

3.5 Hirnorganoide vom gesamten Gehirn oder von spezifischen Hirnregionen und deren mögliche Anwendungen²⁷

Zusammengefasst und aus dem Englischen übersetzt von Lilian Marx-Stölting

Das Zentralnervensystem besteht aus dem Gehirn und dem Rückenmark und steuert die meisten körperlichen und geistigen Prozesse. Seine Erforschung ist daher essenziell, jedoch ist der Zugang zu menschlichen Proben aus praktischen und ethischen Gründen sehr begrenzt. Bisher stellten lediglich durch Operationen isolierte, geschädigte Gehirnteile und Gehirne verstorbener Patientinnen und Patienten unersetzbare Ressourcen für das Studium der Pathologie neuronaler Krankheiten dar. Dementsprechend wurden bislang Mausmodelle zur Erforschung molekularer Prozesse bei der Gehirnentwicklung und für Medikamentenstudien genutzt. Allerdings unterscheiden sich Nagetiere auf genetischer und molekularer Ebene vom Menschen, was sich auch in sehr unterschiedlichen Entwicklungsprogrammen zeigt. Hirnorganoide (die auch als zerebrale Organoide bezeichnet werden) sind dreidimensionale (3-D) Miniatur-Gehirnmodelle in einer Petrischale. Sie sind ein innovatives Modellsystem für die Untersuchung der menschlichen Gehirnentwicklung und Krankheitsentstehung. Im Folgenden wird auf die Herstellung von Hirnorganoiden eingegangen, insbesondere von Organoiden, die bestimmte Hirnregionen nachbilden. Daran anschließend werden Herausforderungen für dieses Forschungsgebiet und mögliche Lösungsansätze diskutiert.

²⁷ Dieser Beitrag ist eine deutsche Zusammenfassung des Review-Artikels „Regional specification and complementation with non-neuroectodermal cells in human brain organoids“ von Yoshiaki Tanaka und In-Hyun Park, der 2020 im *Journal of Molecular Medicine* erschienen ist und eine umfangreiche Darstellung des wissenschaftlichen Sachstands sowie der aktuellen Literatur zum Thema (Stand Sommer 2020) bietet.

3.5.1 Entwicklung von Hirnorganoiden

Die Herausbildung von Gehirnstrukturen und Rückenmark erfolgt während der Embryogenese des Menschen in mehreren Stadien. Während der Gastrulation²⁸ bilden sich primäre Zellen des Zentralnervensystems in einem Gebiet, das als neurale Platte bezeichnet wird und aus embryonalen Neuroektodermzellen besteht.²⁹ Aus dieser neuralen Platte bildet sich dann ein Neuralrohr, welches in drei Hauptabschnitte gegliedert ist: Vorderhirn (Prosencephalon), Mittelhirn (Mesencephalon) und Nachhirn (Rhombencephalon). Das Vorderhirn entwickelt sich weiter zum Telencephalon und Diencephalon. Während der weiteren Entwicklung entstehen hieraus einzelne Hirnregionen wie Cortex, Thalamus und Cerebellum (Kleinhirn), aus denen das Gehirn (Encephalon) besteht.

Wenn humane pluripotente Stammzellen (hPS-Zellen) als dreidimensionale Aggregate kultiviert werden, differenzieren sie in verschiedene Zelltypen des Gehirns und organisieren sich zu Strukturen, die die Entwicklung des menschlichen Gehirns rekapitulieren. Diese Methode geht zurück auf die serumfreie, flottierende („floating“) Kultivierung von pluripotenten Stammzellen als sogenannte Embryoid Bodies (EB), die ein Ausgangspunkt für die Bildung dreidimensionaler hirnhähnlicher Strukturen ist. Seither haben Forscherinnen und Forscher die Kultursysteme für hPS-Zell-basierte Hirnorganoiden optimiert und dabei erforscht, wie sich Hirngewebe *in vitro* differenzieren. EBs bilden dem Neuralrohr ähnliche Strukturen, wenn geringe Mengen bestimmter Wachstumsfaktoren (z. B. FGF2) hinzugegeben werden, und haben damit ein hohes Entwicklungspotenzial. Sie differenzieren zu Neuronen und Gliazellen (Neuronen unterstützende Zellen), wenn FGF2 sowie andere Wachstumsfaktoren und Signalmoleküle dem Medium entzogen werden. Aufgrund dieser Eigenschaften konnten Organoiden des gesamten Gehirns hergestellt werden, welche verschiedene Hirnregionen nachbilden, die vom Vorderhirn bis zur Netzhaut des Auges (die ebenfalls als Teil des Gehirns gilt) reichen, sofern eine unterstützende extrazelluläre Matrix (z. B. Matrigel) vorliegt.

