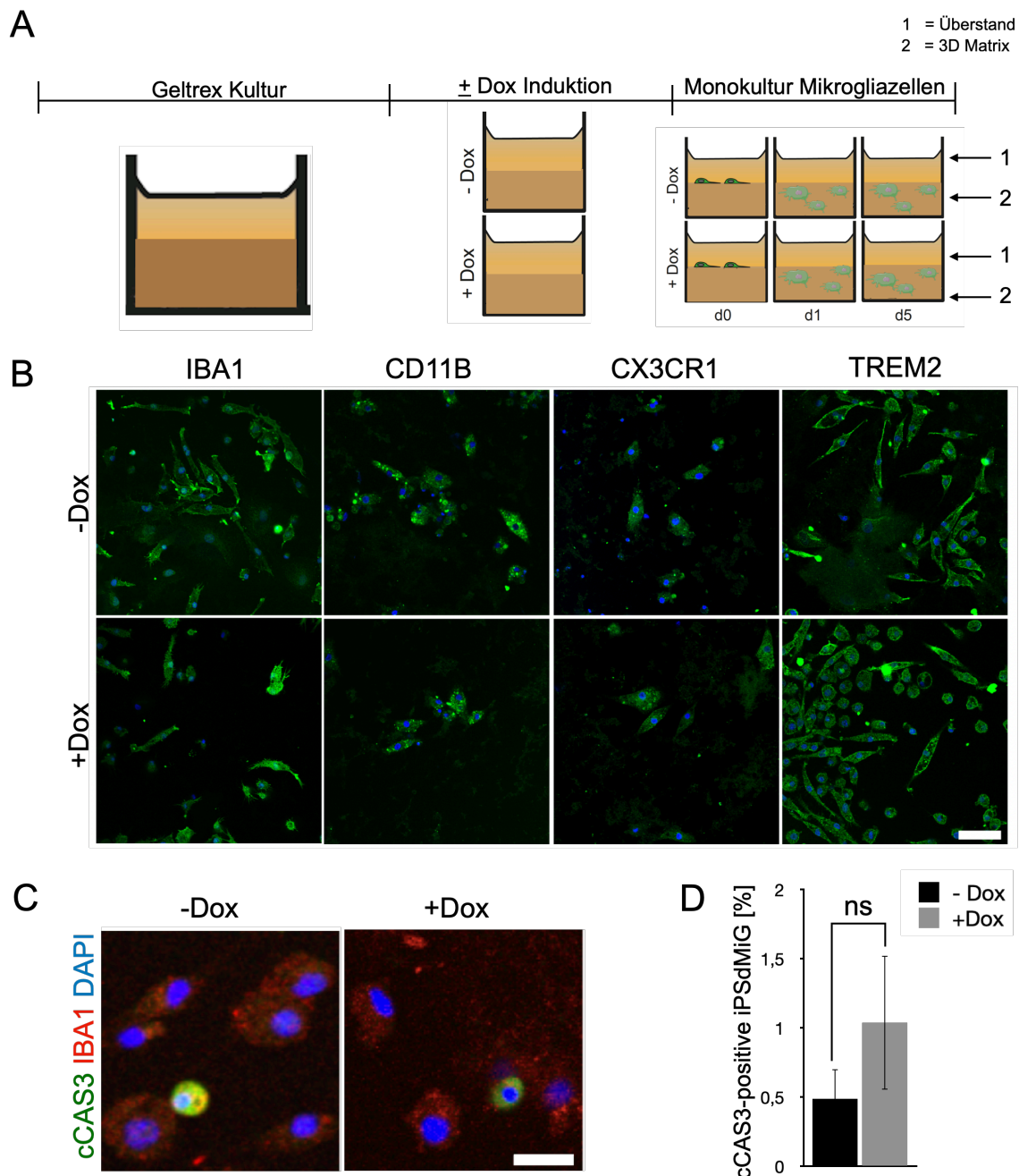
**Abb. 7:** Differenzierungsplan der iPsdMiG Mono- und Kokulturen

(A) Schema der 3D Mono-Kulturen. Zugabe von 20.000 iPsdMiGs am 52. Tag für einen Kultivierungszeitraum von 5 Tagen. (B) Differenzierungsplan der Kokultur. Kultivierung erfolgt analog zu den neuronalen Monokulturen (Vgl. Abb. 3A). iPsdMiG werden am 52. Tag zu den neuronalen 3D AD Matrixkulturen im Verhältnis 1:10 relativ zur Ausgangszellzahl der It-NES zu Versuchsbeginn hinzugefügt und für 5 Tage kokultiviert.

### 3.2.1 Mikrogliazellen überleben und integrieren sich in der 3D Matrixkultur

Um eine Auswirkung der Kulturbedingungen und der Doxycyclinzugabe auf die Mikrogliazellen zu prüfen, wurden die iPsdMiGs zuerst zu den zellfreien 3D Kontrollkulturen gegeben (Abb. 8A) und für 5 Tage kultiviert. Nach Migration der Zellen in die 3D Matrix erfolgte eine mikroskopische Untersuchung auf die Expression typischer mikroglialer Marker (CD11B) und Rezeptoren (IBA1, CX3CR1, TREM2) (Abb. 8B).

In den Kontrollkulturen ohne Doxycyclin war eine stabile Expression der hämatopoetischen Marker zu verzeichnen. Diese blieb auch unter Hinzunahme des Antibiotikums stabil. Als Vitalitätskriterium zeigten die Mikrogliazellen einen bipolaren Phänotyp mit intaktem Nukleus (Abb. 8B). Um weiterhin die Lebensfähigkeit der iPsdMiG zu untersuchen, wurden apoptotische Zellen anhand der Aktivierung der Effektorcaspase (aktiver cCaspase-3) identifiziert und auf 4',6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI)-positive Zellkerne normalisiert (Abb. 8C). In Abwesenheit von Doxycyclin lag der Wert bei  $0,49 \pm 0,21$  % und blieb auch nach Zugabe von Doxycyclin mit  $1,04 \pm 0,48$  % vergleichbar (Abb. 8D). Insgesamt zeigten die iPsdMiG eine geringe Apoptoserate, bei der die Zugabe des Antibiotikums Doxycyclin keinen verstärkenden Einfluss auf die Überlebensfähigkeit der Zellen zeigte.

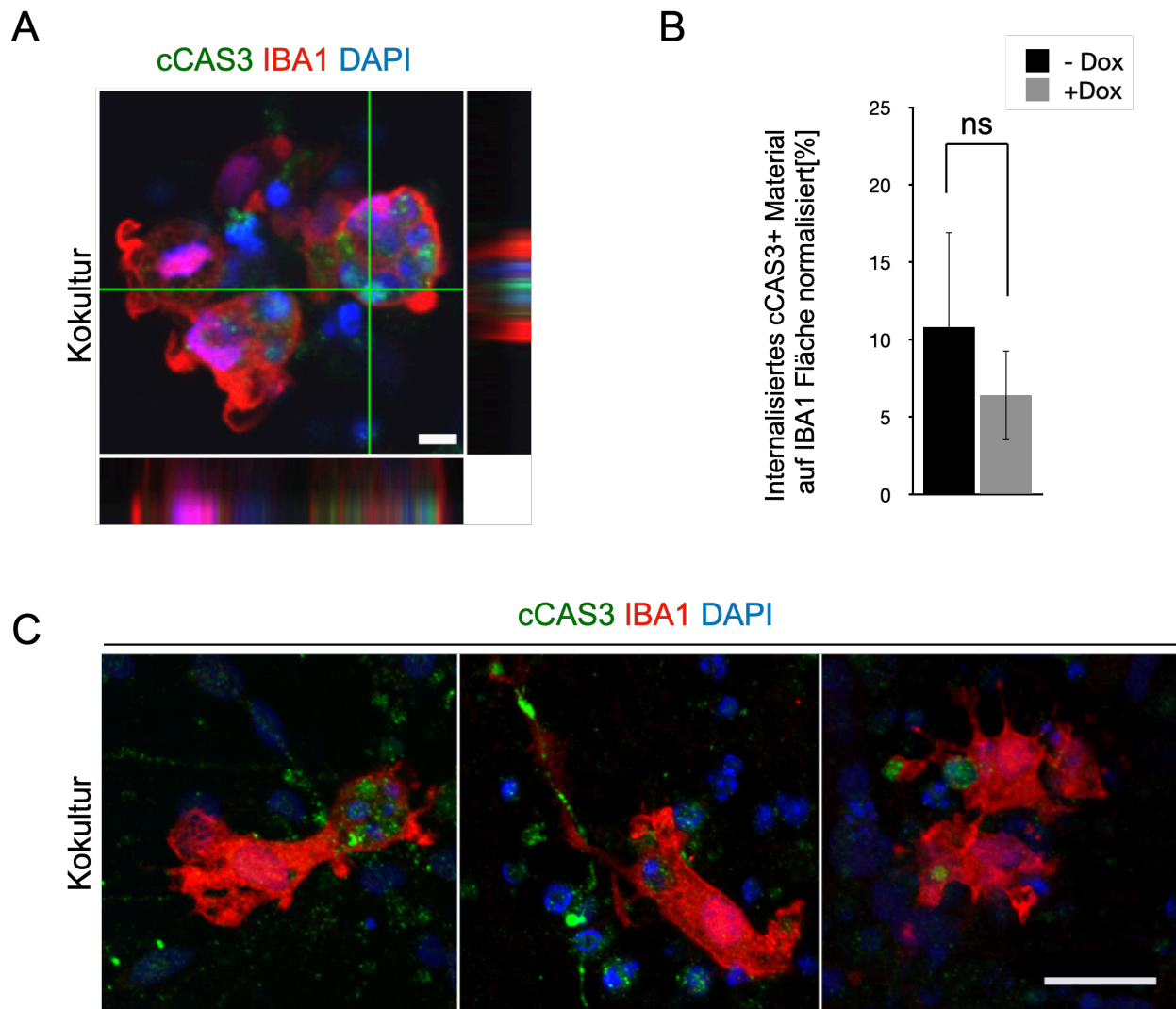


**Abb. 8:** Oberflächenmarkerprofil und Apoptoserate in iPSdMiG unter den 3D Monokulturbedingungen

(A) Differenzierungsplan der 3D Mono-Kulturen. Zugabe von 20.000 iPSdMiGs am 52. Tag für einen Kultivierungszeitraum von 5 Tagen. (B) Validierungspanel der Expression typischer hämatopoetischer Oberflächenmarker (CD11B) und Rezeptoren (IBA1, CX3CR1, TREM2) in iPSdMiG. (C) Repräsentative Konfokalaufnahmen der cCAS3-Expression in iPSdMiG Monokulturen. Maßstab: 25  $\mu$ m. (D) Quantifizierung der cCAS3-positiven Zellkerne in iPSdMiG; Normalisierung auf DAPI positive Zellkerne.  $n = 3$ , Analyse von 10 randomisiert ausgewählten Konfokalbildern pro Replikat, 40er Objektiv. Darstellung als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler. Wilcoxon-Mann-Whitney Test (ns = nicht signifikant).

### 3.2.2 Mikrogliazellen nehmen apoptotische Zellen im Kokultursystem auf

Nachdem das Überleben der Zellen in den 3D Kulturbedingungen gezeigt werden konnte, wurde das Verhalten der iPSdMiG in der Kokultur mit It-NES abgeleiteten Neuronen untersucht. Ein besonderes Augenmerk lag auf der phagozytischen Aktivität der iPSdMiG. Mikrogliazellen sind als spezialisierte Phagozyten des ZNS in der Lage, sterbende Zellen (Janda et al., 2018) und Proteine, wie A $\beta$ , aufzunehmen. 3D AD Kokulturen wurden mit Antikörpern gegen cCAS3 und IBA1 gefärbt und das apoptotische Material innerhalb der IBA1-positiven iPSdMiG bestimmt (Abb. 9A). Die Normalisierung erfolgte auf das Areal der IBA1-positiven Zellen. Zwischen  $6,39 \pm 2,89$  % (+Dox) und  $10,81 \pm 6,13$  % (-Dox) des Zellareals der IBA1-positiven Zellen enthielt cCAS3-positives Material (Abb. 9B). Die konfokalen Aufnahmen zeigten weiterhin eine spezifische Kollokalisierung der iPSdMiG mit cCAS3-positiven Nuklei (Abb. 9C).



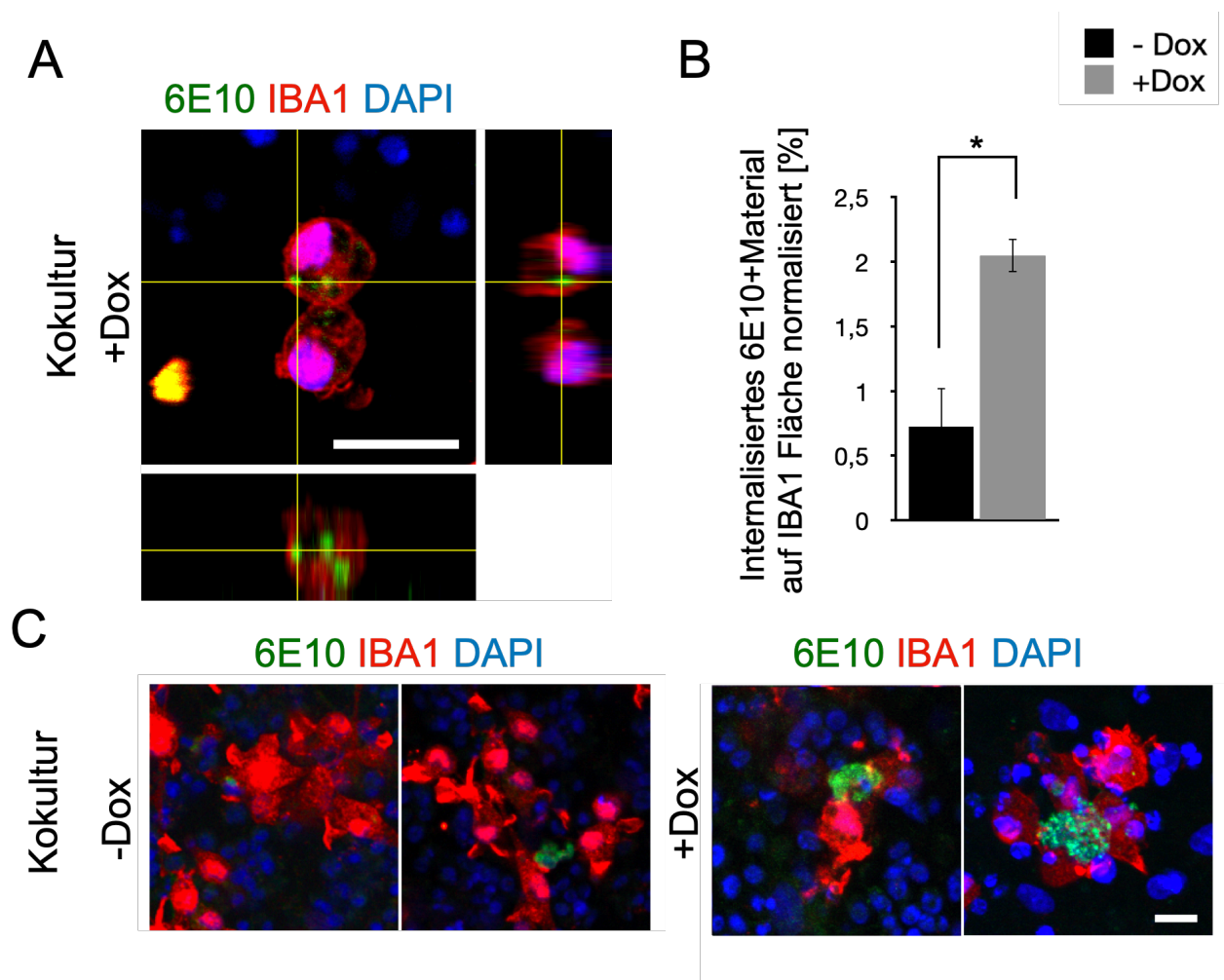
**Abb. 9:** Internalisiertes cCAS3-positives Material in iPSdMiG in 6 Wochen alten 3D Kokulturen

(A) Repräsentative 3D Rekonstruktion einer konfokalen Z-Stack Aufnahme von iPSdMiG in 6 Wochen alten 3D Kokulturen. Maßstab: 20  $\mu$ m. (B) Automatisierte Quantifizierung des cCAS3-positiven Materials innerhalb von IBA1-positiven iPSdMiG in den Konfokalaufnahmen von 6 Wochen alten 3D Kokulturen. Normalisierung auf IBA1 positive Fläche. (Angaben in Prozent; n=3, Analyse von 10 randomisiert ausgewählten Konfokalbildern pro Replikat, 20er Objektiv). Darstellung als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler. Wilcoxon-Mann-Whitney Test (ns = nicht signifikant). (C) Drei repräsentative Konfokalaufnahmen von iPSdMiG gruppiert um cCAS3-positive Zellen in 6 Wochen alten 3D Kokulturen Maßstab: 20  $\mu$ m.

### 3.2.3 Mikrogliazellen umgeben und phagozytieren 6E10-positive Aggregate

Nachdem die Aufnahme von cCAS3-positiven Zellkernen untersucht worden war, wurde weiterhin die Phagozytose von Amyloid durch iPSdMiG analysiert. Dafür wurden immunzytochemische Färbungen durchgeführt, um die Kollokalisierung zwischen 6E10 und IBA1 zu ermitteln. Dabei konnte phagozytiertes A $\beta$  mittels konfokaler Z-Stack Rekonstruktion innerhalb der iPSdMiG nachgewiesen werden (Abb. 10A). Es wurde weiterhin das 6E10-positive Material innerhalb der IBA1-positiven iPSdMiG in Prozent bestimmt. Dabei zeigte sich ein signifikanter Anstieg von  $0,72 \pm 0,3\%$  auf  $2,05 \pm 0,13\%$  in induzierten Kokulturen (Abb. 10B). Die Normalisierung erfolgte auch hier auf das Areal der IBA1-positiven Zellen.

