

Medizinische Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

**Neuronale Differenzierung von patientenspezifischen,
induzierten pluripotenten Stammzellen mit Neurexin 1-
Kopienzahlvariationen zur Erforschung der Schizophrenie**

Dissertation

Zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Medizin (Dr. med.)

von Anne Puls

geboren am 05.04.1991 in Berlin

Betreuer: Prof. D. Rujescu

Gutachterin/Gutachter: Prof. D. Rujescu

apl. Prof. A. Navarrete Santos

PD M. Metzger, Würzburg

14.07.2020

11.06.2021

Referat

Die vorliegende Arbeit stellt eine Grundlagenforschung für die Analyse zellulärer Auswirkungen von Kopienzahlvariationen (*copy number variations*, CNV), die das Neurexin 1 (NRXN1)-Gen betreffen, dar. Diese genetischen Veränderungen sind mit der häufigen psychiatrischen Erkrankung Schizophrenie signifikant assoziiert, wie genomweite Assoziationsstudien gezeigt haben.

Es wurde mit induzierten pluripotenten Stammzellen (iPS-Zellen) gearbeitet, welche aus B-Lymphozyten schizophrener Patienten mit heterozygoter NRXN1-Deletion hergestellt wurden. Diese NRXN1-CNV-Zelllinien wurden zunächst auf pluripotente Stammzellmerkmale hin untersucht. Anschließend wurden sie zu neuronalen Stammzellen und im weiteren Verlauf zu kortikalen Neuronen differenziert. Parallel dazu wurden iPS-Zellen psychiatrisch gesunder Spender differenziert, um mögliche Unterschiede zu den NRXN1-CNV-Zelllinien aufzeigen zu können.

Die Pluripotenz der iPS-Zellen konnte durch Transkriptanalysen und Immunfluoreszenz erbrachte Nachweise spezifischer Stammzellmarker eindeutig belegt werden. Weiterhin zeigte eine spontane Differenzierung der Zellen die für pluripotente Stammzellen typische Fähigkeit Derivate der drei Keimblätter Entoderm, Mesoderm und Ektoderm bilden zu können.

In der folgenden gerichteten neuronalen Differenzierung sind neurale Stammzellen entstanden, die assoziierte Marker wie *paired box 6* (PAX6) aufwiesen. Durch die Detektion glialer Marker konnte zudem das Differenzierungspotential der neuronalen Stammzellen gezeigt werden. Anschließend wurden kortikale Neurone hergestellt, welche positiv für den neuronalen Marker *COUP-TF-interacting protein 2* (CTIP2) waren. Mittels *Patch-Clamp*-Technik wurden die Neurone elektrophysiologisch untersucht. Hierbei konnten durch Perfusion der Zellen mit den Neurotransmittern Glutamat und *gamma-aminobutyric acid* (GABA) physiologische Reaktionen in Form von De- und Hyperpolarisationen gezeigt werden. Die Transkriptmenge von NRXN1 wurde während der Differenzierung quantitativ bestimmt und war im Stadium der kortikalen Neurone am höchsten.

Es konnten keine Unterschiede zwischen den NRXN1-CNV-Zelllinien und den Kontrolllinien hinsichtlich Zellmorphologie, NRXN1-Genexpression und Funktionalität der Neurone festgestellt werden.

Puls, Anne: Neuronale Differenzierung von patientenspezifischen, induzierten pluripotenten Stammzellen mit Neurexin 1-Kopienzahlvariationen zur Erforschung der Schizophrenie, Halle (Saale), Univ., Med., Fak., Diss., 80 Seiten, 2020

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	IV
Abbildungsverzeichnis	VIII
Tabellenverzeichnis	IX
1 Einleitung	1
1.1 Schizophrenie	1
1.2 Neurexine (NRXN)	2
1.3 Induzierte pluripotente Stammzellen (iPS-Zellen)	4
1.4 Neuronale Differenzierung	6
2 Zielstellung	8
3 Material und Methodik	9
3.1 Zellkultur	9
3.1.1 Zelllinien	9
3.1.2 Routinekultivierung der iPS-Zellen	10
3.1.3 Spontane Differenzierung	10
3.1.4 Differenzierung zu NSC	11
3.1.5 Terminale Differenzierung der NSC zu kortikalen Neuronen	11
3.2 Molekularbiologische Methoden	13
3.2.1 RNA-Isolation	13
3.2.2 Reverse Transkription	13
3.2.3 <i>Reverse transcriptase - polymerase chain reaction</i> (RT-PCR)	13
3.2.4 Gelelektrophorese	14
3.2.5 Quantitative RT-PCR (qRT-PCR)	15
3.3 Immunhistochemische Methoden	16
3.3.1 Alkalische-Phosphatase-Färbung	16
3.3.2 Immunfluoreszenzfärbungen	16
3.4 Elektrophysiologische Untersuchungen	17
3.4.1 Grundlagen der <i>Patch-Clamp</i> -Technik	17

3.4.2	Durchführung der <i>Patch-Clamp</i> -Messungen	18
4	Ergebnisse	20
4.1	Pluripotenz-Analyse der iPS-Zelllinien	20
4.1.1	Morphologie und Alkalische-Phosphatase-Färbung	20
4.1.2	Transkriptanalyse der iPS-Zellen mittels RT-PCR	20
4.1.3	Immunfluoreszenz-Analyse der iPS-Zellen	21
4.1.4	Analyse von B-Zell-assoziierten Transkripten in iPS-Zelllinien	23
4.2	Spontane Differenzierung der patientenspezifischen iPS-Zellen	24
4.2.1	Morphologie während der spontanen Differenzierung	24
4.2.2	Transkriptanalyse während der spontanen Differenzierung mittels RT-PCR	24
4.2.3	Immunfluoreszenz-Analyse während der spontanen Differenzierung	26
4.3	Differenzierung der iPS-Zellen zu neuronalen Stammzellen	26
4.3.1	Morphologie während der Entwicklung zu NSC	27
4.3.2	Transkriptanalyse von NSC mittels qRT-PCR	28
4.3.3	Immunfluoreszenz-Analyse von NSC	30
4.4	Differenzierung der NSC zu kortikalen Neuronen	31
4.4.1	Morphologie während der NSC-Differenzierung zu NPC	31
4.4.2	Immunfluoreszenz-Analyse von NPC	31
4.4.3	Morphologie während der NPC-Differenzierung zu kortikalen Neuronen	32
4.4.4	Transkriptanalyse der Zellen des PSC-, NSC-, NPC- und TD-Stadiums mittels RT-PCR	33
4.4.5	Transkriptanalyse der Zellen des PSC-, NSC-, NPC- und TD-Stadiums mittels qRT-PCR	36
4.4.6	Immunfluoreszenzanalyse der kortikalen Neurone	36
4.4.7	Elektrophysiologische Untersuchung der kortikalen Neurone	39
5	Diskussion	41
5.1	Charakterisierung der iPS-Zellen	41
5.1.1	iPS-Zellen der NRXN1-CNV-Linien sind pluripotent	41
5.1.2	Spontan differenzierte iPS-Zellen bilden Derivate aller drei Keimblätter	43

5.1.3	B-Zellmarker _____	44
5.2	Differenzierung der patientenspezifischen iPS-Zellen zu kortikalen Neuronen ____	45
5.2.1	Herstellung von NSC _____	45
5.2.2	Variable neurale Induktion in NRXN1-CNV-Zelllinien _____	47
5.2.3	Differenzierung der NSC zu kortikalen Neuronen_____	48
5.2.4	Elektrophysiologische Untersuchungen zeigen die Funktionalität der Neurone	52
5.2.5	Vergleich der NRXN1-CNV-Zelllinien und der Kontrollzelllinien_____	55
5.3	Ausblick _____	58
6	Zusammenfassung _____	59
	Literaturverzeichnis _____	61
	Thesen _____	68
	Anlagen _____	69
	Selbstständigkeitserklärung _____	X
	Erklärung über frühere Promotionsversuche _____	XI
	Lebenslauf _____	XII
	Danksagung _____	XIII

Abkürzungsverzeichnis

ASCL1	<i>Achaete-scute family bHLH transcription factor 1</i>
BDNF	<i>Brain-derived neurotrophic factor</i>
BMP	<i>Bone morphogenetic protein</i>
BTLA	<i>B and T lymphocyte associated</i>
CDH1	<i>Cadherin 1</i>
cDNA	<i>Complementary deoxyribonucleic acid</i>
CNV	<i>Copy number variations (Kopienzahlvariationen)</i>
CTIP2 (BCL11B)	<i>COUP-TF-interacting protein 2 (BAF chromatin remodeling complex subunit BCL11B)</i>
CXCR4	<i>C-X-C motif chemokine receptor 4</i>
Cyclopamine-KAAD	<i>Cyclopamine-3-Keto-N-aminoethyl-N'-aminocaproyldihydrocinnamoyl</i>
d	<i>Day (Tag)</i>
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)</i>
DPPA2	<i>Developmental pluripotency associated 2</i>
EBF1	<i>Early B-cell factor transcription factor 1</i>
EBV	<i>Epstein-Barr-Virus</i>
ESC	<i>Embryonic stem cell(s) [embryonale Stammzelle(n)]</i>
FCRLA	<i>Fc receptor like A</i>
FGF	<i>Fibroblast growth factor</i>
FOXA2	<i>Forkhead box A2</i>
GABA	<i>Gamma-aminobutyric acid (Gamma-Aminobuttersäure)</i>
GABBR1	<i>Gamma-aminobutyric acid type B receptor subunit 1</i>
GAPDH	<i>Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase</i>
GDNF	<i>Glial cell line-derived neurotrophic factor</i>
GFAP	<i>Glial fibrillary acidic protein</i>

GPR183	<i>G protein-coupled receptor 183</i>
GRIA2	<i>Glutamate ionotropic receptor AMPA type subunit 2</i>
GWAS	Genomweite Assoziationsstudie(n)
h	<i>Hour</i> (Stunde)
IKFZ3	<i>IKAROS family zinc finger 3</i>
iPS-Zelle	Induzierte pluripotente Stammzelle
KLF4	<i>Kruppel like factor 4</i>
LIN28A	<i>Lin-28 homolog A</i>
Mbp	Mega-Basenpaare
MEOX1	<i>Mesenchyme homeobox 1</i>
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
mRNA	<i>Messenger ribonucleic acid</i>
MSI1	<i>Musashi RNA binding protein 1</i>
mV	Millivolt
MYC	<i>MYC proto-oncogene</i>
NANOG	<i>Nanog homeobox</i>
NES	<i>Nestin</i>
NEUROG3	<i>Neurogenin 3</i>
NGN2	<i>Neurogenin 2</i>
NIM	Neurales Induktionsmedium
NLGN1	<i>Neuroigin 1</i>
NPC	<i>Neural progenitor cell(s)</i> [neurale Progenitorzelle(n)]
NRXN	Neurexine
NRXN1, 2, 3	<i>Neurexin 1, 2, 3</i>
NSC	<i>Neural stem cell(s)</i> [neurale Stammzelle(n)]

OCT4 (POU5F1)	<i>Octamer-binding transcription factor 4 (POU class 5 homeobox 1)</i>
OLIG2	<i>Oligodendrocyte transcription factor 2</i>
PAX6	<i>Paired box 6</i>
PBS	<i>Phosphate-buffered saline</i> (phosphatgepufferter Salzlösung)
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> (Polymerase-Kettenreaktion)
PRRX1	<i>Paired related homeobox 1</i>
PSC	<i>Pluripotent stem cell(s)</i> [(pluripotente Stammzelle(n)]
PTN	<i>Pleiotrophin</i>
RA	<i>Retinoic acid</i> (Retinsäure)
REST	<i>RE1 silencing transcription factor</i>
RNA	<i>Ribonucleic acid</i> (Ribonukleinsäure)
rpm	<i>Rounds per minute</i> (Umdrehungen pro Minute)
RT-PCR	<i>Reverse transcriptase - polymerase chain reaction</i>
s	Sekunde
SHH	<i>Sonic hedgehog signaling molecule</i>
SMAD	<i>Sma (small body size) / MAD (mothers against decapentaplegic)</i>
SNP	<i>Single nucleotide polymorphism</i> (Einzelnukleotidpolymorphismus)
SOX1, 2, 17	<i>SRY-box transcription factor 1, 2, 17</i>
SSEA4	<i>Stage-specific embryonic antigen 4</i>
STX	Syntaxine
SYT1	<i>Synaptotagmin 1</i>
T	<i>T-box transcription factor T</i> (auch Brachyuri oder TBXT)
TCL1A	<i>T-cell leukemia/ lymphoma 1A</i>
TD	Terminale Differenzierung
TDM	Terminales Differenzierungsmedium
TGF-β	<i>Transforming growth factor beta</i>
TRA-1-60	<i>Tumor rejection antigen 1-60</i>

TRA-1-81	<i>Tumor rejection antigen 1-81</i>
TUBB3	<i>Tubulin beta 3 class III</i>
VAMP2	<i>Vesicle associated membrane protein 2</i>
VIM	<i>Vimentin</i>
WNT	<i>Wingless / integrated</i>
ZNS	Zentrales Nervensystem

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Ablauf der Reprogrammierung und Differenzierung von iPS-Zellen.	5
Abb. 2: Morphogene während der embryonalen Entwicklung des Nervensystems.	7
Abb. 3: Differenzierung der induzierten pluripotenten Stammzellen (iPS-Zellen) zu kortikalen Neuronen.	12
Abb. 4: <i>Patch-Clamp</i> -Messung.	18
Abb. 5: Morphologie und Alkalische Phosphatase-Färbung der iPS-Zellen.	20
Abb. 6: Transkriptanalyse der iPS-Zelllinien hinsichtlich Pluripotenz-assoziiierter Gene mittels RT-PCR.	21
Abb. 7: Immunfluoreszenz-Analyse der iPS-Zelllinien hinsichtlich Pluripotenz-assoziiierter Marker.	22
Abb. 8: Analyse von iPS-Zellen hinsichtlich B-Zell-assoziiierter Transkripte mittels RT-PCR.	23
Abb. 9: Morphologische Analyse der iPS-Zelllinien während der spontanen Differenzierung.	24
Abb. 10: Transkriptanalyse der iPS-Zelllinien während der spontanen Differenzierung.	25
Abb. 11: Immunfluoreszenz-Analyse während der spontanen Differenzierung.	27
Abb. 12: Morphologische Analyse der iPS-Zelllinien während der Entwicklung zu NSC.	28
Abb. 13: Relative quantitative Analyse NSC-assoziiierter Transkripte.	29
Abb. 14: Immunfluoreszenz-Analyse NSC-assoziiierter Marker.	30
Abb. 15: Immunfluoreszenz-Analyse NPC-assoziiierter Marker.	32
Abb. 16: Morphologische Analyse der kortikalen Neurone I.	34
Abb. 17: Morphologische Analyse der kortikalen Neurone II.	35
Abb. 18: Transkriptanalyse neuronaler, synaptischer und glialer Marker während der Differenzierung.	35
Abb. 19: Relative quantitative Transkriptanalyse der Proteine NRXN1, 2 und 3.	37
Abb. 20: Immunfluoreszenz-Analyse neuronaler Marker.	38
Abb. 21: Elektrophysiologische Analyse der kortikalen Neurone mittels <i>Patch-Clamp</i> -Technik.	40

Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Medium für die spontane Differenzierung. _____	11
Tab. 2: Medien für die terminale Differenzierung. _____	12
Tab. 3: Reaktionsansatz für RT-PCR mittels Firepol DNA Polymerase. _____	14
Tab. 4: Reaktionsansatz für RT-PCR mittels Platinum™ Taq DNA Polymerase. _____	14
Tab. 5: Programm für RT-PCR. _____	14
Tab. 6: Lösungen für die Gelelektrophorese. _____	15
Tab. 7: Reaktionsansatz für qRT-PCR. _____	15
Tab. 8: Programm für qRT-PCR. _____	15
Tab. 9: Lösungen der <i>Patch-Clamp</i> -Versuche. _____	19

1 Einleitung

1.1 Schizophrenie

Schizophrenie ist eine schwerwiegende psychiatrische Erkrankung, die Veränderungen im Erleben und Verhalten der Betroffenen hervorruft (Caspar et al. 2018). Dies äußert sich in Symptomen wie Halluzinationen jeder Sinnesmodalität, Wahnvorstellungen und Ich-Störungen. Zu Letzteren zählt beispielsweise das Empfinden, dass sich eigene Gedanken ausbreiten. Zusätzlich zu den genannten produktiven oder auch positiven Symptomen, können bei den Betroffenen negative Symptome wie zum Beispiel Denk- und Kommunikationsstörungen, sozialer Rückzug oder eine Abflachung des Affekts auftreten. Da die Symptome bezüglich Muster und Ausprägungsgrad individuell variieren, ist Schizophrenie als Oberbegriff für eine heterogene Gruppe von Erkrankungen zu verstehen (Peralta und Cuesta 2001). In Abhängigkeit von der vorliegenden Symptomkonstellation lässt sich die Erkrankung nach der *International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems (ICD) -10* in den paranoiden, den hebephrenen, den katatonen und den undifferenzierten Subtyp unterteilen.

Die Lebenszeitprävalenz der Schizophrenie liegt ungefähr bei einem Prozent und weist keine geografischen oder geschlechtsspezifischen Unterschiede auf. Die Erkrankung tritt hauptsächlich im jungen Erwachsenenalter auf, wobei männliche Patienten im Durchschnitt früher betroffen sind als weibliche (Howard et al. 2000). Trotz der derzeit verfügbaren Therapieoptionen besteht ein Risiko für einen rezidivierenden oder chronischen Verlauf. Nach dem erstmaligen Auftreten einer psychotischen Episode sind bei weniger als 14 % der Patienten eine langanhaltende Remission der Symptome und ein adäquates Sozialverhalten zu verzeichnen (Robinson et al. 2004; Jääskeläinen et al. 2013). Die starke Stigmatisierung stellt häufig sowohl für die Betroffenen, als auch deren Angehörigen, ein Problem dar. Zudem ist die Erkrankung auch aus volkswirtschaftlicher Sicht relevant. In einer europaweit durchgeführten Studie waren nur 21,5 % der von Schizophrenie Betroffenen erwerbstätig (Marwaha et al. 2007). Darüber hinaus zählt Obdachlosigkeit zu den problematischen Aspekten für Menschen mit Schizophrenie. Eine großangelegte US-amerikanische Studie untersuchte ein Jahr lang das Auftreten von Obdachlosigkeit bei Menschen mit schweren psychiatrischen Erkrankungen und zeigte, dass jeder Fünfte der schizophrenen Menschen obdachlos war (Folsom et al. 2005).

Ätiologie der Schizophrenie

Bereits Ende des 19. Jahrhunderts vermutete Emil Kraepelin, der für die Schizophrenie den Begriff *Dementia praecox* prägte, eine neurobiologische Gehirnpathologie als Ursache der Erkrankung (Falkai 2016). Seitdem wurden zahlreiche Hypothesen zur Ätiologie und

Pathophysiologie der Schizophrenie aufgestellt. Einige dieser Hypothesen vermuten einen Einfluss der Neurotransmitter Dopamin, Glutamat und Gamma-Aminobuttersäure (*gamma-aminobutyric acid*, GABA) (Falkai 2016).

Pathogenetische Modelle betrachten die Erkrankung als neuronale Entwicklungsstörung. Neben neurogenetischen Störungen während der intrauterinen und frühen postnatalen Phase werden auch Entwicklungsprozesse des Gehirns in der Adoleszenz und des frühen Erwachsenenalters, wie Beschneidungen von Synapsen, als Krankheitsursache in Betracht gezogen (Keshavan et al. 2011).

Durch Ergebnisse aus Familien-, Zwillings- und Adoptionsstudien wird die Heritabilität der Schizophrenie auf 64 – 81 % geschätzt (Rujescu 2017). Ein internationales Konsortium ermittelte in genomweiten Assoziationsstudien (GWAS) 128 Einzelnukleotidpolymorphismen (*single nucleotide polymorphisms*, SNP), die mit Schizophrenie assoziiert sind (Schizophrenia Working Group of the Psychiatric Genomics Consortium 2014). Die jeweilige Effektstärke ist gering, weshalb ein Zusammenwirken verschiedener SNP vermutet wird (Rujescu 2017). Zudem sind strukturelle Genveränderungen in Form von Kopienzahlvariationen (*copy number variations*, CNV) bekannt, die bei Patienten mit Schizophrenie zwar selten vorkommen, aber einen großen Effekt aufweisen (Falkai 2016). Eine kürzlich durchgeführte Studie fand für 8 in Zusammenhang mit Schizophrenie stehende CNV eine genomweite Signifikanz. Darunter befinden sich sowohl Gendeletionen (Genloci 1q21.1, 2p16.3, 3q29, , 15q13.3, 16p11.2 distal und 22q11.2) als auch Genduplikationen (Genloci 7q11.2 und 16p11.2 proximal) (Marshall et al. 2017).

Ein weiterer Aspekt im Hinblick auf die Ätiologie der Schizophrenie ist der Einfluss von Umweltfaktoren, die mit den genetischen Risikovarianten interagieren. Zu diesen Faktoren zählen beispielsweise Schwangerschafts- und Geburtskomplikationen oder der Missbrauch von Cannabis (Gauggel und Kircher 2008).

1.2 Neurexine (NRXN)

Wie bereits erwähnt, zählt 2p16.3 zu den Genloci, die mit Schizophrenie signifikant assoziiert sind. Auf diesem Chromosomenabschnitt liegt das Neurexin 1 (NRXN1)-Gen. Beim Menschen existieren drei unterschiedliche NRXN-Gene NRXN1 (2p16.3), NRXN2 (11q13.1) und NRXN3 (14q24.3-q31.1) (Tabuchi und Südhof 2002).

Ein möglicher Zusammenhang zwischen CNV in NRXN1 und dem Auftreten von Schizophrenie wurde zunächst in zwei Studien gefunden, in denen jeweils eine Familie

betroffen war (Kirov et al. 2007; Walsh et al. 2008). Darauffolgend wurde die Assoziation in einer großangelegten genomweiten Studie mit schizophrenen Patienten und gesunden Probanden aus sieben europäischen Ländern bestätigt. Es wurde gezeigt, dass insbesondere heterozygote Deletionen, die zur Unterbrechung von Exons führen, für die Ätiologie der Schizophrenie eine Rolle spielen (Rujescu et al. 2009). NRXN1-Deletionen sind in ungefähr 0,18 % der Fälle für die Erkrankung ursächlich (Rees et al. 2014). Weiterhin ist bekannt, dass CNV in NRXN1 auch für die Entstehung anderer psychischer Krankheitsbilder, wie Autismus und mentaler Retardierung, von Bedeutung sind (Ching et al. 2010). Bislang sind keine CNV in NRXN2 und 3 bekannt, die im Zusammenhang mit der Entstehung von Schizophrenie stehen.

Das NRXN1-Gen zählt mit ungefähr 1,1 Mega-Basenpaaren (Mbp) zu den größten bekannten Genen des humanen Genoms. Während das NRXN3-Gen mit ungefähr 1,7 Mbp ebenfalls eine beachtliche Größe hat, stellt das NRXN2-Gen mit in etwa 110 Kilo-Basenpaaren das kleinste Gen dieser Gruppe dar. Durch voneinander unabhängige Promotoren α und β codiert jedes der drei NRXN-Gene für ein längeres α -NRXN und ein kürzeres β -NRXN (Tabuchi und Südhof 2002). Das NRXN1-Gen besitzt zusätzlich einen γ -Promotor, von dem ein γ -NRXN transkribiert wird (Sterky et al. 2017). Da die *messenger ribonucleic acid* (mRNA) für die Translation der NRXN-Proteine an sechs verschiedenen Stellen durch alternatives Spleißen modifiziert wird, wird die Anzahl der Proteinisoformen auf mehrere 1000 geschätzt (Tabuchi und Südhof 2002; Treutlein et al. 2014). Dies hat eine eindrucksvolle molekulare Vielfalt zur Folge.

Die Proteine der NRXN-Familie sind präsynaptische, transmembrane Zelladhäsionsmoleküle, die in exzitatorischen und inhibitorischen Synapsen des zentralen Nervensystems (ZNS) vorkommen. In synaptischen Netzwerken, in denen zahlreiche Moleküle interagieren, nehmen sie eine zentrale Rolle ein, regulieren synaptische Eigenschaften und beeinflussen neuronale Schaltkreise (Südhof 2017). Bisherige Forschungen heben die Bedeutung der NRXN für synaptische Funktionen hervor. Experimentelle Studien an Mäusen haben beispielsweise gezeigt, dass α -NRXN für die Funktion präsynaptischer Kalziumkanäle entscheidend sind und demnach für die Ausschüttung von Neurotransmittern eine wichtige Rolle spielen (Missler et al. 2003). Auch für differenzierte humane Neuronen mit einer NRXN1-Deletion konnte eine beeinträchtigte Neurotransmitterausschüttung festgestellt werden (Pak et al. 2015). Über extrazelluläre Sequenzen, in denen sich α -NRXN von β - bzw. γ -NRXN unterscheiden (Südhof 2008), werden zahlreiche Liganden gebunden. Zu diesen gehören verschiedene postsynaptische Proteinfamilien. Die Interaktionen in diesem molekularen Netzwerk werden unter anderem durch das alternative Spleißen der NRXN beeinflusst. Zu den bereits identifizierten Bindungspartnern zählen unter anderem Proteine der Neuroligin (NLGN)-Familie, die mit

NRXN transsynaptische Komplexe bilden. Beim Menschen kodieren fünf Gene für die verschiedenen NLGN-Proteine, welche jeweils bestimmten synaptischen Unterkategorien zugeordnet werden können (Ichtchenko et al. 1996; Südhof 2008). So ist NLGN1 beispielsweise in exzitatorischen, glutamatergen Synapsen lokalisiert (Song et al. 1999). Proteine der NLGN-Familie stehen ebenfalls im Zusammenhang mit neuropsychiatrischen Erkrankungen (Jamain et al. 2003; Laumonier et al. 2004).

1.3 Induzierte pluripotente Stammzellen (iPS-Zellen)

Die Auswirkungen des ätiologischen Zusammenhangs zwischen CNV in NRXN1 und Schizophrenie sind auf zellulärer Ebene bisher kaum verstanden. Zugrunde liegende Pathomechanismen können mit Hilfe induzierter pluripotenter Stammzellen (iPS-Zellen), die durch Reprogrammierung adulter somatischer Zellen entstehen, erforscht werden. Das Differenzierungspotential von iPS-Zellen ermöglicht die Untersuchung von schwer zugänglichen Geweben wie beispielsweise Neuronen, deren Erforschung für die Ätiologie der Schizophrenie essentiell ist.

Die Reprogrammierung von humanen Hautfibroblasten zu iPS-Zellen gelang erstmals im Jahr 2007 (Takahashi et al. 2007). Auch andere Zellen wie beispielsweise B-Lymphozyten können als somatisches Ausgangsmaterial verwendet werden (Abb. 1). In diesem Fall lässt sich der Erfolg der Reprogrammierung durch eine vergleichende Analyse der hergestellten iPS-Zellen und adulter B-Lymphozyten anhand B-Zell-assoziiierter Markergene wie *B and T lymphocyte associated* (BTLA), *early B-cell-factor transcription factor 1* (EBF1), *Fc receptor like A* (FCRLA), *G protein-coupled receptor 183* (GPR183), *IKAROS family zinc finger 3* (IKZF3) und *T cell leukemia/ lymphoma 1A* (TCL1A) beurteilen (Kiss et al. 2003; Yoon et al. 2012; Gatto und Brink 2013; Ferreirós-Vidal et al. 2013; Capone et al. 2016).

Anfänglich wurden für die Reprogrammierungen Retro- oder Lentiviren genutzt (Takahashi et al. 2007; Yu et al. 2007). Inzwischen gibt es eine Reihe anderer Methoden, zu denen unter anderem die Reprogrammierung mittels nichtviraler episomaler Plasmide (Yu et al. 2009; Barrett et al. 2014) oder die Verwendung hypoxischer Zellkulturbedingungen gehören, wie unsere Arbeitsgruppe zeigen konnte (Foja et al. 2013).

Die Eigenschaften von iPS-Zellen sind mit denen embryonaler Stammzellen (*embryonic stem cells*, ESC), die aus der inneren Zellmasse der Blastozyste gewonnen werden, vergleichbar. Neben der Expression alkalischer Phosphatasen sind zahlreiche Transkriptionsfaktoren für pluripotente Stammzellen (*pluripotent stem cells*, PSC) charakteristisch und dementsprechend sowohl mit ESC als auch mit iPS-Zellen assoziiert. Zu diesen zählen beispielsweise *octamer-binding transcription factor 4* [OCT4, auch bekannt als *POU class 5 homeobox 1* (POU5F1)],

Nanog homeobox (NANOG), *sex determining region Y-box 2* (SOX2), *developmental pluripotency associated 2* (DPPA2), *Kruppel like factor 4* (KLF4), *lin-28 homolog A* (LIN28A), *MYC proto-oncogene*, (MYC) und *RE1 silencing transcription factor* (REST) (Takahashi et al. 2007; Singh et al. 2008). Zudem zählen das epithelassozierte Protein *cadherin 1* (CDH1) und die Oberflächenantigene *stage-specific embryonic antigen 4* (SSEA4), *tumor rejection antigen-1-60* und *tumor rejection antigen-1-81* (TRA-1-60, TRA-1-81) zu klassischen Pluripotenz-assoziierten Markern (Adewumi et al. 2007; Takahashi et al. 2007).

Ebenso wie ESC können iPS-Zellen in die drei Keimblätter Entoderm, Mesoderm und Ektoderm differenzieren, aus denen im Laufe der embryonalen Entwicklung alle Gewebetypen des menschlichen Körpers entstehen. Die Ausbildung entodermaler Strukturen lässt sich unter anderem an der Expression der Marker *C-X-C motif chemokine receptor 4* (CXCR4), *forkhead box A2* (FOXA2) und *SRY-box transcription factor 17* (SOX17) erkennen (D'Amour et al. 2005). Während der Entwicklung mesodermaler Gewebe spielen Marker wie *paired related homeobox 1* (PRRX1), *mesenchyme homeobox 1* (MEOX1) und *T-box transcription factor T* (T, auch bekannt als Brachyuri oder TBXT) eine wichtige Rolle (Loh et al. 2016). In ektodermalen Geweben lassen sich beispielsweise die Marker *musashi RNA binding protein 1* (MSI1), *paired box 6* (PAX6) und *sonic hedgehog signaling molecule* (SHH) nachweisen (Liem et al. 2000; Battelli et al. 2006; Pankratz et al. 2007).

Die Forschung mit iPS-Zellen zur Klärung von Krankheitsursachen wird im Vergleich zur Verwendung von ESC ethisch weniger kontrovers diskutiert. Zudem bietet sie den Vorteil, dass die differenzierten Gewebe patienten- und damit krankheitsspezifisch sind. Daraus ergibt sich neben der Modellierung ätiologisch ungeklärter Krankheiten eine Reihe klinischer Anwendungsmöglichkeiten, wie beispielsweise die Erprobung neuer Medikamente oder Einsatzmöglichkeiten in der regenerativen Medizin (Abb. 1, Yamanaka 2009).

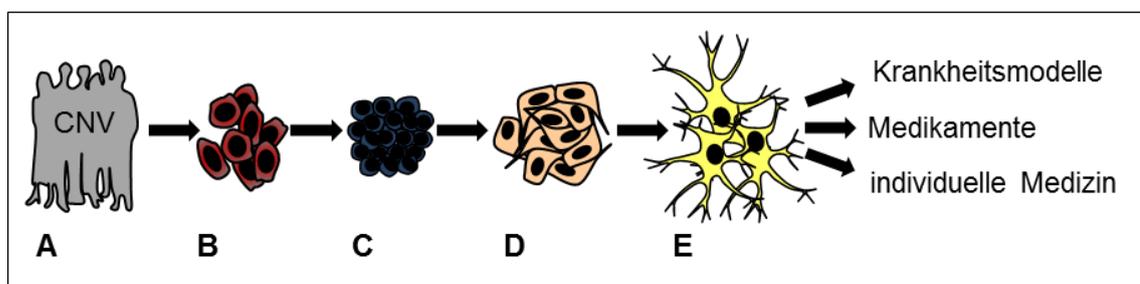


Abb. 1: Ablauf der Reprogrammierung und Differenzierung von iPS-Zellen.

Durch Reprogrammierung adulter Körperzellen wie B-Lymphozyten (B) entstehen induzierte pluripotente Stammzellen (iPS-Zellen) (C). Diese können unter anderem über neurale Vorläuferzellen (D) in Neurone (E) differenziert werden, die für die Analyse genetischer Veränderungen wie Kopienzahlvariationen (*copy number variations*, CNV) in Patienten (A) genutzt werden können.

1.4 Neuronale Differenzierung

Die Neurogenese *in vitro* weist viele Parallelen zu der Entwicklung des Nervensystems *in vivo* auf. Durch die neurale Induktion erfolgt eine Spezifizierung des Ektoderms in neurale Richtung (Tropepe et al. 2001). *In vivo* faltet sich das Neuroepithel anschließend zum Neuralrohr. Das Äquivalent *in vitro* ist die Entstehung neuraler Rosetten. Dabei handelt es sich um eine radiale und säulenartige Anordnung von Zellen mit zentralem Lumen, die dem Querschnitt des Neuralrohrs entspricht (Pankratz et al. 2007). Das Neuralrohr enthält multipotente neurale Stammzellen (*neural stem cells*, NSC), aus denen neurale Progenitorzellen (*neural progenitor cells*, NPC) hervorgehen. Die Expression der Marker *achaete-scute family bHLH transcription factor 1* (ASCL1), *nestin* (NES), *paired box 6* (PAX6), *SRY-box transcription factor 1* und 2 (SOX1 und 2) ist mit NSC assoziiert (Elkabatz et al. 2008; Koch et al. 2009). Zudem lassen sich A2B5, *musashi RNA binding protein 1* (MSI1), *neurogenin 3* (NEUROG3), *pleiotrophin* (PTN), *stage-specific embryonic antigen 1* (SSEA1) und *vimentin* (VIM) in neuronalen Vorläuferzellen nachweisen (Silos-Santiago et al. 1996; Reubinoff et al. 2001; Yanagisawa et al. 2005; Battelli et al. 2006; Simon-Arecas et al. 2011).

Aus NSC bilden sich alle Neuronenarten des Nervensystems. Ein spezifischer neuronaler Marker ist beispielsweise *tubulin beta 3 class III* (TUBB3) (Koch et al. 2009). Außerdem entstehen aus den multipotenten NSC Gliazellen, zu denen Astrozyten und Oligodendrozyten gehören. Diese können anhand des astrozytären Markers *glial fibrillary acidic protein* (GFAP) und des oligodendrozytären Markers *oligodendrocyte transcription factor 2* (OLIG2) nachgewiesen werden (Koch et al. 2009; Emery 2010).

Das Neuralrohr bildet sich entlang der rostro-kaudalen Achse. Zudem entsteht bei der Entwicklung des Gehirns eine ventro-dorsale Achse. Entlang dieser Achsen bilden sich zeitliche und räumliche Gradienten von Morphogenen, die die weitere Spezifizierung der NPC in regionale Subtypen beeinflussen (Abb. 2, Petros et al. 2011). Unter Beachtung dieser Prinzipien und Zugabe entsprechender Morphogene kann auch *in vitro* das Schicksal differenzierender Zellen bestimmt werden.

Die humane Großhirnrinde besitzt einen komplexen sechsschichtigen Aufbau. Den verschiedenen Schichten lassen sich spezifische Markergene zuordnen. So ist der Transkriptionsfaktor *COUP-TF-interacting protein 2* [CTIP2, auch bekannt als BAF chromatin remodeling complex subunit BCL11B (BCL11B)] beispielsweise typisch für die beiden tiefsten Hirnschichten (Gaspard et al. 2009).