HPS-Zell-abgeleitete Hirnorganoiden stellen eine vielversprechende Ressource für die Untersuchung molekularer Mechanismen der Gehirnentwicklung und von Krankheiten dar. Ganzhirnorganoiden ermöglichen die Erforschung der Unterschiede und der gegenseitigen Abhängigkeit verschiedener Hirnregionen voneinander. Außerdem

²⁸ Als Gastrulation bezeichnet man die Phase während der frühen Embryogenese, in der aus dem pluripotenten Epiblast die drei Keimblätter (Entoderm, Mesoderm und Ektoderm) entstehen (siehe Einleitung, Kap. 2.1).

²⁹ Neuroektodermzellen sind Zellen des Ektoderms, aus denen später Zellen des Nervensystems hervorgehen.

dienen sie der Erforschung von Krankheiten des Gehirns, die große Teile des Gehirns betreffen, wie etwa Anenzephalie (angeborenes Fehlen des Großhirns) oder Mikrozephalie (Entwicklungsstörung des Großhirns). Allerdings sind die Entwicklungsprozesse von Ganzhirnorganoiden zufällig (stochastisch), was zu einer großen Heterogenität und eingeschränkter Reproduzierbarkeit zwischen individuellen Organoiden führt. Durch eine Kombination verschiedener Signalmodulatoren und Wachstumsfaktoren können die menschlichen Organoiden dazu gebracht werden, zu spezifischen Regionen des Zentralnervensystems zu differenzieren: Cortex (Großhirnrinde), Basalganglien (Teile des Endhirns), Mittelhirn, Thalamus (Teil des Zwischenhirns), Hypothalamus (Teil des Zwischenhirns), Hippocampus (Teil des Endhirns), Cerebellum (Kleinhirn) und Rückenmark (siehe Abbildung 1a und 1b). Die Möglichkeit der Erzeugung derartiger Organoiden hat Implikationen für die Modellierung neuronaler Krankheiten.

3.5.2 Regionenspezifische Organoiden

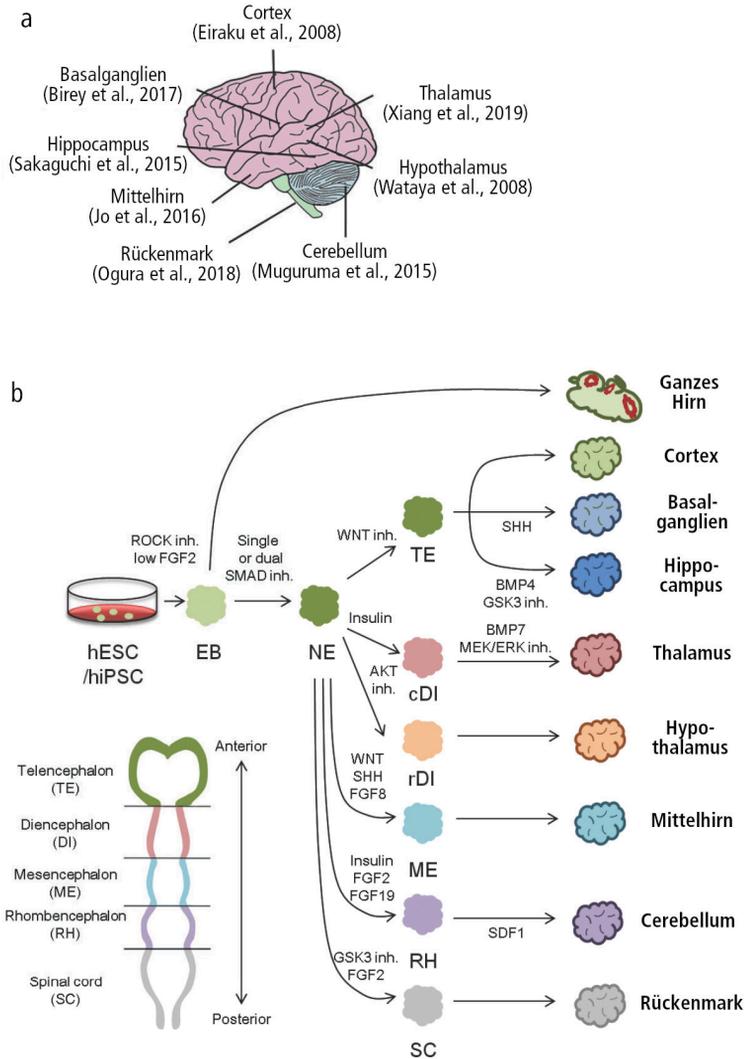
Im Folgenden werden die einzelnen regionenspezifischen Organoiden kurz vorgestellt.

