

**Parakrine Effekte Ras- und mTORopathischer
neuroepithelialer Tumorzellen auf neuronale
Netzwerke**

Multimodalanalytik im *in vitro* Entwicklungsmodell

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades (Dr. med.)

der Medizinischen Fakultät

der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität

Bonn

Philipp Müller

aus Trier

2026

Angefertigt mit der Genehmigung
der Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: Prof. Dr. Albert J. Becker
2. Gutachter: Prof. Dr. Tobias Bald

Tag der mündlichen Prüfung: 29.01.2026

Aus dem Institut für Neuropathologie

Inhaltsverzeichnis

	Abkürzungsverzeichnis	4
1.	Deutsche Zusammenfassung	6
1.1	Einleitung	6
1.2	Material und Methoden	9
1.3	Ergebnisse	14
1.4	Diskussion	20
1.5	Zusammenfassung	28
1.6	Literaturverzeichnis der deutschen Zusammenfassung	29
2.	Veröffentlichung	40
3.	Erklärung zum Eigenanteil	41
4.	Danksagung	42
5.	Publikation (PDF-Version)	43

Abkürzungsverzeichnis

Akt	Proteinkinase B (<i>AK strain Transforming</i>)
Akt ^A	konstitutiv phosphorylierte und aktivierte Proteinkinase B
ANOVA	Varianzanalyse (<i>ANalysis Of VAriance</i>)
ApoE	Apolipoprotein E
APP	Amyloid-Vorläufer-Protein (<i>Amyloid Precursor Protein</i>)
AraC	Cytarabin (Arabinosyl-Cytosin)
BRAF	<i>Rapidly Accelerated Fibrosarcoma, homolog B</i> (Gen)
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DBI	Diazepam-bindender Inhibitor (Protein)
DIV	Tag <i>in vitro</i> (<i>Day In Vitro</i>)
E	Embryonaler Tag
GABA	γ -Aminobuttersäure (<i>Gamma-Amino-Butyric Acid</i>)
GFAP	saures Gliafaserprotein (<i>Glial Fibrillary Acidic Protein</i>)
GG	Gangliogliom
GO	<i>Gene Ontology</i>
MAP2	Mikrotubuli-assoziiertes Protein 2
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
MEA	Mikroelektroden-Array
MS	Massenspektrometrie
mTOR	<i>Mammalian / Mechanistic Target Of Rapamycin</i>
MW	Mittelwert
NB	Neurobasal-Medium
NB ⁺⁺⁺	Neurobasal-Medium, angereichert mit N-2, B-27, GlutaMax™

NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
P	Postnataler Tag
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung (<i>Phosphate-Buffered Saline</i>)
TP53	Tumor-Protein p53
SD	Standardabweichung (<i>Standard Deviation</i>)
SEM	Standardfehler des Mittelwertes (<i>Standard Error of the Mean</i>)
wMFR	gewichtete mittlere Feuerrate (<i>Weighted Mean Firing Rate</i>)
ZNS	zentrales Nervensystem

1. Deutsche Zusammenfassung

1.1 Einleitung

1.1.1 Hintergrund

Gangliogliome (GGs) sind die häufigsten glioneuronalen Tumoren im zentralen Nervensystem (ZNS, Blumcke et al., 2017; Slegers und Blumcke, 2020). Sie treten vor allem im Kindes- und Jugendalter auf und sind oftmals mit epileptischer Anfallsaktivität verbunden (Blumcke et al., 2021; Slegers und Blumcke, 2020). In einigen Punkten unterscheiden sie sich klar von rein glialen primären ZNS-Tumoren, welche deutlich häufiger auftreten (Miller et al., 2021; Ostrom et al., 2021): Histologisch bestehen GGs aus dysmorphen, oft mehrkernigen, Neuronen, welche in eine dichte astrozytäre Matrix eingebettet sind (Solomon et al., 2021). In der überwiegenden Mehrheit sind sie aus pathologischer Sicht benigne; maligne Formen, früher als anaplastisches GG bezeichnet, machen hingegen nur circa 1-9 % der Fälle aus (Luyken et al., 2004; Varshneya et al., 2016; Yust-Katz et al., 2014; Zanello et al., 2016). Molekularpathologisch liegen oftmals aktivierende Mutationen im Mitogen-aktivierten-Protein-Kinase- (MAPK) Signalweg vor, insbesondere im Gen *BRAF* (Pekmezci et al., 2018; Schindler et al., 2011). Hierbei ist vor allem die Substitution der Aminosäure Valin durch Glutaminsäure im Codon 600 (*BRAF*^{V600E}) zu nennen, welche auch in anderen Tumor-Entitäten wie dem Melanom, dem kolorektalen Karzinom oder dem papillären Schilddrüsen-Karzinom beschrieben worden ist (Davies et al., 2002; Loo et al., 2018). Das intrinsische epileptogene Potential dieser Mutation wurde kürzlich bereits im Mausmodell gezeigt (Koh et al., 2018). Seltener treten hingegen Fusionen von *BRAF* mit anderen Genen auf, insbesondere *KIAA1549* (Pekmezci et al., 2018; Wang et al., 2022). Diese Gen-Fusion ist eher typisch für pilozytische Astrozytome, welche ebenfalls klassische pädiatrische Hirntumoren sind (Antonelli et al., 2015). Neben Aberrationen im MAPK-Signalweg haben weitere Untersuchungen aktivierende Mutationen in der Kaskade des „*mammalian / mechanistic target of rapamycin*“ (mTOR), welches ein zentrales Element in der Regulation des gesamten Stoffwechsels einer Zelle darstellt, bei verschiedenen glioneuronalen Tumoren nahegelegt (Boer et al., 2010; Ehrstedt et al., 2020; Kakkar et al., 2016; Laplante und Sabatini, 2012; Prabowo et al., 2014). Die Notwendigkeit der Ko-Aktivierung des MAPK-

und mTOR-Signalweges für die Entstehung von GGs wurde bereits im Mausmodell bestätigt (Cases-Cunillera et al., 2022). In letzterer Studie konnte zudem die Rolle des *TP53*-Verlustes für die Determination eines malignen Phänotyps gezeigt werden. Interessanterweise behalten diese hochgradigen, invasiven Tumoren nach wie vor ihre gut differenzierte glioneuronale Architektur bei (Cases-Cunillera et al., 2022; Zanello et al., 2016).

1.1.2 Fragestellung

Die Gründe, wieso GGs oft mit epileptischer Anfallsaktivität einhergehen, sind bisher nicht hinreichend geklärt. Für den Fokus des Anfallsgeschehens gibt es zwei grundsätzliche Hypothesen: Auf der einen Seite steht der Tumor selbst, auf der anderen Seite das umliegende Hirngewebe, welches durch den Tumor beeinflusst wird (Pallud et al., 2013; Stone et al., 2018). Insbesondere bei letzterer Annahme sind verschiedene Mechanismen denkbar. Sie reichen von direkten Interaktionen zwischen den dysmorphen GG-Neuronen und den nicht-neoplastischen Neuronen in der Umgebung bis hin zur Ausschüttung von parakrin wirkenden Faktoren durch die GG-Zellen in das peritumorale Gewebe. Dieser Aspekt wurde im Kontext von reinen Gliomen bereits von verschiedenen Arbeiten adressiert, welche unter anderem eine erhöhte Ausschüttung von Glutamat als wichtigstem exzitatorischen Neurotransmitter zeigen konnten (Buckingham et al., 2011; Ye und Sontheimer, 1999; Yuen et al., 2012). Durch eine geänderte Chlorid-Homöostase kann zudem der sonst inhibitorisch wirkende Transmitter γ -Aminobuttersäure (GABA) zur Epileptogenese beitragen (Pallud et al., 2014). Diese Studien bezogen sich auf rein gliale ZNS-Tumoren. Wie anfangs erläutert, unterscheiden sich GGs allerdings in mehreren Punkten grundlegend von diesen Tumoren. Das Ziel dieser Arbeit ist daher, den parakrinen Effekt von putativ von GGs ausgeschütteten Faktoren auf sich entwickelnde Neurone *in vitro* zu untersuchen. Grundlage ist ein murines GG-Modell (*BRAF*^{V600E}, mTOR-Aktivierung, *TP53*^{KO}), welches im hiesigen Institut für Neuropathologie, Sektion für Translationale Epilepsieforschung, entwickelt wurde (Cases-Cunillera et al., 2022). Es basiert auf der Technik der *in-utero* Elektroporation (IUE). Dabei werden Transgene, in diesem Fall die Onkogene, in sich entwickelnde neurale Vorläuferzellen eingebracht (Kittock und Pilaz, 2023). Damit wird dem Umstand Rechnung getragen, dass GGs

vermutlich aus neuronalen Vorläuferzellen mit der Möglichkeit der weiteren glialen wie neuronalen Differenzierung hervorgehen (Becker et al., 2006; Blümcke et al., 1999; Cases-Cunillera et al., 2022; Regal et al., 2023). Die mTOR-Aktivierung wird hierbei durch eine konstitutiv phosphorylierte und damit aktivierte Proteinkinase B (*Akt^A*) gewährleistet. Der *TP53^{KO}* wird durch die homozygote Flankierung dieses Gens mit loxP-Sequenzen (*TP53^{loxP/loxP}*) sowie der folgenden Einbringung der DNA-Rekombinase „Cre“ (*cyclization recombination*) in der IUE erreicht (Sauer und Henderson, 1988). Zusätzlich sind die Onkogene gekoppelt mit dem für das rot-fluoreszierende Reporterprotein „mCherry“ kodierende Gen, was eine Visualisierung der Onkogen-exprimierenden Zellen *ex vivo* und *in vitro* ermöglicht (Cases-Cunillera et al., 2022; Müller et al., 2024; Shaner et al., 2004). Wie oben erläutert, determiniert der *TP53^{KO}* einen malignen Phänotyp. Dies ist in dieser Studie notwendig, da die induzierten hochgradigen Tumoren nach Entnahme und Vereinzelung als Primärzellkultur *in vitro* gehalten werden können (Cases-Cunillera et al., 2022; Müller et al., 2024). Dadurch kann konditioniertes Zellkultur-Medium, hier GG-konditioniertes Medium genannt, erzeugt werden. In einem ersten Schritt wird der Effekt der putativ sezernierten Faktoren auf die elektrische Netzbildung sich entwickelnder primärer neuronaler Wildtyp-Kulturen untersucht und mit dem Effekt von naivem sowie Neuronen-konditioniertem Medium verglichen. Anschließend werden das GG-konditionierte Medium sowie die neuronalen Kulturen weiter molekular bzw. zytologisch charakterisiert. Die Identifizierung GG-sezernierter Faktoren kann zum weiteren Verständnis der Epileptogenese im Kontext dieser Tumoren beitragen. In Zukunft könnten sich darauf aufbauend neue diagnostische und therapeutische Möglichkeiten eröffnen.

1.2 Material und Methoden

1.2.1 GG-Zellkultur und GG-konditioniertes Medium

Alle Prozeduren an Tieren wurden gemäß den gesetzlichen Bestimmungen der Europäischen Union (Richtlinie 2010/63/EU) sowie der Bundesrepublik Deutschland (Tierschutzgesetz, Tierschutz-Versuchstierverordnung) durchgeführt. Die murinen GGs wurden mittels IUE generiert (Cases-Cunillera et al., 2022). Dabei wurden die Onkogene (*BRAF^{V600E}*, *Akt^A*, *Cre*, jeweils gemeinsam mit dem *mCherry*-Gen) am embryonalen Tag (E) 14 in kortikale neurale Vorläuferzellen von Maus-Embryonen eingebracht (*TP53^{loxp/loxp}*-Tiere, Tierversuchs-Aktenzeichen 81-02.04.2019.A030, LANUV NRW). Diese Operationen wurden von Dr. Silvia Cases-Cunillera, Institut für Neuropathologie, durchgeführt. Am postnatalen Tag (P) 40 wurden die Gehirne entnommen, mithilfe eines Vibratoms frontal geschnitten und das Onkogen-exprimierende Tumorgewebe unter grünem Fluoreszenzlicht herausgeschnitten. Das Gewebe wurde anschließend mithilfe eines Papain-Verdau vereinzelt („Neural Tissue Dissociation Kit“, Miltenyi, Bergisch Gladbach, Deutschland) und in 6-Well-Platten ausplattiert. Die Zelldichte betrug dabei 150.000 Zellen pro Well. Als Medium diente Neurobasal-Medium (NB), angereichert mit den Zusätzen N-2, B-27 und GlutaMaxTM (NB⁺⁺⁺, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA). Als Kontrolle wurde dieses Medium ohne Zellen ausplattiert (naives Medium). Alle Platten wurden bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Am Tag *in vitro* (DIV) 5 wurden das naive und das GG-konditionierte Medium gesammelt, durch Zentrifugation gefiltert und bei -80 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

1.2.2 Neuronale Primärzellkulturen zur Generierung Neuronen-konditionierter Medien

Zur Generierung primärer neuronaler Zellkulturen wurden trächtige Muttertiere der Linie C57BL/6 (Charles River Laboratories, Wilmington, Massachusetts, USA) am Tag E16 durch Dekapitation unter Isofluran-Anästhesie getötet und die Embryonen entnommen (Tierversuchs-Aktenzeichen 81-02.04.2019.A306 bzw. 81-02.04.2020.A100, LANUV NRW). Anschließend wurde der Kortex der embryonalen Gehirne isoliert und mittels Trypsin- und folgendem DNaseI-Verdau vereinzelt. Die Neurone wurden schließlich in mit poly-D-Lysin gecoateten 24-Well-Platten ausplattiert. Zur Generierung Neuronen-konditionierten Mediums betrug die Zelldichte 80.000 Zellen pro Well in NB⁺⁺⁺. Die Platten

wurden bei 37 °C und 5 % CO₂ gelagert. Das Neuronen-konditionierte Medium wurde an DIV5 und DIV14 gesammelt und analog dem GG-konditionierten Medium gereinigt und gelagert. Die Präparation der neuronalen Wildtyp-Kulturen wurde von Sabine Opitz, Institut für Neuropathologie, durchgeführt.

1.2.3 Mikroelektroden-Array-Aufnahmen

Für die elektrophysiologischen Aufnahmen im Mikroelektroden-Array (MEA) wurden 10.000 Neurone in 24-Well-Cytoview-MEA-Platten mit jeweils 16 Elektroden ausplattiert (Axion BioSystems, Atlanta, Georgia, USA). Als Medien dienten das naive Medium, GG-konditioniertes Medium sowie die beiden Neuronen-konditionierten Medien (DIV5 und DIV14, siehe **Tab. 1**). Zur Unterdrückung glialer Zell-Proliferation wurde in einigen Versuchen der Antimetabolit und Mitose-Hemmer Cytarabin (AraC, 0,02 und 0,04 µmol/l) zugegeben (Schwieger et al., 2016). Außerhalb der Aufnahmezeiten wurden die MEA-Platten im Inkubator bei 37 °C und 5 % CO₂ gelagert. Von DIV6 an wurde die extrazelluläre elektrische Aktivität der sich entwickelnden Neurone alle 48 Stunden für 10 Minuten mithilfe des „Maestro Edge“ MEA-Systems und der Software AxIS Navigator (Version 2.0.4.21, Axion BioSystems) aufgezeichnet. Auch während der Aufnahmen herrschte eine Temperatur von 37 °C bei 5 % CO₂. Als elektrische Entladung (Spike) wurde eine Abweichung des extrazellulären Potenzials um mindestens sechs Standardabweichungen (SDs) von der Basislinie angesehen. Als Minimal-Kriterien zur Detektion eines Burstes wurden fünf Spikes mit einem inter-Spike-Intervall von maximal 100 ms festgelegt (Negri et al., 2020; Pitsch et al., 2020). Aus den Rohdaten wurden als metrische Daten die gewichtete mittlere Feuerrate (wMFR), der Burst-Anteil (0-100 %) sowie der Synchronizitäts-Index (0-1) berechnet und für die weitere statistische Analyse verwendet. Betrug die wMFR zu frühen Zeitpunkten 0 Hz bei später detektierter Aktivität > 0 Hz, wurden auch der Burst-Anteil und der Synchronizitäts-Index für diese frühen Zeitpunkte als 0 % bzw. 0 festgelegt.

Tab. 1: Übersicht über die verwendeten Medien.

Medien für die MEA- und Immunzytochemie-Experimente

Naives Medium
GG-konditioniertes Medium
Neuronen-konditioniertes Medium DIV5
Neuronen-konditioniertes Medium DIV14

1.2.4 Massenspektrometrie

Für die massenspektrometrische (MS) Analyse des naiven und des GG-konditionierten Mediums wurden die Medien ebenfalls an DIV5 gesammelt, durch Zentrifugation gefiltert und bei -80 °C gelagert. Nach Sammlung aller Replikate wurden diese gemeinsam weiter vorbereitet. Nach langsamem Auftauen auf Eis wurde das im Medium enthaltene Phenolrot durch Zentrifugen-Filter mit einer Porengröße von 10 kDa sukzessive ausgewaschen und die retinierten Proteine in einer phosphatgepufferten Salzlösung (PBS) resuspendiert. Die weiteren MS-Prozeduren wurden von der Core Facility „Analytical Proteomics“ der Medizinischen Fakultät der Universität Bonn durchgeführt und sind in der angehängten Publikation weiter ausgeführt (Müller et al., 2024). Die identifizierten und im GG-konditionierten Medium im Vergleich zum naiven Medium signifikant angereicherten Proteine wurden anschließend einer funktionellen *Gene Ontology* (GO) Analyse unterzogen. Dazu wurde das „PANTHER Enrichment Analysis Tool“ genutzt (Thomas et al., 2022). Die angereicherten Signalwege (*Cluster*) wurden gezielt auf Terme, die mit Neuro- bzw. Gliogenese assoziiert sind, untersucht.

1.2.5 Glutamat-Assay

Zur Bestimmung der Glutamat-Konzentration in den verschiedenen Medien (**Tab. 1**) wurde das fluorometrische „Glutamate Assay Kit“ (Abcam, Cambridge, Vereinigtes Königreich) verwendet. Die Proben wurden zusammen mit vorbereiteten Standard-Lösungen bekannter Konzentration gemäß den Vorgaben des Herstellers verarbeitet. Es wurden 50 µl Proben- bzw. Standard-Volumen in Duplikaten mithilfe eines Fluoreszenz-Mikroplatten-Lesers gemessen („Infinite® 200 PRO“ der Firma Tecan, Männedorf,

Schweiz). Die Wellenlänge für die Exzitation betrug 540 nm, für die Emission 590 nm. Anhand der mithilfe der Standards erstellten Eichgeraden wurde die Glutamat-Konzentration in den verschiedenen Medien bestimmt.

1.2.6 Immunzytochemie

Für die immunzytochemische Analyse wurden 40.000 Neurone pro Well in 24-Well-Platten mit den Medien aus **Tab. 1** ausplattiert, analog dem Prozedere in den MEA-Experimenten. In einigen Versuchen wurde auch hier gliale Proliferation mit AraC inhibiert. Am DIV8 wurden die Zellen mit Paraformaldehyd (4 %) fixiert. Es folgten simultane immunzytochemische Färbungen mit Primärantikörpern gegen das „Mikrotubuli-assoziierte Protein 2“ (MAP2, Synaptic Systems, Göttingen, Deutschland) zur Darstellung von Neuronen sowie das „saure Gliafaserprotein“ (GFAP, Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) zur Darstellung von möglicherweise vorhandenen Astrozyten in den primären Neuronen-Kulturen. Als Sekundärantikörper wurden Fluoreszenz-markierte Antikörper verwendet (Thermo Fisher Scientific). Zusätzlich wurden die Zellkerne mittels 4',6-Diamidin-2-phenylindol- (DAPI) Färbung dargestellt. Fluoreszenz-Bilder wurden mit dem „Nikon Eclipse Ti Confocal Microscope“ (Nikon, Minato, Tokio, Japan) in 400-facher Vergrößerung aufgenommen. Zur Messung des positiv gefärbten Flächenanteils wurden pro Replikat fünf Bilder aufgenommen. Mithilfe der Open-Source-Software „ImageJ“ wurde anschließend für den betreffenden Farbkanal ein dichotomer Cut-off-Wert zur Differenzierung zwischen positiven und negativen Flächenanteilen definiert und das Bild in ein entsprechendes Binärbild umgewandelt. Aus diesem wurde der positive Flächeninhalt als Prozentsatz (0-100 %) berechnet.