In den Netzwerken adulter Neurone werden die Verbindungspunkte durch Synapsen hergestellt, die Informationen nicht nur übertragen, sondern auch modellieren (Südhof 2017). Ein wichtiger

Schritt für die synaptische Transmission ist die Ausschüttung von Neurotransmittern. Proteine wie Syntaxine (STX), *synaptotagmin 1* (SYT1) und *vesicle associated membrane protein 2* (VAMP2) spielen hierbei eine entscheidende Rolle (Söllner et al. 1993; Geppert et al. 1994). Zu etwa 80 % ist der Großteil der kortikalen Neuronen glutamaterg. Der Neurotransmitter Glutamat bindet an unterschiedliche Rezeptoren und wirkt dort exzitatorisch. Zu diesen Rezeptoren gehört u. a. *glutamate ionotropic receptor AMPA type subunit 2* (GRIA2). Der häufigste inhibitorische Neurotransmitter ist GABA. An Rezeptoren wie *gamma-aminobutyric acid type B receptor subunit 1* (GABBR1) bewirkt er eine Hemmung der neuronalen Erregung.

Im Großhirn entstehen Bewusstsein und die Verarbeitung kognitiver Prozesse. Daher liegt hier der Ursprung für neuropsychiatrische Erkrankungen wie Schizophrenie und der Fokus für die Aufklärung pathologischer Vorgänge.

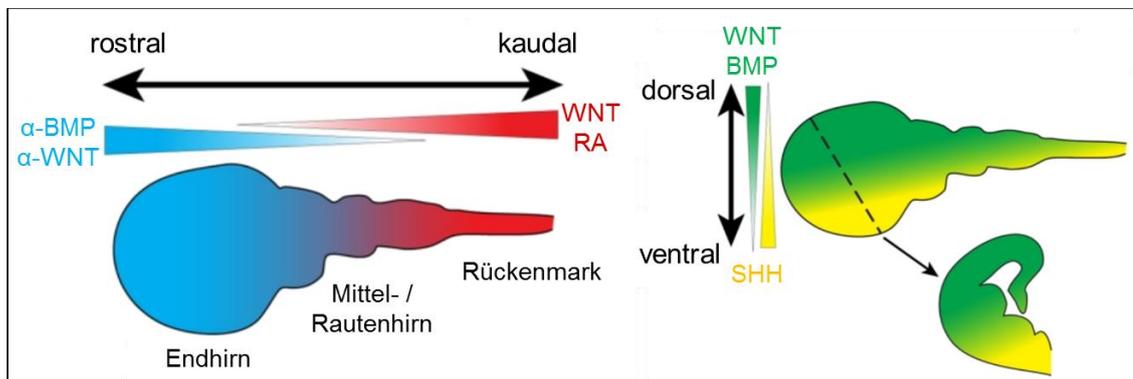


Abb. 2: Morphogene während der embryonalen Entwicklung des Nervensystems.

Entlang der beiden Achsen wird durch morphogenetische Gradienten die regionale Spezifizierung der Zellen beeinflusst. Der kleine Pfeil weist auf einen Koronarschnitt entlang der gestrichelten Linie hin. Die Abbildung wurde nach Petros et al. 2011 erstellt.

α: anti, BMP: *bone morphogenetic protein*, RA: *retinoic acid*, SHH: *sonic hedgehog signaling molecule*, WNT: *wingless / integrated*

2 Zielstellung

Heterozygote NRXN1-Deletionen gehören zu den CNV, welche mit der psychiatrischen Erkrankung Schizophrenie assoziiert sind. Dies konnte durch genomweite Assoziationsstudien gezeigt werden. Die Auswirkungen dieser genetischen Veränderungen auf zellulärer Ebene sind bisher jedoch kaum verstanden.

Ziel der vorliegenden Doktorarbeit ist es daher iPS-Zellen, die aus B-Lymphozyten schizophrener Patienten mit heterozygoter NRXN1-Deletion erstmalig hergestellt und von der Arbeitsgruppe zur Verfügung gestellt wurden, hinsichtlich ihres pluripotenten Stammzellcharakters zu untersuchen. Durch spontane Differenzierung und anschließende Analyse spezifischer Marker soll die Fähigkeit der Zellen, Derivate aller drei Keimblätter bilden zu können, nachgewiesen werden. Ein weiteres Ziel ist eine Transkriptanalyse der iPS-Zelllinien im Hinblick auf B-Zell-assoziierte Marker.

Ziel der Arbeit soll weiterhin die Generierung von NSC-Linien aus den iPS-Zellen und deren Charakterisierung anhand assoziierter Marker sein. Die NSC-Linien mit der besten neuronalen Induktion sollen schließlich zu kortikalen Neuronen differenziert werden. Durch *Patch-Clamp*-Untersuchungen soll die Fähigkeit der hergestellten Neurone, physiologisch auf die Neurotransmitter Glutamat und GABA reagieren zu können, getestet werden. Im Verlauf der Differenzierung soll weiterhin die Transkriptmenge von NRXN1 quantitativ erfasst und im Hinblick auf Unterschiede zu ebenfalls neuronal differenzierten Kontrollzelllinien von psychiatrisch gesunden Spendern beurteilt werden.

Hypothesen:

- (1) Die aus B-Lymphozyten hergestellten iPS-Zellen der NRXN1-CNV-Linien weisen Merkmale humaner pluripotenter Stammzellen auf und sind mit etablierten iPS-Zelllinien vergleichbar.
- (2) Die iPS-Zellen der NRXN1-CNV-Linien lassen sich zu neuronalen Stammzellen und funktionsfähigen kortikalen Neuronen differenzieren.
- (3) Neurone der NRXN1-CNV-Linien unterscheiden sich hinsichtlich ihrer NRXN1-Expression auf RNA- und Proteinebene von Neuronen aus Kontrollzelllinien ohne NRXN-Deletion.

3 Material und Methodik

3.1 Zellkultur

Die Zellen wurden in einem Inkubator bei 37 °C, 95 % Luftfeuchtigkeit und 21 % O₂, 78 % N₂ und 5 % CO₂ (Normoxie) oder 5 % O₂, 90 % N₂ und 5 % CO₂ (Hypoxie) kultiviert. Jedes Kulturmedium wurde vor Verwendung auf 37 °C im Wasserbad erwärmt.

3.1.1 Zelllinien

NRXN1-CNV-Zelllinien

Durch eine venöse Blutentnahme wurden B-Lymphozyten der Patienten gewonnen. Unter Verwendung von Epstein-Barr-Viren (EBV) wurden diese immortalisiert. Durch Reprogrammierung der B-lymphoblastoiden Zellen (Barrett et al. 2014) mittels nicht integrierender episomaler Plasmide (Addgene: #27080, #27077, #27078, #20927) mit dem Neon Transfektionssystem (Thermo Fisher Scientific, Deutschland) wurden die iPS-Zelllinien hergestellt. Die iPS-Zelllinien wurden von der Arbeitsgruppe für die weitere Charakterisierung zur Verfügung gestellt.

Patient 1 ist männlich und erkrankte im Alter von 25 Jahren an Schizophrenie. Eine heterozygote Deletion des NRXN1-Gens (CNV-Grenzen: chr2: 50.884.834 - 51.154.665) wurde nachgewiesen. Von Patient 1 standen die Linien MLUi001-B, -F, -M, -N und -O (Benennung nach (Kurtz et al. 2018)) zur Verfügung. Patient 2 ist männlich und erkrankte im Alter von 21 Jahren an Schizophrenie. Eine heterozygote Deletion des NRXN1-Gens (CNV-Grenzen: chr2: 50.746.947 - 50.994.315) wurde nachgewiesen. Von Patient 2 standen die Linien MLUi002-E und -G zur Verfügung.

Die CNV-Grenzen wurden mittels Sanger-Sequenzierung (*primerwalking*) durch die Arbeitsgruppe analysiert. Andere mit Schizophrenie assoziierte CNV wurden ausgeschlossen.

Kontrollzelllinien

Die Zelllinie IPS(IMR90)-4 wurde durch lentivirale Reprogrammierung mit den Faktoren OCT4, SOX2, NANOG und LIN28A der humanen fetalen Lungenfibroblastenzelllinie IMR90 hergestellt (Yu et al. 2007).

Die Zelllinie iPS-DF19-9-7T stammt von Vorhautfibroblasten eines Neugeborenen und wurde durch Reprogrammierung mittels nicht integrierender episomaler Vektoren mit den Faktoren OCT4, SOX2, NANOG, LIN28A, L-MYC, KLF4 und *simian virus 40 large T antigen* hergestellt (Yu et al. 2009).

Die Zelllinien sind bei Wicell Research Institute, USA erhältlich.

ARH-77 und LCL-HO

Die humanen B-lymphoblastoiden Zelllinien ARH-77 (Burk et al. 1978) und LCL-HO (Uphoff et al. 2010) wurden von Patienten mit Plasmazell-Leukämie bzw. Melanom gewonnen und sind bei der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Deutschland erhältlich.

3.1.2 Routinekultivierung der iPS-Zellen

Die iPS-Zellen wurden bei Hypoxie auf mit Matrigel™ Growth Factor Reduced Matrix (Thermo Fisher Scientific, Deutschland) beschichteten Nunc™ Zellkultur-Multischalen (Thermo Fisher Scientific, Deutschland) in mTeSR™1-Medium (Stemcell Technologies, Deutschland) kultiviert. Dem Medium wurde 1 % 10.000 U/10.000 µg Penicillin/Streptomycin (Thermo Fisher Scientific, Deutschland) zugegeben. Es erfolgte ein täglicher Mediumwechsel.

Für die Matrigel™-Beschichtung wurden pro 9,6 cm²-Well 0,5 mg Matrigel™ in 1 ml KnockOut™ Dulbecco's Modified Eagle Medium (Thermo Fisher Scientific, Deutschland) gelöst und in den Kulturschalen für mindestens 1 h bei 37 °C inkubiert. Vor Gebrauch der Kulturschalen wurde die Beschichtungslösung verworfen und durch mTeSR™1 ersetzt.

Für die Passage wurde das Kulturmedium entfernt, die Zellen mit Ca²⁺- und Mg²⁺-freier phosphatgepufferter Salzlösung (*phosphate-buffered saline*, PBS, Merck, Deutschland) gewaschen und anschließend mit sterilfiltrierter Kollagenase IV (250 – 300 U/ml) gelöst in DMEM/F-12 (beides Thermo Fisher Scientific, Deutschland) behandelt. Wenn sich die Ränder der Kolonien ablösen, wurde zum Abstoppen der Reaktion mTeSR™1 hinzugefügt. Die Zellen wurden durch pipettieren vom Schalenboden gelöst. Die Zellsuspension wurde in ein Zentrifugenröhrchen überführt und für 5 min bei 1000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen vorsichtig in 1 ml mTeSR™1 resuspendiert. Die Zellsuspension wurde auf mit Matrigel beschichtete und mit mTeSR™1 befüllte Kulturplatten verteilt. Das Splitverhältnis betrug 1:50 bis 1:10. Die Passage erfolgte wöchentlich.

Zur Kryokonservierung wurden die Zellen wie zur Passage abgelöst und zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in ein Kryomedium aufgenommen, welches sich aus 60 % mTeSR™1, 30 % KnockOut™ Serum Replacement (Thermo Fisher Scientific, Deutschland) und 10 % Dimethylsulfoxid (Merck, Deutschland) zusammensetzte. Die Zellsuspension wurde in Kryoröhrchen überführt. Dieses wurde über Nacht bei –80 °C gelagert und am darauffolgenden Tag in flüssigen Stickstoff überführt.

3.1.3 Spontane Differenzierung

Für die spontane Differenzierung wurden die iPS-Zellen bei Normoxie für 10 d in einem spontanen Differenzierungsmedium (Tab. 1) kultiviert. Das Medium wurde alle 2 d gewechselt. Eine Probennahme der Zellen erfolgte an 3 d, 5 d, 7 d und 10 d.

Tab. 1: Medium für die spontane Differenzierung.

Zusammensetzung	Hersteller	Endkonzentration
DMEM mit L-Glutamin	Thermo Fisher Scientific, Deutschland	~ 40 %
Ham's F-12 Nutrient Mix	Thermo Fisher Scientific, Deutschland	~ 40 %
FCS "human ESC-qualified"	Thermo Fisher Scientific, Deutschland	~ 20 %
L-Glutamin (100 x, 200 mM)	Merck, Deutschland	2 mM
NEAA (100 x, 10 mM)	Thermo Fisher Scientific, Deutschland	0,1 mM
Penicillin/Streptomycin (100 x, 10000 U/ml / 10000 µg/ml)	Thermo Fisher Scientific, Deutschland	100 U/ml / 100 µg/ml
β-Mercaptoethanol (1000 x, 55 mM)	Thermo Fisher Scientific, Deutschland	0,1 mM

3.1.4 Differenzierung zu NSC

Für die gerichtete neurale Differenzierung wurden die iPS-Zellen bei Normoxie für 7 d in STEMdiff™ Neural Induction Medium (NIM, Stemcell Technologies, Deutschland) kultiviert. Dem Medium wurde 1 % 10.000 U/10.000 µg Penicillin/Streptomycin zugegeben. Das Medium wurde alle 2 d gewechselt. Eine Probennahme der Zellen erfolgte an 7 d.

3.1.5 Terminale Differenzierung der NSC zu kortikalen Neuronen

Bei der terminalen Differenzierung (TD) der NSC zu kortikalen Neuronen wurde das NSC-Stadium als 0 d festgelegt. Die Zellen wurden bei Normoxie zunächst für 7 d in einem terminalen Differenzierungsmedium 1 (TDM1, Tab. 2) kultiviert. Der Mediumwechsel erfolgte alle 3 d. An 7 d erreichten die Zellen das NPC-Stadium. Das Medium wurde durch TDM2 ersetzt (Tab. 2) und alle 3 – 4 d gewechselt.

An 43 d wurden die Zellen neu ausplattiert. Für die enzymatische Ablösung wurden die Zellen mit PBS gespült und anschließend mit TrypLE™ Express Enzyme (Thermo Fisher Scientific, Deutschland) bei Raumtemperatur inkubiert. Die Reaktion wurde mit TDM2 abgestoppt. Die Zellen wurden in ein Zentrifugenröhrchen überführt und für 5 min bei 1000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die pelletierten Zellen in TDM2 resuspendiert. Das Ausplattieren erfolgte auf Poly-L-Ornithin- / Laminin-beschichtete Nunc™ Zellkultur-Multischalen. Die Kultivierung der Zellen wurde mit TDM2 fortgesetzt.

Für die Poly-L-Ornithin- / Laminin-Beschichtung wurden die Zellkulturschalen zunächst mit Poly-L-Ornithin (Merck, Deutschland) beschichtet und für 24 h bei 37 °C inkubiert. Poly-L-Ornithin wurde zuvor in 150 mM Natrium-Borat-Puffer gelöst und 1:10 verdünnt. Die Beschichtungslösung wurde abgenommen. Die Zellkulturschalen wurden unter der

Sterilwerkbank getrocknet, dreimalig mit entionisiertem Wasser gespült und erneut unter der Sterilwerkbank getrocknet. Danach wurden die Schalen mit 1 % Laminin (Merck, Deutschland) in PBS beschichtet und für 1 h bei 37 °C inkubiert.

An 66 d wurden die Zellen nochmals wie für 43 d beschrieben ausplattiert. Die Kultivierung der Zellen wurde mit TDM2 bis 78 d fortgesetzt (Abb. 3).

Tab. 2: Medien für die terminale Differenzierung.

Zusammensetzung	Hersteller	Endkonzentration
TD-Grundmedium		
DMEM mit L-Glutamin, HEPES	Thermo Fisher Scientific, Deutschland	~ 25 %
Ham´s F-12 Nutrient Mix	Thermo Fisher Scientific, Deutschland	~ 25 %
Neurobasal Medium	Thermo Fisher Scientific, Deutschland	~ 50 %
B-27™ Supplement (50 x), minus Vitamin A	Thermo Fisher Scientific, Deutschland	10 µl/ml
Penicillin/Streptomycin (100 x, 10000 U/ml / 10000 µg/ml)	Thermo Fisher Scientific, Deutschland	100 U/ml / 100 µg/ml
Adenosine 3',5'-cyclic monophosphate (cAMP)	Merck, Deutschland	0,3 µg/ml
Zusätze TDM1		
N-2 Supplement (100 x)	Thermo Fisher Scientific, Deutschland	10 µl/ml
Recombinat Murine WNT-3a	Peprtech, Deutschland	1 ng/ml
Cyclopamine-KAAD	Merck, Deutschland	1 µM
Zusätze TDM2		
Recombinant Human/Murine/Rat BDNF	Peprtech, Deutschland	10 ng/ml
Recombinant Human GDNF	Peprtech, Deutschland	10 ng/ml

BDNF: *brain-derived neurotrophic factor*, GDNF: *glial cell line-derived neurotrophic factor*
 Cyclopamine-KAAD: *Cyclopamine-3-Keto-N-aminoethyl-N'-aminocaproyldihydrocinnamoyl*

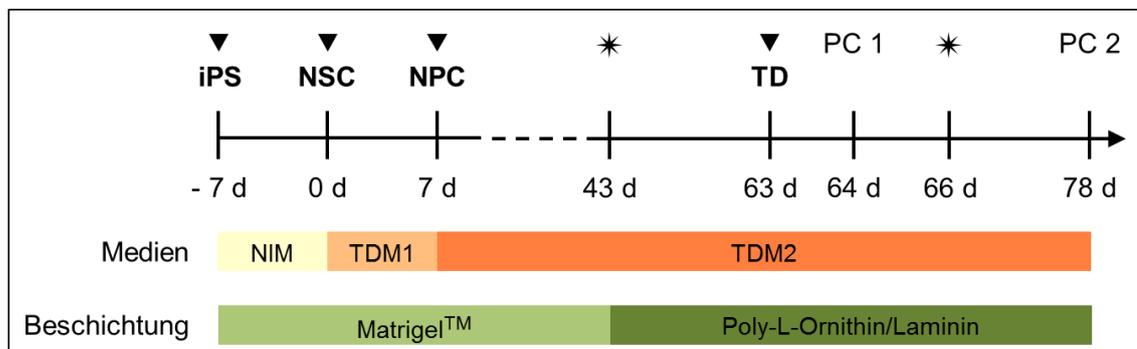


Abb. 3: Differenzierung der induzierten pluripotenten Stammzellen (iPS-Zellen) zu kortikalen Neuronen.

Übersicht über den Ablauf der Differenzierung mit Darstellung der verwendeten Medien und Beschichtungen der Zellkulturschalen.

* Ausplattieren, ▼ Probennahme, PC: *Patch-Clamp*-Untersuchungen

3.2 Molekularbiologische Methoden

3.2.1 RNA-Isolation

Für die *ribonucleic acid* (RNA)-Präparation wurden die Zellen mit einem Zellschaber vom Schalenboden gelöst, in 1 ml PBS aufgenommen, in ein Reaktionsgefäß überführt und für 5 min bei 1000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 594 µl Lysepuffer (Qiagen, Deutschland) und 6 µl β-Mercaptoethanol (Serva, Deutschland) resuspendiert.

Die RNA-Isolation erfolgte mittels RNeasy Mini Kit (Qiagen, Deutschland) nach Herstellerangaben. Zusätzlich wurde ein 15-minütiger DNase-Verdau mit DNase I (Qiagen, Deutschland) durchgeführt. Die RNA wurde in 30 µl nukleasefreiem Wasser eluiert und die RNA-Konzentration in Doppelbestimmung mit dem Plattenlesegerät Synergymx (BioTek, Deutschland) bestimmt. Als Referenz dienten 2 µl nukleasefreies Wasser. Die isolierte RNA wurde bei - 80 °C gelagert.

3.2.2 Reverse Transkription

Jeweils 1 µg der isolierten RNA wurde mittels reverser Transkriptase in *complementary deoxyribonucleic acid* (cDNA) umgeschrieben. Die RNA wurde mit 1 µl Oligo(dT)18 Primer (Thermo Fisher Scientific, Deutschland) und nukleasefreiem Wasser (Qiagen, Deutschland) auf ein Gesamtvolumen von 12,5 µl vereinigt. Der Ansatz wurde 5 min bei 65 °C in einem Thermoblock inkubiert und anschließend auf 4 °C heruntergekühlt. Danach wurden 7,5 µl Mastermix (alles Thermo Fisher Scientific, Deutschland), bestehend aus 4 µl 5 x Reaktionspuffer, 0,5 µl RNase Inhibitor, 2 µl Desoxynukleotid-5'-triphosphate (dNTPs, 10 mM) und 1 µl Reverse Transkriptase (200 U/µl), zugegeben. Die reverse Transkription erfolgte in dem Temperaturzyklus-Steuergerät TRIO Thermoblock (Biometra, Deutschland) für 60 min bei 42 °C. Der Ansatz wurde anschließend erst für 10 min bei 70 °C inkubiert, bevor er auf 4 °C heruntergekühlt wurde. Die cDNA wurde bei - 20 °C gelagert.

3.2.3 Reverse transcriptase - polymerase chain reaction (RT-PCR)

Die RT-PCR-Ansätze wurden entsprechend (Tab. 3) hergestellt. Um MYC, NANOG, KLF4 und NLGN1 nachzuweisen, wurde die cDNA mittels Platinum Taq DNA Polymerase High Fidelity (Thermo Fisher Scientific, Deutschland) entsprechend Tab. 4 amplifiziert. Die entsprechenden Primersequenzen sind in Anlage 3 aufgelistet. Das verwendete PCR-Programm ist in Tab. 5 dargestellt und wurde mit dem Temperaturzyklus-Steuergerät Master Gradient (Eppendorf, Deutschland) durchgeführt.

Tab. 3: Reaktionsansatz für RT-PCR mittels Firepol DNA Polymerase.

Bestandteil	Hersteller	Volumen
cDNA		1,0 ng/µl
Nukleasefreies Wasser	Qiagen, Deutschland	16,25 µl
Puffer B (10 x)	Solis BioDyne, Estland	2,5 µl
MgCl ₂ (25 mM)	Merck, Deutschland	2,0 µl
dNTPs (2,5 mM)	Thermo Fisher Scientific, Deutschland	2,0 µl
S Primer		0,5 µl
AS Primer		0,5 µl
Firepol DNA Polymerase (5 U/µl)	Solis BioDyne, Estland	0,25 µl

S: *sense*, AS: *antisense*

Tab. 4: Reaktionsansatz für RT-PCR mittels Platinum™ Taq DNA Polymerase.

Bestandteil	Hersteller	Volumen
cDNA		1,0 ng/µl
Nukleasefreies Wasser	Qiagen, Deutschland	17,9 µl
High Fidelity PCR Puffer (10 x)	Thermo Fisher Scientific, Deutschland	2,5 µl
MgSO ₄ (50 mM)	Thermo Fisher Scientific, Deutschland	1,0 µl
dNTPs (10 mM)	Thermo Fisher Scientific, Deutschland	0,5 µl
S Primer		1,0 µl
AS Primer		1,0 µl
Platinum™ Taq DNA Polymerase High Fidelity (5 U/µl)	Thermo Fisher Scientific, Deutschland	0,25 µl

S: *sense*, AS: *antisense*

Tab. 5: Programm für RT-PCR.

Reaktion	Temperatur	Zeit
DNA-Polymerase-Hitzeaktivierung	95 °C	5 min
DNA-Hitzedenaturierung	95 °C	30 s
Hybridisierung	60 °C	30 s
Elongation	72 °C	30 s
Elongation	72 °C	10 min
Stop	4 °C	∞

3.2.4 Gelelektrophorese

Die amplifizierten DNA-Fragmente wurden mittels Gelelektrophorese in 2 % Agarosegelen (Biozym LE Agarose, Biozym Scientific, Deutschland) in 1 x Tris-Acetat-Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)-Puffer (TAE-Puffer, Tab. 6) aufgetrennt. Vor dem Ausgießen der Agarosegele wurde 1 µl Ethidiumbromid (10 mg/ml, Promega, Deutschland) je 100 ml hinzugefügt. Den PCR-Proben wurde zuvor 10 x DNA-Ladepuffer (Tab. 6) zugegeben. Als Längenstandard wurde 100 bp DNA Ladder Ready to Load (Solis BioDyne, Estland) verwendet. Die Auswertung erfolgte mittels Geldokumentations-Apparatur (VWR, Deutschland).

Tab. 6: Lösungen für die Gelelektrophorese.

Bestandteil	Zusammensetzung	Hersteller
10 x TAE-Puffer	4,8 g Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris-Base, 0,4 M)	Serva, Deutschland
	0,4 g Na ₄ EDTA (0,01 M, pH 8,4)	Roth, Deutschland
	ad 100 ml Wasser (entionisiert)	
1 x TAE-Puffer	10 ml 10 x TAE	
	ad 100 ml Wasser (entionisiert)	
10 x DNA-Ladepuffer	50 ml Glycerol	Thermo Fisher Scientific, Deutschland
	0,2 g EDTA (0,5 M)	Roth, Deutschland
	Bromphenolblau	Merck, Deutschland
	ad 100 ml Wasser (entionisiert)	

3.2.5 Quantitative RT-PCR (qRT-PCR)

Die Reaktionsansätze für die quantitative DNA-Amplifizierung wurden entsprechend Tab. 7 hergestellt und auf 96-Well-Platten (Biozym Scientific, Deutschland) in Triplikaten aufgetragen. Die entsprechenden Primersequenzen sind in Anlage 4 aufgelistet. Für die Messung wurde der Biorad CFX Manager 3.1 (Biorad, Deutschland) verwendet. Das verwendete Programm ist in Tab. 8 dargestellt. Im Anschluss an die PCR wurde zum Nachweis eines spezifischen Schmelzproduktes eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt. Die verwendeten Primer sind in Anlage 4 aufgelistet. Die Auswertung der Triplikate zur Detektion der Expressionslevel erfolgte mit einer Standardkurvenanalyse. Die Standardkurven für den internen Standard Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH), sowie PAX6, SOX2, ASCL1, NRXN1, 2 und 3 waren bereits vorhanden. Für NES und SOX1 erfolgte die Etablierung einer Standardkurve. Dazu wurde eine Verdünnungsreihe der cDNA und folgender qRT-PCR hergestellt. Zur Auswertung der Daten wurde die Software BioRad CFX Manager 3.1 genutzt. Es wurden der Mittelwert und der Standardfehler entsprechend dem StepOnePlus™ Real-Time PCR System Reagent Guide, Anhang A-2 (Thermo Fisher Scientific, Deutschland) bestimmt.

Tab. 7: Reaktionsansatz für qRT-PCR.

Bestandteil	Hersteller	Volumen
cDNA		1,0 ng/μl
Nukleasefreies Wasser	Qiagen, Deutschland	14,0 μl
HOT FIREPol™ EvaGreen™ qPCR Mix Plus	Solis BioDyne, Estland	4,0 μl
S Primer		0,5 μl
AS Primer		0,5 μl

S: *sense*, AS: *antisense*

Tab. 8: Programm für qRT-PCR.

Temperatur	Zeit	
95 °C	5 min	
95 °C	10 s	44x
60 °C	30 s	
60 °C - 95 °C (in 0,5 °C Schritten)	0,05 s	

3.3 Immunhistochemische Methoden

3.3.1 Alkalische-Phosphatase-Färbung

Der Nachweis von Alkalischer Phosphatase wurde mittels Alkaline Phosphatase Staining Kit (System Biosciences, USA) nach Herstellerangaben durchgeführt. Der Nachweis wurde mit dem inversen Mikroskop Eclipse TS1000 (Nikon, Deutschland) dokumentiert.

3.3.2 Immunfluoreszenzfärbungen

Für die Immunfluoreszenzfärbungen erfolgte die Kultivierung der iPS-Zellen, NSC und NPC auf MatrigelTM-beschichteten Glas-Deckgläsern (Durchmesser 12 mm, VWR, Deutschland). Die Kultur der terminal differenzierten Neurone erfolgte auf Poly-L-Ornithin-/Laminin-beschichteten NuncTM ThermanoxTM Deckgläsern (Durchmesser 13 mm, Thermo Fisher Scientific, Deutschland). Zur Fixierung wurden die Zellen für 20 min mit 4 % Paraformaldehyd-Lösung [Paraformaldehyd (Merck, Deutschland) in PBS mit 1 M NaOH (AppliChem, Deutschland) auf pH 7,4 eingestellt] behandelt. Nach dreimaligem Waschen mit PBS wurden die Deckgläser reichlich mit PBS bedeckt. Bis zur Färbung wurden sie in mit Parafilm verschlossenen Kulturschalen bei 4 °C gelagert.

Zum Blocken unspezifischer Epitope wurden die Deckgläser für 30 min mit 100 µl 1 % Pferdeserum (Thermo Fisher Scientific, Deutschland) in PBS und 0,2 % TritonX-100 (AppliChem, Deutschland) bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Entfernung der Lösung durch vorsichtiges Aufsetzen der Deckgläser auf Zellstoff, erfolgte eine erneute Inkubation mit 100 µl 3,5 % Pferdeserum in PBS für 30 min bei Raumtemperatur. Erneut wurden die Deckgläser dreimalig in PBS gewaschen und anschließend mit je 100 µl des 1:100 in PBS verdünnten primären Antikörpers bei 4 °C über Nacht inkubiert. Die verwendeten primären Antikörper sind in Anlage 1 dargestellt. Die Deckgläser wurden dreimalig in PBS gewaschen, mit je 100 µl des 1:400 in PBS verdünnten sekundären Antikörpers überschichtet und 30 min bei 37 °C inkubiert. Die verwendeten sekundären Antikörper sind in Anlage 2 dargestellt. Erneut wurden die Deckgläser dreimalig in PBS gewaschen. Anschließend wurden die Deckgläser für 5 min bei Raumtemperatur mit 2 µg/ml Hoechst-Kernfarbstoff 33342 (Thermo Fisher Scientific, Deutschland) inkubiert. Die Deckgläser wurden nochmals dreimal in PBS und anschließend einmal in destilliertem Wasser gewaschen.

Die Deckgläser wurden mit jeweils 5 µl Einbettmedium Fluoromount (Biozol, Deutschland) mit der Zelloberfläche nach unten auf einem Objektträger eingebettet und abgedunkelt bei 4 °C über Nacht gelagert. Die Deckgläser wurden mit Nagellack versiegelt und dauerhaft abgedunkelt bei 4 °C gelagert.

Die Analyse erfolgte für alle Pluripotenz-, NSC- und NPC-Präparate mit dem Fluoreszenz-Mikroskop BZ-8000 (Keyence, Deutschland). Die Präparate der spontanen Differenzierung

wurden mit dem Fluoreszenz-Mikroskop Evos FL Auto 2 (Thermo Fisher Scientific, Deutschland) analysiert. Die TD-Präparate wurden mit dem Fluoreszenz-Mikroskop Eclipse TE2000 (Nikon, Deutschland) untersucht.

3.4 Elektrophysiologische Untersuchungen

3.4.1 Grundlagen der *Patch-Clamp*-Technik

Die *Patch-Clamp*-Technik ist eine Methode zur Bestimmung elektrischer Eigenschaften von Zellen, bei der durch verschiedene Konfigurationen das Membranpotential, Ströme durch die gesamte Membran oder einzelne Kanäle gemessen werden können. Sie wurde 1976 von Bert Sakmann und Erwin Neher entwickelt (Neher und Sakmann 1976).

Bei der *Patch-Clamp*-Technik wird ein Abschnitt der Zellmembran (Flecken oder *patch*) durch Aufsetzen einer Glaspipette elektrisch isoliert. Die Glaspipette dient als Messelektrode und wird mit einer Elektrolytlösung befüllt. Je dichter der Verschluss zwischen Glaspipette und Membran, desto kleiner wird das Hintergrundrauschen. Die durch Ansaugen des Membranstückes an die Pipette entstehenden Abdichtwiderstände (*seals*) sollten dabei im Bereich mehrerer Gigaohm liegen (*Gigaseal*) (Numberger und Draguhn 1996).

Die Messungen sind über vier verschiedene Konfigurationen möglich. Die *Cell-attached*-Konfiguration wird durch das beschriebene Aufsetzen der Pipette auf die Membran und die Entstehung eines *Gigaseals* erreicht. Durch Zurückziehen der Pipette wird das Membranstück herausgelöst und verbleibt in der Kapillarenöffnung. Dies wird als *Inside-Out*-Konfiguration bezeichnet und ermöglicht die Untersuchung des Milieus auf der Membraninnenseite. Die Membranaußenseite hingegen kann durch die *Outside-Out*-Konfiguration analysiert werden. Diese wird durch das Abziehen der Pipette ausgehend von der *Whole-cell*-Konfiguration erreicht. Die bisher beschriebenen Konfigurationen ermöglichen die Messungen von Einzelkanalaktivitäten. Im Gegensatz dazu können durch die *Whole-cell*-Konfiguration die Ionenströme über die gesamte Membran gemessen werden. Für das Erreichen dieser Konfiguration wird das Membranstück unter der Pipettenöffnung durch einen Sog zerstört. Daraus resultiert eine Vermischung des Zytosols mit der Pipettenlösung. Fügt man der Pipettenlösung in der *Whole-cell*-Konfiguration beispielsweise Amphotericin B bei, werden Poren in der Zellmembran gebildet, durch die monovalente Kationen strömen können. Diese Konfiguration bezeichnet man als perforierten *Patch*. Dabei besteht ein elektrischer Zugang zum Zellinneren, ohne dass die Pipettenlösung in das Zytosol gelangt (Numberger und Draguhn 1996; Hermey 2010).

3.4.2 Durchführung der *Patch-Clamp*-Messungen

Die Patch-Clamp-Versuche wurden mit Unterstützung von Dr. Albrecht Klemenz, Institut für Anatomie und Zellbiologie, Halle (Saale) durchgeführt.

Die Zellen wurden an 64 d und 78 d elektrophysiologisch untersucht. In Vorbereitung auf die Messungen wurden die terminal differenzierten Neurone auf Poly-L-Ornithin- / Laminin-beschichteten Glas-Deckgläsern (Durchmesser 5 mm, Thermo Fisher Scientific, Deutschland) kultiviert. Jeweils ein Deckgläschen wurde untersucht. Die Zellen wurden kontinuierlich mit Perfusionslösung perfundiert (Tab. 9).

Die Auswahl der Zellen erfolgte nach Kriterien wie Zellgröße und isolierter Lage der Zelle. Die verwendeten Pipetten wurden aus Borosilikat-Glaskapillaren mit einem Außendurchmesser von 1,5 mm (GB150F-8P, Science Products, Deutschland) hergestellt. Sie wurden mit dem Flaming/ Brown Micropipette Puller P-97 (Sutter Instrument, USA) gezogen. Nach Befüllen der Pipetten mit der Pipettenlösung (Tab. 9) lag der gemessene Pipettenwiderstand bei 6 - 10 M Ω . Das Aufsetzen der Glaspipette auf die Zellmembran erfolgte unter mikroskopischer Sicht (Abb. 4). Hierfür wurde das inverse Phasenkontrastmikroskop Axiovert 25 (Carl Zeiss, Deutschland) verwendet. Nach Erreichen eines Gigaseals (Sealwiderstand > 1,0 G Ω) wurde zunächst das Zellpotential V_Z erfasst. Wenn dieses mindestens 1,5 min konstant war, wurde der Perfusionslösung zur Zellstimulation entweder Glutamat oder GABA (Tab. 9) zugegeben und die Änderungen des Zellpotentials im zeitlichen Verlauf beobachtet und dokumentiert. Eine Messung wurde dann gezählt, wenn nach Beendigung der Neurotransmitter-Perfusion ein Angleichen des Zellpotentials auf den Ausgangswert und eine anschließende Stabilisierung des Potentials verzeichnet werden konnte. Da sich die jeweiligen Ionenkonzentrationen der Perfusions- und Badlösung unterscheiden, entsteht an der Messelektrode ein elektrisches Potential, das sogenannte *liquid junction potential* V_{LJ} . Die Membranpotentiale der Zellen V_M wurden wie folgt berechnet: $V_M = V_Z - V_{LJ}$. Bei den vorliegenden Messungen betrug das *liquid junction potential* V_{LJ} 11,0 mV.

Die Daten wurden mit dem Messgerät Axopatch-1D amplifier (Molecular Devices, USA) und der Software pCLAMP 6 (MDS Analytical Technologies, USA) erhoben. Die Auswertung der Daten erfolgte im Anschluss mit Origin 9 (OriginLab, USA).



Abb. 4: Patch-Clamp-Messung.

Mikroskopische Aufnahme des Aufsetzens der Pipettenspitze auf die Zelloberfläche.

Tab. 9: Lösungen der Patch-Clamp-Versuche.

