

Sándor Alexandra

Biológia MSc

2020/21 évfolyam

Indukált pluripotens őssejt alapú organoidmodell fejlesztése cerebelláris ataxia
vizsgálatára

36. OTDK Biológia Szekció

Témavezető:

Dr. Szebényi Kornélia

Konzulens:

Dr. Sinka Rita

Szegedi Tudományegyetem

Természettudományi és Informatikai Kar

Természettudományi Kutatóközpont



1. Tartalomjegyzék

Rövidítések jegyzéke.....	3
2. Bevezető	4
2.1. Humán pluripotens őssejtek.....	4
2.2. Agyi organoidok	5
2.3 A cerebellum fejlődésére jellemző marker fehérjék	7
2.4. Cerebelláris ataxiák és modelljeik	8
3. Célkitűzések	10
4. Anyagok és módszerek.....	11
4.1. Humán pluripotens őssejtek tenyésztése és differenciáltatása	11
4.2.Általunk használt médiumok összetétele.....	11
4.3. IL-1 β kezelés menete.....	12
4.4. Méretmeghatározás.....	12
4.5. Áramlási citometria vizsgálat	13
4.6. Immunfestés.....	13
4.6.1. Konfokális kamra.....	13
4.6.2. Teljes organoid immunfestése	13
4.6.3. Organoidok fagyasztva metszése	14
4.7. Western blot.....	15
5. Eredmények és értékelésük	17
5.1. Pluripotencia vizsgálata.....	17
5.1.1. Pluripotencia vizsgálata áramlási citometriával.....	17
5.1.2. Pluripotencia vizsgálata immunfestéssel	17
5.2. Organoid indítási sejtszám meghatározása.....	18
5.3. Az eredeti protokoll sejtelhalást okoz	19
5.4. Protokoll optimalizálás	20
5.5. Második minőség-ellenőrzési pont beállítása.....	26
5.6 A cerebelláris differenciációs protokoll további optimalizálása	27
5.7. IL-1 β kezelés eredménye.....	31
6. Összefoglalás.....	33
Függelék	35
7. Köszönetnyilvánítás	36
Irodalomjegyzék:.....	37

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

BMPs:	Bone morphogenetic proteins
FGF:	Fibroblast Growth Factor
GFAP:	Glial fibrillary acidic protein
gfCDM:	Growth factor-free chemically defined medium
hESC:	human embryonic stem cell
hiPSC:	human induced pluripotent stem cell
IDM:	Improved Differentiation Medium
KIRREL2:	Kirre Like Nephric Family Adhesion Molecule 2
MAP2:	Microtubule-associated protein 2
OCT:	Octamer binding protein
PAX6:	Paired box protein 6
PBS:	Phosphate Buffered Saline
PFA:	Paraformaldehyd
PI:	Propidium-jodid
PSC:	pluripotent stem cell
RL:	Rombic lip
SDF:	stroma cell-derived factor
SHH:	Sonic Hedgehog
SOX:	SRY-box Transcription Factor
SSEA4:	Stage-specific embryonic antigen 4
SZVZ:	Szubventrikuláris zóna
VZ:	Ventrikuláris zóna
Wnt:	Wingless

2. BEVEZETŐ

Munkám elsődleges célja a humán cerebellum pluripotens őssejtekből előállítható organoid modelljének létrehozása és karakterizálása volt. A humán cerebellum szerkezetében, összetételében és méreteiben nagy mértékben eltér bármely más faj hasonló agyterületétől, így elképzelésünk szerint a cerebellumot érintő ataxiák pathomechanizmusának vizsgálatát és ezáltal új terápiás célpontok felfedezését segítheti elő a humán cerebelláris organoidok használata ezen betegségcsoport modellezésére.

2.1. Humán pluripotens őssejtek

Az őssejtek olyan speciális funkcióval még nem rendelkező sejtek, amelyek korlátlan önmegújulásra képesek azáltal, hogy osztódással önmagukhoz hasonló sejteket hoznak létre. Megfelelő szignálok hatására azonban az őssejtek specifikus funkcióval rendelkező szöveti sejtekké képesek alakulni. Ezt a folyamatot nevezzük differenciációnak. Az embrionális fejlődés során különböző típusú őssejtek figyelhetők meg, melyeknek a fejlődés előrehaladtával a differenciációs potenciáljuk csökken.

A totipotens őssejtek még képesek az összes testi szövet kialakításán kívül az extraembrionális szöveteket is létrehozni (1), míg erre a pluripotens őssejtek már nem képesek, belőlük csak az összes testi sejt tud kialakulni. A multipotens őssejtek még kisebb potenciállal rendelkeznek, csak szövetspecifikus sejtekké képesek alakulni.

A nyolcsejtes hólyagsíra állapot egy sejtjéből létrehozható humán embrionális őssejt (human embryonic stem cell, hESC) vonalak pluripotens potenciálúak, hasonlóan az indukált pluripotens őssejtekhez (human induced pluripotent stem cell, humán indukált pluripotens őssejt, hiPSC), melyeket testi sejtekből állítanak elő visszaprogramozással. A visszaprogramozás a pluripotens őssejt állapotra jellemző transzkripciós faktorok (OCT4, SOX2, KLF4, c-MYC) testi sejtekbe történő bejuttatásával és ott azok átmeneti, emelt mértékű kifejeztetésével érhető el (2).

A pluripotens állapot igazolására számos széles körben elfogadott marker létezik, melyek lehetnek akár sejtfelszíni molekulák (SSEA3, SSEA4, TRA1-60, TRA1-81, E-Cadherin), akár transzkripciós faktorok (Nanog, OCT3/4 és SOX2) (3). További bizonyítéka a kiindulási sejtek pluripotens állapotának, ha spontán differenciációjuk révén képesek a három csíralemezre (ektoderma, endoderma, mezoderma) jellemző sejttypusokat létrehozni. A differenciáció folyamata megfelelő növekedési faktorok alkalmazásával irányíthatóvá válik, és ma már

képesek vagyunk gyakorlatilag korlátlan mennyiségben létrehozni olyan sejt kultúrákat Petri-csészében, amik egy adott szövetre jellemző sejt típusokat vagy akár nagy tisztaságban csak egyféle sejt típust tartalmaznak (4). Azonban a hagyományos 2 dimenziós (2D) sejttenyészeteknek erős korlátjai vannak, mivel az adott szerv strukturális komplexitását (pl.: agyszövet), így a valós fiziológiai környezetet nem képesek utánozni.

2.2. Agyi organoidok

A humán agy fejlődésének, működésének és elváltozás esetén a betegség mechanizmusának megértéséhez fontos olyan modellrendszereket használnunk, amik a lehető legpontosabb módon képesek lemásolni a humán agy komplexitását és struktúráját. Gyakran használt modell a rágcsáló, azonban amíg az emberi agy tömege megközelítőleg 1300-1400 g és körülbelül 86 milliárd neuront tartalmaz, addig egy egér agy nagyjából 0,4 g és körülbelül 71 millió neuront tartalmaz (5). Különösen nagy eltérést mutat a humán és a rágcsáló cerebellum, ami a neuronban legsűrűbb területe az agynak. A cerebellumban található a humán agy neuronállományának 80%-a, míg egér esetében ez csak 60%, ezen kívül pedig a neuronok különböző típusainak eloszlása is meglehetősen eltér a két faj között (6). Például míg egérben a szemcse sejtek és a Purkinje neuronok aránya 200:1-hez, addig a humán cerebellumban ez 3000:1-hez (7), valamint az egyik cerebelláris progenitor zóna, a ventrikuláris zóna (VZ) is csak humánban válik szét ventrikuláris és szubventrikuláris zónára (SZVZ), semmilyen más fajban ez nem figyelhető meg (6). Ezek miatt fontos olyan modellrendszerek kidolgozása, amelyek az emberi agy összetettségét és szerkezeti felépítését az állatmodelleknél jobban tükrözik.

Az agyi organoidok magukban foglalják a 2D humán sejttenyészetek és az állatmodellek pozitívumait: pluripotens őssejt eredetűek, tehát elméletileg korlátlan mennyiségben előállíthatók, továbbá az egyes agyterületekre jellemző sejt típusok részben vagy egészben önszerveződő struktúrákban alakulnak ki, ezáltal reprodukálva az agy bizonyos strukturális és sejtjes aspektusait.

Az őssejtek differenciációjához szükséges a térbeli, anterior-poszterior, és a dorzális-ventrális tengelyeken történő szabályzás. A fibroblaszt növekedési faktor (fibroblast growth factor, fibroblaszt növekedési faktor, FGF), a Wingless (Wnt) és a retinol sav az anterior-poszterior irányú fejlődést szabályozzák. A dorzális-ventrális irányú fejlődést a Sonic Hedgehog (SHH), Wnt és a morfogenetikus csontfehérjék (bone morphogenetic proteins, morfogenetikus csontfehérjék, BMPs) szabályozzák (8). Ezeket a növekedési faktorokat az organoidon belül a

sejtek maguk is előállíthatják, vagy a különböző növekedési faktorok eltérő koncentrációjával, illetve aktivátorok és inhibitorok alkalmazásával reprodukálható *in vitro* a folyamat (9). Például a CHIR99021 kismolekula aktiválja a Wnt jelátviteli utat, ami a neuroepithélium kialakulását dózisfüggő módon szabályozza.

Létezik organoid protokoll az előagy (10), a középagy (11)(12) és az utóagy (13) modellezésére is, bár leginkább az előagyat leképező kortikális organoid modellek használata terjedt el, mivel számos neurodegeneratív betegség, mint például a frontotemporális demencia érinti ezt a részét az agynak (14). Ez a modellrendszer képes reprodukálni ventrikuláris, kamraszerű struktúrákat, a felszíni (SATB2), és a mélyebb rétegekben található neuronok (CTIP2) markereinek expressziójával (14).

A cerebellum jellemzően kevesebbet tanulmányozott agyterület, mégis az első organoid modell pár évvel a kortikális modellek megjelenése után kidolgozásra került (15). Ezen modell esetében azonban a Purkinje sejtek éréséhez még szükség volt egérből származó primer sejtekkel ko-kultúrában tartani az organoidokat.

A hatékony cerebelláris indukciót már azonban ez a protokoll is az SB431542, FGF2, FGF19 és SDF1 egymás utáni hozzáadásával váltotta ki. Az SB431542 gátolja a transzformáló növekedési faktor- β (TGF- β) receptort, ezáltal gátolja a mezodermális irányú differenciációt és elősegíti a neuroektoderma kialakulását. Az FGF2 az FGF1 alcsaládba tartozik, az agyi fejlődés során alacsony szinten expresszálódik a külső-, és belső szemcse sejtek rétegében, és a Purkinje-sejtekben. Fő funkciója a neuroepiteliális szövet kaudalizációja (16)(17). Ezekből az okokból ennek a két molekulának az alkalmazása elengedhetetlen a differenciálódás első napjaiban, ugyanis ezek fogják eredményezni a középső-, hátsóagyi területet, amiből a későbbi cerebelláris agyszövet fog kifejlődni (16). Az FGF19-et a középső hátsó agyi struktúrák polarizációjának elősegítésére használják, ami ezáltal elősegíti az agyi progenitor zónák kialakulását (18)(19), míg az SDF1 (stroma cell-derived factor 1) elősegíti a neurogenesis során a szemcse sejtek migrációját (20), és a progenitor régiók rétegeinek szerveződését (16).

A Muguruma *et al.* protokollt két másik csoport is továbbfejlesztette (21)(22). Nayler *et al.* 90 napig tartotta levegő-folyadék határfelületen kialakított tenyészetben az organoidokat, így elérve a Purkinje neuronok megfelelő érését egy olyan rendszerben, ahol már nem volt szükség eger primer sejtekre. Ezek az organoidok az érett Purkinje neuronokon kívül a cerebellumra jellemző szemcse sejteket és Bergmann glia sejteket is tartalmaztak már a differenciáció 90. napján. Silva *et al.* egy bioreaktor segítségével alkalmassá tette a protokollt nagy mennyiségű organoid egyszerre, jól reprodukálható módon történő előállítására (16). A protokoll 50. napra még nem, de 80. napra már eredményez asztrocita (GFAP) és érett neuron (MAP2) sejteket,

viszont érett Purkinje neuronokat csak 2 dimenziósra szétdisszociált organoidok esetében tudtak előállítani (23).

Egy harmadik csoport pedig kimutatta, hogy az általuk előállított kortikális organoidok a cerebellumra jellemző sejteket is tartalmaznak, és ezáltal a cerebellumot érintő patológiás elváltozások vizsgálatára is alkalmasak lehetnek (5). Ebben a modellben már a differenciáció 25. napján megjelent a MAP2 pozitivitás, és 50. napra már GFAP pozitív sejtek is kimutathatóak voltak. Mivel azonban a kortikális asztrociták és a cerebellárisak nehezen megkülönböztethetők, így Bergman glia sejtek jelenléte nem volt kimutatható. Mindenesetre ez volt az első modell, aminél kihasználták a szerzők a hiPSC-kben rejlő lehetőséget, és az egészségesen kívül egy örökletes betegségben, a Machado-Joseph kórban (3-as típusú spinocerebelláris ataxia) szenvedő páciensből visszaprogramozott sejtekből is létrehoztak organoidokat.

2.3 A cerebellum fejlődésére jellemző marker fehérjék

A cerebellum a $GBX2^+$ utóagyból két progenitor zóna kialakulásával kezd kifejlődni (21). Az egyik a már korábban említett VZ, a másik a rombikus ajak (rhombic lip, RL). Mindkét zóna sejtjei expresszálják az általános neuroepitél markert, a SOX2-t (SRY-box Transcription Factor, SRY-box transzkripció faktor) (24). A RL glutamaterg neuronokat hoz létre, melyek a szemcse sejtek, az unipoláris kefesejtek, és a glutamaterg kisagyi mélymagvak (9)(21). A PAX6 transzkripció faktor a radiális gliasejtek markere a szemcse sejtrétegben (25). A VZ-ből keletkezik az $OLIG2^+$ SZVZ, abból pedig a GABAerg neuronok, mint amilyen a Purkinje neuron is és a legtöbb glia típus, mint például a radiális glia sejtek.

A Purkinje sejtek progenitorainak megjelenését a KIRREL2 (Kirre Like Nephric Family Adhesion Molecule 2, Kirre típusú nefrikus családba tartozó adhézios molekula 2) fehérje jelöli, míg a Purkinje sejtek érését egy későbbi marker fehérje, a Calbindin megjelenésével lehet kimutatni (9)(21). Általános neuronális marker a mikrotubulus-asszociált fehérje 2 (MAP2), ami érett neuronok dendritjét jelölő fehérje (5). Az érett neuronok további azonosítására a NeuN fehérje is alkalmas, ami a gerincesek idegrendszerének minden részében megtalálható. Erősen konzervált fehérje, festődése más lehet bizonyos betegségek esetén (26).