Neben der Aufnahme von 6E10-positivem Material zeigten die iPSdMiG, nach der fünftägigen Kokultivierung, eine enge Interaktion mit 6E10-positiven Aggregaten. Multiple Konfokalaufnahmen zeigten iPSdMiG, welche sich um 6E10-positive Aggregate gruppierten (Abb. 10C).



**Abb. 10:** Mikrogliazellen umgeben und phagozytieren 6E10-positive Aggregate in 6 Wochen alten 3D AD Kokulturen

(A) Repräsentative 3D Rekonstruktion einer konfokalen Z-Stack Aufnahme zeigt phagozytirtes 6E10-positives Material im Zytoplasma von IBA1-positiven iPSdMiG. Maßstab: 25  $\mu\text{m}$ . (B) Quantifizierung von 6E10-positivem Material in iPSdMiG; Normalisierung auf IBA1 positive Fläche. Angaben in Prozent;  $n=3$ . Analyse von 10 randomisiert ausgewählten Konfokalbildern pro Replik, 40er Objektiv. Darstellung als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler. Wilcoxon-Mann-Whitney Test. \*:  $p<0.05$  (C) Jeweils zwei repräsentative Konfokalaufnahmen von iPSdMiG in enger Kolokalisation mit 6E10-positiven Aggregaten. Maßstab: 20  $\mu\text{m}$ .

### 3.2.4 Mikrogliazellen verringern die A $\beta$ 42/40 Ratio in 3D Kokulturen

Nachdem Anzeichen für A $\beta$ -Phagozytose durch iPSdMiG in Kokultur (Vgl. Abb. 10) gefunden wurden, sollte als nächstes überprüft werden, ob die A $\beta$ -Last während der 5-tägigen Kokultivierung messbar sinkt. Die Analyse erfolgte analog zu den neuronalen Monokulturen durch das MSD V-PLEX A $\beta$  Peptide Panel (6E10) Kit. Allgemein zeigte die Analyse bei Zugabe von Mikrogliazellen einen nicht signifikanten Trend in der Reduktion des A $\beta$  Gehalts in den induzierten Kokulturen im Vergleich zu neuronalen Monokulturen. Dies ließ sich, in geringerem Ausmaß, auch in uninduzierten Kulturen und in den Überständen nachvollziehen. Für alle drei A $\beta$  Spezies (A $\beta$  38/40/42) war in den Kokulturen unter Doxycyclin-Induktion die stärkste, jedoch weiterhin nicht signifikante Verringerung detektierbar.

In der 3D Matrix der induzierten Kulturen zeigte sich eine durchschnittliche Änderung der A $\beta$  38 Konzentration von  $5 \pm 2$  ng/ml in der neuronalen Monokultur auf  $3 \pm 1$  ng/ml in Kokultur (Abb. 11A). Gleichzeitig lag die A $\beta$  40 Konzentration durchschnittlich bei  $14 \pm 6$  ng/ml in der induzierten Monokultur und bei  $12 \pm 5$  ng/ml in der induzierten Kokultur (Abb. 11B). Bei der A $\beta$  42 Konzentration war ein Wert von  $15 \pm 8$  ng/ml in der neuronalen Monokultur und  $7 \pm 2$  ng/ml in Kokultur zu vermerken (Abb. 11C).

Im Überstand der mit Doxycyclin induzierten 3D Matrixkulturen lag die durchschnittliche A $\beta$  38 Konzentration der neuronalen Monokultur bei  $0,8 \pm 0,4$  ng/ml und  $1 \pm 0,2$  ng/ml in Kokultur (Abb. 11A). Die A $\beta$  40 Konzentration lag im Überstand durchschnittlich bei  $4 \pm 1,6$  ng/ml (Monokultur) und  $3 \pm 0,1$  ng/ml (Kokultur). Die Werte der A $\beta$  42 Spezies halbierten sich nicht signifikant von  $3 \pm 1,6$  ng/ml (neuronale Monokultur) auf  $1,5 \pm 0,2$  ng/ml in Kokultur (Abb. 11B, C).

In den uninduzierten Kulturen waren die Ausgangswerte der A $\beta$  Spezies deutlich geringer. Es zeigte sich jedoch ein ähnlicher, nicht signifikanter Trend in der Reduktion der detektierten A $\beta$  Spezies. In der uninduzierten 3D Matrix war die A $\beta$  38 Konzentration in der Matrixfraktion nicht detektierbar. In der Kokultur lag der Wert bei  $0,4 \pm 0,1$  ng/ml (Abb. 11A). Es konnte ein A $\beta$  40 Wert von  $0,6 \pm 0,1$  ng/ml (Monokultur) und  $0,5 \pm 0,1$  ng/ml

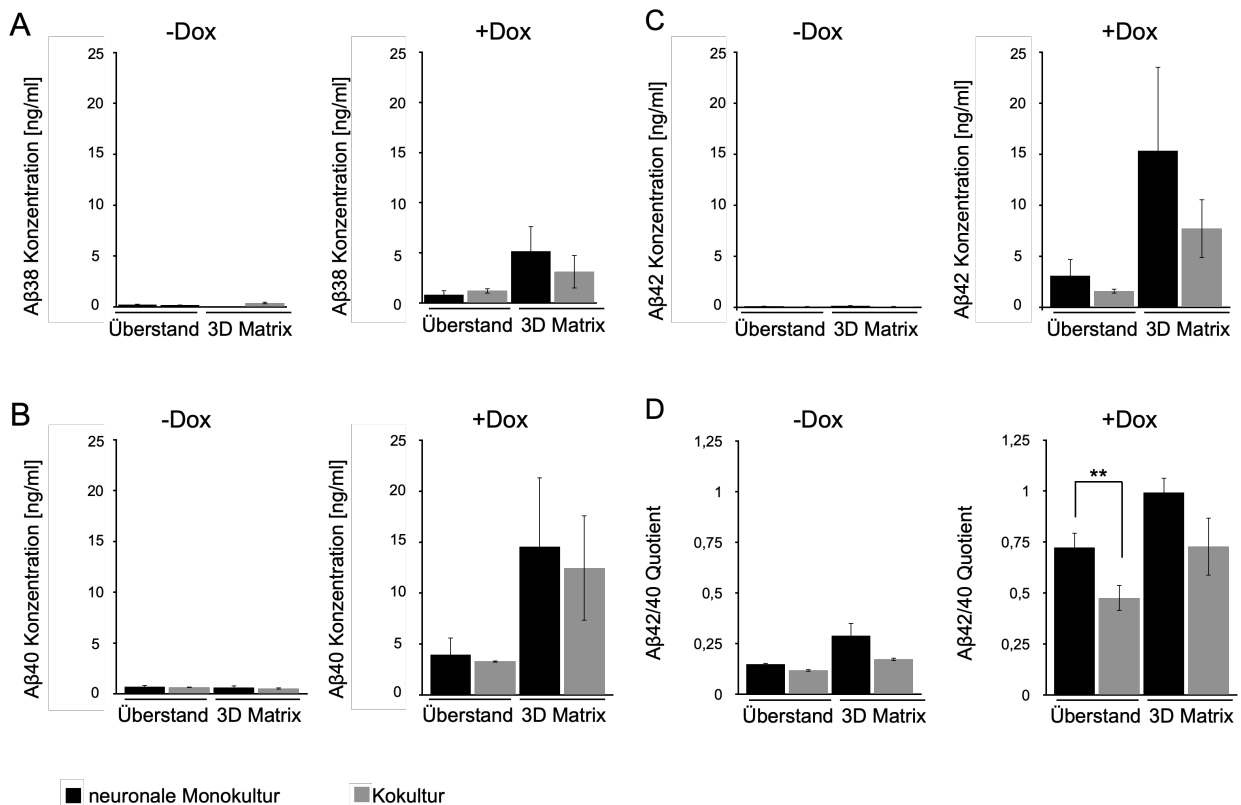
(Kokultur) gemessen werden (Abb. 11B). A $\beta$  42 Werte lagen bei  $0,2 \pm 0,03$  ng/ml in der neuronalen Monokultur und  $0,1 \pm 0,01$  ng/ml in der Kokultur (Abb. 11C).

Im Überstand der uninduzierten Kulturen zeigte sich eine durchschnittliche A $\beta$  38 Konzentration von  $0,2 \pm 0,08$  ng/ml in Abwesenheit von iPSdMiG und  $0,18 \pm 0,02$  ng/ml unter Hinzunahme der Immunzellen (Abb. 11A). Die durchschnittlichen A $\beta$  40 Werte lagen in der neuronalen Monokultur bei  $0,7 \pm 0,2$  ng/ml und  $0,6 \pm 0,07$  ng/ml unter Kokulturbedingungen (Abb. 11B). Die A $\beta$  42 Werte lagen bei  $0,1 \pm 0,02$  ng/ml ohne Mikroglia und  $0,08 \pm 0,008$  ng/ml mit den Mikrogliazellen (Abb. 11C).

Neben der totalen A $\beta$  Konzentration wurde ebenfalls der A $\beta$  42/40 Quotient ermittelt.

Im doxycyclininduzierten Überstand zeigte sich unter Hinzunahme der Mikrogliazellen eine signifikante Verringerung des Quotienten von  $0,72 \pm 0,07$  (+Dox) auf  $0,48 \pm 0,06$  (+Dox). Interessanterweise veränderte die Zugabe von Mikrogliazellen in Abwesenheit von Doxycyclin das A $\beta$  42/40-Verhältnis im Überstand im Vergleich zu neuronalen Monokulturen nicht signifikant; es war ein Wert von  $0,15 \pm 0,01$  und  $0,12 \pm 0,01$  zu detektieren (Abb. 11D). Es zeigte sich in der 3D Matrix der Monokultur ein Wert von  $0,99 \pm 0,07$  (+Dox) bzw.  $0,29 \pm 0,06$  (-Dox) und  $0,73 \pm 0,14$  (+Dox) bzw.  $0,17 \pm 0,01$  (-Dox) in der Kokultur (Abb. 11 D).

Die signifikante Reduktion der A $\beta$  42/40 Ratio im Überstand und die nicht signifikante Reduktionstendenz der drei Amyloid Spezies könnten als ein weiteres Anzeichen für eine aktive Phagozytose der iPSdMiG gewertet werden.



**Abb. 11:** Bestimmung der Aβ Konzentration und des Aβ 42/40 Quotienten in 6 Wochen alten 3D Kokulturen im Vergleich zu den neuronalen 3D Matrixkulturen

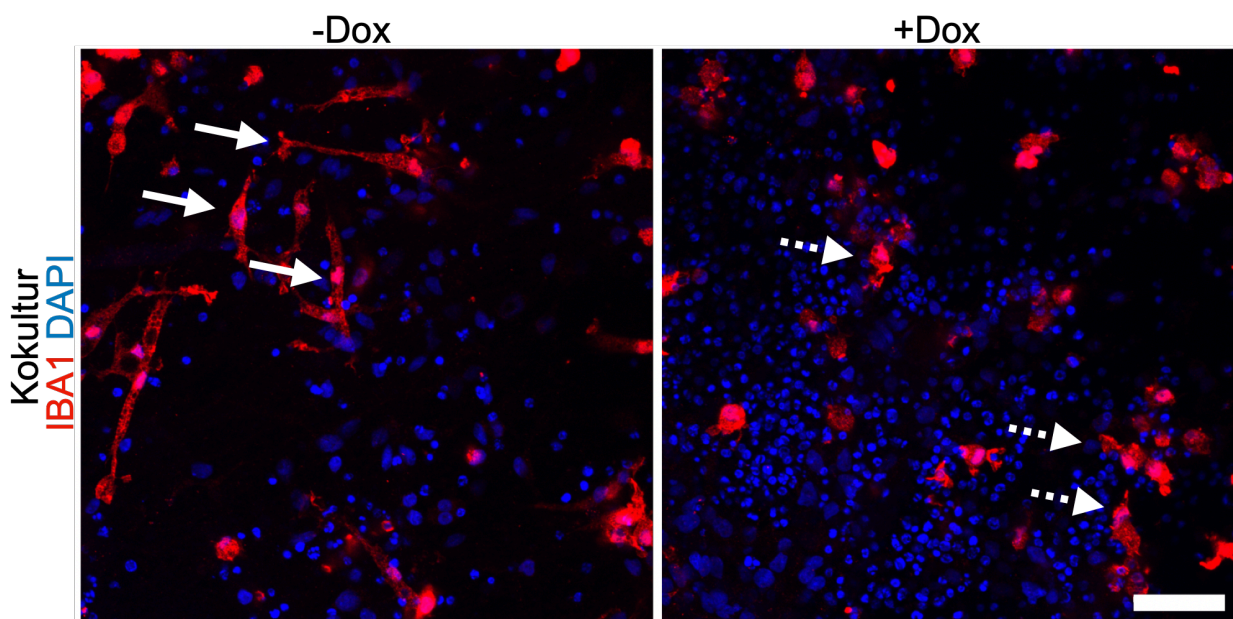
Quantifizierung der Konzentration von Aβ 38 (A), Aβ 40 (B) und Aβ 42 (C) in neuronaler Mono- und Kokultur. (D) Quantifizierung des Aβ 42/40 Quotienten in neuronaler Mono- und Kokultur; (Messung in ng/ml; n=3). Der Kokultivierungszeitraum beträgt dabei 5 Tage. Darstellung als Mittelwert ± Standardfehler. Kruskal-Wallis Test mit Nemenyi's Nachtest. \*\*: p<0.01.

### 3.2.5 iPSdMiG zeigen in induzierten AD-Kokulturen verstärkt eine amöboide Morphologie

Das Spektrum der Mikroglia-Funktionalitäten ist nicht nur durch phagozytische Aktivität gekennzeichnet, sondern spiegelt sich in einer großen phänotypischen Vielfalt wider. Mikrogliazellen zeigen unter verschiedenen Einflüssen eine Diversität an morphologischen Änderungen und passen sich so den unterschiedlichen Umgebungsbedingungen an. Allgemein unterscheidet man einen phagozytisch aktiven, amöboiden von einem bipolaren und eher neuroprotektiven Phänotypen (Au und Ma, 2017, Helmut et al., 2011, Tam et al., 2016, Tam und Ma, 2014).

Im Kokultursystem zeigten die iPScMiG unter Einfluss der AD Pathologie ein rundliches Soma, die Fortsätze erschienen zunehmend verzweigt, zahlreich und verkürzt (Abb. 12). In Abwesenheit der AD Pathologie dominierte ein Morphotyp mit langgezogenem Zellkörper sowie weniger und einfacheren Fortsätzen. Dabei sind beide morphologischen Varianten nicht exklusiv in einer Bedingung zu beobachten, sondern scheinen mit einer vermehrten prozentualen Häufigkeit pro Bedingungen vorzukommen.

Der langgezogene und wenig verzweigte Phänotyp trat ebenfalls in den iPScMiG Monokulturen auf (Vgl. Abb. 8).



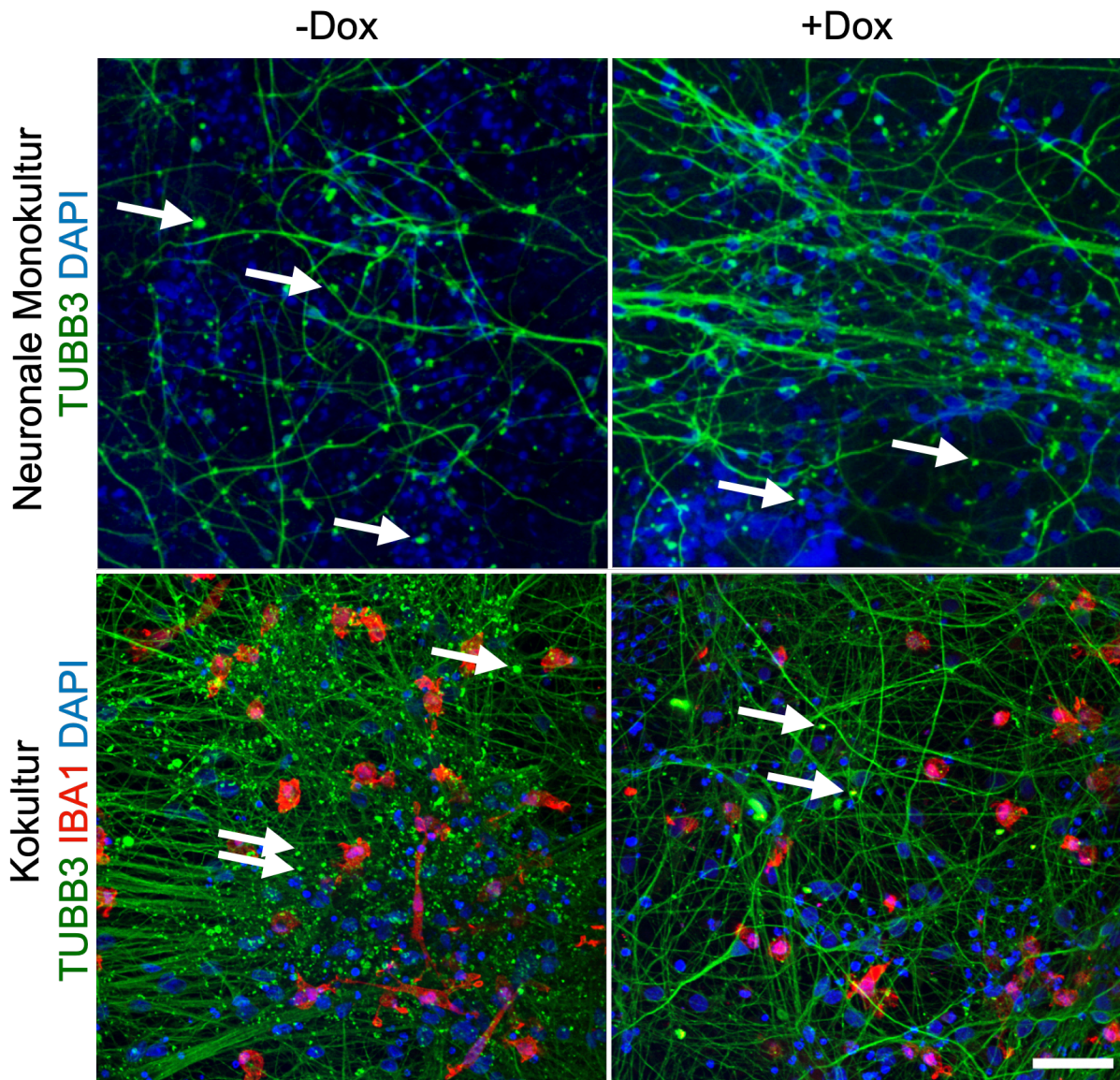
**Abb. 12:** Morphologische Analyse von iPScMiG in 3D Kokulturen

Repräsentative Konfokalaufnahmen am 5. Tag der Kokultur ohne und mit AD Pathologie. Durchgezogene Pfeile verweisen auf bipolaren Phänotyp; gestrichelte Pfeile zeigen runden, amöboiden Phänotyp. Maßstab: 50  $\mu$ m.