Bestandteil	Hersteller	Endkonzentration Perfusionslösung	Endkonzentration Pipettenlösung
Natriumchlorid	AppliChem, Deutschland	145 mM	10 mM
Kaliumchlorid	Roth, Deutschland	5 mM	110 mM
Kalziumchlorid	Merck, Deutschland	2 mM	0,5 mM
Magnesium- chlorid	Merck, Deutschland	1 mM	1 mM
HEPES Pufferan TM	Roth, Deutschland	10 mM	10 mM
D(+)-Glucose- Monohydrat	Merck, Deutschland	5,6 mM	-
EGTA	Roth, Deutschland	-	5 mM
Amphotericin B aus Streptomyces sp.	Merck, Deutschland	-	240 µg/ml (Stock: 60 mg/ml Dimethylsulfoxid)
		pH 7,4	pH 7,2
L-glutamic acid	Merck, Deutschland	-	10 µM
GABA	Merck, Deutschland	-	10 µM / 100 µM

HEPES: N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure

EGTA: Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure

4 Ergebnisse

4.1 Pluripotenz-Analyse der iPS-Zelllinien

4.1.1 Morphologie und Alkalische-Phosphatase-Färbung

Die reprogrammierten, patientenspezifischen iPS-Zelllinien MLUi001-B, -F, -M, -N, -O und MLUi002-E, -G wurden zunächst unter dem Lichtmikroskop betrachtet. Sie wiesen eine für humane pluripotente Stammzellen typische Morphologie mit einem hohen Kern-Zytoplasma-Verhältnis auf. Die Zellkolonien waren rundlich, flach und dicht gepackt. Die Morphologie war vergleichbar mit der Morphologie der pluripotenten Kontrollzelllinie IPS(IMR-90)-4. In Abb. 5 ist die Enzymaktivität alkalischer Phosphatasen anhand der bläulichen Färbung am Beispiel der Zellen von MLUi001-B gezeigt. Die Aktivität alkalischer Phosphatasen wurde in allen iPS-Zelllinien nachgewiesen und war vergleichbar mit Färbungen der pluripotenten Kontrollen IPS(IMR-90)-4 und iPS-DF19-9-7T (Anlage 5).

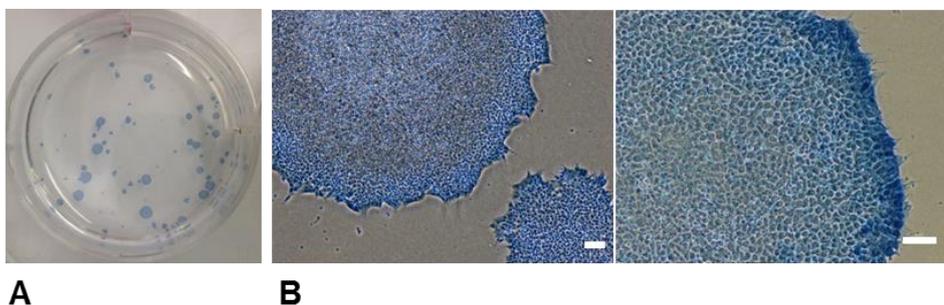


Abb. 5: Morphologie und Alkalische Phosphatase-Färbung der iPS-Zellen.

Alkalische Phosphatase-Färbung von MLUi001-B in Passage 5. **(A)** Makroskopische Aufnahme der Zellkulturschale. **(B)** Lichtmikroskopische Aufnahme mit unterschiedlicher Vergrößerung (links 4-fach, rechts 10-fach). Die rundliche Form der dicht gepackten Kolonien ist gut erkennbar. Maßstäbe entsprechen 100 μm .

4.1.2 Transkriptanalyse der iPS-Zellen mittels RT-PCR

Die RNA aus den iPS-Zelllinien MLUi001-B, -F, -M, -N, -O und MLUi002-E, -G wurde hinsichtlich der Transkription verschiedener Pluripotenz-assoziiierter Gene untersucht. Die für Transkriptionsfaktoren codierenden Gene DPPA2, KLF4, LIN28A, MYC, NANOG, OCT4, REST und SOX2 waren in allen Zelllinien exprimiert. CDH1 war in MLUi001-O negativ, konnte in den restlichen Linien jedoch nachgewiesen werden. Die Positivkontrolle IPS(IMR90)-4 zeigte die Expression aller untersuchten Transkripte (Abb. 6).

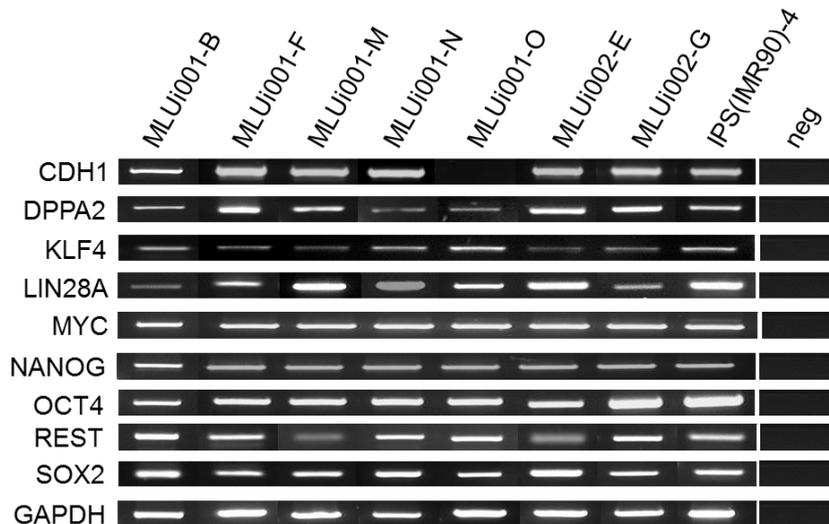


Abb. 6: Transkriptanalyse der iPS-Zelllinien hinsichtlich Pluripotenz-assoziiierter Gene mittels RT-PCR.

Analyse von CDH1, DPPA2, KLF4, LIN28A, MYC, NANOG, OCT4, REST und SOX2 in den NRXN1-CNV-Zelllinien im Vergleich zur iPS-Zelllinie IPS(IMR90)-4 mittels RT-PCR. GAPDH diente als interne Ladekontrolle. Die Negativkontrolle (neg) enthielt entionisiertes Wasser und keine Probe.

4.1.3 Immunfluoreszenz-Analyse der iPS-Zellen

Um den pluripotenten Charakter der Linien MLUi001-B, -F, -M, -N, -O und MLUi002-E, -G weitergehend zu validieren, wurden Immunfluoreszenz-Färbungen unter Nutzung spezifischer Antikörper angefertigt. Zusätzlich zu den Markern aus der vorherigen Transkriptanalyse wurden die Pluripotenz-assoziierten Zelloberflächenantigene SSEA4, TRA-1-60 und TRA-1-81 in allen Linien nachgewiesen (Abb. 7, Anlage 8). Die epithelassoziierte Expression von CDH1 wurde in allen Linien gezeigt. In den von allen NRXN1-CNV-Zelllinien angefertigten Doppelfärbungen konnten neben den Oberflächenantigenen auch die Pluripotenzmarker DPPA2, KLF4, LIN28A, MYC, NANOG, REST, OCT4 und SOX2 in den Zellen nachgewiesen werden. In Abb. 7 wird dies beispielhaft für MLUi002-E gezeigt. Zum Vergleich wurde die iPS-Kontrollzelllinie IPS(IMR90)-4 ebenfalls immunhistochemisch hinsichtlich der genannten Marker analysiert (Anlage 8). Die Färbungen der zu NRXN1-CNV-Zelllinien waren mit der Kontrollzelllinie vergleichbar.

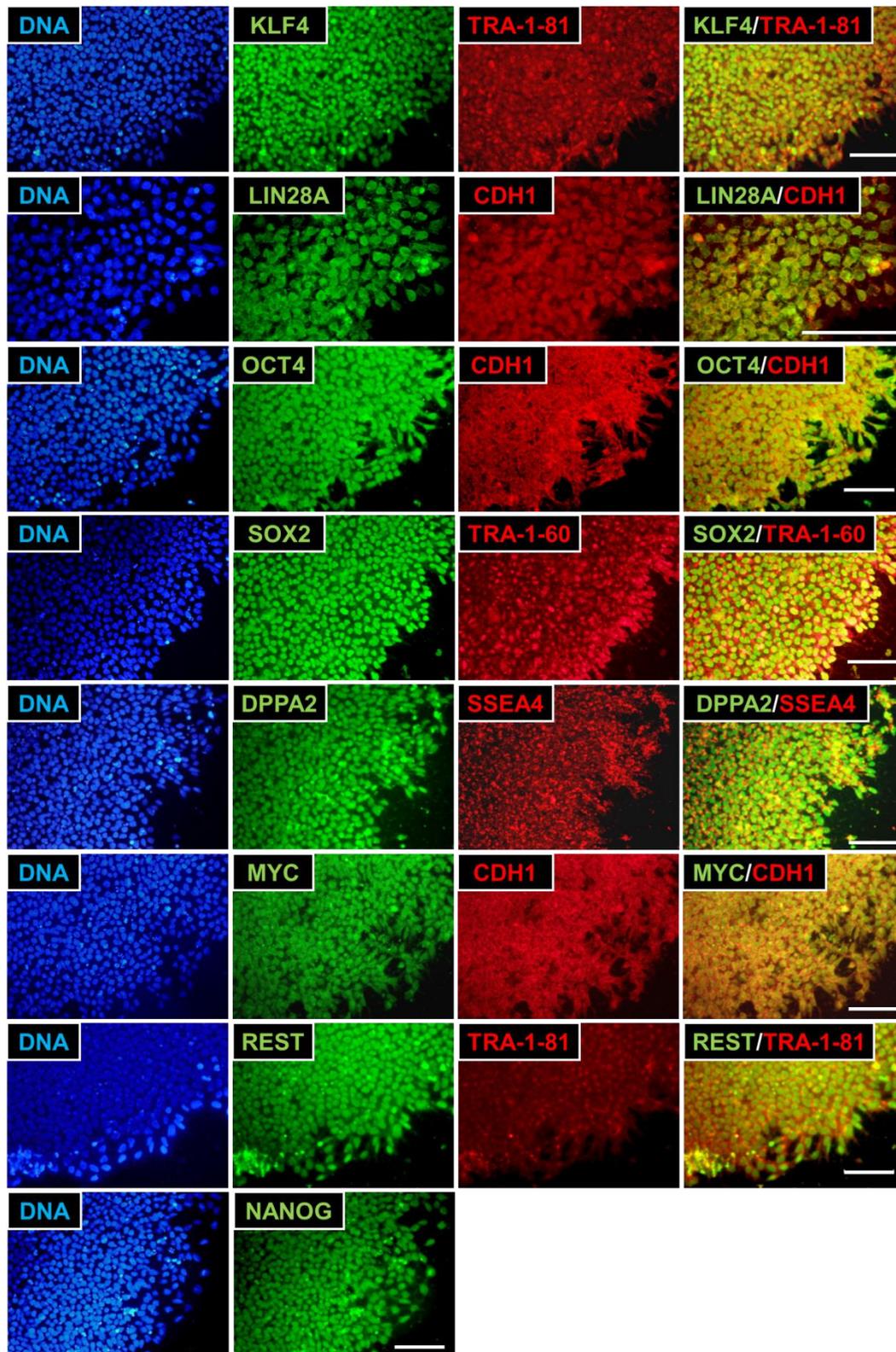


Abb. 7: Immunfluoreszenz-Analyse der iPS-Zelllinien hinsichtlich Pluripotenz-assoziiierter Marker.

Nachweis der Pluripotenzmarker CDH1, DPPA2, KLF4, LIN28A, MYC, NANOG, REST, OCT4, SOX2, sowie der Oberflächenmoleküle SSEA4, TRA-1-60 und TRA-1-81 in den Zelllinien mittels Immunfluoreszenz. Die Doppelfärbungen für MLUi002-E sind jeweils einzeln, sowie im *Overlay* dargestellt. DNA-Färbung durch Hoechst-Kernfarbstoff. Maßstäbe entsprechen 100 μm .

4.1.4 Analyse von B-Zell-assoziierten Transkripten in iPS-Zelllinien

Da für die Herstellung der iPS-Zelllinien B-lymphoblastoide Zellen verwendet wurden, erfolgte eine Analyse B-Zell-assoziiierter Transkripte mittels RT-PCR. Die Linien MLUi001-B, -F, -M, -N, -O und MLUi002-E, -G zeigten keine Transkription von BTLA, FCRLA und GPR183. EBF1, IKZF3 und TCL1A konnten hingegen in allen Linien nachgewiesen werden. Als Positivkontrollen dienten die beiden humanen B-lymphoblastoiden Zelllinien ARH-77 und LCL-HO. Des Weiteren wurde die Kontrollzelllinie IPS(IMR90)-4 auf die genannten Marker hin untersucht. Hier konnten ebenfalls die Marker EBF1, IKZF3 und TCL1A nachgewiesen werden. Zudem zeigte sich ein Nachweis von GPR183 (Abb. 8).

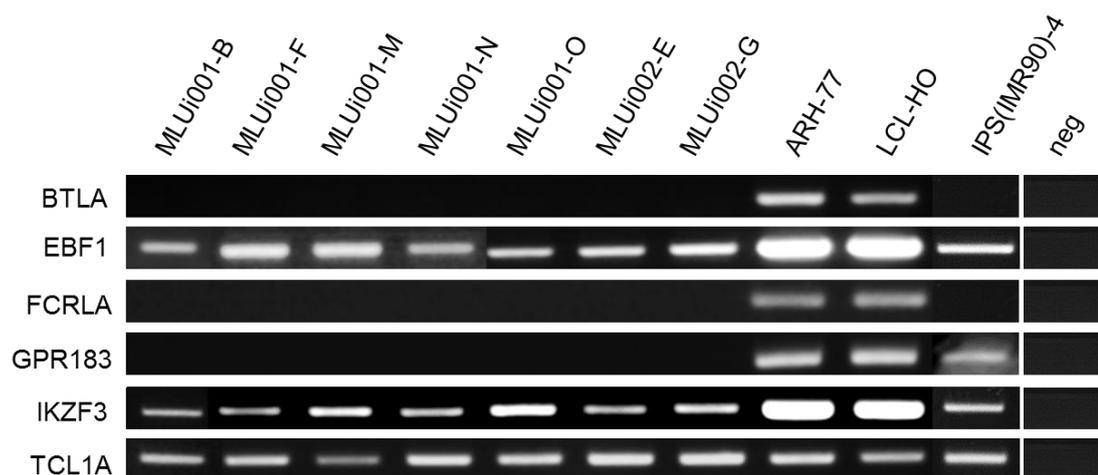


Abb. 8: Analyse von iPS-Zellen hinsichtlich B-Zell-assoziiierter Transkripte mittels RT-PCR.

Analysiert wurden die B-Zell-Marker BTLA, EBF1, FCRLA, GPR183, IKZF3 und TCL1A mittels RT-PCR. Die humanen B-lymphoblastoiden Zelllinien ARH-77 und LCL-HO wurden als Positivkontrollen verwendet. Die Negativkontrolle (neg) enthielt entionisiertes Wasser und keine Probe.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass alle untersuchten iPS-Zelllinien die Morphologie pluripotenter Stammzellen zeigen, für den Nachweis der alkalischen Phosphatase-Aktivität positiv sind, eine mRNA- und Proteinexpression von Pluripotenz-assoziierten Genen zeigen und B-Zell-assoziierte Transkripte teilweise nicht exprimieren.

4.2 Spontane Differenzierung der patientenspezifischen iPS-Zellen

Die patientenspezifischen NRXN1-CNV-Zelllinien MLUi001-B, -F, -M, -N, -O, und MLUi002-E, -G, sowie die beiden Kontrolllinien IPS(IMR90)-4 und iPS-DF19-9-7T wurden vom iPS-Zellstadium ausgehend spontan differenziert. Bei der spontanen Differenzierung erfolgte eine Probennahme aller Linien jeweils an 3 d, 5 d, 7 d und 10 d nach Differenzierungsstart.

4.2.1 Morphologie während der spontanen Differenzierung

Während der Differenzierung lösten sich die Zellen aus den rundlichen Zellverbänden. Es kam zu deutlichen Veränderungen der Zellmorphologie, was am Beispiel der Linie MLUi002-E in Abb. 9 gezeigt ist. Die zunehmend heterogenen Zellen veränderten sich in Form, Größe und Granularität. Sie zeigten ein geringeres Kern-Zytoplasma-Verhältnis. Die Morphologie war in allen Linien vergleichbar (Anlage 6).

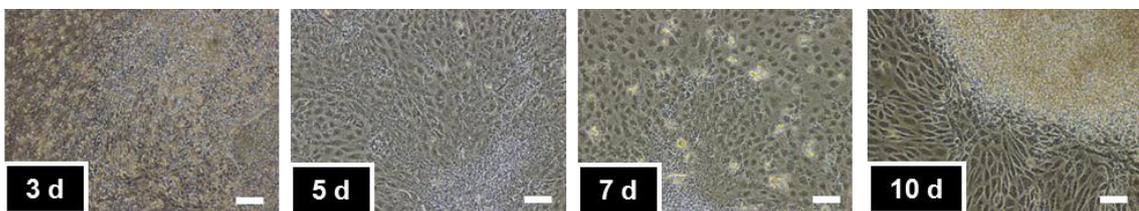


Abb. 9: Morphologische Analyse der iPS-Zelllinien während der spontanen Differenzierung.

Lichtmikroskopische Aufnahmen der Zellen von MLUi002-E an 3 d, 5 d, 7 d und 10 d während der spontanen Differenzierung. Maßstäbe entsprechen 100 µm.

4.2.2 Transkriptanalyse während der spontanen Differenzierung mittels RT-PCR

Da pluripotente Stammzellen die Fähigkeit besitzen Derivate aller drei Keimblätter auszubilden, wurde die Induktion repräsentativer ektodermaler (CXCR4, FOXA2, SOX2), mesodermaler (MEOX1, PRRX1, T) und entodermaler (MSI1, PAX6, SHH) Transkripte untersucht. Die Transkriptanalyse mittels RT-PCR dieser Gene erfolgte an 3 d, 5 d, 7 d und 10 d für alle Zelllinien. Alle Transkripte wurden mindestens an einem Zeitpunkt in allen Zelllinien nachgewiesen (Abb. 10).

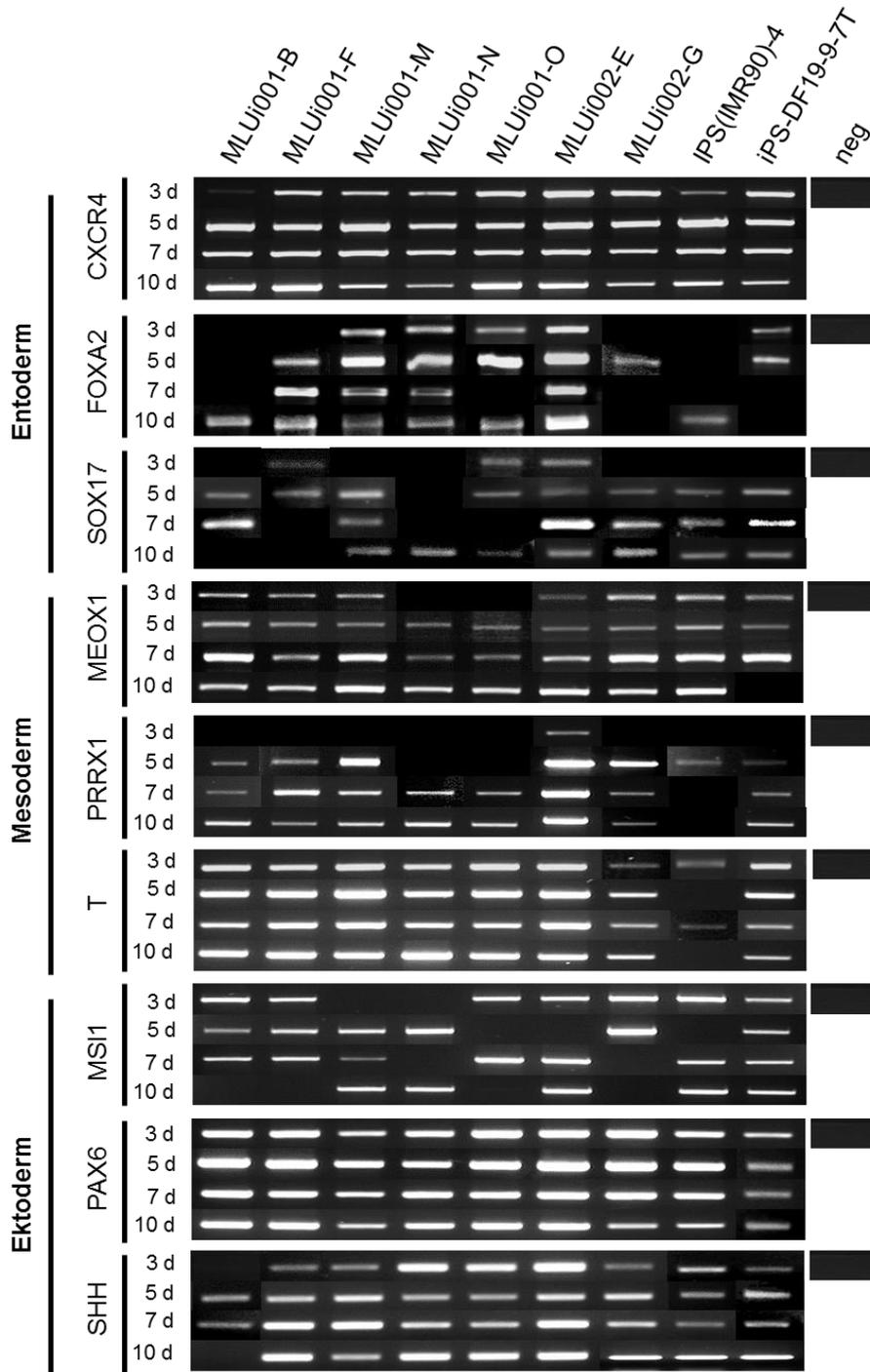


Abb. 10: Transkriptanalyse der iPS-Zelllinien während der spontanen Differenzierung. Gezeigt ist der Nachweis von Transkripten repräsentativ für entodermal (CXCR4, FOXA2, SOX2), mesodermal (MEOX1, PRRX1, T) und ektodermal entwickelte Zellen (MSI1, PAX6, SHH). Die Negativkontrolle (neg) enthielt entionisiertes Wasser und keine Probe.

4.2.3 Immunfluoreszenz-Analyse während der spontanen Differenzierung

Die Analyse erfolgte an 3 d, 5 d, 7 d und 10 d während der Differenzierung. Für die Analyse entodermaler Derivate wurden Antikörper gegen CXCR4, FOXA2 und SOX17 verwendet und in Doppelfärbungen (FOXA2 / SOX17, SOX17 / CXCR4) dargestellt. Für die Analyse der mesodermaler Derivate wurden die Antikörper gegen PRRX1, MEOX1 und T verwendet und in einer Dreifachfärbung analysiert. In den patientenspezifischen NRXN1-CNV-Zelllinien wurden alle untersuchten Proteine zu mindestens einem Zeitpunkt nachgewiesen. Die Daten von MLUi001-O sind repräsentativ an 3, 5 und 7 d gezeigt (Abb. 11 A und B). Die untersuchten Proteine waren kernständig bzw. zytoplasmatisch lokalisiert. Die Färbungen waren mit allen weiteren NRXN1-CNV-Zelllinien und mit den differenzierten Zellen aus den Kontrollzelllinien vergleichbar (Anlage 9).

Antikörper gegen MSI1, PAX6 und SHH wurden für die Analyse ektodermaler Strukturen verwendet und ebenfalls in einer dreifachen Färbung dargestellt. In der Analyse des ektodermalen Keimblattes zeigten sich vereinzelt neurale Rosetten positiv für die Expression von PAX6, SHH und MSI1, während die Zellen in der Peripherie der Rosetten negativ waren (Abb. 11 C). Neuronale Rosetten fanden sich an 5 d bei MLUi001-B und -O, bei MLUi002-E an 5 d und 7 d und bei MLUi001-B und -N an 10 d. Des Weiteren fanden sich Zellansammlungen, welche nicht die Morphologie neuronaler Rosetten hatten, aber dennoch positiv für PAX6, SHH und MSI1 waren. Diese Strukturen konnten in MLUi001-M an 3 d, in MLUi002-G an 5 d und in IPS(IMR90)-4 an 7 d und 10 d beobachtet werden (Anlage 9). In MLUi001-F und in iPS-DF19-9-7T konnten keine Zellen, die positiv für PAX6, SHH und MSI1 waren, an den untersuchten Zeitpunkten dargestellt werden.

4.3 Differenzierung der iPS-Zellen zu neuronalen Stammzellen

Die NRXN1-CNV-Zelllinien MLUi001-B, -F, -M, -N, -O, und MLUi002-E, -G, sowie die beiden Kontrolllinien IPS(IMR90)-4 und iPS-DF19-9-7T wurden vom iPS-Zellstadium ausgehend zu neuronalen Stammzellen differenziert. Bei der gerichteten neuronalen Differenzierung erfolgte eine Probennahme aller Linien jeweils an 7 d nach Differenzierungsstart.

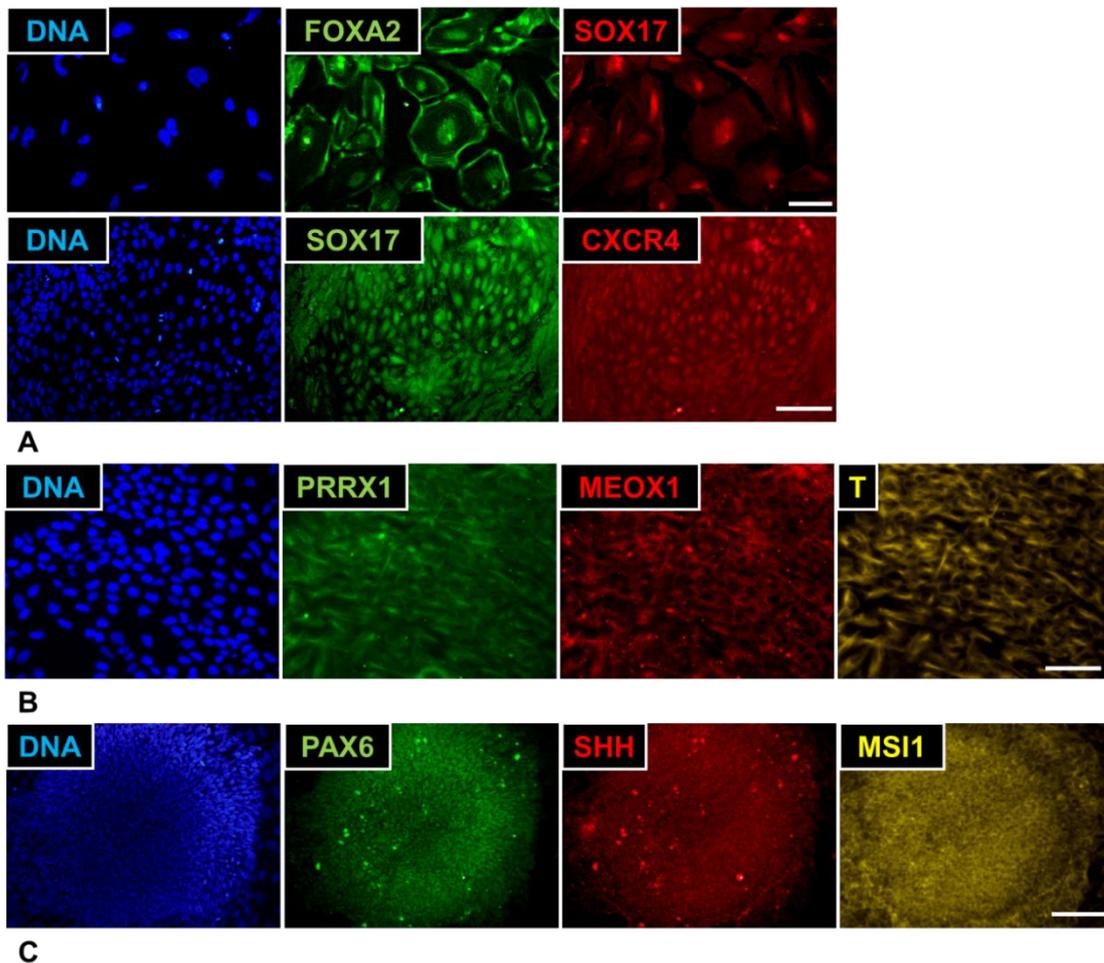


Abb. 11: Immunfluoreszenz-Analyse während der spontanen Differenzierung.

Nachweis der Genexpression repräsentativer Marker aller drei Keimblätter. Dargestellt sind Färbungen von MLUi001-O zu verschiedenen Zeitpunkten. (A) Analyse der entodermalen Marker FOXA2, SOX17 und CXCR4 an 7 d. (B) Nachweis mesenchymaler Strukturen mittels PRRX1, MEOX und T in Dreifachfärbung an 3 d. (C) Analyse des ektodermalen Blattes durch PAX6, SHH und MSI1 in Dreifachfärbung an 5 d. Zu sehen ist die rundliche Struktur einer neuralen Rosette. DNA-Färbung durch Hoechst-Kernfarbstoff. Maßstäbe entsprechen 100 µm.

4.3.1 Morphologie während der Entwicklung zu NSC

Nach Differenzierungsstart waren lichtmikroskopisch deutliche morphologische Veränderungen in allen zu untersuchenden iPS-Zelllinien zu beobachten, welche an 3 d, 5 d und 7 d dokumentiert wurden (Anlage 7). Abb. 12 zeigt beispielhaft die Entwicklung von MLUi001-F. Vereinzelt zeigte sich in den NRXN1-CNV-Linien und in den Kontrollzelllinien die Entstehung neuraler Rosetten an 5 d und 7 d. Zellansammlungen neuraler Rosetten zeigten eine radiale Anordnung mit rundlicher Zellformation und zentral angedeutetem Lumen (Abb. 12, 5 d). Im Randbereich waren spindelförmige und pyramidale Perikaryen, sowie Zellfortsätze zu erkennen (Abb. 12, Vergrößerung 7 d).

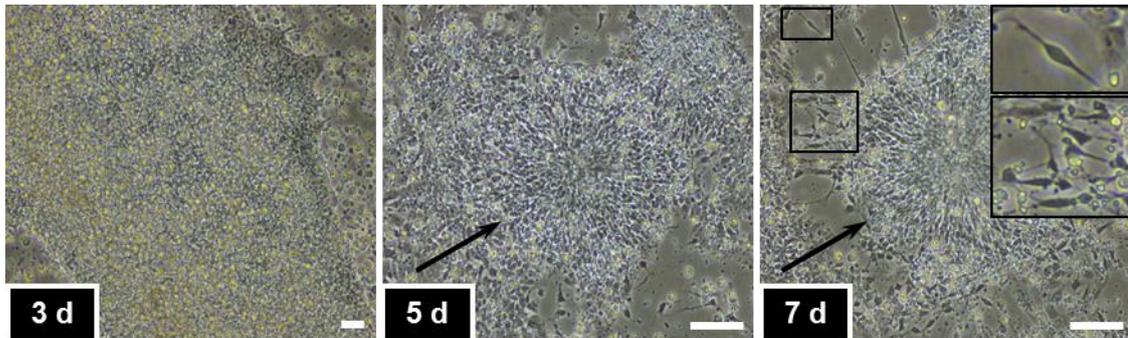


Abb. 12: Morphologische Analyse der iPS-Zelllinien während der Entwicklung zu NSC. Lichtmikroskopische Aufnahmen der Zellen von MLUi001-F an 3 d, 5 d und 7 d während der Differenzierung zu NSC. Erkennbar sind die Entstehung neuraler Rosetten (Pfeile) und deutlich neuraler Morphologien (vergrößerte Bereiche an 7 d). Vergrößerungen 4-fach (3 d) und 10-fach (5 d, 7 d). Maßstäbe entsprechen 100 μm .

4.3.2 Transkriptanalyse von NSC mittels qRT-PCR

Alle Zelllinien wurden an 7 d nach Beginn der neuralen Differenzierung auf die Transkription der NSC-assoziierten Marker SOX2, PAX6, ASCL1, NES und SOX1 relativ quantitativ mittels qRT-PCR untersucht (Abb. 13). Die ermittelten Werte wurden mit einer Standardkurve verrechnet und im Vergleich zu den undifferenzierten Zellen an 0 d aufgetragen.

Die mRNA von SOX2 wurde in MLUi001-B, MLUi002-E und MLUi002-G an 7 d im Vergleich zu 0 d verstärkt exprimiert, während für alle weiteren NRXN1-CNV-Zelllinien und die Linie iPS-DF19-9-7T die Expression von SOX2 vergleichbar zu 0 d oder geringer gemessen wurde. MLUi001-O zeigte für PAX6 eine gleichbleibende Expression. In allen anderen Zelllinien konnte eine starke Induktion des Markers im NSC-Stadium nachgewiesen werden. Der NSC-spezifische Marker ASCL1 war in MLUi001-B, -F, -M, -N und MLUi002-G stark induziert. In MLUi002-E war eine gleichbleibende, in den restlichen Linien eine verringerte Expression erkennbar. Beim Marker NES zeigte sich für MLUi001-F, -M und MLUi002-G eine starke Geninduktion. Für die weiteren Linien blieb die Induktion gleich oder verringerte sich. Für SOX1 zeigte sich eine ähnliche Verteilung. Hier wurde für MLUi001-B, -F, -M, -N und MLUi002-G eine starke Genexpression nachgewiesen. In den restlichen Linien war SOX1 verringert exprimiert.

Zusammenfassend wird festgestellt, dass zwei der NRXN1-CNV-Linien die untersuchten NSC-assoziierten Transkripte an 7 d im Vergleich zu 0 d verstärkt oder gleichbleibend exprimierten. Auf Grundlage dieser Daten wurden MLUi001-M und MLUi002-G für die weitere Differenzierung zu kortikalen Neuronen gewählt.

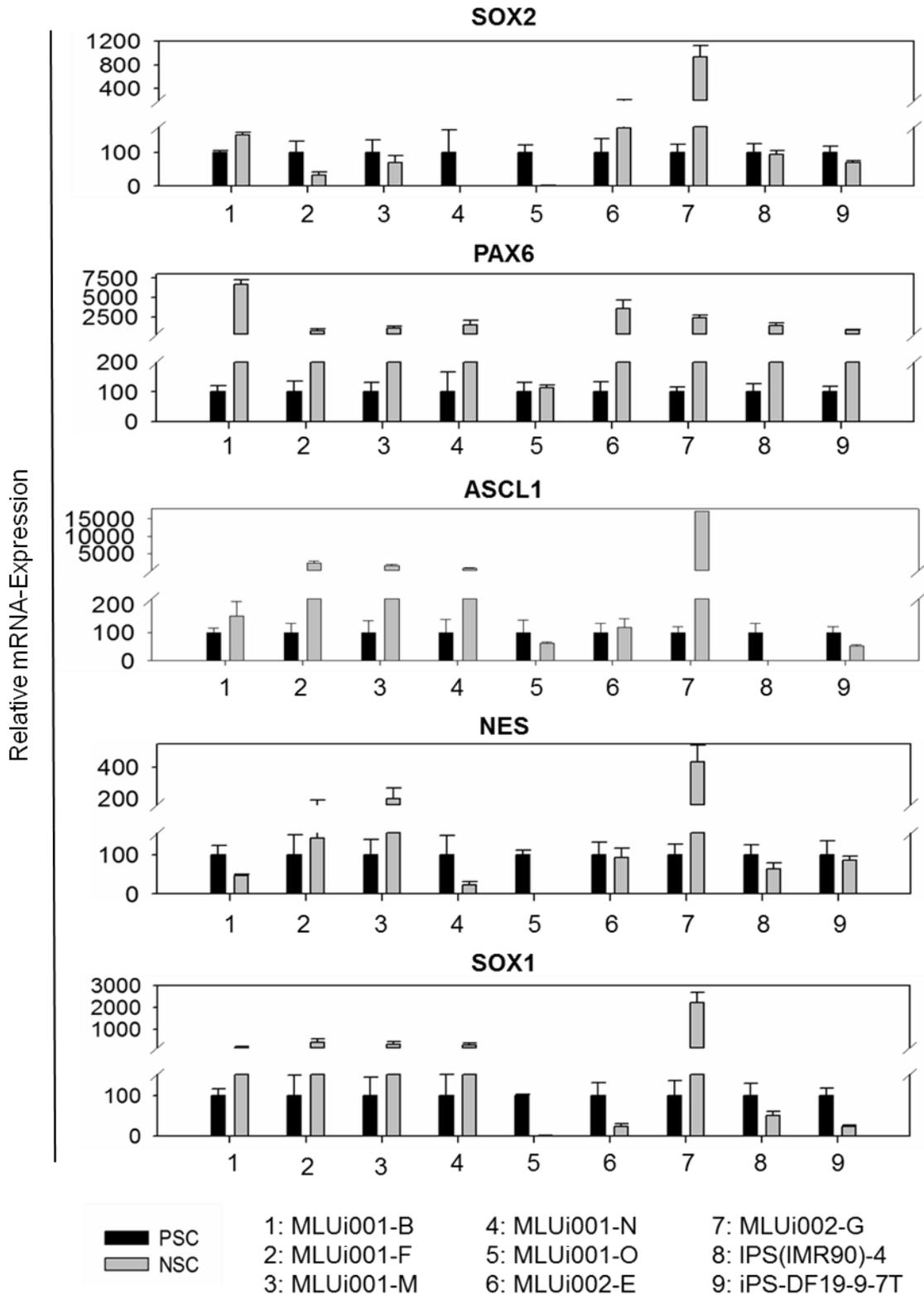


Abb. 13: Relative quantitative Analyse NSC-assoziierter Transkripte.

