

Gehirnentwicklung

Neurobiologie in der Petrischale – Chancen und Herausforderungen

KENSINGTON POTTER STEPHENS, ZEYNEP YENTÜR, SIMONE MAYER
SYSTEMISCHE ZELLULÄRE NEUROBIOLOGIE, ZOOLOGISCHES INSTITUT,
KARLSRUHER INSTITUT FÜR TECHNOLOGIE (KIT)

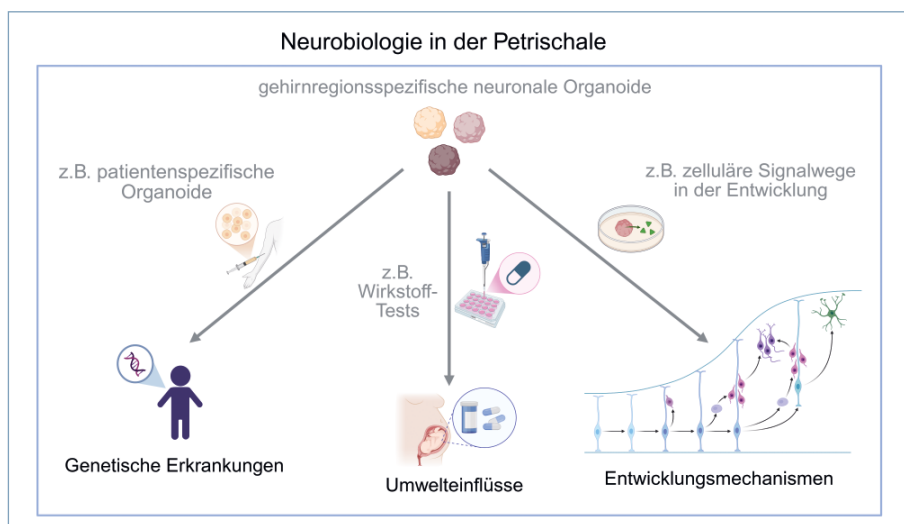
Human neural organoids, 3-dimensional cultures derived from induced pluripotent stem cells, provide a platform to study brain development in a human-specific context. Using brain region-specific organoids, we modeled the rare neurological disorder PCH2a, examined the effects of prenatal exposure to an antiepileptic drug, and studied protein secretion during organoid differentiation. Taken together, neural organoids provide a versatile model system to study human brain development and its perturbations by genetic or environmental factors.

DOI: 10.1007/s12268-026-2777-9
© The Author(s) 2026

Die Entwicklung des Säugetiergehirns wird von präzisen räumlichen und zeitlichen Interaktionen zwischen intrinsischen genetischen Programmen, interzellulären Signalen und Umweltfaktoren gesteuert. Während der Entwicklung der Hirnrinde, auch Neokortex genannt, erzeugen Radialgliazellen zunächst weitere Typen von Vorläuferzellen, die wiederum Neurone generieren. Die kor-

tikale Entwicklung erfolgt dabei charakteristischerweise „von innen nach außen“. Früh generierte Neurone werden im Inneren des Gehirns nahe an den Ventrikeln gebildet und wandern von dort nach außen, wo sie letztlich die tiefen Schichten des Neokortex bilden. Später gebildete Neurone migrieren an den früh gebildeten Neuronen vorbei und bilden die äußeren, oberflächlichen Schich-