### 3.2.6 imAP-Zellen weisen in Mikroglia-Kokultur in Anwesenheit von Doxycylin weniger TUBB3+ Partikel auf

Neben der Analyse der Mikrogliamorphologie wurde auch die Gesamtheit des neuronalen Netzwerks in Kokultur untersucht. Interessanterweise zeigten nicht-induzierte Kokulturen eine veränderte Zellmorphologie mit diskontinuierlichen Neuritenausläufern und ein vermehrtes Auftreten von TUBB3-positiven Partikeln (Abb. 13). Währenddessen waren in den induzierten Kulturen, in denen die AD Pathologie vorlag, intakt anmutende

Neuritenauswüchse mit weniger Zelldebris zu beobachten (Abb. 13). Trotz dieser strukturellen Veränderungen schien das über TUBB3+ abgedeckte Gebiet unverändert zu sein. Ein vergleichbar ausgeprägter Phänotyp der Neuritenmorphologie, sowie das vermehrte Auftreten von TUBB3-positiven Partikeln, konnte in den neuronalen Monokulturen, sowohl in Ab- als auch in Anwesenheit der AD Pathologie, nicht nachgewiesen werden (Abb. 13).



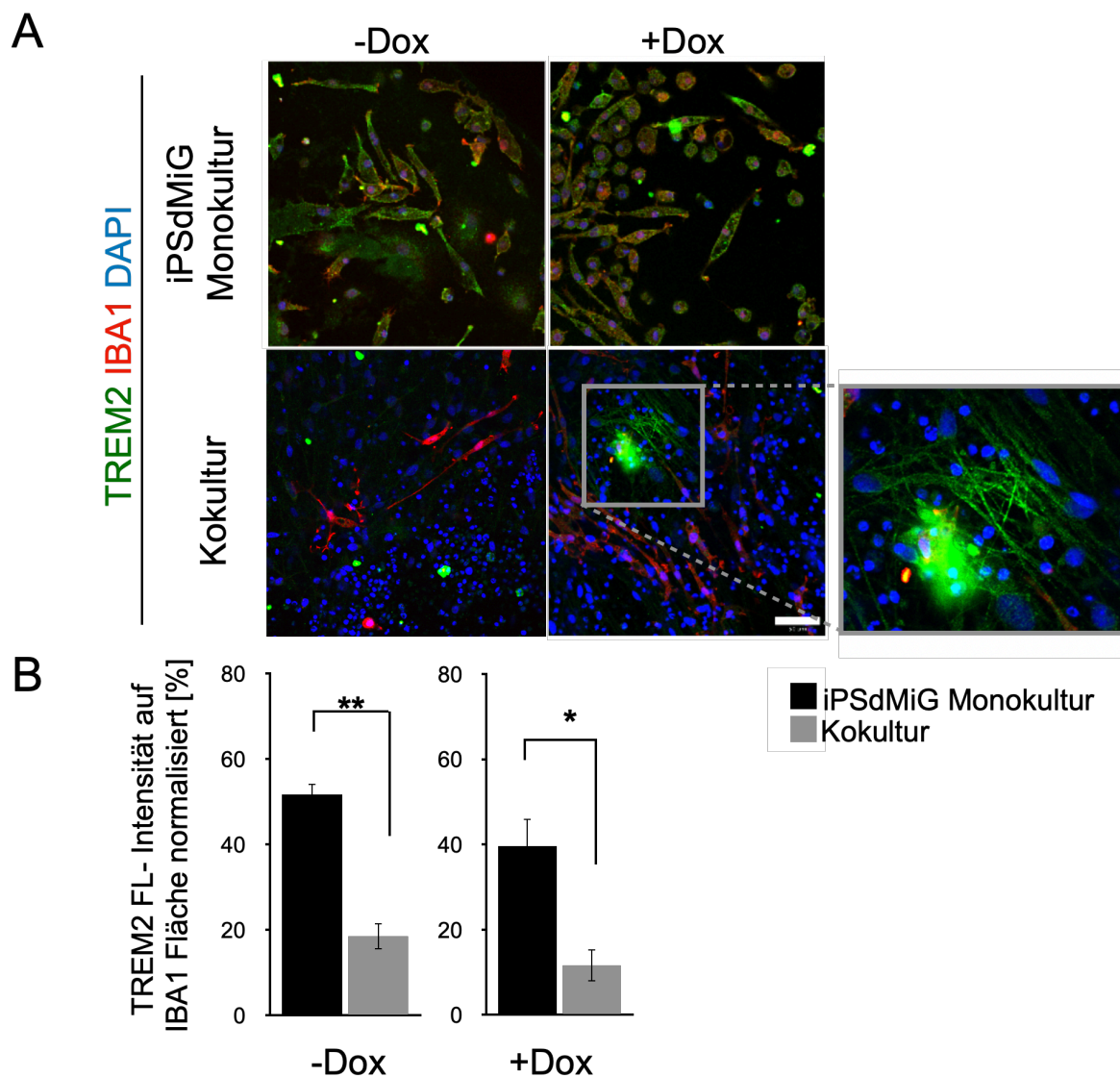
**Abb. 13:** imAP-Zellen weisen in Mikroglia-Kokultur in Anwesenheit von Doxycylin weniger TUBB3+ Partikel auf

Obere Reihe: Repräsentative Konfokale Z-Stackaufnahme von 6 Wochen alten neuronalen imAP Monokulturen. Maßstab: 50  $\mu$ m. Untere Reihe: Konfokale Z-Stackaufnahmen von 6 Wochen alten iPsdMiG Kokulturen. Durchgezogene Pfeile verweisen auf die TUBB3-positive Partikel. Maßstab: 50  $\mu$ m.

### 3.2.7 Humane Mikrogliazellen zeigen in 3D Kokulturen eine verringerte Expression typischer Oberflächenmarker

Mikrogliazellen exprimieren auf ihrer Zelloberfläche eine Reihe von Rezeptoren. Besonders TREM2 spielt für die Aufrechterhaltung der metabolischen Fitness von Mikrogliazellen im Rahmen von neurodegenerativen Erkrankungen eine entscheidende Rolle und kann eine adäquate Reaktion auf A $\beta$ -Plaques und weitere AD-assoziierte Pathologien ermöglichen (Ulland und Colonna, 2018). Dabei ist anzumerken, dass TREM2 als Typ-I-Transmembranprotein mit seiner extrazellulären Domäne in der Lage ist, pathologische Bestandteile, wie aggregiertes A $\beta$ , zu binden (Olufunmilayo und Holsinger, 2022). Aus diesem Grund erfolgte im vorliegenden Modell eine immunhistochemische Analyse der TREM2 Expression. Dabei wurde eine Färbung des TREM2 Rezeptors in iPSdMiG Mono- und Kokultur, sowohl in An-, als auch Abwesenheit von Doxycyclin durchgeführt. Die Identifizierung der iPSdMiG erfolgte durch eine Kofärbung mit dem kalziumbindenden Protein IBA1.

Neben einer ubiquitären Reduktion der TREM2 Fluoreszenz konnte in Anwesenheit der AD Pathologie eine Translokation des Rezeptors auf potenziell neuronale und aggregat-ähnliche Strukturen nachgewiesen werden (Abb. 14A). Insgesamt ließ sich in den Kokulturen eine signifikante Reduktion der TREM2 Fluoreszenz der iPSdMiG im Vergleich zu den korrespondierenden Monokulturen nachweisen. (Abb. 14B).



**Abb. 14:** Immunhistochemischer Nachweis der TREM2 Reduktion in Kokultur

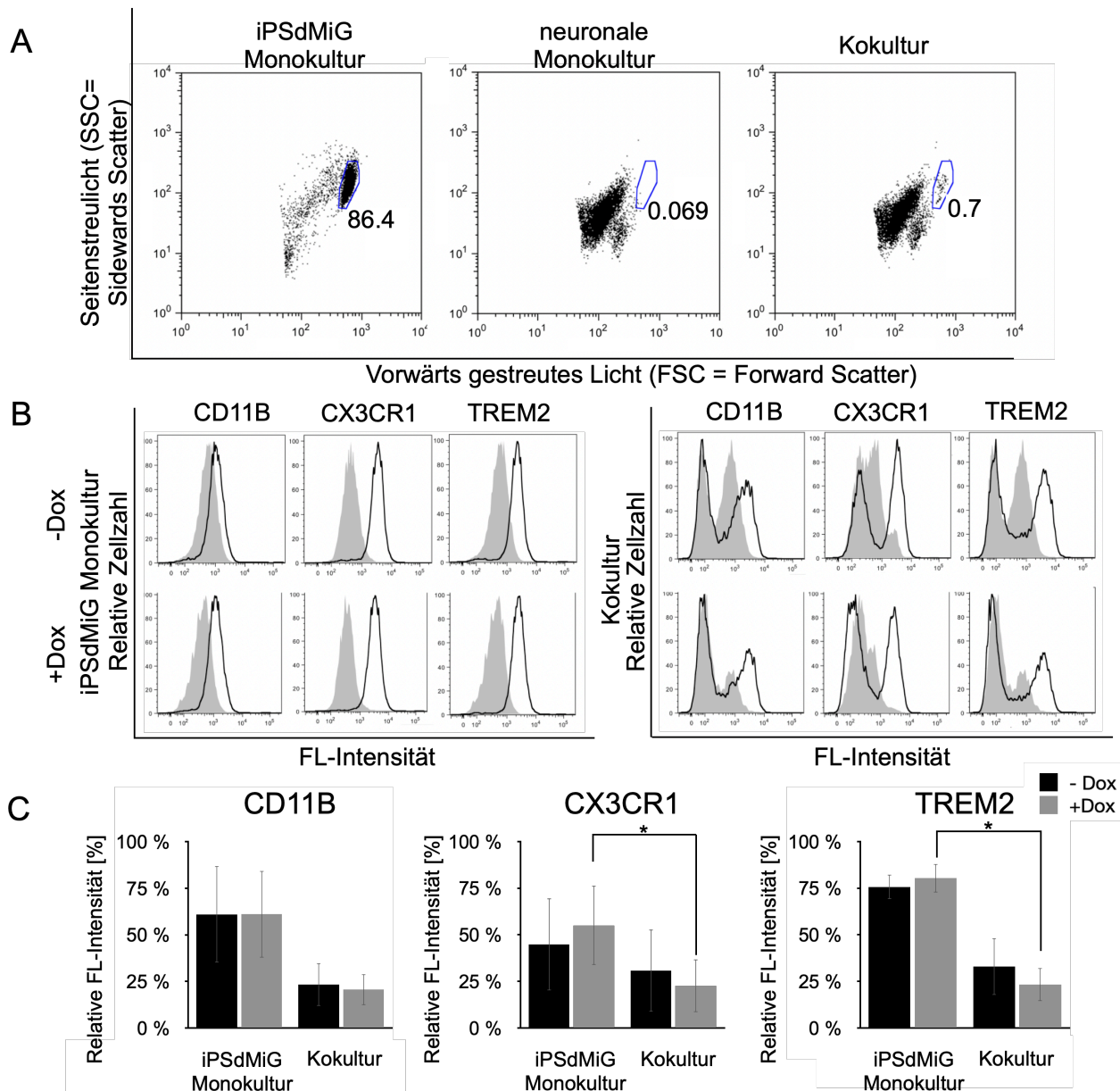
(A) Repräsentative Konfokalaufnahmen der TREM2 Expression auf IBA1-positiven iPSdMiG in Mono- und Kokultur. Vergrößerung zeigt TREM2 positive Strukturen außerhalb der iPSdMiG. Maßstab: 50  $\mu$ m. (B) Quantifizierung der durchschnittlichen TREM2 Fluoreszenzintensität (FL = Fluoreszenz). Normalisiert auf die IBA1-positive Fläche. n = 3. Analyse von 10 randomisiert ausgewählten Konfokalbildern pro Replikat, 40er Objektiv. Darstellung als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler. Wilcoxon-Mann-Whitney Test/ Anova \*:  $p < 0.05$  \*\*:  $p < 0.01$ .

Anschließend wurde der TREM2 Befund mittels Durchflusszytometrie quantitativ validiert und um weitere Oberflächenmarker ergänzt. Dabei wurde neben dem TREM2 Rezeptor, welcher bei Aktivierung von Mikrogliazellen entscheidend ist, auch das Zelladhäsionsmolekül CD11B sowie der Chemokinrezeptor CX3CR1 analysiert. Dafür wurden die iPSdMiG zuerst als einzelne Zellpopulation in Mono- und Kokultur anhand

ihrer Größe und Granularität identifiziert (Abb. 15A) und anschließend das Expressionsniveau der einzelnen Rezeptoren ermittelt (Abb. 15B). Dafür wurden die Oberflächenmarker separat gefärbt und sequentiell analysiert. Etwa die Hälfte der IBA1-positiven Zellen in Monokulturen exprimieren CD11B und CX3CR1 unabhängig von der Anwesenheit von Doxycyclin. Der TREM2 Rezeptor ist bei 75% der iPSdMiG nachweisbar (Abb. 15C). Die durchflusszytometrische Analyse der iPSdMiG im Rahmen der Kokultur zeigt eine Trennung der Population in zwei Subpopulationen. Dabei werden die beschriebenen Marker weiterhin exprimiert. Es zeigt sich aber eine Reduktionstendenz der Expressionsniveaus der Marker auf durchschnittlich 25%.

Bei Vergleich der Monokulturen mit den korrespondierenden Kokulturen konnte unter Vorlage der AD Pathologie eine signifikante Reduktion von TREM2 und des Fraktalkinrezeptors CX3CR1 nachgewiesen werden, was den Immunhistochemischen Nachweis der TREM2 Reduktion untermauert (Abb. 15C).

Innerhalb der Kokulturen zeigten sich keine signifikanten Änderungen, obwohl der Komplementrezeptor CR3 (CD11B), TREM2 und der Fraktalkinrezeptor CX3CR1 unter Vorlage der AD Pathologie eine geringere relative Fluoreszenzintensität aufwies.



**Abb. 15:** Humane Mikrogliazellen zeigen in 3D Kokulturen eine verringerte Expression Mikroglia-typischer Oberflächenmarker

(A) Identifizierung der iPsdMiG Population in Mono- und Kokultur anhand der Größe und Granularität der Zellen. Die 6 Wochen alte neuronale Monokultur repräsentiert die Kontrollbedingung (B) Histogramm des Expressionsniveaus von CD11B, CX3CR1 und TREM2 in iPsdMiG Mono- und Kokulturen. Grau hinterlegt die isotypische Antikörper-Kontrolle. Schwarze Linie repräsentiert das Expressionsniveau der Marker (C) Quantifizierung der FACS-Daten. CD11B, CX3CR1 und TREM2 Expression in iPsdMiG Mono- und Kokulturen. FL= Fluoreszenz. n = 3. Darstellung als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler. Zweifache Varianzanalyse gefolgt vom Tukey post hoc Test. \*:  $p < 0.05$  \*\*:  $p < 0.01$  \*\*\*:  $p < 0.001$  \*\*\*\*:  $p < 0.0001$ .

### 3.2.8 iPSdMiG zeigen in induzierten Kokulturen unter LPS-Stimulation eine reduzierte Zytokinsekretion

Mikrogliazellen sind als Immunzellen des ZNS in der Lage, pro- und antiinflammatorische Zytokine als Reaktion auf pathologische Reize zu bilden (Smith et al., 2012). Um das in diesem Modell vorliegende Sekretomprofil genauer zu beleuchten, wurden zuerst die Konzentrationen von TNF $\alpha$ , IL10, IL12, IFN $\gamma$ , IL6, IL1 $\beta$  und IL8 in den 3D Kontrollkulturen ermittelt. Anschließend wurde der Einfluss der Kokulturbedingungen unter der chronischen AD Pathologie, sowie in deren Abwesenheit, auf die Immunantwort bestimmt. Dafür wurde das inflammatorische Kit (K15008B) von MSD verwendet. Um die vorliegenden Kulturen genau zu charakterisieren, wurden sowohl die Konzentrationen in der 3D Matrix als auch in den Überständen der 6 Wochen alten iPSdMiG Mono- und Kokulturen separat gemessen.

In induzierten und uninduzierten Kulturen zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in der Zytokinproduktion zwischen den iPSdMiG Mono- und Kokulturen. Auch das Vorliegen der AD Pathologie zeigte keinen Einfluss auf die Zytokinproduktion zum Analysezeitpunkt (Vgl. Abb. 16A und Abb. 16B).