1.2.7 Statistik und Visualisierung

Sämtliche statistischen Analysen sowie die Visualisierung der metrischen Daten wurden mit der Software „GraphPad Prism“ (Version 6.05, GraphPad Software, Boston, Massachusetts, USA) durchgeführt. Bei den Vergleichen mehrerer Gruppen wurde eine Ein-Weg-Varianzanalyse (ANOVA) durchgeführt, gefolgt vom Tukey-Test für multiple Vergleiche. Bei den Vergleichen mehrerer Datenreihen über mehrere Zeitpunkte wurde

entsprechend eine Zwei-Weg-ANOVA durchgeführt, gefolgt von einem Test für multiple Vergleiche nach Tukey, Dunn, oder Dunnett. Als signifikant wurden die Vergleiche angesehen, bei denen der p -Wert nach Korrektur für multiples Testen kleiner als 0,05 war. Wenn nicht anders in der Abbildungs-Legende angegeben, wurde nur das niedrigste Signifikanzniveau in den Graphen angegeben. Zur Visualisierung der MEA-Rohdaten wurden das „Neural Metric Tool“ (Version 3.2.5) sowie das „Axion Data Export Tool“ genutzt (Version 3.4.5, jeweils Axion BioSystems).

1.3 Ergebnisse

1.3.1 Charakterisierung der GG-Zellkulturen

Vorab wurden die generierten GG-Kulturen zytologisch charakterisiert. In der Immunzytochemie gegen die Antigene MAP2 (Neurone) und GFAP (Astrozyten) zeigte sich, dass die glioneuronale Zusammensetzung auch *in vitro* erhalten blieb. Die meisten GFAP-positiven Zellen exprimierten zudem den IUE-Marker mCherry, was sie als Onkogen-exprimierende (neoplastische) Zellen identifizierte. Diese Ergebnisse sind dargestellt in **Fig. 1** der beiliegenden Publikation (Müller et al., 2024). Im Folgenden wird daher vor allem der Effekt der neoplastischen Zellen analysiert.

1.3.2 Effekte des GG-konditionierten Mediums auf die elektrische Netzbildung

Zunächst wurde der Effekt der vier verschiedenen Medien auf die Netzbildung von Wildtyp-Neuronen *in vitro* untersucht. Als Parameter dienten die wMFR für die spontane elektrische Gesamtaktivität sowie der Burst-Anteil und der Synchronizitäts-Index für die Netzwerk-Reifung.

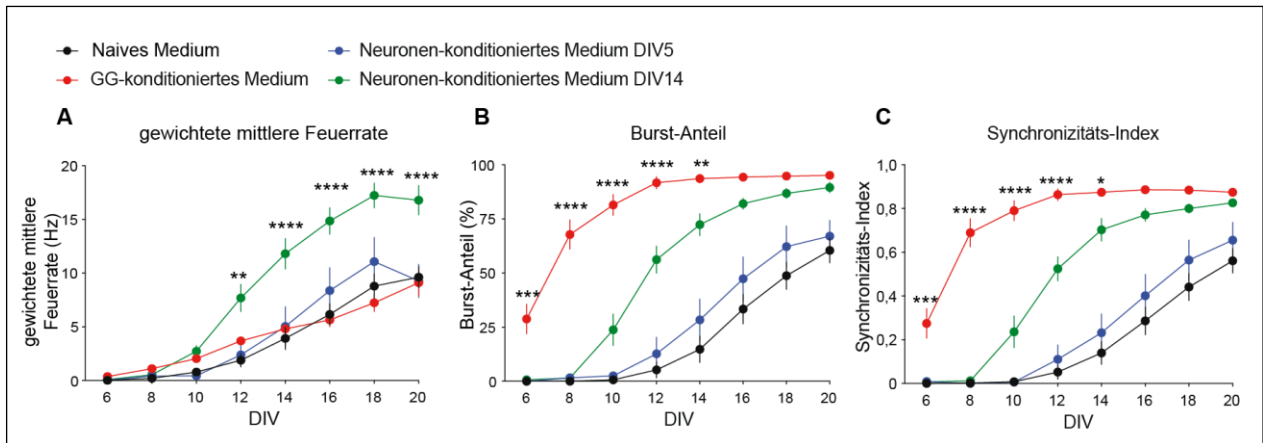


Abb. 1: Zeitleisten der MEA-Aufnahmen der neuronalen Wildtyp-Kulturen in verschiedenen Medien. Dargestellt sind (A) wMFR, (B) Burst-Anteil sowie (C) Synchronizitäts-Index. Auffällig sind die Netzwerk-Effekte des GG-konditionierten Mediums besonders zu frühen Zeitpunkten. Zwei-Weg-ANOVA, gefolgt vom Tukey-Test, N = 12-23, n = 2-6, *p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001, ****p < 0,0001. Nur statistisch signifikante Unterschiede sind markiert. Die Daten sind dargestellt als Mittelwert (MW) ± Standardfehler (SEM). Abbildung ist übernommen aus und modifiziert nach Müller et al., 2024 (Fig. 2C).

In allen Konditionen konnte im Laufe der Tage extrazellulär elektrische Aktivität in Form von Spikes (Entladungen) detektiert werden (**Abb. 1A**). Dabei führte das GG-konditionierte Medium zu einer deutlich beschleunigten und gesteigerten Netzwerk-Bildung, da schon am DIV8 der MEA-Aufnahmen der Burst-Anteil bei circa 70 % und der Synchronizitäts-Index bei etwa 0,7 lag (**Abb. 1B** und **1C**). Letzterer stieg im Verlauf weiter bis circa 0,9 an. Interessanterweise führte allerdings das Neuronen-konditionierte Medium von DIV14 zur höchsten spontanen Gesamtaktivität ab DIV12 im MEA-System (**Abb. 1A**). Die Aktivität und Netzwerk-Bildung verlief im naiven und Neuronen-konditionierten Medium von DIV5 ähnlich, es zeigten sich in keinem der drei betrachteten Parameter signifikante Unterschiede. Insgesamt waren der Burst-Anteil und der Synchronizitäts-Index der Kulturen im GG-konditionierten Medium gegenüber denen der Kulturen im Neuronen-konditionierten Medium vom DIV14 bis einschließlich DIV14 der MEA-Aufnahmen signifikant erhöht (**Abb. 1B** und **1C**). Daran wird deutlich, dass das GG-konditionierte Medium die Netzwerkbildung zu frühen Zeitpunkten deutlich beschleunigt. Zu späteren Zeitpunkten hingegen erzielte das Neuronen-konditionierte Medium vom DIV14 ähnliche Netzwerk-Parameter sowie die höchste Gesamt-Aktivität.

1.3.3 Konnektivitäts- und Langzeit-Netzwerkeffekte des GG-konditionierten Mediums

Als nächstes wurde die Empfindlichkeit der neuronalen Kulturen unter den verschiedenen Medien gegenüber der Blockade von N-Methyl-D-Aspartat- (NMDA) Rezeptoren untersucht und untereinander verglichen. So sollte ausgeschlossen werden, dass es hinsichtlich der Konnektivität (chemische Synapsen versus elektrische Synapsen) Unterschiede zwischen den Konditionen gab. Mit steigenden Konzentrationen von MK-801, einem irreversiblen, allosterischen Inhibitor von NMDA-Rezeptoren (Rogawski, 1993), konnte die Aktivität an DIV20 in allen Konditionen auf allen Ebenen (wMFR, Burst-Anteil, Synchronizitäts-Index) erfolgreich unterbunden werden (**Fig. 3A** der beigefügten Publikation, Müller et al., 2024). Damit konnte ausgeschlossen werden, dass insbesondere das GG-konditionierte Medium zu einer gesteigerten Konnektivität über elektrische Synapsen (*Gap Junctions*) beiträgt.

Ferner wurde untersucht, wie sich die elektrische Aktivität in den verschiedenen Konditionen nach Auswaschen der Medien verhält. Dadurch sollte erfasst werden, ob die

Exposition der neuronalen Kulturen gegenüber den verschiedenen Medien nur akute oder auch Langzeit-Effekte vermittelt. An DIV20 der MEA-Kulturen wurde dazu das Medium vorsichtig durch frisches, im Inkubator (37 °C, 5 % CO₂) adaptiertes NB⁺⁺⁺ ersetzt und die elektrische Aktivität direkt davor und danach sowie für weitere fünf Tage erfasst.

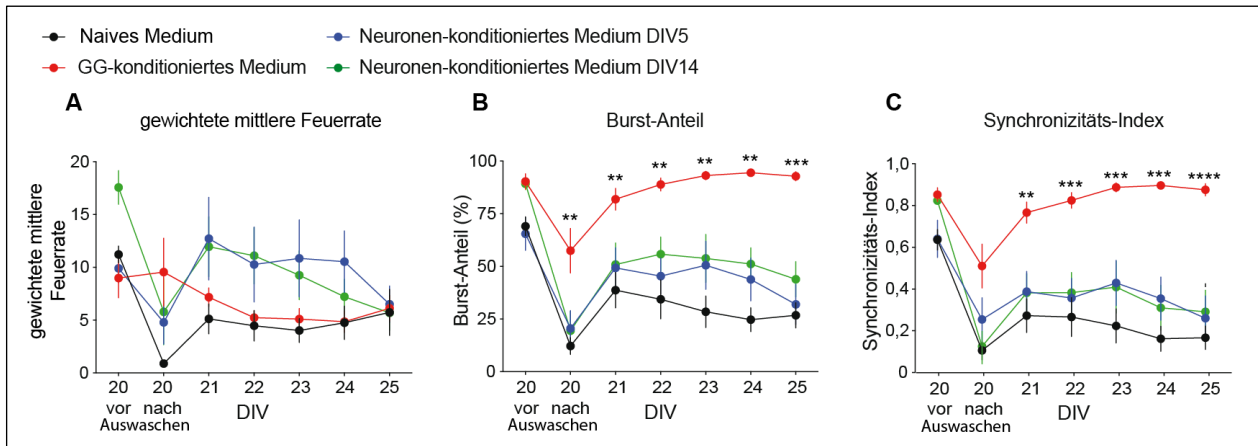


Abb. 2: Zeitleisten der MEA-Aufnahmen nach Auswaschen des Mediums an DIV20. Das Medium wurde an DIV20 in allen Konditionen durch frisches vorgewärmtes Medium ersetzt. Direkt davor und danach sowie für weitere fünf Tage wurde die neuronale Aktivität erfasst. Dargestellt sind (A) wMFR, (B) Burst-Anteil sowie (C) Synchronizitäts-Index. Auffällig ist die Re-Synchronisation der Neurone, die zuvor im GG-konditionierten Medium kultiviert worden waren. Zwei-Weg-ANOVA, gefolgt vom Tukey-Test, N = 11, n = 1-6, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$. Nur statistisch signifikante Unterschiede sind markiert. Die Daten sind dargestellt als MW $\pm$ SEM. Abbildung ist übernommen aus und modifiziert nach Müller et al., 2024 (Fig. 3C).

In allen Konditionen blieb spontane Aktivität erhalten, welche sich auch nicht signifikant zwischen den verschiedenen Konditionen unterschied (**Abb. 2A**). Allerdings kam es nur in den Kulturen, die zuvor mit dem GG-konditionierten Medium inkubiert worden waren, zu einer vollständigen Re-Synchronisation, wie in den Netzwerk-Parametern (Burst-Anteil sowie Synchronizitäts-Index) deutlich wird (**Abb. 2B** und **2C**). Dies impliziert, dass das GG-konditionierte Medium Langzeit-Effekte auf die sich entwickelnden Neurone *in vitro* ausüben kann, die auch nach Auswaschung der darin enthaltenen Faktoren erhalten bleiben.

1.3.4 Molekulare Analyse des GG-konditionierten Mediums

Es folgte die weitere Analyse des GG-konditionierten Mediums im Vergleich zum naiven Medium. In der MS-Analyse konnten über 100 Proteine detektiert werden, deren Häufigkeit (*Abundance*) im GG-konditionierten Medium signifikant erhöht war. Die GO-Analyse zur funktionalen Charakterisierung ordnete diese Proteine unter anderem einigen Clustern zu, die eng mit Neurogenese und auch Gliogenese verbunden sind. Die Proteine sind in **Fig. 4B** der beigefügten Publikation aufgelistet (Müller et al., 2024). Mögliche Funktionen einiger dieser Proteine werden im Diskussionsteil weiter ausgeführt. Parallel konnte der Neurotransmitter und Onkometabolit Glutamat in diesem Kontext als vermittelnder Faktor der beobachteten funktionellen Effekte im MEA-System ausgeschlossen werden. Dessen Konzentration unterschied sich nicht signifikant zwischen GG-konditioniertem Medium und Neuronen-konditioniertem Medium von DIV14 (**Abb. 3**). DNA- und RNA-Moleküle wurden durch Vorinkubation der Medien mit DNase I bzw. RNase A ebenfalls als Vermittler ausgeschlossen.

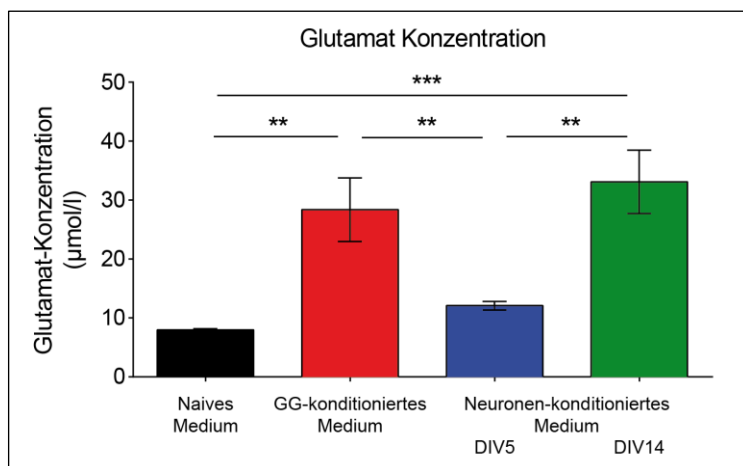


Abb. 3: Glutamat-Konzentration in den verschiedenen Medien, kolorimetrisch bestimmt. Ein-Weg-ANOVA, gefolgt vom Tukey-Test, $N = 5-8$, $n = 2$, $**p < 0,01$, $***p < 0,001$. Nur statistisch signifikante Unterschiede sind markiert. Die Daten sind dargestellt als $MW \pm SEM$. Abbildung ist übernommen aus und modifiziert nach Müller et al., 2024 (Zusatzmaterial, Fig. S4).

1.3.5 Immunzytochemische Analyse der neuronalen Kulturen

Die Anreicherung mit Gliogenese assoziierter Proteine führte zudem zur weiteren immunzytologischen Charakterisierung der neuronalen Kulturen unter den verschiedenen Medien. Zur Charakterisierung der zellulären Zusammensetzung der putativ rein neuronalen Kulturen wurden diese nach Fixierung am DIV8 mit Antikörpern gegen MAP2 (Neurone) und GFAP (Astrozyten) gefärbt und der positiv gefärbte Flächenanteil quantifiziert. Es zeigten sich keine augenscheinlichen Unterschiede in der Morphologie der MAP2-positiven Elemente, ebenso wenig in der folgenden Quantifizierung des gefärbten Flächenanteils. Damit konnte ausgeschlossen werden, dass die beobachteten Effekte auf die Netzwerk-Bildung und -Stabilität einfach durch eine erhöhte Zahl an viablen neuronalen Zellen erreicht wurde. In der Immunzytochemie gegen das Antigen GFAP hingegen traten deutliche Unterschiede auf. In den neuronalen Kulturen, welche mit GG-konditioniertem Medium inkubiert wurden, war eine große Zahl an GFAP-positiven Zellen darstellbar. Dieser Effekt konnte durch kein anderes der drei übrigen Medien reproduziert werden. Dort waren nur sehr vereinzelt GFAP-positive Zell-Elemente nachweisbar. Passend dazu war auch der GFAP-positive Flächenanteil in den Kulturen unter dem Einfluss von GG-konditioniertem Medium deutlich erhöht. Exemplarische Bilder sowie die Quantifizierung sind in der beiliegenden Publikation aufgeführt (**Fig. 4C** und **4D**, Müller et al., 2024). Es konnte damit gezeigt werden, dass das GG-konditionierte Medium nicht nur funktionelle Effekte (MEA-Experimente) ausübt, sondern auch die Proliferation von astrozytären Elementen triggert.

1.3.6 Effekte von Astrozyten-Depletion auf die Netzwurkbildung

Es stellte sich zuletzt die Frage, wie das GG-konditionierte Medium die beschriebenen Effekte auf die Netzwurkbildung ausübt. Es sind hierbei zwei Szenarien denkbar: Zum einen könnte es sich um einen direkten neuronalen Effekt handeln, zum anderen könnten die Effekte aber auch durch die induzierte Astrozyten-Proliferation vermittelt werden. Um letzteren Aspekt auszuschließen, wurde der Antimetabolit und Mitose-Inhibitor AraC zu den verschiedenen Medien zugegeben und die Kulturen erneut am DIV8 immunzytologisch aufgearbeitet. Eine AraC-Konzentration von 0,04 $\mu\text{mol/l}$ war ausreichend, um die Fläche an GFAP-positiven Zellen in den mit GG-konditioniertem

Medium inkubierten neuronalen Kulturen signifikant zu reduzieren, wohingegen morphologisch keine Effekte auf die MAP2-positiven Elemente auffielen (siehe **Fig. 5A** der beiliegenden Publikation, Müller et al., 2024). Funktionell ergaben sich allerdings Unterschiede in der Erfassung der elektrischen Aktivität im MEA-System: Alle drei erfassten Parameter (wMFR, Burst-Anteil und Synchronizitäts-Index) wurden im naiven Medium durch 0,04 $\mu\text{mol/l}$ AraC vermindert. Dieser Effekt wurde im Laufe der Zeit immer stärker (**Fig. 5B**, Müller et al., 2024). Ein ähnlicher Effekt trat beim Neuronen-konditionierten Medium von DIV5 auf, wohingegen beim Neuronen-konditionierten Medium von DIV14 gar kein signifikanter Unterschied erkennbar war. Auch bei den neuronalen Kulturen im GG-konditionierten Medium traten unter 0,04 $\mu\text{mol/l}$ AraC verminderte Effekte auf. Diese waren aber limitiert auf frühe Zeitpunkte, ab DIV14 bestanden keine signifikanten Unterschiede mehr (**Fig. 5B**, Müller et al., 2024). Es wurde also trotz Unterdrückung der astrozytären Proliferation eine vollständige Netzwerk-Synchronisation erreicht.

1.4 Diskussion

1.4.1 Einführung

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Einflüsse von GG-sezernierten Faktoren auf sich entwickelnde kortikale Wildtyp-Neurone *in vitro* zu untersuchen, da die Mechanismen der neuronalen Übererregbarkeit im Rahmen von GGs und anderen glioneuronalen Neoplasien noch nicht verstanden sind (Pallud et al., 2013; Stone et al., 2018). Als Vergleiche dienten naives Medium (ohne Kontakt zu Zellen) sowie Neuronen-konditioniertes Medium zweier Zeitpunkte (**Tab. 1**). Sowohl auf funktioneller (MEA) als auch morphologischer Ebene (Immunzytochemie) zeigten sich deutliche Unterschiede zwischen den Neuronen, die mit den verschiedenen Medien inkubiert worden waren. Effekte des GG-konditionierten Mediums im Vergleich zum naiven Medium konnten dabei nicht durch die beiden Neuronen-konditionierten Medien reproduziert werden. In der Diskussion der beigefügten Publikation wurden einige Aspekte bereits beleuchtet und sollen hier kurz rekapituliert und weiter ausgeführt werden.

1.4.2 Netzwerkeffekte des GG-konditionierten Mediums

Es wurde in der Vergangenheit herausgearbeitet, dass bei neuronalen Kulturen in MEA-Systemen im Laufe der Entwicklung sowohl die Spontan-Aktivität (wMFR) als auch die Netzwerkparameter im Laufe der Zeit parallel zunehmen (Cotterill et al., 2016). Unter dem Neuronen-konditionierten Medium vom DIV14 war der oben beschriebene Effekt der parallelen Zunahme aller Parameter beobachtbar, was heißt, dass die Netzwerk-Reifung wirklich beschleunigt wurde. Das GG-konditionierte Medium hingegen induzierte vor allem gesteigerte Netzwerk-Parameter, während die wMFR nicht signifikant gesteigert wurde. Daher beschleunigen die von den GG-Zellen sezernierten Faktoren nicht einfach die Reifung, sondern führen vielmehr zu einer irreversiblen Schädigung des neuronalen Netzwerks. Dies wird dadurch untermauert, dass die Netzwerk-Effekte nicht durch das Auswaschen des Mediums an DIV20 reversibel waren.