ten des Neokortex aus. Entscheidend ist dabei das Gleichgewicht zwischen der Bildung von Vorläuferzellen, deren Differenzierung in verschiedene Neuronentypen und die Migration dieser Neuronen. Gesteuert wird es durch die Wechselwirkung zwischen genetischen Programmen und der Mikroumgebung [1]. Da diese Prozesse pränatal *in utero* ablaufen, ist die *in vivo*-Untersuchung ihrer molekularen Mechanismen eine Herausforderung. Durch Tiermodelle haben wir tiefe Einblicke in die zellulären und molekularen Mechanismen der Entwicklung des Neokortex erhalten, allerdings mit begrenzter Aussagekraft für die menschliche Hirnentwicklung. So sind bestimmte Vorläuferpopulationen im menschlichen Gehirn stark vergrößert, die Neurogenese deutlich verlängert und die Zusammensetzung der extrazellulären Matrix (ECM) in den Nischen der Vorläuferzellen im Menschen einzigartig [2]. Tiermodelle liefern daher nur begrenzte Erkenntnisse über humanspezifische Zelldynamiken und umweltbedingte Einflüsse. Gleichzeitig ist humanes *ex vivo*-Gewebe kaum für experimentelle Manipulationen zugänglich. Gehirnorganoide, 3-dimensionale neuronale gewebeähnliche Strukturen, die aus menschlichen pluripotenten Stammzellen generiert werden können, bieten eine geeignete Alternative: Sie bilden frühe Entwicklungsstadien nach und sind für experimentelle Perturbationen zugänglich [3]. Durch gezielte Zugabe von Wachstumsfaktoren können bestimmte Regionen, wie etwa der Neokortex oder das Kleinhirn, nachempfunden werden [4, 5]. Verwendet man Stammzellen, die krankheitsassoziierte Genvarianten tragen oder direkt von Patient:innen abgeleitet wurden, können gehirnregionsspezifische Phänotypen von Neuroentwicklungsstörungen (*Neurodevelopmental Disorders*, NDDs) modelliert werden. Zudem können in der Therapieentwicklung an Organoiden die Effizienz oder Toxizität von Wirkstoffen getestet und in der Grundlagenforschung Mechanismen der Hirnentwicklung im physiologischen Zustand untersucht werden (**Abb. 1**).



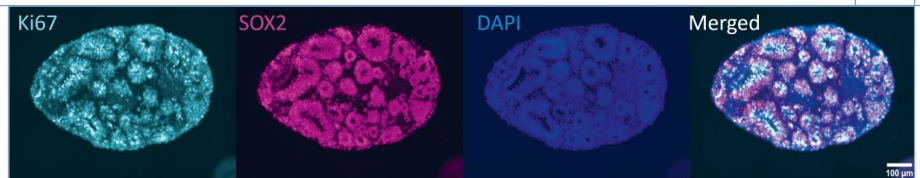
▲ Abb. 1: Gehirnorganoide dienen der Erforschung der menschlichen Gehirnentwicklung. Patientenspezifische Organoide ermöglichen die Analyse genetischer Eigenheiten und Erkrankungen, während die gezielte Zugabe von Wirkstoffen oder Noxen die Untersuchung von Umwelteinflüssen erlaubt. Signalweguntersuchungen etwa über das Sekretom liefern Einblicke in menschliche Entwicklungsprozesse. Created in BioRender. Mayer, S. (2026) <https://BioRender.com/9du8203>.

Seltene neurologische Erkrankungen: wie Gehirnganoide genetische Varianten mit regionspezifischer Hirnentwicklung verknüpfen