Cortex: Es gibt verschiedene Herstellungsverfahren zur Gewinnung von Cortexorganoiden, die sich jedoch in ihrer Zelltypzusammensetzung ähneln. Diese Organoiden können für die Modellierung von Krankheiten wie z. B. Schizophrenie und Autismus genutzt werden, die u. a. mit einem Ungleichgewicht der Signalübertragung an den Synapsen einhergehen.

Hippocampus: Der Hippocampus ist Teil des limbischen Systems, das Emotionen steuert und für Lernen und Gedächtnis zuständig ist. Er ist sehr empfindlich gegenüber metabolischen und zytotoxischen Störungen (die also den Stoffwechsel betreffen und zu Zellschäden führen). Diese können etwa durch traumatische Verletzungen, Durchblutungsstörungen (Ischämien) und Alterungsprozesse hervorgerufen werden. Hippocampusorganoiden weisen Ähnlichkeiten zu frühen Entwicklungsstadien im embryonalen Hippocampus auf, allerdings sind weitere Untersuchungen und Verbesserungen des Kultursystems nötig, um eine bessere Reifung und Langzeitkultur der Organoiden zu ermöglichen.

Thalamus, Hypothalamus und Hypophyse: Thalamus und Hypothalamus gehören ebenfalls zum limbischen System und spielen eine wichtige Rolle bei Parkinson, bestimmten Formen von Demenz und der Amyotrophen Lateralsklerose (ALS). Die Kombination von Thalamusorganoiden mit Cortexorganoiden führte erfolgreich zu Wechselwirkungen zwischen den Bereichen und könnte helfen, die Pathologie dieser Erkrankungen besser zu verstehen. Auch die Hypophyse (Hirnanhangdrüse) befindet sich unter dem Hypothalamus und ist ein Zentrum für die Aufrechterhaltung der

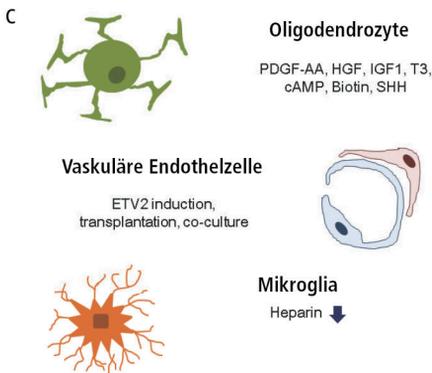
Abbildung 1: Regionenspezifische 3-D-Gehirnkultursysteme aus humanen pluripotenten Stammzellen



a) Seit Kurzem herstellbare regionenspezifische Hirnorganoide.

b) Schematischer Ablauf der Gewinnung von ganzen und regionenspezifischen Hirnorganoiden aus hPS-Zellen durch Zugabe bestimmter Wachstumsfaktoren.

Die Literaturangaben in der Abbildung verweisen auf die Artikel, welche die Gewinnung der entsprechenden Organoiden beschreiben. Eine Übersicht bietet der Originalartikel von Tanaka/Park (2020).



c) Kompensation fehlender Zelltypen in herkömmlichen Herstellungsverfahren für Hirnorganoiden.

Homöostase (dem Fließgleichgewicht des Körpers). Wachstum, Stress und sexuelle Reproduktionsfähigkeit werden über die dort gebildeten Hormone reguliert. Störungen der Hypophyse führen zu Stoffwechsel- und Fruchtbarkeitsstörungen wie etwa Übergewicht, nachlassende Hodenfunktion, Schilddrüsenunterfunktion etc. Hypophysenorganoiden können bestimmte Hormone bilden, wenn sie gezielt dazu angeregt werden. Auf diese Weise lassen sich die Entwicklung und Defekte von Hormonkaskaden untersuchen.

Mittelhirn: Das Mittelhirn steuert die motorischen Fähigkeiten, also die Bewegungsmöglichkeiten des Körpers. Da Parkinson mit einer Degeneration bestimmter Neuronen in diesem Bereich einhergeht, können Mittelhirnorganoiden als In-vitro-Modell der Krankheitsentstehung und für Medikamentenscreenings genutzt werden.