A neuroektoderma indukcióját és a radiális glia sejteket a Nestin kifejeződése jellemzi (5)(27). A radiális glia sejtek csak a főemlősök agyában figyelhetők meg (28), és állványt (scaffold) képezve segítik a neuronok migrációját, illetve belőlük alakulnak ki később a cerebellum specifikus Bergmann glia sejtek is. Ezek kimutatására az S100Beta markert alkalmazzák (29),

míg asztrogliá (asztrocita) sejtek általános kimutatására a SOX9 vagy a GFAP fehérje markerek használhatók (5)(29)(30). Az asztrociták fő feladata a neuronok metabolikus és fizikai támogatása (30)(31)(32), azonban ennek a támogató funkciónak a sérülése révén vagy akár károsító hatásúvá válva számos neurodegeneratív betegség patomechanizmusában szerepet játszanak (29).

2.4. Cerebelláris ataxiák és modelljeik

Számos típusa létezik a cerebellumot érintő ataxiáknak. Ezek lehetnek örökletesek vagy szerzettek, például fertőzőes megbetegedések, feji traumák, de akár alkohol, gyógyszerek és mérgegyanyagok is kiválthatják. Az örökletes ataxiák lehetnek autoszomális domináns (spinocerebelláris ataxia) vagy recesszívek (Friedreich's ataxia, RFC1-hez kötött ataxia, ataxia-telangiectasia, Wilson's disease).

A spinocerebelláris ataxia (SCA) egy heterogén betegség csoport, amely számos neurodegeneratív megbetegedést foglal magában, és ma már több, mint 40 génről ismert, hogy annak mutációja SCA-t okoz (33). A betegség fő mechanizmusai közé tartozik többek közt a nem-kódoló ismétlődő expanziós RNS-ek toxikussá válása fontos fehérjék magukhoz kötése révén (SCA 8, 10, 12, 31, 36 és 37), a mitokondrium hibás működése (SCA 2), az ioncsatornák nem megfelelő működése (SCA 6, 13, 19, 41, 42 és 44), sérült autofágia (SCA 3 és 7) és a nem megfelelő transzkripciós szabályzás (SCA 1, 2, 3, 7, 17 és 47) (34). Leggyakrabban felnőtt korban jelenik meg. A betegeknél a motoros funkcióban, mozgásban okoz tüneteket, egyensúly és koordináció vesztesét, valamint zavart beszédet okoz. A legtöbb SCA jelentős károsodást eredményez a cerebellum Purkinje sejtjeiben, de más központi idegrendszeri rész is érintett lehet, mint például: gerincvelő, agytörzsi magok és a bazális ganglionok. Sok esetben az SCA korai halálhoz vezethet, jelenleg sem a teljes gyógyulásra, sem a betegség lassítására nincs megoldás. A mai terápiák leginkább a tünetek enyhítését célozza meg fizioterápiás és logopédiás kezeléssel. A gyógymód fejlesztését hátráltatja a betegség heterogenitás. A jövőben egy esetleges megoldást jelenthet a személyre szabott egyedi terápiás kezelés.(35)

Sokáig főleg a neuronális sejtípusok érintettségére irányultak a kutatások, így hiPSC-kből létrehozott 2 dimenziós *in vitro* neuron, motor neuron és Purkinje neuron tenyészetek léteznek számos SCA típusra (36). Ezek részben reprodukálják az adott SCA-ra jellemző molekuláris patológiai elváltozásokat, de nem szolgáltatnak információval a cerebellum glia sejtjeinek ataxiában való szerepéről, annak ellenére, hogy számos adat áll rendelkezésünkre azok érintettségéről is. Ilyen például, hogy az ataxiás betegek autopszia mintáiban gliózist, a glia

sejtek reaktív elváltozását figyeltek meg (29). A cerebelláris cortex Bergmann glia és granuláris réteg asztrocitái, valamint a cerebellum fehér állományának rostos asztrocitái akár egymástól eltérő patológiás elváltozásoktól is szenvedhetnek, hiszen ezek mindegyike különböző típusú neuronokkal van kapcsolatban, és funkciójuk a támogatott neuron típusára nézve specifikus. A legismertebb ezen asztrociták közül a Bergmann glia, amelynek szerepe a cerebellum fejlődésében és a Purkinje neuronok szinaptogenezisének támogatásában már jól ismert. Arról, hogy mekkora jelentőségük lehet a Bergmann gliáknak, egy nemrég született publikáció árulkodik a leginkább, ahol a boncolást követően kimutatták, hogy csak ezek a fajta asztrociták vannak gyulladásos állapotban SCA 1, 2 és 7 esetében (37). A gyulladásos folyamat a JNK aktivációjával indul, ami a c-Jun transzkripciós faktor foszforilációjához vezet, ami pedig Interleukin-1 β (IL-1 β) kiválasztását idézi elő a Bergmann glia sejtekben. Az IL-1 β ataxia indukáló hatását már számos állatmodellben kimutatták. Receptora a Purkinje sejtek szómáján fejeződik ki, így kívülről beadva vagy a mikroglia és asztrocita sejtekből felszabadulva a Purkinje sejtek károsodásához, vagy akár elhalásához is vezethet (38)(39)(40). A jelátvitel gátlásával csökkenthető a gliaaktiváció, ezáltal csökkenthető a Purkinje sejtek elhalása is. Ezen cerebellum specifikus glia sejtek azonban nem vizsgálhatóak olyan rendszerekben, mint a korábban említett kortikális organoid modell, amit SCA 3 hiPSC-ből hoztak létre a szerzők (5), hiszen abban vagy ki sem alakulnak cerebelláris asztrociták, vagy ha ki is alakulnak, a kortikális asztrocitáktól nem jól elkülöníthetőek, így specifikus vizsgálatuk gyakorlatilag lehetetlen. Ugyanez igaz a betegség specifikus hiPSC-kből létrehozott 2 dimenziós neuronális monokultúrákra is. Tehát olyan cerebellum specifikus protokollok alkalmazására van szükség, ami lehetővé teszi a Purkinje neuronokon kívül a cerebellumra jellemző egyéb sejtek kialakulását is, valamint struktúrájában is tükrözi az *in vivo* körülményeket, reprodukálva ezen sejtek egymáshoz viszonyított térbeli elhelyezkedését. Ezeknek a feltételeknek a Nayler *et al.* és a Silva *et al.* cerebelláris organoid protokollok felelnek meg leginkább, bár mindkét esetben közel három hónapig tart, mire az organoidokban érett asztrociták is kimutathatóvá válnak.

3. CÉLKITŰZÉSEK

A dolgozat általános célja egy olyan *in vitro* háromdimenziós sejttenyésztési eljárás (organoid) kidolgozása volt, amely lehetővé teszi a humán cerebellumra jellemző sejttypusok, mint például a Purkinje neuronok és a Bergmann glia sejtek egyszerre történő tanulmányozását annak érdekében, hogy a cerebellum megbetegedéseit az összes patológiában érintett szereplő egymásra hatását figyelembe véve vizsgálhassuk. Annak érdekében, hogy ez az általános cél megvalósuljon, a következő specifikus célokat tűztük ki:

1. A kiindulási sejt vonal pluripotenciájának ellenőrzése.
2. Differenciációs protokoll beállítása, ami lehetővé teszi cerebelláris organoidok indukált pluripotens őssejtekből való létrehozását.
3. A létrehozott cerebelláris organoidok minőség-ellenőrzésére egy immuncitokémiai vizsgálati panel felállítása.
4. Cerebelláris ataxia kiváltására alkalmas kezelés beállítása és sejttypus specifikus hatásának vizsgálata.

4. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

4.1. Humán pluripotens őssejtek tenyésztése és differenciáltatása

Az általunk használt humán indukált pluripotens őssejtvonal (hiPSC) egészséges újszülött köldökszinórvéréből származott. (1. táblázat).

A sejteket extracelluláris mátrixszal (Geltrex, Thermo Fisher Scientific, A1413302) bevont tenyésztőedényekbe ültettük ki, és StemFlex médiumban tartottuk fenn (Thermo Fisher Scientific, A3349401). A sejteken a médiumot naponta cseréltük és 70-80% konfluencia elérésekor passzáltuk őket. A passzáláshoz 0,5 mM EDTA-t (Thermo Fisher Scientific, Invitrogen, 15575038) használtunk. Organoid differenciáció indításához a sejteket egysejtes állapotúra emésztettük Accutase segítségével (Corning, ACC-1B) és 10000 vagy 20000 sejtet Stemflex médiumban olyan tenyésztőfelületre ültettünk, ami nem támogatja a kitapadást (ultra low attachment: Merck-Millipore, CLS7007-24EA), ezáltal elősegíti a 3D szferoidok kialakulását. Az egysejtes állapotban való túlélés elősegítése érdekében, illetve az iPSC kolóniák fagyasztásból való visszavétele esetén is Rock-Inhibítort (Tocris, Y-27632) használtunk 10 μ M végkoncentrációban.

1. táblázat: Az általunk használt őssejtvonal legfőbb jellemzői

Sejtvonal neve	Mutációk	Kor	Nem	Klinikai jellemzők	Sejt eredet	Kariotípus kezdetben/ Passzálás után	Újraprogramozás	Katalógusszám
EpiC	Nincs	Újszülött	Nő	Egészséges	Köldökszinórvér	46,XX-100% (100%)	Episzómális	Thermo Fischer (A18945)

4.2. Általunk használt médiumok összetétele

Elsőnek gfCDM (growth factor-free chemically defined medium, növekedési faktor mentes ismert összetételű médium) tápfolyadékot használtunk az organoidok differenciáltatásához, melynek összetevői: Ham's F12 (Gibco, 21765-029), IMDM (Gibco, 12440-046), lipid koncentrátum (1 v/v%) (Gibco, 11905-031), monothioglicerol (450 μ M) (Sigma, M6145), apo-transzferrin (15 μ g/ml), BSA (5 mg/ml), inzulin (7 μ g/ml) (Sigma, SLCF8083), P/S (0,5 v/v%, penicillin/streptomycin).

A későbbiekben ezt N2B27 médiumra cseréltük, amit 10% KnockOut Serum Replacement-tel (KOSR) (Thermo, 10828010) egészítettünk ki. Összetevői: DMEM-F12 (Gibco, 31331-028),

fenolvörös mentes Neurobasal (Gibco, 12348-017), N2 supplement (Thermo, 17502048), A-vitamin mentes B27 (Thermo, 12587010), NEAA (Gibco, 11140-035), Glutamax, Beta-Merkaptoetanol (Gibco, 31350-010), inzulin, P/S.

A huszadik napon az N2B27 médiumot lecseréltük IDM-re (Improved Differentiation Medium, továbbfejlesztett differenciációs médium) melynek összetevői: DMEM-F12, Neurobasal médium (Gibco, 21103-049), N2 supplement, A-vitaminos B27, NEAA, Glutamax, Beta-Merkaptoetanol, inzulin, Hepes puffer, C-vitamin, P/S.

4.3. IL-1B kezelés menete

A kezelést az 50. napon kezdtük el és 72 óráig tartott. 10 ng/ml-es koncentrációban alkalmaztunk IL-1 β -t (PeproTech, 200-01B) cerebelláris organoidokon. 36 óra után az IL-1 β lebomlása elkerülése érdekében lecseréltük a tápfolyadékot a kezelt és a kontroll mintákra is.

4.4. Méretmeghatározás

A differenciáció során különböző időpontokban meghatároztuk az organoidok átlagos átmérőjét, így követve az organoidok növekedését. Az organoidokról először Olympus CKX 41 mikroszkóppal felvételeket készítettünk az 1., 4., 6., 12., 16., 20., 28., és 35. napokon, majd az átlagos átmérő meghatározásához az *ImageJ* szoftvert (<https://imagej.nih.gov/ij/download.html>) használtuk: az organoid által lefedett terület kijelölése után (region of interest, ROI) a „Measure” funkcióval meghatároztuk az organoidok által lefedett pixelek számát (Area) a következő képlettel alakítottuk pixelben megadott átmérővé:

$$\text{átmérő [pixel]} = \sqrt{4x/\pi}$$

$$x = \text{lefedett pixelek száma}$$

A pixelben megadott átmérőt a következő egyenlettel alakítottuk át μm -re:

$$200 \mu\text{m} = 230 \text{ pixel}$$

$$\text{átmérő } [\mu\text{m}] = \frac{y * 200}{230}$$

$$y = \text{átmérő pixelben megadva}$$

4.5. Áramlási citometria vizsgálat

A vizsgálat sikeres elvégzéséhez a differenciálatlan összejttelepeket egysejtes állapotra emésztettük Accutase segítségével. Az így kapott sejteket 0,5% marha szérum albumint (bovine serum albumin, BSA) tartalmazó foszfáttal pufferolt sóoldat (Phosphate Buffered Saline, PBS, Sigma, D8537) mostuk, és 30 percig 37°C-on inkubáltuk SSEA4-APC (R&D Systems, FAB1435A-025) antitestet tartalmazó oldattal, ami a pluripotens sejtekhez képes kötődni. Izotípus kontrollként IgG3-APC-t (R&D Systems, IC007A) használtunk. A már nem élő sejteket Zombie Violet (BioLegend, 423113) festékkel való jelölődés alapján kapuztuk ki és az SSEA4 pozitivitást kizárólag Zombie Violet negatív események esetében vizsgáltuk. A kísérlet során az Attune™ NxT Acoustic Focusing Cytometer készüléket használtuk.

4.6. Immunfestés

4.6.1. Konfokális kamra

A sejteket Geltrexszel bevont konfokális kamrába (Ibidi, 80826) ültettük ki, majd a megfelelő konfluencia elérése után 12 percig fixáltuk 4% paraformaldehidet (PFA) tartalmazó PBS-sel (Sigma, D8662). A blokkoláshoz 10% szamár szérumot (normal donkey szérum, Sigma, D9663) és 0,3% Triton X-100-at (Sigma, T8787) tartalmazó PBS oldatot használtunk. Két elsődleges ellenanyagot használtunk, melyek az OCT3/4 és Nanog fehérjéket jelölték. 1 órát 4°C-on a sejteken hagytuk, majd PBS mosás után két másodlagos ellenanyagot alkalmaztunk: szamárban termeltetett egér ellenanyag (D α M) melyet 488 nm hullámhosszon gerjesztettünk, és szamárban termeltetett kecske antitest (D α G) amit 594 nm hullámhosszon tudunk gerjeszteni. Mosást követően 15 percig 1 mM-os DAPI-val inkubálva festettük meg a sejtmagokat. A dolgozatban használt képeket Olympus CKX41 típusú mikroszkóppal, és az ehhez társított számítógépen lévő Cell A nevű szoftverrel készítettük el. Az így kapott eredményeket a CellProfiler nevű programmal (<https://cellprofiler.org/>) értékeltük ki (41)(42).