Allerdings veränderte das GG-konditionierte Medium nicht die grundlegenden Mechanismen der Konnektivität der neuronalen Kulturen. Das wurde daran deutlich, dass die Wildtyp-Neurone alle sensibel gegenüber der NMDA-Rezeptor-Blockade mit MK-801

waren. So konnte indirekt die Involvierung von elektrischen Synapsen ausgeschlossen werden. Dies ist interessant vor dem Hintergrund, dass eine Rolle dieser in der Epileptogenese bei reinen Gliomen immer wieder diskutiert wird und für die Tumor-Invasion schon gezeigt werden konnte (Dong et al., 2017; McCutcheon und Spray, 2022; Pallud et al., 2013; Potthoff et al., 2019). Insbesondere das vornehmlich astrozytäre Connexin 43 wird in Astrozytomen, der astrozytären Komponente glioneuronaler Tumoren sowie dem peritumoralen Kortex verstärkt exprimiert (Aronica et al., 2001). Entsprechend zeigte eine *Bulk-RNA-Sequencing*-Analyse des Tumor-Gewebes des in dieser Studie verwendeten Maus-Modells, dass das für das Connexin 43 kodierende Gen (*GJA1*) im Vergleich zum Kontroll-Kortex signifikant und relevant verstärkt exprimiert wurde (ca. 2,2-fach stärkere Expression, $p < 0,001$, Datensatz war Teil von Cases-Cunillera et al., 2022). Allerdings wurden in der hier vorliegenden Studie die Effekte GG-sezernierter Faktoren erfasst, da die Wildtyp-Neurone sowie die GG-Zellen zu keinem Zeitpunkt in direkten Kontakt zueinander waren. Daher ist es nicht widersprüchlich zu der angeführten Literatur sowie den Sequenzierungs-Ergebnissen, dass elektrische Synapsen hier keine tragende Rolle spielen.

1.4.3 Rolle der astrozytären Proliferation

Das GG-konditionierte Medium triggerte eine starke astrozytäre Proliferation *in vitro*. Dies passt zu der glioneuronalen Komposition von GGs. Viele Studien haben zudem schon zeigen können, dass Astrozyten über viele Mechanismen zu einer schnelleren Netzwerkreifung beitragen können (Purushotham und Buskila, 2023), weshalb diese auch die beschriebenen Effekte im MEA-System vermitteln könnten. Hier konnte dies allerdings ausgeschlossen werden durch die Inhibition der astrozytären Proliferation mittels AraC, welche nur zu einer sehr leichten Verzögerung in der Synchronisation führte. Das passt auch zu den oben beschriebenen Beobachtungen und Schlussfolgerungen, dass elektrische Synapsen, und damit auch das vornehmlich astrozytäre Connexin 43, hier keine große Rolle spielen. Die im naiven und Neuronen-konditionierten Medium vom DIV5 beobachteten Änderungen unter AraC-Behandlung sind hingegen vereinbar mit einem neurotoxischen Effekt, da insbesondere die wMFR als Parameter für die Gesamtaktivität abnimmt (Kang et al., 2022). Ein solcher wurde für AraC sowohl *in vitro* als auch *in vivo*

an Tieren und Patienten bereits beobachtet (Kwong et al., 2009; Lopes-Rodrigues et al., 2023; Salimi et al., 2023).

1.4.4 Implikationen der molekularen Analyse des GG-konditionierten Mediums

Die molekulare Charakterisierung führte zur Identifikation einiger Kandidaten-Proteine, welche die beobachteten Effekte vermitteln könnten. Für eine ganze Reihe von diesen konnten in der Vergangenheit bereits neurotrophe Eigenschaften beschrieben werden. Mögliche Funktionen einiger dieser Faktoren sind in **Tab. 2** zusammengestellt und werden danach weiter ausgeführt.

Tab. 2: Übersicht über die beschriebenen Effekte der im GG-konditionierten Medium detektierten Faktoren.

Protein	Abkürzung	Referenz	Funktion und Effekte
Pleiotrophin	PTN	Miao et al., 2019	MAPK-Signalweg-Aktivierung (in Mikroglia)
		Qiu et al., 2023	mTOR-Signalweg-Aktivierung
		González-Castillo et al., 2014	MAPK-/mTOR-Signalweg-Aktivierung
		Tang et al., 2019	Reifung hippokampaler Neurone in Stammzell-Nische im Rahmen der adulten Neurogenese
Tenascin C	TNC	Irintchev et al., 2005	Involvierung in kortikale Entwicklung
		Evers et al., 2002	Involvierung in hippokampale postsynaptische Langzeit-Potenzierung
		Strekalova et al., 2002	Involvierung in synaptische Plastizität

Protein	Abkürzung	Referenz	Funktion und Effekte
Hevin / <i>Secreted Protein Acidic And Rich In Cysteine-Like 1</i>	SPARCL1	Kucukdereli et al., 2011	Unterstützung der exzitatorischen Synaptogenese
		Gan und Südhof, 2019	synaptogene Wirkung
		Gan und Südhof, 2020	Unterstützung der exzitatorischen Synaptogenese
Diazepam-bindender Inhibitor	DBI	Dumitru et al., 2017	Kontrolle der Neurogenese
		Everlien et al., 2022	Regulation der Neurogenese via GABA-Rezeptoren
Apolipoprotein E	ApoE	Tensaouti et al., 2020	Involvierung in Neurogenese
14-3-3-Proteine	YwhaE, YwhaH, YwhaZ	Zhu et al., 2014	neuroprotektiver Effekt
		Qiao et al., 2014	Vermittlung synaptischer Plastizität und Langzeit-Potenzierung
		Toyo-oka et al., 2014	Regulation von Neurogenese und neuronaler Migration
Calcium-bindendes Protein A8 / Calgranulin A	S100A8	Sun et al., 2018	Förderung des Neuriten-Wachstums
<i>Amyloid-Precursor-Protein</i>	APP	Hasebe et al., 2013	Stimulation des Neuriten-Wachstums über den Neurotrophin-Rezeptor p75
		Lee et al., 2020	Vermittlung synaptischer Plastizität

Für Pleiotrophin ist interessanterweise eine Aktivierung des MAPK- und mTOR-Signalweges in verschiedenen Zell-Typen gezeigt worden (González-Castillo et al., 2014; Miao et al., 2019; Qiu et al., 2023). Dies rekapituliert die onkogenetischen Alterationen des hier verwendeten Mausmodells, welche selber schon zur Epileptogenese beitragen,

nicht nur im Kontext von GGs, sondern auch anderen epileptogenen Läsionen wie z.B. fokalen kortikalen Dysplasien (Blumcke et al., 2021; Koh et al., 2018; Okoh et al., 2023). In der neueren Forschung werden passend dazu verschiedene Syndrome unter den Oberbegriffen „Rasopathien“ und „mTORopathien“ zusammengefasst, welchen aktivierende Mutationen im MAPK- bzw. mTOR-Signalweg zugrunde liegen und welche oft mit einer Epilepsie als neurologischer Manifestation einhergehen (Moloney et al., 2021; Sran und Bedrosian, 2023). Daran wird deutlich, dass die gesteigerte Aktivität dieser beiden Signalwege zu den beobachteten Netzwerk-Effekten beitragen könnte. Es muss aber betont werden, dass in den hier durchgeführten Experimenten durchgehend neuronale Wildtyp-Kulturen untersucht wurden, welche lediglich unter dem parakrinen Einfluss der GG-Zellen standen. Zusätzlich interessant ist der Aspekt, dass Pleiotrophin als der von neuronalen Stammzellen sezernierte Faktor identifiziert wurde, der im Hippokampus die adulte Neurogenese ermöglicht, wohingegen die im GG-konditionierten Medium ebenfalls detektierten Proteine DBI und ApoE in jener Studie ausgeschlossen werden konnten (Tang et al., 2019). Bemerkenswerterweise wurden für die beiden letztgenannten Faktoren allerdings auch schon positive Effekte auf die Neurogenese beschrieben (Dumitru et al., 2017; Everlien et al., 2022; Tensaouti et al., 2020).

Tenascin C ist ein Bestandteil der extrazellulären Matrix im Gehirn und insbesondere wichtig in der Entwicklungsperiode (Irintchev et al., 2005; Ferrer-Ferrer und Dityatev, 2018). Außerdem ist es ein bekannter Faktor in der Vermittlung synaptischer Plastizität (Evers et al., 2002; Strekalova et al., 2002). Letzteres ist interessant vor dem Hintergrund, dass das GG-konditionierte Medium nicht nur zu einer schnelleren, sondern auch irreversiblen Netzwerk-Synchronisation führte. Calcium-Ionen sind dabei bekannte Vermittler synaptischer Plastizität (Graupner und Brunel, 2012; Inglebert et al., 2020). Zukünftige Untersuchungen könnten daher Änderungen der intrazellulären Calcium-Konzentrationen in neuronalen Kulturen unter den verschiedenen hier verwendeten Medien mithilfe von Calcium-Reporter-Proteinen erfassen (Chen et al., 2013; Dana et al., 2019; Zhang et al., 2023). Daneben wurde auch für das im GG-konditionierten Medium detektierte SPARCL1 bereits mehrfach eine unterstützende Rolle insbesondere in der exzitatorischen Synaptogenese beschrieben (Gan und Südhof, 2019, 2020; Kucukdereli et al., 2011).

Es wird deutlich, dass die GG-Zellen eine ganze Reihe von Kandidaten-Faktoren sezernieren, welche für die beobachteten elektrophysiologischen Effekte auf die Wildtyp-Neurone verantwortlich sein können. Dies legt die Annahme nahe, dass nicht ein einzelner, sondern vielmehr eine komplexe Mischung die Wirkungen des GG-konditionierten Mediums vermittelt.

Die Detektion GFAP im GG-konditionierten Medium rekapituliert ferner sehr gut die astrogliale Komponente von GGs. Es ist ein typischer Marker in der Immunhistochemie bei der neuropathologischen Aufarbeitung von Tumor-Biopsaten bzw. -Resektaten (Blümcke und Wiestler, 2002; Jacque et al., 1978; Koelsche et al., 2013; WHO Classification of Tumours Editorial Board, 2021). Auch bei RNA-Sequenzierungs-Analysen ist es ein typischer Marker astrozytärer Cluster (Regal et al., 2023). Die Ergebnisse dieser vorliegenden Studie zeigen zudem, dass GFAP auch extrazellulär nachgewiesen werden kann, weshalb es in Zukunft auch als Biomarker im Liquor dienen könnte. Ähnliches gilt für das *Amyloid-Precursor-Protein*, APP. Dieses ist typisch für neuronale Zellen (Lee et al., 2020), sodass im GG-konditionierten Medium der glioneuronale Phänotyp von GGs deutlich wird. Die vermehrte Expression von APP bei humanen GGs wurde interessanterweise auch schon positiv mit der Dauer einer epileptischen Anfallsaktivität korreliert (Prabowo et al., 2015). Daher ist auch dieses Protein ein möglicher Biomarker-Kandidat im Liquor bei Patienten mit unklaren epileptischen Anfällen. Darüber hinaus ist APP der Vorläufer des beta-Amyloids, welches eines der pathologischen Merkmale der Alzheimer-Demenz darstellt (DeTure und Dickson, 2019; Hillen, 2019). Dies passt sehr gut zu der Beobachtung, dass GGs zwar Hirnentwicklungs-Tumoren darstellen, aber auch Eigenschaften von neurodegenerativen Erkrankungen aufweisen (Prabowo et al., 2015). Es wurde bereits herausgearbeitet, dass die Überaktivität des mTOR-Signalweges zu einem beschleunigten Altern von neuronalen Zellen beitragen kann (zusammengefasst in Perluigi et al., 2015). In der Zusammenschau mit den oben diskutierten irreversiblen Netzwerkeffekten sowie den Faktoren, die eine Überaktivität dieses Signalweges auch unter dem Einfluss des GG-konditionierten Mediums nahelegen, lässt sich schlussfolgern, dass das GG-konditionierte Medium zu einer irreversiblen Schädigung des neuronalen Netzwerks führt.

Der Metabolit und wichtigste exzitatorische Neurotransmitter Glutamat konnte bemerkenswerterweise als Ursache der beschleunigten Netzwerk-Reifung ausgeschlossen werden. Bisherige Untersuchungen an reinen Gliomen hingegen konnten eine gestörte Homöostase ebendieses Faktors nachweisen, welche zur neuronalen Übererregbarkeit bei diesen Tumoren beiträgt. Allerdings basierten diese und auch weitere Experimente auf der direkten Interaktion zwischen Tumorzellen und Neuronen *in vivo* und *in vitro* (Buckingham et al., 2011; Fuchs et al., 2021; Taylor et al., 2023), wohingegen hier nur sezernierte Faktoren untersucht wurden. Nach dem Wissen des Autors wurde der Effekt von Tumor-sezernierten Faktoren auf sich entwickelnde Neurone *in vitro*, insbesondere im Kontext von GGs, bisher nicht auf elektrisch-funktioneller Ebene untersucht. In der Vergangenheit wurde bisher lediglich nachgewiesen, dass Gliom-Zelllinien-konditioniertes Medium je nach Linie positive oder negative Effekte auf das neuronale Überleben sowie die dendritischen Verzweigungen hat (Hatanaka und Tsukui, 1986; Okuda et al., 1994; Wei et al., 2019). Weitere Untersuchungen könnten folgerichtig darin bestehen, konditioniertes Medium verschiedener Gliom-Zell-Linien zu generieren und damit ebenfalls Effekte auf die elektrische Netzwerk-Bildung sowie die zelluläre Zusammensetzung bei neuronalen Wildtyp-Kulturen zu untersuchen.

1.4.5 Limitationen und biologische Relevanz

Wie in der Einleitung erläutert wurde, war für diese Studie die Verwendung hochgradiger Tumoren notwendig, um die Kultivierung *in vitro* zu ermöglichen. Diese induzierten Tumoren mit *TP53^{KO}* erscheinen histologisch wie GGs mit malignem Phänotyp. Solche GGs wurden früher als anaplastische GGs bezeichnet, allerdings sieht die aktuell gültige fünfte Auflage der WHO-Klassifikation der Tumoren des ZNS diese Entität nicht weiter vor (Solomon et al., 2021). Trotzdem sind die beiden anderen eingebrachten Alterationen, *BRAF^{V600E}* und mTOR-Aktivierung, typische Merkmale verschiedener primärer neuroepithelialer ZNS-Tumoren unterschiedlichster Graduierung bzw. Dignität (Di Nunno et al., 2022; Pachow et al., 2015). Glioneuronale Tumoren wie GGs und andere Entitäten zeichnen sich dabei dadurch aus, dass sie aus neuralen Vorläuferzellen entstehen, welche von den genannten Alterationen getroffen werden. Dies konnte experimentell im

Maus-Modell gezeigt sowie mithilfe von RNA-Sequenzierungsstudien an humanem Material bestätigt werden (Cases-Cunillera et al., 2022; Regal et al., 2023).

Die Ergebnisse dieser Arbeit lassen sich aufgrund der beschriebenen Limitationen nicht direkt auf eine bestimmte Tumor-Entität beim Menschen übertragen. Allerdings konnte hier generell gezeigt werden, dass neuroepitheliale Tumor-Zellen mit Überaktivität im MAPK- und mTOR-Signalweg parakrin Faktoren sezernieren, welche starke Effekte auf sich entwickelnde neuronale Netzwerke ausüben. Diese Resultate können damit sogar auf eine größere Gruppe von primären humanen ZNS-Tumoren übertragen werden. Sie tragen weiter zum Verständnis der Epileptogenese im Rahmen von ZNS-Tumoren bei und bilden in Zukunft möglicherweise die Grundlage für neuartige therapeutische Interventionen bei Tumor-assoziierten Epilepsien.

1.5 Zusammenfassung

Gangliogliome (GGs) sind die häufigsten glioneuronalen Tumoren und gehen oftmals mit epileptischer Anfallsaktivität einher. Die Mechanismen, die dieser Anfallsaktivität zugrunde liegen, sind bis heute nicht hinreichend geklärt. Basierend auf einem kürzlich entwickelten Mausmodell für höhergradige GGs (*BRAF^{V600E}*, mTOR-Aktivierung, *TP53^{KO}*) wurden in dieser Studie Primärzell-Kulturen angelegt, um GG-konditioniertes Medium zu generieren. Der Effekt dieses Mediums auf sich entwickelnde Wildtyp-Neurone wurde mit jenem von naivem sowie Neuronen-konditioniertem Medium verglichen. Im Mikroelektroden-Array führte das GG-konditionierte Medium zu einer massiv beschleunigten Netzwerk-Synchronisation, welche auch nach Auswaschen mit frischem Medium erhalten blieb. Die molekulare Charakterisierung des GG-konditionierten Mediums mittels Massenspektrometrie identifizierte eine komplexe Mischung verschiedener Proteine in diesem Medium, welche funktionell mit Neurogenese und Gliogenese assoziiert sind. Passend zu letzterem Punkt triggerte das GG-konditionierte Medium eine starke astrozytäre Proliferation in den neuronalen Wildtyp-Kulturen. Da die beschriebenen Netzwerk-Effekte aber auch nach Inhibition dieser Proliferation mittels Cytarabin erhalten blieben, wird der Haupt-Effekt des GG-konditionierten Mediums direkt auf die Neurone ausgeübt. Parallel konnte der Gliotransmitter und Onkometabolit Glutamat, welcher bereits aus dem Kontext reiner Gliome bekannt ist, als Vermittler der beobachteten Effekte ausgeschlossen werden. Diese Studie ist die erste, die den Einfluss von GG-sezernierten Faktoren auf Wildtyp-Neurone systematisch untersucht hat. Die Ergebnisse zeigen, dass parakrin sezernierte Faktoren von neuroepithelialen Tumorzellen mit MAPK- und mTOR-Überaktivität alleine ausreichend sind, ein sich entwickelndes neuronales Netzwerk irreversibel zu schädigen. Die Kenntnis über diese involvierten Faktoren kann in Zukunft neue diagnostische und therapeutische Möglichkeiten eröffnen.

1.6 Literaturverzeichnis der deutschen Zusammenfassung

Antonelli M, Badiali M, Moi L, Buttarelli FR, Baldi C, Massimino M, Sanson M, Giangaspero F. KIAA1549:BRAF fusion gene in pediatric brain tumors of various histogenesis. *Pediatr Blood Cancer* 2015; 62: 724–727

Aronica E, Gorter JA, Jansen GH, Leenstra S, Yankaya B, Troost D. Expression of connexin 43 and connexin 32 gap-junction proteins in epilepsy-associated brain tumors and in the perilesional epileptic cortex. *Acta Neuropathol* 2001; 101: 449–459

Becker AJ, Blümcke I, Urbach H, Hans V, Majores M. Molecular neuropathology of epilepsy-associated glioneuronal malformations. *J Neuropathol Exp Neurol* 2006; 65: 99–108

Blumcke I, Budday S, Poduri A, Lal D, Kobow K, Baulac S. Neocortical development and epilepsy: insights from focal cortical dysplasia and brain tumours. *Lancet Neurol* 2021; 20: 943–955

Blumcke I, Spreafico R, Haaker G, Coras R, Kobow K, Bien CG, Pfäfflin M, Elger C, Widman G, Schramm J, Becker A, Braun KP, Leijten F, Baayen JC, Aronica E, Chassoux F, Hamer H, Stefan H, Rössler K, Thom M, Walker MC, Sisodiya SM, Duncan JS, McEvoy AW, Pieper T, Holthausen H, Kudernatsch M, Meencke HJ, Kahane P, Schulze-Bonhage A, Zentner J, Heiland DH, Urbach H, Steinhoff BJ, Bast T, Tassi L, Lo Russo G, Özkara C, Oz B, Krsek P, Vogelgesang S, Runge U, Lerche H, Weber Y, Honavar M, Pimentel J, Arzimanoglou A, Ulate-Campos A, Noachtar S, Hartl E, Schijns O, Guerrini R, Barba C, Jacques TS, Cross JH, Feucht M, Mühlebner A, Grunwald T, Trinka E, Winkler PA, Gil-Nagel A, Toledano Delgado R, Mayer T, Lutz M, Zountsas B, Garganis K, Rosenow F, Hermsen A, Oertzen TJ von, Diepgen TL, Avanzini G. Histopathological Findings in Brain Tissue Obtained during Epilepsy Surgery. *N Engl J Med* 2017; 377: 1648–1656

Blümcke I, Giencke K, Wardelmann E, Beyenburg S, Kral T, Sarioglu N, Pietsch T, Wolf HK, Schramm J, Elger CE, Wiestler OD. The CD34 epitope is expressed in neoplastic and malformative lesions associated with chronic, focal epilepsies. *Acta Neuropathol* 1999; 97: 481–490

Blümcke I, Wiestler OD. Gangliogliomas: an intriguing tumor entity associated with focal epilepsies. *J Neuropathol Exp Neurol* 2002; 61: 575–584

Boer K, Troost D, Timmermans W, van Rijen PC, Spliet WGM, Aronica E. Pi3K-mTOR signaling and AMOG expression in epilepsy-associated glioneuronal tumors. *Brain Pathol* 2010; 20: 234–244

Buckingham SC, Campbell SL, Haas BR, Montana V, Robel S, Ogunrinu T, Sontheimer H. Glutamate release by primary brain tumors induces epileptic activity. *Nat Med* 2011; 17: 1269–1274