Transkriptanalyse aller Zelllinien an 7 d während der neuralen Differenzierung hinsichtlich der NSC-assozierten Transkripte SOX2, PAX6, ASCL1, NES und SOX1 mittels qRT-PCR. Vergleich zwischen Pluripotenzstadium (PSC) und Stadium der neuralen Stammzellen (NSC). Die Balken stellen den Mittelwert der gemessenen Triplikate mit Standardabweichung dar. Als interner Standard diente GAPDH.

4.3.3 Immunfluoreszenz-Analyse von NSC

Die NSC der NRXN1-CNV-Linien wurden auf das Vorhandensein der Oberflächenmodifikationen A2B5 und SSEA1, der zytoplasmatischen Proteine MS11, NES und VIM und der Transkriptionsfaktoren NEUROG3, PAX6 und SOX2 hin untersucht. Alle Antigene wurden in NSC der NRXN1-CNV-Zelllinien nachgewiesen. Die erhobenen Daten waren mit den Analysen der Kontrollzelllinien vergleichbar (Anlage 10). Es sind beispielhaft Daten für MLUi001-F gezeigt (Abb. 14). In allen Linien konnten dichte Zellansammlungen nachgewiesen werden, welche die genannten NSC-spezifischen Marker exprimierten. An zahlreichen Stellen konnte die Bildung neuraler Rosetten beobachtet werden. In diesen Bereichen zeigte sich durchgehend eine sehr starke Expression der NSC-Marker.

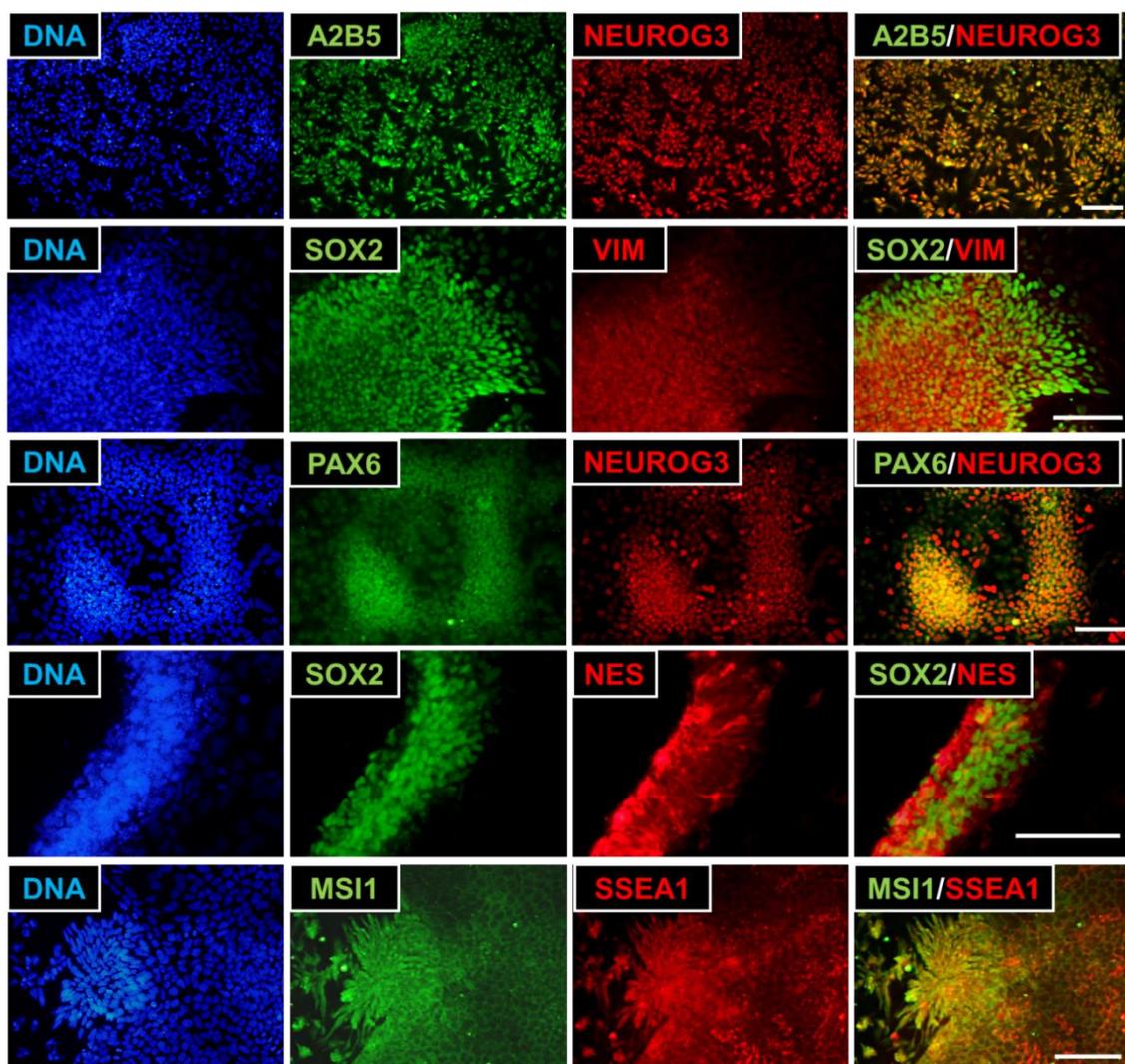


Abb. 14: Immunfluoreszenz-Analyse NSC-assoziierter Marker.

Analyse der NSC-Marker A2B5, MS11, NES, SSEA1 und VIM, sowie der Transkriptionsfaktoren NEUROG3, PAX6 und SOX2 mittels Immunfluoreszenz. Dargestellt sind beispielhaft Kernfärbungen, Einzelfärbungen der Marker und *Overlays* für MLUi001-F. DNA-Färbung durch Hoechst-Kernfarbstoff. Maßstäbe entsprechen 100 µm.

4.4 Differenzierung der NSC zu kortikalen Neuronen

MLUi001-M, MLUi002-G, IPS(IMR90)-4 und iPS-DF19-9-7T wurden zu kortikalen Neuronen differenziert. Das NSC-Stadium wurde als 0 d festgelegt. An 7 d erreichten die Zellen das NPC-Stadium. Anschließend wurde die Differenzierung bis 78 d fortgesetzt.

4.4.1 Morphologie während der NSC-Differenzierung zu NPC

Während der Differenzierung der NSC zu NPC ließen sich keine morphologischen Veränderungen feststellen.

4.4.2 Immunfluoreszenz-Analyse von NPC

Die neuralen Progenitorzellen wurden auf die Genexpression von MSI1, NEUROG3, PAX6, PTN, STX und TUBB3 untersucht. Des Weiteren wurden der Astrozyten-Marker GFAP und das präsynaptische Protein NRXN1 gefärbt. Es sind beispielhaft Daten für MLUi002-G dargestellt (Abb. 15). Die Färbung von MSI1 und TUBB3 ließ deutlich die Bildung neuraler Rosetten erkennen. In allen Linien konnten Zellansammlungen verzeichnet werden, welche positiv für die genannten Marker waren. Das Protein NRXN1 zeigte sich kernständig lokalisiert. Die erhobenen Daten waren mit den Analysen der Kontrollzelllinien vergleichbar (Anlage 11).

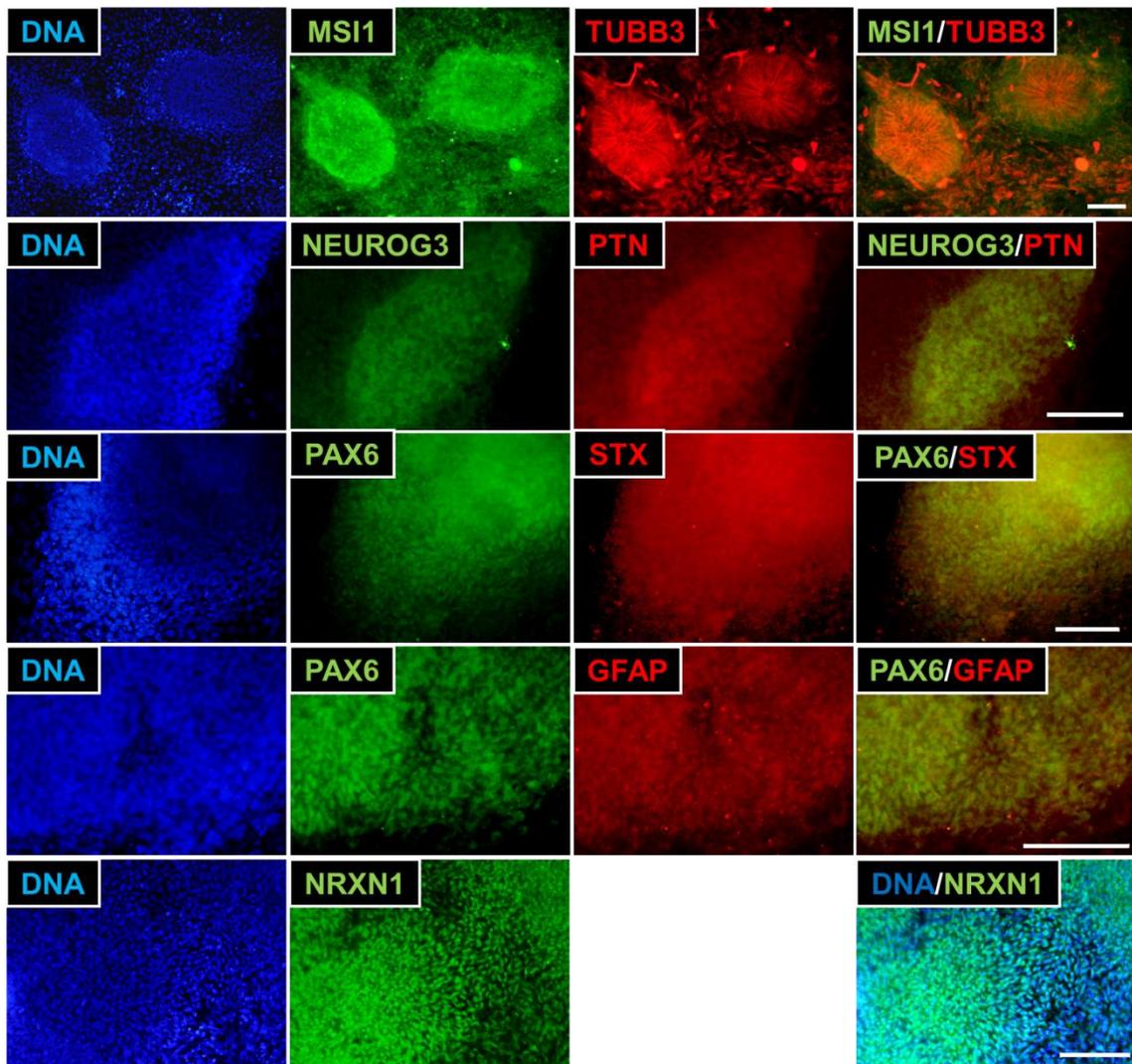


Abb. 15: Immunfluoreszenz-Analyse NPC-assoziierter Marker.

Analyse der NPC-Marker MSI1, NEUROG3, PTN, PAX6 und TUBB3, der synaptischen Marker STX und NRXN1, sowie des Astrozyten-Markers GFAP mittels Immunfluoreszenz. Dargestellt sind beispielhaft Kernfärbungen, Einzelfärbungen der Marker und *Overlays* für MLU_i002-G. DNA-Färbung durch Hoechst-Kernfarbstoff. Maßstäbe entsprechen 100 µm.

4.4.3 Morphologie während der NPC-Differenzierung zu kortikalen Neuronen

Während der Differenzierung zu kortikalen Neuronen kam es lichtmikroskopisch zu deutlichen morphologischen Veränderungen, welche an 63 d und 78 d dokumentiert wurden. Im Vergleich zum NSC-Stadium zeigten sich keine neuronalen Rosetten. Besonders in den beiden Patientenzelllinien sowie in der Kontrollzelllinie IPS(IMR90)-4 konnten starke Ausdünnungen des Zellmaterials beobachtet werden. In den lichtereren Bereichen schritt die Differenzierung stark voran. Die Zellen zeigten zahlreiche neuronale Verzweigungen unterschiedlicher Stärke und Länge, welche teilweise dichte Geflechte bildeten. Die Zellfortsätze wurden zum Teil einige 100 µm lang. Die Kontrollzelllinie iPS-DF19-9-7T blieb im beobachteten Zeitraum wesentlich dichter gepackt. Die Differenzierung der Zellen schien hier langsamer

voranzuschreiten. In allen Linien konnten typisch neuronale Zellmorphologien ausgemacht werden. Die Perikaryen waren überwiegend rundlich oder spindelförmig, vereinzelt waren auch pyramidale Formen erkennbar. Es konnten uni-, bi- und multipolare Zellen ausgemacht werden. An 78 d wurden weitere lichtmikroskopische Aufnahmen zur Dokumentation der Morphologie angefertigt. Hierbei fielen an zahlreichen Stellen Verdickungen im Bereich der Dendriten auf. Diese Verdickungen lagen in unterschiedlichen Größen vor und gaben den dendritischen Verzweigungen ein stacheliges Aussehen (Abb. 16 und 17).

4.4.4 Transkriptanalyse der Zellen des PSC-, NSC-, NPC- und TD-Stadiums mittels RT-PCR

An 63 d erfolgte eine Transkriptanalyse von RNA-Proben aus dem NSC-, NPC- und TD-Stadium der Zelllinien. Diese Proben wurden mit dem Pluripotenzstadium der Zellen verglichen. Für die Analyse der neuronalen Differenzierung wurde die Genexpression des RNA-bindenden Protein MSII und des neuronalen Markers TUBB3 untersucht. Diese Marker wurden in allen Zelllinien in den vier Differenzierungsstadien nachgewiesen (Abb. 18 A)

Zur Beurteilung der Transkription synaptischer Proteine wurden die Marker NLGN1, STX2, SYT1 und VAMP2 analysiert. NLGN1 und STX2 konnten vereinzelt nachgewiesen werden. Die Analyse von SYT1 und VAMP2 war in allen Stadien positiv (Abb. 18 B).

Des Weiteren wurden der GABA-Rezeptor GABBR1 und der glutamaterge Rezeptor GRIA2 untersucht. Für GABBR1 zeigte sich in allen Stadien vereinzelt eine Expression. GRIA2 konnte im letzten Differenzierungsstadium in allen Zelllinien nachgewiesen werden. Außerdem wurde die Gentranskription für MLUi001-M im PSC- Stadium nachgewiesen (Abb. 18 C).

Zudem wurden die Zellen auf die Expression von Gliazellmarkern hin untersucht. Der Astrozyten-Marker GFAP konnte vereinzelt in den ersten drei Stadien nachgewiesen werden. Im terminalen Differenzierungsstadium zeigte sich die Gentranskription in allen Zelllinien. Der Transkriptnachweis für den Oligodendrozyten-Marker OLIG2 lag in allen Zelllinien zu allen genannten Zeitpunkten vor (Abb. 18 D).

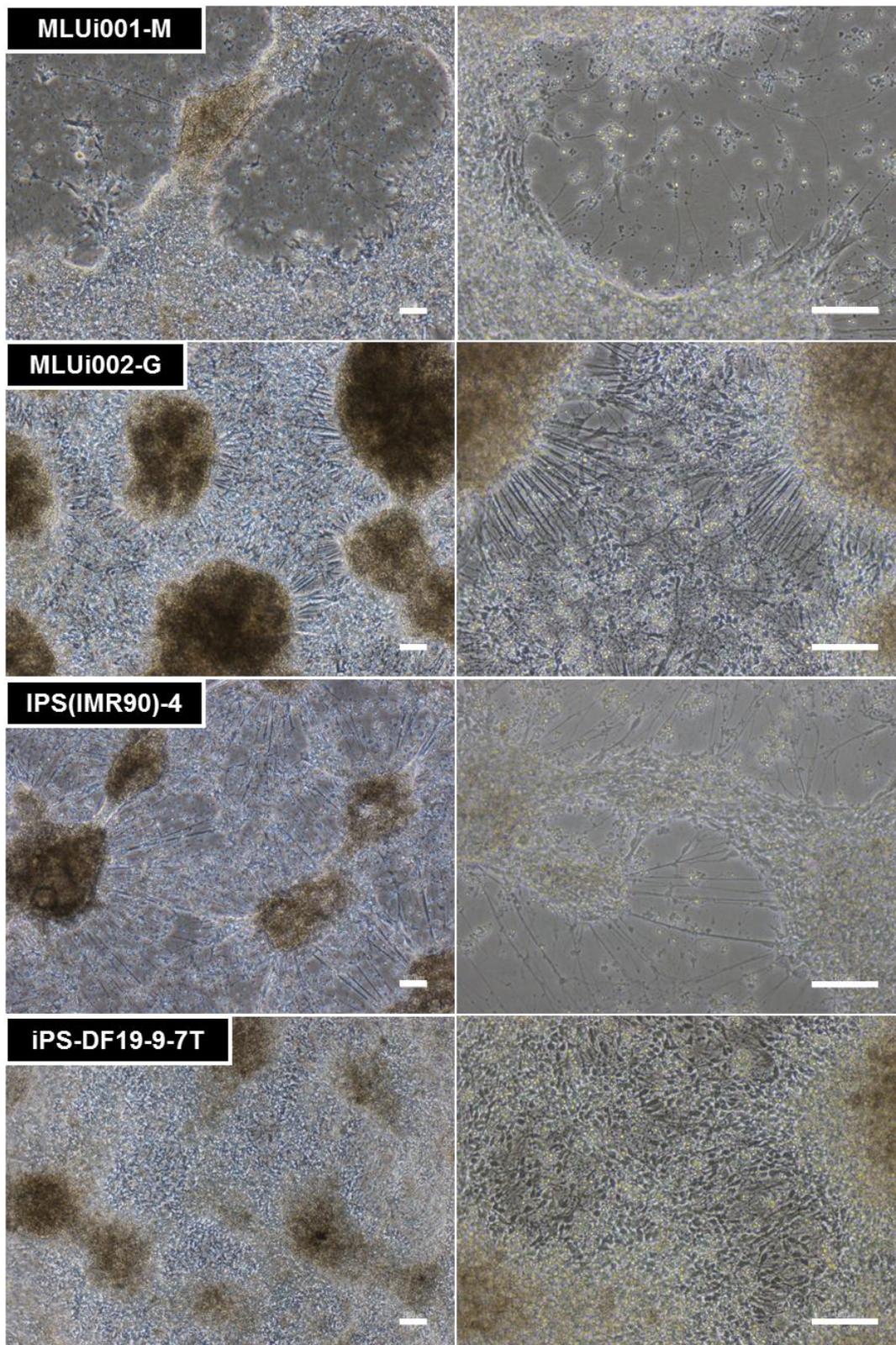


Abb. 16: Morphologische Analyse der kortikalen Neurone I.

Lichtmikroskopische Aufnahmen der NRXN1-CNV-Zelllinien und Kontrolllinien an 63 d. Erkennbar sind eine Ausdünnung des Zellmaterials und die Ausbildung zahlreicher neuronaler Verzweigungen. Vergrößerung 4-fach (links) und 10-fach (rechts). Maßstäbe entsprechen 100 μm .

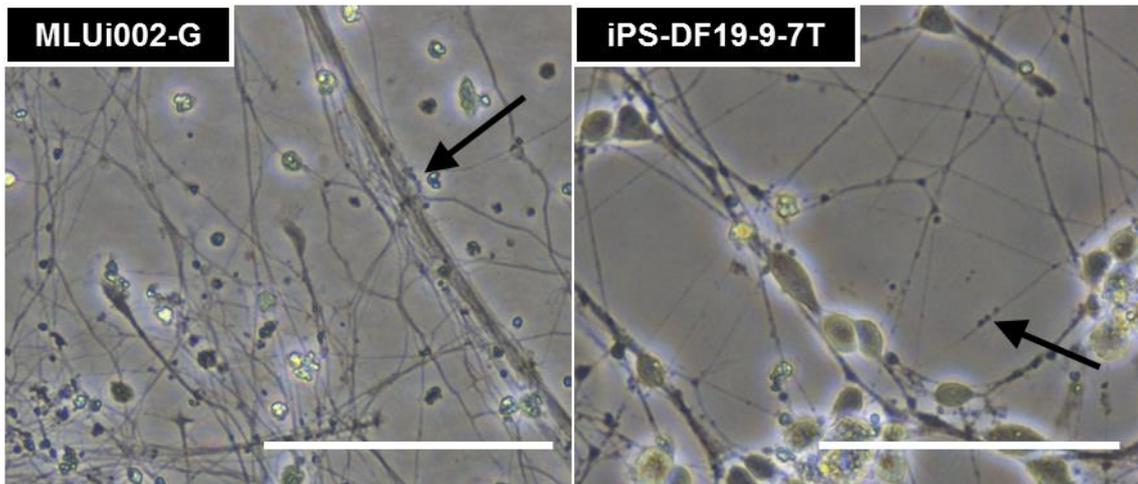


Abb. 17: Morphologische Analyse der kortikalen Neurone II.

Lichtmikroskopische Aufnahmen von MLUi002-G und iPS-DF19-9-7T an 78 d. Erkennbar sind rundliche Verdickungen im Bereich der Dendriten und Axone (Pfeile). Vergrößerung 20-fach. Maßstäbe entsprechen 100 µm.

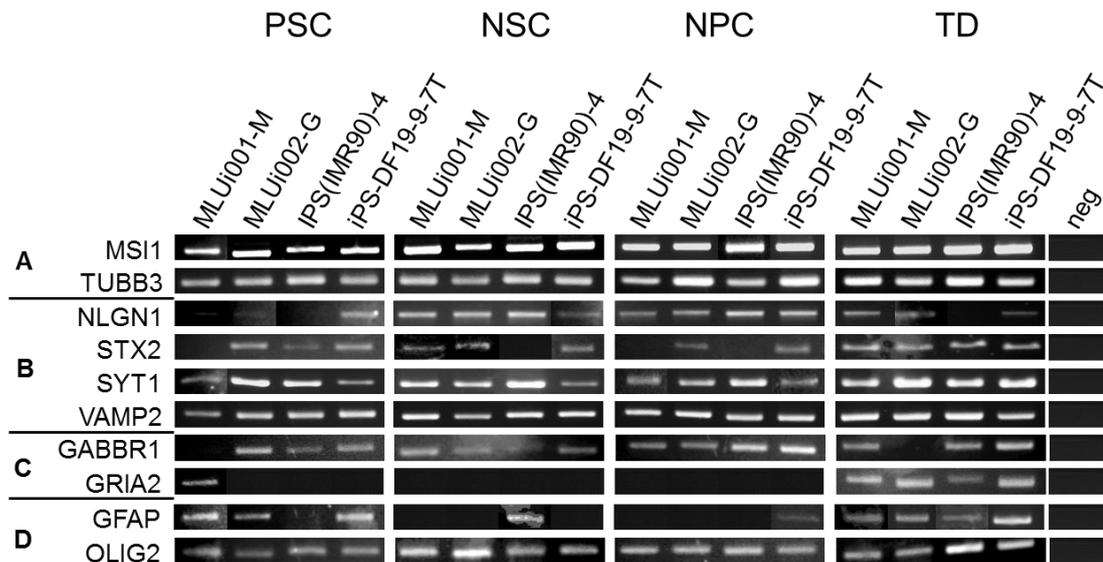


Abb. 18: Transkriptanalyse neuronaler, synaptischer und glialer Marker während der Differenzierung.

(A) Gezeigt ist der Nachweis von Transkripten der neuronalen Differenzierung (MSI1, TUBB3), (B) von synaptischen Transkripten (NLGN1, STX2, SYT1 und VAMP2), (C) von Transkripten neuronaler Rezeptoren (GABBR1 und GRIA2) und (D) von glialen Transkripten (GFAP und OLIG2) zu verschiedenen Zeitpunkten der Differenzierung. Die Negativkontrolle (neg) enthielt entionisiertes Wasser und keine Probe.

4.4.5 Transkriptanalyse der Zellen des PSC-, NSC-, NPC- und TD-Stadiums mittels qRT-PCR

Die Gentranskription der präsynaptischen Proteine NRXN 1, 2 und 3 wurde im PSC-, NSC-, NPC- und TD- Stadium für alle Zelllinien quantitativ analysiert (Abb. 19).

Für NRXN1 zeigte sich im NSC-Stadium ein Anstieg der Genexpression. Diese war im NPC-Stadium geringer ausgeprägt und stieg im TD-Stadium wieder deutlich an. Der größte Anstieg war bei MLUi002-G zu beobachten. Für MLUi001-M war die Expression von NRXN1 im NSC- und TD-Stadium gleich.

Die Transkriptmenge von NRXN2 war in den ersten drei Stadien nur gering ausgeprägt. Im TD-Stadium nahm sie in allen Linien stark zu. MLUi002-G zeigte die stärkste Genexpression.

Die Analyse der Geninduktion von NRXN3 ergab ein diverses Bild. MLUi001-M zeigte einen kontinuierlichen Anstieg in den vier Stadien. In den anderen Linien war im TD- Stadium ein sprunghafter Anstieg der Genexpression zu verzeichnen. Die größte Transkriptmenge wurde hier ebenso bei MLUi002-G gemessen.

4.4.6 Immunfluoreszenzanalyse der kortikalen Neurone

Die Neurone wurden auf das Vorhandensein des mikrotubulären Proteins TUBB3 und des kortikalen Transkriptionsfaktors CTIP2 hin untersucht. Die genannten Marker konnten in MLUi001-M, MLUi002-G und den beiden Kontrolllinien nachgewiesen werden (Abb. 20). Die Färbung mit TUBB3 ließ die Bildung neuronaler Verzweigungen deutlich erkennen. Die Expression von CTIP2 war kernständig lokalisiert.

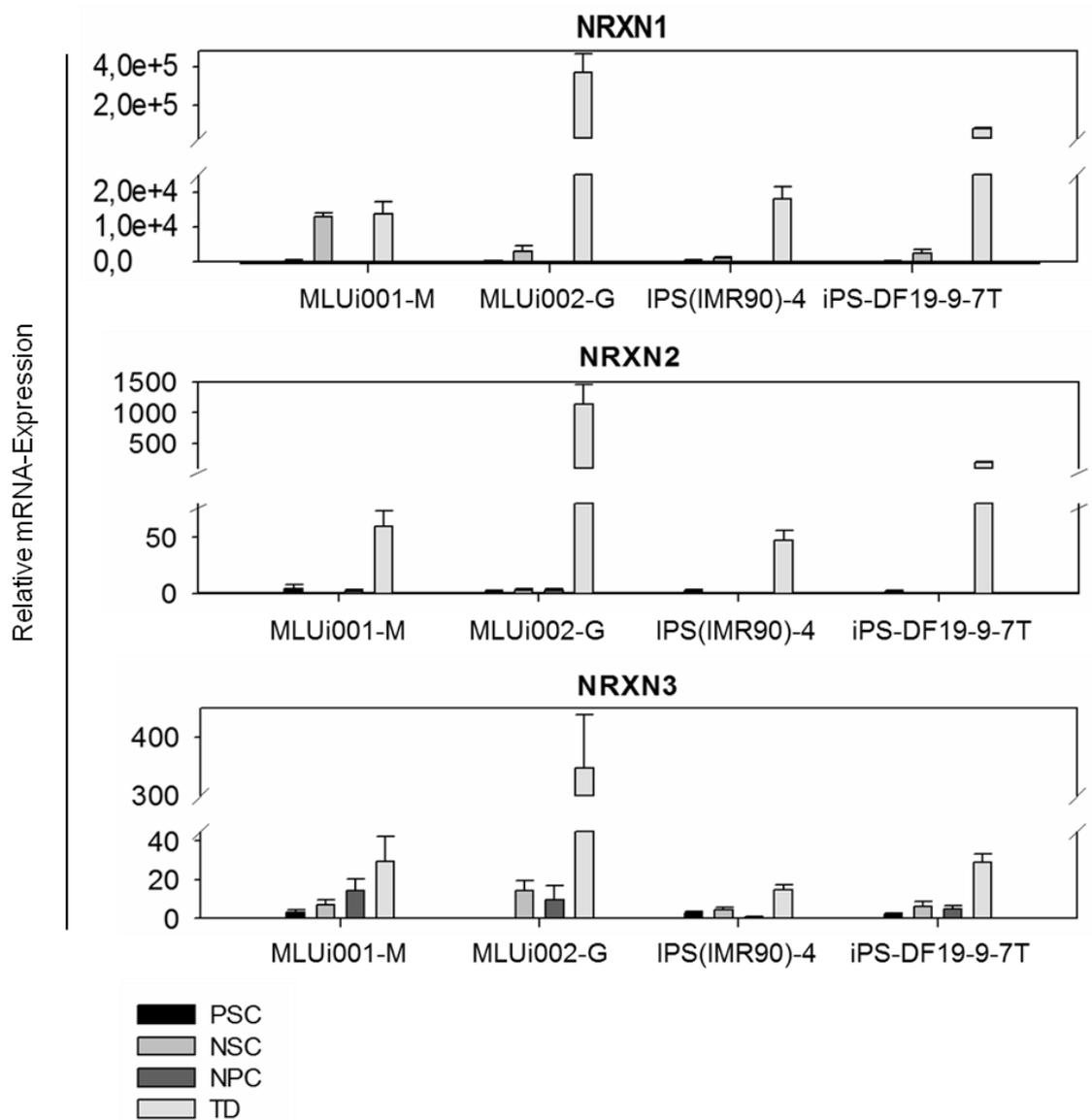


Abb. 19: Relative quantitative Transkriptanalyse der Proteine NRXN1, 2 und 3.

Transkriptanalyse der vier Zelllinien hinsichtlich der Expression der präsynaptischen Proteine NRXN1, 2 und 3 während der terminalen Differenzierung mittels qRT-PCR. Gezeigt sind Messungen im PSC-, NSC-, NPC- und TD-Stadium. Die Balken stellen den Mittelwert der gemessenen Triplikate mit Standardabweichung dar. Als interner Standard diente GAPDH.

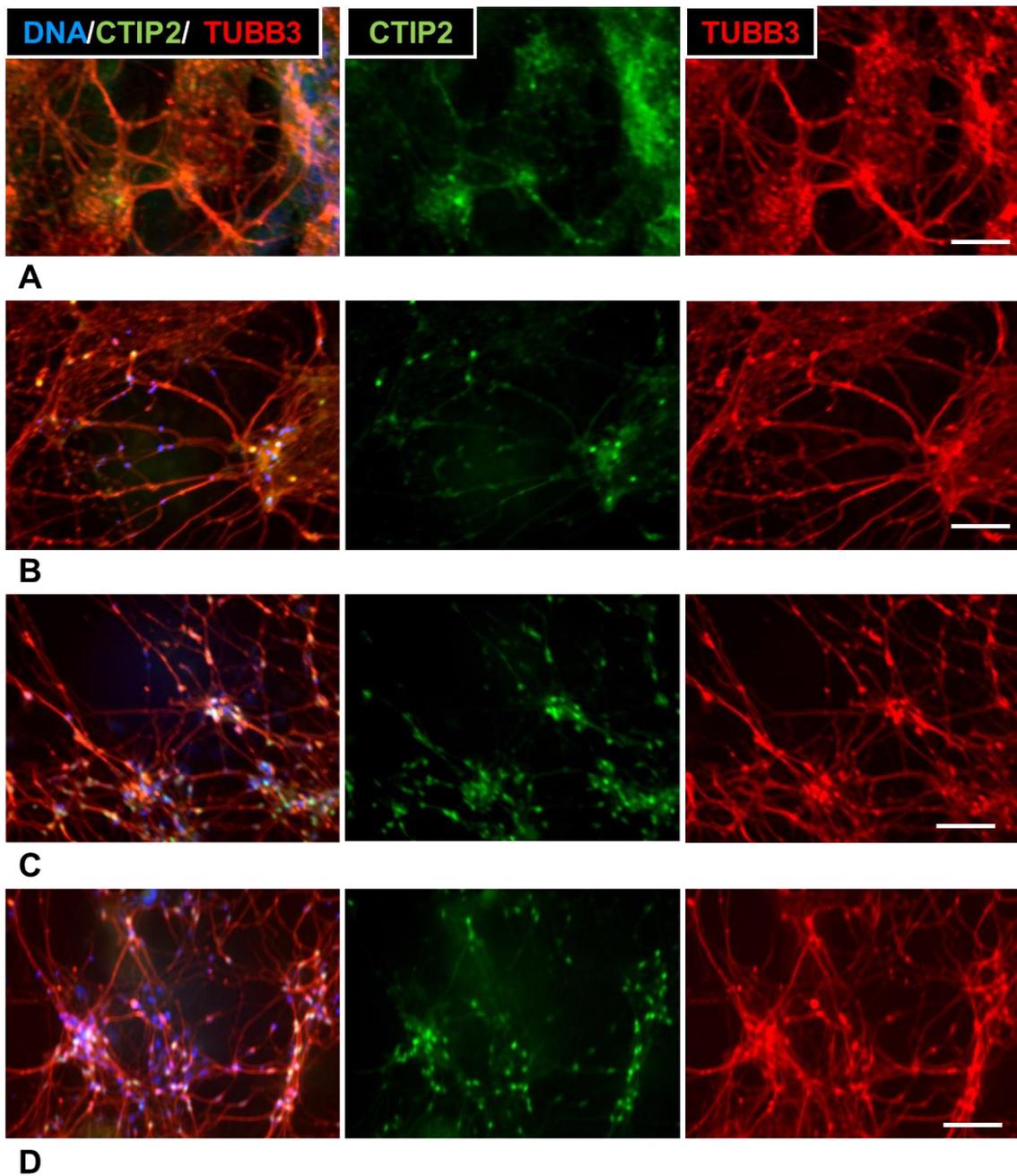


Abb. 20: Immunfluoreszenz-Analyse neuronaler Marker.

Analyse der neuronalen Marker CTIP2 und TUBB3 der kortikalen Neurone von (A) MLUi001-M, (B) MLUi002-G, (C) IPS(IMR90)-4 und (D) iPS-DF19-9-7T an 63 d. Die Marker sind jeweils im *Overlay* mit DNA-Hoechst-Färbung, sowie einzeln dargestellt. Die Maßstäbe entsprechen 100 μm .

4.4.7 Elektrophysiologische Untersuchung der kortikalen Neurone

Die elektrophysiologischen Messungen wurden an 64 d und 78 d durchgeführt. An 64 d lagen die gemessenen Membranpotentiale im Durchschnitt bei -31 mV. Diese Messungen wurden nicht in die Auswertung einbezogen. Die gemessenen Ruhemembranpotentiale der Zellen an 78 d lagen durchschnittlich bei -57 mV. Eine Zelle zeigte ein sehr negatives Ruhemembranpotential von -92 mV. Lag das Ruhemembranpotential bei ≥ -30 mV, so wurde die Messung abgebrochen.

Die Perfusion mit Glutamat erzeugte ausschließlich positive Membranpotentialänderungen im Sinne einer Depolarisation (Abb. 21 A). Nach Perfusion mit GABA wurden sowohl Hyper- als auch Depolarisationen beobachtet (Abb. 21 A und B).