4.6.2. Teljes organoid immunfestése

Az organoidokat a 16. napon lefixáltuk. Az organoidok kis mérete miatt a „whole mount” technikát választottuk az immunfluoreszcens vizsgálat módszeréül. Ehhez az organoidokat 45 percre 4% PFA/PBS-be tettük, majd PBS-sel mostuk. A kiválasztott ellenanyagnak megfelelően, 10%-os szamár vagy kecske szérumot (Sigma, G9023) és 0,3% Triton X-100 tartalmazó PBS-ben 1 órát blokkoltuk, majd a kiválasztott elsődleges ellenanyaggal együtt a

mintát 4°C-ra helyeztük egy éjszakára. Másnap PBS-es mosást követően ráhelyeztük a megfelelő másodlagos ellenanyagot és 4 órát inkubáltuk szobahőn. Ezt követte a DAPI festés. A festéket 30 percig hagytuk a mintákon 1 µM-os koncentrációban, amit egy mosási lépés követett. Ezután az organoidokat tárgylemezre (Epredia, Superfrost Plus Adhesion Microscope Slides, J1800AMNZ) helyeztük. FluoSave (Merck, 345789) használatával biztosítottuk a mintán lévő másodlagos fluoreszcens ellenanyag stabilitását, majd rátettük a fedőlemezt és száradni hagytuk. Az elkészült mintákat Zeiss LSM 710 konfokális mikroszkóppal és Zeiss LASOS RMC 7812 Z2 lézer segítségével néztük meg és fotóztuk le (szoftver: ZEN 2011). A képeket a CellProfiler programmal értékeltük ki.

4.6.3. Organoidok fagyasztva metszése

A 21. napos kort elérő organoidok immunfestésére nagyobb méretük miatt a fagyasztva metszés módszerét alkalmaztuk, így biztosítva az ellenanyagok megfelelő penetrációját.

2. táblázat: Immunfestéshez és western blot analízishez használt ellenanyagok és hígításuk. Magyarázat a másodlagos jelöléshez használt ellenanyagokhoz: D: számárban termeltetett, G: kecskében termeltetett, αG: kecske elleni, αRb: nyúl elleni, αM: egér elleni, αCh: csirke elleni.

Elsődleges jelöléshez használt ellenanyag (termelő állat)	Használt hígítás		Elsődleges ellenanyag katalógus-szám	Másodlagos jelöléshez használt ellenanyag	Gerjesztéshez használt hullámhossz [nm]	Használt hígítás	Másodlagos ellenanyag katalógus-szám
egér OCT3/4	1:200		SC-5279	DαG	488	1:300	AB150133
kecske NANOG	1:200		AF1997-SP	DαG	568	1:300	ab175704
kecske SOX2	1:200		AF2018	DαG	647	1:300	ab150131
nyúl Nestin	1:200		N5413-100UG	DαRb	568	1:300	AB175693
egér PAX6	1:200		A249566	DαM	488	1:300	AB150109
egér KIRREL2	1:200		MAB2564	DαM	647	1:300	AB175693
nyúl GBX2	1:200		A92048	DαM	568	1:300	AB150175
kecske KIRREL2	1:200		AF2930	GαRb	488	1:300	AB150081
nyúl SOX9	1:200		A13994	GαM	568	1:300	AB175701
egér NeuN	1:200		A85405	GαCh	647	1:300	AB150175
csirke Calbindin	1:800		A85359	egér HRP		1:5000	SA00001-1
csirke GFAP	1:800		A85307	nyúl HRP		1:5000	SA00001-2
csirke MAP2	1:200		A85363	egér GFAP		1:5000	60190-1-Ig
egér P62	ICC: 1:200	Western blott: 1:1000	AB56416	egér TUJ1		1:1000	AB9354

A metszéshez az organoidokat 45 percre 4% PFA/PBS-be tettük, majd PBS-sel mostuk. Hármassával OCT-be (VWR Chemicals, 361603E) ágyasztuk, majd szárazjégre tettük dermedésig. A metszéshez a Microm HM 505 N típusú fagyasztva metsző készüléket használtuk. A 12 μm vastagságú metszetekből egy tárgylemezre három különböző síkból származó metszetet tettünk, amik a 3 beágyazott organoid alsó, középső és felső részét reprezentálták. A metszeteket -20°C -on tároltuk felhasználásig. Felhasználáskor PBS-sel mostuk, majd a tárgylemezen a mintákat lipid tollal (Vector, H-4000) körberajzoltuk. A lipid réteg megszáradása után párástó kamrába helyeztük a metszeteket, ahol 45 percig 10%-os szamár vagy kecske szérumot és 0,3% Triton X-100-at tartalmazó PBS-ben blokkoltuk szobahőmérsékleten a mintákat. Ezt követően az elsődleges ellenanyagot 4°C -on inkubáltuk a metszeten egy éjszakán keresztül. Másnap mosást követően ráértük a másodlagos ellenanyagot, amit 1 órán keresztül hagytunk a mintákon szobahőn, szintén a párástó kamrában. Ezután következett a DAPI festés, amit 15 percig hagytunk rajta a mintákon, 1 μM -os koncentrációban. Mosást követően a tárgylemezre FluoSave-vet cseppentve letakartuk a fedőlemezzel. Száradás után konfokális mikroszkóppal vizsgáltuk meg a kész mintákat, és a szokásos módon értékeltük.

4.7. Western blot

Az organoidokban lévő fehérjék western blot méréséhez a mintákat az adott napon elkészítettük. PBS-es mosás után 10% foszfatáz és proteáz inhibitor (Thermo Fisher Scientific, A32961) tartalmazó RIPA lízis puffert (Sigma-Aldrich, R0278) mértünk az organoidokra, és jégen hagytuk addig amíg el nem emésztődtek (1-2 óra). Ezután 4°C -on, 25 percig 13000 g-n centrifugáltuk, majd a felülúszót leszívtuk, -80°C -on tároltuk.

Annak érdekében, hogy a feldolgozott minták mindegyikéből azonos mennyiségű fehérje kerüljön a gélre, megmértük azok fehérjetartalmát a BCA Protein Assay Kit (Thermo, 23227) segítségével, annak a gyártó által megadott használati utasításait követve. Az összemért reakciót mikrolemes-olvasóval mértük le, 550 nm hullámhosszú gerjesztést használva (Perkin Elmer Enspire). 10, illetve 20 μg fehérjét mértünk ki, amit 30, illetve 60 μl végtérfogatra egészítettünk ki DNase és RNase mentes víz, NuPAGE™ LDS Sample Buffer (4X) (Thermo, NP0007) és NuPAGE™ Sample Reducing Agent (10X) (Thermo, NP0009) hozzáadásával. A mintákat 5 percig 95°C -on tartottuk, hogy a fehérjeink denaturálódjanak. A gélre (Thermo Fiser Scientific, Invitrogen, NP0322BOX) 22 μl mintát vittünk fel zsebenként. A Thermo XCell SureLock Mini-Cell elektroforézis készülékében 100 V-on futtattuk a mintákat, amíg elhagyták

a zsebet (30 perc), majd 150 V-ra emeltük fel és addig hagytuk futni, amíg a felvitt minták el nem érték a gél alját (80 perc). Ezután a gélről a metanolban aktivált PVDF membránra vittük át a fehérjéket, 30 V-on 55 percen keresztül.

A gél coomassi blue (Ferak Berlin, 81791) festésével ellenőriztük, hogy mennyi fehérje maradt a gélben, és csak olyan membrán jelölését végeztük el, ahol a fehérjék gélről membránra történő átjutása egyenletesnek mutatkozott.

A membránon az aspecifikus kötőhelyeket 5% zsírmentes tejpor pufferben blokkoltuk 1 órán át, az elsődleges ellenanyagot 1% tejpor pufferbe oldottuk be és éjszakára 4°C-on a membránon hagytuk. A másodlagos ellenanyagokat 1 órát hagytuk membránon szobahőmérsékleten. β -aktin jelöléséhez közvetlenül konjugált ellenanyagot használtunk (Proteintech, HRP-60008), 1 órás inkubációs idővel, 1:20000 hígításban. Az előhíváshoz Cytiva ECL Prime készletet (RPN2232) használtuk. A felhasznált ellenanyagok típusát és hígítását a 2. táblázat foglalja össze.

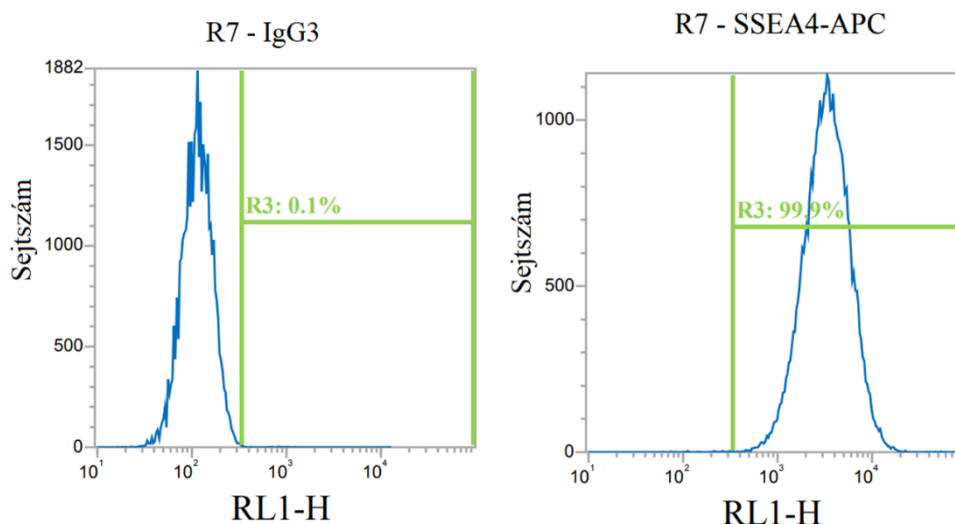
A képek analizálására az ImageJ nevű szoftvert alkalmaztuk, ahol a fehérjesávok denzitását β -aktin denzitására történő normalizálás után ugyanazon a bloton belül a kontrollhoz mért változásként fejeztük ki.

5. EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK

5.1. Pluripotencia vizsgálata

5.1.1. Pluripotencia vizsgálata áramlási citometriával

A sejtek pluripotens állapotának igazolására az SSEA4 sejtfelszíni markermolekulát választottuk, kontrollnak pedig IgG3 molekulát használtunk. A vizsgálat során kizárólag a Zombie Violet viabilitás festékre negatív, sejt méretű események SSEA4 jelét vettük figyelembe. Így az élő hiPSC sejtek 99,9%-a volt SSEA4 pozitív (1. ábra). A sejtek pluripotens állapotát azonban érdemes többféle marker együttes vizsgálatával ellenőrizni, így további immunfestési vizsgálatokat is végeztünk.

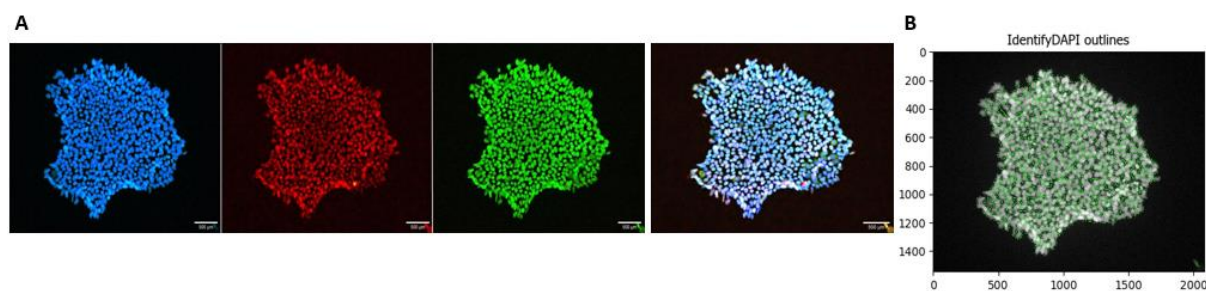


1. ábra: A hiPSC sejtek pluripotenciájának igazolása IgG3 és SSEA4 jelölés áramlási citometriával történő vizsgálatával.

5.1.2. Pluripotencia vizsgálata immunfestéssel

A pluripotencia vizsgálatára az OCT3/4 és NANOG transzkripciós faktorokat választottuk (3). A fluoreszcens mikroszkóppal készített képeket (2. ábra A panel) CellProfiler szoftverrel értékeltük ki úgy, hogy a DAPI-t elsődleges objektumnak, az OCT3/4-et, illetve NANOG-ot másodlagos objektumnak tekintettük és így a két pluripotencia markert a DAPI pozitív magokra normalizálva kvantifikáltuk (2. ábra B panel). A sejtek 100%-a lett OCT3/4 pozitív és 95%-a lett NANOG pozitív. Az eredmények megerősítették a korábban áramlási citometriával

bizonyítottakat. Tehát megállapítható, hogy az általunk használt sejtvonal pluripotens állapotban került felhasználásra.

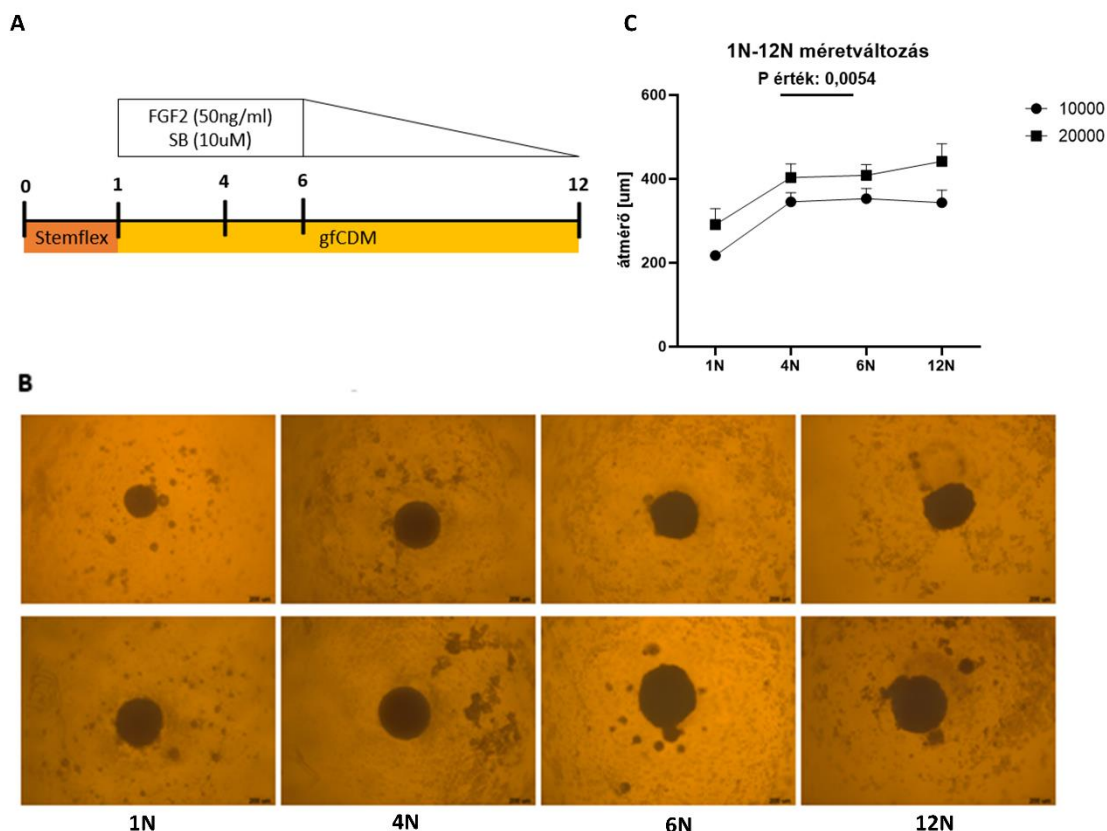


2. ábra: A hiPSC sejtek pluripotenciájának igazolása immunfestéssel. **A panel:** OCT3/4 és NANOG fehérjék immunfestésének eredménye. Kék csatorna: DAPI, piros csatorna: NANOG, zöld csatorna: OCT3/4. **B panel:** Cell profiler szoftveres sejtfelismerés magi lokalizációjú fehérje (DAPI) esetében.