Die Modellierung einer genetischen Erkrankung mithilfe von Organoiden ist uns zuletzt mit patientenabgeleiteten induzierten pluripotenten Stammzellen von Patient:innen mit pontocerebellärer Hypoplasie Typ 2a (PCH2a) gelungen [6]. PCH2a ist eine autosomal-rezessive neurologische Erkrankung, die durch eine Variante in TSEN54 (A307S) verursacht wird [7, 8]. Klinisch zeigen betroffene Kinder eine schwere Hypoplasie von Kleinhirn und Brücke (Pons), eine progressive Mikrozephalie (vermindertes Großhirnwachstum), ausgeprägte motorische Beeinträchtigungen und Entwicklungsverzögerungen sowie eine stark verkürzte Lebenserwartung. Traditionelle Modellsysteme können die regional selektive Pathologie der Patient:innen nicht angemessen abbilden. Induzierte pluripotente Stammzellen aus Hautzellen von PCH2a-Patient:innen und neurotypischen Individuen wurden daher zu Kleinhirn- und Neokortexorganoiden differenziert. Das jeweilige Wachstumsverhalten wurde über die frühen Entwicklungsstadien hinweg überwacht und die Vorläuferzellpopulationen quantifiziert. PCH2a-Linien bildeten dabei konsistent deutlich kleinere Kleinhirnorganoiden aus, während Neokortexorganoiden nur geringere Unterschiede zu neurotypischen Modellen aufwiesen – ein Muster, das der regionspezifischen Pathologie *in vivo* entspricht. Darüber hinaus konnten wir Unterschiede in den Vorläuferzellpopulationen feststellen. Damit wurde erstmals gezeigt, dass neben neurodegenerativen Prozessen auch entwicklungsneurobiologische Prozesse die Krankheitsentstehung beeinflussen können. Zusammenfassend zeigt diese Studie, dass Hirnorganoiden genutzt werden können, um Krankheitsmechanismen seltener genetischer Erkrankungen in einem menschlichen 3-dimensionalen neuronalen Kontext zu modellieren.

Neurotoxizität: Modellierung der Auswirkungen pränataler Antiepileptika-Exposition in Organoiden

Organoiden ermöglichen aber nicht nur Einblicke in genetische Besonderheiten, sondern auch die Untersuchung der Wirkung von Umgebungseinflüssen auf die neuronale Entwicklung. So ist die pränatale Exposition mit dem häufig verschriebenen Antiepilepti-



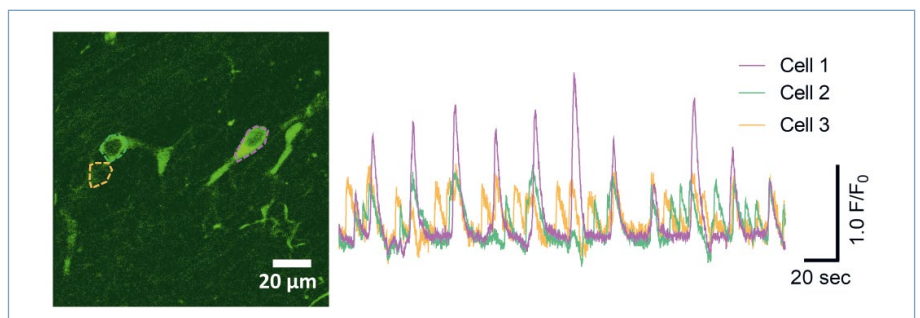
▲ **Abb. 2:** Neokortikale Organoiden, erzeugt nach dem Protokoll von Velasco *et al.* [4], wurden von Tag 21 bis Tag 35 mit 0,5 mM VPA behandelt. Zu diesem frühen Stadium werden ventrikelähnliche Strukturen gut ausgebildet, bei fortgesetzter VPA-Exposition sind diese Strukturen jedoch gestört (siehe signifikante Differenz zu Kontroll-Organoiden im Artikel). Für proliferierende Zellen wurde ein Anti-Ki67-Antikörper (cyan) und für radiale Gliazellen ein Anti-SOX2-Antikörper (magenta) verwendet.