Cerebellum: Das Cerebellum ist essenziell für die motorische Kontrolle von Gleichgewicht und Haltung. Missbildungen des Cerebellums führen etwa zu Ataxie (Störungen der Bewegungskoordination), Sprachstörungen und Tremor (Zittern). Mithilfe von Cerebellumorganoiden können Entwicklungsstörungen des Gehirns untersucht werden (etwa das Dandy-Walker-Syndrom oder das Joubert-Syndrom). Neurodegeneration im Bereich des Cerebellums spielt auch eine Rolle bei Chorea Huntington und Multipler Sklerose, sodass Cerebellumorganoiden auch für das Studium dieser Krankheiten vielversprechend sind.

Rückenmark: Primäre sensorische Informationen über die äußere Umgebung werden von Haut- und Muskelzellen aufgenommen und in Form von Signalen über das Rückenmark ins Gehirn weitergeleitet. Signale aus dem Cortex werden wiederum über das Rückenmark in die peripheren Gewebe gesendet. Daher ist das Rückenmark wesentlich für die meisten Körperfunktionen, was auch die Sprache, das Fühlen und die

Muskelbewegungen einschließt. Schäden am Rückenmark beeinträchtigen meist irreversibel die Bewegungsfähigkeit und das Leben der Patientinnen und Patienten. Die In-vitro-Generierung von Organoiden des Rückenmarks ermöglicht die Erforschung genetisch bedingter neuromuskulärer Erkrankungen wie der Spinalen Muskelatrophie, bei der die Motoneuronen im Rückenmark, defekt sind. Der Mechanismus der Krankheitsentstehung kann hierbei ebenso erforscht werden wie neue medizinische Ansätze zur Heilung. Auch die Autoimmunkrankheit Myasthenia gravis, die mit Störungen der Signalübertragung von Nervenimpulsen an neuromuskulären Schnittstellen einhergeht, kann so untersucht werden.

3.5.3 Komplementierung mit Zelltypen, die in Hirnorganoiden selten vorkommen

Die meisten Protokolle für die Züchtung von Hirn- und Rückenmarksorganoiden wurden optimiert, um hPS-Zellen zu einer Entwicklung entlang der neuroektodermalen Entwicklungslinie zu bewegen. Endothelzellen (Zellen, die das Innere der Blutgefäße auskleiden) und umgebende Zelltypen entwickeln sich jedoch aus mesodermalen Zellen und bilden ein zerebrales Netzwerk von Blutgefäßen, die Sauerstoff und Nährstoffe durch das gesamte Gehirn transportieren. Endothelzellen sind zentrale Komponenten der Blut-Hirn-Schranke, welche die Bewegung von Ionen, Molekülen und Zellen zwischen dem Blut und dem Hirngewebe streng reguliert. Mikroglia-Zellen sind im Gehirn vorhandene Makrophagen (bestimmte weiße Blutkörperchen), die hier der Immunabwehr dienen. Weil die Funktion der Blut-Hirn-Schranke und der Mikroglia eng mit der Entstehung von Krankheiten des Gehirns (Gehirnpathogenese) verweben ist, sind Hirnorganoiden, die keine derartigen Zelltypen enthalten, unvollständig und nicht ausreichend für die Erforschung der Krankheitsentstehung.

Während der Embryonalentwicklung bilden sich in spezifischen Hirnregionen bestimmte Zelltypen wie etwa Interneuronen und Oligodendrozyten, die dann in andere Gebiete wandern. Bei Krankheiten aus dem Autismus-Spektrum und bei Multipler Sklerose sind diese Prozesse gestört. Im Gegensatz zu Tiermodellen und Hirnproben, enthalten regionenspezifische Hirnorganoiden diese eingewanderten Zellen zunächst nicht. Um dies zu ändern, wurden bestehende Protokolle so abgewandelt, dass Oligodendrozyten, Blutgefäße und Zellen, die Mikroglia ähneln, aus hPS-Zellen innerhalb der Hirnorganoiden differenziert werden können (siehe Abbildung 1c). Zu den verbesserten Herstellungsmethoden gehören etwa die Fusion von regionenspezifischen Hirnorganoiden, die Zugabe bestimmter Wachstumsfaktoren und die Zugabe von chemischen Komponenten, die die Bildung dieser Zelltypen anregen. Dadurch gibt es

inzwischen Organoide, die alle drei Hauptzelltypen des Gehirns enthalten und auch Zellkommunikationsprozesse aufweisen, die für eine Hirnfunktion grundlegend sind.