5.2. Organoid indítási sejtszám meghatározása

Munkám első lépéseként az irodalomból ismert Silva *et al.* protokoll laborunkban történő beállítását tűztem ki célul. Az organoid tenyészetek létrehozása és fenntartása egy hosszú és költséges folyamat, így fontos olyan minőség-ellenőrzési lépések beiktatása, amik már korai stádiumban előre jelzik a differenciáció alakulását. A Silva *et al.* protokoll esetében a szerzők szerint a megfelelő differenciálódás akkor érhető el, ha az FGF2 és SB431542 kezelést akkor kezdjük meg, amikor a 3D aggregátumok elérik a 200-250 μm -es átmérőt és ha a differenciáció első 5-10 napjában megfelelően növekednek.

Az aggregátumok megfelelő méretének beállításához két kezdeti sejtszámot hasonlítottunk össze. A tíz- és húszeszes sejtszámmal indított csoportot tizennégy napig tartottuk fent a 3. ábra A paneljén sematikusan ábrázolt protokoll szerint. A differenciáció során felvételeket készítettünk az 1., 4. 6. és 12. napokon (3. Ábra B panel), majd a kapott átmérőket összehasonlítottuk (3. Ábra C panel). A kezdeti sejtszámot a kísérleteinkhez húszezer sejtre állítottuk be, mivel a tízeszes sejtszámmal csak épphogy elértük a Silva *et al.* protokoll által meghatározott 200 μm -es átmérőt (3. ábra). A továbbiakban ennek megfelelően minden organoid differenciációhoz húszezer sejtet alkalmaztunk. Míg az elsőről a 4. napra még megfigyelhető volt az aggregátumok növekedése, onnantól kezdve méretbeli stagnálás következett be, a 6. napon pedig már az aggregátumok szélén sejtelhalás jelei voltak megfigyelhetők.

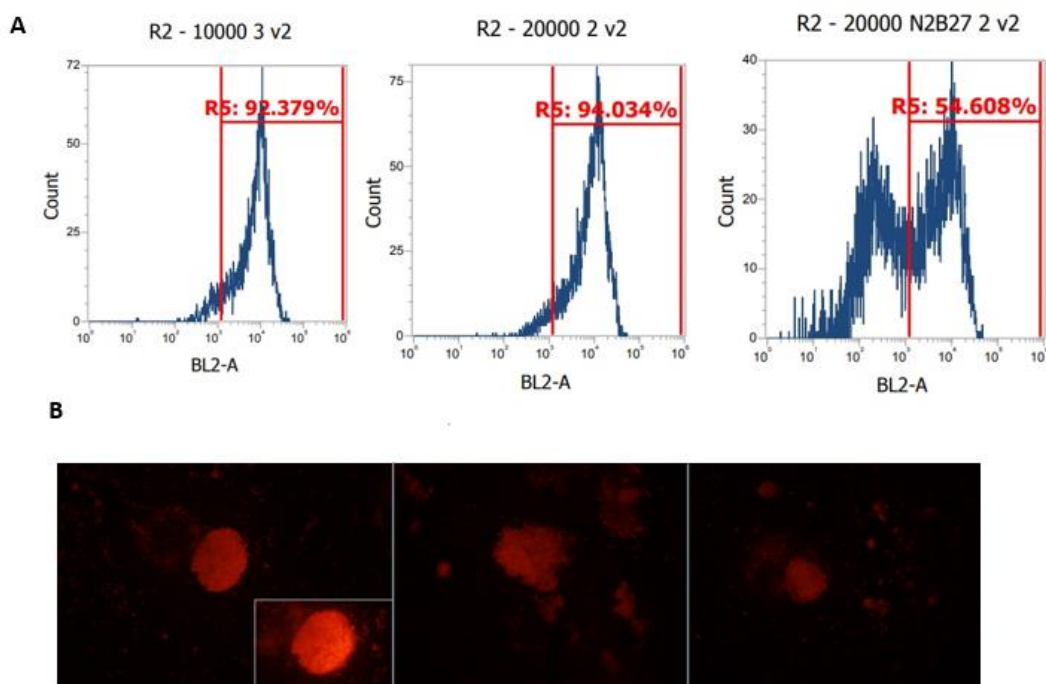


3. ábra: Organoid tenyészetek létrehozása. **A panel:** Kezdetben használt kondíció sematikus ábrája (eredeti Silva et al. protokoll) **B panel:** Felső sor: tízezer sejtszámmal indított organoidok, alsó sor: húszezer sejtszámmal indított organoidok 1N-12N-on A lépték 200 μm-nek felel meg. **C panel:** Két eltérő sejtszámmal indított organoidok méretösszehasonlítása 1N-től 12N-ig. Egy indításból származó organoidok adatai kerültek ábrázolásra, 10 ezer sejt esetében $n=8$, 20 ezer sejt esetében $n=5$.

5.3. Az eredeti protokoll sejtelhalást okoz

A Silva et al. protokollt követve egy ismert összetételű médiumot, a gfCDM-et használtuk (3. ábra A panel) (16). Mivel a 6. napon azt tapasztaltuk, hogy az organoidokat alkotó sejtek egy része elhal, néhány organoid gfCDM tápfolyadékát lecseréltük N2B27 médiumra, amit rutinszerűen használ a csoportunk kortikális és spinális organoidok fenntartásához. A sejteket ezután a 14. napon megfestettük propidium-jodid (PI) és áramlási citométerrel (4. ábra A panel), illetve fluoreszcens mikroszkóppal (4. ábra B panel) ellenőriztük a halott sejtek arányát. A gfCDM tápfolyadék esetében a sejtek több, mint 92%-t, míg a 6. naptól N2B27-ben tartott organoidok esetében a sejtek csupán 55%-át veszítettük el. Tehát megállapíthatjuk, hogy azok a sejtek nagyobb arányban éltek túl, amelyek esetében a médiumot gfCMD-ről lecseréltük N2B27-re. Mivel az eredeti Silva et al. protokoll nem váltotta be a hozzá fűzött reményeket,

így egy olyan új protokoll kidolgozását tűztük ki célul, ami a mi kezünkben is megbízhatóan működik.



4. ábra: A sejtpusztulás igazolása propidium jodidos festéssel. **A panel:** A propidium-jodidos festés áramlási citometriás vizsgálatának eredménye. **B panel:** Propidium-jodiddal jelölt organoidok fluoreszcens mikroszkópos képe.

5.4. Protokoll optimalizálás

Az optimalizálás érdekében többféle változtatást eszközöltünk az eredeti protokollon és a differenciáció első 21 napjában vizsgáltuk a változtatások eredményességét. Monitoroztuk az organoidok megfelelő növekedését, és kidolgoztunk egy immunfestésekre alapuló minőségellenőrzési lépést, ami alapján eldönthető, hogy melyik kondíciót tartjuk a leghatékonyabbnak. Az általunk összehasonlított protokollokban közös volt, hogy nulladik napon (0N) Stemflexben lettek elindítva, amit Rock Inhibitor-ral egészítettünk ki, 1 μ M koncentrációban. A neuronális indukciót a fibroblaszt növekedési faktor 2 (fibroblast growth factor 2, FGF2) hozzáadásával váltottuk ki, míg a mezodermális utódsejtek visszaszorítása érdekében SB431542-vel egészítettük ki a tápfolyadékot. A negyedik és hatodik napon lecseréltük az organoidokon a tápfolyadékot, de a hatodik napon már 66%-ra csökkentettük a negyedik napi koncentrációt és a 12 napig nem cseréltünk többször tápfolyadékot, így elérve, hogy a növekedési faktorok koncentrációja lecsökkenjen.

A cerebelláris progenitor zónák kialakulásának folyamatát a tizenkettedik naptól 100 ng/ml koncentrációjú FGF19-cel támogattuk, valamint 20. naptól IDM tápfolyadékot kaptak az

organoidok, ami már tartalmaz A vitamint, az anterior-poszterior irányú fejlődést szabályozó retinolsav előalakját.

Az öt általunk alkalmazott protokoll azonban számos ponton lényegesen eltért egymástól:

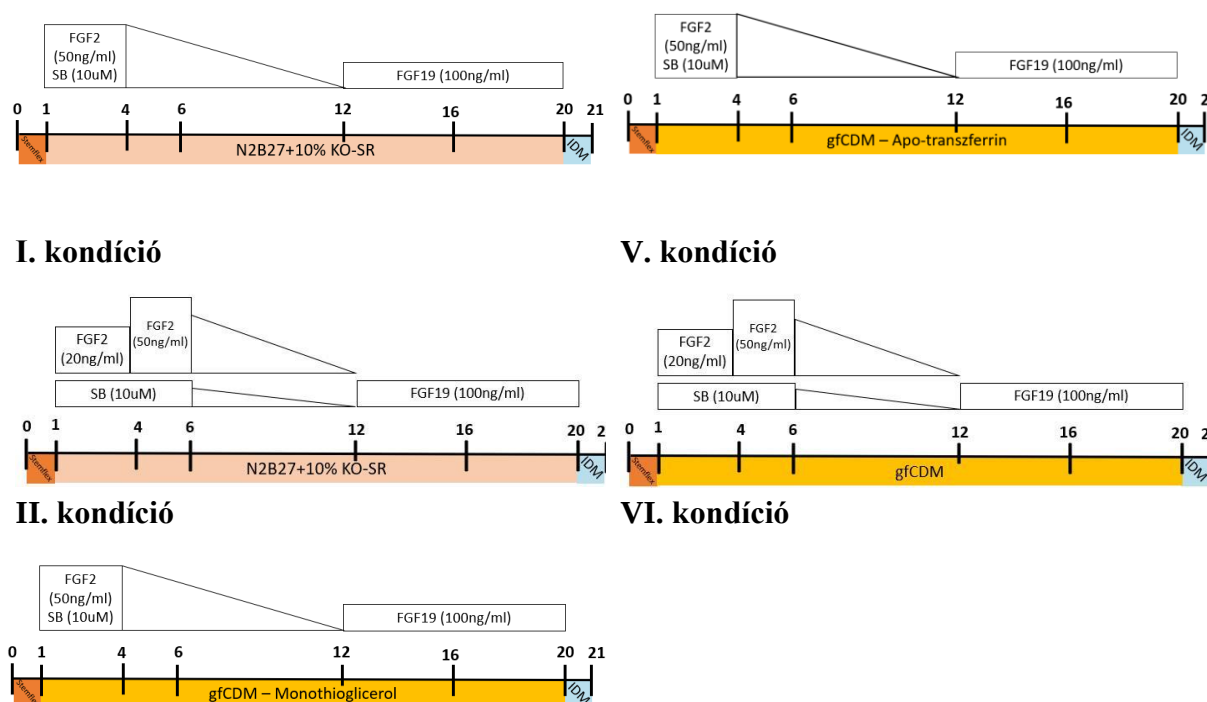
Az **I. kondíció** abban tér el a korábbi eredeti protokolltól, hogy a differenciáció 1N-től 20N-ig tartó időszakában N2B27 médiumot használtunk.

A **II. kondícióban** a kezdeti FGF2 koncentrációját lecsökkentettük a kiindulási érték 40%-ára, és N2B27 médiumot használtunk 1N-től, 20N-ig.

A **IV. kondícióban** az eredeti Silva *et al.* protokollt követtük, azzal a változtatással, hogy nem tettünk monothioglicerolt a médiumba, de tartalmazott apo-transzferrint.

A **V. kondícióban** a négyeshez hasonlóan, azt a protokollt vettük alapul, mint Silva *et al.*, annyi eltéréssel, hogy a médium apo-transzferin mentes volt, de tartalmazott monothioglicerolt.

A **VI. kondícióban** szintén gfCDM tápfolyadékot alkalmaztunk, viszont az eredeti FGF2 és SB431542 faktorok mennyiségét 40%-ra csökkentettük, hasonlóan, mint a II. kondícióban (5.ábra).



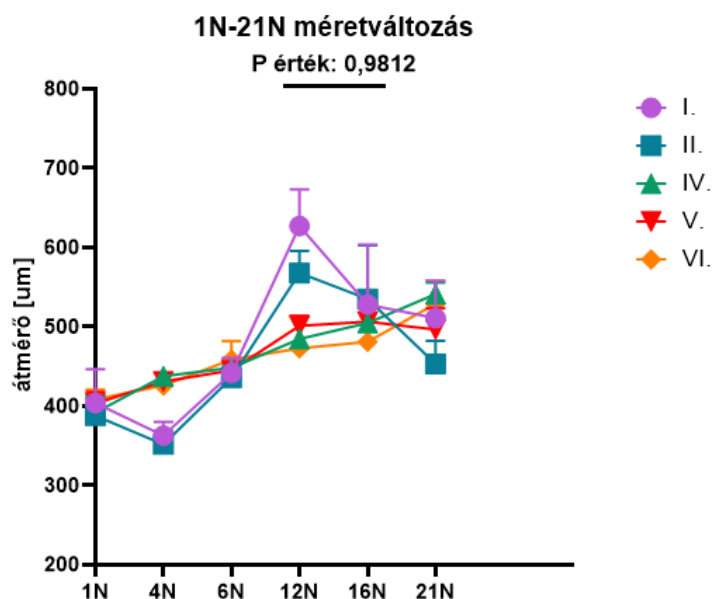
IV. kondíció

5. ábra: Az organoid differenciáltatás protokolljának optimalizálása. Kondíciók közti különbségek sematikusán ábrázolva, 0N-től 21N-ig.