Cases-Cunillera S, van Loo KMJ, Pitsch J, Quatraccioni A, Sivalingam S, Salomoni P, Borger V, Dietrich D, Schoch S, Becker AJ. Heterogeneity and excitability of BRAFV600E-induced tumors is determined by Akt/mTOR-signaling state and Trp53-loss. *Neuro Oncol* 2022; 24: 741–754

Chen T-W, Wardill TJ, Sun Y, Pulver SR, Renninger SL, Baohan A, Schreiter ER, Kerr RA, Orger MB, Jayaraman V, Looger LL, Svoboda K, Kim DS. Ultrasensitive fluorescent proteins for imaging neuronal activity. *Nature* 2013; 499: 295–300

Cotterill E, Hall D, Wallace K, Mundy WR, Eglen SJ, Shafer TJ. Characterization of Early Cortical Neural Network Development in Multiwell Microelectrode Array Plates. *J Biomol Screen* 2016; 21: 510–519

Dana H, Sun Y, Mohar B, Hulse BK, Kerlin AM, Hasseman JP, Tsegaye G, Tsang A, Wong A, Patel R, Macklin JJ, Chen Y, Konnerth A, Jayaraman V, Looger LL, Schreiter ER, Svoboda K, Kim DS. High-performance calcium sensors for imaging activity in neuronal populations and microcompartments. *Nat Methods* 2019; 16: 649–657

Davies H, Bignell GR, Cox C, Stephens P, Edkins S, Clegg S, Teague J, Woffendin H, Garnett MJ, Bottomley W, Davis N, Dicks E, Ewing R, Floyd Y, Gray K, Hall S, Hawes R, Hughes J, Kosmidou V, Menzies A, Mould C, Parker A, Stevens C, Watt S, Hooper S, Wilson R, Jayatilake H, Gusterson BA, Cooper C, Shipley J, Hargrave D, Pritchard-Jones K, Maitland N, Chenevix-Trench G, Riggins GJ, Bigner DD, Palmieri G, Cossu A, Flanagan A, Nicholson A, Ho JWC, Leung SY, Yuen ST, Weber BL, Seigler HF, Darrow TL, Paterson H, Marais R, Marshall CJ, Wooster R, Stratton MR, Futreal PA. Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature* 2002; 417: 949–954

DeTure MA, Dickson DW. The neuropathological diagnosis of Alzheimer's disease. *Mol Neurodegener* 2019; 14: 32

- Di Nunno V, Gatto L, Tosoni A, Bartolini S, Franceschi E. Implications of BRAF V600E mutation in gliomas: Molecular considerations, prognostic value and treatment evolution. *Front Oncol* 2022; 12: 1067252
- Dong H, Zhou X-W, Wang X, Yang Y, Luo J-W, Liu Y-H, Mao Q. Complex role of connexin 43 in astrocytic tumors and possible promotion of glioma-associated epileptic discharge (Review). *Mol Med Rep* 2017; 16: 7890–7900
- Dumitru I, Neitz A, Alfonso J, Monyer H. Diazepam Binding Inhibitor Promotes Stem Cell Expansion Controlling Environment-Dependent Neurogenesis. *Neuron* 2017; 94: 125-137.e5
- Ehrstedt C, Ahlsten G, Strömberg B, Lindskog C, Casar-Borota O. Somatostatin receptor expression and mTOR pathway activation in glioneuronal tumours of childhood. *Seizure* 2020; 76: 123–130
- Everlien I, Yen T-Y, Liu Y-C, Di Marco B, Vázquez-Marín J, Centanin L, Alfonso J, Monyer H. Diazepam binding inhibitor governs neurogenesis of excitatory and inhibitory neurons during embryonic development via GABA signaling. *Neuron* 2022; 110: 3139-3153.e6
- Evers MR, Salmen B, Bukalo O, Rollenhagen A, Bösl MR, Morellini F, Bartsch U, Dityatev A, Schachner M. Impairment of L-type Ca²⁺ channel-dependent forms of hippocampal synaptic plasticity in mice deficient in the extracellular matrix glycoprotein tenascin-C. *J Neurosci* 2002; 22: 7177–7194
- Ferrer-Ferrer M, Dityatev A. Shaping Synapses by the Neural Extracellular Matrix. *Front Neuroanat* 2018; 12: 40
- Fuchs Q, Batut A, Gleyzes M, Rontard J, Miny L, Libralato M, Vieira J, Debis D, Larramendy F, Honegger T, Messe M, Pierrevet M, Lhermitte B, Dontenwill M, Entz-Werlé N. Co-culture of Glutamatergic Neurons and Pediatric High-Grade Glioma Cells Into Microfluidic Devices to Assess Electrical Interactions. *J Vis Exp* 2021
- Gan KJ, Südhof TC. Specific factors in blood from young but not old mice directly promote synapse formation and NMDA-receptor recruitment. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2019; 116: 12524–12533

- Gan KJ, Südhof TC. SPARCL1 Promotes Excitatory But Not Inhibitory Synapse Formation and Function Independent of Neurexins and Neuroligins. *J Neurosci* 2020; 40: 8088–8102
- González-Castillo C, Ortuño-Sahagún D, Guzmán-Brambila C, Pallàs M, Rojas-Mayorquín AE. Pleiotrophin as a central nervous system neuromodulator, evidences from the hippocampus. *Front Cell Neurosci* 2014; 8: 443
- Graupner M, Brunel N. Calcium-based plasticity model explains sensitivity of synaptic changes to spike pattern, rate, and dendritic location. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2012; 109: 3991–3996
- Hasebe N, Fujita Y, Ueno M, Yoshimura K, Fujino Y, Yamashita T. Soluble β -amyloid Precursor Protein Alpha binds to p75 neurotrophin receptor to promote neurite outgrowth. *PLoS One* 2013; 8: e82321
- Hatanaka H, Tsukui H. Differential effects of nerve-growth factor and glioma-conditioned medium on neurons cultured from various regions of fetal rat central nervous system. *Brain Res* 1986; 395: 47–56
- Hillen H. The Beta Amyloid Dysfunction (BAD) Hypothesis for Alzheimer's Disease. *Front Neurosci* 2019; 13: 1154
- Inglebert Y, Aljadeff J, Brunel N, Debanne D. Synaptic plasticity rules with physiological calcium levels. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2020; 117: 33639–33648
- Irintchev A, Rollenhagen A, Troncoso E, Kiss JZ, Schachner M. Structural and functional aberrations in the cerebral cortex of tenascin-C deficient mice. *Cereb Cortex* 2005; 15: 950–962
- Jacque CM, Vinner C, Kujas M, Raoul M, Racadot J, Baumann NA. Determination of glial fibrillary acidic protein (GFAP) in human brain tumors. *J Neurol Sci* 1978; 35: 147–155
- Kakkar A, Majumdar A, Kumar A, Tripathi M, Pathak P, Sharma MC, Suri V, Tandon V, Chandra SP, Sarkar C. Alterations in BRAF gene, and enhanced mTOR and MAPK signaling in dysembryoplastic neuroepithelial tumors (DNTs). *Epilepsy Res* 2016; 127: 141–151

- Kang K-R, Kim C-Y, Kim J, Ryu B, Lee S-G, Baek J, Kim Y-J, Lee J-M, Lee Y, Choi S-O, Woo DH, Park IH, Chung HM. Establishment of Neurotoxicity Assessment Using Microelectrode Array (MEA) with hiPSC-Derived Neurons and Evaluation of New Psychoactive Substances (NPS). *Int J Stem Cells* 2022; 15: 258–269
- Kittock CM, Pilaz L-J. Advances in in utero electroporation. *Dev Neurobiol* 2023; 83: 73–90
- Koelsche C, Wöhrer A, Jeibmann A, Schittenhelm J, Schindler G, Preusser M, Lasitschka F, Deimling A von, Capper D. Mutant BRAF V600E protein in ganglioglioma is predominantly expressed by neuronal tumor cells. *Acta Neuropathol* 2013; 125: 891–900
- Koh HY, Kim SH, Jang J, Kim H, Han S, Lim JS, Son G, Choi J, Park BO, Heo WD, Han J, Lee HJ, Lee D, Kang H-C, Shong M, Paik S-B, Kim DS, Lee JH. BRAF somatic mutation contributes to intrinsic epileptogenicity in pediatric brain tumors. *Nat Med* 2018; 24: 1662–1668
- Kucukdereli H, Allen NJ, Lee AT, Feng A, Ozlu MI, Conatser LM, Chakraborty C, Workman G, Weaver M, Sage EH, Barres BA, Eroglu C. Control of excitatory CNS synaptogenesis by astrocyte-secreted proteins Hevin and SPARC. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011; 108: E440-9
- Kwong Y-L, Yeung DYM, Chan JCW. Intrathecal chemotherapy for hematologic malignancies: drugs and toxicities. *Ann Hematol* 2009; 88: 193–201
- Laplane M, Sabatini DM. mTOR signaling in growth control and disease. *Cell* 2012; 149: 274–293
- Lee SH, Kang J, Ho A, Watanabe H, Bolshakov VY, Shen J. APP Family Regulates Neuronal Excitability and Synaptic Plasticity but Not Neuronal Survival. *Neuron* 2020; 108: 676-690.e8
- Loo E, Khalili P, Beuhler K, Siddiqi I, Vasef MA. BRAF V600E Mutation Across Multiple Tumor Types: Correlation Between DNA-based Sequencing and Mutation-specific Immunohistochemistry. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 2018; 26: 709–713

Lopes-Rodrigues V, Boxy P, Sim E, Park DI, Habeck M, Carbonell J, Andersson A, Fernández-Suárez D, Nissen P, Nykjær A, Kisiswa L. AraC interacts with p75NTR transmembrane domain to induce cell death of mature neurons. *Cell Death Dis* 2023; 14: 440

Luyken C, Blümcke I, Fimmers R, Urbach H, Wiestler OD, Schramm J. Supratentorial gangliogliomas: histopathologic grading and tumor recurrence in 184 patients with a median follow-up of 8 years. *Cancer* 2004; 101: 146–155

McCutcheon S, Spray DC. Glioblastoma-Astrocyte Connexin 43 Gap Junctions Promote Tumor Invasion. *Mol Cancer Res* 2022; 20: 319–331

Miao J, Wang F, Wang R, Zeng J, Zheng C, Zhuang G. Pleiotrophin regulates functional heterogeneity of microglia cells in EAE animal models of multiple sclerosis by activating CCR-7/CD206 molecules and functional cytokines. *Am J Transl Res* 2019; 11: 2013–2027

Miller KD, Ostrom QT, Kruchko C, Patil N, Tihan T, Cioffi G, Fuchs HE, Waite KA, Jemal A, Siegel RL, Barnholtz-Sloan JS. Brain and other central nervous system tumor statistics, 2021. *CA Cancer J Clin* 2021; 71: 381–406

Moloney PB, Cavalleri GL, Delanty N. Epilepsy in the mTORopathies: opportunities for precision medicine. *Brain Commun* 2021; 3: fcab222

Müller P, Dietrich D, Schoch S, Pitsch J, Becker AJ, Cases-Cunillera S. Ganglioglioma cells potentiate neuronal network synchronicity and elicit burst discharges via released factors. *Neurobiol Dis* 2024; 190: 106364

Negri J, Menon V, Young-Pearse TL. Assessment of Spontaneous Neuronal Activity In Vitro Using Multi-Well Multi-Electrode Arrays: Implications for Assay Development. *eNeuro* 2020; 7

Okoh J, Mays J, Bacq A, Oses-Prieto JA, Tyanova S, Chen C-J, Imanbeyev K, Doladilhe M, Zhou H, Jafar-Nejad P, Burlingame A, Noebels J, Baulac S, Costa-Mattioli M. Targeted suppression of mTORC2 reduces seizures across models of epilepsy. *Nat Commun* 2023; 14: 7364

Okuda S, Saito H, Katsuki H. Divergent trophic actions of glioma conditioned media on cultured rat hippocampal neurons. *Biol Pharm Bull* 1994; 17: 735–738

Ostrom QT, Cioffi G, Waite K, Kruchko C, Barnholtz-Sloan JS. CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Other Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2014-2018. *Neuro Oncol* 2021; 23: iii1-iii105

Pachow D, Wick W, Gutmann DH, Mawrin C. The mTOR signaling pathway as a treatment target for intracranial neoplasms. *Neuro Oncol* 2015; 17: 189–199

Pallud J, Capelle L, Huberfeld G. Tumoral epileptogenicity: how does it happen? *Epilepsia* 2013; 54 Suppl 9: 30–34

Pallud J, van Quyen M, Bielle F, Pellegrino C, Varlet P, Cresto N, Baulac M, Duyckaerts C, Kourdougli N, Chazal G, Devaux B, Rivera C, Miles R, Capelle L, Huberfeld G. Cortical GABAergic excitation contributes to epileptic activities around human glioma. *Sci Transl Med* 2014; 6: 244ra89

Pekmezci M, Villanueva-Meyer JE, Goode B, van Ziffle J, Onodera C, Grenert JP, Bastian BC, Chamyan G, Maher OM, Khatib Z, Kleinschmidt-DeMasters BK, Samuel D, Mueller S, Banerjee A, Clarke JL, Cooney T, Torkildson J, Gupta N, Theodosopoulos P, Chang EF, Berger M, Bollen AW, Perry A, Tihan T, Solomon DA. The genetic landscape of ganglioglioma. *Acta Neuropathol Commun* 2018; 6: 47

Perluigi M, Di Domenico F, Butterfield DA. mTOR signaling in aging and neurodegeneration: At the crossroad between metabolism dysfunction and impairment of autophagy. *Neurobiol Dis* 2015; 84: 39–49

Pitsch J, Kamalizade D, Braun A, Kuehn JC, Gulakova PE, Rüber T, Lubec G, Dietrich D, Wrede R von, Helmstaedter C, Surges R, Elger CE, Hattingen E, Vatter H, Schoch S, Becker AJ. Drebrin Autoantibodies in Patients with Seizures and Suspected Encephalitis. *Ann Neurol* 2020; 87: 869–884

Potthoff A-L, Heiland DH, Evert BO, Almeida FR, Behringer SP, Dolf A, Güresir Á, Güresir E, Joseph K, Pietsch T, Schuss P, Herrlinger U, Westhoff M-A, Vatter H, Waha A, Schneider M. Inhibition of Gap Junctions Sensitizes Primary Glioblastoma Cells for Temozolomide. *Cancers (Basel)* 2019; 11

Prabowo AS, Iyer AM, Veersema TJ, Anink JJ, Schouten-van Meeteren AYN, Spliet WGM, van Rijen PC, Ferrier CH, Capper D, Thom M, Aronica E. BRAF V600E mutation is associated with mTOR signaling activation in glioneuronal tumors. *Brain Pathol* 2014; 24: 52–66

Prabowo AS, Iyer AM, Veersema TJ, Anink JJ, Schouten-van Meeteren AYN, Spliet WGM, van Rijen PC, Ferrier CH, Thom M, Aronica E. Expression of neurodegenerative disease-related proteins and caspase-3 in glioneuronal tumours. *Neuropathol Appl Neurobiol* 2015; 41: e1-e15

Purushotham SS, Buskila Y. Astrocytic modulation of neuronal signalling. *Front Netw Physiol* 2023; 3: 1205544

Qiao H, Foote M, Graham K, Wu Y, Zhou Y. 14-3-3 proteins are required for hippocampal long-term potentiation and associative learning and memory. *J Neurosci* 2014; 34: 4801–4808

Qiu X, Zhou R, Su X, Ying J, Qu Y, Mu D. Pleiotrophin ameliorates white matter injury of neonatal rats by activating the mTOR/YY1/Id4 signaling pathway. *FASEB J* 2023; 37: e23082

Regal JA, Guerra García ME, Jain V, Chandramohan V, Ashley DM, Gregory SG, Thompson EM, López GY, Reitman ZJ. Ganglioglioma deep transcriptomics reveals primitive neuroectoderm neural precursor-like population. *Acta Neuropathol Commun* 2023; 11: 50

Rogawski MA. Therapeutic potential of excitatory amino acid antagonists: channel blockers and 2,3-benzodiazepines. *Trends Pharmacol Sci* 1993; 14: 325–331

Salimi A, Shabani M, Nikjou A, Choupani M, Biniyaz M. Exploring the possible mitoprotective and neuroprotective potency of thymoquinone, betanin, and vitamin D against cytarabine-induced mitochondrial impairment and neurotoxicity in rats' brain. *J Biochem Mol Toxicol* 2023; 37: e23256

Sauer B, Henderson N. Site-specific DNA recombination in mammalian cells by the Cre recombinase of bacteriophage P1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1988; 85: 5166–5170

Schindler G, Capper D, Meyer J, Janzarik W, Omran H, Herold-Mende C, Schmieder K, Wesseling P, Mawrin C, Hasselblatt M, Louis DN, Korshunov A, Pfister S, Hartmann C, Paulus W, Reifenberger G, Deimling A von. Analysis of BRAF V600E mutation in 1,320 nervous system tumors reveals high mutation frequencies in pleomorphic xanthoastrocytoma, ganglioglioma and extra-cerebellar pilocytic astrocytoma. *Acta Neuropathol* 2011; 121: 397–405

Schwieger J, Esser K-H, Lenarz T, Scheper V. Establishment of a long-term spiral ganglion neuron culture with reduced glial cell number: Effects of AraC on cell composition and neurons. *J Neurosci Methods* 2016; 268: 106–116

Shaner NC, Campbell RE, Steinbach PA, Giepmans BNG, Palmer AE, Tsien RY. Improved monomeric red, orange and yellow fluorescent proteins derived from *Discosoma* sp. red fluorescent protein. *Nat Biotechnol* 2004; 22: 1567–1572

Slegers RJ, Blumcke I. Low-grade developmental and epilepsy associated brain tumors: a critical update 2020. *Acta Neuropathol Commun* 2020; 8: 27

Solomon DA, Blümcke I, Capper D, Gupta Kirti, Varlet P. Ganglioglioma. In: WHO Classification of Tumours Editorial Board, Hrsg. World Health Organization Classification of Tumours of the Central Nervous System. Lyon: International Agency for Research on Cancer, 2021: 111–115

Sran S, Bedrosian TA. RAS pathway: The new frontier of brain mosaicism in epilepsy. *Neurobiol Dis* 2023; 180: 106074

Stone TJ, Rowell R, Jayasekera BAP, Cunningham MO, Jacques TS. Review: Molecular characteristics of long-term epilepsy-associated tumours (LEATs) and mechanisms for tumour-related epilepsy (TRE). *Neuropathol Appl Neurobiol* 2018; 44: 56–69

Strekalova T, Sun M, Sibbe M, Evers M, Dityatev A, Gass P, Schachner M. Fibronectin domains of extracellular matrix molecule tenascin-C modulate hippocampal learning and synaptic plasticity. *Mol Cell Neurosci* 2002; 21: 173–187

Sun J, Pan X, Christiansen LI, Yuan X-L, Skovgaard K, Chatterton DEW, Kaalund SS, Gao F, Sangild PT, Pankratova S. Necrotizing enterocolitis is associated with acute brain responses in preterm pigs. *J Neuroinflammation* 2018; 15: 180

Tang C, Wang M, Wang P, Wang L, Wu Q, Guo W. Neural Stem Cells Behave as a Functional Niche for the Maturation of Newborn Neurons through the Secretion of PTN. *Neuron* 2019; 101: 32-44.e6

Taylor KR, Barron T, Hui A, Spitzer A, Yalçın B, Ivec AE, Geraghty AC, Hartmann GG, Arzt M, Gillespie SM, Kim YS, Maleki Jahan S, Zhang H, Shamardani K, Su M, Ni L, Du PP, Woo PJ, Silva-Torres A, Venkatesh HS, Mancusi R, Ponnuswami A, Mulinyawe S, Keough MB, Chau I, Aziz-Bose R, Tirosh I, Suvà ML, Monje M. Glioma synapses recruit mechanisms of adaptive plasticity. *Nature* 2023; 623: 366–374

Tensaouti Y, Yu T-S, Kernie SG. Apolipoprotein E regulates the maturation of injury-induced adult-born hippocampal neurons following traumatic brain injury. *PLoS One* 2020; 15: e0229240

Thomas PD, Ebert D, Muruganujan A, Mushayahama T, Albou L-P, Mi H. PANTHER: Making genome-scale phylogenetics accessible to all. *Protein Sci* 2022; 31: 8–22

Toyo-oka K, Wachi T, Hunt RF, Baraban SC, Taya S, Ramshaw H, Kaibuchi K, Schwarz QP, Lopez AF, Wynshaw-Boris A. 14-3-3 ϵ and ζ regulate neurogenesis and differentiation of neuronal progenitor cells in the developing brain. *J Neurosci* 2014; 34: 12168–12181