Hirnorganoiden können nach zwei Monaten bis zu 4 mm im Durchmesser groß werden und ungefähr ein Jahr lang kultiviert werden. Sie werden deshalb nicht größer, weil die Versorgung mit Sauerstoff, Nährstoffen und die Abfallentsorgung im Inneren der Organoide *in vitro* nicht gewährleistet werden können. Das Fehlen eines Blutgefäßsystems ist ein großes Problem für den Erhalt von Organoiden und führt zum Absterben von Zellen (u. a. durch programmierten Zelltod/Apoptose). Außerdem ist die Stimulierung durch die Blutgefäßendothelzellen essenziell für die Differenzierung von Nervenzellvorläufern.

Eine der ersten Studien zur Bildung von Blutgefäßen (Vaskularisierung) in Hirnorganoiden war der Transfer eines menschlichen Hirnorganoids in ein Mausgehirn. Nach der Transplantation in den Cortex von immununterdrückten Mäusen integrierten sich die Transplantate dort zuverlässig. Mausblutgefäße wanderten nach ungefähr einer Woche aus dem Wirtshirn in die Transplantate ein und bildeten nach ungefähr zwei Wochen ein Blutgefäßnetzwerk. Diese integrierten Gefäßstrukturen ermöglichten die fortlaufende Reifung der transplantierten Organoide und deren Langzeitüberleben. Darüber hinaus bildeten die menschlichen Nervenzellen Axone (reizweiterleitende Fortsätze), die mit dem Mausgehirn verbunden waren und mit dem Nervensystem des Wirtes funktionale synaptische Verbindungen eingingen. Damit ermöglichen *In-vivo*-Transplantationsversuche die Modellierung von menschlichen Hirnorganoiden und die Untersuchung der Pathogenese neuronaler Krankheiten unter physiologischen Bedingungen.³⁰

Die funktionale Vaskularisierung von Hirnorganoiden konnte jedoch auch *in vitro* nachgeahmt werden. So wurden aus denselben hPS-Zellen Hirnorganoiden und Endothelzellen generiert und diese Zelltypen anschließend miteinander vermischt. Auf diese Weise konnten Blutgefäß-ähnliche Strukturen im Organoid gebildet werden. Die meisten Endothelzellen bildeten jedoch mittels Selbstorganisation einfach separate Endothelorganoiden außerhalb der Hirnorganoiden. Es scheint daher wichtig, Methoden zu entwickeln, welche die Bildung von Blutgefäßen direkt in Hirnorganoiden ermöglichen. Dazu gehört die Überexpression bestimmter Gene. Die Vaskularisierung der Hirnorganoiden reduzierte den programmierten Zelltod im Hirnorganoid deutlich und ermöglichte einen Größenzuwachs und die Langzeitkultivierung der Organoide. Zu den blutgefäß-ähnlichen Strukturen gehörten dabei auch Merkmale und Zelltypen der

30 Zu ethischen Fragen bei Hirnorganoiden und Mensch-Tier-Chimären siehe Schick Tanz, Kap. 6.

Blut-Hirn-Schranke. Dies kann für die Krankheitsmodellierung und für Medikamententests wichtig sein.

Organoide in Zellkultur sind anfälliger für zellulären Stress und Schäden als In-vivo-Hirngewebe. Mikroglia spielen dabei eine wichtige Rolle. Sie regen die Reparatur und Neubildung des Zentralnervensystems durch eine aktive Immunantwort an und regulieren außerdem Entzündungsreaktionen bei einer Vielzahl von neurodegenerativen Erkrankungen. Cortexorganoide und Ganzhirnorganide produzieren auch Zelltypen mesodermalen Ursprungs, was durch die Expression bestimmter Gene nachgewiesen werden kann. Auch mikroglia-ähnliche Zellen, die aus solchen mesodermalen Vorläuferzellen hervorgehen, konnten beim Einsatz bestimmter In-vitro-Differenzierungsmethoden nachgewiesen werden und können dementsprechend mit Organoiden erforscht werden.