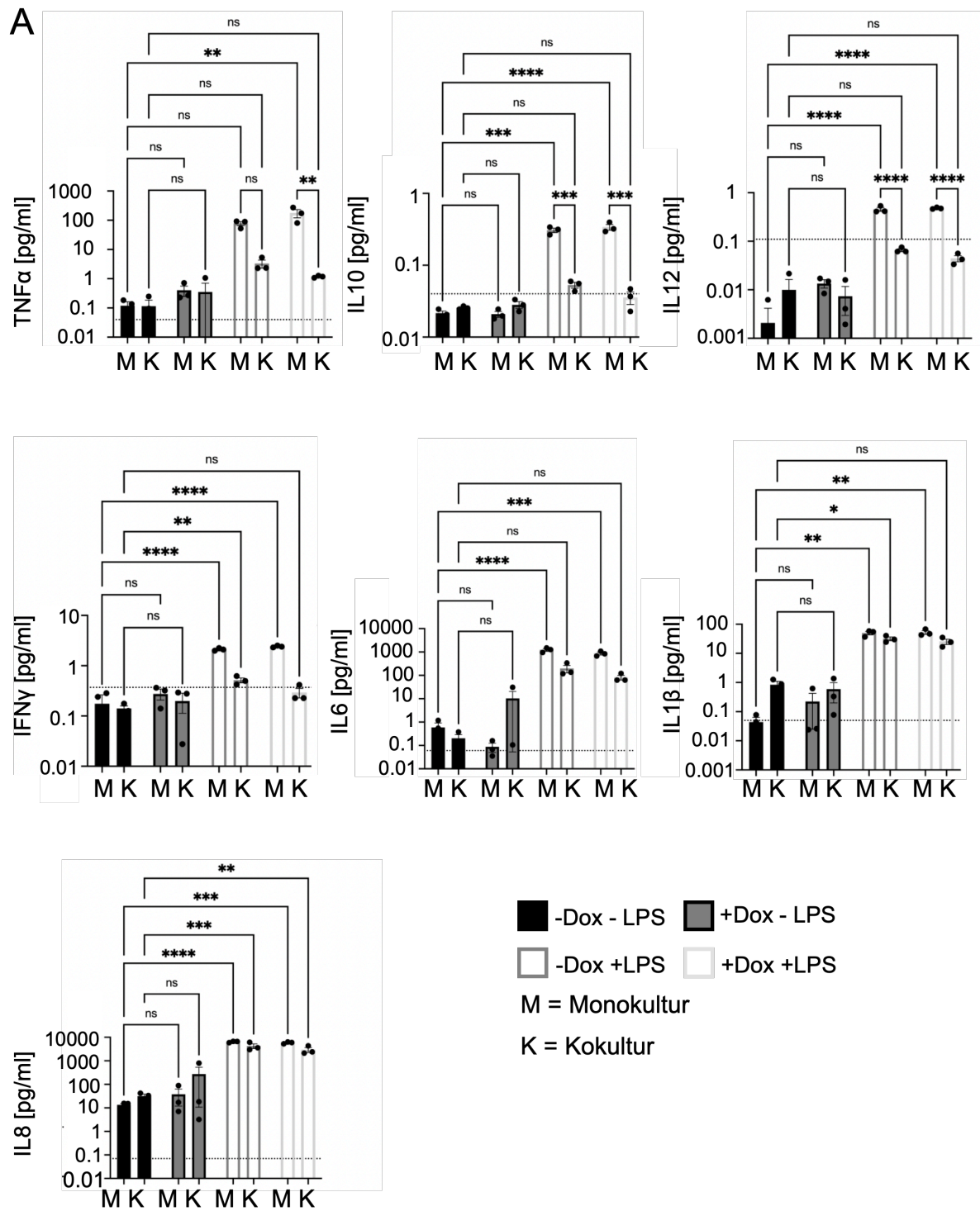
Da im Rahmen der AD Pathologie eine chronische Reizexposition vorliegt, wurde der Versuchsaufbau um eine akute 24-stündige Lipopolysaccharid (LPS) Stimulation ergänzt, um die Reaktionsfähigkeit der Zellen in Bezug auf eine adäquate Zytokinproduktion zu testen. LPS ist ein bakterielles Endotoxin und eine der am häufigsten verwendeten proinflammatorischen Substanzen für Mikrogliazellen (Lively und Schlichter, 2018). Unter LPS-Stimulation wurden die Interleukine 6 und 8 verstärkt sekretiert. Dies war sowohl in den Überständen als auch den 3D Matrices der iPSdMiG Mono- und Kokulturen zu detektieren (Vgl. Abb. 16A und Abb. 16B). Auch die Sekretion von IL1 $\beta$  zeigte eine Abhängigkeit von LPS in der 3D Matrix der Mono- und Kokulturen (Abb. 16A). Dabei zeigt sich bei der Analyse kein Unterschied in der Zytokinproduktion in Ab- bzw. Anwesenheit von Doxycyclin.

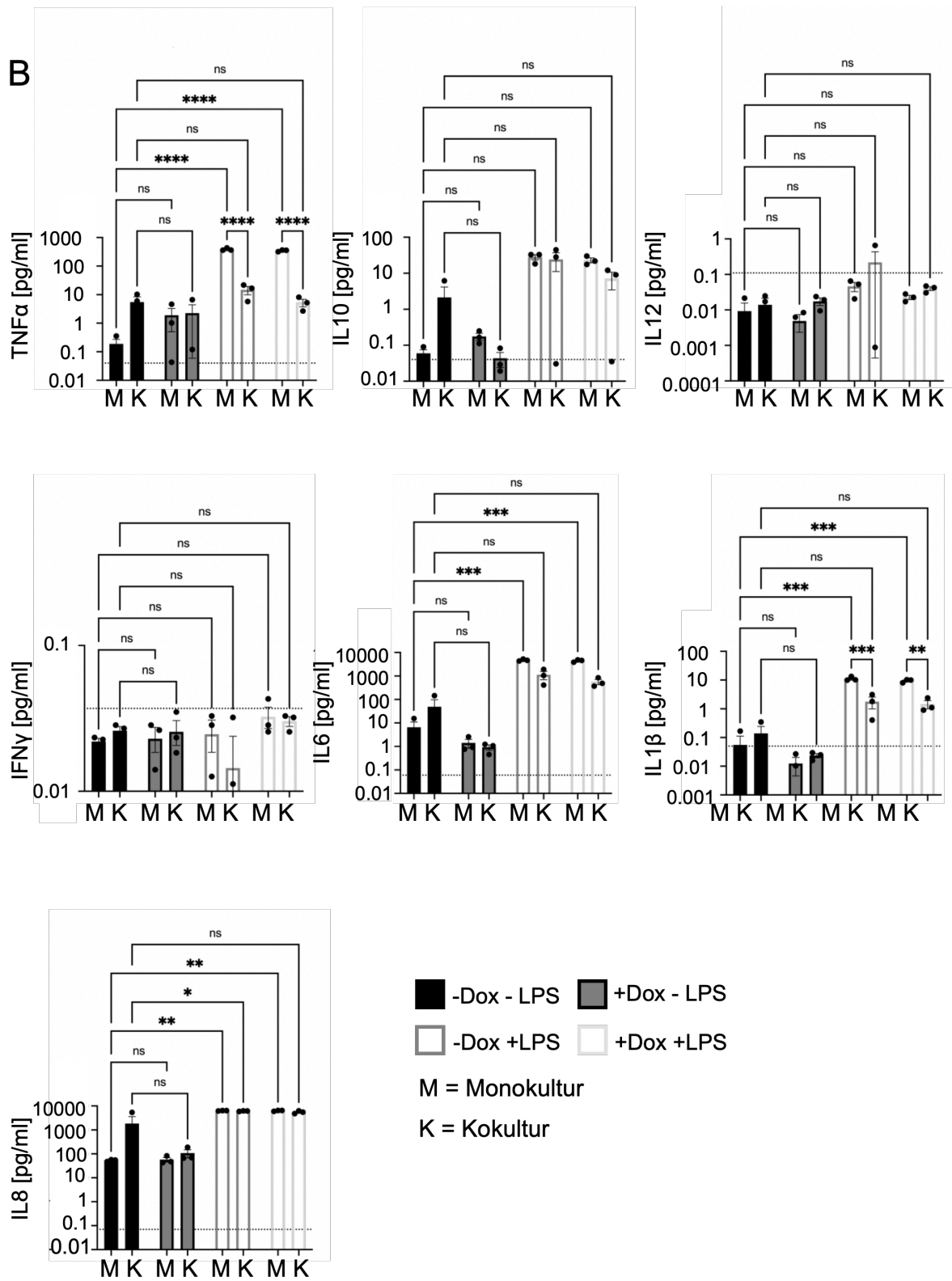
IFN $\gamma$ , welches bei bakteriellen und viralen Infektionen eine entscheidende Rolle spielt, war im gesamten Experiment nur in der 3D Matrix der iPSdMiG Monokultur unter Stimulation mit LPS nachweisbar. In der korrespondierenden Kokultur war IFN $\gamma$  nicht

nachweisbar (Abb. 16A). Die 3D Matrix der iPSdMiG Monokulturen zeigte unter Stimulation ebenfalls eine deutliche Immunantwort und es war eine signifikante Steigerung der IL 10 und IL 12 messbar (Abb.16A). Unter Kokulturbedingungen – unabhängig der AD Pathologie – lag erneut eine signifikant verminderte Zytokinproduktion vor. Weiterhin waren keine Anstiege von IL 10 und IL 12 im Überstand unter LPS Stimulation zu verzeichnen (Abb.16B).

TNF $\alpha$  zeigte unter LPS Stimulation einen Konzentrationsanstieg in Monokulturen im Vergleich zur Kokultur. In Anwesenheit von Dox mit LPS-Stimulation zeigte sich in der 3D Matrix eine signifikante Reduktion der TNF $\alpha$ -Konzentration in der Kokultur im Vergleich zur Monokultur. Diese war in Abwesenheit von Doxycyclin nicht nachweisbar.

Weiterhin wurden neuronale Monokulturen und das NGMC Medium als Negativkontrollen vermessen, um eine andersartige Zytokinproduktion (Bias) auszuschließen; dabei zeigten sich erwartungsgemäß Messwerte an der unteren Detektionsgrenze.





**Abb. 16:** iPSdMiG zeigen in induzierten Kokulturen unter LPS-Stimulation eine reduzierte Zytokinsekretion

(A) Messung der Zytokinkonzentration in pg/ml von TNF $\alpha$ , IL10, IL12, IFN $\gamma$ , IL6, IL1 $\beta$ , IL8 in der 3D Matrix von 6 Wochen alten iPSdMiG Mono- und Kokulturen mittels des inflammatorischen Kits von MSD. Gepunktete Linie entspricht der Nachweisgrenze. (B) Konzentration (pg/ml) von TNF $\alpha$ , IL10, IL12, IFN $\gamma$ , IL6, IL1  $\beta$ , IL8 im Überstand der 6 Wochen alten iPSdMiG Mono- und Kokulturen. Gepunktete Linie entspricht der Nachweisgrenze. n = 3. Darstellung als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler. Zweifache Varianzanalyse gefolgt vom Tukey post hoc Test. \*: p<0.05 \*\*: p<0.01 \*\*\*: p<0.001 \*\*\*\*: p<0.0001. Die LPS-Stimulation erfolgt für 24h.

## 4. Diskussion

Das Ziel dieser Dissertation war die Etablierung und Charakterisierung eines humanen 3D Kokultursystems aus genetisch modifizierten humanen Neuronen und iPSdMiG. Zur Modellierung der AD Pathologie exprimieren differenzierte It-NES Zellkulturen sowohl das mutierte APP (K670N/M671L und V717I), als auch Presenilin1 (dE9). Als Ausgangshypothese war anzunehmen, dass die integrierten Mikrogliazellen auf die neuronale Umgebung und die A $\beta$ -Pathologie reagieren und ihren Aktivierungszustand verändern. Die Analyse der spezifischen Unterschiede zwischen den Bedingungen im Vergleich zu Kontrollkulturen sollte neue Erkenntnisse über den Beitrag der Mikrogliazellen in einem humanen 3D AD Matrixmodell liefern und als Grundstein zur weiteren Erforschung der AD Erkrankung in vitro den Weg für potenzielle Therapieoptionen ebnen.

### 4.1 Erhöhte Amyloid $\beta$ Sezernierung führt zur Aggregatbildung im vorliegenden 3D AD Matrixmodell

Im vorliegenden 3D Matrixmodell zeigt die 6-wöchige Doxycyclin Induktion signifikant erhöhte A $\beta$  38, A $\beta$  40 und A $\beta$  42 Werte im Vergleich zu uninduzierten Kulturen. Dabei konnte gezeigt werden, dass die stärkste Anreicherung der A $\beta$  Spezies in der Matrixfraktion zu verzeichnen war. Besonders die A $\beta$  42 Konzentration, die in der aktuellen Literatur als pathogenste Variante gilt, stieg in der Matrix überproportional um das 95-fache an (Shi et al., 2012). Diese lokale Akkumulation kann auf den Aufbau, vor allem die Dreidimensionalität, des Modells zurückgeführt werden, da bereits vergleichbare 3D Modelle unter Verwendung von immortalisierten humanen neuronalen Vorläuferzellen eine ähnliche Tendenz aufwiesen (Choi et al., 2014, Kwak et al., 2020). Dabei wird die A $\beta$  Anreicherung als Ausgangspunkt für die Bildung der AD Pathologie, inklusive der amyloiden Aggregate diskutiert (Cenini et al., 2021, Choi et al., 2014). Neben der reinen Erhöhung der einzelnen A $\beta$  Konzentrationen war ebenfalls ein signifikant erhöhter A $\beta$  42/40 Quotient zu verzeichnen. Dieser Quotient gewinnt zunehmend an Bedeutung und gilt in vivo mit hoher Sensitivität und Spezifität als sicherer Indikator für das Vorliegen der

AD Pathologie (Hansson et al., 2019). Dabei wird postuliert, dass nicht die gesamte A $\beta$  Menge, sondern der A $\beta$  42/40 Quotient einen wichtigen Induktor der Tau-Pathologie darstellt (Kwak et al., 2020). Es ist zu vermerken, dass in uninduzierten Kulturen ebenfalls geringe Werte für die drei A $\beta$  Spezies nachweisbar sind, was als Anzeichen für eine Leckage des Modells gewertet werden kann.

Der Nachweis von amyloiden Aggregaten erfolgte in der vorliegenden Dissertation anhand von 6E10-Antikörperfärbungen. Dieser monoklonale Antikörper gehört zu den am häufigsten verwendeten Antikörpern zum Nachweis einer vorliegenden Amyloidpathologie in der Alzheimer Forschung. Dabei fungiert die Aminosäuresequenz 1-16 bzw. 4-10 als Epitop und kann sowohl A $\beta$  als auch APP nachweisen (Baghallab et al., 2018). 6E10-positive Aggregate sowie die  $\beta$ -Faltblatt Struktur von Amyloid  $\beta$  (Nachweis mittels ThS-Färbung) (Hebisch, 2020) konnten sowohl in induzierten wie auch nicht-induzierten Kulturen beobachtet werden. Insgesamt traten in induzierten Kulturen größere Aggregate und mit erhöhter Häufigkeit auf. Obwohl Aggregate auch in nicht-induzierten Kulturen auftraten, deuten die geringe Anzahl der Aggregate und die niedrigen sezernierten A $\beta$  Mengen auf lediglich eine minimale Leckage des induzierbaren Systems hin. Diese erhöhte Basalexpression von A $\beta$  könnte einen Einfluss auf zugefügte Mikrogliazellen haben, was in der weiteren Diskussion beleuchtet wird. Für zukünftige Experimente könnte die Verwendung von Cre-induzierten Modellen dieses Problem minimieren bzw. möglicherweise eliminieren.

#### 4.2 Dox-induzierte Kulturen zeigen Anzeichen einer verstärkten Astrogliose

AD führt in Patientengehirnen zu einer reaktiven Gliose, welche besonders durch eine verstärkte GFAP Expression gekennzeichnet ist (Ingelsson et al., 2004).

In der vorliegenden Dissertation konnten über den Kultivierungszeitraum von 57 Tagen die Anwesenheit von Astrozyten mittels der S100 $\beta$  Fluoreszenzintensität sowie ein signifikanter Anstieg der GFAP Expression im 3D Matrixmodell unter Doxycyclininduktion im Vergleich zu nicht induzierten Kontrollkulturen nachgewiesen werden. Ein parallel durchgeführtes Experiment mit einer nicht transgenen Kontrolle, welche den selben genetischen Hintergrund wie die transgene Linie aufweist, zeigte dabei keine

Veränderung zwischen den einzelnen Bedingungen. Das Expressionsniveau der untersuchten Marker blieb mit dem des uninduzierten 3D AD Matrixmodells vergleichbar. Diese Ergebnisse sind mit dem Vorliegen einer AD-typischen reaktiven Astroglie vereinbar. Nach dem aktuellen Stand der Forschung besitzen Astrozyten ein großes regeneratives Potential und sind in der Lage, im Rahmen von neurodegenerativen Erkrankungen auf die Umgebungsbedingungen zu reagieren. Dabei wird angenommen, dass die A $\beta$  Pathologie einen Einfluss auf die Proliferation und das Expressionsniveau von S100 $\beta$  und GFAP von Astrozyten ausübt (Jain et al., 2015, Mrak et al., 1996), wobei die Astrozytenproliferation generell mit einer erhöhten Expression des Markers S100 $\beta$  einhergeht. Zudem kann S100 $\beta$  allein nicht zweifelsfrei auf Astroglie zurückgeführt werden, da dieser Marker auch im Zytoplasma bzw. Zellkern anderer glialer Zellen, wie Oligodendrozyten, exprimiert wird (Steiner et al., 2011). Als weiterer Marker der reaktiven Astroglie gilt GFAP, der als Hauptbestandteil des Intermediärfilaments eine Rolle in der Entwicklung, Reifung und Reaktivität spielt und im Rahmen von degenerativen Erkrankungen vermehrt exprimiert wird (Eng und Ghirnikar, 1994, Eng et al., 2000). Die in der daliegenden Dissertation nachgewiesenen signifikant erhöhten GFAP Werte in den induzierten 3D AD-Matrixkulturen können somit als Anzeichen einer reaktiven Astroglie interpretiert werden. Neben den Veränderungen in der Expression von GFAP und S100 $\beta$  werden in der Literatur weitere Merkmale wie z.B. morphologische Gesichtspunkte der Astroglie genannt, welche in der daliegenden Dissertation nicht weiterführend untersucht worden sind. Besonders die topografische und morphologische Beziehung zwischen Astrozyten und amyloiden Plaques kann in zukünftigen Experimenten mittels eine Ko-Färbung mit z.B. 6E10 herausgearbeitet werden. Ein weiteres mögliches Experiment stellt die Quantifizierung der dargelegten Befunde mittels qPCR oder Western Blot dar.