Abb. 21 C zeigt die durchschnittliche Depolarisation der unterschiedlichen Zelllinien als Reaktion auf den Neurotransmitter Glutamat. Die stärksten Depolarisationen zeigten Zellen von MLUi002-G (mittlere Depolarisation $11,04$ mV $\pm 7,98$, $n=7$). Im Vergleich fanden sich geringere Änderungen des Membranpotentials bei iPS-DF19-9-7T (mittlere Depolarisation $5,12$ mV $\pm 5,81$, $n=9$), MLUi001-M (mittlere Depolarisation $3,47$ mV $\pm 0,45$, $n=3$) und IPS(IMR90)-4 (mittlere Depolarisation $2,03$ mV $\pm 0,90$, $n=3$).

Eine Reaktion der Zellen auf die Perfusion mit GABA konnte für drei Zelllinien festgestellt werden (Abb. 21 D). Zellen von MLUi001-M zeigten eine Hyperpolarisation ($n=2$), bei MLUi002-G reagierten die Zellen sowohl hyper- als auch depolarisierend ($n=5$). Für MLUi001-M und MLUi002-G wurde eine GABA-Konzentration von 100 μ M verwendet. Bei Messungen von iPS-DF19-9-7T wurden ausschließlich Depolarisationen verzeichnet ($n=7$), die GABA-Konzentration betrug 10 μ M.

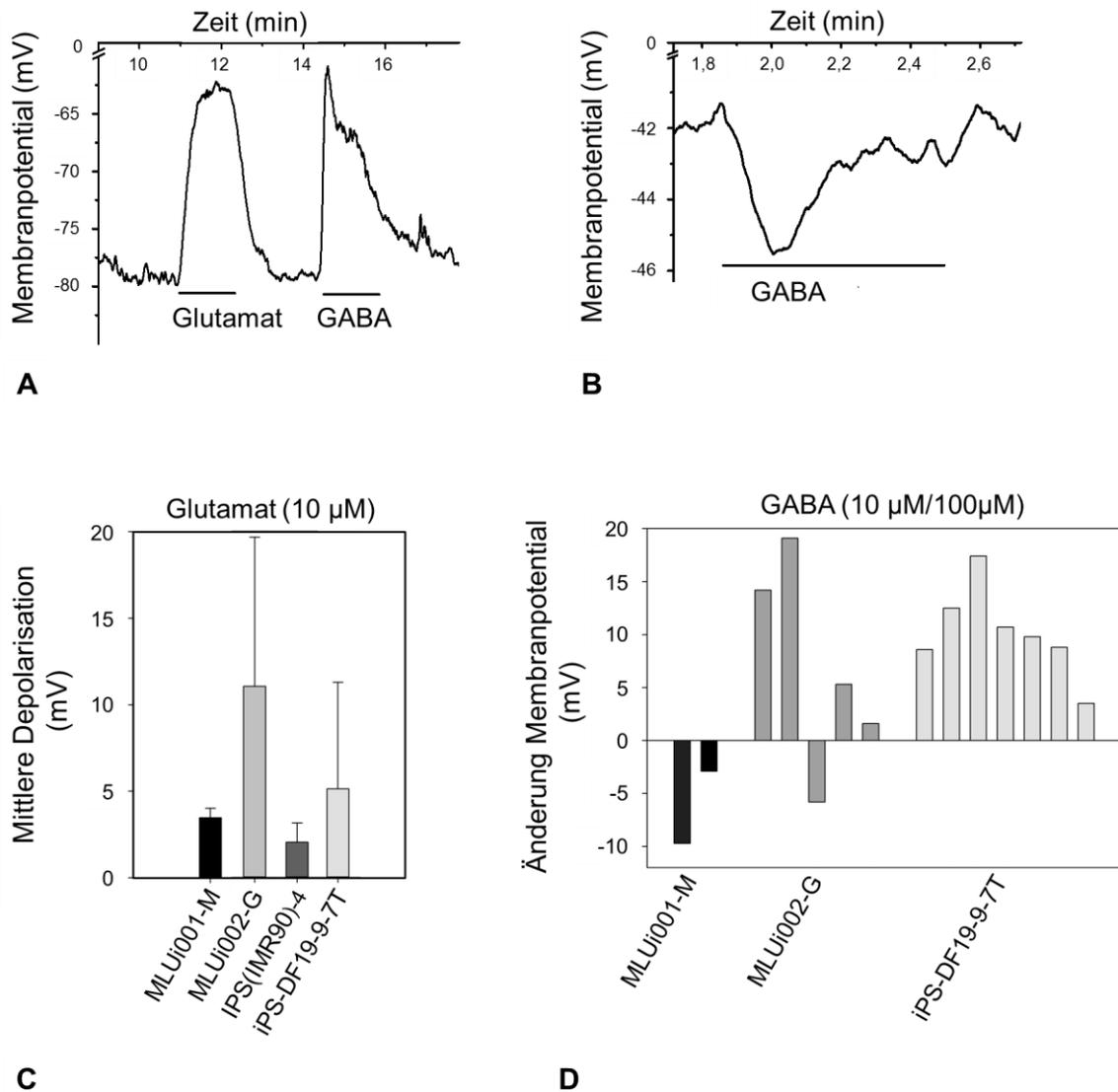


Abb. 21: Elektrophysiologische Analyse der kortikalen Neurone mittels *Patch-Clamp*-Technik.

(A) Nach Perfusion der Zellen mit den Neurotransmittern Glutamat und GABA konnten jeweils Depolarisationen der Zellen beobachtet werden. (B) Eine Perfusion der Zellen mit GABA löste auch Hyperpolarisationen aus. (C) Dargestellt sind gemessene Depolarisationen nach Glutamat-Perfusion. Die Balken stellen die durchschnittliche Depolarisation der einzelnen Linien mit Standardabweichung dar (MLUi001-M: n=3, MLUi002-G: n=7, IPS(IMR90)-4: n=3, iPS-DF19-9-7T: n=9). (D) Gemessene De- und Hyperpolarisationen der Zellen nach Perfusion mit GABA. Die Balken stellen die Membranpotentialänderungen der einzelnen Messungen dar.

5 Diskussion

5.1 Charakterisierung der iPS-Zellen

5.1.1 iPS-Zellen der NRXN1-CNV-Linien sind pluripotent

Humane iPS-Zellen haben hinsichtlich Morphologie, Genexpression und Zelloberflächenmarkern sehr ähnliche Eigenschaften wie humane ESC und werden daher ebenfalls als pluripotent beschrieben, sind jedoch nicht mit ihnen identisch (Takahashi et al. 2007).

Die Pluripotenz der zu untersuchenden iPS-Zellen konnte anhand umfangreicher methodischer Ansätze belegt werden. Die typischen morphologischen Charakteristika pluripotenter Stammzellen und die Aktivität alkalischer Phosphatasen wurden dargestellt (Abb. 5, Anlage 5). Der Nachweis alkalischer Phosphatasen wird häufig für den Beleg der Pluripotenz verwendet. Dies wurde beispielsweise bei der erstmaligen Reprogrammierung von murinen Fibroblasten zu iPS-Zellen (Takahashi und Yamanaka 2006), sowie bei der wenig später folgenden erstmaligen Reprogrammierung humaner Fibroblasten zu iPS-Zellen angewandt (Takahashi et al. 2007). Auch von der *International Stem Cell Initiative*, die 59 humane ESC-Linien charakterisierte, wurde die Aktivität gewebeunspezifischer alkalischer Phosphatasen als typisches Merkmal für ESC dargestellt (Adewumi et al. 2007).

Des Weiteren ließ sich die Expression verschiedener Pluripotenz-assoziiierter Gene in den iPS-Zellen nachweisen. Wichtig für die Pluripotenz von Stammzellen sind in besonderem Maße die Transkriptionsfaktoren OCT4, SOX2 und NANOG, welche auf Transkript- und Proteinebene in den hergestellten iPS-Zellen vorhanden waren (Abb. 6, Abb. 7, Anlage 8). Der Nachweis pluripotenter Zellen mit Hilfe dieser Faktoren ist in der Arbeitsgruppe etabliert (Foja et al. 2013). Sie bilden den Kern in einem Netzwerk bestehend aus weiteren Transkriptionsfaktoren und Chromatin-Regulatoren, welche die Pluripotenz regulieren und für die Selbsterneuerung der Stammzelle zusammenwirken (Boyer et al. 2005).

Der Transkriptionsfaktor OCT4 spielt hierbei eine entscheidende Rolle. Die Funktion und das Expressionslevel dieses Faktors bilden die Voraussetzung für die Aufrechterhaltung der Pluripotenz embryonaler Stammzellen (Niwa et al. 2000). Auch für die Reprogrammierung adulter somatischer Zellen ist OCT4 essentiell und im Gegensatz zu anderen Reprogrammierungsfaktoren nicht austauschbar. Zudem ist bekannt, dass OCT4 für die Reprogrammierung muriner NSC zu iPS-Zellen als alleiniger Faktor ausreichend ist (Kim et al. 2009).

OCT4 und NANOG werden typischerweise von pluripotenten murinen und humanen ESC exprimiert (Adewumi et al. 2007) und werden daher ebenfalls bei iPS-Zellen für die

Charakterisierung der Pluripotenz herangezogen (Takahashi et al. 2007; Barrett et al. 2014). SOX2 wird ebenfalls von pluripotenten Zellen exprimiert, spielt jedoch zusätzlich bei der neuronalen Induktion eine entscheidende Rolle. Dies wird in Kapitel 5.2.1 näher betrachtet.

Des Weiteren waren die Zelloberflächenantigene SSEA4, TRA-1-60 und TRA-1-81 vorhanden (Abb. 7, Anlage 8). Das detektierte Glykosphingolipid SSEA4 wird ebenso wie SSEA3 zu den klassischen Oberflächenmarkern humaner ESC gezählt (Adewumi et al. 2007). SSEA3 und SSEA4 spielen jedoch keine entscheidende Rolle bei der Aufrechterhaltung eines pluripotenten Zellstadiums (Brimble et al. 2007). Auch die ebenfalls nachgewiesenen Marker TRA-1-60 und TRA-1-81 werden zu den typischen Pluripotenzmarkern humaner ESC gezählt (Adewumi et al. 2007). Bei diesen Oberflächenantigenen handelt es sich um Galactosamine (Natunen et al. 2011). Diese Oberflächenantigene werden bei der Charakterisierung der Pluripotenz von iPS-Zellen häufig genutzt (Takahashi et al. 2007; Barrett et al. 2014) und kamen auch bei der Analyse der in dieser Arbeit verwendeten Kontroll-iPS-Zelllinien IPS(IMR90)-4 und iPS-DF19-9-7T zur Anwendung (Yu et al. 2007; Yu et al. 2009).

Eine weitergehende Betrachtung der beschriebenen Pluripotenzmarker wäre durch eine Proteinanalyse der Zellen mittels *Western Blot* oder durchflusszytometrische Analysen der erwähnten Oberflächenantigene möglich.

Nachweis von B-Zell-, Neuronen- und Gliazell-assoziierten Markern in iPS-Zellen

Sowohl in den NRXN1-CNV-Zelllinien als auch den beiden Kontrolllinien IPS(IMR90)-4 und iPS-DF19-9-7T wurden Transkripte nachgewiesen, die mit B-Zellen beziehungsweise mit Neuronen und Gliazellen assoziiert sind (Abb. 8, Abb. 18). Auf diese Transkripte wird in den Kapiteln 5.1.3 und 5.2.3 näher eingegangen. In der Literatur ist beschrieben, dass humane ESC eine Vielfalt von Genen unspezifisch exprimieren (Elefanty et al. 1997; Tropepe et al. 2001). Bei humanen iPS-Zellen ist ebenfalls eine variable Genexpression beschrieben, für die mehrere ursächliche Faktoren diskutiert werden. Zu diesen Faktoren zählen neben des genetischen Hintergrunds und des somatischen Ursprungs auch unter anderem die Art der Reprogrammierung und die vorliegenden Bedingungen in der Zellkultur (Ohi et al. 2011).

Der pluripotente Charakter der hergestellten iPS-Zellen wurde wie beschrieben durch verschiedene Methoden nachgewiesen. Daher ist trotz der Transkriptnachweise der B-Zell-, Neuronen- und Gliazell-assoziierten Marker von einer Pluripotenz der Zellen auszugehen. Weiterhin ist anzunehmen, dass diese Marker alleinstehend nicht als eindeutige Differenzierungsmarker bei der Analyse von Zellen genutzt werden können.

5.1.2 Spontan differenzierte iPS-Zellen bilden Derivate aller drei Keimblätter

Humane iPS-Zellen sind ebenso wie ESC in der Lage Zellerivate von Entoderm, Mesoderm und Ektoderm zu bilden (Takahashi et al. 2007). Da humane pluripotente Zelllinien im Vergleich zueinander epigenetische Unterschiede aufweisen, variieren sie bezüglich ihres Differenzierungspotentials (Bock et al. 2011). Das Differenzierungspotential der in dieser Arbeit verwendeten iPS-Zelllinien wurde nach spontaner, ungerichteter Differenzierung beurteilt. Bei der lichtmikroskopischen Betrachtung waren während des Differenzierungsprozesses deutliche morphologische Veränderungen erkennbar (Abb. 9, Anlage 6). Die anschließende Genexpressionsanalyse bestätigte die Fähigkeit der hergestellten iPS-Zellen spontan Zellerivate aller drei Keimblätter bilden zu können.

CXCR4, SOX17 und FOXA2 (Abb. 10, Abb. 11) sind typisch für definitives Entoderm, welches wie die anderen Keimblätter während der Gastrulation entsteht (D'Amour et al. 2005). Die Entwicklung von mesodermalem Gewebe wurde anhand der Expression von MEOX1, PRRX1 und T auf Transkript- und Proteinebene in den spontan differenzierten Zellen nachgewiesen (Abb. 10, Abb. 11). T wird von Zellen des Primitivstreifens exprimiert und ist für die Entstehung des frühen Mesoderms wichtig. (Wilkinson et al. 1990; Loh et al. 2016). MEOX1 wird zu einem späteren Zeitpunkt während der Somitogenese hochreguliert. PRRX1-positive Zellen entstehen aus dem lateralen Mesoderm und sind für die Bildung der Extremitäten entscheidend (Loh et al. 2016).

Die Transkriptanalyse der Marker MS11, PAX6 und SHH bestätigte die Ausbildung ektodermaler Zellerivate in den Zelllinien und die beginnende Ausbildung neuraler Strukturen (Abb. 10). In der Immunfluoreszenz war eine Expression in neuralen Rosetten vorhanden, jedoch nicht in peripher gelegenen Zellen (Abb. 11, Anlage 9). Dieses Expressionsmuster ist für den frühen neuralen Transkriptionsfaktor PAX6 in der Literatur beschrieben (Pankratz et al. 2007). Das RNA-bindende Protein MS11 hat Einfluss auf die Regulierung von neuralen Progenitorzellen und auf die neurale Differenzierung (Battelli et al. 2006). Das während der neuralen Entwicklung von *Chorda dorsalis* und Bodenplatte sezernierte SHH bestimmt durch einen ventralen-dorsalen Gradienten die weitere Entwicklung der NPC (Liem et al. 2000). Auch MS11 und SHH waren ausschließlich in neuralen Rosetten exprimiert. Einige Bereiche wiesen zwar dasselbe Expressionsmuster auf, zeigten jedoch nicht die für neurale Rosetten typische radiale Morphologie (Anlage 9). Möglicherweise handelte es sich hierbei um Zellansammlungen mit beginnender oder bereits auflösender Rosettenstruktur.

In den Linien MLUi001-F und in iPS-DF19-9-7T konnte keine Genexpression der ektodermalen Marker auf Proteinebene nachgewiesen werden. Es ist möglich, dass in den beiden Linien neurale Rosetten vorlagen, diese jedoch nicht zu den untersuchten Zeitpunkten detektiert werden konnten. Durch kürzere Intervalle zwischen den gewählten Untersuchungszeitpunkten

ließe sich die Expression dieser Marker vermutlich nachweisen. Zusätzlich durchgeführte durchflusszytometrische Untersuchungen könnten in folgenden Studien ebenfalls zum Nachweis der Genexpression beitragen.

Mit der Bildung und Analyse von Embryoidkörpern *in vitro* (Takahashi et al. 2007) bzw. von Teratomen *in vivo* (Yu et al. 2007) sind weitere Möglichkeiten beschrieben, um das Differenzierungspotential von iPS-Zellen nachzuweisen. Zudem könnte die Genexpression keimblattspezifischer Marker durch umfassende Transkriptom-Analysen untersucht werden (Bock et al. 2011).

5.1.3 B-Zellmarker

Für die Forschung mit patientenspezifischen iPS-Zellen müssen reprogrammierbare Zellen der betroffenen Patienten zur Verfügung stehen. Häufig werden dazu Fibroblasten verwendet, für deren Gewinnung eine Hautbiopsie notwendig ist. Als Ursprung für die Herstellung von iPS-Zellen bieten B-Lymphozyten hingegen den Vorteil, dass sie durch eine routinemäßig durchgeführte periphere Blutentnahme gewonnen werden können. Dies könnte die Bereitschaft der Patienten für ein Mitwirken auf diesem Forschungsgebiet steigern, was die Grundlage der iPS-Zellforschung darstellt.

Da die hier verwendeten NRXN1-CNV-Zelllinien durch Reprogrammierung von B-lymphoblastoiden Zellen hergestellt wurden, wurden sie auf die Transkription von B-Zellmarkern untersucht (Abb. 8). Während die B-Zellmarker BTLA, FCRLA und GPR183 in den patientenspezifischen iPS-Zelllinien nicht nachgewiesen wurden, zeigten sich Transkripte für EBF1, IKZF3 und TCL1A.

Für die Immortalisierung der B-lymphoblastoiden Zelllinien wurden EBV verwendet. Da das Onkogen TCL1A über EBV induziert wird (Kiss et al. 2003), ist die Behandlung der Patientenzelllinien mit diesen Viren für den positiven Nachweis dieses Markers möglicherweise ursächlich.

Weiterhin haben Transkriptionsunterschiede zwischen humanen ESC und humanen iPS-Zellen die Vermutung nahegelegt, dass iPS-Zellen ein somatisches Gedächtnis besitzen (Marchetto et al. 2009). Eine Ursache für dieses Gedächtnis ist eine unvollständige DNA-Methylierung der Promotoren während der Reprogrammierung der Zellen (Ohi et al. 2011).

In der Kontrollzelllinie IPS(IMR90)-4 wurden jedoch ebenfalls B-Zellmarker nachgewiesen. Da diese iPS-Zelllinie aus fetalen Lungenfibroblasten hergestellt wurde (Yu et al. 2007), kann die Expression der Marker nicht durch ein somatisches Gedächtnis erklärt werden. Daher ist sowohl bei den NRXN1-CNV- Zelllinien, als auch bei der Kontrolllinie IPS(IMR90)-4 die bereits in

Kapitel 5.1.1 beschriebene Expression unspezifischer Gene in pluripotenten Stammzellen als Ursache in Betracht zu ziehen.

Weitere Analysen, wie beispielsweise Transkriptom-Analysen, der in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien hinsichtlich eines somatischen Gedächtnisses wären wünschenswert, da dies unter Umständen die Effizienz der Zelldifferenzierung beeinflusst. Weiterhin lässt sich über die Ausprägung des somatischen Gedächtnisses die Effizienz der Reprogrammierung beurteilen. Zusätzlich wäre ein Nachweis der genannten B-Zell-Marker auf Proteinebene interessant. Für die Charakterisierung von iPS-Zellen, die aus B-lymphoblastoiden Zellen hergestellt wurden, erscheint es zudem sinnvoll weitere Differenzierungsmarker zu etablieren.

5.2 Differenzierung der patientenspezifischen iPS-Zellen zu kortikalen Neuronen

5.2.1 Herstellung von NSC

Die Herstellung von Neuronen und Gliazellen aus PSC bildet für viele Fragestellungen zur Erforschung des ZNS sowie für das Verständnis neurologischer und psychiatrischer Erkrankungen eine wichtige Forschungsgrundlage. Aus diesem Grund existiert eine große Bandbreite unterschiedlicher Protokolle für neurale Differenzierungen (Kelava und Lancaster 2016). Die Auswahl des Differenzierungsansatzes richtet sich nach der spezifischen Fragestellung und ist von dem zu untersuchenden neuronalen Zelltyp abhängig. Das hier verwendete Protokoll ermöglichte die gerichtete Differenzierung der zuvor charakterisierten iPS-Zellen zu NSC in 7 d und anschließend zu kortikalen Neuronen in 78 d.

Differenzierungsprotokolle für die Herstellung von NSC

In einem ersten Schritt erfolgte die Differenzierung der iPS-Zellen zu NSC in einem neuronalen Induktionsmedium innerhalb von 7 d. In dieser Phase konnten die Entstehung neuraler Rosetten, sowie die Bildung verschiedener Perikaryen beobachtet werden (Abb. 12, Anlage 7). Dies war ein Anzeichen für die erfolgreiche neurale Induktion.

Die Differenzierung von neuralen Rosetten aus humanen ESC wurde erstmals 2001 beschrieben (Zhang et al. 2001). Dabei wurde zunächst die Entwicklung von Embryoidkörpern initiiert. Dies sind rundliche Zellaggregate, die aus PSC entstehen, wenn diese ohne Kontakt zu einer Oberfläche kultiviert werden (Wobus et al. 2002). Zhang et al. (2001) differenzierten diese Embryoidkörper anschließend unter Verwendung von *fibroblast growth factor 2* zu neuronalen Vorläuferzellen. Mehrere Arbeitsgruppen zeigten, dass aus ESC differenzierte NSC im Stadium der neuralen Rosetten unter Zusatz verschiedener Faktoren aufrechterhalten und vermehrt

werden können. Dabei behalten die Zellen die Eigenschaften von NSC im Hinblick auf Selbsterneuerung und Multipotenz mit entsprechendem neuronalen und glialen Differenzierungspotential (Elkabetz et al. 2008; Koch et al. 2009). Diese Differenzierungsprotokolle beinhalten den Zwischenschritt der Bildung von Embryoidkörpern, welche die Embryogenese *in vitro* abbildet. Allerdings geht die Differenzierung ausgehend von Embryoidkörpern mit einer gewissen Varianz hinsichtlich der regionalen Zellidentitäten einher (Du und Zhang 2004).

Weitere Protokolle umgehen diesen Zwischenschritt und sehen die Differenzierung von PSC zu NSC als *Monolayer* vor. Grundlage für einen dieser Ansätze bildet die Erkenntnis, dass *bone morphogenic protein* (BMP) die Bildung von Epidermis aus ektodermalen Zellen fördert und im Gegensatz dazu die neurale Induktion inhibiert (Tropepe et al. 2001). Eine Zeit lang wurde angenommen, dass ektodermale Zellen ohne den Einfluss von äußeren Signalen und vor allem durch die Abwesenheit von BMP selbstständig zu neuronalen Vorläuferzellen differenzieren und *in vivo* die Neuralplatte ausbilden. Inzwischen ist bekannt, dass die neurale Induktion komplexer abläuft und eine Reihe von Signalwegen hierbei eine Rolle spielen (Stern 2005). Dennoch besteht eine weitere Möglichkeit für die Differenzierung von PSC zu neuronalen Rosetten in der dualen SMAD [Fusion aus Sma (*small body size*) und MAD (*mothers against decapentaplegic*)]-Inhibition. Hierbei wird die neurale Induktion durch die doppelte Hemmung des *transforming growth factor beta* (TGF- β)-Signalweges gefördert. Zur Verwendung kommen der BMP-Inhibitor Noggin und SB431542 als Inhibitor des Nodal/Activin/TGF- β -Signalweges (Chambers et al. 2009). Weiterhin fördern serumfreies Medium, der Verzicht von embryonalen Maus-Fibroblasten und die Kultivierung der Zellen mit geringer Dichte die neurale Differenzierung von PSC (Tropepe et al. 2001).

Die Differenzierung von iPS-Zellen zu NSC mit dem in dieser Arbeit verwendeten neuronalen Differenzierungsmediums gelang vergleichsweise schnell und ohne die Notwendigkeit der Bildung von Embryoidkörpern als *Monolayer*. Dies erlaubt während der Differenzierung eine gute lichtmikroskopische Beobachtung der Zellen und verringert eine mögliche Varianz der Zellidentitäten.

Genexpressionsanalyse von NSC

Neben den beschriebenen morphologischen Veränderungen bestätigten Genexpressionsanalysen den NSC-Charakter der Zellen. Auf Transkript- und Proteinebene konnten die Transkriptionsfaktoren PAX6 und SOX2, sowie das Intermediärfilament NES nachgewiesen werden (Abb. 13, Abb. 14, Anlage 10). Diese zählen ebenso wie SOX1 zu den klassischen Markern, die zur Analyse von NSC herangezogen werden (Elkabetz et al. 2008; Koch et al. 2009; Chambers et al. 2009).

Der Transkriptionsfaktor SOX2 nimmt dabei eine Sonderstellung ein. Wie bereits erwähnt spielt er für die Regulierung und Aufrechterhaltung der Pluripotenz in Stammzellen eine wichtige Rolle. SOX2 induziert darüber hinaus aber auch die Entwicklung von neuroektodermalen Zellen und inhibiert im Gegensatz dazu die Ausbildung des Meso- und Entoderms (Thomson et al. 2011). Zusätzlich sorgt SOX2 für die Aufrechterhaltung der multipotenten NSC und hemmt die terminale neuronale Differenzierung (Graham et al. 2003).

Das Intermediärfilament VIM und der Oberflächenmarker A2B5 sind ebenfalls Marker, die in neuronalen Vorläuferzellen vorhanden sind (Reubinoff et al. 2001). Diese konnten in den NSC mittels Immunfluoreszenz nachgewiesen werden (Abb. 14, Anlage 10). Weiterhin exprimierten die NSC den Transkriptionsfaktor NEUROG3, welcher in einem Signalweg eingebettet ist und für die Regulation von neuraler Morphologie und Synaptogenese eine wichtige Rolle spielt (Simon-Arecas et al. 2011).

5.2.2 Variable neurale Induktion in NRXN1-CNV-Zelllinien

Während der Differenzierung konnten weder in der morphologischen Begutachtung der NRXN1-CNV-Zelllinien, noch in der Immunfluoreszenzanalyse der NSC-Marker Unterschiede zwischen den verschiedenen Linien ausgemacht werden. Um die neurale Induktion in den einzelnen Zelllinien vergleichen zu können, wurde die Transkriptmenge von ASCL1, NES, PAX6, SOX1 und SOX2 im NSC-Stadium der Zellen quantitativ untersucht und mit der Transkriptmenge im Pluripotenzstadium verglichen (Abb. 13). ASCL1 zählt ebenfalls zu den Markern, die von NSC exprimiert werden (Elkabetz et al. 2008).

Es zeigte sich eine starke Varianz zwischen den Linien. Dies lässt vermuten, dass die neurale Induktion in den einzelnen NRXN1-CNV-Linien unterschiedlich effizient stattfand. Für die terminale Differenzierung wurde je Patient die Linie gewählt, die die stärkste Induktion der analysierten Markergene im Vergleich zum iPS-Zellstadium vorwies, da vermutet wurde, dass Linien mit einer starken neuronalen Induktion für die weitere neuronale Differenzierung besser geeignet sind.

Es ist beschrieben, dass sich ESC und iPS-Zellen hinsichtlich des zeitlichen Ablaufs und des Genexpressionsmusters während der neuronalen Differenzierung gleichen und iPS-Zellen unabhängig von der verwendeten Reprogrammierungsmethode im Vergleich zu ESC weniger effizient differenzieren. Es gibt zudem eine starke Varianz zwischen verschiedenen iPS-Zelllinien, auch bei Linien gleichen somatischen Ursprungs (Hu et al. 2010). Dies entspricht den in dieser Arbeit beobachteten Ergebnissen.

Die beobachtete Varianz zwischen den Linien könnte auch darauf hinweisen, dass das verwendete Protokoll zur Herstellung der NSC-Zellen noch optimiert werden kann. Da hierzu

bisher keine weiteren Ansätze publiziert sind, wären weitergehende Untersuchungen wünschenswert. Getestet werden könnte beispielsweise die Verwendung verschiedener Medienzusätze. Um die Effizienz des Protokolls hinsichtlich der neuronalen Induktion weitergehend beurteilen zu können, wäre eine Expressionsanalyse von beispielsweise PAX6 oder NES mittels Durchflusszytometrie möglich (Pankratz et al. 2007). Hierbei ließe sich der Anteil der PAX6- und NES-positiven Zellen bestimmen und zwischen den verschiedenen Linien vergleichen.

5.2.3 Differenzierung der NSC zu kortikalen Neuronen

Bei Patienten mit Schizophrenie wurden durch Post-Mortem-Untersuchungen sowie neuroradiologische Verfahren hirnstrukturelle Veränderungen und Funktionseinschränkungen im frontalen und temporalen Kortex festgestellt (Falkai et al. 2001). Daher ist es sinnvoll, dass der Fokus dieser Arbeit auf der Herstellung kortikaler Neurone lag.

Spezifizierung der NSC zu dorsalen Vorderhirnneuronen

NSC sind multipotente Stammzellen, die in Neurone und Gliazellen differenzieren können. Während der Entwicklung des ZNS *in vivo* kommt es zur Ausbildung einer anterior-posterioren (= rostro-kaudalen) sowie einer ventro-dorsalen Achse (Abb. 2). Entlang dieser Achsen entstehen zeitliche und räumliche Gradienten verschiedener Morphogene, welche die weitere Spezifizierung der Neurone beeinflussen. Die Ausbildung der anterior-posterioren Achse wird hauptsächlich durch Morphogene der *wingless / integrated* (WNT)- und *fibroblast growth factor* (FGF)- Familie, sowie *retinoic acid* (RA) bestimmt. Entlang der ventro-dorsalen Achse sind hingegen Morphogene der BMP- und WNT-Familie, sowie SHH entscheidend (Tao und Zhang 2016). Für die Differenzierung von Neuronen aus NSC *in vitro* wird denselben Prinzipien gefolgt und das Zellschicksal durch Zufuhr entsprechender Morphogene bestimmt. Dies lenkt die Differenzierung in die Richtung eines bestimmten neuronalen Subtyps.

Für die Entstehung kortikaler Neurone muss in den neuronalen Vorläuferzellen die Identität dorsaler Vorderhirnneurone induziert werden. Diese differenzieren im Verlauf überwiegend zu exzitatorischen, glutamatergen Neuronen (Tao und Zhang 2016).

Die gerichtete neurale Differenzierung von humanen ESC hat gezeigt, dass neurale Vorläuferzellen während der Entwicklung sowohl *in vivo* als auch *in vitro* zunächst einen anterioren Phänotyp annehmen (Pankratz et al. 2007). Dieser Phänotyp kann in Abwesenheit von kaudalisierenden Morphogenen erhalten werden, was im weiteren Verlauf die Entwicklung von Vorderhirnneuronen bewirkt. Für die Entstehung von beispielsweise Mittelhirn- oder Rückenmarksneuronen ist eine Verschiebung des Zellschicksals in kaudale Richtung

notwendig. Hierfür sind entsprechende Morphogene wie beispielsweise RA entscheidend (Pankratz et al. 2007; Elkabetz et al. 2008).

Die Dorsalisierung der NPC wurde in der ersten Phase der terminalen Differenzierung forciert. Das hierzu verwendete Differenzierungsmedium enthielt die Zusätze Cyclopamine-3-*Keto-N-aminoethyl-N'-aminocaproyldihydrocinnamoyl* (Cyclopamine-KAAD) und WNT3A. Cyclopamine-KAAD ist ein Inhibitor von SHH. Je höher die Konzentration von SHH entlang der ventro-dorsalen Achse, desto stärker erfolgt eine Ventralisierung der Zellidentität (Tao und Zhang 2016, Abb. 2). Die Verwendung des SHH-Inhibitors Cyclopamine-KAAD diente daher einer Verschiebung des Zellschicksals in Richtung des dorsalen Vorderhirns. Die Herstellung von kortikalen Neuronen unter Verwendung von Cyclopamine wurde erstmals für murine ESC beschrieben (Gaspard et al. 2009). Später wurde gezeigt, dass sich das Prinzip der Dorsalisierung der Zellidentität durch Cyclopamine auf humane ESC und humane iPS-Zellen übertragen lässt. Die Verwendung des SHH-Inhibitors fördert die Differenzierung von glutamatergen Neuronen. Im Gegenzug wird die Population von GABAergen Neuronen, die vor allem im ventralen Vorderhirn entstehen, verringert (Cao et al. 2017).

Auch Proteine der WNT-Familie haben Einfluss auf die Regionalisierung der Neurone entlang der ventro-dorsalen Achse (Abb. 2). Für WNT3A ist eine dorsalisierende Wirkung auf neurale Vorläuferzellen beschrieben (Elkabetz et al. 2008). Daher ist es sinnvoll, dass das Medium neben Cyclopamine-KAAD auch WNT3A enthielt.

Genexpressionsanalyse der NPC

In der Analyse der NPC zeigten sich einige der neuronalen Vorläuferzellen in der Immunfluoreszenzanalyse positiv für den Transkriptionsfaktor PAX6 (Abb. 15, Anlage 11). Dieser ist wie bereits beschrieben typisch für NSC. Zu späteren Zeitpunkten der neuronalen Entwicklung deutet er zudem auf eine Regionalisierung der Zellen zu dorsalen Vorderhirnneuronen hin (Cao et al. 2017). Die Expression von PAX6 in den NPC kann dementsprechend als Anhaltspunkt für die Differenzierung von Neuronen mit dorsaler Vorderhirnidentität durch das in dieser Arbeit verwendete Protokoll angesehen werden.

Die beginnende Differenzierung der Zellen zu Neuronen wurde durch den Nachweis von TUBB3 angezeigt. TUBB3 wird häufig verwendet, um die Ausbildung neuronaler Strukturen, ausgehend von NSC, darzustellen (Zhang et al. 2001; Elkabetz et al. 2008; Koch et al. 2009). Der Nachweis von PTN deutet auf die beginnende Ausbildung axonaler Strukturen hin (Silos-Santiago et al. 1996). Weiterhin konnten STX 1A, 1B, 2 und 3 detektiert werden. STX gehören zu einer Gruppe von Rezeptoren, von denen STX 2 und 3 ubiquitär an Exozytoseprozessen beteiligt sind. STX 1A und 1B sind hingegen spezifisch im Nervensystem an präsynaptischen Zellmembranen lokalisiert und an der Ausschüttung von Neurotransmittern beteiligt (Söllner et

al. 1993; Teng et al. 2001). Der Nachweis von STX deutet daher möglicherweise auf die Entwicklung synaptischer Strukturen hin.

Für die weitere Differenzierung der NPC zu kortikalen Neuronen wurden dem terminalen Differenzierungsmedium die neurotrophen Faktoren *brain-derived neurotrophic factor* (BDNF) und *glial cell line-derived neurotrophic factor* (GDNF) zugesetzt, welche die Ausreifung von Neuronen unterstützen (Koch et al. 2009; Martin und Finsterwald 2011). BDNF hat einen Einfluss auf die Überlebensrate und Entwicklung von Neuronen (Numakawa et al. 2010) und spielt zudem eine Rolle bei der Übertragung und Plastizität von Neuronen. Es verbessert die Freisetzung des Neurotransmitters Glutamat. Darüber hinaus kooperieren BDNF und Glutamat bei der Regulation der dendritischen Entwicklung (Martin und Finsterwald 2011). Durch die Funktionen von BDNF im Bereich der neuronalen Entwicklung wird darüber hinaus ein Zusammenhang von Veränderungen des neurotrophen Faktors und der Entstehung von Schizophrenie diskutiert (Nieto et al. 2013).

Eine weitere Möglichkeit für die Herstellung kortikaler Neurone ausgehend von humanen ESC und humanen iPS-Zellen besteht in der forcierten Expression des Transkriptionsfaktors Neurogenin 2 (NGN2), die durch lentivirale Transduktion induziert wird. Hierdurch entsteht eine homogene Population exzitatorischer kortikaler Neurone. Diese Methode stellt einen besonders schnellen Differenzierungsansatz dar (Zhang et al. 2013).