3.5.4 Systematischer Vergleich von Hirnorganoiden und fetalen Gehirnen

Die neue Methode der Einzelzelltranskriptomanalyse (die Analyse der gesamten Transkripte der Gene einzelner Zellen) wird häufig mit Organoidstudien verbunden, um die molekularen Eigenschaften und die Heterogenität individueller Zellen zu untersuchen.³¹ Auf diese Weise können die typischen Zellen des Zentralnervensystems (für die die Expressionsmuster bekannt sind) in Hirnorganoiden nachgewiesen werden. Auch Zellen, deren Funktion noch nicht geklärt ist, wurden sowohl in fetalem Hirngewebe als auch in Hirnorganoiden entdeckt. Allerdings exprimieren Zellen in Hirnorganoiden zum Teil auch andere Gene als Zellen in fetalem Gewebe, insbesondere im Hinblick auf ihren Stoffwechsel. Solche Unterschiede könnten mit dem metabolischen Stress aus der Umgebung des Organoids erklärt werden und können auch die zelltypspezifische Differenzierung der Zellen stören. Diese Störung der neuronalen Entwicklung kann durch die Transplantation der Organoide in ein funktionierendes Gewebe behoben werden. Die Verringerung zellulären Stresses scheint daher wichtig zu sein für die Erforschung von Hirnentwicklungsprozessen, zelltypspezifischen Erkrankungen und Zell-Zell-Interaktionen.

31 Siehe zur Einzelzellanalytik Walter/Schickl (2019): Einzelzellanalyse in Forschung und Medizin. Eine Stellungnahme der interdisziplinären Arbeitsgruppe Gentechnologiebericht. Kostenlos abrufbar unter: https://www.gentechnologiebericht.de/fileadmin/user_upload/Webseitendateien/Dokumente/BBAW_Einzelzellanalyse_A5_PDF-A1-b.pdf [19.5.2020].

3.5.5 Wechselwirkung zwischen Zentralnervensystem und peripherem Gewebe

Die Organfunktionen werden durch das Nervensystem mit Impulsen vom Gehirn und Rückenmark zu peripheren Neuronen gesteuert. ALS-Patientinnen und -Patienten leiden an einer Anomalie der elektrischen Impulse des Herzmuskels, der Entgiftung sowie der Atmung, die durch einen funktionellen Defekt der Motorneuronen im zentralen Nervensystem hervorgerufen werden. Das nervliche Leiden geht mit einem beschädigten peripheren Nervensystem einher und zeigt Symptome einer chronischen Lebererkrankung und Nierenversagen. Magen- und Darmfunktionen sind anfällig für Angst und Stress im Gehirn. Im Gegensatz zu In-vivo-Organoiden enthalten die peripheren Gewebeorganoiden keine neuronalen Zellen und können nicht zur Erforschung der Steuerung der Gewebefunktionen durch das Nervensystem und von Multiorganerkrankungen genutzt werden. Das Fusionskultursystem verschiedener Hirnorganoiden kann hier Abhilfe schaffen. Die Multi-Organ-on-a-Chip-Technologie ist ein weiteres skalierbares Werkzeug, um mehrere Organoiden des Hirns oder anderer Gewebe und Organsysteme mit Mikrofluidik zu verbinden und physiologische Wechselwirkungen nachzubilden. Die Integration biologischer und physikalischer Sensoren auf derartigen Chips ermöglicht eine kontinuierliche Beobachtung des Gewebeverhaltens und die Messung von als Sekret abgegebenen löslichen Biomarkern (also von Molekülen, die als Referenz und biologische Merkmale für Krankheitsprozesse und Vorgänge im Körper dienen). Insofern ist die Etablierung eines biomimetischen (biologische Strukturen nachahmenden) Gerüsts, das mehrere Arten von Organoiden verbindet, ein Meilenstein, um die Komplexität und das Zusammenspiel verschiedener Zelltypen und Regionen bei Multiorganerkrankungen zu untersuchen.

3.5.6 Fazit

Organoidtechnologien haben sich schnell weiterentwickelt und schaffen neue Möglichkeiten für biomedizinische Anwendungen. Die Entwicklung ist jedoch noch nicht abgeschlossen, sondern schreitet weiter voran. Insbesondere wird an der Expansion und Reifung von Hirnorganoiden gearbeitet, um späte fetale oder auch nachgeburtliche Stadien der Hirnentwicklung nachbilden zu können, was derzeit noch nicht möglich ist. Auch multidisziplinäre Ansätze, um biomimetische Organoidkultursysteme zu schaffen, sind aufregende Herausforderungen. Die Bildung von Blutgefäßen, Immunzellen und einem Immunsystem sowie die neuronale Reifung von Hirnorganoiden wird die Entwicklung dieser Systeme verbessern, um Pathologien besser in vitro

untersuchen zu können und langfristig neue Ansätze der regenerativen Medizin zu ermöglichen.