



**Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg**  
**Medizinische Fakultät Mannheim**  
**Dissertations-Kurzfassung**

**Optimizing Microscopy in Three Dimensions: Optical Clearing  
Techniques for the Study of hiPSC-Derived Neural Spheroids and  
3D Cell Cultures**

Autor: Elina Nürnberg  
Institut / Klinik: Institut für Molekular- und Zellbiologie der Hochschule Mannheim  
Doktorvater: Prof. Dr. M. Hafner

Dreidimensionale (3D) Zellkulturen sind ein wichtiger Fortschritt in der zellbiologischen Forschung und bieten, im Vergleich zu zweidimensionalen (2D)-Modellen, oftmals physiologischere Bedingungen. Besonders die neuronale Differenzierung von humanen induzierten pluripotenten Stammzellen (hiPSC) zu komplexen Gehirnorganoiden ermöglichen neue Methoden zur Erforschung von Krankheiten und der Gehirnentwicklung, bringen jedoch auch Herausforderungen mit sich. Die Herstellung kostenintensiv, benötigt ein hohes Maß an Expertise und die Variabilität zwischen Zelllinien und Experimenten ist hoch. Im Gegensatz dazu bieten stabile neurale Vorläuferzellen (NPCs), die von hiPSCs abgeleitet sind, zwar ein geringeres Differenzierungspotenzial und eine geringere Komplexität, aber auch eine kosteneffizientere und konsistentere Methode zur Erzeugung menschlicher neuraler Zellen *in vitro*.

Die Analyse dieser 3D-Kulturen mit Hilfe von Mikroskopie ist jedoch schwierig aufgrund der komplexen, stark verzweigten Struktur neuraler Zellen. Traditionelle Methoden wie Kryoschnitte sind oft nicht in der Lage, räumliche Informationen ganzheitlich darzustellen. Ein alternativer Ansatz ist die *in toto*-Analyse mittels konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie (CLSM), jedoch erschwert laterale Lichtstreuung aufgrund von Unterschieden im Brechungsindex die Generierung hochwertige Bilder jenseits einer Tiefe von etwa 50  $\mu\text{m}$ . Optische Gewebeklärungstechniken (OTC) können diese Einschränkungen überwinden, indem sie den Brechungsindex im gesamten Probenmaterial homogenisieren. Obwohl OTC-Protokolle weitreichend in Geweben untersucht wurden, finden sie selten Anwendung in *in vitro* Systemen. Die wenigen Studien auf diesem Gebiet zeigen eine hohe Variation in der optischen Klärungseffizienz zwischen verschiedenen Methoden und Zelllinien, was darauf hindeutet, dass es in diesem Forschungsbereich keinen universellen Goldstandard gibt.

Die vorliegende Arbeit beschreibt die Etablierung eines 3D-Sphäroidmodells aus hiPSC-abgeleiteten NPCs, welches zu einer Mischung aus Neuronen und Astrozyten differenziert werden kann. Der Differenzierungsprozess wurde in Kryoschnitten überwacht und umfasste die Analyse von Markerproteinen für Proliferation, Apoptose sowie neuronale und astrogliale Differenzierung. Die Ergebnisse zeigten ein ständiges Wachstum der Sphäroide über einen Zeitraum von zwei Wochen hinweg, welches mit dem KI67-Expressionsniveau korrelierte. Marker für junge Neurone waren bereits zu Beginn der 3D-Kultivierung nachweisbar, während Astrozyten in einem späteren Differenzierungsstadium auftraten. Trotz der sich ändernden Anteile von neuronalen Zellen im Laufe der Zeit blieb eine konstante Population undifferenzierter NPCs während des gesamten Kultivierungszeitraums erhalten. Darüber hinaus wurden mehrere OTC-Techniken etabliert und auf ihre Wirksamkeit bei der Klärung von hiPSC-abgeleiteten NPC-Sphäroiden hin untersucht. Konkret wurden Clear<sup>T2</sup>, CytoVista, ScaleS und eine 88%ige Glycerinlösung auf ihre Fähigkeit getestet, die Sphäroidgröße zu erhalten und die optische Transparenz zu verbessern. Die Bewertung erfolgte durch eine tiefenabhängige Analyse der Signalintensität und des Signal-Rausch-Verhältnisses (SNR), sowie der Eignung für die halbautomatische Bildsegmentierung von Zellkernsignalen. Obwohl ScaleS-Klärung im Hinblick auf die Erhaltung der Sphäroidgröße optimale Resultate erzielen konnte, bestätigen die verbleibenden Analysen die Überlegenheit der Glycerin-Klärung in Bezug auf optische Transparenz und Bildqualität. Darüber hinaus wurde, zusätzlich zur optischen Klärung von undifferenzierten hiPSC-abgeleiteten neuronalen Sphäroiden, die Glycerin-Klärung auf differenzierte Sphäroide angewendet und diese mittels Lichtblattmikroskopie (LSFM) untersucht. Diese zusätzlichen Experimente bestätigten die Anwendbarkeit der Methode auf sowohl undifferenzierte als auch differenzierte 3D-Proben.

Angesichts der hohen Variabilität der optischen Klärungseffizienz in 3D-*in vitro*-Systemen, wurden Clear<sup>T2</sup>, CytoVista, ScaleS und 88% Glycerin auf zusätzliche Zellkulturmodelle unterschiedlicher

Komplexität angewendet. Diese umfassten vier weitere Monokultur-Sphäroid-Modelle, ein komplexes Trikultur-Modell und ein Chip-basiertes Co-Kultur-Modell. Die erzielten Ergebnisse zeigen einen hohen Grad an Variabilität zwischen den jeweiligen Methoden und Zellkulturmodellen in Bezug auf die Erhaltung von Fluoreszenzfarbstoffen und optische Transparenz. Insgesamt erwies sich die optische Klärung mit Glycerin als die zuverlässigste Methode für alle Modelle, wobei die Kläreffizienz insgesamt von der Komplexität des Zellkulturmodells beeinflusst wurde. Darüber hinaus konnte die Anwendung der linearen Z-Kompensation während der Bildaufnahme die Segmentierung erheblich verbessern, indem sie die Signalintensität und das Signal-Rausch-Verhältnis (SNR) über die Abmessungen der Probe stabilisierte.