#### 4.3 Erfolgreiche Integration der iPScMiG in das 3D Matrixmodell

Da Mikrogliazellen auf ihre Umgebung reagieren und das verwendete Medium vor Zugabe der iPScMiG das Antibiotikum Doxycyclin enthält, musste ein direkter Effekt des Mediums auf die iPScMiG vor Beginn der Untersuchungsreihe ausgeschlossen werden (Kim et al., 2009, Park et al., 2013, Sheng et al., 2001). Es konnte gezeigt werden, dass iPScMiG in

die Gelmatrix einwanderten und über 5 Tage vital kultiviert werden konnten. Dabei zeigte das Medium sowohl in Ab- als auch Anwesenheit von Doxycyclin keinen messbaren Einfluss auf die Migrationsfähigkeit der Zellen und die iPsdMiG konnten in der verwendeten Gelmatrix detektiert werden. Es zeigte sich weiterhin, dass die Zellen zum Untersuchungszeitpunkt am 5. Tag alle überprüften Oberflächenmarker wie CD11B, IBA1, CX3CR1 und TREM2 gleichmäßig exprimierten. Ebenfalls war kein signifikanter Unterschied in der cCAS3 Aktivität detektierbar. Dies war relevant, da Doxycyclin einen nachgewiesenen Einfluss auf die Apoptoserate haben kann (Jantzie et al., 2005). Im Rahmen von hypoxischen Hirnschäden im Mausmodell wurde Doxycyclin in Verbindung mit einer verminderten Apoptose gebracht (Jantzie et al., 2005). Dabei ist anzumerken, dass die im 3D AD Matrixmodell verwendete Konzentration (2 µg/ml) geringer als die im Mausmodell verwendete Dosis ist (10mg/kg) (Jantzie et al., 2005). Zudem enthält das Kulturmedium im vorliegenden Modell ab Zugabe der iPsdMiG kein Doxycyclin mehr. Eine potenzielle Akkumulation von Doxycyclin in der Gelmatrix sowie ein akuter Effekt auf die iPsdMiG (am ersten Tag) ist jedoch nicht sicher auszuschließen. Da die Immunzellen in der vorliegenden Dissertation nur am fünften Tag der Kultivierung untersucht werden, kann ebenso keine Aussage darüber getroffen werden, wie lange die Zellen in der Kultur maximal überleben können. Falls zukünftige Experimente spätere Untersuchungszeitpunkte erfordern, muss die Vitalität der Zellen für diese Zeiträume erneut evaluiert werden.

#### 4.4 Kolokalisationsanalysen weisen im 3D AD Kokultursystem auf phagozytotische Aktivität der Mikrogliazellen hin

Im vorliegenden 3D AD Kokultursystem konnten durch konfokale z-Stackaufnahmen, Bildanalyse und das MSD V-PLEX A $\beta$  Peptide Panel Anzeichen für phagozytische Aktivität nachgewiesen werden. Dabei wurden sowohl Hinweise für die Aufnahme von apoptotischen Neuronen, als auch von Amyloid  $\beta$  Ablagerungen gefunden. Obwohl größtenteils keine statistische Signifikanz mittels der Quantifizierung der MSD V-PLEX A $\beta$  Peptide Panel Daten bzw. der Aufnahme von apoptotischen Neuronen nachgewiesen werden konnte, zeigten die Mikrogliazellen bei Zugabe unter allen Bedingungen eine phagozytische Aktivität. Dabei ließ sich im MSD V-PLEX A $\beta$  Peptide Panel eine strikte

Reduktionstendenz des A $\beta$  Gehalts in der 3D Matrix der induzierten Kokulturen im Vergleich zu den neuronalen Monokulturen nachweisen. Dies lie $\beta$  sich, in geringerem Ausma $\beta$ , auch in uninduzierten Kulturen nachvollziehen. Auch im Überstand des Kokultursystems zeigte sich eine tendenziell reduzierte A $\beta$  Konzentration. Mittels Bildanalyse konnte zudem sowohl ein signifikanter Anstieg der Kolo-kalisation von 6E10 und IBA1 in induzierten Kulturen als auch internalisiertes 6E10 innerhalb der Mikrogliazellen nachgewiesen werden, was ebenfalls auf eine suffiziente Phagozytose schließen lässt.

Diese Erkenntnisse sind mit dem aktuellen Stand der Forschung vereinbar, da Mikrogliazellen als spezialisierte Phagozyten des ZNS zur rezeptorvermittelten Aufnahme und Abbau von Zelldebris und Proteinen fähig sind (Brown und Neher, 2014). Die fehlende statistische Signifikanz zwischen der induzierten und uninduzierten Kultur in Bezug auf die Aufnahme von abgestorbenen Zellen kann dabei hypothetisch auf verschiedene Punkte zurückgeführt werden. Zum einen kann die im Modell gezeigte Apoptoserate der It-NES abgeleiteten Neurone bereits ausreichen, um die phagozytotische Kapazität der iPSdMiG in Bezug auf abgestorbene Zellen zu sättigen, zum anderen kann sich zum Analysezeitpunkt am 5. Tag bereits ein Gleichgewicht zwischen Aufnahme und Abbau in den Zellen eingependelt haben. Denn Metaanalysen verweisen darauf, dass die Clearance-Zeit von abgestorbenen Neuronen bis zur vollständigen Eliminierung ca. 95 min beträgt (Sierra et al., 2013). Neben der Aufnahme von cCAS3-positiven Zellkernen konnte eine signifikant erhöhte Aufnahme von 6E10 positiven Strukturen in Anwesenheit der AD Pathologie nachgewiesen werden. Diese Aggregate sind, wie in den anderen Experimenten bereits gezeigt, nicht exklusiv in Anwesenheit von Doxycyclin zu detektieren. Aus diesem Grund können iPSdMiG auch in uninduzierten Kulturen 6E10 positives Material enthalten, was wieder für eine geringe Leckage des Systems spricht. Eine nicht transgene Kontrolllinie bzw. eine Cre-induzierbare Linie könnte zukünftig diese Leckage ausschließen und dazu beitragen, den vollständigen Unterschied in der Aufnahme von amyloidem Material zu quantifizieren. Das MSD V-PLEX A $\beta$  Peptide Panel zeigte weiterhin eine strikte Reduktionstendenz des A $\beta$  Gehalts in den 3D Matrices der induzierten Kokulturen im Vergleich zu neuronalen Monokulturen. Dabei war eine signifikante Verringerung des A $\beta$  42/40-Quotienten im Überstand der induzierten Kulturen nachweisbar. Die strikte Reduktionstendenz in den anderen Untersuchungsbedingungen

kann als weiteres Anzeichen für eine Aufnahme vom Amyloid durch die iPSdMiG interpretiert werden. Es ist anzumerken, dass die Immunzellen, die zusammen mit Neuronen und Astrozyten in der Matrix vorliegen, für die Analyse lysiert werden mussten und damit bereits aufgenommenes, jedoch noch unvollständig phagozytiertes A $\beta$  erneut in die Analyse des gesamten A $\beta$  Gehalts einfluss. Dabei ist zu vermuten, dass die iPSdMiG das aufgenommene A $\beta$  im Phagolysosom akkumuliert, aber noch nicht vollständig verdaut haben. Laut A. Sierra et al. (2013) sind weder der Zeitverlauf der Phagolysomenbildung noch der Abbauprozesse im Inneren der Mikrogliazellen hinreichend geklärt. Diese technische Notwendigkeit könnte dazu beigetragen haben, dass größtenteils keine statistische Signifikanz erreicht werden konnte. Einen Lösungsansatz könnte die Isolierung der Zelltypen vor der quantitativen Analyse darstellen, um besser die genaue Phagozytoseleistung der Zellen bestimmen zu können. Andere Publikationen mit murinen Mikrogliazellen zeigen eine Stagnation in der Amyloid Aufnahme nach ca. drei Tagen. Daraufhin wurden unverdaute Amyloidfragmente sogar wieder freigesetzt; ein weiteres Mausmodell fand wiederum keine Belege für eine Amyloidaufnahme in vivo (Chung et al., 1999, Stalder et al., 2001). Viele dieser aus Mausmodellen gewonnenen Erkenntnisse über die Phagozytoseeigenschaften von Mikrogliazellen werfen erneute Fragen auf, sodass die genaue Rolle von humanen Zellen, sowie die zugrunde liegenden Pathomechanismen weiterhin Bestandteil aktueller Forschungen sind (Jiang et al., 2016, Schoch et al., 2021, Tajbakhsh et al., 2021).

Im vorliegenden Modell wurde versucht, den physiologischen Anteil von 10 bis 13% Mikrogliazellen zu Neuronen zu rekapitulieren (Mittelbronn et al., 2001). Dafür wurden 10% iPSdMiG relativ zur anfänglich ausgesäten It-NES Zellzahl in das Modell eingebracht. Es ist anzumerken, dass It-NES Zellen potenziell über ein großes proliferatives Potenzial verfügen (Hebisch, 2020) und somit die gewählte Ausgangsmenge der Immunzellen möglicherweise zu gering für die anfallende Phagozytoselast gewählt wurde. Dies und die hohe A $\beta$  Last, welche im transgenen Modell erzeugt wurde, könnten zusätzliche Modulatoren in Bezug auf die Phagozytosefähigkeit darstellen und die Erfassung des vollständigen Potenzials der Zellen erschweren. Um dies zu adressieren, könnte man unterschiedliche Ausgangswerte der Mikrogliazellen in das System einbringen und erneut die Phagozytosefähigkeit der Immunzellen bestimmen.

Neben der reinen Aufnahme pathogener Bestandteile zeigten die iPsdMiG im 3D AD Kokultursystem eine räumliche Beziehung mit 6E10-positiven Aggregaten. Dieses Ergebnis ist mit den Beobachtungen anderer Forschungsgruppen kongruent, die eine systematische Gruppierung von Mikrogliazellen um amyloide Aggregate beschreiben (Hansen et al., 2018, Serrano-Pozo et al., 2011). Dabei wird angenommen, dass sich Mikroglia aktiv um amyloide Ablagerungen gruppieren und damit in der Lage sind, das Wachstum und die Pathogenität der Plaques zu begrenzen (Condello et al., 2015).

Um die in dieser Dissertation gewonnenen Erkenntnisse zur Phagozytosefähigkeit der iPsdMiG weiter auszubauen, könnte diese zu weiteren Zeitpunkten analysiert werden. Auch könnte ein Lebend-Modell generiert werden, bei dem sowohl die A $\beta$  Aggregate als auch die Mikrogliazellen mit Immunfärbungen bzw. unter Verwendung von grün fluoreszierendem Protein (GFP) visualisiert werden und somit zu jedem Zeitpunkt untersuchbar wären. Ebenso könnte die genaue räumliche Beziehung der Immunzellen zu den pathologischen Aggregatstrukturen erforscht werden (Lebendzellmikroskopie). Ein weiteres mögliches Experiment würde die Etablierung eines Kokultursystems darstellen, bei dem die Immunzellen bereits bei Induktion der Pathologie in der Matrix vorhanden sind, um herauszuarbeiten, ob humane Mikrogliazellen die Ausbildung der AD Pathologie präventiv unterbinden können.

#### 4.5 iPsdMiG und Neurone zeigen morphologische Veränderungen in Anwesenheit der A $\beta$ -Pathologie

Da Mikrogliazellen eine phänotypische Vielfalt in Bezug auf ihre Funktionalität aufweisen sowie einen direkten Einfluss auf die neuronale Plastizität ausüben, wurden sowohl die iPsdMiG sowie das neuronale Netzwerk auf morphologische Veränderungen untersucht (Delpech et al., 2015, Franco-Bocanegra et al., 2021, Leyh et al., 2021, Tam et al., 2016). Dabei zeigten die iPsdMiG im vorliegenden Modell qualitativ zwei unterschiedliche Phänotypen. Zum einen wurde ein langgestreckter Zellkörper mit i.d.R. zwei Fortsätzen, zum anderen wurde ein rundliches Soma mit einer Vielzahl von kurzen und stark verzweigten Ausläufern beobachtet. Dabei scheint das Vorliegen der A $\beta$ -Pathologie den zuletzt genannten Phänotypen zu begünstigen. In der aktuellen Literatur wird ein Spektrum an morphologischen Übergangsformen beschrieben, welche durch eine

Vielzahl an Parametern (z.B. Fortsatzanzahl, -länge und -volumen, sowie Soma Durchmesser und Größe) kategorisiert werden. Dabei werden aktuell 2 bzw. 4 dominante Subtypen (bipolar/gestreckt, aktiv, verzweigt und amöboid) unterschieden, wobei der genaue Zusammenhang zwischen Morphologie und Aktivierungszustand noch nicht abschließend geklärt ist (Leyh et al., 2021). Das Paper von Au und Ma (2017) verweist hingegen darauf, dass bipolare Mikrogliazellen neuroprotektive Eigenschaften besitzen könnten und in funktionellen Prozessen, wie an der Reorganisation von neuronalen Schaltkreisen, beteiligt sind, wohingegen amöboide Zellen in AD besonders die Phagozytose von amyloiden Strukturen begünstigen. Diese Erkenntnisse sind mit den Beobachtungen in der vorliegenden Dissertation vereinbar, da besonders die erhöhte A $\beta$  Konzentration in den induzierten Kulturen zu einem verstärkten Auftreten von runden iPSdMiG mit kurzen und zahlreichen Ausläufern führt. Diese morphologischen Charakteristika sind mit dem Vorliegen von aktivierten, amöboiden Mikrogliazellen vereinbar (Leyh et al., 2021). Es ist anzumerken, dass in dieser vorliegenden Dissertation lediglich semi-quantitative bzw. qualitative Aussagen über die iPSdMiG Morphologie getroffen werden können. Es sind deshalb zukünftig weiterführende Studien nötig, in denen 3D Bildanalyse-Software-Programme genutzt werden, die konfokale Z-Stacks im dreidimensionalen Raum analysieren und damit quantitative Rückschlüsse zulassen. Bedingt durch die im 3D Matrixmodell vorhandenen verschiedenen Stimuli, wie z.B. das Vorliegen von amyloiden Aggregaten und apoptotischen Zellkernen, wäre ebenfalls ein regionaler, vom Stimulus abhängiger, Phänotyp denkbar. Für spätere Untersuchungen wäre ein automatisiertes Analysewerkzeug nötig, welches sowohl die Häufigkeit der morphologischen Subtypen je Bedingung als auch wichtige morphologische Parameter, wie die Größe des Somas, die Fortsatzlänge und die Fortsatzanzahl bestimmt. Um weiterhin die Frage nach einem regionalen Phänotyp zu adressieren, könnten die vorhandenen Ko-Färbungen mit z.B. 6E10 und cCAS3 genutzt und die Morphologie im direkten räumlichen Zusammenhang bestimmt werden. Allerdings weisen konventionelle automatisierte Analysewerkzeuge ihrerseits ebenfalls Limitationen, wie begrenzte Parameterzahlen oder einen Bias in der manuellen Selektion dieser Parameter, auf. Zukünftig könnte hier, wie im Paper von Leyh et al. (2021), der Einsatz von „Machine Learning“-Methoden wie „Convolutional Neural Networks“, die ihre Parameter selbst auf

Grundlage von Trainingsdaten entwickeln, die Robustheit und Objektivität der Quantifizierung der Morphologie weiter ausbauen.

Mikrogliazellen spielen weiterhin im physiologischen und pathologischen Kontext eine Rolle in der Gestaltung von neuronalen Strukturen. Dabei sind Mikrogliazellen aktiv an der neuronalen Plastizität beteiligt und können Schaltkreise im ZNS verändern (Delpech et al., 2015). Neben apoptotischen Zellen sind Mikroglia in der Lage, vitale Neurone, Vorläuferzellen und ungenutzte synaptische Strukturen aufzunehmen und zu eliminieren (Synapseneliminierung, engl.: „Synaptic pruning“) und so zur normalen Entwicklung des Gehirns beizutragen (Brown und Neher, 2014, Paolicelli et al., 2011). Störungen in der Mikroglia-Synapsen-Interaktion sowie eine verstärkte Aktivierung der Mikrogliazellen können dabei zur weiteren Verstärkung des Neuronen- und Synapsenverlusts und damit zur Krankheitsprogression beitragen (Brucato und Benjamin, 2020, Hong et al., 2016). Um diese Eigenschaften im vorliegenden Modell zu überprüfen, wurden neuronale Strukturen anhand von TUBB3 identifiziert, wobei eine umfassende Quantifizierung im Rahmen zukünftiger Arbeiten noch erfolgen muss. Qualitativ zeigten die Kokulturen, besonders die nicht-induzierten, ein vermehrtes Auftreten von TUBB3-positiven Partikeln, was im gegebenen Kontext als weiterer Indikator für einen vermehrten Abbau intakter neuronaler Strukturen und damit für eine aktive Phagozytose interpretiert werden kann. Da eine verstärkte Aktivierung sowie ein vermehrter neuronaler Verlust mit dem Vorliegen der AD Erkrankung assoziiert wird, war es unerwartet, besonders in den nicht induzierten Kokulturen ein vermehrtes Auftreten von TUBB3-positiven Strukturen zu beobachten. Hypothetisch könnten aktivierte Mikrogliazellen ohne A $\beta$ -Pathologie in der Lage sein, ihrer physiologischen Funktion, wie der Formung von intakten neuronalen Netzwerken und der Eliminierung von Synapsen (Synapseneliminierung, engl.: „Synaptic pruning“) und neuronalen Vorläuferzellen, nachzugehen (Graeber, 2010). Dies könnte im vorliegenden Modell bedeuten, dass neuronale Vorläuferzellen und geschädigte Neurone aktiv von Mikrogliazellen eliminiert werden. Um diese Hypothese zu belegen, könnten zukünftig Synapsen und neuronale Vorläuferzellen anhand von Immunfärbungen identifiziert und anschließend die Aufnahme in Mikrogliazellen überprüft werden.