kum Valproat (VPA) beim Menschen mit einem erhöhten Risiko für angeborene Fehlbildungen und Neuroentwicklungsstörungen verbunden [9]. Welche Mechanismen dabei speziell die Entwicklung des menschlichen Neokortex beeinflussen, ist jedoch bislang nur unzureichend verstanden. Durch den Einsatz von Neokortexorganoiden, die wir ab Tag 21 für einen Zeitraum von bis zu 30 Tagen VPA aussetzten, konnte die Auswirkung während der frühen Neurogenese auf Gewebe-, Zell- und Molekülebene analysiert werden (**Abb. 2**, [10]). Die Behandlung mit VPA führte zu deutlichen Störungen ventrikelähnlicher Strukturen innerhalb der Organoiden, was auf beeinträchtigte Zell-Zell- und Zell-Matrix-Interaktionen hindeutet. Transkriptomische Analysen zeigten zudem eine gestörte Regulation von Genen, die an der Organisation der ECM und an Zelladhäsion beteiligt sind. Einzelzell-Transkriptomanalysen zeigten weiterhin, dass Vorläuferzellen besonders empfindlich auf VPA reagierten und Veränderungen in mechano-sensitiven Signalwegen aufwiesen. Proteomische Untersuchungen bestätigten zudem, dass VPA die Sekretion von Matrixproteinen und damit auch die Mikroumgebung der Zellen verändert. Diese Ergebnisse zeigen, dass man an Organoiden auch Veränderungen durch Umwelteinflüsse auf zellulärer und

molekularer Ebene untersuchen kann. Somit können auch mechanistische Prozesse im Gewebe erforscht werden, die in klassischen Zellkultur- oder Tiermodellen nur schwer zugänglich sind.

Entwicklungsbiologie: Entschlüsselung der unbekanntesten Bedeutung sezernierter Signale auf die Entwicklung

Über die Modellierung spezifischer genetischer oder umweltbedingter Einflüsse hinaus bieten Gehirnganoide einen Einblick in die physiologischen Prozesse der menschlichen Gehirnentwicklung. Das Sekretom, also die Gesamtheit der Proteine, die von Zellen in ihre extrazelluläre Umgebung freigesetzt wird, liefert Aufschluss über extrazelluläre Signale, Matrixorganisation und Nischeninteraktionen, die wiederum die verschiedensten zellulären Prozesse steuern können [11]. Durch unsere Analysen des Sekretoms von Neokortexorganoiden über frühe Entwicklungsstadien hinweg (Tag 20, 35 und 50) wurde sichtbar, wie dynamisch die Sekretion ist. Sie spiegelt keineswegs einfach das intrazelluläre Proteom wider [12]. Im vorläuferzellreichen Stadium (Tag 35, vergleichbar mit der embryonalen Entwicklung im ersten Trimenon der Schwangerschaft) waren synaptische Adhäsionsmoleküle, Zelladhäsionsproteine und extrazellu-



▲ **Abb. 3:** 2-Photonen-Mikroskopieaufnahmen von Schnitten eines Neokortexorganoids. Die Organoiden wurden 105 Tage lang nach dem Protokoll von Velasco *et al.* [4] kultiviert und am Tag 105 in 300 µm dicke Schnitte geschnitten und an der Luft-Flüssigkeits-Grenzfläche (*Air-Liquid Interface*, ALI) kultiviert. Nach AAV-vermittelter Expression eines Kalziumindikators wurde an Tag 120 die intrinsische Aktivität der Neuronen per Kalziumimaging gemessen. Die Kalziumtransienten einzelner Zellen wurden über die Zeit aufgetragen. Die Fluoreszenzintensität wurde anhand der Formel $(F-F_0)/F_0$ gemessen und das Ausmaß der Zellkörper als ROI angenommen. Maßstab: 20 µm.