Darüber hinaus gibt es eine Vielzahl von Protokollen für die Differenzierung von Neuronen anderer Hirnabschnitte, wie beispielsweise dopaminerge Neurone des Mittelhirns oder Motorneurone des Rückenmarks (Petros et al. 2011).

Morphologie

Durch Verwendung des beschriebenen Protokolls kam es zu einer deutlichen Ausbildung neuronaler Strukturen mit zahlreichen, lichtmikroskopisch sichtbaren Perikaryen, sowie dendritischen Verzweigungen (Abb. 16). Dies wies auf eine erfolgreiche Differenzierung der iPS-Zellen der NRXN1-CNV-Linien zu Neuronen hin. Im Laufe der gerichteten Differenzierung kam es durch die selektiven Zellkulturbedingungen zu einem sichtbaren Zellverlust. Weiterhin wurden entlang der Dendriten Verdichtungen beobachtet, bei denen es sich möglicherweise um Dornfortsätze handelt (Abb. 17). In einer *post mortem* durchgeführten Studie wurden Pyramidenzellen von an Schizophrenie erkrankten Patienten histologisch untersucht. Dabei war eine signifikant reduzierte Dichte der Dornfortsätze entlang der Dendriten auffällig (Garey et al. 1998). Daher wäre eine weitere Analyse der NRXN1-CNV-Linien im

Hinblick auf die Ausbildung und Dichte von Dornfortsätzen unter Verwendung hochauflösender Mikroskopie von Interesse.

Genexpressionsanalyse der kortikalen Neurone

Weitere Anhaltspunkte für die erfolgreiche Differenzierung ergaben sich aus den Ergebnissen der Analyse von spezifischen Markern auf Transkriptebene im NSC-, NPC- und TD-Stadium der Zellen (Abb. 18).

Das Vorhandensein von Transkripten des GABA-Rezeptors GABBR1 und des Glutamat-Rezeptors GRIA2 sprach dafür, dass die hergestellten Neuronen fähig waren auf die Neurotransmitter GABA und Glutamat zu reagieren. Da durch das beschriebene Protokoll Zellen des dorsalen Vorderhirns gefördert wurden, ist zu vermuten, dass der überwiegende Anteil der Zellen aus exzitatorischen, glutamatergen Neuronen bestand. Eine Arbeitsgruppe, die Cyclopamine für die Herstellung von kortikalen Neuronen nutzte, erhielt eine Neuronenpopulation, die hauptsächlich aus glutamatergen Neuronen bestand und deren Anteil GABAerger Neurone auf 12 % reduziert war (Cao et al. 2017). Um den Anteil glutamaterger Zellen für das in dieser Arbeit verwendete Protokoll zu bestimmen, würde sich eine durchflusszytometrische Analyse anbieten.

Für die Funktionalität neuronaler Schaltkreise ist das Vorhandensein von Synapsen essentiell, da diese Informationen zwischen Neuronen modifizieren und weiterleiten (Südhof 2017).

Die Genexpression von Proteinen wie NLGN1, STX2, SYT1 und VAMP2 ließ die Ausbildung von Synapsen an den hergestellten Neuronen vermuten (Abb. 18). Das postsynaptische Protein NLGN1 gehört in exzitatorischen Synapsen zu den Bindungspartnern der NRXN (Song et al. 1999). Für die synaptische Funktion stellt die Ausschüttung von Neurotransmittern aus präsynaptischen Vesikeln in den synaptischen Spalt einen entscheidenden Schritt dar. Hierbei spielen Rezeptoren wie STX2 und VAMP sowie der Kalziumsensor SYT1 eine wichtige Rolle (Söllner et al. 1993; Geppert et al. 1994).

GFAP zeigte das Vorhandensein von Astrozyten und wird für diesen Nachweis häufig verwendet (Zhang et al. 2001; Koch et al. 2009; Gaspard et al. 2009). Weiterhin deuteten die nachgewiesenen Transkripte von OLIG2 die Entwicklung von Oligodendrozyten an. Der Transkriptionsfaktor OLIG2 ist für die initiale Differenzierung von Oligodendrozyten notwendig (Emery 2010). Daraus kann abgeleitet werden, dass die kortikalen Neurone in einer Mischkultur zusammen mit Gliazellen vorlagen. Dies bestätigt die Multipotenz der zuvor hergestellten NSC.

Die erfolgreiche Differenzierung der patientenspezifischen iPS-Zellen zu Neuronen wurde durch den Nachweis von TUBB3 und CTIP2 auf Proteinebene bestätigt (Abb. 20). Wie bereits erwähnt, wird das mikrotubuläre Protein TUBB3 als typischer neuronaler Marker angesehen (Zhang et al. 2001; Elkabetz et al. 2008; Koch et al. 2009). Der Nachweis von CTIP2 zeigte die Bildung kortikaler Neurone aus den beiden tiefsten histologischen Schichten des Kortex (Gaspard et al. 2009). Dieser Marker ist geeignet um den prozentualen Anstieg dorsaler Vorderhirnzellen durch Cyclopamine zu erfassen (Cao et al. 2017). CTIP2 ist Teil eines Netzwerkes, welches die Projektion der kortikalen Pyramidenzellen reguliert (Srinivasan et al. 2012).

Mit dem in dieser Arbeit verwendeten Protokoll gelang wie beschrieben der Nachweis von TUBB3 und CTIP2, da diese Marker eine starke Expression zeigten. Für weitere aufschlussreiche Marker müsste eine Anpassung des Immunfluoreszenz-Protokolls an neuronale Kulturen erfolgen. Eine weitergehende Charakterisierung kortikaler Neurone der NRXN1-CNV-Linien in folgenden Studien wäre wünschenswert. Von Interesse wäre beispielsweise die Analyse von Markern wie *forkhead box G1* (FOXP1) und *orthodenticle homeobox 2* (OTX2). Hierbei handelt es sich um Endhirn-Marker (Cao et al. 2017), welche für die weitere Analyse der regionalen Spezifizierung der Neurone genutzt werden könnten. Interessant wären zudem Immunfluoreszenz- und *Western-Blot*-Analysen des präsynaptischen Proteins NRXN1 und seiner postsynaptischen Bindungspartner, wie Proteinen der NLGN-Familie, im Hinblick auf mögliche Unterschiede zwischen den NRXN1-CNV-Zelllinien und den Kontrolllinien.

5.2.4 Elektrophysiologische Untersuchungen zeigen die Funktionalität der Neurone

Die elektrophysiologischen Untersuchungen einzelner Zellen mittels *Patch-Clamp* zeigten Reaktionen der Zellen auf die Neurotransmitter Glutamat und GABA und bestätigten damit die Funktionalität der differenzierten Neurone. Da Ionenströme über die gesamte Zellmembranoberfläche betrachtet werden sollten und nicht die Ströme von Einzelkanälen, wurden die Messungen in *whole-cell*-Konfiguration durchgeführt. Zusätzlich wurde mit einem perforiertem *Patch* gearbeitet, weshalb eine Betrachtung der Ionenströme ohne die Vermischung von Pipettenlösung und Zytoplasma möglich war (Hermeijer 2010).

Ruhemembranpotentiale kortikaler Neurone

Das gemessene mittlere Ruhemembranpotential der kortikalen Neurone lag bei - 57 mV. Für große Pyramidenzellen sind Ruhemembranpotentiale zwischen - 60 und - 70 mV beschrieben (Creutzfeldt 1983). Die hier gemessenen Ruhemembranpotentiale sind daher leicht

depolarisiert, was am ehesten für unreife Neurone typisch ist. Eine Studie dazu wurde an murinen hippocampalen Pyramidenzellen in der postnatalen Phase durchgeführt (Tyzio et al. 2003). Messungen mittels durch Gramicidin perforierten *Patch* in *whole-cell*-Konfiguration lieferten an den ersten beiden postnatalen Tagen mittlere Ruhemembranpotentiale von - 44 mV. Im Verlauf wurde eine zunehmende Verlagerung des Ruhepotentials in negativere Bereiche bis zu einem Mittel von - 67 mV an 13 - 15 d postnatal beobachtet. Interessanterweise fanden Tyzio et al. bei *cell-attached*-Messungen von N-Methyl-D-Aspartat-Kanälen hingegen ein während des betrachteten Zeitraumes konstantes mittleres Ruhepotential von - 77 mV. Daher scheint es notwendig elektrophysiologische Zellmessungen in Abhängigkeit von der jeweiligen Messmethode einzuordnen. Weiterhin wären bei zukünftigen Studien der NRXN1-CNV-Zelllinien Messungen von Einzelkanälen interessant.

Eine Zelle zeigte im Vergleich ein stark negatives Ruhemembranpotential von - 92 mV. Solche Ruhepotentiale wurden in einer *in vivo*-Studie für murine präfrontale Pyramidenzellen beschrieben. Membranpotentiale dieser Zellen sind sehr negativ und können durch exzitatorische Impulse zu einem mehr depolarisierten Zustand wechseln, ein Mechanismus, der auch in anderen kortikalen Regionen beobachtet wurde (Lewis 2000).

Vereinzelt lag das gemessene Ruhemembranpotential bei über - 30 mV. Dies führte zu einem Abbruch der Messung, da solche Werte eine große Abweichung des physiologischen Zustandes darstellen und am ehesten auf eine Beschädigung des Neurons durch die Messung hindeuteten.

Reaktion der Neurone auf Glutamat

Sowohl in den NRXN1-CNV-Linien, als auch in den beiden Kontrolllinien konnten Zellen detektiert werden, die auf den Neurotransmitter Glutamat mit einer Depolarisation reagierten (Abb. 21 A und C). Glutamat ist der wichtigste exzitatorisch wirkende Transmitter im ZNS und hat über die Bindung an verschiedene Rezeptoren Einfluss auf die synaptische Plastizität (Zhou und Danbolt 2014). Die durch Glutamat hervorgerufenen beobachteten Depolarisationen der hergestellten kortikalen Neurone stellen daher physiologische Reaktionen dar.

Reaktion der Neurone auf GABA

Reaktionen auf den inhibitorischen Neurotransmitter GABA zeigten sich bei MLUi001-M und MLUi002-G in Form von Hyperpolarisationen, wurden aber bei MLUi002-G und iPS-DF19-9-7T auch als Depolarisationen beobachtet (Abb. 21 A, B und D).

Die Bindung von GABA an ligandengesteuerte GABA_A- und G-Protein-gekoppelte GABA_B-Rezeptoren hat im adulten Gehirn überwiegend eine inhibitorische Wirkung. Die Bindung von

GABA an den GABA_A-Rezeptor sorgt für einen Einstrom negativ geladener Chloridionen ins Zellinnere, was die Hyperpolarisation des Neurons und damit die Hemmung der neuronalen Erregung zur Folge hat. Im Gegensatz dazu liegt bei unreifen Neuronen eine höhere intrazelluläre Chloridionenkonzentration vor. Die Bindung von GABA an den GABA_A-Rezeptor hat dementsprechend einen Ausstrom von Chloridionen und konsekutiv eine Depolarisation zur Folge. Während der Entwicklung des ZNS nimmt die intrazelluläre Konzentration von Chloridionen zunehmend ab, was hauptsächlich auf eine veränderte Expression verschiedener Chlorid-Kotransporter zurückzuführen ist. Dies sorgt letztendlich für den Wechsel von einer depolarisierenden zu einer hyperpolarisierenden Wirkung (Kuner und Augustine 2000; Ben-Ari et al. 2007). Auch im adulten ZNS ist zum Teil eine depolarisierende Wirkung von GABA zu beobachten. Sie spielt eine entscheidende Rolle bei der synaptischen Integration neugebildeter Neurone in vorbestehende Schaltkreise (Ge et al. 2006). Darüber hinaus wurden depolarisierende Antworten auf GABA auch in reifen neokortikalen Pyramidenzellen nachgewiesen, was möglicherweise die synaptische Plastizität beeinflusst (Martina et al. 2001; Gullledge und Stuart 2003).

Bei den detektierten Neuronen, die auf den Transmitter GABA eine depolarisierende Reaktion zeigten, handelt es sich also vermutlich um unreife Nervenzellen oder reife Pyramidenzellen.

In der Kontrolllinie IPS(IMR90)-4 konnten in den elektrophysiologischen Untersuchungen keine Reaktionen der Neurone auf den Neurotransmitter GABA nachgewiesen werden (Abb. 21 D). Dies ist am ehesten auf die geringe Stichprobengröße zurückzuführen. Es ist anzunehmen, dass auch in dieser Linie Zellen entstanden sind, welche physiologisch auf GABA reagieren. Ein Hinweis darauf sind die mittels RT-PCR nachgewiesenen Transkripte des GABAergen Rezeptors GABBR1 in dieser Linie (Abb. 18).

Zusammenfassend zeigten die elektrophysiologischen Untersuchungen an 78 d, dass die Differenzierung mit dem in dieser Arbeit verwendeten Protokoll zur Entstehung von Neuronen führt, welche physiologisch auf die Neurotransmitter Glutamat und GABA reagieren.

Elektrophysiologische Messungen an 64 d

Die elektrophysiologischen Untersuchungen der Neurone wurden erstmals an 64 d durchgeführt. Aufgrund von Schwierigkeiten beim Erreichen des *Gigaseals* und unphysiologischer Ruhemembranpotentiale der Neurone, die im Mittel bei -31 mV lagen, wurden die Messungen zunächst abgebrochen. Ein erneutes Ausplattieren der Zellen an 66 d und die Fortsetzung der Differenzierung bis 78 d lieferte schließlich die hier betrachteten Ergebnisse. Vermutlich war der anfänglich für die Messungen gewählte Zeitpunkt in Bezug auf Zelldichte und Adhärenz der Zellen zur Kulturschale nicht optimal. In weiteren Studien wäre

daher die vergleichende Betrachtung unterschiedlicher Zeitpunkte für elektrophysiologische Untersuchungen wünschenswert. Möglicherweise lässt sich das in dieser Arbeit verwendete Differenzierungsprotokoll für kortikale Neurone im Hinblick auf folgende Patch-Clamp-Analysen weitergehend optimieren.

5.2.5 Vergleich der NRXN1-CNV-Zelllinien und der Kontrollzelllinien

Die Differenzierung der patientenspezifischen NRXN1-CNV-Linien zu kortikalen Neuronen bildete die Grundlage für vergleichende Analysen mit Kontrolllinien ohne Veränderungen im NRXN1-Gen. Der Zusammenhang zwischen CNV in NRXN1 und Schizophrenie konnte bereits mehrfach gezeigt werden (Rujescu et al. 2009; Kirov et al. 2009; Marshall et al. 2017). Vor allem CNV in Form von heterozygoten Deletionen, die zur Unterbrechung von Exons führen, sind signifikant mit der Erkrankung assoziiert und wurden bei den Schizophrenie-Patienten 1 und 2 mittels Sanger-Sequenzierung nachgewiesen. Die Auswirkungen dieser genetischen Veränderungen sind jedoch bisher nur unzureichend verstanden.

Vergleich der Zellmorphologie

Während der Differenzierung der iPS-Zellen zu kortikalen Neuronen konnten keine Unterschiede hinsichtlich Zellmorphologie und dendritischen Verzweigungen zwischen den NRXN1-CNV-Zelllinien und den beiden Kontrollzelllinien ausgemacht werden (Abb. 16, Abb. 17). Dies legt die Vermutung nahe, dass die heterozygote Deletion von NRXN1 in den Zellen keinen Einfluss auf die morphologische Entwicklung von Neuronen hat.

Dies deckt sich mit den Ergebnissen einer Studie, in der die heterozygote Deletion von NRXN1 in humanen ESC induziert wurde und diese ESC anschließend gerichtet neuronal differenziert wurden (Pak et al. 2015). Dabei wurden ebenfalls keine morphologischen Veränderungen während der Neurogenese der Zellen detektiert. Auch in einer Tierversuchsstudie wurde beobachtet, dass NRXN für die Neuro- und Synaptogenese nicht essentiell sind. Sie zeigte, dass *Knockout*-Mäuse mit einer Deletion der Gene aller drei α -NRXN am ersten postnatalen Tag versterben. Während die Entwicklung der Synapsen bei diesen Mäusen funktionierte, war die synaptische Übertragung durch eine Einschränkung der präsynaptischen, spannungsabhängigen Calciumkanäle jedoch gestört (Missler et al. 2003).

Ähnliches wurde für NLGN, die postsynaptischen Bindungspartner der NRXN, beschrieben. Eine Tiermodellstudie ermittelte, dass NLGN für die synaptische Übertragung wichtig sind, jedoch die Entwicklung der synaptischen Kontakte nicht beeinflussen (Varoqueaux et al. 2006).

Vergleich der Genexpression von NRXN1, 2 und 3

Um einen möglichen Einfluss der NRXN1-Deletion auf die Genexpression von NRXN1, 2 und 3 zu untersuchen, wurde die Transkriptmenge dieser Gene quantitativ analysiert (Abb. 19). Die stärkste Expression der NRXN-Gene zeigte sich jeweils zum TD-Stadium der kortikalen Neurone. Insbesondere für NRXN1 zeigte sich bei allen Linien ein wellenförmiger Verlauf mit einem ersten Anstieg der Transkriptmenge im NSC-Stadium, Abfall der mRNA-Menge im folgenden NPC-Stadium und starker Expression im TD-Stadium. Eine Studie untersuchte humanes kortikales Gewebe in den Wochen 8 bis 12 *post conceptionem* hinsichtlich des Expressionsmusters aller NRXN-Gene. Für NRXN1 wurde hierbei mittels quantitativer Messung der Transkriptmenge ein im Verlauf kontinuierlicher Anstieg beobachtet (Harkin et al. 2017). Unter Beachtung des Umstandes, dass das TD-Stadium der Neurone in etwa der 8. Woche *post conceptionem* in der Embryonalentwicklung entsprechen dürfte (Tao und Zhang 2016) und dies der erste Messpunkt in der Studie von Harkin *et al.* war, ließe sich ein kontinuierlicher Anstieg der NRXN1-Expression möglicherweise bei längerer Kultivierung der Neurone beobachten.

In einer Studie wurde für humane ESC mit heterozygoter NRXN1-Deletion ein annähernd zweifach vermindertes mRNA-Level für NRXN1 beschrieben (Pak et al. 2015). Eine Verminderung der mRNA-Expression deutete sich in den NRXN1-CNV-Linien weder für NRXN1, noch für NRXN2 oder 3 an. Insgesamt zeigte sich ein sehr variables Genexpressionsmuster.

Auffällig war, dass für die kortikalen Neurone von MLUi002-G bei NRXN1, 2 und 3 verglichen mit MLUi001-M und den Kontrolllinien tendenziell die stärkste Genexpression zu verzeichnen war. Dies könnte auf einen Unterschied zwischen den beiden NRXN1-CNV-Linien hindeuten. Bekannt ist, dass bei Patient 1 die Exons 1 bis 6, sowie der α -Promotor des NRXN1-Gens deletiert sind. Im Gegensatz dazu betrifft der deletierte Genabschnitt bei Patient 2 die Exons 4 bis 6. Diese Varianz der Deletionen hat möglicherweise einen Einfluss auf den Grad der zellulären Auswirkungen und die Pathogenität (Rujescu et al. 2009). Wünschenswert wäre eine genauere Betrachtung dieser Unterschiede in weiteren Studien.

Im NPC-Stadium der Zellen wurde mittels Immunfluoreszenz in allen Zelllinien eine NRXN1-Expression festgestellt (Abb. 15). Überraschenderweise zeigte sich hierbei eine kernständige Proteinlokalisierung. Eine Studie, die adultes und fetales Hirngewebe immunhistochemisch hinsichtlich der NRXN1-Expression untersuchte, wies ebenfalls eine nukleare Lokalisation nach (Harkin et al. 2017). Der Hintergrund dieses kernständigen Nachweises des synaptischen Proteins NRXN1 ist bisher nicht geklärt und sollte Gegenstand weiterer Forschung sein.

Weiterhin wäre, wie in Kapitel 5.2.3 bereits erwähnt, eine Immunfluoreszenz-Analyse der hergestellten Neurone im Hinblick auf NRXN1 und NLGN nach entsprechender Anpassung des Protokolls interessant.

Vergleich der Funktionalität

Die elektrophysiologischen Untersuchungen bestätigten die Funktionalität der Neurone. Bei der Betrachtung der Membranpotentiale und den beobachteten Reaktionen der Neurone auf die Neurotransmitter Glutamat und GABA deuteten sich keine Unterschiede zwischen den NRXN1-CNV-Zelllinien und den Kontrollen an.

Ein unterschiedliches Verhalten als Reaktion auf den Neurotransmitter GABA, konnte zwischen den Zellen von MLUi001-M und jenen von MLUi002-G und iPS-DF19-9-7T beobachtet werden (Abb. 21 D). Zellen der NRXN1-CNV-Linie MLUi001-M zeigten Hyperpolarisationen. Im Gegensatz dazu wurden in den Linien MLUi002-G und iPS-DF19-9-7T überwiegend Depolarisationen verzeichnet. Diese angedeuteten Tendenzen erfordern weitere Untersuchungen, da in der vorliegenden Arbeit die Aussagekraft bezüglich durch NRXN1-Deletionen hervorgerufene elektrophysiologische Veränderungen aufgrund der geringen Stichprobengröße der *Patch-Clamp*-Experimente limitiert ist. Eine Wiederholung dieser Experimente kann möglicherweise einen Phänotyp der NRXN1-Deletion auf zellulärer Ebene aufzeigen.

Unterschiede zwischen Zelllinien mit einer NRXN1-Deletion und entsprechenden Kontrollen auf elektrophysiologischer Ebene erscheinen unter Berücksichtigung aktueller Literatur plausibel. In einer Studie wurden bei elektrophysiologischen Untersuchungen von Neuronen mit induzierter heterozygoter Deletion von NRXN1 keine Unterschiede zu Kontrollen in Bezug auf Ruhemembranpotential und neuronale Erregbarkeit beobachtet (Pak et al. 2015). Daraus wurde geschlossen, dass NRXN1-Deletionen keinen Einfluss auf nicht-synaptische Eigenschaften von Neuronen haben. In der gleichen Studie wurde für humane Neurone mit induzierter NRXN1-Deletion eine reduzierte Frequenz spontaner postsynaptischer Depolarisationen gezeigt, welche nicht auf eine geänderte synaptische Morphologie oder verringerte synaptische Dichte zurückgeführt werden konnte. Diese Ergebnisse standen im Widerspruch zu Versuchen mit hetero- und homozygoten NRXN1 α -*Knockout*-Mäusen, die in der gleichen Studie durchgeführt wurden. Im Vergleich zu murinen Neuronen ohne Veränderungen des NRXN1-Gens konnten keine Unterschiede in der synaptischen Transmission ausgemacht werden (Pak et al. 2015).

Dies zeigt, dass sich beobachtete Auswirkungen von NRXN1-Deletionen aus Tiermodellen nicht vollständig auf die humane Neuro- und Synaptogenese übertragen lassen und unterstreicht die Relevanz von Untersuchungen humaner Neurone wie im vorliegenden iPS-Modell.

Weitergehende Analysen durch Messungen mit Multielektrodenarrays wären denkbar. Hierbei kommen Glasplättchen mit zahlreichen mikroskopisch kleinen Elektroden zum Einsatz. Über diese Elektroden können extrazelluläre Signale abgeleitet oder Neurone stimuliert werden. Dadurch ist im Gegensatz zu Patch-Clamp-Messungen nicht nur eine Einzelzellanalyse, sondern die Untersuchung von neuronalen Netzwerken möglich (Hermey 2010). Dies könnte Unterschiede zwischen den NRXN1-CNV-Zelllinien und entsprechenden Kontrollen bezüglich der neuronalen Verknüpfungen und damit synaptischen Transmission aufzeigen.

5.3 Ausblick

Die Analyse der vermutlich komplexen Auswirkungen von NRXN1-Deletionen auf zellulärer Ebene stellt einen wichtigen Ansatz zur Untersuchung der Ätiologie und Pathophysiologie der Schizophrenie dar.

Auf Grundlage des in dieser Arbeit vorgestellten Protokolls wäre die Generierung weiterer NRXN1-CNV-Linien ausgehend von patientenspezifischen iPS-Zellen wünschenswert und würde statistische Analysen erlauben. Zudem könnten die in dieser Arbeit vorgeschlagenen Methoden zur ergänzenden Analyse der NSC, NPC und kortikalen Neurone für das Verstehen pathophysiologischer Zusammenhänge aufschlussreich sein. Interessant wäre eine vergleichende Analyse der Zelllinien im Hinblick auf synaptische Übertragungen, beispielsweise durch Multielektrodenarrays.

Die Herstellung von Zelllinien psychiatrisch gesunder Probanden durch Verwendung des gleichen Reprogrammierungsprotokolls ließe eine bessere Vergleichbarkeit zwischen NRXN1-CNV-Linien und Kontrolllinien zu. Mögliche Einflüsse, die durch eine unterschiedliche Herstellung von iPS-Zellen entstehen, könnten so reduziert werden. Da bekannt ist, dass heterozygote Deletionen im NRXN1-Gen auch bei nicht von Schizophrenie oder anderen assoziierten psychiatrischen Erkrankungen betroffenen Menschen vorkommen (Rujescu et al. 2009), wäre zusätzlich eine vergleichende Analyse von NRXN1-CNV-Zelllinien gesunder Probanden interessant.

In Zukunft könnten Zellmodelle dieser Art darüber hinaus eine Grundlage für patientenspezifische Testungen etablierter oder neu entwickelter Medikamente bieten. Dies würde individuelle Therapieansätze fördern (Yamanaka 2009).

Die Nutzung von iPS-Modellen ermöglicht die Forschung an patienten- und damit krankheitsspezifischen Zellen. Das in dieser Arbeit vorgestellte Zellkulturmodell stellt daher eine wichtige Grundlage für das Verständnis der Auswirkungen von NRXN1-Deletionen dar.

6 Zusammenfassung

Schizophrenie ist eine schwerwiegende und häufige psychiatrische Erkrankung, deren Ätiologie weitgehend ungeklärt ist. Genomweite Assoziationsstudien haben einen Zusammenhang zwischen spezifischen CNV und der Erkrankung dargelegt. Zu den assoziierten Genen zählt NRXN1, welches für das präsynaptische Protein NRXN1 kodiert. Die Auswirkungen dieser genetischen Veränderungen auf zellulärer Ebene sind bisher jedoch kaum erforscht.

In der vorliegenden Arbeit wurde daher erstmalig mit iPS-Zellen gearbeitet, die aus B-Lymphozyten schizophrener Patienten mit nachgewiesener heterozygoter NRXN1-Deletion generiert wurden. Es standen insgesamt sieben NRXN1-CNV-Zelllinien von zwei schizophrenen Patienten zur Verfügung. Ziel der Arbeit war es zunächst den pluripotenten Charakter der iPS-Zellen auf RNA- und Proteinebene im Vergleich zu den etablierten iPS-Zelllinien IPS(IMR90)-4 und iPS-DF19-9-7T nachzuweisen. Die Pluripotenz der iPS-Zellen der NRXN1-CNV-Linien konnte unter anderem durch den Nachweis von OCT4, NANOG und SOX2 eindeutig belegt werden. Die spontane Differenzierung der Zellen und der Nachweis spezifischer Marker wie SOX17, T und PAX6 bestätigten zudem die für pluripotente Stammzellen typische Fähigkeit Derivate der drei Keimblätter Entoderm, Mesoderm und Ektoderm ausbilden zu können. Es zeigte sich weiterhin, dass die iPS-Zellen einige B-Zell-assoziierte Marker exprimieren.

Anschließend wurden aus den iPS-Zellen kortikale Neurone hergestellt und diese auf mögliche Unterschiede im Bezug zu den genannten Kontrollzelllinien hin untersucht. Hierfür wurden die Zellen mittels PCR-, qPCR- und Immunfluoreszenzanalysen auf RNA- und Proteinebene zu verschiedenen Zeitpunkten der Differenzierung analysiert.

Zunächst wurden NSC generiert, was durch den Nachweis assoziierter Marker wie beispielsweise NES und PAX6 an 7 d nach Beginn der Differenzierung bestätigt werden konnte. Die Fähigkeit der multipotenten NSC Astrozyten und Oligodendrozyten bilden zu können, konnte durch das Vorhandensein der glialen Marker GFAP und OLIG2 gezeigt werden. Die NSC-Linien wurden mittels qPCR auf die Effizienz ihrer neuralen Induktion untersucht. Für die weitere terminale Differenzierung zu kortikalen Neuronen wurde je Patient die Zelllinie mit der stärksten neuralen Induktion gewählt, die Kontrolllinien IPS(IMR90)-4 und iPS-DF19-9-7T wurden ebenfalls differenziert. Während der terminalen Differenzierung konnte die Ausbildung typischer neuronaler Morphologien beobachtet werden. Das Vorhandensein kortikaler Neurone konnte durch CTIP2 gezeigt werden.

Die Funktionalität der hergestellten Neurone konnte mit Hilfe der *Patch-Clamp*-Technik gezeigt werden. Das gemessene Ruhemembranpotential der Neurone betrug im Mittel - 57 mV. Durch den Neurotransmitter Glutamat wurden Depolarisationen der Neurone hervorgerufen. Eine Perfusion mit dem Botenstoff GABA resultierte hingegen sowohl in Hyper- als auch in Depolarisationen.

Die Transkriptmenge von NRXN1 wurde während der Differenzierung mittels qPCR quantitativ bestimmt. In allen vier Zelllinien konnte der stärkste Anstieg der Genexpression im Stadium der kortikalen Neurone verzeichnet werden. Ein Unterschied zwischen NRXN1-CNV-Linien und Kontrollen konnte dabei nicht gezeigt werden. Um mögliche Auswirkungen der heterozygoten NRXN1-Deletion auf die Genexpression von NRXN2 und NRXN3 zu analysieren, wurde diese ebenfalls quantitativ bestimmt. Auch hier lag die höchste Genexpression bei den untersuchten kortikalen Neuronen vor.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass aus B-Lymphozyten hergestellte iPS-Zellen pluripotente Eigenschaften besitzen und sich diese patientenspezifischen Zellen zu funktionsfähigen Neuronen differenzieren lassen. Mit den verwendeten Methoden konnten keine Unterschiede zwischen den NRXN1-CNV-Zelllinien und den Kontrolllinien hinsichtlich Zellmorphologie, NRXN1-Genexpression und Funktionalität der Neurone festgestellt werden. Durch NRXN1-CNV hervorgerufene Auswirkungen auf zellulärer Ebene erscheinen jedoch auch im Hinblick auf aktuelle Literatur plausibel. Diese Arbeit hat eine Grundlage für die weitergehende Erforschung der Schizophrenie geschaffen. Es ist denkbar, dass mit Hilfe von Zellkultur-Modellen ein wichtiger Beitrag zum ätiologischen Verständnis der Erkrankung geliefert werden kann und damit neue Ansätze für die Entwicklung zielgerichteter Therapien entstehen.

Literaturverzeichnis

- Adewumi O, Aflatoonian B, Ahrlund-Richter L et al (2007) Characterization of human embryonic stem cell lines by the International Stem Cell Initiative. *Nature biotechnology* 25:803–816. doi:10.1038/nbt1318
- Barrett R, Ornelas L, Yeager N, Mandefro B, Sahabian A, Lenaeus L, Targan SR, Svendsen CN, Sareen D (2014) Reliable generation of induced pluripotent stem cells from human lymphoblastoid cell lines. *Stem cells translational medicine* 3:1429–1434. doi:10.5966/sctm.2014-0121
- Battelli C, Nikopoulos GN, Mitchell JG, Verdi JM (2006) The RNA-binding protein Musashi-1 regulates neural development through the translational repression of p21WAF-1. *Molecular and cellular neurosciences* 31:85–96. doi:10.1016/j.mcn.2005.09.003
- Ben-Ari Y, Gaiarsa J-L, Tyzio R, Khazipov R (2007) GABA: a pioneer transmitter that excites immature neurons and generates primitive oscillations. *Physiological reviews* 87:1215–1284. doi:10.1152/physrev.00017.2006
- Bock C, Kiskinis E, Verstappen G, Gu H, Boulting G, Smith ZD, Ziller M, Croft GF, Amoroso MW, Oakley DH, Gnirke A, Eggen K, Meissner A (2011) Reference Maps of human ES and iPS cell variation enable high-throughput characterization of pluripotent cell lines. *Cell* 144:439–452. doi:10.1016/j.cell.2010.12.032
- Boyer LA, Lee TI, Cole MF, Johnstone SE, Levine SS, Zucker JP, Guenther MG, Kumar RM, Murray HL, Jenner RG, Gifford DK, Melton DA, Jaenisch R, Young RA (2005) Core transcriptional regulatory circuitry in human embryonic stem cells. *Cell* 122:947–956. doi:10.1016/j.cell.2005.08.020
- Brimble SN, Sherrer ES, Uhl EW, Wang E, Kelly S, Merrill AH, Robins AJ, Schulz TC (2007) The cell surface glycosphingolipids SSEA-3 and SSEA-4 are not essential for human ESC pluripotency. *Stem cells (Dayton, Ohio)* 25:54–62. doi:10.1634/stemcells.2006-0232
- Burk KH, Drewinko B, Turjillo JM, Ahearn MJ (1978) Establishment of a human plasma cell line in vitro. *Cancer research* 38:2508–2513
- Cao S-Y, Hu Y, Chen C, Yuan F, Xu M, Li Q, Fang K-H, Chen Y, Liu Y (2017) Enhanced derivation of human pluripotent stem cell-derived cortical glutamatergic neurons by a small molecule. *Scientific reports* 7:3282. doi:10.1038/s41598-017-03519-w
- Capone M, Bryant JM, Sutkowski N, Haque A (2016) Fc Receptor-Like Proteins in Pathophysiology of B-cell Disorder. *Journal of clinical & cellular immunology* 7. doi:10.4172/2155-9899.1000427
- Caspar F, Pjanic I, Westermann S (2018) *Klinische Psychologie*. Springer VS, Wiesbaden
- Chambers SM, Fasano CA, Papapetrou EP, Tomishima M, Sadelain M, Studer L (2009) Highly efficient neural conversion of human ES and iPS cells by dual inhibition of SMAD signaling. *Nature biotechnology* 27:275–280. doi:10.1038/nbt.1529
- Ching MSL, Shen Y, Tan W-H et al (2010) Deletions of NRXN1 (neurexin-1) predispose to a wide spectrum of developmental disorders. *American journal of medical genetics. Part B, Neuropsychiatric genetics : the official publication of the International Society of Psychiatric Genetics* 153B:937–947. doi:10.1002/ajmg.b.31063
- Creutzfeldt OD (1983) *Cortex Cerebri*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg
- D'Amour KA, Agulnick AD, Eliazer S, Kelly OG, Kroon E, Baetge EE (2005) Efficient differentiation of human embryonic stem cells to definitive endoderm. *Nature biotechnology* 23:1534–1541. doi:10.1038/nbt1163
- Du Z-W, Zhang S-C (2004) Neural differentiation from embryonic stem cells: which way? *Stem cells and development* 13:372–381. doi:10.1089/scd.2004.13.372