A differenciáció során felvételeket készítettünk az 1., 4., 6., 12., 16. és 21. napokon, majd a kapott átmérőket összehasonlítottuk (6.ábra). Az aggregátumok folyamatos méretnövekedése alapján megállapítottuk, hogy az összes módosított protokoll megfelelő mértékben támogatja

az organoid formációt. A tizenkettedik napról a tizenhatodik napra megfigyelhető kisebb méretbeli csökkenés az I. és II. kondíció esetében, illetve stagnálás a többi kondíció esetében összefüggésben lehet azzal, hogy a 12N-on kerültek az organoidok FGF19-cel kiegészített médiumba, ami a progenitor zónák képződése által a sejtek tömörebb elrendeződéséhez vezet, ezáltal kompaktabbá téve az organoidokat.

Ahhoz, hogy megtudjuk melyik kondíció lesz a legmegfelelőbb a további kísérletekhez, minden kondícióból megvizsgáltunk a 16. és 21. napon is organoidokat: DAPI, SOX2, Nestin és PAX6 fehérjék immunfestésével ellenőriztük, hogy kialakulnak-e a differenciáció során a neuroepitél (SOX2, Nestin) és vele együtt a VZ (Nestin) és az RL (PAX6) radiális glia sejtjei.

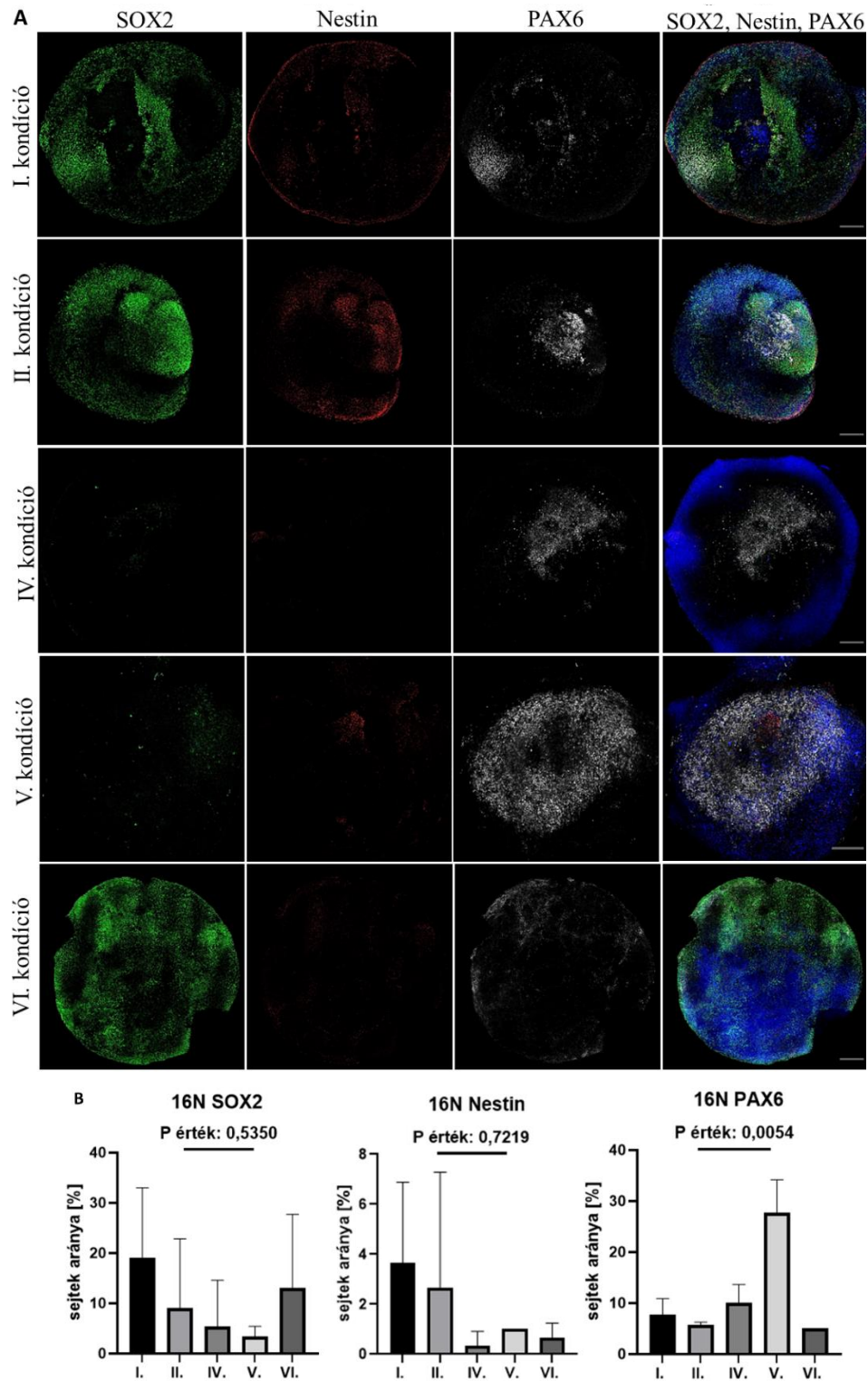


6. ábra: Méretváltozás követése 1N-től 21N-ig az 5 kondíció esetében. Az organoidok két külön indításból származtak, az I. és II. kondíció 1N-től 12N-ig 6, 16N-21N 5, a IV.-VI. kondíció 1N-től 12N-ig 3, 16N-21N 2 esete került ábrázolásra.

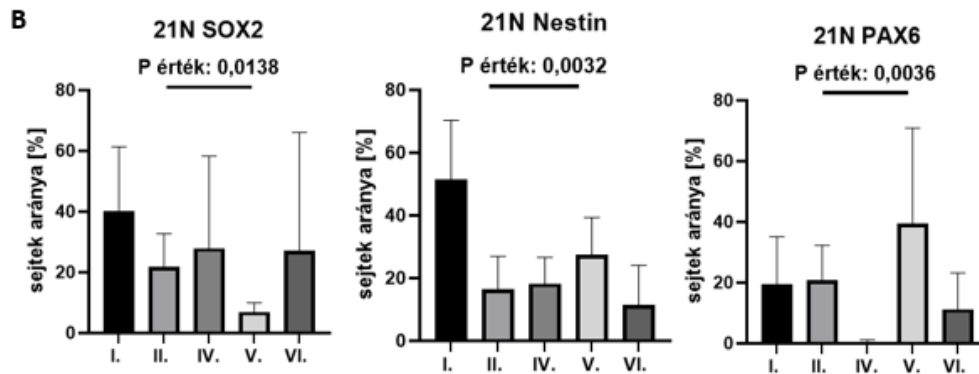
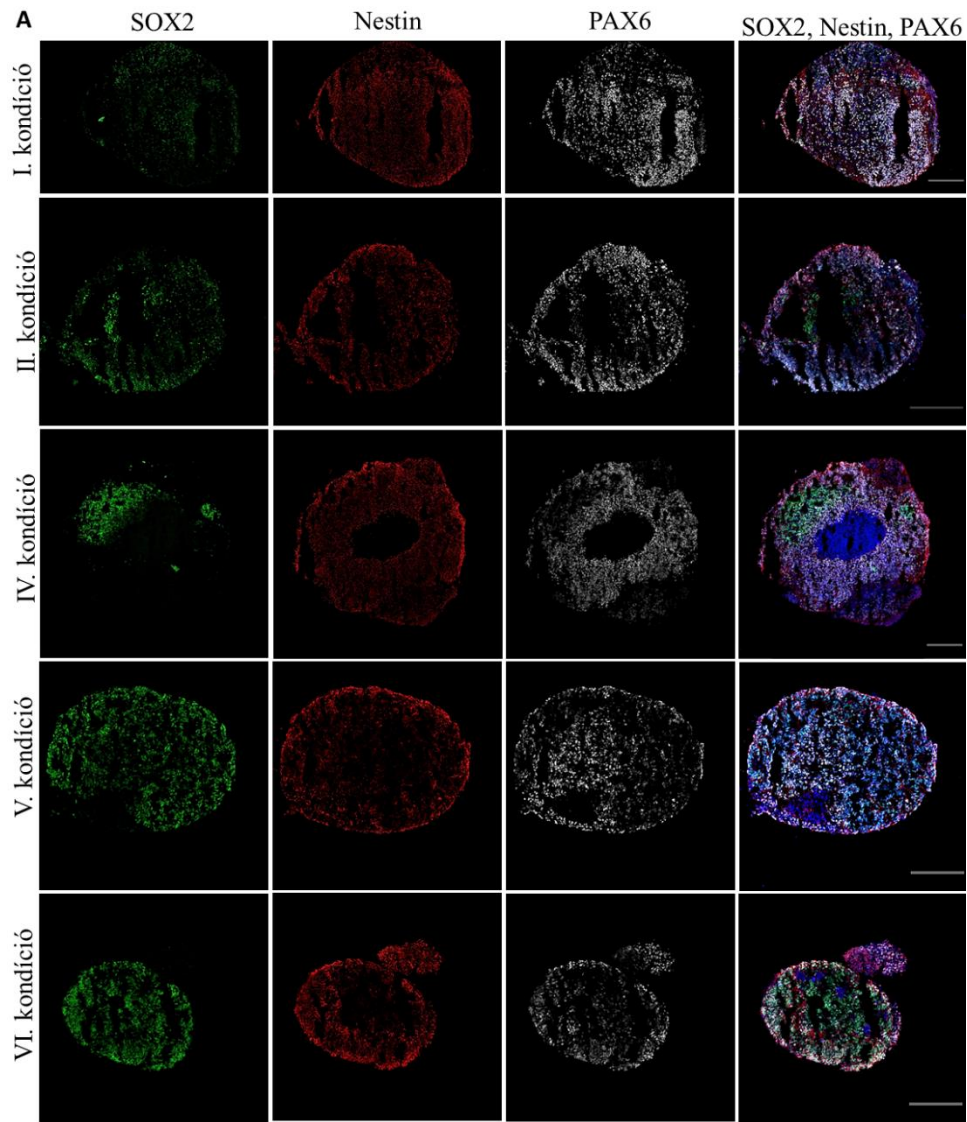
A 16N-on a három vizsgált markerre két eltérő protokoll bizonyult a legeredményesebbnek (7. ábra). SOX2 és Nestin marker esetében az I. kondíció, míg PAX6 szempontjából az V. kondíciónál találtuk a legtöbb, az adott markerre pozitív sejtet. Így vizsgálatainkat kiterjesztettük a 21. napra is abban a reményben, hogy további 5 nap differenciálódás segíteni fog eldönteni, hogy melyik kondíciót válasszuk a továbblépéshez. Ehhez a tizenhatodik naptól a korábbi, FGF19 tartalmú tápfolyadékkal megegyező körülmények között tenyésztettük tovább az organoidokat.

A 21N-on készült felvételek szoftveres analízise után a teljes sejtszámhoz (DAPI) hasonlítottuk az adott fehérjékre (Nestin, SOX2, PAX6) pozitív sejteket (8. ábra). Az I. kondíció kimagasló arányban tartalmazott SOX2 és Nestin pozitív sejteket a 21N-on, míg a PAX6 fehérje esetében

a II., és V. kondíció is több pozitív sejtet tartalmazott, mint az I-es kondíció. Ezek a kondíciók viszont SOX2 és Nestin markerek esetében sem voltak megfelelőek, valamint időközben az I-es kondíció esetében is megduplázódtak a PAX6 pozitív sejtek. Az eredmények alapján elmondható, hogy mindegyik protokoll neuronális irányba kezdett differenciálódni, viszont az I. kondíció esetében volt megfigyelhető legnagyobb arányban a vizsgált markerekre való pozitivitás, emiatt ezt a kondíciót választottuk ki a további vizsgálatok elvégzéséhez. Eredményeink arra is rávilágítottak, hogy az organoid differenciáció minőségének SOX2, Nestin és PAX6 markerek alapján történő ellenőrzésével érdemes legalább a 21. napig várni, hiszen addigra nagyjából megduplázódnak az egyes markerekre pozitív sejtek. Például az I-es kondíció esetében ~20%-ról ~40%-ra nőtt a SOX2-t expresszáló sejtek száma, ~6%-ról ~50%-ra a Nestin pozitivitás és ~10%-ról ~20%-ra pedig a PAX6-ot expresszáló sejtek száma.



7. ábra: SOX2, Nestin és PAX6 marker fehérjék kifejeződése a 16. napon a különböző protokollok szerint tenyésztett organoidokban. **A panel:** 16N immunfestés. A lépték 100 μ m-nek felel meg. **B panel:** A 16N-on készült immunfestés kvantifikáció eredményei a vizsgált fehérjékre külön megjelenítve. X tengelyen a kondíciók láthatóak, az Y tengelyen pedig a pozitív sejtek aránya, DAPI értékre normalizálva [%]. Az analízishez használt összesen 3 organoidok 2 indításból származott. A hibaszázlő a standard hibát (SEM) mutatja. A részletes P értékeket a függelék 3. táblázata tartalmazza.

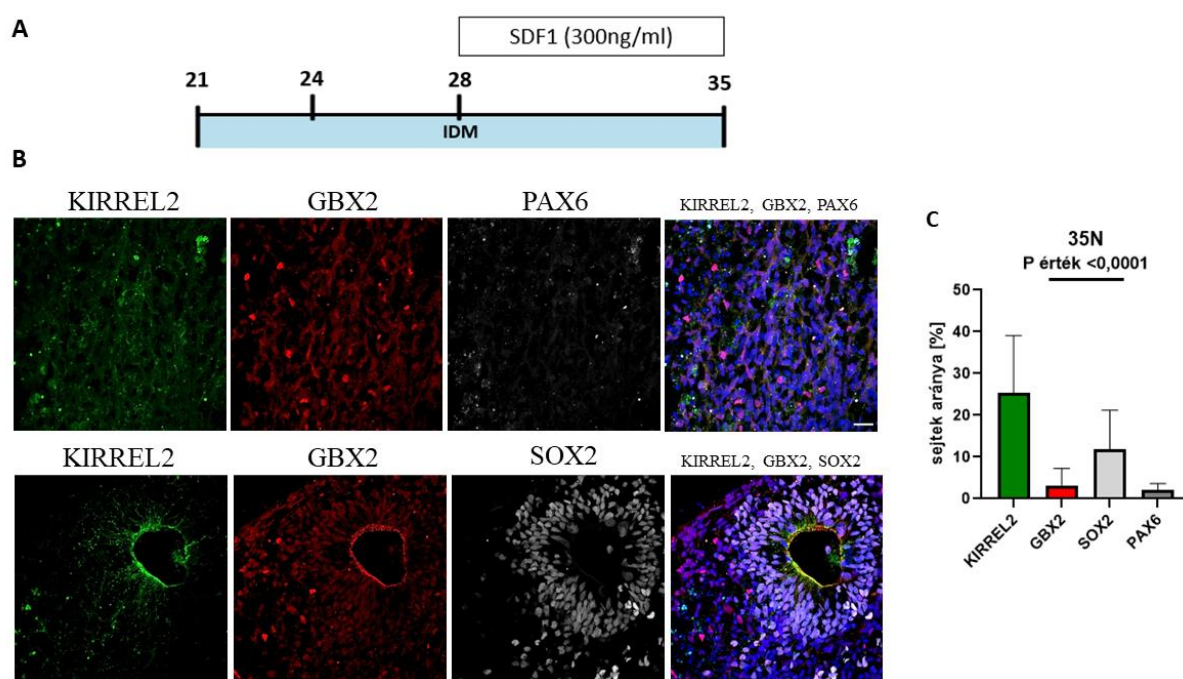


8. ábra: SOX2, Nestin és PAX6 marker fehérjék kifejeződése a 21. napon a különböző protokollok szerint tenyésztett organoidokban. **A panel:** 21N immunfestés. A lépték 100 μm -nek felel meg. **B panel:** A 21N-on készült immunfestés kvantifikáció eredményei a vizsgált fehérjékre külön megjelenítve. X tengelyen a kondíciók láthatóak, az Y tengelyen pedig a pozitív sejtek aránya, DAPI értékre normalizálva [%]. Az analízishez használt organoidok 2 indításból származtak, az I. és VII. kondíciók esetében 2 organoid és ezekről készült 6 kép, a II-VI. kondíció 3 organoid, és ezekről készült 9 kép eredményeit ábrázolják. A hibaszázlő a standard hibát (SEM) mutatja. A részletes P értékeket a függelék 4. táblázata tartalmazza.