läre Proteasen besonders reichlich vorhanden. Bislang werden diese Proteine mit merklich späteren Entwicklungsstadien assoziiert, in denen die Ausbildung von Synapsen vorherrscht [13]. Neurexin- und Neuroligin-Gene sind im kortikalen Gewebe ab etwa 9–12 postkonzeptionellen Wochen auf Transkriptebeine nachweisbar [14]. Obwohl diese Gene in transkriptomischen Datensätzen des frühen menschlichen Neokortexes dokumentiert sind, war ihre frühe Sekretion in die extrazelluläre Umgebung bislang nicht beschrieben. In denselben Organoiden wurde im Sekretom von Tag 50, einem Zeitpunkt mit zunehmender Neurogenese, beobachtet, dass vor allem ECM-Proteine vorherrschen. Hervorzuheben ist, dass diese Dynamik konsistent in drei verschiedenen Zelllinien beobachtet wurde. Dies unterstreicht die Stärke der Organoidmodelle, grundlegende und konservierte Mechanismen der menschlichen Gehirnentwicklung zuverlässig abzubilden. Diese systematische Analyse sezernierter Proteine deckt eine bislang wenig untersuchte Ebene entwicklungsbedingter Signalübertragung auf, die potenziell eine entscheidende Rolle in der menschlichen Gehirnentwicklung einnimmt.

Zusammenfassung und Ausblick

Menschliche Gehirnorganoide haben sich zu vielseitigen, menschlichen, 3-dimensionalen Modellsystemen entwickelt, die die Relevanz für die menschliche Entwicklung mit experimenteller Zugänglichkeit und Skalierbarkeit verbinden. Unsere Studien mit patientenabgeleiteten PCH2a-Modellen, kontrollierter VPA-Exposition und Sekretom-Analyse zeigen, dass Organoide zur Aufklärung zuvor unzugänglicher Prozesse der frühen neuronalen Entwicklung auf mechanistischer Ebene genutzt werden können. Damit vereinen sie biologische Aussagekraft, Verfügbarkeit und experimentelle Manipulierbarkeit in einem Modell. Dennoch bestehen technische Herausforderungen, wie etwa die Variabilität in der Struktur und Zellzusammensetzung, die verminderte Zellviabilität im Inneren der Organoide durch fehlende Vaskularisierung, sowie begrenzte zelluläre Diversität [15]. Dies kann die Reifung und Reproduzierbarkeit in Krankheitsmodellen und Wirkstofftests einschränken [16]. Auch die Messung neuronaler Aktivität bleibt schwierig, da neuronale Netzwerke nur begrenzt ausreifen. Kalzium-Imaging

(**Abb. 3**) und Mikroelektrodenarrays (MEA) ermöglichen jedoch, die entstehende Netzwerkaktivität in Organoiden zu messen und mit der Zellzusammensetzung sowie der strukturellen Reifung zu verknüpfen [17]. Ein aktuelles Forschungsfeld ist die weitere Optimierung von Kulturbedingungen und funktionellen Messmethoden, um die bestehenden Hürden schrittweise zu überwinden. ■

Literatur

- [1] Stiles J, Jernigan TL (2010) The basics of brain development. *Neuropsychol Rev* 20: 327–348
- [2] Fietz SA, Lachmann R, Brandl H et al. (2012) Transcriptomes of germinal zones of human and mouse fetal neocortex suggest a role of extracellular matrix in progenitor self-renewal. *Proc Natl Acad Sci USA* 109: 11836–11841
- [3] Lancaster MA, Knoblich JA (2014) Generation of cerebral organoids from human pluripotent stem cells. *Nat Protoc* 9: 2329–2340
- [4] Velasco S, Kedaigle AJ, Simmons SK et al. (2019) Individual brain organoids reproducibly form cell diversity of the human cerebral cortex. *Nature* 570: 523–527
- [5] Silva MCB, Qian H, Cottrell JR et al. (2021) Transcriptome profiling of human pluripotent stem cell-derived cerebellar organoids reveals faster commitment under dynamic conditions. *Cerebellum* 20: 854–866
- [6] Kagermeier T, Hauser S, Sarijeva K et al. (2024) Human organoid model of pontocerebellar hypoplasia 2a recapitulates brain region-specific size differences. *Dis Model Mech* 17: dmm50740
- [7] Budde BS, Namavar Y, Barth PG et al. (2008) tRNA splicing endonuclease mutations cause pontocerebellar hypoplasia. *Nat Genet* 40: 1113–1118
- [8] van Dijk T, Baas F, Barth PG et al. (2018) What's new in pontocerebellar hypoplasia? An update on genes and subtypes. *Orphanet J Rare Dis* 13: 92
- [9] Taleb M, Al-Delaimy WK, Al-Jumaily EF et al. (2021) Emerging mechanisms of valproic acid-induced neurotoxic events in autism and its implications for pharmacological treatment. *Int J Mol Sci* 22: 7426