#### 4.6 Kokultivierte iPSdMiG weisen an ihrer Zelloberfläche ein vermindertes Niveau der Rezeptoren CD11B, CX3CR1 und TREM2 auf

Mikrogliazellen weisen eine spezielle Oberflächenstruktur mit einer Vielzahl an Rezeptoren auf. Diese sind zum einen für die Zellen charakteristisch, zum anderen unterliegen diese Rezeptoren im Rahmen von Erkrankungen einem aktiven Wandel und können sowohl hoch- als auch herunterreguliert vorliegen (Kim und de Vellis, 2005). Für die Charakterisierung der iPSdMiG wurde in der dahingehenden Dissertation das Expressionsniveau des Integrins CD11B, des Chemokinrezeptors CX3CR1 sowie des TREM2 Rezeptors analysiert.

Dabei zeigte ein immunhistochemisches Experiment eine ubiquitäre und signifikante Reduktion des TREM2-Rezeptorniveaus unter Kokulturbedingungen im Vergleich zu den äquivalenten Monokulturen und offenbarte weiterhin TREM2-positive Strukturen unabhängig von den IBA1-positiven Zellen. In der Literatur gilt TREM2 als Zelloberflächen-Transmembran-Glykoprotein und besitzt eine Vielzahl von Funktionen. Es ist sowohl an der aktiven Gruppierung der Mikrogliazellen um Amyloid  $\beta$  als auch an dessen Phagozytose beteiligt. Dabei kann das Expressionsniveau erneut hoch- sowie herunterreguliert vorliegen. Neue Forschungen verweisen zudem darauf, dass TREM2 in der Lage ist, A $\beta$  zu binden und somit eine gerichtete Mikrogliaaktivierung hervorzurufen (Gratuze et al., 2018, Hansen et al., 2018, Zhao et al., 2018). Im Rahmen dieser Erkenntnisse können die immunhistochemischen TREM2-positiven Strukturen (Vgl. Abb. 14A) im gegebenen Kontext als Translokation auf neuronale bzw. amyloide Strukturen interpretiert werden, die es den iPSdMiG ermöglichen, ihre phagozytotische Aktivität zu entfalten. Um diesen Zusammenhang von amyloiden Strukturen und der Translokation des TREM2-Rezeptors in weiteren Experimenten zu bestätigen, könnte eine Ko-Färbung mit z.B. 6E10 und TREM2 zur Visualisierung genutzt werden.

Ein komplementäres Experiment konnte die TREM2 Reduktion weiter belegen. Dabei zeigte die Durchflusszytometrie neben der signifikanten TREM2 Reduktion weiterhin eine signifikante Reduktion des CX3CR1 Rezeptorniveaus im Vergleich der Mono- und Kokulturbedingungen unter Anwesenheit der A $\beta$ -Pathologie. Das Zelladhäsionsmolekül CD11B blieb hingegen ohne signifikante Veränderung.

Im Paper von Haenseler et al. (2017) wurde durchflusszytometrisch eine Reduktion des CD11B Zelladhäsionsmoleküls, im Rahmen eines stammzellbasierten Kokultursystems von Mikrogliazellen und iPSZ-abgeleiteten Neuronen in 2D, gezeigt. Andere Arbeiten verweisen jedoch darauf, dass CD11B, welches an der Zelladhäsion, der Phagozytose, an Entzündungsreaktionen und der Chemotaxis beteiligt ist, im Rahmen von Aktivierung in Mikroglia verstärkt exprimiert werden kann. Die funktionelle Bedeutung der verstärkten und verminderten Expression gilt dabei weiter als ungeklärt (Crain et al., 2013, Haenseler et al., 2017). CX3CR1 zählt hingegen zu den häufig exprimierten Chemokin-Rezeptoren und ist an der Kommunikation zwischen Neuronen und Mikrogliazellen beteiligt. Eine Reduktion bzw. Defizienz dieses Rezeptors wird in der Literatur mit besseren Phagozytoseeigenschaften der Zellen in Verbindung gebracht (Pong et al., 2013, Wolf et al., 2013). Diese Erkenntnis ist mit den vorliegenden Ergebnissen, dass iPSdMiG in Kokultur (besonders unter Anwesenheit der A $\beta$ -Pathologie) phagozytische Aktivität aufweisen, kongruent.

Neben der rein funktionellen Fähigkeit von Mikrogliazellen ihre Oberflächenrezeptoren durch eine an das Umfeld angepasste Genexpression zu verändern, muss ebenfalls eine technische Limitation des Modells in Betracht gezogen werden. Die Kokultur kann, bedingt durch das dichte neuronale Netzwerk und die Astrozyten, die Antikörper in der Migration zur Zielstruktur behindern bzw. Ansatzpunkt für unspezifische Bindungspunkte liefern. Um diesen Punkt zu adressieren wurden in der vorliegenden Dissertation unterschiedliche Experimente (Immunhistochemische Färbungen und Durchflusszytometrie) gewählt, um technische Limitationen weitgehend ausschließen zu können. Zukünftig könnten noch weitere Oberflächenmarker (wie z.B. CD33, CD45 und CD14) für eine weiterführende Charakterisierung ergänzt werden.

#### 4.7 Das Kokultursystem weist im Vergleich zu iPSdMiG Monokulturen unter LPS-Stimulation verringerte Zytokinwerte auf

Im Rahmen von neurodegenerativen Erkrankungen sowie anderen ZNS Pathologien führt eine Aktivierung von Mikrogliazellen i.d.R. zur Produktion von pro- und antiinflammatorischen Zytokinen (Smith et al., 2012). Die im vorliegenden Modell durchgeführte Analyse des Zytokinprofils zeigte am 5. Tag unerwarteterweise keinen

Unterschied zwischen den iPSdMiG Mono- und Kokulturen. Dabei ist anzumerken, dass eine mögliche akute Immunantwort auf die vorliegende A $\beta$ -Pathologie in den ersten Tagen der Kokultivierung zum Analysezeitpunkt potenziell nicht mehr nachweisbar ist, sodass für kommende Arbeiten weitere Analysezeitpunkte (z.B. 1. Tag, 3. Tag und 5. Tag) in Betracht gezogen werden sollten. In der aktuellen Literatur wird weiterhin darauf verwiesen, dass das Antibiotikum Doxycyclin einen Einfluss auf Aktivierbarkeit von Mikrogliazellen haben und dabei ein antiinflammatorisches Potenzial entfalten könnte (Santa-Cecília et al., 2016). Um diesen Punkt zu adressieren und weiterhin die Reagibilität der Zellen zu überprüfen, erfolgte die Einbringung von LPS als weiterer akuter Stimulus. LPS ist in der Mikrogliaforschung zur Untersuchung inflammatorischer Prozesse weit verbreitet und als bakterieller Bestandteil, durch seine Bindung am Toll-Like Rezeptors 4, in der Lage, diverse Signalkaskaden zu aktivieren und somit eine proinflammatorische Reaktion hervorzurufen (Lively und Schlichter, 2018). Unter Hinzunahme der LPS Stimulation konnte zum Teil ein signifikanter Anstieg der untersuchten Zytokine in den Bedingungen, auch in den zuvor mit Doxycyclin behandelten Kulturen, verzeichnet werden. Dies lässt im gegebenen Kontext auf eine adäquate Immunreaktion der iPSdMiG, unabhängig der zuvor gewählten Kulturbedingungen, schließen. Im direkten Vergleich der Mono- mit den korrespondierenden Kokulturbedingungen unter LPS waren in den Kokulturen verringerte Werte des proinflammatorischen Zytokins IL12 sowie des entzündungshemmenden Zytokins IL10 nachweisbar. Die verringerten Werte für IL10 und IL12 im Rahmen der Kokultur können als Anzeichen einer abgedämpften Immunantwort unter Kokulturbedingungen interpretiert werden.

Unter Vorlage der A $\beta$ -Pathologie konnte eine weitere signifikante Reduktion des proinflammatorischen Zytokins TNF $\alpha$  unter der Zugabe von LPS detektiert werden.

Diese gewonnenen Daten führen im gegebenen Kontext zu der Schlussfolgerung, dass die iPSdMiG unter einer doppelten Stimulation eine beeinträchtigte Immunreaktion aufweisen. Dabei fungiert das Kokultursystem als chronisches Stressereignis, während die LPS Stimulation als Infektionsereignis einen weiteren Trigger für die Mikrogliazellen-Aktivierung darstellt. Die weitere Reduktion im Rahmen der A $\beta$ -Pathologie lässt auf eine weitere Beeinträchtigung der Immunantwort schließen. Dabei ist anzumerken, dass das Kokulturmodell auch in Abwesenheit der AD Pathologie neurodegenerative Prozesse sowie geringe Amyloid Konzentrationen aufweist und Mikrogliazellen ebenfalls auf

geringfügige pathologische Veränderungen mit einer Aktivierung reagieren können (Kreutzberg, 1996).

Um ebenfalls der Möglichkeit nachzugehen, dass It-NES abgeleitete Neurone oder Astrozyten als weitere Quelle der Zytokinproduktion in Frage kommen, wurden zusätzlich mikrogliafreie It-NES abgeleitete Kulturen analysiert. Diese Analyse offenbarte nur geringfügig detektierbare Werte der zu untersuchenden Parameter, sodass die gemessene Zytokinproduktion im vorliegenden Modell auf die iPSdMiG zurückgeführt werden kann.

## 5. Zusammenfassung

Die Alzheimererkrankung ist die häufigste neurodegenerative Erkrankung weltweit. Ausgehend vom Jahr 2010 bis zum Jahr 2050 werden sich die Zahlen nach mathematischen Schätzungen ca. verdreifachen (Hebert et al., 2013). Besonders die Erforschung von Therapieoptionen gestaltete sich in der Vergangenheit, durch den Mangel an suffizienten Modellen bzw. den Einsatz von Tiermodellen, die die AD Pathologie nur unzureichend widerspiegeln, schwierig. Erste Fortschritte stellte die Etablierung von human iPSZ-abgeleiteten Modellen dar, die bereits Teilaspekte der AD Pathologie und besonders den humantypischen Charakter der Erkrankung rekapitulieren konnten. Erst vor kurzem ist es gelungen, weitere humane AD-relevante Zelltypen, wie z.B. Mikrogliazellen, zu generieren und damit die AD Forschung voranzubringen.

Das in dieser Dissertation etablierte humane iPSZ-abgeleitete 3D Kokultursystem soll den Weg für die weitere Erforschung der komplexen pathophysiologischen Prozesse von Morbus Alzheimer in vitro ebnen und dazu beitragen, Mikrogliazellen mehr in den Fokus der AD Forschung zu rücken, da bisherige Therapieoptionen, die sich rein mit der Verringerung der Amyloidpathologie beschäftigt haben, fehlgeschlagen sind. Dazu wurde das bestehende in vitro Modell mit Fokus auf der extrazellulären A $\beta$ - und intrazellulären Tau-Pathologie, um neurodegenerative und neuroinflammatorische Gesichtspunkte, durch die Zugabe von humanen Mikrogliazellen, ergänzt.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die transgenen iPSZ (imAP) unter Doxycyclin eine stabile Bildung von 6E10-positiven Aggregaten und eine signifikant erhöhte Amyloid  $\beta$  Konzentration erzeugen. Im Weiteren konnte im Rahmen der Kokultivierung das Zusammenspiel der Mikrogliazellen mit der neuronalen Umgebung untersucht werden. Dabei zeigte sich zum einen eine stabile Überlebensfähigkeit der iPSdMiG im Untersuchungszeitraum von 5 Tagen, zum anderen konnten Hinweise auf eine ausgeprägte Phagozytosefähigkeit gefunden werden. Konfokal-mikroskopische Untersuchungen zeigten Kollokalisierungen von Mikrogliazellen mit sowohl apoptotischen Zellen als auch 6E10 positiven Strukturen. Zudem ließen sich durch 3D Rekonstruktion die eben genannten Strukturen innerhalb der Mikrogliazelle nachweisen, was auf eine aktive Aufnahme der Bestandteile schließen lässt. Weiterhin konnte unter Vorlage der A $\beta$ -Pathologie eine fast 3-fach erhöhte Amyloid Menge (Vgl. Abb. 10B) innerhalb der

Mikrogliazelle sowie ein Gruppierungsverhalten um pathologische 6E10 positive Aggregate nachgewiesen werden. Diese Beobachtungen im vorliegenden in vitro Modell sind nach aktuellem Forschungsstand mit dem physiologischen Verhalten von Mikrogliazellen in vivo vereinbar, was die Reliabilität des Modells unterstreicht. Des Weiteren konnte eine Modulierbarkeit und Reagibilität des Zytokin- und Oberflächenexpressionsprofils sowie der Morphologie der Mikrogliazellen nachgewiesen werden, was durch die Hinzunahme weiterer Parameter (weitere Zytokine und Oberflächenmarker) sowie weiterer Tools (z.B. „Machine Learning“) neue Ansatzpunkte für zukünftige Forschungsfragen liefert.

Das vorliegende humane Kokultursystem schafft eine gute Grundvoraussetzung für die Erforschung und Etablierung neuer Therapieoptionen für AD. Besonders immunologische Gesichtspunkte und die Rolle der Mikrogliazellen können mit dem vorliegenden Modell weiter ergründet werden. Dabei ermöglicht dieses leicht zugängliche in vitro Modell potenziell auch die parallele Testung einer Reihe von therapeutischen Substanzen.

## 6.                    **Abbildungsverzeichnis**

|                                                                                                                                                                            |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Abb. 1:</b> Das 3D AD-Modell beinhaltet ein Genkonstrukt aus mutiertem APP (K670N/M671L und V717I) und Presenilin1 (dE9) sowie dem Fluoreszenzreporter mCherry          | 22 |
| <b>Abb. 2:</b> Kultivierungsplan der iPSdMiG                                                                                                                               | 23 |
| <b>Abb. 3:</b> FAD-Transgenexpression führt im 3D AD-Modell zur Bildung von 6E10-positiven Aggregaten                                                                      | 46 |
| <b>Abb. 4:</b> Bestimmung der A $\beta$ Konzentration und des A $\beta$ 42/40 Quotienten in 3D Matrixkulturen                                                              | 49 |
| <b>Abb. 5:</b> Erhöhte Apoptoserate in 6 Wochen alten 3D AD Matrixkulturen.                                                                                                | 50 |
| <b>Abb. 6:</b> S100 $\beta$ - und GFAP-Immunoreaktivität in 6 Wochen alten 3D Matrixkulturen                                                                               | 52 |
| <b>Abb. 7:</b> Differenzierungsplan der iPSdMiG Mono- und Kokulturen                                                                                                       | 53 |
| <b>Abb. 8:</b> Oberflächenmarkerprofil und Apoptoserate in iPSdMiG unter den 3D Monokulturbedingungen                                                                      | 55 |
| <b>Abb. 9:</b> Internalisiertes cCAS3-positives Material in iPSdMiG in 6 Wochen alten 3D Kokulturen                                                                        | 57 |
| <b>Abb. 10:</b> Mikrogliazellen umgeben und phagozytieren 6E10-positive Aggregate in 6 Wochen alten 3D AD Kokulturen                                                       | 59 |
| <b>Abb. 11:</b> Bestimmung der A $\beta$ Konzentration und des A $\beta$ 42/40 Quotienten in 6 Wochen alten 3D Kokulturen im Vergleich zu den neuronalen 3D Matrixkulturen | 62 |
| <b>Abb. 12:</b> Morphologische Analyse von iPSdMiG in 3D Kokulturen                                                                                                        | 63 |
| <b>Abb. 13:</b> imAP-Zellen weisen in Mikroglia-Kokultur in Anwesenheit von Doxycylin weniger TUBB3+ Partikel auf                                                          | 64 |
| <b>Abb. 14:</b> Immunhistochemischer Nachweis der TREM2 Reduktion in Kokultur                                                                                              | 66 |
| <b>Abb. 15:</b> Humane Mikrogliazellen zeigen in 3D Kokulturen eine verringerte Expression Mikroglia-typischer Oberflächenmarker                                           | 68 |
| <b>Abb. 16:</b> iPSdMiG zeigen in induzierten Kokulturen unter LPS-Stimulation eine reduzierte Zytokinsekretion                                                            | 73 |

## 7. Tabellenverzeichnis

|                                                                |    |
|----------------------------------------------------------------|----|
| <b>Tab. 1:</b> Technische Geräte.....                          | 26 |
| <b>Tab. 2:</b> Zellkulturmaterial.....                         | 28 |
| <b>Tab. 3:</b> Chemikalien und Zellkultur-Agenzien .....       | 29 |
| <b>Tab. 4:</b> Primäre Antikörper .....                        | 31 |
| <b>Tab. 5:</b> Sekundäre Antikörper .....                      | 32 |
| <b>Tab. 6:</b> Antibiotika .....                               | 33 |
| <b>Tab. 7:</b> FEB-Medium .....                                | 33 |
| <b>Tab. 8:</b> Glukose Stammlösung (100x).....                 | 33 |
| <b>Tab. 9:</b> Lt-NES Gefriermedium.....                       | 33 |
| <b>Tab. 10:</b> N2-Medium .....                                | 33 |
| <b>Tab. 11:</b> NGMC – Medium .....                            | 34 |
| <b>Tab. 12:</b> PBS-EDTA.....                                  | 34 |
| <b>Tab. 13:</b> Fibonektin/ Poly-L-Ornithin Beschichtung.....  | 34 |
| <b>Tab. 14:</b> Laminin/ Poly-L-Ornithin Beschichtung.....     | 34 |
| <b>Tab. 15:</b> Stem Brew Medium.....                          | 35 |
| <b>Tab. 16:</b> Trypsin .....                                  | 35 |
| <b>Tab. 17:</b> Software.....                                  | 35 |
| <b>Tab. 18:</b> Blocking-Lösung für Membranantigene .....      | 40 |
| <b>Tab. 19:</b> Blocking-Lösung für intranukleäre Marker ..... | 40 |
| <b>Tab. 20:</b> MSD Kits .....                                 | 43 |