Varshneya K, Sarmiento JM, Nuño M, Lagman C, Mukherjee D, Nuño K, Babu H, Patil CG. A national perspective of adult gangliogliomas. *J Clin Neurosci* 2016; 30: 65–70

Wang Y, Wang L, Blümcke I, Zhang W, Fu Y, Shan Y, Piao Y, Zhao G. Integrated genotype-phenotype analysis of long-term epilepsy-associated ganglioglioma. *Brain Pathol* 2022; 32: e13011

Wei Z, Kale S, El Fatimy R, Rabinovsky R, Krichevsky AM. Co-cultures of Glioma Stem Cells and Primary Neurons, Astrocytes, Microglia, and Endothelial Cells for Investigation of Intercellular Communication in the Brain. *Front Neurosci* 2019; 13: 361

WHO Classification of Tumours Editorial Board, Hrsg. World Health Organization Classification of Tumours of the Central Nervous System. Lyon: International Agency for Research on Cancer, 2021

Ye ZC, Sontheimer H. Glioma cells release excitotoxic concentrations of glutamate. *Cancer Res* 1999; 59: 4383–4391

Yuen TI, Morokoff AP, Bjorksten A, D'Abaco G, Paradiso L, Finch S, Wong D, Reid CA, Powell KL, Drummond KJ, Rosenthal MA, Kaye AH, O'Brien TJ. Glutamate is associated with a higher risk of seizures in patients with gliomas. *Neurology* 2012; 79: 883–889

Yust-Katz S, Anderson MD, Liu D, Wu J, Yuan Y, Olar A, Fuller GN, Brown PD, de-Groot JF. Clinical and prognostic features of adult patients with gangliogliomas. *Neuro Oncol* 2014; 16: 409–413

Zanello M, Pages M, Tauziède-Espariat A, Saffroy R, Puget S, Lacroix L, Dezamis E, Devaux B, Chrétien F, Andreiuolo F, Sainte-Rose C, Zerah M, Dhermain F, Dumont S, Louvel G, Meder J-F, Grill J, Dufour C, Pallud J, Varlet P. Clinical, Imaging, Histopathological and Molecular Characterization of Anaplastic Ganglioglioma. *J Neuropathol Exp Neurol* 2016; 75: 971–980

Zhang Y, Rózsa M, Liang Y, Bushey D, Wei Z, Zheng J, Reep D, Broussard GJ, Tsang A, Tsegaye G, Narayan S, Obara CJ, Lim J-X, Patel R, Zhang R, Ahrens MB, Turner GC, Wang SS-H, Korff WL, Schreiter ER, Svoboda K, Hasseman JP, Kolb I, Looger LL. Fast and sensitive GCaMP calcium indicators for imaging neural populations. *Nature* 2023; 615: 884–891

Zhu Y, Bu Q, Liu X, Hu W, Wang Y. Neuroprotective effect of TAT-14-3-3 ϵ fusion protein against cerebral ischemia/reperfusion injury in rats. *PLoS One* 2014; 9: e93334

2. Veröffentlichung

Dieser Publikationsdissertation liegt die folgende, unabhängig begutachtete Veröffentlichung zugrunde:

Müller P, Dietrich D, Schoch S, Pitsch J, Becker AJ, Cases-Cunillera S. Ganglioglioma cells potentiate neuronal network synchronicity and elicit burst discharges via released factors. *Neurobiol Dis* 2024; 190: 106364

<https://doi.org/10.1016/j.nbd.2023.106364>

3. Erklärung zum Eigenanteil

Die vorliegende Arbeit wurde von mir im Institut für Neuropathologie, Sektion für Translationale Epilepsieforschung, unter der Betreuung von Prof. Dr. Albert J. Becker sowie Dr. Silvia Cases Cunillera angefertigt.

Die Konzeption der Studie erfolgte durch mich in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. Albert J. Becker, Dr. Silvia Cases Cunillera, Prof. Dr. Dirk Dietrich (Klinik und Poliklinik für Neurochirurgie), Prof. Dr. Susanne Schoch (Institut für Neuropathologie) und Priv.-Doz. Dr. Julika Pitsch (Klinik und Poliklinik für Epileptologie).

Bis auf folgend aufgeführte Ausnahmen erfolgte die Datenerhebung sowie Auswertung durch mich: Die *in-utero* Elektroporationen führte Dr. Silvia Cases Cunillera durch. Sabine Opitz (Institut für Neuropathologie) präparierte sämtliche neuronale Wildtyp-Kulturen. Die Massenspektrometrischen Analysen wurden durch die entsprechende Core Facility des Universitätsklinikums Bonn durchgeführt (Dr. Robert Hardt, Dr. Marc Sylvester, Beatrix Brummer). Diese stellten die Rohdaten aufgearbeitet im Excel-Format zur Verfügung, die weitere Auswertung erfolgte durch mich. Bei einzelnen allgemeinen Labor-Prozeduren halfen zudem Pia Trebing und Shayne Gilgenbach (jeweils Institut für Neuropathologie).

Die statistische Auswertung erfolgte eigenständig durch mich.

Die Interpretation und Diskussion der Ergebnisse erfolgte initial durch mich, anschließend gemeinsam mit Dr. Silvia Cases Cunillera, Prof. Dr. Albert J. Becker, Prof. Dr. Dirk Dietrich, Prof. Dr. Susanne Schoch sowie Prof. Dr. Gilles Huberfeld (Université Paris Cité, Institute of Psychiatry and Neuroscience of Paris, INSERM U1266, Neuronal Signaling in Epilepsy and Glioma, Paris).

Ich versichere, die Dissertationsschrift selbständig verfasst zu haben und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

4. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen danken, die mich in meinem ganzen Promotionsvorhaben unterstützt haben. Mein größter Dank gilt meinem Doktorvater, Prof. Albert Becker, für die Überlassung des Themas sowie seine Unterstützung im Laufe des Projektes. Ebenfalls danke ich meiner direkten Betreuerin, Dr. Silvia Cases Cunillera: Vielen Dank für die endlose Geduld, Hilfsbereitschaft und Unterstützung von Beginn an! Darüber hinaus danke ich Prof. Susanne Schoch und Prof. Dirk Dietrich für ihre wertvollen Anmerkungen und Vorschläge im Laufe des Projektes sowie Prof. Gilles Huberfeld für die kritische Diskussion der Ergebnisse. Ich bedanke mich bei allen Mitgliedern der Arbeitsgruppen Becker, Schoch, Pitsch und Dietrich. Besonderer Dank geht hier an Sabine Opitz für ihre große Hilfsbereitschaft sowohl in technischen als auch persönlichen Belangen sowie die zahlreichen Präparationen von Primär-Neuronen. Zudem bedanke ich mich bei Dr. Robert Hardt sowie Dr. Marc Sylvester der Core-Facility „Massenspektrometrie“ für die gute Beratung sowie die Durchführung der massenspektrometrischen Analysen, sowie bei Jakob Neuberger und Moritz Müller für das kritische Lesen der vorliegenden Arbeit.

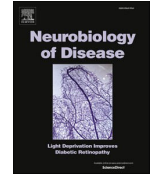
Des Weiteren bedanke ich mich bei meiner Familie für ihre grenzenlose Unterstützung, nicht nur in den Jahren dieses Promotionsprojektes.

5. Publikation (PDF-Version)



Contents lists available at ScienceDirect

Neurobiology of Disease

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ynbdi

Ganglioglioma cells potentiate neuronal network synchronicity and elicit burst discharges via released factors

Philipp Müller^a, Dirk Dietrich^b, Susanne Schoch^{a,c}, Julika Pitsch^c, Albert J. Becker^{a,1},
Silvia Cases-Cunillera^{d,*}

^a Institute of Neuropathology, Section for Translational Epilepsy Research, Medical Faculty, University of Bonn, 53127 Bonn, Germany

^b Department of Neurosurgery, University Hospital Bonn, 53127 Bonn, Germany

^c Department of Epileptology, University Hospital Bonn, University of Bonn, 53127 Bonn, Germany

^d Université Paris Cité, Institute of Psychiatry and Neuroscience of Paris (IPNP), INSERM U1266, Neuronal Signaling in Epilepsy and Glioma, 75014 Paris, France

ARTICLE INFO

Keywords:

Ganglioglioma
Neuronal maturation
Plasticity
Reactive astrocyte

ABSTRACT

Gangliogliomas (GGs) represent the most frequent glioneuronal tumor entity associated with chronic recurrent seizures; rare anaplastic GGs variants retain the glioneuronal character. So far, key mechanisms triggering chronic hyperexcitability in the peritumoral area are unresolved. Based on a recent mouse model for anaplastic GG (*BRAF*^{V600E}, mTOR activation and *Trp53*^{KO}) we here assessed the influence of GG-secreted factors on non-neoplastic cells in-vitro. We generated conditioned medium (CM) from primary GG cell cultures to developing primary cortical neurons cultured on multielectrode-arrays and assessed their electrical activity in comparison to neurons incubated with naïve and neuronal CMs. Our results showed that the GG CM, while not affecting the mean firing rates of networks, strongly accelerated the formation of functional networks as indicated increased synchrony of firing and burst activity. Washing out the GG CM did not reverse these effects indicating an irreversible effect on the neuronal network. Mass spectrometry analysis of GG CM detected several enriched proteins associated with neurogenesis as well as gliogenesis, including Gap43, App, Apoe, S100a8, Tnc and Sod1. Concomitantly, immunocytochemical analysis of the neuronal cultures exposed to GG CM revealed abundant astrocytes suggesting that the GG-secreted factors induce astroglial proliferation. Pharmacological inhibition of astrocyte proliferation only partially reversed the accelerated network maturation in neuronal cultures exposed to GG CM indicating that the GG CM exerts a direct effect on the neuronal component. Taken together, we demonstrate that GG-derived paracrine signaling alone is sufficient to induce accelerated neuronal network development accompanied by astrocytic proliferation. Perspectively, a deeper understanding of factors involved may serve as the basis for future therapeutic approaches.

1. Introduction

Developmental glioneuronal neoplasms are a major cause of chronic recurrent seizure activity in children and adolescents. Among them, gangliogliomas (GGs) represent the most frequent entity (Blumcke et al., 2017). Several cytohistological, molecular and clinical features are characteristic of GGs and distinguish them fundamentally from diffuse gliomas including their highly differentiated phenotype composed of dysmorphic neurons and fibrillary astroglia. Somatic *BRAF*^{V600E} mutation has been reported as the primary molecular-genetic alteration of

GGs, whereas mutations of *IDH1* virtually exclude the diagnosis of GG (Schindler et al., 2011). The biological behavior of GGs is generally benign and data from GG mouse models demonstrate that the growth potential of low grade GGs is virtually exhausted before adulthood (Cases-Cunillera et al., 2022).

However, rarely malignant GG variants - typically as relapses of lower grade primary neoplasms - with sustained growth dynamics occur (Blumcke et al., 2017). They account for 1–8% of all GG cases (Luyken et al., 2004; Zanello et al., 2016). Whereas in diffuse gliomas malignant progression goes along with an overgrowth of other clonal proliferates

* Corresponding author at: Université Paris Cité, Institute of Psychiatry and Neuroscience of Paris (IPNP), INSERM U1266, Neuronal Signaling in Epilepsy and Glioma, Rue de la Santé 104, 75014 Paris, France.

E-mail address: silvia-cases@outlook.com (S. Cases-Cunillera).

¹ Contributed equally.

<https://doi.org/10.1016/j.nbd.2023.106364>

Received 27 September 2023; Received in revised form 17 November 2023; Accepted 21 November 2023

Available online 24 November 2023

0969-9961/© 2023 The Authors. Published by Elsevier Inc. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

by the most anaplastic tumor cell fraction, anaplastic GGs retain a highly differentiated glioneuronal composition despite an accelerated proliferation of the glial fraction. Furthermore, malignant GGs resemble transcript signatures of mesenchymal glioblastoma variants presumably due to RAS/RAF/MAPK activation and parallel absence of IDH1 mutations (Verhaak et al., 2010). Remarkably, anaplastic GGs histologically lack mesenchymal differentiation present in diffuse primary glioblastomas as well as the characteristic proneural-mesenchymal transition upon tumor recurrences (Behnan et al., 2019), but conserve a high differentiation resembled by dysmorphic neurons and fibrillary astroglia. These differences highlight the relevance of distinct precursors hit by somatic mutations for the cellular architecture and biological features of the emerging lesions. Also, the anaplastic variants of GGs frequently manifest with chronic epilepsy in more than half of the cases (Thom et al., 2012; Zanello et al., 2016). So far, it is unresolved by which signals GGs convert neuronal networks of the tumor microenvironment (TME) chronically hyperexcitable. Generally, primary brain tumors interact with TME by extracellular release of factors or direct synaptic contacts as it has been mainly demonstrated for malignant astrocytomas (Huberfeld and Vecht, 2016; Krishna et al., 2023; Venkatesh et al., 2019). Considering the highly circumscribed and minimal invasive growth as well as the unique glioneuronal composition of GGs, we here started from an anaplastic GG mouse model to test the hypothesis that GGs alter neuronal excitability by extracellularly secreted factors. We have furthermore studied systematically the relevant secreted proteins and experimentally interfered with mechanisms induced by them.

2. Materials and methods

2.1. Mice

All animal experiments involving mice were performed strictly following the guidelines of the European Union and the University of Bonn Medical Center Animal Care Committee. To achieve a higher IUE efficiency, CD1/C57BL/6 hybrid mice were generated by crossing CD1 with B6.129P2-*Trp53^{tm1Brn}*/J from Jackson Laboratories (Stock No: #008462). All animals were sacrificed at postnatal day 40 (P40).

2.2. Intraventricular in utero electroporation (IUE)

The IUE approach was performed as previously described (Cases-Cunillera et al., 2022). Coordinated breedings were performed for 1 day and the pregnant mothers were operated after 14 days. Mouse mothers received Ketoprofen and Buprenorphin 30 min before the surgery and isoflurane was given as a narcotic during the whole procedure. The solution containing the DNA plasmids at a final concentration of 1.5 µg/µl was mixed with Fast Green FCF (Sigma Aldrich) to visualize the solution. After uterus exposure, the lateral ventricle of the pups was injected with the DNA by introducing a glass capillary pipette inside the cavity and expelling it by pressure with a microinjector. Electrical pulses of 45 V were delivered with the CUY21 SC Square Wave Electroporator. After surgery, females were kept on top of a heating pad and were subcutaneously injected daily with Ketoprofen for three days.

2.3. Generation of plasmids used for IUE

The DNA plasmids injected with IUE were cloned into the PiggyBac (PB)-based vectors. In brief, the sequence of the transgenes was cloned between two PB terminal repeats in the donor PB plasmid (Wellcome Trust Sanger Institute; Cambridge, UK). *BRAF^{V600E}* transgene was kindly given by Dr. David Jones (German Cancer Research Center, Heidelberg). For PB-CAG-mCherry-lynAkt (further referred to as *Akt^Δ*), the *Akt* sequence from the myr-Akt1-pUSEamp (Addgene #17245; RRID: Addgene_17,245) was amplified and subcloned into a plasmid containing mCherry-T2A (Addgene #72264; RRID: Addgene_72,264).

2.4. Histological examinations

Mouse tumor brains were isolated between P40 and P70, incubated in 10% formalin for 7 days and embedded in paraffin. Formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) tumor brains were cut to 4 µm and resulting slices were deparaffinized with a decreasing gradient of ethanol. For histological evaluation, brain slices were stained with hematoxylin and eosin (HE). For immunochemical studies, antigen retrieval was performed by boiling the slices in citric buffer (pH 6.0, 10 mM) for 6 min (2 times). After blocking the brain sections in 10% normal goat serum (NGS) and 1% fetal bovine serum (FBS) for 2 h at 37 °C, primary antibodies were applied and incubated overnight at 4 °C (Table S1). After 24 h, sections were incubated with fluorophore-conjugated antibodies (Table S1) for 2 h at room temperature. Finally, sections were mounted using Mowiol 4-88 (Roth #0718) and glass coverslips.

2.5. GG tumor cultures

For the generation of GG CM, tumor mice were sacrificed at P40 to ensure sufficient growth to gain enough material for culturing (Cases-Cunillera et al., 2022). Animals were deeply anesthetized with Isoflurane and decapitated. For GG microdissection the brains were sliced frontally using a vibratome (slice thickness 300 µm) and the mCherry-expressing areas were further cut out of each slice under a fluorescence microscope and kept in HBSS (Gibco #14170138). The obtained GG-tissue was further digested using the 'Neural Tissue Dissociation Kit' (Miltenyi #130-092-628). In brief, after digestion with enzymes 'P' and 'A', the obtained suspension was filtered through a strainer (70 µm) following a 10 min incubation with red blood cell removal solution (from Miltenyi #130-107-677). After washing and pelleting in PBS (Gibco #14190094; 300 x g, 5 min, 4 °C) cells were resuspended in 1 ml of media (Neurobasal (ThermoFisher #21103049), +0.5× N-2 (ThermoFisher #17502048), +1× B-27 (ThermoFisher #17504001), +0.5 mM GlutaMAX™ (ThermoFisher #35050061); further referred as NB⁺⁺⁺). Finally, GG cells were seeded in 6-well plates at a density of 15 × 10⁴ cells per well in 1.5 ml of NB⁺⁺⁺. As control, NB⁺⁺⁺ medium was seeded at the same conditions without cells to obtain naïve media. Plates were kept in an incubator at 37 °C and 5% CO₂. At day in-vitro 1 (DIV1), 0.5 ml NB⁺⁺⁺ medium was added to each well so that the total volume per well was 2 ml. At DIV5, the media were collected, filtered by centrifugation (5000 g, 5 min, 4 °C) and stored at -80 °C until further usage. For mass-spectrometry analysis of the GG-conditioned media cells were seeded in Neurobasal enriched with 0.5× N-2, 0.5 mM GlutaMAX™, 5 ng/ml bFGF (Stemcell Technologies #78003), 10 ng/ml EGF (Stemcell Technologies #78006) and 2 µg/ml Heparin (Stemcell Technologies #07980).

2.6. Neuronal cultures

Pregnant C57BL/6 mother mice were deeply anesthetized at embryonic day 16 and sacrificed by decapitation. Abdominal skin and uterus were opened, embryos removed and kept on ice in PBS. After decapitation, the brain was divided in sagittal fashion and cerebellum and meninges were removed. The cortex was extracted and kept in HBSS. After 3× washing with fresh HBSS, tissue was digested with Trypsin (Gibco #15090046, 1:10 in HBSS) for 20 min. Cells were dissociated with DNase I (Roche #11284932001) and BME (Gibco #41010109, enriched with FBS, Gibco #10270106) after 3× washing in HBSS. Counting was performed in a Neubauer's chamber. Cell culture plates with and without coverslips were coated for 1 h at room temperature with Poly-D-Lysine (Sigma-Aldrich #11284932001) and subsequently 2× washed with autoclaved water. For the generation of neuronal CM, the cells were seeded in NB⁺⁺⁺ medium at a density of 80 × 10⁴ cells in 24-well plates without coverslips. Collecting, filtering and storage at DIV5 respectively DIV14 were performed as described above for GG CM. For multielectrode array (MEA) experiments, the neurons

were seeded in naïve NB⁺⁺⁺ as well as GG DIV5 CM and neurons DIV5/ DIV14 CM at a density of 10×10^4 cells per well in 24-well Cytoview-MEA-plates (Axion #M384-tMEA-24 W). For immunocytochemistry analyses, the cells were seeded in the corresponding media at a density of 40×10^4 cells per well in 24-well plates with coverslips. For astrocyte inhibition, cytarabine (AraC) was added at a concentration of 0.02 μ M respectively 0.04 μ M (Sigma-Aldrich, #C1768). AraC-stock was prepared in ddH₂O. All cultures were kept in an incubator (37 °C, 5% CO₂).

2.7. MEA recordings

From DIV6 of the neuronal culture on, electrical activity of the cultures was recorded using the Maestro Edge apparatus of Axion Biosystems. During recordings, the plates were kept at 37 °C and 5% CO₂. Recordings were controlled via Axis Navigator software (version 2.0.4.21) and were all performed for 10 min. The obtained raw recording data were further analyzed by the same software to generate numeric results. The settings of the analysis were the following: Spike detection: 6 x SD from voltage baseline. Minimal burst criterion: minimum 5 spikes, maximum inter-spike interval 100 ms. If the mean firing rate was 0, burst percentage and SI were put to 0 as well. For further analysis, the weighted mean firing rate was calculated (mean firing rate per well, corrected for the number of active electrodes detecting electrical activity). Spike traces were generated by using the Axion Neural Metric Tool (version 3.2.5) and voltage traces by using the Axion Data Export Tool (version 3.4.5).