- [10] Yentür Z, Sarijeva K, Branco L et al. (2025) Multiomics analysis identifies VPA-induced changes in neural progenitor cells, ventricular-like regions, and cellular microenvironment in dorsal forebrain organoids. *bioRxiv*, <https://doi.org/10.1101/2025.06.24.661272>
- [11] Wu CC, Krijgsveld J (2021) Secretome analysis: Reading cellular sign language to understand intercellular communication. *Proteomics* 21: e2000242
- [12] Yentür Z, Kagermeier T, Sarijeva K et al. (2025) Human dorsal forebrain organoids show differentiation-state-specific protein secretion. *Iscience* 28: 112935
- [13] Nazir FH, Becker D, Brinkmalm G et al. (2021) Expression and secretion of synaptic proteins during stem cell differentiation to cortical neurons. *Mol Neurodegener* 16: 74
- [14] Kang HJ, Kawasawa YI, Cheng F et al. (2011) Spatio-temporal transcriptome of the human brain. *Nature* 478: 483–489
- [15] Andrews MG, Kriegstein AR (2023) Challenges of Organoid Research. *Annu Rev Neurosci* 45: 23–39
- [16] Sandoval SO, Cappuccio G, Kruth K et al. (2024) Rigor and reproducibility in human brain organoid research: Where we are and where we need to go. *Stem Cell Reports* 19: 796–816
- [17] Passaro AP, Stice SL (2021) Electrophysiological analysis of brain organoids: Current approaches and advancements. *Front Neurosci* 15: 605963

Funding: Open Access funding enabled and organized by Projekt DEAL.
Open Access: This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

Korrespondenzadresse:

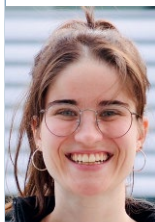
Prof. Dr. Simone Mayer
 Systemische Zelluläre Neurobiologie, Zoologisches Institut (SZN-ZOO), Karlsruher Institut für Technologie, Karlsruhe
 Wolfgang-Gaede-Straße 1a, Geb. 30.25
 D-76131 Karlsruhe
 simone.mayer@kit.edu
 www.sznbio.zoo.kit.edu

AUTORINNEN



Kensington Potter Stephens

2017–2026 Studium der Chemischen Biologie und Wirtschaftsingenieurwesen am Karlsruher Institut für Technologie. Seit 2026 Mitarbeiterin am Zoologischen Institut, Systemische Zelluläre Neurobiologie, am Karlsruher Institut für Technologie.



Zeynep Yentür

2013–2018 Studium der Molekularbiologie und Genetik an der Koç Universität Istanbul (Türkei). 2018–2020 Studium der Neurowissenschaften an der Universität Tübingen. 2021–2026 Promotion, Medizinische Fakultät, Universität Tübingen. Seit 2026 PostDoc am Zoologischen Institut, Systemische Zelluläre Neurobiologie, am Karlsruher Institut für Technologie.



Simone Mayer

2006–2009 Studium Natural Sciences. 2009–2011 Molekularbiologiestudium. 2011–2014 Promotion am Max-Planck-Institut für experimentelle Medizin, Universität Göttingen. 2015–2018 PostDoc an der University of California, San Francisco, USA. 2018–2024 Arbeitsgruppenleitung am Hertie-Institut für klinische Hirnforschung an der Universität Tübingen. Seit 2024 Professorin für Systemische Zelluläre Neurobiologie am Karlsruher Institut für Technologie.