5.5. Második minőség-ellenőrzési pont beállítása

A cerebelláris irányba való differenciálódás ellenőrzése érdekében fontosnak tartottunk beiktatni egy második minőség-ellenőrzési lépést is, aminek során a 35N-on fixált sejteken KIRREL2, GBX2, PAX6, és SOX2 fehérjemarkerek vizsgálatát végeztük el az I-es kondíció tovább differenciáltatott organoidjain. A differenciáció huszadik napján (20N) megváltoztattuk a médiumot IDM-re, amiben már A vitamin is van, ezzel támogatva a neuronok érését.

A továbbiakban a harmincötödik napig minden negyedik napon történt médium csere, amit a huszonnyolcadik napon 300 ng/ml koncentrációjú SDF1-gyel (stroma cell-derived factor 1) egészítettünk ki.



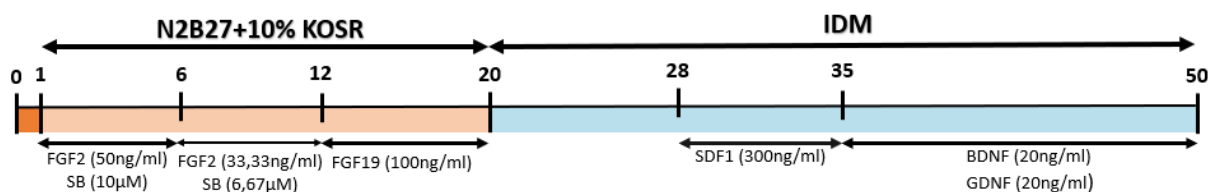
9. ábra: KIRREL2, GBX2, PAX6 és SOX2 markerfehérjék kifejeződése a 35. napon. **A panel:** 35N készült immunhisztokémiai felvételek. A sejtmagok DAPI festéssel (kék) kerültek kimutatásra. A lépték 20 μ m-nek felel meg. **B panel:** 21N-től 35N használt protokoll sematikus ábrázolása. **C panel:** Immunfestéssel készült képek analízise az I. esetén. A felhasznált organoid minták egy indításból származtak, KIRREL2 és GBX2 markerek esetén 7 organoid 40x nagyításából készült 22 felvétel, PAX6 esetében 4 organoidról 40x nagyításban készült 12 felvétel, és SOX2 esetében 3 organoidról készült 40x nagyításban 10 felvétel került ábrázolásra. A hibázászló a standard hibát (SEM) mutatja.

Ennek ellenére a PAX6 fehérjét kifejező sejtek mennyisége továbbra is alacsony maradt, mindössze 2%-ukban volt jelen ez a marker. A GBX2 fehérjét a sejtek 3%-ban találtunk. SOX2 fehérje esetében a sejtek 12%-a lett pozitív, míg KIRREL2 Purkinje-sejt fehérjét a sejtek 25%-ánál mutattunk ki (9. ábra). Ezek alapján az eredmények alapján arra a következtetésre

jutottunk, hogy a kidolgozott protokoll segítségével létrehozhatók a VZ utódsejtjei, ugyanakkor az RL kialakulásának kevésbé kedveznek a körülmények.

5.6 A cerebelláris differenciációs protokoll további optimalizálása

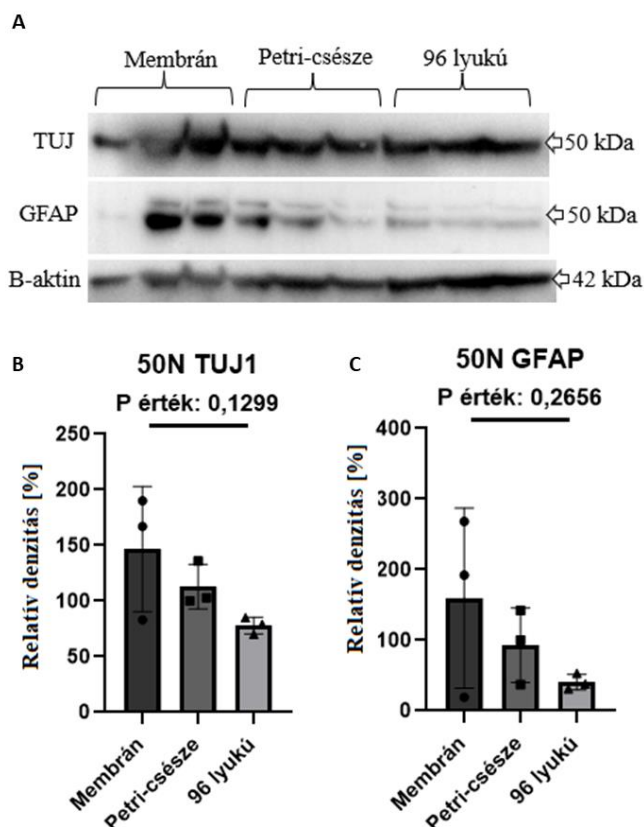
A VZ megfelelő fejlődésének további fenntartása érdekében a 35N-től az 50N-ig három eltérő tenyésztési körülményt hasonlítottunk össze. Az egyik csoportot magasított falú, öblösebb Petri-csészékbe helyeztük el, amit az inkubátorba helyezett körkörös rázatóra tettünk, csészénként 10-15 organoiddal, annak érdekében, hogy az oxigenizációt és a tápanyagok, illetve a növekedési faktorok bejutását az egyre növekvő organoidokba megkönnyítsük. Hasonló hatás elérését remélve egy másik csoportot ötösével egy tenyésztőedénybe illeszthető membrán inzerten (Millipore, PICMORG50) helyeztünk el, ami a tápfolyadék és a levegő határfelületén tartotta az organoidokat. A harmadik csoportba tartozó organoidokat nem helyeztük át, hanem a 96 lyukú tenyésztőedényben hagytuk őket, egyesével. A 35. naptól kezdődően a médiumot 20 ng/ml koncentrációban agyból származó neurotróf faktorral (Brain-derived neurotrophic factor, BDNF) és gliasejtből származó neurotróf faktorral (Glial cell-derived neurotrophic factor, GDNF) egészítettük ki. Ezt a Petri csészében és a 96 lyukú tenyésztőedényben 3 naponta, míg a membrán inzert esetében naponta frissre cseréltük. Az általunk kidolgozott protokollt, az indítástól a 50N-ig a 10. ábra illusztrálja.



10. ábra Az általunk kidolgozott protokoll sematikus ábrája 50N-ig.

A három különböző csoportba tartozó organoidokból az 50. napon western blottos analízishez és immunfestéshez mintát tettünk el.

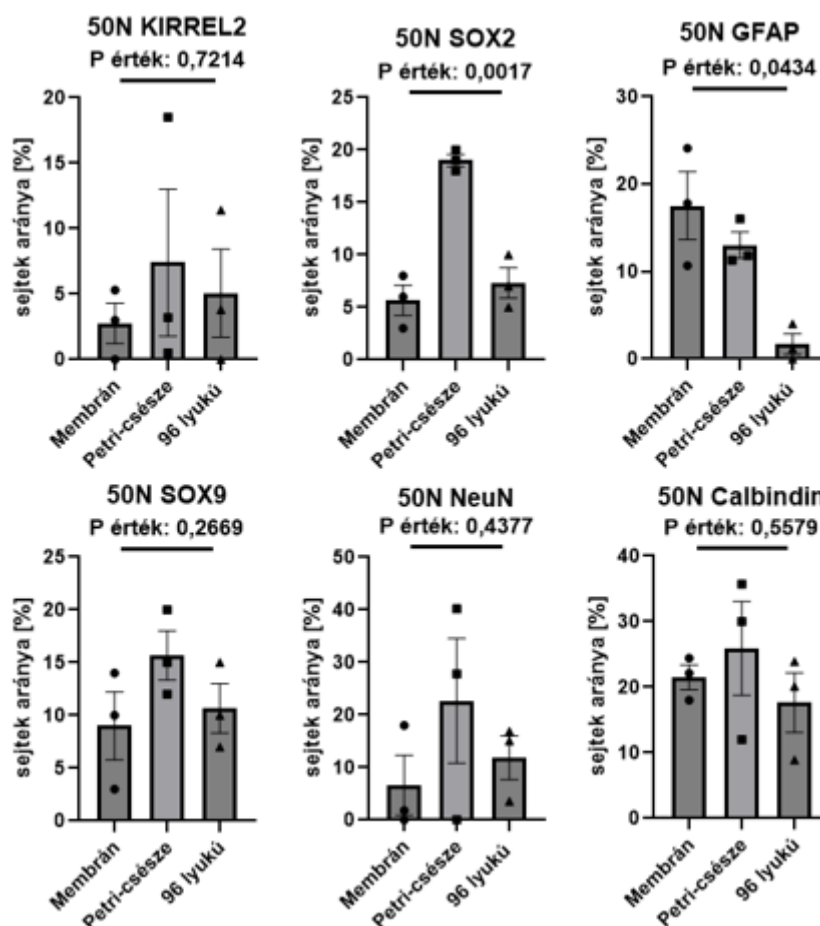
Az 50N-os organoidok fehérje összetételét először western blot analízissel vizsgáltuk meg a TUJ és GFAP fehérjék mennyiségére (11. ábra A panel). A TUJ fehérjével a neuronok, míg a GFAP markerrel az asztrociták mennyiségét hasonlítottuk össze a három kondíció szerint tenyésztett organoidokban. Az általunk vizsgált tenyésztési körülmények közül a membrán inzerten elhelyezett organoidokban volt a legmagasabb a neuronális (11. ábra B panel) és asztrocita (11. ábra C panel) marker fehérjék kifejeződése.



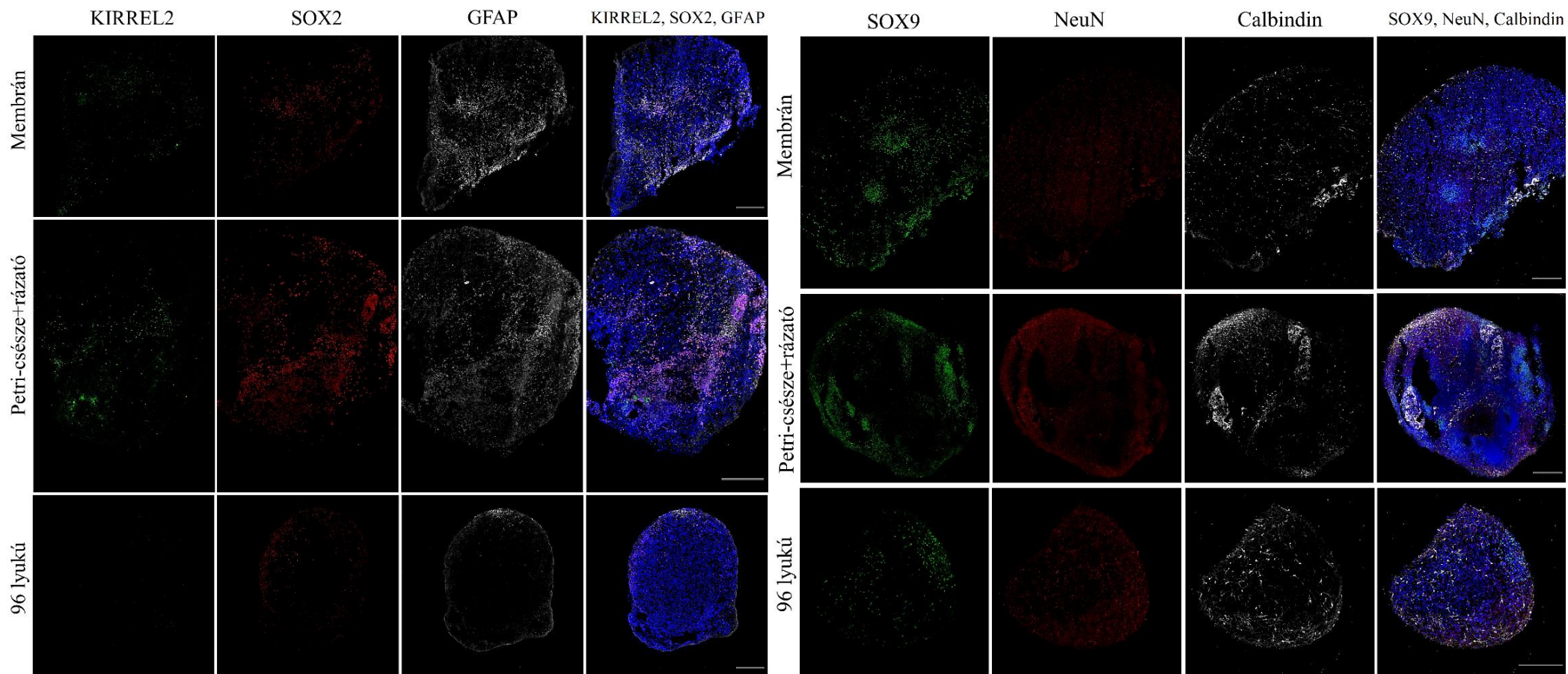
11. ábra: TUJ és GFAP marker fehérjék kifejeződése az 50. napon a három különböző elrendezésben tenyésztett organoidokban. **A panel:** Western blot membrán részek, előhívás után. Minden kondíció esetében zsebenként 2 organoidból származó fehérjeminta került a gélen futtatásra, így az ábrázolás összesen 6 organoid eredményeit tartalmazza. **B panel:** A TUJ1 fehérje membránon előhívott sávjának kvantifikálása. **C panel:** A GFAP fehérje membránon előhívott sávjának kvantifikálása. A hibaszázlő a standard hibát (SEM) mutatja. A részletes P értékeket a függelék 5. táblázata tartalmazza.