2.8. Mass spectrometry (MS)

Naïve and GG CM were collected at DIV5, filtered and stored at –80 °C. All replicates were further processed together. After thawing on ice, 2 ml were loaded onto an Amicon column (10 kDa cut-off, Millipore #801024) and 3 times centrifuged (2200 g, 4 °C, 20 min), each time resuspended in 500 μ l PBS. For SDS-PAGE, Laemmli buffer was added and samples were boiled at 95 °C for 5 min. SDS-PAGE was performed with 10% gel and 70 V. For MS, protease inhibitor was added (1:200, Millipore #539132). See Supplementary Methods for a detailed description of the MS and further analysis. In brief, naïve and CM underwent precipitation in ice-cold acetone for 2 h, followed by centrifugation at 10,000 g (15 min, 4 °C). The precipitates were further processed using the iST-NHS 96× sample preparation kit (Preomics GmbH #P.O.00030) following the manufacturer's protocol. Afterwards, samples were labelled with 0.4 mg of TMT10plex isobaric Mass Tag Labeling reagents (ThermoFisher #90110). Then the sample solutions were pooled, desalted using an Oasis HLB column (Waters, #WAT094225), dried and finally resuspended in 0.1% formic acid to 1 g/l. For analysis, 1 μ l of the solution was separated on a Dionex Ultimate 3000 RSLC nanoHPLC system (Dionex GmbH). The nanoHPLC was coupled online to an Orbitrap Fusion Lumos mass spectrometer (Thermo Fisher). Peptide ions between 330 and 1600 m/z were scanned every 3.5 s (resolution 60,000). For MS3-based identification, peptides were further subjected to collision induced dissociation (CID, 0.7 Da isolation, normalized energy 30%) and the fragments were analyzed in a linear ion trap. Top 10 fragment ions were chosen for synchronous precursor selection and fragmented with higher energy CID (HICD, 2 Da MS2 isolation, 60% collision energy) for detection of reporter ions in the Orbitrap analyzer (100–500 m/z , resolution 15,000). Data processing and database search were further performed with Proteome Discoverer software 2.5.0.400 (Thermo Fisher). An in-house Mascot server (version 2.8.2, Matrix Science Ltd) was used for peptide identification. The data were searched against the Swissprot mouse database (version 2022/05) and two contamination databases (Contaminants Hao Lab and cRFP, (Frankenfield et al., 2022; Shin et al., 2019)). Proteins identified by MS were submitted to Gene Ontology analysis by using PANTHER Enrichment Analysis tool (Thomas et al., 2022).

2.9. Immunocytochemistry

At DIV4 respectively DIV8 the cells were incubated for 10 min with PFA (4%, in PBS, Sigma-Aldrich #252549) at room temperature followed by three washouts with PBS. For immunofluorescence staining, the cells were initially incubated with Triton X-100 (0.3%, in PBS, Sigma-Aldrich #T9284) for 15 min followed by 1 h incubation with blocking solution (1% bovine serum albumin, 10% normal goat serum, 0.1% Triton, in PBS). Primary antibodies were applied in a blocking solution overnight at 4 °C (Table S1). On the next day, the plates were washed 3 times with PBS and secondary antibodies (fluorescence-labelled, Table S1) as well as DAPI (1:100000, Sigma-Aldrich #D9542) were applied in blocking solution for 2 h at room temperature and protected from light. After 3 times washing in PBS, the coverslips were mounted on slides using Mowiol. Images were captured using a Nikon Eclipse Ti Confocal Microscope. For the quantification of the stained area, a threshold was applied to the corresponding channel to create a binary image. The resulting data were extracted as area fraction (ranging from 0 to 100). For each coverslip, 5 pictures were taken and analyzed.

2.10. Statistics

All statistical analyses were performed by using Graph Prism software. All data are presented as means $\pm$ SEM. Only significant differences are displayed in the graphs ($p < 0.05$). For two-way-ANOVAs with more than two inter-group-comparisons per time point, only the weakest significance level is indicated.

3. Results

3.1. GG-secreted factors accelerate neuronal network synchronization

To assess whether there are GG-secreted factors influencing neuronal development in-vitro we targeted neural precursor cells of *Trp53^{loxP/loxP}* mice with the oncogenes *BRAF^{V600E}*, *Akt^A* and *Cre* by intraventricular IUE at embryonic day 14 as previously described (Fig. S1A, Cases-Cunillera et al., 2022). The induced tumors resembled features of high-grade GG tumors with dysmorphic cells (Fig. S1B) showing positivity for the neuronal marker microtubule-associated protein 2 (MAP2) and being surrounded by a matrix with positive expression of the astrocytic protein glial-acidic fibrillary protein (GFAP) (Fig. S1C, D). The brain tumors were isolated, further dissociated and the resulting tumor cells were cultured in-vitro. Immunocytochemistry analysis against MAP2 and GFAP showed that the resulting cultures were composed by a mixture of MAP2- and GFAP-positive cells (Fig. 1A) recapitulating the glioneuronal phenotype. Assessment of co-labelling of GFAP and the co-electroporated transgenic marker mCherry revealed the presence of both IUE-positive (neoplastic) and IUE-negative astrocytes in the GG cultures. However, the neoplastic GFAP-positive cells turned out to be far more abundant (Fig. 1B).

The GG CM was generated by harvesting the medium from GG cell cultures after 5 days in vitro. Naïve medium (without exposure to cultured cells) and CMs from neurons being cultured for 5 and 14 days (further referred to as neurons DIV5 and neurons DIV14 CMs) served as controls. Primary neuronal wildtype cultures were exposed to naïve and CMs seeded on the top of a 16-electrode grid in a MEA plate from DIV0 on and subsequent electrical recordings for 10 min from the neurons were performed every 2 days from DIV6 to DIV20 (Fig. 2A). Qualitatively, the visualization of the spike pattern at early time points (DIV8) clearly revealed highly regular and synchronous firing dynamics and bursting activity uniquely for the neurons incubated with GG CM (Fig. 2B). The spikes showed the typical biphasic shape of extracellularly recorded action potentials (Fig. S2). Quantitatively, the weighted mean firing rate (wMFR) was first measured to assess the spontaneous neuronal activity. The wMFR gradually started to increase from DIV10

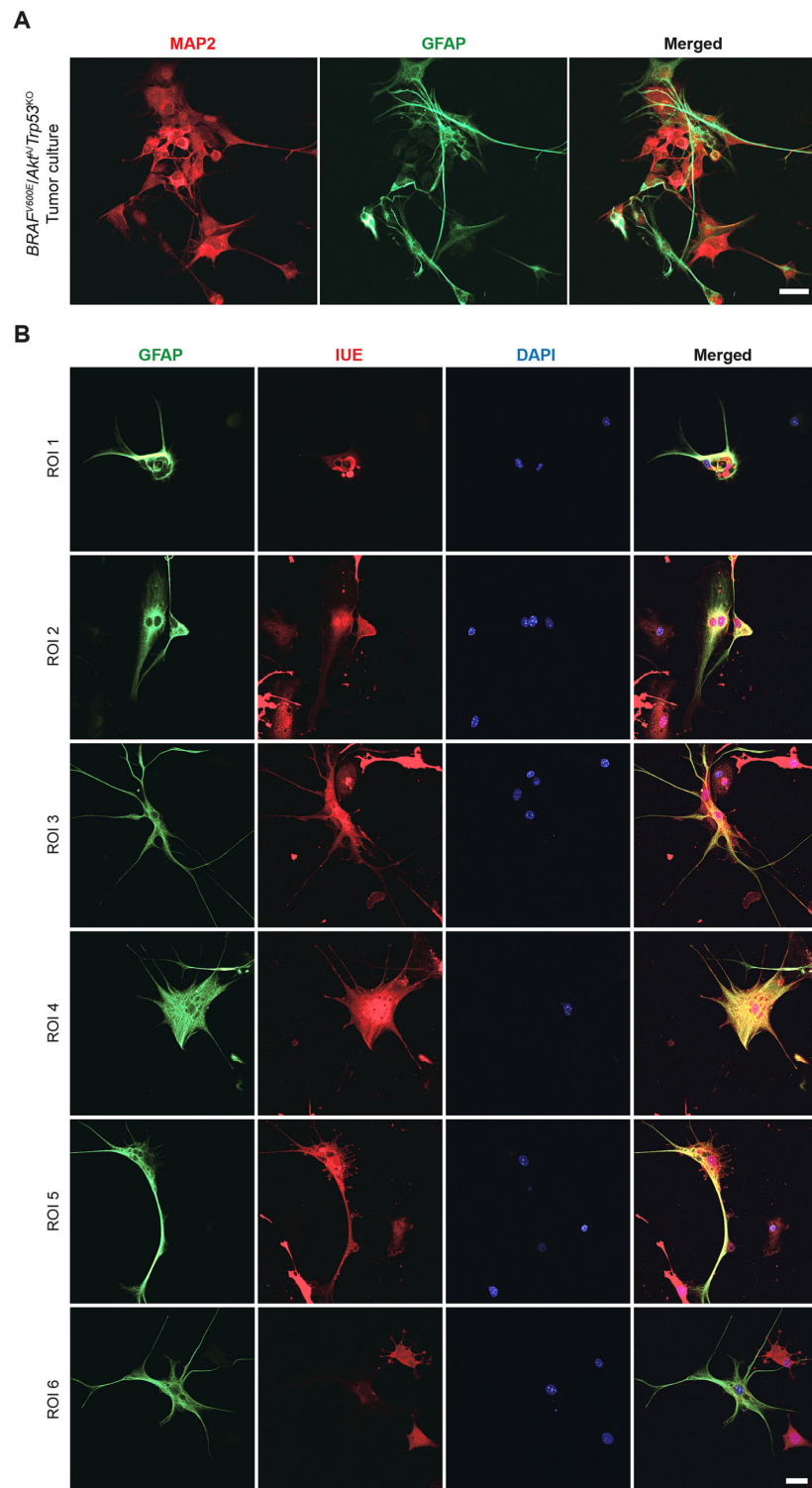


Fig. 1. GG-derived cell cultures retain the glioneuronal phenotype. (A) Representative image of a GG cell culture. Note the presence of neuronal (MAP2) and astrocytic cells (GFAP) in the culture resembling the situation in-vivo. Scale bar, 25 μ m (B) Regions of interests (ROIs) of GG cultures to differentiate between non-neoplastic (IUE negative) and neoplastic astrocytes (IUE positive). Note the predominance of the neoplastic astrocytic component. Scale bar, 25 μ m.

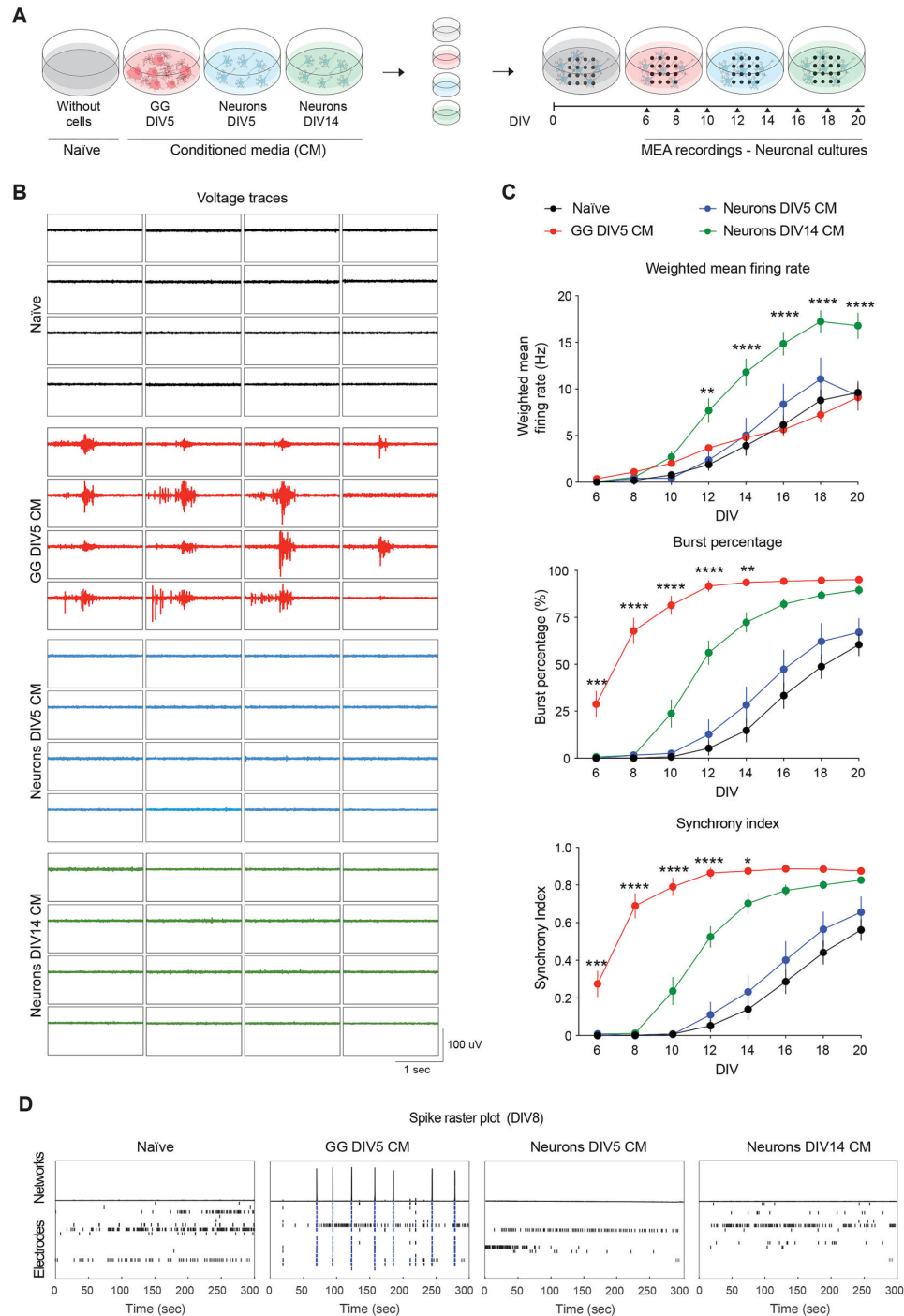


Fig. 2. Neurons develop unique firing properties after exposure to GG-CM. (A) Schematic illustration of the procedure. Neurons were plated in naïve medium or CMs derived from DIV5 GG cells, DIV5 neurons and DIV14 neurons in a 24-well MEA plate containing a 16-electrode grid. MEA recordings were performed every other day from DIV6 to DIV20. (B) Raw voltage traces of the different conditions at DIV8. Note the presence of bursts only in the neurons incubated with GG DIV5 CM. (C) Timelines from DIV6 until DIV20 of weighted mean firing rate (wMFR), burst percentage and synchrony index (SI). Minimum spike criterion: 6 SDs from voltage-baseline. Minimum burst criterion: 5 spikes, maximum inter-spike-interval 100 ms. The duration of each recording was 10 min. Ordinary two-way ANOVA followed by Tukey's multiple comparison test. $N = 12-23$, $n = 2-6$, $^*p < 0.05$, $^{**}p < 0.01$, $^{***}p < 0.001$, $^{****}p < 0.0001$. Only significant differences are marked ($p < 0.05$). Data are displayed as mean $\pm$ standard error of the mean (SEM). See Table S2 for all inter-group comparisons. (D) Representative spike raster plots of 300 s for each condition at DIV8. Note the presence of network bursts (in blue color) only in the neurons plated in GG CM. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

on and reached plateau levels around DIV16 in all conditions. Neurons seeded with the CM of DIV14 neurons reached the highest levels of activity (Fig. 2C, upper panel). We then assessed the percentage of bursts and synchrony index (SI) to obtain information on local and well-wide neuronal network activity, respectively. Neurons incubated with GG CM showed a higher percentage of bursts and a higher SI compared to all the other conditions (from DIV6 to DIV14; Fig. 2C, middle and lower panels, and Table S2). From DIV16 on, the percentage of bursts and the

SI of neuronal cultures exposed to GG CM and neurons DIV14 CM were not significantly different. Therefore, the most striking effect of GG CM was seen at earlier stages to strongly accelerate the development of network activity. Whereas for all other conditions the temporal development of network activity, bursting activity and SI followed the increase in wMFR, GG CM cultured neurons started to robustly express bursting and elevated synchrony already at DIV6. Concomitantly, at DIV8, network bursts were uniquely recorded from neurons incubated

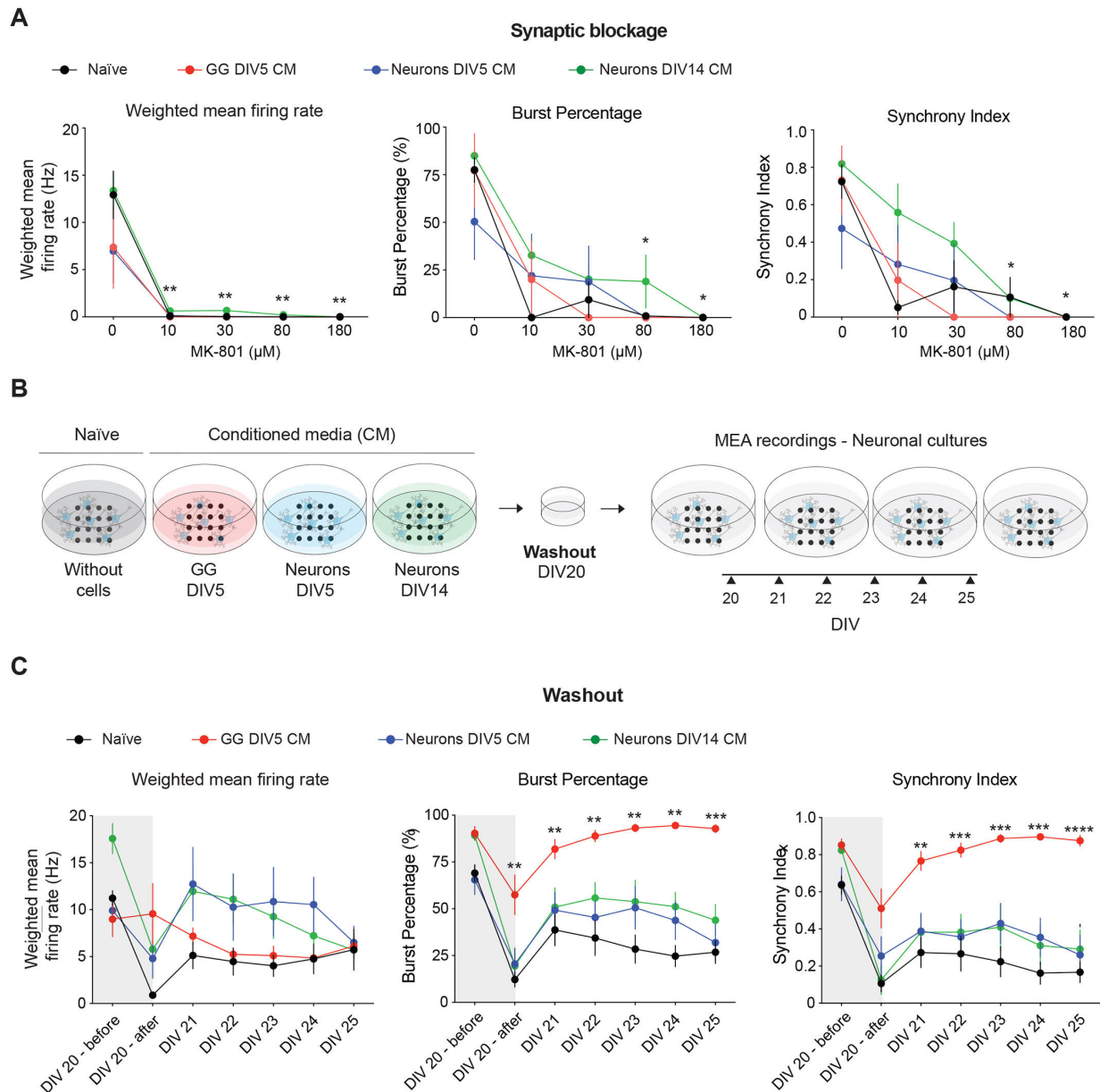


Fig. 3. Increased burst propensity and synchronous firing of neurons persist after withdrawal of GG-CM. (A) Inhibition of NMDA-receptor signaling with MK-801. The drug was added in sequentially increasing dosages until all conditions were silenced. Ordinary two-way ANOVA followed by Dunnett's multiple comparison test. $N = 4-5$, $n = 1-2$, $*p < 0.05$, $**p < 0.01$. Only significant differences are marked. See Table S3 for all comparisons. (B) Schematic representation of the washout experiment. Neurons were plated in naïve medium or the distinct CMs in a 24-well MEA plate at DIV0. At DIV20 the media were washed out with fresh naïve medium (pre-warmed and CO_2 -adjusted). Further recordings were performed every day until DIV25. (C) Timeline of wMFR, burst percentage and SI. Note the preserved synchronization only in the neurons previously plated with the GG DIV5 CM. Ordinary two-way ANOVA followed by Tukey's multiple comparison test. $N = 11$, $n = 1-6$, $*p < 0.05$, $**p < 0.01$, $***p < 0.001$, $****p < 0.0001$. Only significant differences are marked. Data are displayed as mean $\pm$ SEM. See Table S4 for all inter-group comparisons.

with GG CM (Fig. 2D). Furthermore, they reached plateau values around DIV10, a time at which the other conditions only started to show increasing levels of synchrony (Fig. 2C, middle and lower panels).