## 8. Literaturverzeichnis

Au NPB, Ma CHE. Recent advances in the study of bipolar/rod-shaped microglia and their roles in neurodegeneration. *Front Aging Neurosci* 2017; 9: 1–16

Baghallab I, Reyes-Ruiz JM, Abulnaja K, Huwait E, Glabe C. Epitomic Characterization of the Specificity of the Anti-Amyloid A $\beta$  Monoclonal Antibodies 6E10 and 4G8. *J Alzheimer's Dis* 2018; 66: 1235–1244

Bassil R, Shields K, Granger K, Zein I, Ng S, Chih B. Improved modeling of human AD with an automated culturing platform for iPSC neurons, astrocytes and microglia. *Nat Commun* 2021; 12(1): 5220

Bateman RJ, Aisen PS, De Strooper B, Fox NC, Lemere CA, Ringman JM, Salloway S, Sperling RA, Windisch M, Xiong C. Autosomal-dominant Alzheimer's disease: a review and proposal for the prevention of Alzheimer's disease. *Alzheimers Res Ther* 2011; 3(1): 1

Bodnar B, Zhang Y, Liu J, Lin Y, Wang P, Wei Z, Saribas S, Zhu Y, Li F, Wang X, Yang W, Li Q, Ho WZ, Hu W. Novel Scalable and Simplified System to Generate Microglia-Containing Cerebral Organoids From Human Induced Pluripotent Stem Cells. *Front Cell Neurosci* 2021; 15

Breijyeh Z, Karaman R. Comprehensive Review on Alzheimer's Disease: Causes and Treatment. *Molecules* 2020; 25(24): 5789

Brown GC, Neher JJ. Microglial phagocytosis of live neurons. *Nat Rev Neurosci* 2014; 15(4): 209–216

Brucato FH, Benjamin DE. Synaptic Pruning in Alzheimer's Disease: Role of the Complement System. *Glob J Med Res* 2020; 20(6): 10.34257/gjmr/vol20is6pg1

Calsolaro V, Edison P. Neuroinflammation in Alzheimer's disease: Current evidence and future directions. *Alzheimer's Dement* 2016; 12(6): 719–732

Cenini G, Hebisch M, Iefremova V, Flitsch LJ, Breitkreuz Y, Tanzi RE, Kim DY, Peitz M, Brüstle O. Dissecting Alzheimer's disease pathogenesis in human 2D and 3D models. *Mol Cell Neurosci* 2021; 110: 103568

Chen X, Sun G, Tian E, Zhang M, Davtayan H, Beach TG, Reiman EM, Blurton-Jones M, Holtzman DM, Shi Y. Modeling Sporadic Alzheimer's Disease in Human Brain Organoids under Serum Exposure. *Adv Sci* 2021; 8(18): 1–16

Choi SH, Kim YH, Hebisch M, Sliwinski C, Lee S, D'Avanzo C, Chen H, Hooli B, Asselin C, Muffat J, Klee JB, Zhang C, Wainger BJ, Peitz M, Kovacs DM, Woolf CJ, Wagner SL, Tanzi RE, Kim DY. A three-dimensional human neural cell culture model of Alzheimer's disease. *Nature* 2014; 515(7526): 274–278

Choi SS, Lee HJ, Lim I, Satoh J, Kim SU. Human astrocytes: secretome profiles of cytokines and chemokines. *PLoS One* 2014; 9(4): e92325

Chung H, Brazil MI, Soe TT, Maxfield FR. Uptake, Degradation, and Release of Fibrillar and Soluble Forms of Alzheimer's Amyloid  $\beta$ -Peptide by Microglial Cells. *J Biol Chem* 1999; 274(45): 32301–32308

Colonna M, Wang Y. TREM2 variants: new keys to decipher Alzheimer disease pathogenesis. *Nat Rev Neurosci* 2016; 17(4): 201–207

Condello C, Yuan P, Schain A, Grutzendler J. Microglia constitute a barrier that prevents neurotoxic protofibrillar A $\beta$ 42 hotspots around plaques. *Nat Commun* 2015; 6: 6176

Crain JM, Nikodemova M, Watters JJ. Microglia express distinct M1 and M2 phenotypic markers in the postnatal and adult central nervous system in male and female mice. *J Neurosci Res* 2013; 91(9): 1143–1151

Delpech J-C, Madore C, Nadjar A, Joffre C, Wohleb ES, Layé S. Microglia in neuronal plasticity: Influence of stress. *Neuropharmacology* 2015; 96: 19–28

Eng LF, Ghirnikar RS. GFAP and Astrogliosis. *Brain Pathol* 1994; 4(3): 229–237

Eng LF, Ghirnikar RS, Lee YL. Glial Fibrillary Acidic Protein: GFAP-Thirty-One Years (1969–2000). *Neurochem Res* 2000; 25(9): 1439–1451

Finder VH, Glockshuber R. Amyloid- $\beta$  Aggregation. *Neurodegener Dis* 2007; 4(1): 13–27

Franco-Bocanegra DK, Gourari Y, McAuley C, Chatelet DS, Johnston DA, Nicoll JAR, Boche D. Microglial morphology in Alzheimer's disease and after A $\beta$  immunotherapy. *Sci Rep* 2021; 11(1): 15955

Graeber MB. Changing face of microglia. *Science* 2010; 330(6005): 783–788

Gratuze M, Leyns CEG, Holtzman DM. New insights into the role of TREM2 in Alzheimer's disease. *Mol Neurodegener* 2018; 13(1): 66

Griciuc A, Patel S, Federico AN, Choi SH, Innes BJ, Oram MK, Cereghetti G, McGinty D, Anselmo A, Sadreyev RI, Hickman SE, El Khoury J, Colonna M, Tanzi RE. TREM2 Acts Downstream of CD33 in Modulating Microglial Pathology in Alzheimer's Disease. *Neuron* 2019; 103(5): 820-835.e7

Haass C, Kaether C, Thinakaran G, Sisodia S. Trafficking and proteolytic processing of APP. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2012; 2(5): a006270

Haenseler W, Sansom SN, Buchrieser J, Newey SE, Moore CS, Nicholls FJ, Chintawar S, Schnell C, Antel JP, Allen ND, Cader MZ, Wade-Martins R, James WS, Cowley SA. A Highly Efficient Human Pluripotent Stem Cell Microglia Model Displays a Neuronal-Co-culture-Specific Expression Profile and Inflammatory Response. *Stem Cell Reports* 2017;

8(6): 1727–1742

Hansen D V, Hanson JE, Sheng M. Microglia in Alzheimer's disease. *J Cell Biol* 2018; 217(2): 459–472

Hansson O, Lehmann S, Otto M, Zetterberg H, Lewczuk P. Advantages and disadvantages of the use of the CSF Amyloid  $\beta$  (A $\beta$ ) 42/40 ratio in the diagnosis of Alzheimer's Disease. *Alzheimers Res Ther* 2019; 11(1): 34

Hardy J, Selkoe DJ. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science* 2002; 297(5580): 353–356

Hardy JA, Higgins GA. Alzheimer's Disease: The Amyloid Cascade Hypothesis. *Science* 1992; 256(5054): 184–185

Hebert LE, Weuve J, Scherr PA, Evans DA. Alzheimer disease in the United States (2010–2050) estimated using the 2010 census. *Neurology* 2013; 80(19): 1778–1783

Hebisch, Matthias Alexander Sebastian: Establishment of an inducible human pluripotent stem cell-based 3D model of Alzheimer's disease. - Bonn, 2020. - Dissertation, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn. Online-Ausgabe in bonndoc: <https://nbn-resolving.org/urn:nbn:de:hbz:5-60401>

Hollingworth P, Harold D, Sims R, Gerrish A, Lambert J-C, Carrasquillo MM, Abraham R, Hamshere ML, Pahwa JS, Moskvina V, Dowzell K, Jones N, Stretton A, Thomas C, Richards A, Ivanov D, Widdowson C, Chapman J, Lovestone S, Powell J, Proitsi P, Lupton MK, Brayne C, Rubinsztein DC, Gill M, Lawlor B, Lynch A, Brown KS, Passmore PA, Craig D, McGuinness B, Todd S, Holmes C, Mann D, Smith AD, Beaumont H, Warden D, Wilcock G, Love S, Kehoe PG, Hooper NM, Vardy ERLC, Hardy J, Mead S, Fox NC, Rossor M, Collinge J, Maier W, Jessen F, Ruther E, Schürmann B, Heun R, Kölsch H, van den Bussche H, Heuser I, Kornhuber J, Wiltfang J, Dichgans M, Frölich L, Hampel H, Gallacher J, Hüll M, Rujescu D, Giegling I, Goate AM, Kauwe JSK, Cruchaga C, Nowotny

P, Morris JC, Mayo K, Sleegers K, Bettens K, Engelborghs S, De Deyn PP, Van Broeckhoven C, Livingston G, Bass NJ, Gurling H, McQuillin A, Gwilliam R, Deloukas P, Al-Chalabi A, Shaw CE, Tsolaki M, Singleton AB, Guerreiro R, Mühleisen TW, Nöthen MM, Moebus S, Jöckel KH, Klopp N, Wichmann HE, Pankratz VS, Sando SB, Aasly JO, Barcikowska M, Wszolek ZK, Dickson DW, Graff-Radford NR, Petersen RC, van Duijn CM, Breteler MMB, Ikram MA, DeStefano AL, Fitzpatrick AL, Lopez O, Launer LJ, Seshadri S, Berr C, Champion D, Epelbaum J, Dartigues JF, Tzourio C, Alépovitch A, Lathrop M, Feulner TM, Friedrich P, Riehle C, Krawczak M, Schreiber S, Mayhaus M, Nicolhaus S, Wagenpfeil S, Steinberg S, Stefansson H, Stefansson K, Snaedal J, Björnsson S, Jonsson PV, Chouraki V, Genier-Boley B, Hiltunen M, Soininen H, Combarros O, Zelenika D, Delepine M, Bullido MJ, Pasquier F, Mateo I, Frank-Garcia A, Porcellini E, Hanon O, Coto E, Alvarez V, Bosco P, Siciliano G, Mancuso M, Panza F, Solfrizzi V, Nacmias B, Sorbi S, Bossù P, Piccardi P, Arosio B, Annoni G, Seripa D, Pilotto A, Scarpini E, Galimberti D, Brice A, Hannequin D, Licastro F, Jones L, Holmans PA, Jonsson T, Riemenschneider M, Morgan K, Younkin SG, Owen MJ, O'Donovan M, Amouyel P, Williams J. Common variants at ABCA7, MS4A6A/MS4A4E, EPHA1, CD33 and CD2AP are associated with Alzheimer's disease. *Nat Genet* 2011; 43(5): 429–435

Hong S, Dissing-Olesen L, Stevens B. New insights on the role of microglia in synaptic pruning in health and disease. *Curr Opin Neurobiol* 2016; 36: 128–134

Huang Y, Mucke L. Alzheimer mechanisms and therapeutic strategies. *Cell* 2012; 148(6): 1204–1222

Ingelsson M, Fukumoto H, Newell KL, Growdon JH, Hedley-Whyte ET, Frosch MP, Albert MS, Hyman BT, Irizarry MC. Early Abeta accumulation and progressive synaptic loss, gliosis, and tangle formation in AD brain. *Neurology* 2004; 62(6): 925–931

Jain P, Wadhwa PK, Jadhav HR. Reactive Astroglia: Role in Alzheimer's Disease. *CNS Neurol Disord Targets* 2015; 14(7): 872–879

Janda E, Boi L, Carta AR. Microglial phagocytosis and its regulation: A therapeutic target

in parkinson's disease? *Front Mol Neurosci* 2018; 11: 144

Jantzie LL, Cheung P-Y, Todd KG. Doxycycline reduces cleaved caspase-3 and microglial activation in an animal model of neonatal hypoxia-ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 2005; 25(3): 314–324

Jay TR, von Saucken VE, Landreth GE. TREM2 in Neurodegenerative Diseases. *Mol Neurodegener* 2017; 12(1): 56

Jiang T, Zhang Y-D, Gao Q, Zhou J-S, Zhu X-C, Lu H, Shi JQ, Tan L, Chen Q, Yu J-T. TREM1 facilitates microglial phagocytosis of amyloid beta. *Acta Neuropathol* 2016; 132(5): 667–683

Kamphuis W, Middeldorp J, Kooijman L, Sluijs JA, Kooi E-J, Moeton M, Freriks M, Mizee MR, Hol EM. Glial fibrillary acidic protein isoform expression in plaque related astrogliosis in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 2014; 35(3): 492–510

Karch CM, Goate AM. Alzheimer's disease risk genes and mechanisms of disease pathogenesis. *Biol Psychiatry* 2015; 77(1): 43–51

Kettenmann H, Hanisch UK, Noda M, Verkhratsky A. Physiology of microglia. *Physiol Rev* 2011; 91(2): 461–553

Khoury R, Rajamanickam J, Grossberg GT. An update on the safety of current therapies for Alzheimer's disease: focus on rivastigmine. *Ther Adv Drug Saf* 2018; 9(3): 171–178

Kim SU, de Vellis J. Microglia in health and disease. *J Neurosci Res* 2005; 81(3): 302–313

Kim Y, Deshpande A, Dai Y, Kim JJ, Lindgren A, Conway A, Clark AT, Wong DT. Cyclin-dependent kinase 2-associating protein 1 commits murine embryonic stem cell differentiation through retinoblastoma protein regulation. *J Biol Chem* 2009; 284(35):

23405–23414

Klein WL. Synaptotoxic amyloid- $\beta$  oligomers: a molecular basis for the cause, diagnosis, and treatment of Alzheimer's disease? *J Alzheimers Dis* 2013; 33 Suppl 1: S49-65

Koch P, Opitz T, Steinbeck JA, Ladewig J, Brüstle O. A rosette-type, self-renewing human ES cell-derived neural stem cell with potential for in vitro instruction and synaptic integration. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009; 106(9): 3225–3230

Kreutzberg GW. Microglia: a sensor for pathological events in the CNS. *Trends Neurosci* 1996; 19(8): 312–318

Kwak SS, Washicosky KJ, Brand E, von Maydell D, Aronson J, Kim S, Capen DE, Cetinbas M, Sadreyev R, Ning S, Bylykbashi E, Xia W, Wagner SL, Choi SH, Tanzi RE, Kim DY. Amyloid- $\beta$ 42/40 ratio drives tau pathology in 3D human neural cell culture models of Alzheimer's disease. *Nat Commun* 2020; 11(1): 1377

Lessard CB, Malnik SL, Zhou Y, Ladd TB, Cruz PE, Ran Y, Chakrabaty P, Mahan TE, Holtzman DM, Colonna M, Ulrich JD, Golde TE. High affinity interactions and signal transduction between A $\beta$  oligomers and TREM2. *EMBO Mol Med*. 2018; 10(11): e9027

Leyh J, Paeschke S, Mages B, Michalski D, Nowicki M, Bechmann I, Winter K. Classification of Microglial Morphological Phenotypes Using Machine Learning. *Front Cell Neurosci* 2021; 15: 241

Linnartz-Gerlach B, Mathews M, Neumann H. Sensing the neuronal glycocalyx by glial sialic acid binding immunoglobulin-like lectins. *Neuroscience* 2014; 275: 113–124

Lively S, Schlichter LC. Microglia Responses to Pro-inflammatory Stimuli (LPS, IFN $\gamma$ +TNF $\alpha$ ) and Reprogramming by Resolving Cytokines (IL-4, IL-10). *Front Cell Neurosci* 2018; 12: 215

Maragakis NJ, Rothstein JD. Mechanisms of Disease: astrocytes in neurodegenerative disease. *Nat Clin Pract Neurol* 2006; 2(12): 679–689

Mathews M, Wißfeld J, Flitsch LJ, Shahraz A, Semkova V, Breitzkreuz Y, Neumann H, Brüstle O. Reenacting Neuroectodermal Exposure of Hematopoietic Progenitors Enables Scalable Production of Cryopreservable iPSC-Derived Human Microglia. *Stem Cell Rev Reports* 2023; 19(2):455-474

Matsuda H. MRI morphometry in Alzheimer's disease. *Ageing Res Rev* 2016; 30: 17–24

McComish SF, Caldwell MA. Generation of defined neural populations from pluripotent stem cells. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2018; 373(1750): 20170214

McKhann GM, Knopman DS, Chertkow H, Hyman BT, Jack Jr CR, Kawas CH, Klunk WE, Koroshetz WJ, Manly JJ, Mayeux R, Mohs RC, Morris JC, Rossor MN, Scheltens P, Carrillo MC, Thies B, Weintraub S, Phelps CH. The diagnosis of dementia due to Alzheimer's disease: recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement* 2011; 7(3): 263–269

Mertens J, Stüber K, Poppe D, Doerr J, Ladewig J, Brüstle O, Koch P. Embryonic stem cell-based modeling of tau pathology in human neurons. *Am J Pathol* 2013; 182(5): 1769–1779