A továbbiakban a western blot eredmények ellenőrzése érdekében immunhisztokémiai analízist végeztünk. Az 50N-on fixált organoidokból készült metszeteken szintén megvizsgáltuk a KIRREL2 és SOX2 markereket, de ezt kiegészítettük GFAP, SOX9, NeuN és Calbindin fehérjék vizsgálatával is. Az általunk vizsgált markerek közül GFAP esetében azok az organoidok tartalmazták a legtöbb markerfehérjét, amelyeket membránra inzertre helyeztünk. Minden más vizsgált marker esetében (SOX2, KIRREL2, SOX9, NeuN, Calbindin) a körkörös rázaton elhelyezett Petri-csészékben tenyésztett organoidok mutatták a legmagasabb kifejeződést. A SOX2 korai neuronális marker 19%-ban volt jelen ezekben a mintákban. Az asztrociták jelenlétét a mintában GFAP-vel és SOX9-cel igazoltuk. GFAP 18%-ban, míg a SOX9 fehérje 16%-ban volt kimutatható. 7%-a a mintáknak KIRREL2 és 26%-a Calbindin

pozitív lett, ami a Purkinje-sejtek meglétét igazolta. Az érett neuronok kimutatására a NeuN fehérjét választottuk. Ezt 23%-ban sikerült ezekből a mintákból kimutatni (12. és 13. ábra). Az immunhisztokémiai vizsgálat során kiderült, hogy a legtöbb érett neuron a Petri-csészékben lévő organoidokban található meg, így ezt a kondíciót választottuk az IL-1 β kezelés elvégzéséhez.



12. ábra: KIRREL2, SOX2, GFAP, SOX9, NeuN és Calbindin markerfehérjék kifejeződése az 50. napon. X tengelyen a kondíciók kerültek ábrázolásra, az Y tengelyen pedig a pozitív sejtek aránya, DAPI-ra normalizálva [%]. Az organoidok egy indításból származtak. 3-3 minta eredményei kerültek ábrázolásra. A részletes P értékeket a függelék 6. táblázata tartalmazza.

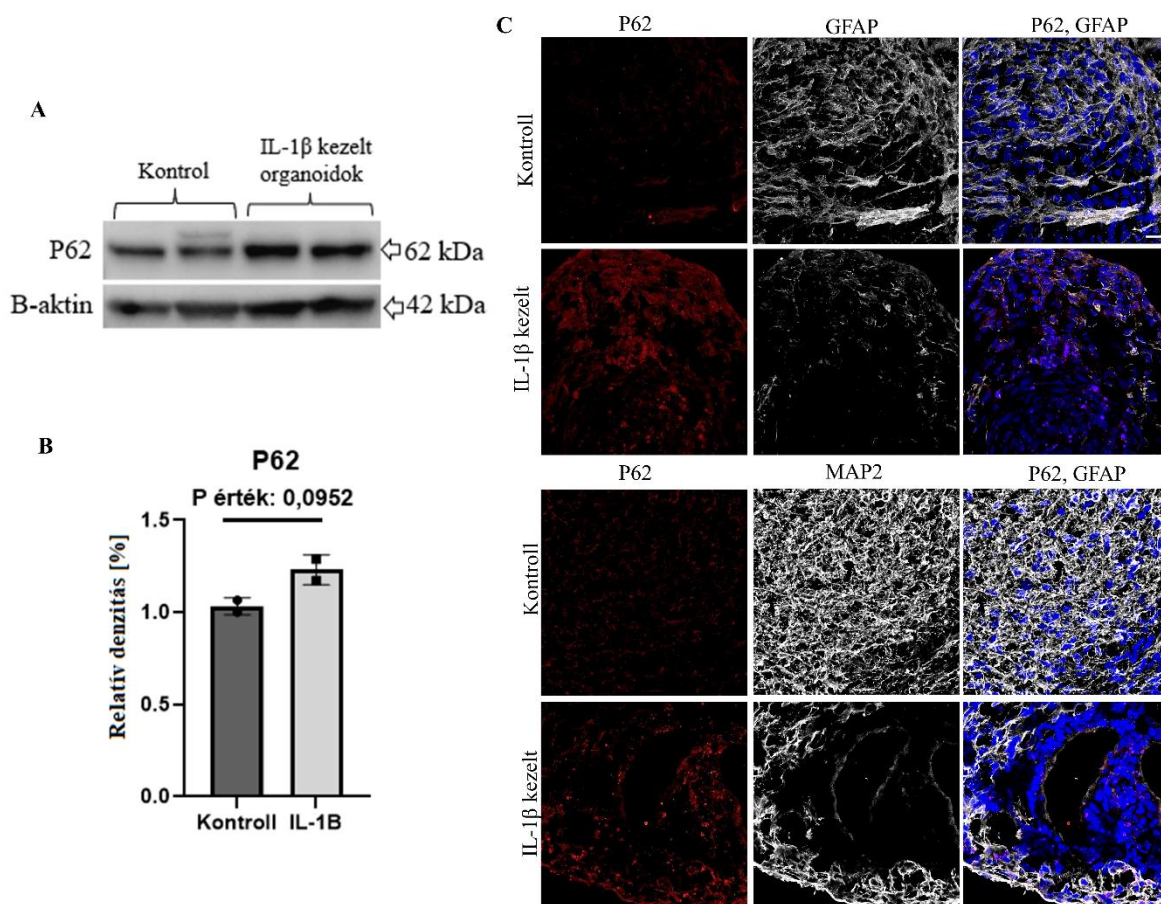


13. ábra: 35N-től három eltérő kondícióban elhelyezett organoidok immunfestése az 50N-on. A lépték 100 μ m-nek felel meg. A sejtmagok DAPI festéssel (kék) kerültek kimutatásra.

5.7. IL-1 β kezelés eredménye

Az IL-1 β gyulladásos citokint egerek esetében már több esetben is bizonyították, mind élő, mind pedig agyszövet preparátumon, hogy ataxiát vált ki a neuronoknál (38)(39)(40).

Humán szövet vonatkozásban azonban nem találtunk arra vonatkozó információt, hogy milyen koncentrációban és mennyi ideig alkalmazva alkalmas ataxia indukálására, így azt a koncentrációt választottuk, amit a preparált egérszövet esetében találtunk a szakirodalomban, 72 órán át alkalmazva. A kezelést a Petri-csészés tenyésztési körülményt alkalmazva végeztük. A kezelt és kontroll organoid minták fehérje összetételét először western blot analízissel vizsgáltuk meg a P62/SQSTM1 autofágia markerfehérje mennyiségére vonatkozólag, mivel ismert, hogy a P62 fehérje, az autofágia indukálódásán keresztül részt vesz a Purkinje sejtek degenerációs folyamataiban (43)(44).

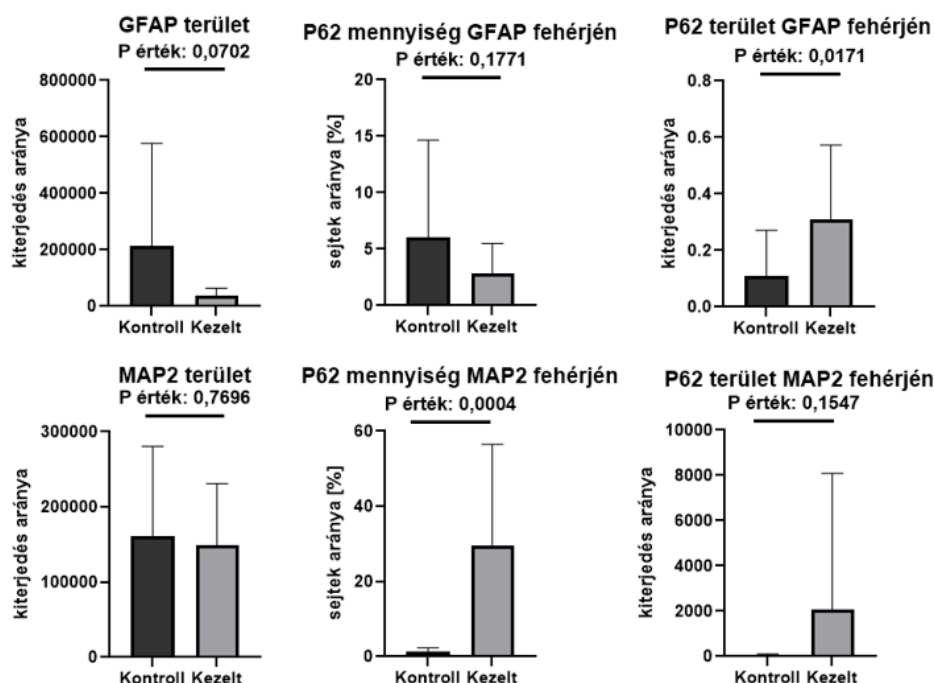


14. ábra: Az IL-1 β gyulladásos citokin hatására bekövetkező autofágiát jelző P62 fehérje expressziója cerebelláris organoidokban. **A panel:** Western blot membrán részek, előhívás után **B panel:** A P62 fehérje membránon előhívott sávjának kvantifikálása. Az organoidok egy indításból származtak, és 7-7 organoid fehérjetartalma lett gélen futtatva. **C panel:** Kontroll és kezelt minták GFAP (asztrocita) és MAP2 (neuron) immunfestésének képe. A sejtmagok DAPI festéssel (kék) kerültek kimutatásra. A lépték 20 μ m-nek felel meg. A hibazászló a standard hibát (SEM) mutatja.

Az eredményeinkből, melyet a 14. ábra foglal össze, az látható, hogy az IL-1 β kezelésen átesett organoidokban megnő a P62 fehérje mennyisége. Ahhoz, hogy megállapíthassuk vajon ez a változás sejtspecifikus módon következett-e be, immunhisztokémiai analízist végeztünk.

Az asztroglia sejtek jelöléséhez GFAP fehérjét, míg neuronok azonosításához a MAP2 marker fehérjét választottuk. A MAP2 pozitív területekhez viszonyítva a P62 fehérje kifejeződése jelentős mértékben megnövekedett a kezelés hatására, ez a P62 területi kiterjedésének növekedésében is megnyilvánult. A GFAP fehérjéhez viszonyítva viszont a kontroll mintákban több P62 fehérjét tudtunk azonosítani, mint a kezelt mintában. Itt is megvizsgáltuk a P62 fehérje kiterjedési területét a GFAP fehérje területére normalizálva. Eredményeink azt mutatták, hogy ugyan kevesebb P62 aggregátum van kezelt minták esetében asztroglia sejtekben, de azok nagyobb kiterjedésűek, mint a kontroll minták esetében (15. ábra). A kezelés hatására a GFAP pozitív területek csökkenését figyeltük meg, amit MAP2 esetében nem tapasztaltunk. Mivel az immunfestés során nem kapunk információt a teljes organoidról, csak az aktuálisan megfestett metszetről, így az asztrocita és neuron populációk mennyiségi változásait western blot technikával is igazolnunk kell még.

Elmondható, hogy a kezelés hatására a kezelt minták P62 tartalma megemelkedett és ez nagyobb részt a MAP2 pozitív neuronok P62 szintjének változás miatt történt.



15. ábra: P62 fehérje mennyisége és lefedett területe GFAP és MAP2 területéhez hasonlítva. Az organoidok egy indításból származtak, és 3-3 mintáról 40x nagyításban készült 15 felvétel eredményét tartalmazzák.

6. ÖSSZEFOGLALÁS

A humán cerebellum fejlődése teljesen eltér az egér cerebellumétól, így mind fejlődésbiológiai, mind neurodegeneratív elváltozásainak tanulmányozására elengedhetetlen a humán modellrendszerek alkalmazása. Mivel egyre több bizonyíték áll rendelkezésünkre azzal kapcsolatban, hogy a cerebellumot érintő ataxiák különböző típusaiban a cerebellum Purkinje sejtjein kívül glia sejtípusok is érintettek, ezért nemcsak humánspecifikus modellrendszerekre van szükség, hanem olyanokra is, amik lehetővé teszik egyszerre többféle sejtípus és azok egymásra hatásának a vizsgálatát. A cerebellum különböző sejtípusait 3D organizációban tartalmazó, humán indukált pluripotens őssejtekből létrehozott *in vitro* rendszer a cerebelláris organoid.

A projekt során először a cerebellum organoid modelljének létrehozására dolgoztam ki egy olyan jól reprodukálható differenciációs protokollt, amely később lehetővé teszi akár genetikai eredetű ataxiában szenvedő betegekből létrehozott hiPSC vonalakból is cerebelláris organoidok előállítását. Ennek érdekében egy olyan, az irodalomban korábban leírt protokollt optimalizáltam, ami a mi kezünkben jelentős sejtpusztuláshoz vezetett. Annak érdekében, hogy kiválasztható legyen az optimalizálás során kidolgozott protokoll verziók közül a legeredményesebb, beállítottam egy immuncitokémiai panelt, ami az organoid differenciáció különböző stádiumaiban lehetővé teszi az organoidok minőség-ellenőrzését, vagyis hogy megfelelő irányba differenciálódna-e. Ehhez a cerebellum fejlődése során jellemző fehérje markereket vettem alapul. Kimutattam, hogy a 21. napon már jelen vannak a neuroepitélium kialakulását mutató SOX2 és Nestin marker fehérjék, a 35. napon pedig már megjelennek Kirrel2 pozitív Purkinje progenitorok, amelyekből az 50. napra kialakulnak a Calbindin pozitív Purkinje neuronok is. A tenyésztési körülmények további optimalizálásával elértem, hogy az 50. napon a MAP2-t is kifejező érett neuronális sejtek mellett már a később kifejlődő GFAP pozitív asztrogliá sejtek is kimutathatóak voltak. Ezáltal a Nayler *et al.* és Silva *et al.* protokollok által leírt közel három hónapig tartó differenciációnál jóval rövidebb idő alatt sikerült az ataxia vizsgálatára alkalmas sejteket előállítanom.

Annak érdekében, hogy bizonyítsam, a modell patológiás elváltozások kimutatására is alkalmas, az egérben ataxia indukálására képes IL-1 β -val kezeltem az organoidokat, ami a P62 autofágia marker megemelkedésével járt. Annak érdekében, hogy kiderítsem, hogy vajon ez a változás sejtspecifikus módon történt-e, neuronális (MAP2) és asztrogliá (GFAP) markerekkel együtt vizsgáltam a P62-t organoid metszeteken. Bebizonyítottam, hogy az irodalomban

korábban egér sejtek esetében kimutatott jelenség, miszerint az IL-1 β a neuronkat károsítja, a humán cerebelláris organoid modell esetében is tetten érhető.