Taken together, these results show that GG-released factors can strongly accelerate neuronal network formation at the early stages of neuronal development in-vitro.

3.2. GG-released factors foster a highly stable synchronous neuronal network

Our results so far show that GG-secreted factors lead to higher synchronicity in the early stages of neuronal culture maturation which could possibly be driven by gap junctional coupling of neurons. Thus, we aimed to compare the mechanisms of neuronal connectivity across culture conditions. For this purpose, we suppressed synaptic activity with increasing concentrations of MK-801 to block *N*-methyl-D-aspartate (NMDA) receptors which are known drivers of bursting activity and synaptic plasticity (Paoletti et al., 2013; Zakharov et al., 2016). If GG-secreted factors stimulated gap-junctional networking we would expect a reduced effect of MK-801 to suppress bursting and network activity. However, MK-801 similarly suppressed synchronized activity across all conditions suggesting involvement of chemical synapses (Fig. 3A). Note, this experiment does not rule out the involvement of other neurotransmitter systems which may co-support the action of NMDA receptors.

Subsequently, we assessed whether the GG-derived effects on neuronal activity were reversible. For this purpose, we seeded primary neuronal cultures exposed to naïve respectively the different CMs on the top of a 16-electrode grid in a MEA plate. At DIV20 we then carefully performed a full medium change (washout with fresh, non-conditioned, pre-warmed and CO₂-adjusted medium), when the neurons are considered fully mature. Electrical activity of the neurons was recorded immediately before and after the washout with the MEA system. From then on, neuronal activity was recorded every 24 h until DIV25 (Fig. 3B). We first again assessed the levels of spontaneous activity by monitoring the wMFR. Our results showed that the levels of wMFR remained unchanged across conditions, validating that the washout did not significantly impact the total levels of spontaneous neuronal activity (Fig. 3C, left graph). We next assessed the burst percentage across conditions and we observed that only the neurons previously plated with GG CM (until DIV20) preserved the burst percentage at the same level as before the washout (Fig. 3C, middle graph). This result held also true for the SI, which remained unchanged only for the neurons previously incubated with GG CM (Fig. 3C, right graph). Indeed, both burst percentage and SI from neurons previously grown in GG CM were significantly higher in comparison to all the other conditions. In the case of neurons previously treated with naïve medium and neuron CMs, we observed a decrease in burst percentage and SI after the washout, which can be explained by the fact that the neurons were deprived of their own released factors.

Altogether, these results demonstrate that GG CM has the unique potency to induce a self-sustained, stable network composed of synaptically connected neurons with high levels of synchronous activity.

3.3. Mass spectrometry of GG CM identifies a complex admixture of neurotrophic factors

The aforementioned results show that the GG cells are able to secrete proteins or metabolites that mediate distinct effects on the neuronal network-formation in-vitro. Therefore, we next aimed to identify the factors mediating these effects. DNA and RNA particles as driving factors were excluded by pre-incubation of the media with either DNase I or RNase A prior to application to neuronal cultures in the MEA system (Fig. S3). We also excluded the metabolite glutamate as the driving factor since its concentration was indistinguishable in GG and neurons DIV14 CM (Fig. S4).

Thus, we next aimed to determine whether the naïve and the GG CM

showed differences in protein concentration. Coomassie blue G-250 staining of SDS-PAGE gels detected several protein bands in the GG CM, that were not visible in the naïve condition (data not shown). We next performed mass spectrometry analysis of the proteins from the GG CM and naïve medium to examine the most abundant GG-released proteins qualitatively and quantitatively. Mass spectrometry analysis found 137 proteins in the GG CM. Among them, the change in the level of 102 proteins reached significance between the GG CM compared to the naïve medium (Table S5). Several histones were also detected by mass spectrometry but the subsequent analysis could not precisely distinguish between them, and thus, they were not considered for the downstream assessment. Overall, a total number of 77 proteins of interest was found significantly enriched in the GG CM compared to the naïve medium (Fig. S5A). In order to assess the biological functions of the proteins found in the GG CM, we performed gene ontology (GO) enrichment analysis (see Table S6 for the complete list of enriched GO terms). Following our previous results, we aimed to reveal the protein candidates influencing neuronal maturation and activity. Among the significantly enriched biological processes, we found 7 GO terms associated with neuronal function (Fig. 4A). The proteins from the GG CM corresponding to these pathways are displayed in Fig. 4B and Table S7. Of note, the cellular components of the proteins identified by GO enrichment analysis included, among others, the term *glutamatergic synapse* (Fig. S5B), which comprises the proteins Pfn1, Ywhae, Ywhah, Ywhaz, Sparcl1, Actc1, Cdh2 and Apoe (Table S7).

Interestingly, the GO terms *gliogenesis* and *glial cell projection* were also found to be significantly enriched in the GG CM (Fig. 4A and Fig. S5B). The corresponding proteins in these terms were Gfap, Gap43, App, Sod1, Cdh2, Dbi, S100a8 and Hexb. As expected, GO cellular components annotation of the proteins also included *extracellular space*, *cell membrane*, *lysosome*, *endoplasmic reticulum* and *vesicle*, validating the secretory profile of the detected proteins (Fig. S5B).

3.4. GG-released factors induce astrocytic proliferation in neuronal cultures

Considering the unique electrophysiological properties of the neurons incubated with the GG CM (Figs. 2 and 3) and the functional implications of the GG-released proteins in biological processes including *neurogenesis*, *gliogenesis* and *glial cell projection* (Fig. 4A and Fig. S5B), we next aimed to analyze the impact of the released GG factors on neuronal and non-neuronal cell emergences recapitulating features of the TME. For this purpose, we assessed the cellular composition of the neuronal cultures plated with naïve and the different CMs using immunocytochemical analyses with antibodies against the neuronal protein MAP2 as well as the glial marker GFAP to label astrocytes. The immunocytochemistry showed no striking morphological differences in MAP2-positive cells, which were present in all conditions (Fig. 4C). However, GFAP-positive cells were vastly detected in the neuronal cultures incubated with the GG CM while they were mostly absent in the neuronal cultures incubated with naïve and neuron CMs (Fig. 4C).

We further characterized the MAP2 and GFAP immunolabelling quantitatively by measuring the percentage of the stained area. While the fraction of the stained area from MAP2-labelled cells did not change across conditions, the fraction of the area stained by GFAP was significantly higher in the neurons seeded with GG CM in comparison to neurons seeded with naïve and neuron CMs (Fig. 4D, circa 25-fold increase). In the presence of the naïve medium, very few GFAP-expressing cells were also found in the neuronal cultures, which may be reasoned by the fact that complete neuronal isolation is technically not achieved in culture preparation. Therefore, the abundance of GFAP-positive cells in cultures exposed to GG CM most probably is the result of a proliferation stimulus to the few astrocytes that unavoidably occur in primary neuronal cultures rather than the consequence of trans-differentiation from neurons. A parallel effect was not observed for microglia since Iba1-positive cells were absent from the neuronal cultures in all

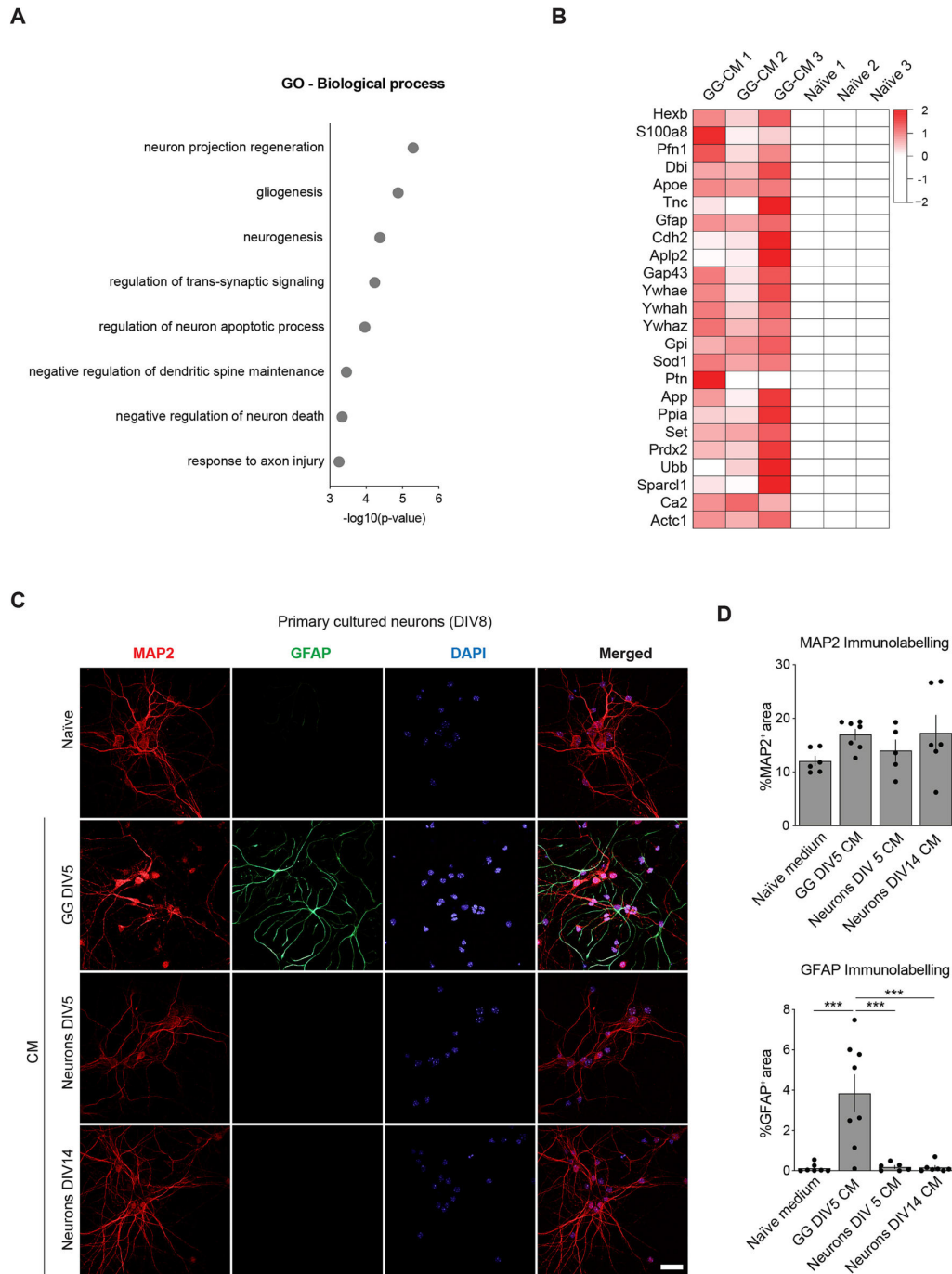


Fig. 4. Glioneurogenic proteome signatures of GG-CM translate into cellular composition and architecture of cultures. (A) Gene ontology (GO) analysis of proteins enriched in the GG CM. Only the GO terms related to neuroepithelial cell types are displayed. (B) Heat-map of the relative abundance levels of proteins that were detected significantly enriched in the GO terms shown in panel A. Each column represents a different biological replicate. Each row represents one protein. Color represents the z-score-scaled abundance (from dark red, high abundance, to light red, lower abundance). (C) Immunocytochemical analyses at DIV8 with antibodies against MAP2 (somato-dendritic marker) and GFAP (astrocytic marker) of the neuronal cultures incubated with the different media. Note the robust occurrence of astrocytes only in the cultures incubated with GG CM. Scale bar, 25 μ m. $N = 7$. (D) Quantification of the MAP2-positive area fraction in the different conditions (upper graph). Quantification of the GFAP-positive area fraction in the different conditions (lower graph). Ordinary one-way ANOVA followed by Tukey's multiple comparison test. $N = 5-8$, *** $p < 0.001$, only significant differences between conditions are indicated. Data are displayed as mean $\pm$ SEM. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

conditions (Fig. S6).

Collectively, these results strongly suggest that the identified paracrine factors released by the GG cells can induce astrocytic cell proliferation in-vitro. These results underline their ability to influence not only neuronal function (Figs. 2 and 3) but also growth kinetics of non-neoplastic glial cells.

3.5. Inhibition of astrocytes with cytarabine leads to a delay of the GG-derived neuronal synchronization

Based on the above-mentioned results, we aimed to further assess whether the increase in the number of astrocytes contributed to the changes in neuronal network synchronization. For this purpose, we treated the neuronal cultures with cytarabine (AraC), which is a mitotic inhibitor widely used to halt glial proliferation (Schwieger et al., 2016). To find the most suitable concentration without neurotoxic effects, we applied two different concentrations of AraC (0.02 μ M or 0.04 μ M). Co-immunocytochemistry against MAP2 and GFAP and corresponding quantification of the stained area proved that the treatment with 0.04 μ M AraC reduced the number of GFAP-labelled cells (astrocytes) but did not affect the number of MAP2-positive cells in neuronal cultures exposed to GG CM (Fig. 5A, Fig. S7).

We next monitored the impact of astrocytic depletion on the electrophysiological properties of the neuronal cultures in-vitro. Since we detected a reduction in the levels of all parameters (wMFR, percentage of bursts and SI) in the cultures exposed to naïve medium (Fig. 5B, upper panel), AraC may exert toxic effects on developing post-mitotic neurons as it has already been described in the past (Wallace and Johnson, 1989; Zhuo et al., 2018). A similar effect was observed for neurons incubated with neurons DIV5 CM (Fig. S8, upper graphs) whereas the development of neurons plated with neurons DIV14 CM was not affected (Fig. S8, lower graphs). On the other side, the treatment of neuronal cultures growing in GG CM with AraC did not show changes in the overall wMFR (Fig. 5B, lower panel, left graph). Moreover, the treatment with 0.04 μ M AraC did delay the increase of burst percentage and SI at early stages of neuronal network maturation (DIV8, 10 and 12). The effect was restricted to these early time points since at later stages the cultures still reached the same levels as the vehicle-treated ones (Fig. 5B, lower panel, middle and right graph).

4. Discussion

The mechanisms underlying neuronal hyperexcitability in the context of GGs have not been fully elucidated. Our study aimed to assess the influence of GG-secreted factors on neuronal development in-vitro. The primary GG cell cultures generated on the basis of our murine GG model (*BRAF^{V600E}*, mTOR activation and *Trp53^{KO}*, Cases-Cunillera et al., 2022) recapitulate the glioneuronal tumor architecture. Since the vast majority of cells in the cultures turned out to express the oncogenes, we here mainly assessed the effect of factors secreted by the neoplastic component of GGs.

As main findings, the released factors from GG cells alone are sufficient to alter electrophysiological activity and trigger astrocytic proliferation since the GG cells and the neurons were not in direct contact. The observed electrophysiological effects occur at the early stages of neuronal development and lead to an early synchronized network. Previous studies have elaborated that the raw firing rate, bursting parameters and synchronicity parameters (e.g., burst percentage respectively SI) all increase in cortical neuronal cultures in-vitro over time concomitantly (Cotterill et al., 2016). This holds true in the present study for all conditions. However, the GG CM accelerates the development of bursting and synchronicity whereas the raw activity is not increased significantly in comparison to the other conditions. Therefore, these data suggest an accelerated and disturbed functional maturation process of neurons uniquely mediated by the GG CM, which may thereby cause unique functional features of resulting neurons and networks

predisposing to seizure emergence. Additionally, the effects appear to be irreversible since deprivation of GG-secreted factors does not impact the high levels of synchronicity suggesting the induction of neuronal plasticity.

The astrocytic proliferation in-vitro recalls the strong astrocytic component in human GGs (Cases-Cunillera et al., 2022). We rule out that the increase in the number of astrocytes may be triggered by neuronal synchronization since we observed this effect before the neurons show any electrical activity (Fig. S9). Astroglia is known to be able to influence network maturation and synchronicity (Purushotham and Buskila, 2023). However, our further results show that elimination of astrocytes only partially delays neuronal synchronization at early time points and does not prevent the electrophysiological effects triggered by GG CM. Hence, we conclude that the main effect of the GG CM is an intrinsic neuronal effect whereas astrocytic proliferation is rather an epiphenomenon in this context.

We further elaborated that the neuronal network induced by the GG-secreted factors is composed of chemical glutamatergic synapses being susceptible to MK-801-blockage. Therefore, electrical synapses (gap junctions) cannot be the driving factor here for network synchronization. However, for purely glial brain tumors they have been discussed to be important for epileptic seizure activity as well as invasion of peritumoral neuronal networks (Dong et al., 2017; Pallud et al., 2013).

Mass spectrometry of GG CM and subsequent functional analysis revealed enrichment of several proteins associated with neuronal maturation and glial proliferation concordant with the results showing increased neuronal synchronization and high abundance of de-novo astrocytes. Proteins of interest in the context of neurogenesis may be Ptn, Tnc, Apoe, the 14–3–3 protein family (Ywhae, Ywhah, Ywhaz), the APP family (App, Aplp2) and S100a8. Pleiotrophin (Ptn) is known to promote neurite outgrowth as feature of neuronal development via activation of MAPK and mTOR pathway (González-Castillo et al., 2015; Nakanishi et al., 2010). Moreover, Tenascin C (Tnc) as a component of extracellular matrix has already been linked to axonal growth and especially synaptic plasticity and long term potentiation via calcium-signaling (Dzyubenko et al., 2016; Ferrer-Ferrer and Dityatev, 2018; Strekalova et al., 2002) recapitulating the observed effect of the GG CM in the washout experiment. Potential downstream pathways may include here, among others, calcium-calmodulin-dependent protein kinase II (CaMKII) and protein kinase C (PKC) signaling (Bazzari and Parri, 2019; Rossetti et al., 2017; Sossin, 2007). Concerning the 14–3–3 protein family, a critical role in neurodevelopment as well as synaptic plasticity has already been discussed (Kaplan et al., 2017). For the APP-family, activity of soluble APP fragments at the neurotrophin receptor p75 has already been shown resulting in promoted neuronal development (Hasebe et al., 2013). Additionally, the involvement of Apolipoprotein E (ApoE) in these processes is known (Tensaouti et al., 2020) acting as a ligand at several receptors (Herz, 2009). Finally, a neurite-growth promoting effect has already been shown for the member of S100 protein family S100a8 (Sun et al., 2018). Taken together, these results prompt the perception that GG-cells in-vitro secrete a highly complex admixture of neurotrophic factors severely impairing the regular development of neuronal network function in the TME in an irreversible fashion. This may contribute to the increased seizure propensity of these neoplasms. Considering the large number of GG-released neuro-/glia-trophic factors with putative synergistic effects, the detailed characterization of individual or sets of such factors with respect to specific TME network effects will be a future challenge. Here, however, the effort would be beyond the scope and aims of the study. Concerning transfer to human (anaplastic) GGs, the robust abundance of Gfap as well as S100 proteins in the GG-CM recapitulates the strong astrocytic component of these tumors in vivo (Slegers and Blumcke, 2020). Regarding the neuronal component, GGs have been shown to be neurodevelopmental lesions with accelerated aging of neuronal cells (Sarnat and Flores-Sarnat, 2015). In this field, we have detected App to be enriched in the GG-CM which has already been shown to be expressed in human GGs. The