Michelucci A, Heurtaux T, Grandbarbe L, Morga E, Heuschling P. Characterization of the microglial phenotype under specific pro-inflammatory and anti-inflammatory conditions: Effects of oligomeric and fibrillar amyloid-beta. *J Neuroimmunol* 2009; 210(1–2): 3–12

Minter MR, Taylor JM, Crack PJ. The contribution of neuroinflammation to amyloid toxicity in Alzheimer's disease. *J Neurochem* 2016; 136(3): 457–474

Mittelbronn M, Dietz K, Schluesener HJ, Meyermann R. Local distribution of microglia in

the normal adult human central nervous system differs by up to one order of magnitude. *Acta Neuropathol* 2001; 101(3): 249–255

Morales I, Guzmán-Martínez L, Cerda-Troncoso C, Farías GA, Maccioni RB. Neuroinflammation in the pathogenesis of Alzheimer's disease. A rational framework for the search of novel therapeutic approaches. *Front Cell Neurosci* 2014; 8: 112

Mrak RE, Sheng JG, Griffin WS. Correlation of astrocytic S100 beta expression with dystrophic neurites in amyloid plaques of Alzheimer's disease. *J Neuropathol Exp Neurol* 1996; 55(3): 273–279

Muratore CR, Rice HC, Srikanth P, Callahan DG, Shin T, Benjamin LNP, Walsh DM, Selkoe DJ, Young-Pearse TL. The familial Alzheimer's disease APPV717I mutation alters APP processing and Tau expression in iPSC-derived neurons. *Hum Mol Genet* 2014; 23(13): 3523–3536

Naj AC, Jun G, Beecham GW, Wang L-S, Vardarajan BN, Buross J, Gallins PJ, Buxbaum JD, Jarvik GP, Crane PK, Larson EB, Bird TD, Boeve BF, Graff-Radford NR, De Jager PL, Evans D, Schneider JA, Carrasquillo MM, Ertekin-Taner N, Younkin SG, Cruchaga C, Kauwe JSK, Nowotny P, Kramer P, Hardy J, Huentelman MJ, Myers AJ, Barmada MM, Demirci FY, Baldwin CT, Green RC, Rogava E, St George-Hyslop P, Arnold SE, Barber R, Beach T, Bigio EH, Bowen JD, Boxer A, Burke JR, Cairns NJ, Carlson CS, Carney RM, Carroll SL, Chui HC, Clark DG, Corneveaux J, Cotman CW, Cummings JL, DeCarli C, DeKosky ST, Diaz-Arrastia R, Dick M, Dickson DW, Ellis WG, Faber KM, Fallon KB, Farlow MR, Ferris S, Frosch MP, Galasko DR, Ganguli M, Gearing M, Geschwind DH, Ghetti B, Gilbert JR, Gilman S, Giordani B, Glass JD, Growdon JH, Hamilton RL, Harrell LE, Head E, Honig LS, Hulette CM, Hyman BT, Jicha GA, Jin LW, Johnson N, Karlawish J, Karydas A, Kaye JA, Kim R, Koo EH, Kowall NW, Lah JJ, Levey AI, Lieberman AP, Lopez OL, Mack WJ, Marson DC, Martiniuk F, Mash DC, Masliah E, McCormick WC, McCurry SM, McDavid AN, McKee AC, Mesulam M, Miller BL, Miller CA, Miller JW, Parisi JE, Perl DP, Peskind E, Petersen RC, Poon WW, Quinn JF, Rajbhandary RA, Raskind M, Reisberg B, Ringman JM, Roberson ED, Rosenberg RN, Sano M, Schneider LS, Seeley

W, Shelanski ML, Slifer MA, Smith CD, Sonnen JA, Spina S, Stern RA, Tanzi RE, Trojanowski JQ, Troncoso JC, Van Deerlin VM, Vinters HV, Vonsattel JP, Weintraub S, Welsh-Bohmer KA, Williamson J, Woltjer RL, Cantwell LB, Dombroski BA, Beekly D, Lunetta KL, Martin ER, Kamboh MI, Saykin AJ, Reiman EM, Bennett DA, Morris JC, Montine TJ, Goate AM, Blacker D, Tsuang DW, Hakonarson H, Kukull WA, Foroud TM, Haines JL, Mayeux R, Pericak-Vance MA, Farrer LA, Schellenberg GD. Common variants at MS4A4/MS4A6E, CD2AP, CD33 and EPHA1 are associated with late-onset Alzheimer's disease. *Nat Genet* 2011; 43(5): 436–441

Nayak D, Roth TL, McGavern DB. Microglia development and function. *Annu Rev Immunol* 2014; 32: 367–402

Neumann H, Takahashi K. Essential role of the microglial triggering receptor expressed on myeloid cells-2 (TREM2) for central nervous tissue immune homeostasis. *J Neuroimmunol* 2007; 184(1-2): 92–99

Olufunmilayo EO, Holsinger RMD. Variant TREM2 Signaling in Alzheimer's Disease. *J Mol Biol* 2022; 434(7): 167470

Onos KD, Sukoff Rizzo SJ, Howell GR, Sasner M. Toward more predictive genetic mouse models of Alzheimer's disease. *Brain Res Bull* 2016; 122: 1–11

Paolicelli RC, Bolasco G, Pagani F, Maggi L, Scianni M, Panzanelli P, Giustetto M, Ferreira TA, Guiducci E, Dumas L. Synaptic pruning by microglia is necessary for normal brain development. *Science* 2011; 333(6048): 1456–1458

Park J-K, Son D-C, Choi K-H, Lee C-K. Dox-inducible induced pluripotent stem cell lines derived from porcine embryonic fibroblasts. *한국발생생물학회 (The Korea Society of Developmental Biology)* 2013 년도 추계학술대회; 2013.08: 111

Park J, Wetzel I, Marriott I, Dréau D, D'Avanzo C, Kim DY, Tanzi RE, Cho H. A 3D human

triculture system modeling neurodegeneration and neuroinflammation in Alzheimer's disease. *Nat Neurosci* 2018; 21(7): 941–951

Pong WW, Higer SB, Gianino SM, Emmett RJ, Gutmann DH. Reduced microglial CX3CR1 expression delays neurofibromatosis-1 glioma formation. *Ann Neurol* 2013; 73(2): 303–308

Prince M, Albanese E, Guerchet M, Prina M. World Alzheimer Report 2014: Dementia and risk reduction: An analysis of protective and modifiable risk factors. *Alzheimer's Disease International*, 2014

Roese-Koerner B, Stappert L, Berger T, Braun NC, Veltel M, Jungverdorben J, Evert BO, Peitz M, Borghese L, Brüstle O. Reciprocal Regulation between Bifunctional miR-9/9\* and its Transcriptional Modulator Notch in Human Neural Stem Cell Self-Renewal and Differentiation. *Stem Cell Reports* 2016; 7(2): 207–219

Santa-Cecília FV, Socias B, Ouidja MO, Sepulveda-Diaz JE, Acuña L, Silva RL, Michel PP, Del-Bel E, Cunha TM, Raisman-Vozari R. Doxycycline Suppresses Microglial Activation by Inhibiting the p38 MAPK and NF- $\kappa$ B Signaling Pathways. *Neurotox Res* 2016; 29(4): 447–459

Scheuner D, Eckman C, Jensen M, Song X, Citron M, Suzuki N, Bird TD, Hardy J, Hutton M, Kukull W, Larson E, Levy-Lahad L, Viitanen M, Peskind E, Poorkaj P, Schellenberg G, Tanzi R, Wasco W, Lannfelt L, Selkoe D, Younkin S. Secreted amyloid  $\beta$ -protein similar to that in the senile plaques of Alzheimer's disease is increased in vivo by the presenilin 1 and 2 and APP mutations linked to familial Alzheimer's disease. *Nat Med* 1996; 2(8): 864–870

Schindelin J, Arganda-Carreras I, Frise E, Kaynig V, Longair M, Pietzsch T, Preibisch S, Rueden C, Saalfeld S, Schmid B, Tinevez JY, White DJ, Hartenstein V, Eliceiri K, Tomancak P, Cardona A. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat Methods* 2012; 9(7): 676–682

Schoch KM, Ezerskiy LA, Morhaus MM, Bannon RN, Sauerbeck AD, Shabsovich M, Jafar-Nejad P, Rigo F, Miller TM. Acute Trem2 reduction triggers increased microglial phagocytosis, slowing amyloid deposition in mice. *Proc Natl Acad Sci* 2021; 118(27)

Selkoe DJ, Hardy J. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease at 25 years. *EMBO Mol Med* 2016; 8(6): 595–608

Serrano-Pozo A, Frosch MP, Masliah E, Hyman BT. Neuropathological alterations in Alzheimer disease. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2011; 1(1): a006189

Serrano-Pozo A, Mielke ML, Gómez-Isla T, Betensky RA, Growdon JH, Frosch MP, Hyman BT. Reactive glia not only associates with plaques but also parallels tangles in Alzheimer's disease. *Am J Pathol* 2011; 179(3): 1373–1384

Shaffer LM, Dority MD, Gupta-Bansal R, Frederickson RCA, Younkin SG, Brunden KR. Amyloid  $\beta$  protein (A $\beta$ ) removal by neuroglial cells in culture. *Neurobiol Aging* 1995; 16(5): 737–745

Sheng P, Liao W, Xiaoyan LI. The transfection of bone marrow stem cell with Tet-on regulating system and the pilot study of doxycycline depending expression with Tet-on regulating system. *Chinese J Orthop* 2001; 03

Shi Y, Kirwan P, Smith J, MacLean G, Orkin SH, Livesey FJ. A human stem cell model of early Alzheimer's disease pathology in Down syndrome. *Sci Transl Med* 2012; 4(124): 124ra29

Sierra A, Abiega O, Shahrzad A, Neumann H. Janus-faced microglia: beneficial and detrimental consequences of microglial phagocytosis. *Front Cell Neurosci* 2013; 7: 6

Smith JA, Das A, Ray SK, Banik NL. Role of pro-inflammatory cytokines released from microglia in neurodegenerative diseases. *Brain Res Bull* 2012; 87(1): 10–20

Solito E, Sastre M. Microglia function in Alzheimer's disease. *Front Pharmacol* 2012; 3: 14

Speicher AM, Wiendl H, Meuth SG, Pawlowski M. Generating microglia from human pluripotent stem cells: novel in vitro models for the study of neurodegeneration. *Mol Neurodegener* 2019; 14(1): 46

Spies PE, Slats D, Sjögren JMC, Kremer BPH, Verhey FRJ, Rikkert MGMO, Verbeek MM. The cerebrospinal fluid amyloid beta42/40 ratio in the differentiation of Alzheimer's disease from non-Alzheimer's dementia. *Curr Alzheimer Res* 2010; 7(5): 470–476

Stalder M, Deller T, Staufenbiel M, Jucker M. 3D Reconstruction of microglia and amyloid in APP23 transgenic mice: no evidence of intracellular amyloid. *Neurobiol Aging* 2001; 22(3): 427–434

Steiner J, Bogerts B, Schroeter ML, Bernstein H-G. S100B protein in neurodegenerative disorders. *Clin Chem Lab Med* 2011; 49(3): 409–424

Tajbakhsh A, Read M, Barreto GE, Ávila-Rodríguez M, Gheibi-Hayat SM, Sahebkar A. Apoptotic neurons and amyloid-beta clearance by phagocytosis in Alzheimer's disease: Pathological mechanisms and therapeutic outlooks. *Eur J Pharmacol* 2021; 895: 173873

Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* 2007; 131(5): 861–872

Tam WY, Au NPB, Ma CHE. The association between laminin and microglial morphology in vitro. *Sci Rep* 2016; 6(1): 28580

Tam WY, Ma CHE. Bipolar/rod-shaped microglia are proliferating microglia with distinct M1/M2 phenotypes. *Sci Rep* 2014; 4: 7279

Thomson JA, Itskovit Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, Jones JM. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 1998; 282 (5391): 1145–1147

Tian C, Liu Q, Ma K, Wang Y, Chen Q, Ambroz R, Klinkebiel DL, Li Y, Huang Y, Ding J, Wu J, Zheng JC. Characterization of Induced Neural Progenitors from Skin Fibroblasts by a Novel Combination of Defined Factors. *Sci Rep.* 2013; 3: 1345

Ulland TK, Colonna M. TREM2 — a key player in microglial biology and Alzheimer disease. *Nat Rev Neurol* 2018; 14(11): 667–675

Wang Y, Ulland TK, Ulrich JD, Song W, Tzaferis JA, Hole JT, Yuan P, Mahan TE, Shi Y, Gilfillan S, Cella M, Grutzendler J, DeMattos RB, Cirrito JR, Holtzman DM, Colonna M. TREM2-mediated early microglial response limits diffusion and toxicity of amyloid plaques. *J Exp Med* 2016; 213(5): 667–675

White JA, Manelli AM, Holmberg KH, Van Eldik LJ, Ladu MJ. Differential effects of oligomeric and fibrillar amyloid-beta 1-42 on astrocyte-mediated inflammation. *Neurobiol Dis* 2005; 18(3): 459–465

Wiltfang J, Esselmann H, Bibl M, Hüll M, Hampel H, Kessler H, Frölich L, Schröder J, Peters O, Jessen F, Luckhaus C, Perneczky R, Jahn H, Fiszer M, Maler JM, Zimmermann R, Bruckmoser R, Kornhuber J, Lewczuk P. Amyloid beta peptide ratio 42/40 but not A beta 42 correlates with phospho-Tau in patients with low- and high-CSF A beta 40 load. *J Neurochem* 2007; 101(4): 1053–1059

Wolf Y, Yona S, Kim K-W, Jung S. Microglia, seen from the CX3CR1 angle. *Front Cell Neurosci* 2013; 7: 26

Xu R, Boreland AJ, Li X, Erickson C, Jin M, Atkins C, Pang ZP, Daniels BP, Jiang P. Developing human pluripotent stem cell-based cerebral organoids with a controllable

microglia ratio for modeling brain development and pathology. *Stem cell reports* 2021; 16(8): 1923–1937

Yagi T, Ito D, Okada Y, Akamatsu W, Nihei Y, Yoshizaki T, Yamanaka S, Okano H, Suzuki N. Modeling familial Alzheimer's disease with induced pluripotent stem cells. *Hum Mol Genet* 2011; 20(23): 4530–4539

Zhao Y, Wu X, Li X, Jiang L-L, Gui X, Liu Y, Sun Y, Zhu B, Piña-Crespo JC, Zhang M, Zhang N, Chen X, Bu G, An Z, Huang TY, Xu H. TREM2 Is a Receptor for  $\beta$ -Amyloid that Mediates Microglial Function. *Neuron* 2018; 97(5): 1023-1031.e7

Zuroff L, Daley D, Black KL, Koronyo-Hamaoui M. Clearance of cerebral A $\beta$  in Alzheimer's disease: reassessing the role of microglia and monocytes. *Cell Mol Life Sci* 2017; 74(12): 2167–2201

## **9. Danksagung**

An dieser Stelle möchte ich allen beteiligten Personen danken, die mich bei der Anfertigung meiner Dissertation unterstützt haben.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Oliver Brüstle für die Möglichkeit, meine Doktorarbeit an seinem Institut zu fertigen. Ebenfalls bedanke ich mich bei meiner gesamten Arbeitsgruppe AG Peitz. Ein besonderer Dank gebührt dabei Mona Mathews und Matthias Hebisch für die tatkräftige Unterstützung, sowie Giovanna Cenini, Cornelia Thiele, Wen Jianbin und Michael Peitz, die meine Arbeit durch konstruktive Hilfestellungen unterstützt haben.

Ebenfalls möchte ich mich ganz herzlich für die Förderung über das Promotionsstipendium des Promotionskollegs "Neuroimmunology" der Medizinischen Fakultät bedanken, welches durch die Else Kröner-Fresenius-Stiftung gefördert wird. Meinen Eltern und meinem Freund danke ich für die Ermutigung und die Zusprüche während der Arbeit an meiner Dissertation.

## 10. Publikationen/Poster

Aktuell in Arbeit: „Recapitulation of plaque formation, tau pathology and neurodegeneration in a human 3D model of Alzheimer’s disease“ Matthias Hebisch †, **Viola Kamin** †, Giovanna Cenini, Antonia Piazzesi, Fabio Bertan, Beatrice Weykopf, Julia Fischer, Kevin J. Washicosky, Doo Yeon Kim, Daniele Bano, Michael Peitz and Oliver Brüstle,\* †These authors contributed equally -

BonnBrain3 2019: „A human neural stem cell-based 3D model of human Alzheimer’s disease recapitulates amyloid deposition and p-tau accumulation“ Matthias Hebisch, Clara Grezella, Antonia Piazzesi, Fabio Bertan, **Viola Kamin**, Sven Fengler, Vesselina Semkova, Simone Haupt, Beatrice Weykopf, Kevin J. Washicosky, Doo Yeon Kim, Philip Denner, Eugenio Fava, Daniele Bano, Michael Peitz and Oliver Brüstle

ISSCR 2019: „Probing the amyloid cascade hypothesis in a human pluripotent stem cell-based 3D model of Alzheimer’s disease“ Matthias Hebisch, Clara Grezella, Antonia Piazzesi, Fabio Bertan, **Viola Kamin**, Sven Fengler, Beatrice Weykopf, Kevin J. Washicosky, Philip Denner, Eugenio Fava, Daniele Bano, Doo Yeon Kim, Michael Peitz and Oliver Brüstle

3. Düsseldorf-Jülich Symposium on Neurodegenerative Diseases 2019: Aggregates, Autophagy, Prions and Biomarkers: „Probing the amyloid cascade hypothesis in a human pluripotent stem cell-based 3D model of Alzheimer’s disease“ Matthias Hebisch, **Viola Kamin**, Antonia Piazzesi, Fabio Bertan, Clara Grezella, Sven Fengler, Beatrice Weykopf, Kevin J. Washicosky, Philip Denner, Eugenio Fava, Daniele Bano, Doo Yeon Kim, Oliver Brüstle and Michael Peitz