Összességében megállapítható, hogy a létrehozott humán cerebelláris organoid modell alkalmas sejtspecifikus patológiás elváltozások vizsgálatára és az azokat célzó terápiák kifejlesztésének platformjául szolgálhat. További munkám során genetikai eredetű ataxiák organoid modelljét is szeretném létrehozni, új, gliaspecifikus célfehérjék beazonosítása érdekében. A terápiás célpontok könnyebb monitorozása érdekében fluoreszcens riporter hiPSC vonalakat is tervezek létrehozni, és az azokból differenciáltatott organoidokat nagy áteresztőképességű szűrésekben tervezem felhasználni a patológiás elváltozások kialakulását feltartóztató molekulák beazonosítása érdekében.

FÜGGELÉK

3. táblázat: 16 napos immunfestéshez tartozó ANOVA teszt P értékei (bal)

4. táblázat: 21 napos immunfestéshez tartozó ANOVA teszt P értékei (jobb)

Kondíciók	SOX2	NESTIN	PAX6
I. vs. II.	>0,9999	0,994	0,999
I. vs. IV.	0,98	0,5281	0,9978
I. vs. V.	>0,9999	0,7269	0,032
I. vs. VI.	>0,9999	0,628	0,9959
II. vs. IV.	>0,9999	0,8172	0,9649
II. vs. V.	>0,9999	0,9456	0,0173
II. vs. VI.	>0,9999	0,8917	>0,9999
IV. vs. V.	>0,9999	0,9991	0,065
IV. vs. VI.	>0,9999	>0,9999	0,9376
V. vs. VI.	>0,9999	>0,9999	0,0141

Kondíciók	SOX2	NESTIN	PAX6
I. vs. II.	0,6795	<0,0001	>0,9999
I. vs. IV.	0,9228	<0,0001	0,4188
I. vs. V.	0,1031	0,0046	0,3682
I. vs. VI.	0,8986	<0,0001	0,9615
II. vs. IV.	0,993	0,9995	0,2377
II. vs. V.	0,7656	0,3847	0,3127
II. vs. VI.	0,9966	0,9398	0,8977
IV. vs. V.	0,4204	0,5804	0,0012
IV. vs. VI.	>0,9999	0,8164	0,8349
V. vs. VI.	0,4687	0,0654	0,0342

5. táblázat: 50 napos western blott analízishez tartozó ANOVA teszt P értékei

Kondíciók	TUJ	GFAP
Membrán vs. Petri-csésze	0,5028	0,592
Membrán vs. 96 lyukú	0,1133	0,2412
Petri-csésze vs. 96 lyukú	0,4787	0,7161

6. táblázat: 50 napos immunfestéshez tartozó ANOVA teszt P értékei

Kondíciók	KIRREL2	SOX2	GFAP	SOX9	NeuN	Calbindin
Membrán vs. Petri-csésze	0,6907	0,0006	0,4562	0,2563	0,3861	0,8134
Membrán vs. 96 lyukú	0,9088	0,628	0,0099	0,8992	0,8888	0,8514
Petri-csésze vs. 96 lyukú	0,9063	0,0013	0,0421	0,4313	0,6254	0,5106

7. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Szeretnék köszönetet mondani témavezetőmnek, Dr. Szabó Kornéliának, aki irányította a munkámat, kérdéseimmel bármikor fordulhattam hozzá, azokra készséggel, türelmesen válaszolt.

Szeretném megköszönni Dr. Monostory Katalinnak és kutatócsoportjának, a Metabolikus Gyógyszer-kölcsönhatások Kutatócsoportnak, a sok segítséget és kedvességet, amit tőlük kaptam, és hogy a közösségük tagja lehetek.

Köszönöm a Természettudományi Kutatóközpont Humán Pluripotens Őssejt Laboratórium dolgozóinak, különösképp Dr. Apáti Ágotának és Haraszi Beátának a sok segítséget, hogy helyet biztosítottak a számomra, és az organoidjaim számára.

Köszönöm szépen a Gyógyszerrezisztencia Kutatócsoporton belül Dolniczki Krisztinának és Dr. Füredi Andrásnak a sok segítséget.

Köszönettel tartozom az MTA Enzimológiai Intézet igazgatójának, Dr. Hunyady Lászlónak, és az Enzimológia Intézet valamennyi munkatársának, akik kedvességükkel segítették munkámat.

Köszönöm páromnak Márknak, a türelmet és megértést, amit a megírás során tanúsított felém, illetve a segítséget, tanácsokat amikkel a dolgozat létrejöttét lendítette előre.

IRODALOMJEGYZÉK:

1. de Paepe C, Krivega M, Cauffman G, Geens M, van de Velde H. Totipotency and lineage segregation in the human embryo. *Mol Hum Reprod.* 2014;20(7):599–618.
2. Takahashi K, Yamanaka S. Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors. *Cell.* 2006;126(4):663–76.
3. Adewumi O, Aflatoonian B, Ahrlund-Richter L, Amit M, Andrews PW, Beighton G, et al. Characterization of human embryonic stem cell lines by the International Stem Cell Initiative. *Nat Biotechnol.* 2007;25(7):803–16.
4. Chhibber T, Bagchi S, Lahooti B, Verma A, Al-Ahmad A, Paul MK, et al. CNS organoids: an innovative tool for neurological disease modeling and drug neurotoxicity screening. *Drug Discov Today.* 2020;25(2):456–65.
5. Brás J, Henriques D, Moreira R, Santana MM, Silva-Pedrosa R, Adão D, et al. Establishment and characterization of human pluripotent stem cells-derived brain organoids to model cerebellar diseases. *Sci Rep.* 2022;12(1):1–15.
6. Haldipur P, Aldinger KA, Bernardo S, Deng M, Timms AE, Overman LM, et al. Spatiotemporal expansion of primary progenitor zones in the developing human cerebellum. *Science* (80-). 2019;366(6464):454–60.
7. Lange W. Cell number and cell density in the cerebellar cortex of man and some other mammals. *Cell Tissue Res.* 1975;157(1):115–24.
8. Tao Y, Zhang SC. Neural Subtype Specification from Human Pluripotent Stem Cells. *Cell Stem Cell.* 2016;19(5):573–86.
9. Hua T, Liu C, Kiran S, Gray K, Jung S, Meckes DG, et al. Phenotypic, metabolic, and biogenesis properties of human stem cell-derived cerebellar spheroids. *Sci Rep.* 2022;12(1):1–13.
10. de Jong JO, Llapashtica C, Genestine M, Strauss K, Provenzano F, Sun Y, et al. Cortical overgrowth in a preclinical forebrain organoid model of CNTNAP2-associated autism spectrum disorder. *Nat Commun.* 2021;12(1).
11. Smits LM, Schwamborn JC. Midbrain Organoids: A New Tool to Investigate Parkinson's Disease. *Front Cell Dev Biol.* 2020;8(May):1–12.
12. Jo J, Xiao Y, Sun AX, Cukuroglu E, Tran HD, Göke J, et al. Midbrain-like Organoids from Human Pluripotent Stem Cells Contain Functional Dopaminergic and Neuromelanin-Producing Neurons. *Cell Stem Cell.* 2016;19(2):248–57.
13. Valiulahi P, Vidyawan V, Puspita L, Oh Y, Juwono VB, Sittipo P, et al. Generation of caudal-type serotonin neurons and hindbrain-fate organoids from hPSCs. *Stem Cell Reports.* 2021;16(8):1938–52.
14. Szebenyi K, Wenger LMD, Sun Y, Dunn AWE, Limegrover CA, Gibbons GM, et al. Human ALS/FTD brain organoid slice cultures display distinct early astrocyte and targetable neuronal pathology. *Nat Neurosci.* 2021;24(11):1542–54.
15. Muguruma K, Nishiyama A, Kawakami H, Hashimoto K, Sasai Y. Self-organization of polarized cerebellar tissue in 3D culture of human pluripotent stem cells. *Cell Rep.* 2015;10(4):537–50.
16. Silva TP, Fernandes TG, Nogueira DES, Rodrigues CAV, Bekman EP, Hashimura Y, et al. Scalable generation of mature cerebellar organoids from human pluripotent stem cells and

- characterization by immunostaining. *J Vis Exp*. 2020;2020(160):1–21.
17. Yaguchi Y, Yu T, Ahmed MU, Berry M, Mason I, Basson MA. Fibroblast growth factor (FGF) gene expression in the developing cerebellum suggests multiple roles for FGF signaling during cerebellar morphogenesis and development. *Dev Dyn*. 2008;238(8):2058–72.
 18. Fischer T, Faus-Kessler T, Welzl G, Simeone A, Wurst W, Prakash N. Fgf15-mediated control of neurogenic and proneural gene expression regulates dorsal midbrain neurogenesis. *Dev Biol*. 2011;350(2):496–510.
 19. Gimeno L, Martinez S. Expression of chick Fgf19 and mouse Fgf15 orthologs is regulated in the developing brain by Fgf8 and Shh. *Dev Dyn*. 2007;236(8):2285–97.
 20. Bagri A, Gurney T, He X, Zou YR, Littman DR, Tessier-Lavigne M, et al. The chemokine SDF1 regulates migration of dentate granule cells. *Development*. 2002;129(18):4249–60.
 21. Nayler S, Agarwal D, Curion F, Bowden R, Becker EBE. High-resolution transcriptional landscape of xeno-free human induced pluripotent stem cell-derived cerebellar organoids. *Sci Rep*. 2021;11(1):1–17.
 22. Silva TP, Sousa-Luís R, Fernandes TG, Bekman EP, Rodrigues CAV, Vaz SH, et al. Transcriptome profiling of human pluripotent stem cell-derived cerebellar organoids reveals faster commitment under dynamic conditions. *Biotechnol Bioeng*. 2021;118(7):2781–803.
 23. Silva TP, Bekman EP, Fernandes TG, Vaz SH, Rodrigues CAV, Diogo MM, et al. Maturation of Human Pluripotent Stem Cell-Derived Cerebellar Neurons in the Absence of Co-culture. *Front Bioeng Biotechnol*. 2020;8 (February):1–17.
 24. Mercurio S, Serra L, Pagin M, Nicolis SK. Deconstructing Sox2 Function in Brain Development and Disease. *Cells*. 2022;11(10).
 25. Manuel MN, Mi D, Masonand JO, Price DJ. Regulation of cerebral cortical neurogenesis by the Pax6 transcription factor. *Front Cell Neurosci*. 2015;9(March):1–21.
 26. Duan W, Zhang YP, Hou Z, Huang C, Zhu H, Zhang CQ, et al. Novel Insights into NeuN: from Neuronal Marker to Splicing Regulator. *Mol Neurobiol*. 2016;53(3):1637–47.
 27. Suzuki S, Namiki J, Shibata S, Mastuzaki Y, Okano H. The neural stem/progenitor cell marker nestin is expressed in proliferative endothelial cells, but not in mature vasculature. *J Histochem Cytochem*. 2010;58(8):721–30.
 28. Lancaster MA, Renner M, Martin CA, Wenzel D, Bicknell LS, Hurles ME, et al. Cerebral organoids model human brain development and microcephaly. *Nature*. 2013;501(7467):373–9.
 29. Cerrato V. Cerebellar astrocytes: Much more than passive bystanders in ataxia pathophysiology. *J Clin Med*. 2020;9(3).
 30. Sun W, Cornwell A, Li J, Peng S, Joana Osorio M, Aalling N, et al. SOX9 is an astrocyte-specific nuclear marker in the adult brain outside the neurogenic regions. *J Neurosci*. 2017;37(17):4493–507.
 31. Vong KI, Leung CKY, Behringer RR, Kwan KM. Sox9 is critical for suppression of neurogenesis but not initiation of gliogenesis in the cerebellum. *Mol Brain*. 2015;8(1):0–17.
 32. Szabó Z, Héja L, Szalay G, Kékesi O, Füredi A, Szebényi K, et al. Extensive astrocyte synchronization advances neuronal coupling in slow wave activity in vivo. *Sci Rep*. 2017;7(1):1–18.
 33. Kingdom U. An induced pluripotent stem cell-based neuronal model of Spinocerebellar ataxia Periodic Reporting for period 1 - iPSCAtaxia (An induced pluripotent stem cell-based neuronal model of Spinocerebellar ataxia). 2019;1–4.

34. Sullivan R, Yau WY, O'Connor E, Houlden H. Spinocerebellar ataxia: an update. *J Neurol*. 2019;266(2):533–44.
35. Klockgether T, Mariotti C, Paulson HL. Spinocerebellar ataxia. *Nat Rev Dis Prim*. 2019;5(1):1–21.
36. Hommersom MP, Buijsen RAM, van Roon-Mom WMC, van de Warrenburg BPC, van Bokhoven H. Human Induced Pluripotent Stem Cell-Based Modelling of Spinocerebellar Ataxias. *Stem Cell Rev Reports*. 2022;18(2):441–56.
37. Edamakanti CR, Mohan V, Opal P. Reactive Bergmann glia play a central role in Spinocerebellar ataxia inflammation via the JNK pathway. 2022;(63):1–25.
38. Motoki K, Kishi H, Hori E, Tajiri K, Nishijo H, Muraguchi A. The direct excitatory effect of IL-1 β on cerebellar Purkinje cell. *Biochem Biophys Res Commun*. 2009;379(3):665–8.
39. Andoh T, Kishi H, Motoki K, Nakanishi K, Kuraishi Y, Muraguchi A. Protective Effect of IL-18 on Kainate- and IL-1 β -Induced Cerebellar Ataxia in Mice. *J Immunol*. 2008;180(4):2322–8.
40. Sama MA, Mathis DM, Furman JL, Abdul HM, Artiushin IA, Kraner SD, et al. Interleukin-1 β -dependent signaling between astrocytes and neurons depends critically on astrocytic calcineurin/NFAT activity. *J Biol Chem*. 2008;283(32):21953–64.
41. Stirling DR, Swain-Bowden MJ, Lucas AM, Carpenter AE, Cimini BA, Goodman A. CellProfiler 4: improvements in speed, utility and usability. *BMC Bioinformatics*. 2021;22(1):1–11.
42. McQuin C, Goodman A, Chernyshev V, Kametsky L, Cimini A, Karhohs KW, et al. Cellprofiler 3.0. *PLoS Biol*. 2018;1–17.
43. Wang QJ, Ding Y, Kohtz S, Mizushima N, Cristea IM, Rout MP, et al. Induction of autophagy in axonal dystrophy and degeneration. *J Neurosci*. 2006;26(31):8057–68.
44. Yamada T, Adachi Y, Yanagawa T, Iijima M, Sesaki H. p62/sequestosome-1 knockout delays neurodegeneration induced by Drp1 loss. *Neurochem Int*. 2018;117:77–81.