- Elefanty AG, Robb L, Birner R, Begley CG (1997) Hematopoietic-specific genes are not induced during in vitro differentiation of scl-null embryonic stem cells. *Blood* 90:1435–1447
- Elkabetz Y, Panagiotakos G, Al Shamy G, Socci ND, Tabar V, Studer L (2008) Human ES cell-derived neural rosettes reveal a functionally distinct early neural stem cell stage. *Genes & development* 22:152–165. doi:10.1101/gad.1616208
- Emery B (2010) Regulation of oligodendrocyte differentiation and myelination. *Science (New York, N.Y.)* 330:779–782. doi:10.1126/science.1190927
- Falkai P, Vogeley K, Maier W (2001) Hirnstrukturelle Veränderungen bei Patienten mit schizophrenen Psychosen. *Der Nervenarzt* 72:331–341. doi:10.1007/s001150050761
- Falkai P (Hrsg) (2016) *Praxishandbuch Schizophrenie; Diagnostik -- Therapie -- Versorgungsstrukturen*. Urban & Fischer is an imprint of Elsevier, München
- Ferreirós-Vidal I, Carroll T, Taylor B, Terry A, Liang Z, Bruno L, Dharmalingam G, Khadayate S, Cobb BS, Smale ST, Spivakov M, Srivastava P, Petretto E, Fisher AG, Merkenschlager M (2013) Genome-wide identification of Ikaros targets elucidates its contribution to mouse B-cell lineage specification and pre-B-cell differentiation. *Blood* 121:1769–1782. doi:10.1182/blood-2012-08-450114
- Foja S, Jung M, Harwardt B, Riemann D, Pelz-Ackermann O, Schroeder IS (2013) Hypoxia supports reprogramming of mesenchymal stromal cells via induction of embryonic stem cell-specific microRNA-302 cluster and pluripotency-associated genes. *Cellular reprogramming* 15:68–79. doi:10.1089/cell.2012.0037
- Folsom DP, Hawthorne W, Lindamer L, Gilmer T, Bailey A, Golshan S, Garcia P, Unützer J, Hough R, Jeste DV (2005) Prevalence and risk factors for homelessness and utilization of mental health services among 10,340 patients with serious mental illness in a large public mental health system. *The American journal of psychiatry* 162:370–376. doi:10.1176/appi.ajp.162.2.370
- Garey L, Ong W, Patel T, Kanani M, Davis A, Mortimer A, Barnes T, Hirsch S (1998) Reduced dendritic spine density on cerebral cortical pyramidal neurons in schizophrenia. *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry* 65:446–453
- Gaspard N, Bouschet T, Herpoel A, Naeije G, van den Aemele J, Vanderhaeghen P (2009) Generation of cortical neurons from mouse embryonic stem cells. *Nature protocols* 4:1454–1463. doi:10.1038/nprot.2009.157
- Gatto D, Brink R (2013) B cell localization: regulation by EBI2 and its oxysterol ligand. *Trends in immunology* 34:336–341. doi:10.1016/j.it.2013.01.007
- Gauggel S, Kircher T (2008) *Neuropsychologie der Schizophrenie; Symptome, Kognition, Gehirn ; mit 35 Tabellen*. Springer Medizin, Heidelberg
- Ge S, Goh ELK, Sailor KA, Kitabatake Y, Ming G-l, Song H (2006) GABA regulates synaptic integration of newly generated neurons in the adult brain. *Nature* 439:589–593. doi:10.1038/nature04404
- Geppert M, Goda Y, Hammer RE, Li C, Rosahl TW, Stevens CF, Südhof TC (1994) Synaptotagmin I: A major Ca²⁺ sensor for transmitter release at a central synapse. *Cell* 79:717–727. doi:10.1016/0092-8674(94)90556-8
- Graham V, Khudyakov J, Ellis P, Pevny L (2003) SOX2 Functions to Maintain Neural Progenitor Identity. *Neuron* 39:749–765. doi:10.1016/S0896-6273(03)00497-5
- Gulledge AT, Stuart GJ (2003) Excitatory Actions of GABA in the Cortex. *Neuron* 37:299–309. doi:10.1016/S0896-6273(02)01146-7
- Harkin LF, Lindsay SJ, Xu Y, Alzu'bi A, Ferrara A, Gullon EA, James OG, Clowry GJ (2017) Neurexins 1-3 Each Have a Distinct Pattern of Expression in the Early Developing

- Human Cerebral Cortex. *Cerebral cortex* (New York, N.Y. : 1991) 27:216–232. doi:10.1093/cercor/bhw394
- Hermey G (2010) *Der Experimentator: Neurowissenschaften*. Spektrum Akademischer Verl., Heidelberg
- Howard R, Rabins PV, Seeman MV, Jeste DV (2000) Late-onset schizophrenia and very-late-onset schizophrenia-like psychosis: an international consensus. The International Late-Onset Schizophrenia Group. *The American journal of psychiatry* 157:172–178. doi:10.1176/appi.ajp.157.2.172
- Hu B-Y, Weick JP, Yu J, Ma L-X, Zhang X-Q, Thomson JA, Zhang S-C (2010) Neural differentiation of human induced pluripotent stem cells follows developmental principles but with variable potency. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107:4335–4340. doi:10.1073/pnas.0910012107
- Ichtchenko K, Nguyen T, Südhof TC (1996) Structures, alternative splicing, and neurexin binding of multiple neuroligins. *The Journal of biological chemistry* 271:2676–2682
- Jääskeläinen E, Juola P, Hirvonen N, McGrath JJ, Saha S, Isohanni M, Veijola J, Miettunen J (2013) A systematic review and meta-analysis of recovery in schizophrenia. *Schizophrenia bulletin* 39:1296–1306. doi:10.1093/schbul/sbs130
- Jamain S, Quach H, Betancur C, Råstam M, Colinaux C, Gillberg IC, Soderstrom H, Giros B, Leboyer M, Gillberg C, Bourgeron T (2003) Mutations of the X-linked genes encoding neuroligins NLGN3 and NLGN4 are associated with autism. *Nature genetics* 34:27–29. doi:10.1038/ng1136
- Kelava I, Lancaster MA (2016) Stem Cell Models of Human Brain Development. *Cell stem cell* 18:736–748. doi:10.1016/j.stem.2016.05.022
- Keshavan MS, Nasrallah HA, Tandon R (2011) Schizophrenia, "Just the Facts" 6. Moving ahead with the schizophrenia concept: from the elephant to the mouse. *Schizophrenia research* 127:3–13. doi:10.1016/j.schres.2011.01.011
- Kim JB, Sebastiano V, Wu G, Araúzo-Bravo MJ, Sasse P, Gentile L, Ko K, Ruau D, Ehrich M, van den Boom D, Meyer J, Hübner K, Bernemann C, Ortmeier C, Zenke M, Fleischmann BK, Zaehres H, Schöler HR (2009) Oct4-induced pluripotency in adult neural stem cells. *Cell* 136:411–419. doi:10.1016/j.cell.2009.01.023
- Kirov G, d. Gumus, Chen W, Norton N, Georgieva L, Sari M, O'Donovan MC, Erdogan F, Owen MJ, Ropers H-H, Ullmann R (2007) Comparative genome hybridization suggests a role for NRXN1 and APBA2 in schizophrenia. *Human molecular genetics* 17:458–465. doi:10.1093/hmg/ddm323
- Kirov G, Rujescu D, Ingason A, Collier DA, O'Donovan MC, Owen MJ (2009) Neurexin 1 (NRXN1) deletions in schizophrenia. *Schizophrenia bulletin* 35:851–854. doi:10.1093/schbul/sbp079
- Kiss C, Nishikawa J, Takada K, Trivedi P, Klein G, Szekely L (2003) T cell leukemia I oncogene expression depends on the presence of Epstein-Barr virus in the virus-carrying Burkitt lymphoma lines. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100:4813–4818. doi:10.1073/pnas.0730710100
- Koch P, Opitz T, Steinbeck JA, Ladewig J, Brüstle O (2009) A rosette-type, self-renewing human ES cell-derived neural stem cell with potential for in vitro instruction and synaptic integration. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106:3225–3230. doi:10.1073/pnas.0808387106
- Kuner T, Augustine GJ (2000) A genetically encoded ratiometric indicator for chloride: capturing chloride transients in cultured hippocampal neurons. *Neuron* 27:447–459

- Kurtz A, Seltmann S, Bairoch A et al (2018) A Standard Nomenclature for Referencing and Authentication of Pluripotent Stem Cells. *Stem cell reports* 10:1–6. doi:10.1016/j.stemcr.2017.12.002
- Laumonnier F, Bonnet-Brilhault F, Gomot M, Blanc R, David A, Moizard M-P, Raynaud M, Ronce N, Lemonnier E, Calvas P, Laudier B, Chelly J, Fryns J-P, Ropers H-H, Hamel BCJ, Andres C, Barthélémy C, Moraine C, Briault S (2004) X-linked mental retardation and autism are associated with a mutation in the NLGN4 gene, a member of the neuroligin family. *American journal of human genetics* 74:552–557. doi:10.1086/382137
- Lewis BL (2000) Ventral Tegmental Area Afferents to the Prefrontal Cortex Maintain Membrane Potential 'Up' States in Pyramidal Neurons via D1 Dopamine Receptors. *Cerebral Cortex* 10:1168–1175. doi:10.1093/cercor/10.12.1168
- Liem KF, Jessell TM, Briscoe J (2000) Regulation of the neural patterning activity of sonic hedgehog by secreted BMP inhibitors expressed by notochord and somites. *Development (Cambridge, England)* 127:4855–4866
- Loh KM, Chen A, Koh PW, Deng TZ, Sinha R, Tsai JM, Barkal AA, Shen KY, Jain R, Morganti RM, Shyh-Chang N, Fernhoff NB, George BM, Wernig G, Salomon REA, Chen Z, Vogel H, Epstein JA, Kundaje A, Talbot WS, Beachy PA, Ang LT, Weissman IL (2016) Mapping the Pairwise Choices Leading from Pluripotency to Human Bone, Heart, and Other Mesoderm Cell Types. *Cell* 166:451–467. doi:10.1016/j.cell.2016.06.011
- Marchetto MCN, Yeo GW, Kainohana O, Marsala M, Gage FH, Muotri AR (2009) Transcriptional signature and memory retention of human-induced pluripotent stem cells. *PLoS one* 4:e7076. doi:10.1371/journal.pone.0007076
- Marshall CR, Howrigan DP, Merico D et al (2017) Contribution of copy number variants to schizophrenia from a genome-wide study of 41,321 subjects. *Nature genetics* 49:27–35. doi:10.1038/ng.3725
- Martin J-L, Finsterwald C (2011) Cooperation between BDNF and glutamate in the regulation of synaptic transmission and neuronal development. *Communicative & integrative biology* 4:14–16. doi:10.4161/cib.4.1.13761
- Martina M, Royer S, Paré D (2001) Cell-type-specific GABA responses and chloride homeostasis in the cortex and amygdala. *Journal of neurophysiology* 86:2887–2895. doi:10.1152/jn.2001.86.6.2887
- Marwaha S, Johnson S, Bebbington P, Stafford M, Angermeyer MC, Brugha T, Azorin J-M, Kilian R, Hansen K, Toumi M (2007) Rates and correlates of employment in people with schizophrenia in the UK, France and Germany. *The British journal of psychiatry : the journal of mental science* 191:30–37. doi:10.1192/bjp.bp.105.020982
- Missler M, Zhang W, Rohlmann A, Kattenstroth G, Hammer RE, Gottmann K, Südhof TC (2003) α -Neurexins couple Ca^{2+} channels to synaptic vesicle exocytosis. *Nature* 423:939. doi:10.1038/nature01755
- Natunen S, Satomaa T, Pitkänen V, Salo H, Mikkola M, Natunen J, Otonkoski T, Valmu L (2011) The binding specificity of the marker antibodies Tra-1-60 and Tra-1-81 reveals a novel pluripotency-associated type 1 lactosamine epitope. *Glycobiology* 21:1125–1130. doi:10.1093/glycob/cwq209
- Neher E, Sakmann B (1976) Single-channel currents recorded from membrane of denervated frog muscle fibres. *Nature*:799–802. doi:10.1038/260799a0
- Nieto R, Kukuljan M, Silva H (2013) BDNF and Schizophrenia: From Neurodevelopment to Neuronal Plasticity, Learning, and Memory. *Frontiers in Psychiatry* 4. doi:10.3389/fpsy.2013.00045

- Niwa H, Miyazaki J, Smith AG (2000) Quantitative expression of Oct-3/4 defines differentiation, dedifferentiation or self-renewal of ES cells. *Nature genetics* 24:372–376. doi:10.1038/74199
- Numakawa T, Suzuki S, Kumamaru E, Adachi N, Richards M, Kunugi H (2010) BDNF function and intracellular signaling in neurons. *Histology and histopathology* 25:237–258. doi:10.14670/HH-25.237
- Numberger M, Draguhn A (1996) Patch-clamp-Technik. Spektrum, Akad. Verl., Heidelberg
- Ohi Y, Qin H, Hong C, Blouin L, Polo JM, Guo T, Qi Z, Downey SL, Manos PD, Rossi DJ, Yu J, Hebrok M, Hochedlinger K, Costello JF, Song JS, Ramalho-Santos M (2011) Incomplete DNA methylation underlies a transcriptional memory of somatic cells in human iPS cells. *Nature cell biology* 13:541–549. doi:10.1038/ncb2239
- Pak C, Danko T, Zhang Y, Aoto J, Anderson G, Maxeiner S, Yi F, Wernig M, Südhof TC (2015) Human Neuropsychiatric Disease Modeling using Conditional Deletion Reveals Synaptic Transmission Defects Caused by Heterozygous Mutations in NRXN1. *Cell stem cell* 17:316–328. doi:10.1016/j.stem.2015.07.017
- Pankratz MT, Li X-J, Lavaute TM, Lyons EA, Chen X, Zhang S-C (2007) Directed neural differentiation of human embryonic stem cells via an obligated primitive anterior stage. *Stem cells (Dayton, Ohio)* 25:1511–1520. doi:10.1634/stemcells.2006-0707
- Peralta V, Cuesta MJ (2001) How many and which are the psychopathological dimensions in schizophrenia? Issues influencing their ascertainment. *Schizophrenia research* 49:269–285
- Petros TJ, Tyson JA, Anderson SA (2011) Pluripotent Stem Cells for the Study of CNS Development. *Front. Mol. Neurosci.* 4:30. doi:10.3389/fnmol.2011.00030
- Rees E, Walters JTR, Georgieva L, Isles AR, Chambert KD, Richards AL, Mahoney-Davies G, Legge SE, Moran JL, McCarroll SA, O'Donovan MC, Owen MJ, Kirov G (2014) Analysis of copy number variations at 15 schizophrenia-associated loci. *The British journal of psychiatry : the journal of mental science* 204:108–114. doi:10.1192/bjp.bp.113.131052
- Reubinoff BE, Itsykson P, Turetsky T, Pera MF, Reinhartz E, Itzik A, Ben-Hur T (2001) Neural progenitors from human embryonic stem cells. *Nature biotechnology* 19:1134. doi:10.1038/nbt1201-1134
- Robinson DG, Woerner MG, McMeniman M, Mendelowitz A, Bilder RM (2004) Symptomatic and functional recovery from a first episode of schizophrenia or schizoaffective disorder. *The American journal of psychiatry* 161:473–479. doi:10.1176/appi.ajp.161.3.473
- Rujescu D, Ingason A, Cichon S et al (2009) Disruption of the neurexin 1 gene is associated with schizophrenia. *Human molecular genetics* 18:988–996. doi:10.1093/hmg/ddn351
- Rujescu D (2017) Suche nach Risikogenen bei Schizophrenie. *Der Nervenarzt* 88:751–754. doi:10.1007/s00115-017-0330-2
- Schizophrenia Working Group of the Psychiatric Genomics Consortium (2014) Biological insights from 108 schizophrenia-associated genetic loci. *Nature* 511:421–427. doi:10.1038/nature13595
- Silos-Santiago I, Yeh H-J, Gurrieri MA, Guillerman RP, Li Y-S, Wolf J, Snider W, Deuel TF (1996) Localization of pleiotrophin and its mRNA in subpopulations of neurons and their corresponding axonal tracts suggests important roles in neural-glia interactions during development and in maturity. *J. Neurobiol.* 31:283–296. doi:10.1002/(SICI)1097-4695(199611)31:3<283::AID-NEU2>3.0.CO;2-6
- Simon-Areces J, Dopazo A, Dettenhofer M, Rodriguez-Tebar A, Garcia-Segura LM, Arevalo M-A (2011) Formin1 Mediates the Induction of Dendritogenesis and Synaptogenesis by

- Neurogenin3 in Mouse Hippocampal Neurons. *PLOS ONE* 6:e21825. doi:10.1371/journal.pone.0021825
- Singh SK, Kagalwala MN, Parker-Thornburg J, Adams H, Majumder S (2008) REST maintains self-renewal and pluripotency of embryonic stem cells. *Nature* 453:223. doi:10.1038/nature06863
- Söllner T, Whiteheart SW, Brunner M, Erdjument-Bromage H, Geromanos S, Tempst P, Rothman JE (1993) SNAP receptors implicated in vesicle targeting and fusion. *Nature* 362:318. doi:10.1038/362318a0
- Song JY, Ichtchenko K, Südhof TC, Brose N (1999) Neuroligin 1 is a postsynaptic cell-adhesion molecule of excitatory synapses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96:1100–1105
- Srinivasan K, Leone DP, Bateson RK, Dobрева G, Kohwi Y, Kohwi-Shigematsu T, Grosschedl R, McConnell SK (2012) A network of genetic repression and derepression specifies projection fates in the developing neocortex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109:19071–19078. doi:10.1073/pnas.1216793109
- Sterky FH, Trotter JH, Lee S-J, Recktenwald CV, Du X, Zhou B, Zhou P, Schwenk J, Fakler B, Südhof TC (2017) Carbonic anhydrase-related protein CA10 is an evolutionarily conserved pan-neurexin ligand. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 114:E1253–E1262. doi:10.1073/pnas.1621321114
- Stern CD (2005) Neural induction: old problem, new findings, yet more questions. *Development (Cambridge, England)* 132:2007–2021. doi:10.1242/dev.01794
- Südhof TC (2008) Neuroligins and neurexins link synaptic function to cognitive disease. *Nature* 455:903–911. doi:10.1038/nature07456
- Südhof TC (2017) Synaptic Neurexin Complexes: A Molecular Code for the Logic of Neural Circuits. *Cell* 171:745–769. doi:10.1016/j.cell.2017.10.024
- Tabuchi K, Südhof TC (2002) Structure and evolution of neurexin genes: insight into the mechanism of alternative splicing. *Genomics* 79:849–859. doi:10.1006/geno.2002.6780
- Takahashi K, Yamanaka S (2006) Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 126:663–676. doi:10.1016/j.cell.2006.07.024
- Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, Yamanaka S (2007) Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* 131:861–872. doi:10.1016/j.cell.2007.11.019
- Tao Y, Zhang S-C (2016) Neural Subtype Specification from Human Pluripotent Stem Cells. *Cell stem cell* 19:573–586. doi:10.1016/j.stem.2016.10.015
- Teng FY, Wang Y, Tang BL (2001) The syntaxins. *Genome biology* 2:REVIEWS3012. doi:10.1186/gb-2001-2-11-reviews3012
- Thomson M, Liu SJ, Zou L-N, Smith Z, Meissner A, Ramanathan S (2011) Pluripotency factors in embryonic stem cells regulate differentiation into germ layers. *Cell* 145:875–889. doi:10.1016/j.cell.2011.05.017
- Treutlein B, Gokce O, Quake SR, Südhof TC (2014) Cartography of neurexin alternative splicing mapped by single-molecule long-read mRNA sequencing. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111:E1291–9. doi:10.1073/pnas.1403244111
- Tropepe V, Hitoshi S, Sirard C, Mak TW, Rossant J, van der Kooy D (2001) Direct Neural Fate Specification from Embryonic Stem Cells: A Primitive Mammalian Neural Stem Cell

- Stage Acquired through a Default Mechanism. *Neuron* 30:65–78. doi:10.1016/S0896-6273(01)00263-X
- Tyzio R, Ivanov A, Bernard C, Holmes GL, Ben-Ari Y, Khazipov R (2003) Membrane potential of CA3 hippocampal pyramidal cells during postnatal development. *Journal of neurophysiology* 90:2964–2972. doi:10.1152/jn.00172.2003
- Uphoff CC, Denkmann SA, Steube KG, Drexler HG (2010) Detection of EBV, HBV, HCV, HIV-1, HTLV-I and -II, and SMRV in human and other primate cell lines. *Journal of biomedicine & biotechnology* 2010:904767. doi:10.1155/2010/904767
- Varoqueaux F, Aramuni G, Rawson RL, Mohrmann R, Missler M, Gottmann K, Zhang W, Südhof TC, Brose N (2006) Neuroligins Determine Synapse Maturation and Function. *Neuron* 51:741–754. doi:10.1016/j.neuron.2006.09.003
- Walsh T, McClellan JM, McCarthy SE et al (2008) Rare structural variants disrupt multiple genes in neurodevelopmental pathways in schizophrenia. *Science (New York, N.Y.)* 320:539–543. doi:10.1126/science.1155174
- Wilkinson DG, Bhatt S, Herrmann BG (1990) Expression pattern of the mouse T gene and its role in mesoderm formation. *Nature* 343:657. doi:10.1038/343657a0
- Wobus AM, Guan K, Yang HT, Boheler KR (2002) Embryonic stem cells as a model to study cardiac, skeletal muscle, and vascular smooth muscle cell differentiation. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* 185:127–156
- Yamanaka S (2009) A fresh look at iPS cells. *Cell* 137:13–17. doi:10.1016/j.cell.2009.03.034
- Yanagisawa M, Taga T, Nakamura K, Ariga T, Yu RK (2005) Characterization of glycoconjugate antigens in mouse embryonic neural precursor cells. *Journal of neurochemistry* 95:1311–1320. doi:10.1111/j.1471-4159.2005.03452.x
- Yoon HS, Scharer CD, Majumder P, Davis CW, Butler R, Zinzow-Kramer W, Skountzou I, Koutsonanos DG, Ahmed R, Boss JM (2012) ZBTB32 is an early repressor of the CIITA and MHC class II gene expression during B cell differentiation to plasma cells. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 189:2393–2403. doi:10.4049/jimmunol.1103371
- Yu J, Vodyanik MA, Smuga-Otto K, Antosiewicz-Bourget J, Frane JL, Tian S, Nie J, Jonsdottir GA, Ruotti V, Stewart R, Slukvin II, Thomson JA (2007) Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science (New York, N.Y.)* 318:1917–1920. doi:10.1126/science.1151526
- Yu J, Hu K, Smuga-Otto K, Tian S, Stewart R, Slukvin II, Thomson JA (2009) Human induced pluripotent stem cells free of vector and transgene sequences. *Science (New York, N.Y.)* 324:797–801. doi:10.1126/science.1172482.
- Zhang S-C, Wernig M, Duncan ID, Brüstle O, Thomson JA (2001) *In vitro* differentiation of transplantable neural precursors from human embryonic stem cells. *Nature biotechnology* 19:1129. doi:10.1038/nbt1201-1129
- Zhang Y, Pak C, Han Y, Ahlenius H, Zhang Z, Chanda S, Marro S, Patzke C, Acuna C, Covy J, Xu W, Yang N, Danko T, Chen L, Wernig M, Südhof TC (2013) Rapid single-step induction of functional neurons from human pluripotent stem cells. *Neuron* 78:785–798. doi:10.1016/j.neuron.2013.05.029
- Zhou Y, Danbolt NC (2014) Glutamate as a neurotransmitter in the healthy brain. *Journal of neural transmission (Vienna, Austria : 1996)* 121:799–817. doi:10.1007/s00702-014-1180-8

Thesen

- (1) Aus B-Lymphozyten schizophrener Patienten mit nachgewiesener NRXN1-Deletion hergestellte iPS-Zellen sind mit etablierten iPS-Zellen hinsichtlich Zellmorphologie und der Expression verschiedener Pluripotenz-assoziiierter Transkriptfaktoren und Zelloberflächenantigenen vergleichbar.
- (2) Unter spontanen Differenzierungsbedingungen sind Zellen dieser NRXN1-CNV-Linien in der Lage Zellerivate der Keimblätter Entoderm, Mesoderm und Ektoderm zu bilden.
- (3) Auf Transkriptebene exprimieren iPS-Zellen der NRXN1-CNV-Zelllinien und der Kontrolllinien zum Teil B-Zell-assoziierte Marker.
- (4) Die iPS-Zellen der NRXN1-CNV-Zelllinien lassen sich in sieben Tagen zu NSC differenzieren, exprimieren NSC-assoziierte Marker und weisen ein neuronales sowie gliales Differenzierungspotenzial auf. Die Effizienz der neuronalen Induktion variiert in Zelllinien gleichen somatischen Ursprungs.
- (5) Unter Nutzung von Zusätzen wie Cycloamine-KAAD und WNT3A kann die Differenzierung von NSC der NRXN1-CNV-Zelllinien zu Neuronen mit dorsaler Vorderhirnidentität forcieren werden. Die Neurone exprimieren den kortikalen Marker CTIP2.
- (6) Neurone der NRXN1-CNV-Linien zeigen Membranpotentiale im physiologischen Bereich und reagieren in *Patch-Clamp*-Versuchen auf den Neurotransmitter Glutamat mit Depolarisationen. Eine Perfusion mit dem Neurotransmitter GABA löst sowohl Hyper- als auch Depolarisationen aus.
- (7) Zellen der NRXN1-CNV-Linien weisen während der Differenzierung zu kortikalen Neuronen keine Unterschiede hinsichtlich Zellmorphologie und Funktionalität im Vergleich zu Kontrollzelllinien psychiatrisch gesunder Spender ohne NRXN1-Deletion auf. Weiterhin gibt es während der Differenzierung zu kortikalen Neuronen keine Unterschiede zu Kontrollzelllinien psychiatrisch gesunder Spender im Hinblick auf die Transkriptmenge von NRXN1.

Anlagen

Anlage 1: Verwendete primäre Antikörper.

Antikörper	Gen	Spezies	Klonalität	Immunglobulin (Ig)	Hersteller
A2B5	-	Maus	monoklonal	IgM	Merck, Deutschland
Brachyury	T	Kaninchen	polyklonal	IgG	Abcam, UK
c-Myc	MYC	Maus	monoklonal	IgG ₁	SCB, Deutschland
Ctip2	BCL11B	Ratte	monoklonal	IgG _{2a}	Abcam, UK
CXCR4	CXCR4	Ratte	monoklonal	IgG _{2b}	Merck, Deutschland
DPPA2	DPPA2	Ziege	polyklonal	IgG	SCB, Deutschland
E-cadherin	CDH1	Kaninchen	monoklonal	IgG	SCB, Deutschland
FoxA2	FOXA2	Kaninchen	polyklonal	IgG	Merck, Deutschland
GFAP	GFAP	Ziege	polyklonal	IgG	SCB, Deutschland
Klf4	KLF4	Ziege	polyklonal	IgG	Bio-Techne, Deutschland
Lin28	LIN28A	Maus	monoklonal	IgG ₁	SCB, Deutschland
MOX1	MEOX1	Maus	monoklonal	IgG _{2a}	Bio-Techne, UK
Musashi-1	MSI1	Kaninchen	polyklonal	n.a.	Merck, Deutschland
Nanog	NANOG	Ziege	polyklonal	IgG	SCB, Deutschland
Nestin	NES	Maus	monoklonal	IgG ₁	SCB, Deutschland
Neurexin1	NRXN1	Ziege	polyklonal	IgG	Abcam, UK
Neurogenin 3	NEUROG3	Kaninchen	polyklonal	IgG	Abcam, UK
NRSF	REST	Ziege	polyklonal	IgG	SCB, Deutschland
OCT3/4	POU5F1	Maus	monoklonal	IgG _{2b}	SCB, Deutschland
Pax6	PAX6	Maus	monoklonal	IgG _{2a}	SCB, Deutschland
Pleiotrophin	PTN	Ziege	polyklonal	IgG	Bio-Techne, UK
PRRX1	PRRX1	Ziege	polyklonal	IgG	Bio-Techne, UK
Shh	SHH	Ratte	monoklonal	IgG _{2a}	Abcam, UK
Sox2	SOX2	Kaninchen	monoklonal	IgG	Acris, Deutschland
Sox17	SOX17	Maus	monoklonal	IgG ₁	SCB, Deutschland
SSEA-1	-	Maus	monoklonal	IgM	SCB, Deutschland
SSEA-4	-	Maus	monoklonal	IgG ₃	SCB, Deutschland
Syntaxin	STX1A, 1B, 2, 3	Ziege	polyklonal	IgG	SCB, Deutschland
TRA-1-60	-	Maus	monoklonal	IgM	Abcam, UK
TRA-1-81	-	Maus	monoklonal	IgM	Abcam, UK
Tubulin β 3	TUBB3	Maus	monoklonal	IgG ₁	Merck, Deutschland
Vimentin	VIM	Maus	polyklonal	IgG ₁	Merck, Deutschland

SCB: Santa Cruz Biotechnology

Anlage 2: Verwendete sekundäre Antikörper.

Antikörper	Anti-Spezies	aus Spezies	Hersteller
Alexa Fluor 488	Kaninchen	Ziege	Thermo Fisher Scientific, Deutschland
Alexa Fluor 488	Maus	Ziege	Thermo Fisher Scientific, Deutschland
Alexa Fluor 488	Ratte	Kaninchen	Thermo Fisher Scientific, Deutschland
Alexa Fluor 488	Ziege	Esel	Thermo Fisher Scientific, Deutschland
Cy TM 3 AffiniPure	Kaninchen	Esel	Jackson ImmunoResearch, UK
Cy TM 3 AffiniPure	Maus	Ziege	Jackson ImmunoResearch, UK
Cy TM 3 AffiniPure	Ratte	Esel	Jackson ImmunoResearch, UK
Cy TM 3 AffiniPure	Ziege	Esel	Jackson ImmunoResearch, UK
Cy TM 5 AffiniPure	Kaninchen	Ziege	Jackson ImmunoResearch, UK

Anlage 3: Verwendete Primer für RT-PCR.

Bezeichnung	Sequenz (5' → 3')	Fragmentgröße (bp)	Version (pubmed)
h BTLA (2) S	gacacagcaggaaggaaat	331	NM_181780.3
h BTLA (2) AS	atggtcctgttgagtcag		NM_001085357.1
h CDH1 S	ggagaagaggaccaggactttg	808	NM_001317185.1
h CDH 1 AS	agggacacaccagttagtaa		NM_001317186.1 NM_001317184.1 NM_004360.4
h CXCR4 S	gcctgttgctgccttacta	674	NM_003467.2
h CXCR4 AS	caggaaaaacgtccacggg		NM_001008540.1
h DPPA2 S	ccgtccccgaatctcctccatc	608	NM_138815.3
h DPPA2 AS	atgatccaacatggctcccggtg		
h EBF1 (2) S	agcgtttgccaaggaagta	350	NM_001324111.1 NM_182708.2 NM_001324107.1 NM_001324108.1 NM_001324101.1 NM_024007.4 NM_001324109.1 NM_001290360.2 NM_001324106.1 NM_001324103.1
h EBF1 (2) AS	gctcgtggtgacggagtat		
h FCRLA (2) S	aaccctaggtgtgggctct	295	NM_032738.3 NM_001184873.1 NM_001184872.1 NM_001184871.1 NM_001184870.1 NM_001184867.1 NM_001184866.1
h FCRLA (2) AS	tggtggaagggtgagttagc		
h FOXA2 S	tgggagcggatgaagatggaaggcac	216	NM_021784.4 NM_153675.1
h FOXA2 AS	tcatgccagcggccacgtacgacgac		

h: human, S: sense, AS: antisense

Fortsetzung Anlage 3: Verwendete Primer für RT-PCR.

Bezeichnung	Sequenz (5' → 3')	Fragmentgröße (bp)	Version (pubmed)
h GABBR1 S	gtcatcgaccaacaacaacg	422	NM_001319053.1
h GABBR1 AS	cagaactcacagggggacat		NM_021904.3 NM_001470.3
h GAPDH S	caaggtcatccatgacaactttg	497	NM_001256799.2
h GAPDH AS	gtccaccaccctgttgctgtag		NM_001289746.1 NM_001289745.1 NM_002046.5
h GFAP S	ggcccgccacttgaggagtaccagg	328	NM_002055.4
h GFAP AS	cttctgctcggggcccctcatgagacg		
h GPR183 S	gaccggaacgagtcactgat	352	NM_004951.4
h GPR183 AS	acacaaggcatctccgattc		
h GRIA2 S	gaatgctggaggtgcatttt	373	NM_000826.3
h GRIA2 AS	tgatgcaccgttacatggat		NM_001083620.1 NM_001083619.1
h IKZF3 (2) S	atgtggcaaacgaaaagc	335	NM_001284516.1 NM_001284515.1 NM_001284514.1 NM_001257412.1 NM_001257411.1 NM_001257410.1 NM_001257409.1 NM_001257408.1 NM_183231.2 NM_012481.4
h IKZF3 (2) AS	agaaggcacgctcttctctg		
h KLF4 S	tgattgtagtgctttctggctgggctcc	387	NM_004235.5
h KLF4 AS	acgategtggccccggaaaaggacc		NM_001314052.1
h LIN28A S	ggttcggcttctgtccatga	313	NM_024674.5
h LIN28A AS	ggtggcagcttgcatccttg		
h MEOX1 S	gcagcgtaccctgacttctc	500	NM_013999.3
h MEOX1 AS	cggttctggaaccacacttt		NM_004527.3 NM_001040002.1
h MSI1 S	aaggagtgtctggtgatgcg	571	NM_002442.3
h MSI1 AS	ggcgaggcctgtataactcc		
h MYC S	ttcgggtagtggaaaaccag	490	NM_002467.4
h MYC AS	taggaggccagcttctctga		
h NANOG S	ttccttctccatggatctg	483	NM_024865.3
h NANOG AS	actggatgttctgggtctgg		NM_001297698.1
h NLGN1 S	caacacaatgccttacctgtg	458	NM_014932.3
h NLGN1 AS	atgccatcactgctctccaaa		
h OCT4 S	caagccctcatttcaccag	467	NM_002701.5
h OCT4 AS	ttgatgtctctgggactctc		
h OLIG2 S	cagaagcgtgatggctata	209	NM_005806.3
h OLIG2 AS	tcggcagtttgggtattc		

h: human, S: sense, AS: antisense

Fortsetzung Anlage 3: Verwendete Primer für RT-PCR.

Bezeichnung	Sequenz (5' → 3')	Fragmentgröße (bp)	Version (pubmed)
h PAX6 S	accattatccagatgtgtttgcccgag	317	NM_001127612.1
h PAX6 AS	atggtgaagctgggcataggcggcag		NM_000280.4 NM_001604.5 NM_001258462.1 NM_001258463.1 NM_001258464.1 NM_001258465.1
h PRRX1 S	gaccatgacctccagctacg	567	NM_022716.3
h PRRX1 AS	gagcaggacgaggtacgatg		NM_006902.4
h REST S	ccagcaccaactttaccac	333	NM_001193508.1
h REST AS	accgaccaggaatcacagc		NM_005612.4
h SHH S	gctttcaccgagcagtggat	174	NM_001310462.1
h SHH AS	cgaagatggccaccactcag		NM_000193.3
h SOX2 S	agtctccaagcgacgaaaa	410	NM_003106.3
h SOX2 AS	ggaaagtgggatcgaacaa		
h SOX17 S	tagttggggtggtcctgcat	166	NM_022454.3
h SOX17 AS	cgcttcatggtgtgggcta		
h STX2 S	ctgacggcgtgtaggaagaa	462	NM_194356.2
h STX2 AS	gtctgtggtggttctcccag		NM_001980.3
h SYT1 S	tttactgcactgccaagg	508	NM_001135806.1
h SYT1 AS	gcaaaagagcttgcccttc		NM_001291901.1 NM_005639.2 NM_001135805.1
h T (2) S	aattggtccagccttggat	290	NM_003181.3
h T (2) AS	tactggctgtccacgatgctc		NM_001270484.1
h TCL1A (2) S	gggaggaatggacagacaga	237	NM_021966.2
h TCL1A (2) AS	agtgggtgtgcaacatgaaa		NM_001098725.1
h TUBB3 (1) S	aagagggcgagatgtacgaa	267	NM_006086.3
h TUBB3 (1) AS	gcctggagctgcaataagac		NM_001197181.1
h VAMP2 S	gccaagctcaagcgcaata	373	NM_014232.2
h VAMP2 AS	gcaaatgaaggacttgggg		

h: human, S: *sense*, AS: *antisense***Anlage 4: Verwendete Primer für qRT-PCR.**

Bezeichnung	Sequenz (5' → 3')	Fragmentgröße (bp)	Version (pubmed)
h ASCL1 S	ggagcttctcgactcacca	128	NM_004316.3
h ASCL1 AS	aacgccactgacaagaaagc		
h GAPDH S	cagcctcaagatcatcagca	143	NM_001289746.1 NM_001289745.1 NM_001256799.2 NM_002046.5
h GAPDH AS	gtcttctgggtggcagtgat		
h NES S	ttccctcagcttcaggacctc	86	NM_006617.1
h NES AS	ggactgggagcaaagatccaa		

h: human, S: *sense*, AS: *antisense*

Fortsetzung Anlage 4: Verwendete Primer für qRT-PCR.