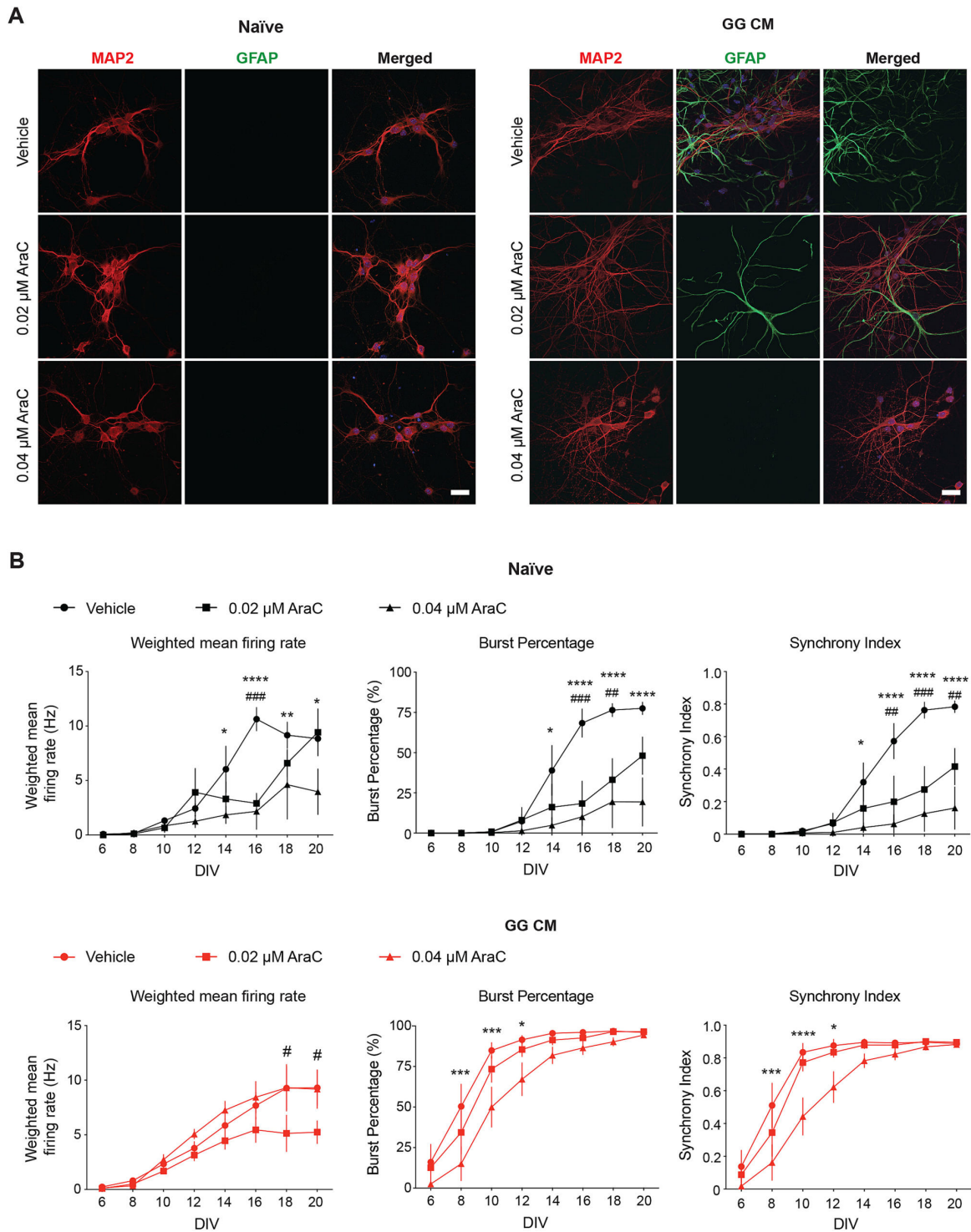


Fig. 5. Astrocytic inhibition by AraC treatment slows down network formation only at early stages of neuronal development. (A) Representative images from neuronal cultures (incubated with naïve or GG CM) immunostained with MAP2 and GFAP antibodies after treatment with vehicle or AraC (0.02 μ M respectively 0.04 μ M). See Fig. S7 for quantification of GFAP-positive area in the cultures incubated with GG CM. (B) Timeline of wMFR, burst percentage and SI of neuronal cultures in MEA system incubated with naïve (upper graphs) and GG CM (lower graphs) following vehicle and AraC treatment. Ordinary two-way ANOVA followed by Dunnett's multiple comparison test. $N = 5-7$, $n = 2$, $*/\# p < 0.05$, $*/\#\# p < 0.01$, $***/\#\#\# p < 0.001$, $****/\#\#\#\# p < 0.0001$, only significant differences between conditions are indicated. # Vehicle vs. AraC 0.02 μ M, * Vehicle vs. AraC 0.04 μ M. Data are displayed as mean $\pm$ SEM.

immunoreactivity levels were indeed positively correlated with the duration of epileptic seizure activity (Prabowo et al., 2015). Therefore, evaluation of especially these three factors (Gfap, S100 proteins and App) as biomarkers in cerebrospinal fluid may be a future challenge in this field of research.

5. Conclusions

In conclusion, we here examined the influence of GG-secreted factors on non-neoplastic cells in-vitro. Our data show that these factors exert an intrinsic neurotrophic effect resulting in a massively accelerated and disturbed network maturation process. Concomitantly, astrocytic proliferation is triggered. This study provides a notorious basis for finding new targetable molecules to interfere with the seizure activity associated with GGs.

Funding

Our work was financially supported by the Mildred Scheel School of Oncology (MSSO, Deutsche Krebshilfe, scholarship in aid to PM) and by the Deutsche Forschungsgemeinschaft (SFB 1089 to AJB and SS).

CRediT authorship contribution statement

Philipp Müller: Conceptualization, Data curation, Formal analysis, Investigation, Methodology, Project administration, Supervision, Validation, Visualization, Writing – original draft, Writing – review & editing. **Dirk Dietrich:** Conceptualization, Writing – review & editing. **Susanne Schoch:** Conceptualization, Funding acquisition. **Julika Pitsch:** Conceptualization, Project administration. **Albert J. Becker:** Conceptualization, Funding acquisition, Project administration, Supervision, Writing – original draft, Writing – review & editing. **Silvia Cases-Cunillera:** Conceptualization, Investigation, Methodology, Project administration, Supervision, Validation, Visualization, Writing – original draft, Writing – review & editing.

Declaration of Competing Interest

None of the authors has a conflict of interest.

Data availability

Data will be made available on request.

Acknowledgments

We thank Sabine Opitz, Pia Trebing and Shayne Gilgenbach for excellent technical assistance. We also thank Prof. Gilles Huberfeld for his valuable feedback. Protein identification was performed at the Core Facility Analytical Proteomics, Institute of Biochemistry and Molecular Biology, Medical Faculty, University of Bonn, funded by the Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG, German Research Foundation) – Projektnummer 386936527. The present work fulfills the first author obligations for PM's written thesis to obtain the MD degree according to the 'Doctoral Degree Regulations' at the University of Bonn, Medical Faculty.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2023.106364>.

References

- Bazzari, A.H., Parri, H.R., 2019. Neuromodulators and long-term synaptic plasticity in learning and memory: a steered-glutamatergic perspective. *Brain Sci.* 9 <https://doi.org/10.3390/BRAINSCI9110300>.
- Behnan, J., Finocchiaro, G., Hanna, G., 2019. The landscape of the mesenchymal signature in brain tumours. *Brain* 142, 847–866. <https://doi.org/10.1093/BRAIN/AWZ044>.
- Blumcke, I., Spreafico, R., Haaker, G., Coras, R., Kobow, K., Bien, C.G., Pfäfflin, M., Elger, C., Widman, G., Schramm, J., Becker, A., Braun, K.P., Leijten, F., Baayen, J.C., Aronica, E., Chassoux, F., Hamer, H., Stefan, H., Rössler, K., Thom, M., Walker, M.C., Sisodiya, S.M., Duncan, J.S., McEvoy, A.W., Pieper, T., Holthausen, H., Kudernatsch, M., Meencke, H.J., Kahane, P., Schulze-Bonhage, A., Zentner, J., Heiland, D.H., Urbach, H., Steinhoff, B.J., Bast, T., Tassi, L., Lo Russo, G., Özkara, C., Oz, B., Krsek, P., Vogelgesang, S., Runge, U., Lerche, H., Weber, Y., Honavar, M., Pimentel, J., Arzimanoglou, A., Ulate-Campos, A., Noachtar, S., Hartl, E., Schijns, O., Guerrini, R., Barba, C., Jacques, T.S., Cross, J.H., Feucht, M., Mühlebner, A., Grunwald, T., Trinka, E., Winkler, P.A., Gil-Nagel, A., Toledano Delgado, R., Mayer, T., Lutz, M., Zountsas, B., Garganis, K., Rosenow, F., Hermesen, A., von Oertzen, T.J., Diepgen, T.L., Avanzini, G., 2017. Histopathological findings in brain tissue obtained during epilepsy surgery. *N. Engl. J. Med.* 377, 1648–1656. <https://doi.org/10.1056/NEJM0A1703784>.
- Cases-Cunillera, S., van Loo, K.M.J., Pitsch, J., Quatraccioni, A., Sivalingam, S., Salomoni, P., Borger, V., Dietrich, D., Schoch, S., Becker, A.J., 2022. Heterogeneity and excitability of BRAFV600E-induced tumors is determined by Akt/mTOR-signaling state and Trp53-loss. *Neuro-Oncology* 24. <https://doi.org/10.1093/NEUONC/NOAB268>.
- Cotterill, E., Hall, D., Wallace, K., Mundy, W.R., Eglen, S.J., Shafer, T.J., 2016. Characterization of early cortical neural network development in multiwell microelectrode array plates. *J. Biomol. Screen.* 21, 510–519. <https://doi.org/10.1177/1087057116640520>.
- Dong, H., Zhou, X.W., Wang, X., Yang, Y., Luo, J.W., Liu, Y.H., Mao, Q., 2017. Complex role of connexin 43 in astrocytic tumors and possible promotion of glioma-associated epileptic discharge (review). *Mol. Med. Rep.* 16, 7890–7900. <https://doi.org/10.3892/MMR.2017.7618>.
- Dzyubenko, E., Gottschling, C., Faissner, A., 2016. Neuron-glia interactions in neural plasticity: contributions of neural extracellular matrix and perineuronal nets. *Neural Plast.* 2016 <https://doi.org/10.1155/2016/5214961>.
- Ferrer-Ferrer, M., Dityatev, A., 2018. Shaping synapses by the neural extracellular matrix. *Front. Neuroanat.* 12 <https://doi.org/10.3389/FNANA.2018.00040>.
- Frankenfeld, A.M., Ni, J., Ahmed, M., Hao, L., 2022. Protein contaminants matter: building universal protein contaminant libraries for DDA and DIA proteomics. *J. Proteome Res.* 21, 2104–2113. <https://doi.org/10.1021/ACS.JPROTEOME.2C00145>.
- González-Castillo, C., Ortuño-Sahagún, D., Guzmán-Brambila, C., Pallás, M., Rojas-Mayorquín, A.E., 2015. Pleiotrophin as a central nervous system neuromodulator, evidences from the hippocampus. *Front. Cell. Neurosci.* 8, 1–7. <https://doi.org/10.3389/FNCEL.2014.00443>.
- Hasebe, N., Fujita, Y., Ueno, M., Yoshimura, K., Fujino, Y., Yamashita, T., 2013. Soluble β -amyloid precursor protein alpha binds to p75 neurotrophin receptor to promote neurite outgrowth. *PLoS One* 8. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0082321>.
- Herz, J., 2009. Apolipoprotein E receptors in the nervous system. *Curr. Opin. Lipidol.* 20, 190–196. <https://doi.org/10.1097/MOL.0B013E32832D3A10>.
- Huberfeld, G., Vecht, C.J., 2016. Seizures and gliomas—towards a single therapeutic approach. *Nat. Rev. Neurol.* 12, 204–216. <https://doi.org/10.1038/NRNEUROL.2016.26>.
- Kaplan, A., Bueno, M., Fournier, A.E., 2017. Extracellular functions of 14-3-3 adaptor proteins. *Cell. Signal.* 31, 26–30. <https://doi.org/10.1016/J.CELLSIG.2016.12.007>.
- Krishna, S., Choudhury, A., Keough, M.B., Seo, K., Ni, L., Kakaizada, S., Lee, A., Aabedi, A., Popova, G., Lipkin, B., Cao, C., Nava Gonzales, C., Sudharshan, R., Egladyous, A., Almeida, N., Zhang, Y., Molinaro, A.M., Venkatesh, H.S., Daniel, A.G. S., Shamardani, K., Hyer, J., Chang, E.F., Findlay, A., Phillips, J.J., Nagarajan, S., Raleigh, D.R., Brang, D., Monje, M., Hervey-Jumper, S.L., 2023. Glioblastoma remodelling of human neural circuits decreases survival. *Nature* 7961 (617), 599–607. <https://doi.org/10.1038/s41586-023-06036-1>.
- Luyken, C., Blümcke, I., Fimmers, R., Urbach, H., Wiestler, O.D., Schramm, J., 2004. Supratentorial gangliogliomas: histopathologic grading and tumor recurrence in 184 patients with a median follow-up of 8 years. *Cancer* 101, 146–155. <https://doi.org/10.1002/cncr.20332>.
- Nakanishi, K., Tokita, Y., Aono, S., Ida, M., Matsui, F., Higashi, Y., Oohira, A., 2010. Neuroglycan C, a brain-specific chondroitin sulfate proteoglycan, interacts with pleiotrophin, a heparin-binding growth factor. *Neurochem. Res.* 35, 1131–1137. <https://doi.org/10.1007/S11064-010-0164-9>.
- Pallud, J., Capelle, L., Huberfeld, G., 2013. Tumoral epileptogenicity: how does it happen? *Epilepsia* 54 (Suppl. 9), 30–34. <https://doi.org/10.1111/EPL.12440>.
- Paoletti, P., Bellone, C., Zhou, Q., 2013. NMDA receptor subunit diversity: impact on receptor properties, synaptic plasticity and disease. *Nat. Rev. Neurosci.* 14, 383–400. <https://doi.org/10.1038/NRN3504>.
- Prabowo, A.S., Iyer, A.M., Veersema, T.J., Anink, J.J., Schouten-van Meeteren, A.Y.N., Spliet, W.G.M., van Rijen, P.C., Ferrier, C.H., Thom, M., Aronica, E., 2015. Expression of neurodegenerative disease-related proteins and caspase-3 in glioneuronal tumours. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 41, e1–e15. <https://doi.org/10.1111/NAN.12143>.
- Purushotham, S.S., Buskila, Y., 2023. Astrocytic modulation of neuronal signalling. *Front. Netw. Physiol.* 3 <https://doi.org/10.3389/FNETP.2023.1205544>.

- Rossetti, T., Banerjee, S., Kim, C., Leubner, M., Lamar, C., Gupta, P., Lee, B., Neve, R., Lisman, J., 2017. Memory erasure experiments indicate a critical role of CaMKII in memory storage. *Neuron* 96, 207–216.e2. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2017.09.010>.
- Sarnat, H.B., Flores-Sarnat, L., 2015. Infantile tauopathies: hemimegalencephaly; tuberous sclerosis complex; focal cortical dysplasia 2; ganglioglioma. *Brain and Development* 37, 553–562. <https://doi.org/10.1016/j.braindev.2014.08.010>.
- Schindler, G., Capper, D., Meyer, J., Janzarik, W., Omran, H., Herold-Mende, C., Schmieder, K., Wesseling, P., Mawrin, C., Hasselblatt, M., Louis, D.N., Korshunov, A., Pfister, S., Hartmann, C., Paulus, W., Reifenberger, G., Von Deimling, A., 2011. Analysis of BRAF V600E mutation in 1,320 nervous system tumors reveals high mutation frequencies in pleomorphic xanthoastrocytoma, ganglioglioma and extra-cerebellar pilocytic astrocytoma. *Acta Neuropathol.* 121, 397–405. <https://doi.org/10.1007/s00401-011-0802-6>.
- Schwieger, J., Esser, K.H., Lenarz, T., Scheper, V., 2016. Establishment of a long-term spiral ganglion neuron culture with reduced glial cell number: effects of AraC on cell composition and neurons. *J. Neurosci. Methods* 268, 106–116. <https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2016.05.001>.
- Shin, J., Kwon, Y., Lee, S., Na, S., Hong, E.Y., Ju, S., Jung, H.G., Kaushal, P., Shin, S., Back, J.H., Choi, S.Y., Kim, E.H., Lee, S.J., Park, Y.E., Ahn, H.S., Ahn, Y., Kabir, M.H., Park, S.J., Yang, W.S., Yeom, J., Bang, O.Y., Ha, C.W., Lee, J.W., Kang, U.B., Kim, H. J., Park, K.S., Lee, J. Eugene, Lee, Ji Eun, Kim, J.Y., Kim, K.P., Kim, Y., Hirano, H., Yi, E.C., Cho, J.Y., Paek, E., Lee, C., 2019. Common repository of FBS proteins (cRFP) to be added to a search database for mass spectrometric analysis of cell secretome. *J. Proteome Res.* 18, 3800–3806. <https://doi.org/10.1021/ACS.JPROTEOME.9B00475>.
- Slegers, R.J., Blumcke, I., 2020. Low-grade developmental and epilepsy associated brain tumors: a critical update 2020. *Acta Neuropathol. Commun.* 8 <https://doi.org/10.1186/s40478-020-00904-X>.
- Sossin, W.S., 2007. Isoform specificity of protein kinase Cs in synaptic plasticity. *Learn. Mem.* 14, 236–246. <https://doi.org/10.1101/LM.469707>.
- Strekalova, T., Sun, M., Sibbe, M., Evers, M., Dityatev, A., Gass, P., Schachner, M., 2002. Fibronectin domains of extracellular matrix molecule tenascin-C modulate hippocampal learning and synaptic plasticity. *Mol. Cell. Neurosci.* 21, 173–187. <https://doi.org/10.1006/mcne.2002.1172>.
- Sun, J., Pan, X., Christiansen, L.I., Yuan, X.L., Skovgaard, K., Chatterton, D.E.W., Kaalund, S.S., Gao, F., Sangild, P.T., Pankratova, S., 2018. Necrotizing enterocolitis is associated with acute brain responses in preterm pigs. *J. Neuroinflammation* 15. <https://doi.org/10.1186/s12974-018-1201-X>.
- Tensaouti, Y., Yu, T.S., Kernie, S.G., 2020. Apolipoprotein E regulates the maturation of injury-induced adult-born hippocampal neurons following traumatic brain injury. *PLoS One* 15. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0229240>.
- Thom, M., Blümcke, I., Aronica, E., 2012. Long-term epilepsy-associated tumors. *Brain Pathol.* 22, 350–379. <https://doi.org/10.1111/J.1750-3639.2012.00582.X>.
- Thomas, P.D., Ebert, D., Muruganujan, A., Mushayamah, T., Albou, L.P., Mi, H., 2022. PANTHER: making genome-scale phylogenetics accessible to all. *Protein Sci.* 31, 8–22. <https://doi.org/10.1002/PRO.4218>.
- Venkatesh, H.S., Morishita, W., Geraghty, A.C., Silverbush, D., Gillespie, S.M., Arzt, M., Tam, L.T., Espenel, C., Ponnuswami, A., Ni, L., Woo, P.J., Taylor, K.R., Agarwal, A., Regev, A., Brang, D., Vogel, H., Hervy-Jumper, S., Bergles, D.E., Suvà, M.L., Malenka, R.C., Monje, M., 2019. Electrical and synaptic integration of glioma into neural circuits. *Nature* 573, 539–545. <https://doi.org/10.1038/S41586-019-1563-Y>.
- Verhaak, R.G.W., Hoadley, K.A., Purdom, E., Wang, V., Qi, Y., Wilkerson, M.D., Miller, C. R., Ding, L., Golub, T., Mesirov, J.P., Alexe, G., Lawrence, M., O’Kelly, M., Tamayo, P., Weir, B.A., Gabriel, S., Winckler, W., Gupta, S., Jakkula, L., Feiler, H.S., Hodgson, J.G., James, C.D., Sarkaria, J.N., Brennan, C., Kahn, A., Spellman, P.T., Wilson, R.K., Speed, T.P., Gray, J.W., Meyerson, M., Getz, G., Perou, C.M., Hayes, D. N., 2010. Integrated genomic analysis identifies clinically relevant subtypes of glioblastoma characterized by abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR, and NF1. *Cancer Cell* 17, 98–110. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2009.12.020>.
- Wallace, T.L., Johnson, E.M., 1989. Cytosine arabinoside kills postmitotic neurons: evidence that deoxycytidine may have a role in neuronal survival that is independent of DNA synthesis. *J. Neurosci.* 9, 115–124. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.09-01-00115.1989>.
- Zakharov, D., Lapish, C., Gutkin, B., Kuznetsov, A., 2016. Synergy of AMPA and NMDA receptor currents in dopaminergic neurons: a modeling study. *Front. Comput. Neurosci.* 10 <https://doi.org/10.3389/FNCOM.2016.00048>.
- Zanello, M., Pages, M., De-Espariat, A.T., Saffroy, R., Puget, S., Lacroix, L., Dezamis, E., Devaux, B., Chretien, F., Andreiulo, F., Sainte-Rose, C., Zerah, M., Dhermain, F., Dumont, S., Louvel, G., Meder, J.F., Grill, J., Dufour, C., Pallud, J., Varlet, P., 2016. Clinical, imaging, histopathological and molecular characterization of anaplastic ganglioglioma. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 75, 971–980. <https://doi.org/10.1093/JNEN/NLW074>.
- Zhuo, M., Gorgun, M.F., Englander, E.W., 2018. Neurotoxicity of cytarabine (Ara-C) in dorsal root ganglion neurons originates from impediment of mtDNA synthesis and compromise of mitochondrial function. *Free Radic. Biol. Med.* 121, 9–19. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2018.04.570>.