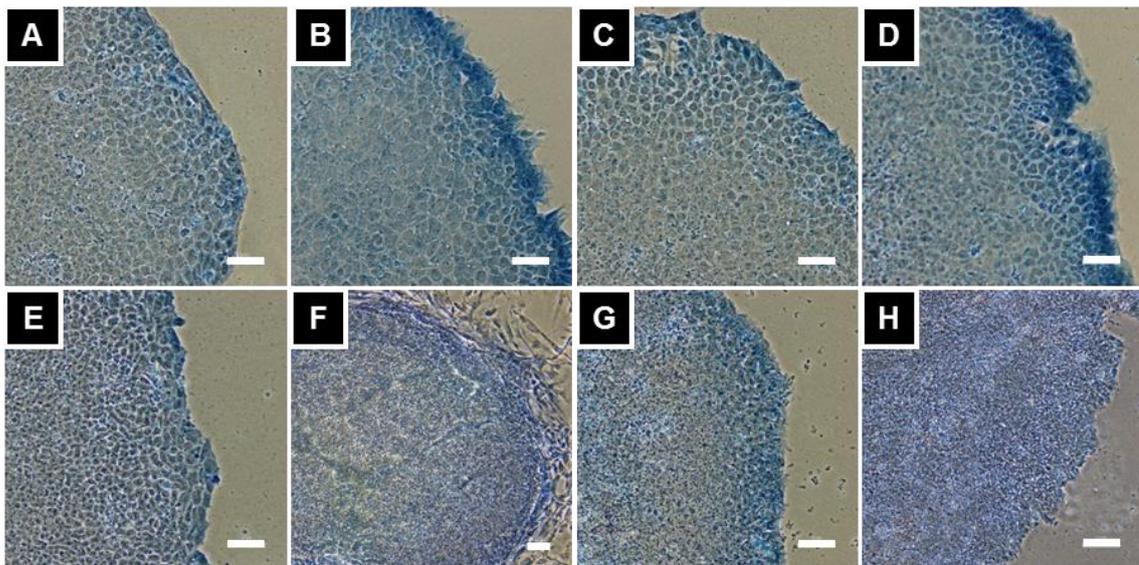
Bezeichnung	Sequenz (5' → 3')	Fragmentgröße (bp)	Version (pubmed)
h NRXN1 S	n. a.	70	n. a. * ¹
h NRXN1 AS	n. a.		
h NRXN2 S	n. a.	78	n. a. * ²
h NRXN2 AS	n. a.		
h NRXN3 S	n. a.	93	n. a. * ³
h NRXN3 AS	n. a.		
h PAX6 (1) S	gccacacacctaggacat	295	NM_001310161.1 NM_001310160.1 NM_001310158.1 NM_001258465.1 NM_001258464.1 NM_001258463.1 NM_001258462.1 NM_001604.5 NM_000280.4
h PAX6 (1) AS	gccatgctgtccccaaga		
h SOX1 S	agcagtgtcgctccaattca	96	NM_005986.2
h SOX1 AS	acgatgagtgttacctggc		
h SOX2 S	cactgccctctcacacatg	81	NM_003106.3
h SOX2 AS	cccattccctcgttttctt		

h: human, S: *sense*, AS: *antisense*, n. a.: nicht angegeben

*¹ h NRXN1: PrimePCR™ SYBR® Green Assay, ID: qHsaCED0037578, Biorad, Deutschland

*² h NRXN2: PrimePCR™ SYBR® Green Assay, ID: qHsaCED0037911, Biorad, Deutschland

*³ h NRXN3: PrimePCR™ SYBR® Green Assay, ID: qHsaCID0008187, Biorad, Deutschland

**Anlage 5: Alkalische Phosphatase-Färbung der iPS-Zellen.**

Alkalische Phosphatase-Färbungen von

A MLUi001-F in Passage 5,

E MLUi002-E in Passage 5,

B MLUi001-M in Passage 4,

F MLUi002-G in Passage 5,

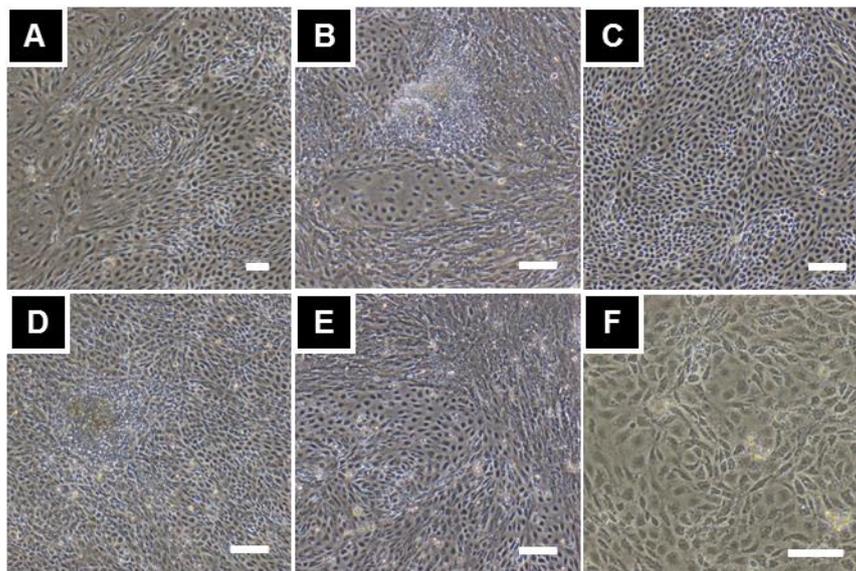
C MLUi001-N in Passage 4,

G IPS(IMR90)-4 in Passage 36,

D MLUi001-O in Passage 4,

H iPS-DF19-9-7T in Passage 27.

MLUi002-G ist auf murinen embryonalen Fibroblasten gezeigt. Maßstäbe entsprechen 100 µm.

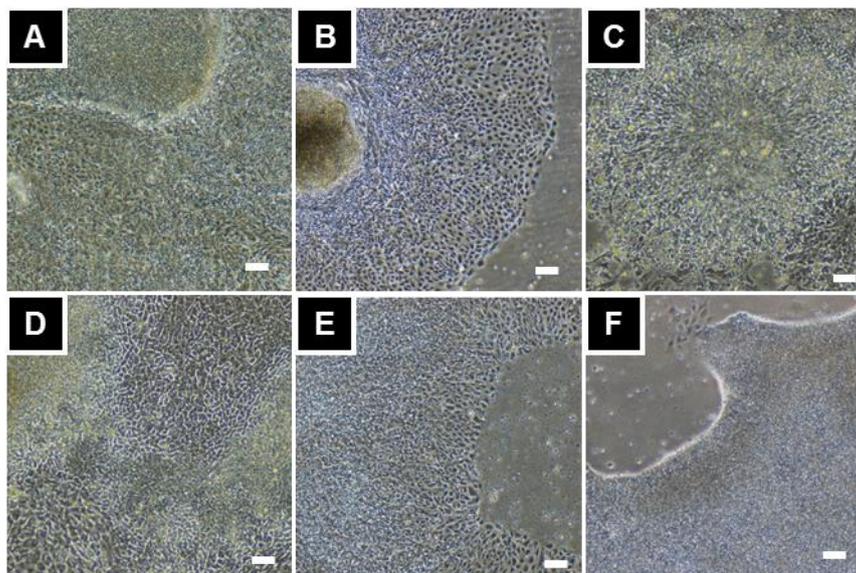


Anlage 6: Morphologische Analyse der iPS-Zelllinien an 10 d der spontanen Differenzierung.

Gezeigt sind

A MLUi001-B,	D MLUi001-N,
B MLUi001-F,	E MLUi001-O,
C MLUi001-M,	F MLUi002-G.

Maßstäbe entsprechen 100 µm.

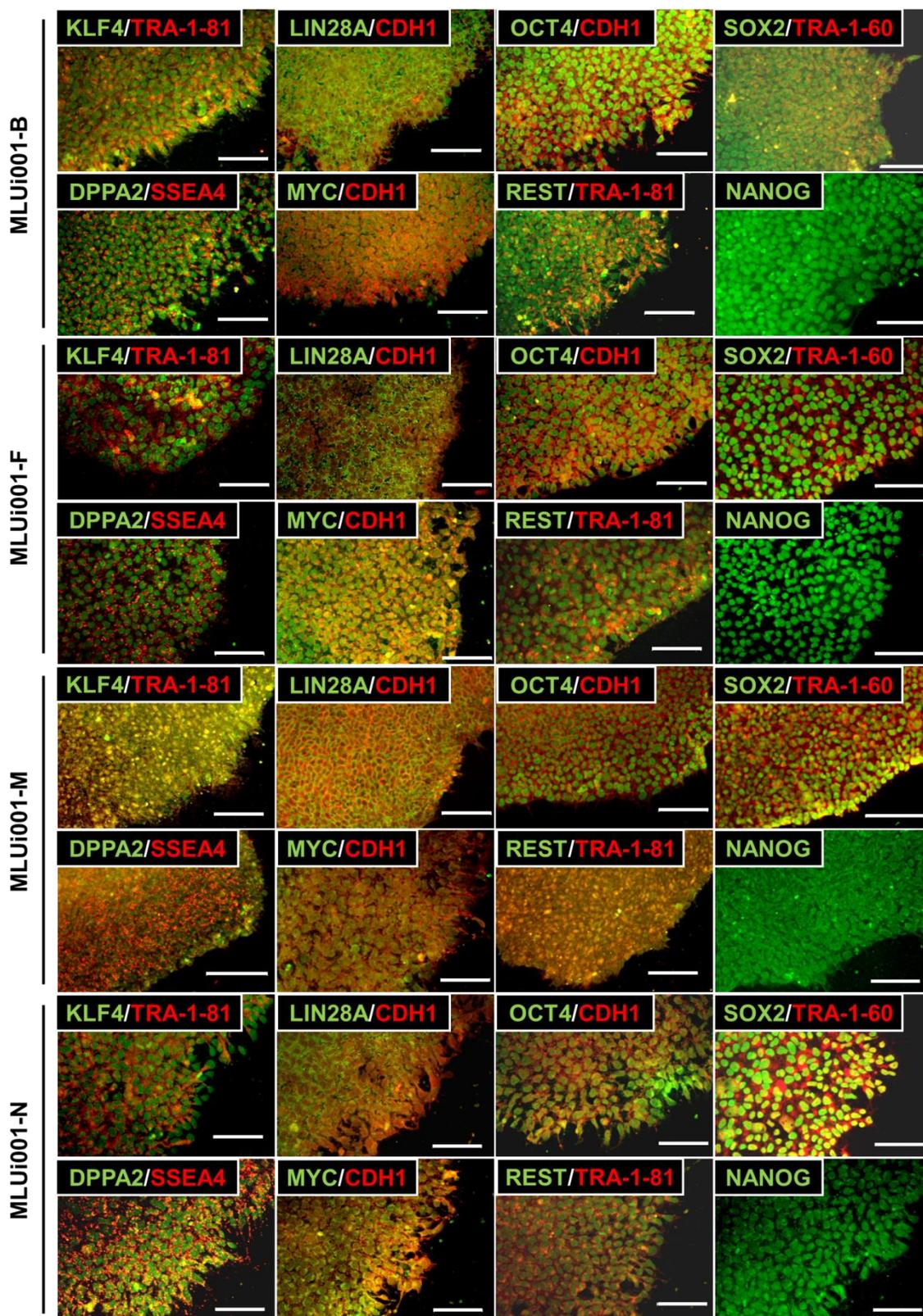


Anlage 7: Morphologische Analyse der iPS-Zelllinien an 7 d während der Entwicklung zu NSC.

Gezeigt sind

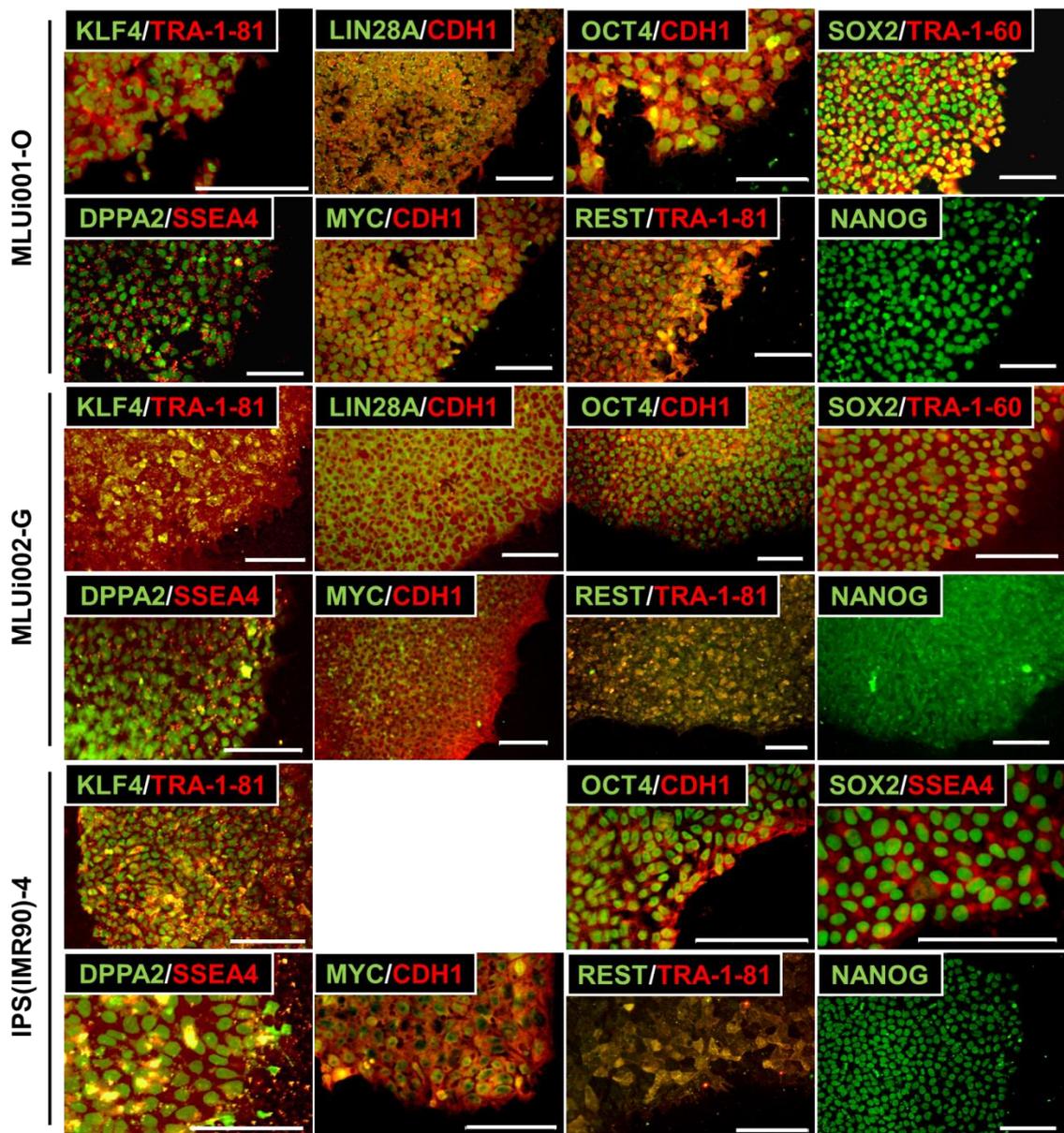
A MLUi001-B,	D MLUi001-O,
B MLUi001-M,	E MLUi002-E,
C MLUi001-N,	F MLUi002-G.

Maßstäbe entsprechen 100 µm.

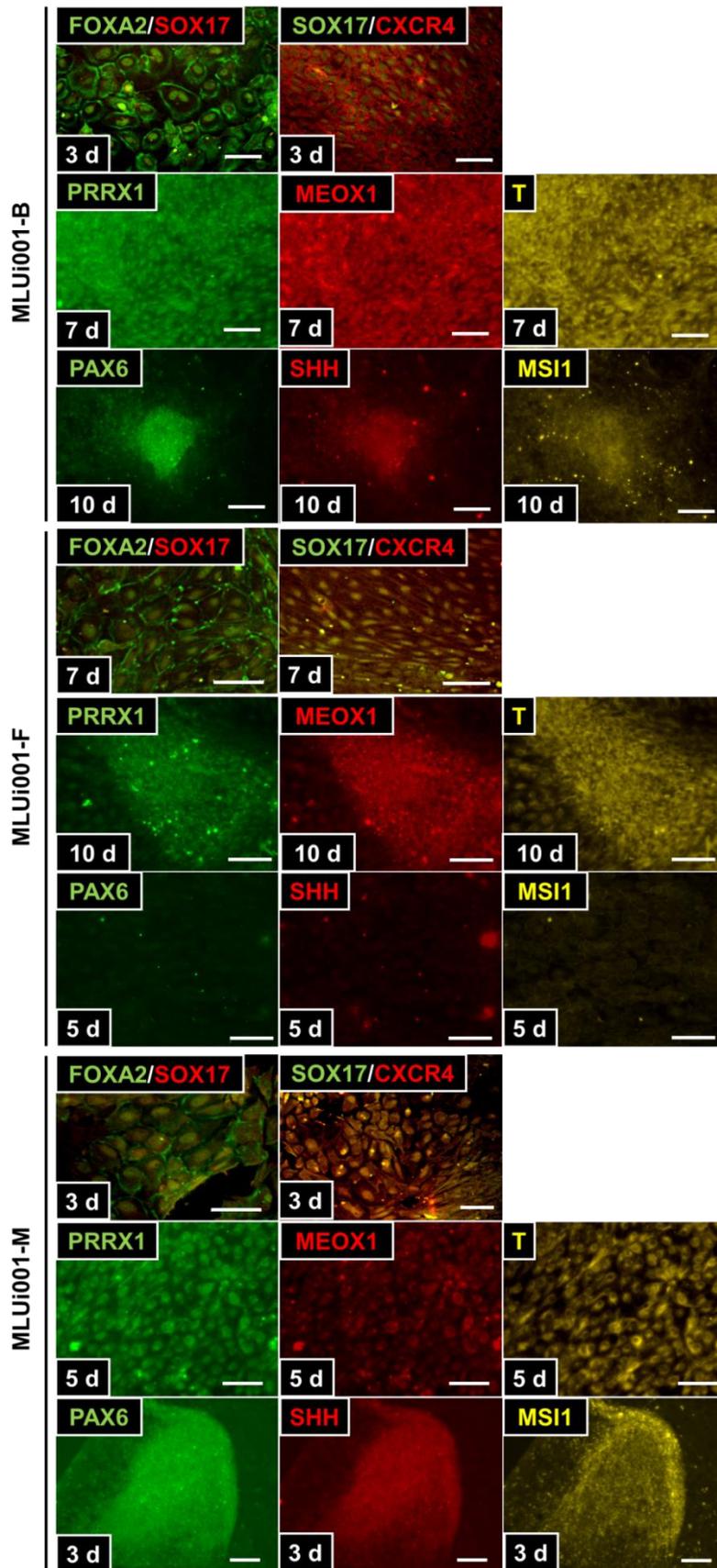


Anlage 8: Immunfluoreszenz-Analyse der iPS-Zelllinien hinsichtlich Pluripotenz-assoziiierter Marker.

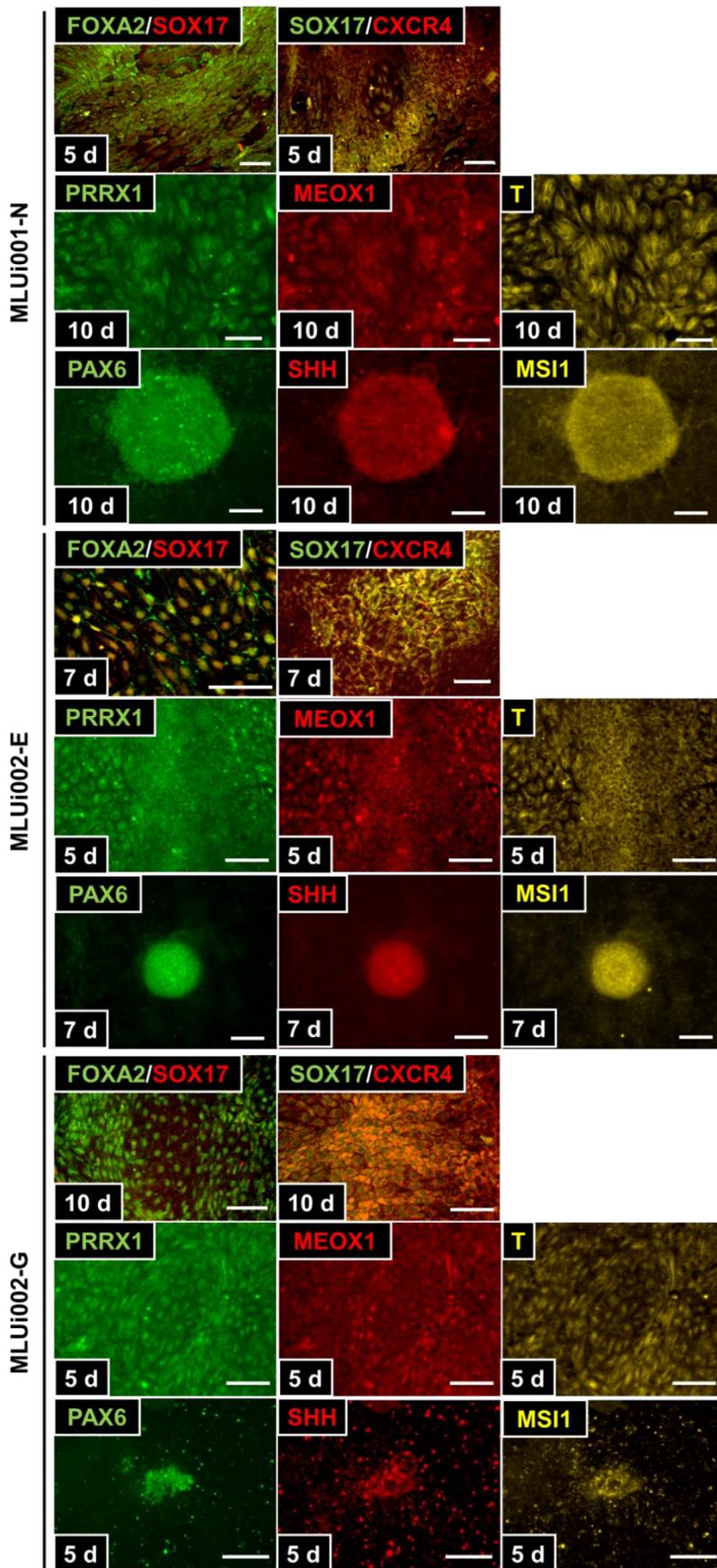
Maßstäbe entsprechen 100 µm.



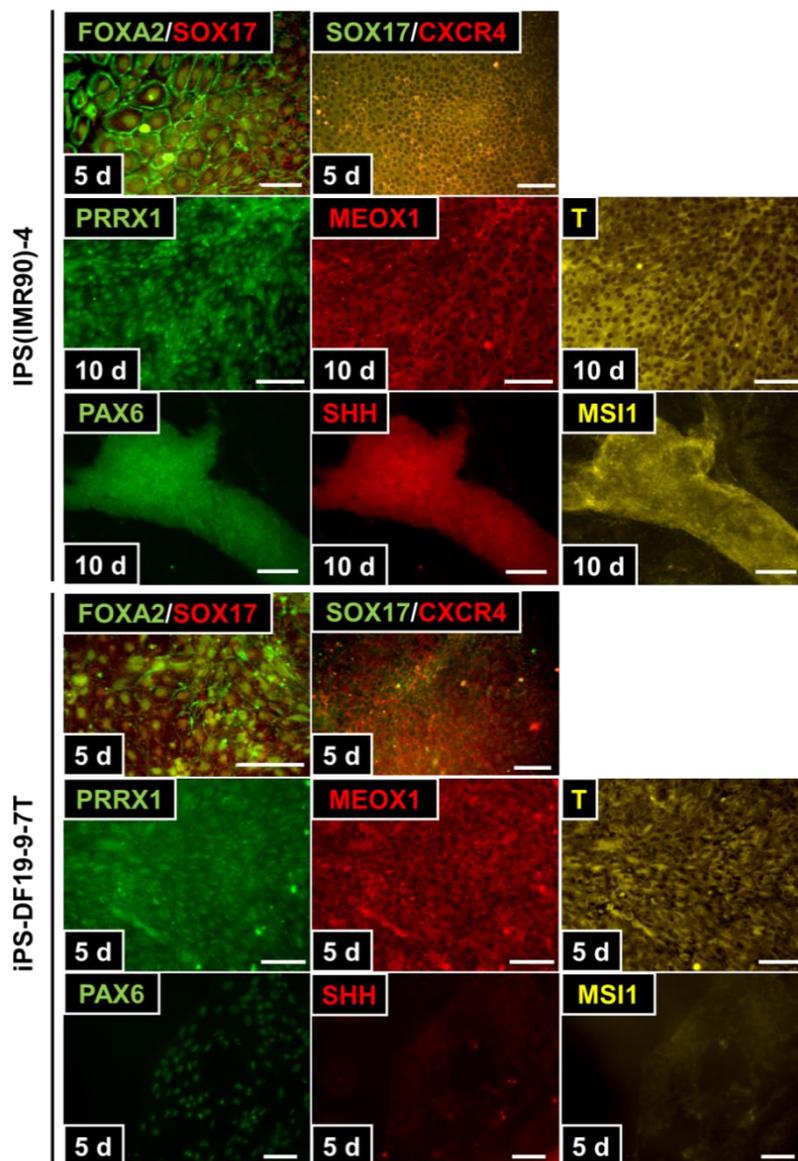
Fortsetzung Anlage 8: Immunfluoreszenz-Analyse der iPS-Zelllinien hinsichtlich Pluripotenz-assoziiierter Marker.



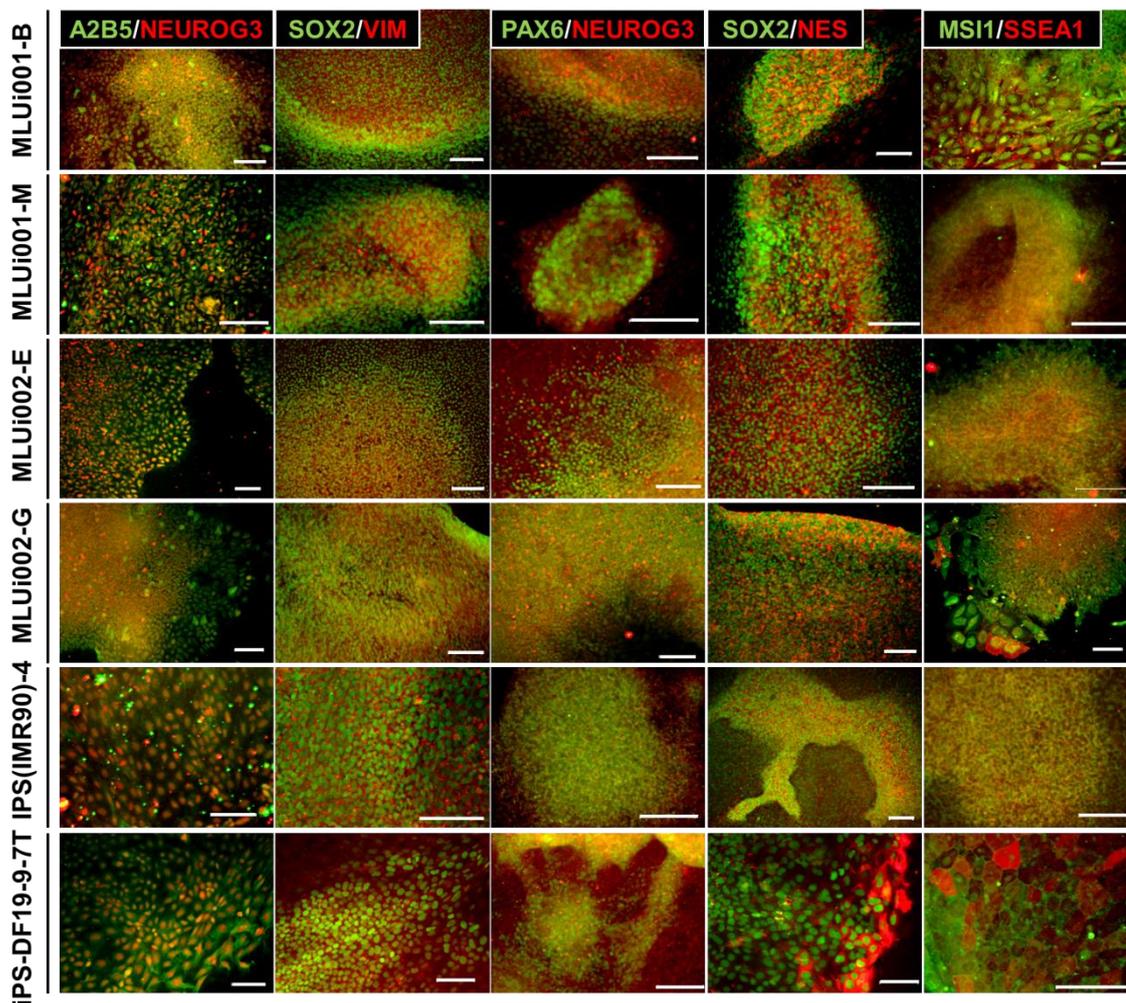
Anlage 9: Immunfluoreszenz-Analyse während der spontanen Differenzierung. Maßstäbe entsprechen 100 μm.



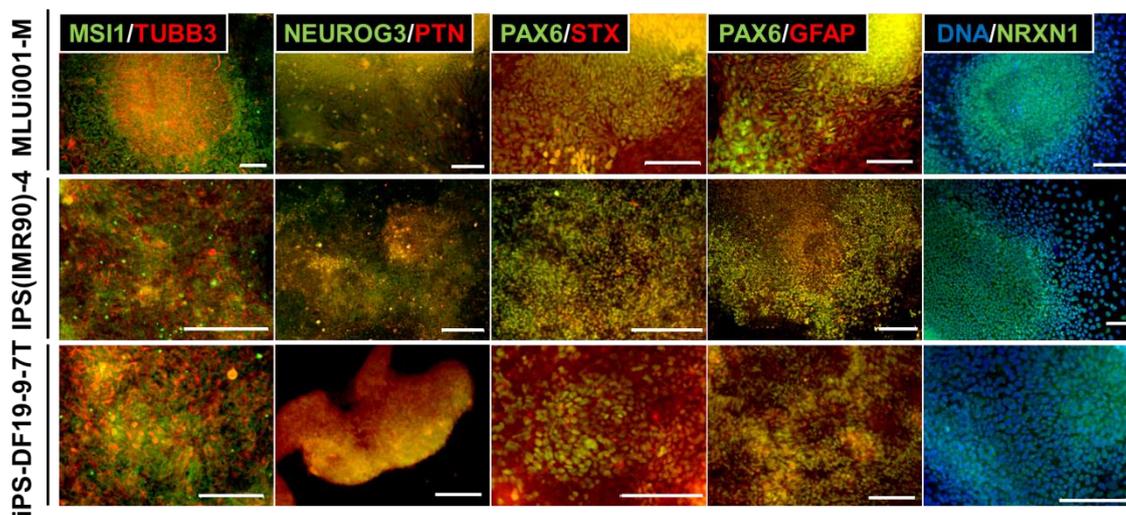
Fortsetzung Anlage 9: Immunfluoreszenz-Analyse während der spontanen Differenzierung.



Fortsetzung Anlage 9: Immunfluoreszenz-Analyse während der spontanen Differenzierung.



Anlage 10: Immunfluoreszenz-Analyse NSC-assoziiierter Marker.
MLUi001-N und -O nicht gezeigt. Maßstäbe entsprechen 100 µm.



Anlage 11: Immunfluoreszenz-Analyse NPC-assoziiierter Marker.
Maßstäbe entsprechen 100 µm.

Selbstständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit direkt oder indirekt verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Die Regeln guter wissenschaftlicher Praxis und die allgemeinen Datenschutzbestimmungen wurden eingehalten.

Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar eine Vergütung oder geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen.

Die vorgelegte Arbeit wurde weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt.

Halle (Saale), den 14.05.2020

Ort, Datum



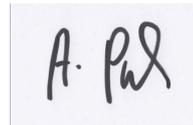
Unterschrift

Erklärung über frühere Promotionsversuche

Hiermit erkläre ich, dass ich bisher keine Promotionsversuche unternommen habe. Weder diese noch eine andere Dissertationsschrift wurde von mir an anderen Institutionen bzw. an einer anderen medizinischen Fakultät zu Promotionszwecken eingereicht.

Halle (Saale), den 14.05.2020

Ort, Datum



Unterschrift

Lebenslauf

Persönliche Angaben

Geboren: am 05.04.1991 in Berlin
 Staatsangehörigkeit: Deutsch

Beruflicher Werdegang

Seit 02/2020 Facharztausbildung an der Universitätsklinik für Anästhesie und Intensivmedizin, Landeskrankenhaus Innsbruck
 05/2019 – 01/2020 Basisarztausbildung an der Universitätsklinik für Anästhesie und Intensivmedizin, Landeskrankenhaus Innsbruck

Universitärer Werdegang

2011 - 2018 Studium der Humanmedizin an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
 11/2018 Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (Note 2,0)
 11/2017 - 10/2018 Praktisches Jahr mit den Abschnitten Anästhesiologie und Operative Intensivmedizin am Universitätsklinikum Halle (Saale), Innere Medizin am Universitätsklinikum Örebro und Chirurgie am Universitätsklinikum Innsbruck
 10/2017 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (Note 2,0)
 10/2016 - 07/2017 Urlaubssemester aufgrund der Promotion
 2014 - 2016 Famulaturen in den Bereichen Rettungsstelle, Anästhesiologie und Intensivmedizin, Herzchirurgie, Innere Medizin
 09/2013 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (Note 2,0)

Promotion

Thema Neuronale Differenzierung von patientenspezifischen, induzierten pluripotenten Stammzellen mit Neurexin 1-Kopienzahlvariationen zur Erforschung der Schizophrenie
 Betreuer Prof. Dr. med. Dan Rujescu
 Präsentationen Posterpräsentation im Rahmen der 11. Mitteldeutschen Psychiatrietage in Halle (Saale) vom 27. - 28.10.2017,
 Posterpräsentation im Rahmen der *5th Annual Conference of the German Stem Cell Network* in Jena vom 11. - 13.09.2017,
 Posterpräsentation im Rahmen des Forschungstages Universitätsmedizin in Halle (Saale) am 11.11.2016

Praktika

09/2010 - 08/2011 Freiwilliges Soziales Jahr (Charité Berlin, HNO-Station)

Schulischer Werdegang

06/2010 Abitur, Philipp-Melanchthon-Gymnasium, Berlin

Danksagung

An erster Stelle gilt mein Dank meinem Doktorvater Prof. Dr. med. Dan Rujescu für die Möglichkeit an der Klinik für Psychiatrie, Psychotherapie und Psychosomatik des Universitätsklinikums Halle (Saale) promovieren zu dürfen.

Dr. Matthias Jung möchte ich für seine wissenschaftliche und methodische Unterstützung, sowie die zahlreichen fachlichen Gespräche, Anmerkungen und Ratschläge während der gesamten Bearbeitungsphase der Dissertation herzlich danken.

Ein besonderer Dank gilt zudem Dr. Albrecht Klemenz für seine Hilfsbereitschaft bei der Planung und Durchführung der elektrophysiologischen Versuche, sowie seine fachlichen Anregungen auf diesem Gebiet.

Bernadette Harwardt möchte ich für ihre stetige Unterstützung bei der Arbeit im Labor, ihre guten Ratschläge und die vielen motivierenden Gespräche, auch fernab der Wissenschaft, herzlich danken.

Weiterhin möchte ich Carla Hartmann für ihr offenes Ohr, die fachlichen Diskussionen und Anmerkungen danken, welche zum Abschluss der Promotion beigetragen haben. Meiner gesamten Arbeitsgruppe gilt mein Dank für die konstruktive Zusammenarbeit und die angenehme Atmosphäre.

Ich danke Prof. Dr. Heike Kielstein für die Möglichkeit die Räumlichkeiten des Instituts für Anatomie und Zellbiologie der Medizinischen Fakultät nutzen zu dürfen. Weiterhin möchte ich mich bei allen Mitarbeitern des Instituts, insbesondere Christine Fröhlich, für die nette Zusammenarbeit und Hilfsbereitschaft bedanken.

Zuletzt möchte ich meiner Familie und meinen Freunden für die liebevolle und vielseitige Unterstützung während des Studiums und der Promotionszeit danken.