

**Medizinische Fakultät der
Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg**

**Analyse Patienten-spezifischer Stammzellen und deren Differenzierung in
verschiedene neuronale Subtypen zur Analyse von DNA-Variationen in
Neurexin 1**

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Medizin (Dr. med.)

von Annika Liisa Majer

geboren am 27.02.1994 in Bergisch Gladbach

Betreuer: Prof. Dr. med. D. Rujescu

Gutachter*innen:

- Frau apl. Prof. A. Harder
- PD M. Peitz, Bonn
- Prof. T. Cantz, Hannover

12.07.2021

21.03.2022

Referat

Die funktionelle Analyse von DNA-Variationen steht im Fokus der aktuellen Forschung zur Pathogenese psychiatrischer Erkrankungen. In diesem Zusammenhang stützen sich weitere Thesen auf eine Störung innerhalb zerebraler Transmittersysteme. Auch quantitative und qualitative Veränderungen einzelner zerebraler Zelltypen werden diskutiert.

Die Entdeckung von hiPSCs im Jahr 2006 bedeutete einen immensen Zugewinn für die Wissenschaft. Sie ermöglichte die nicht-invasive Erforschung von patientInnen-spezifischem Material. So lassen sich Auswirkungen struktureller genetischer Varianten *in vitro* abbilden und untersuchen.

In dieser Arbeit werden mithilfe eines *in vitro*-Modells die Neurone von SCZ-Patienten im Vergleich zu Gesunden analysiert.

Die Patienten weisen eine Mutation im Gen NRXN1 auf, welches für das präsynaptische Adhäsionsmolekül Neurexin 1 kodiert.

Als Ausgangsmaterial für die Herstellung von Neuronen wurden iPS-Zellen verwendet. Diese Zellen wurden über die Entwicklungsstufe der neuralen Stammzellen in eine neuronale Zellkultur differenziert. Die Zellen wurden mittels molekularbiologischer Methoden untersucht. Die neuronale Differenzierung wurde durch den Nachweis verschiedener Markergene von Neuronen charakterisiert (TUBB3, SYT1, NLGN1, VAMP2). Das Vorhandensein glialer Zellen sowie neuronaler Subtypen wurde durch die Expressionsanalyse spezifischer Marker (CD68, GFAP, OLIG2, SLC17A7, GRIA1) gezeigt und anschließend via Durchflusszytometrie quantifiziert.

Alle Zelllinien wurden erfolgreich zu neuronalen Kulturen differenziert. Alle Kulturen enthielten Gliazellen sowie glutamaterge und GABAerge Neurone.

Um eine Verbindung zur klinischen Symptomatik herzustellen, wurde diese in Abhängigkeit der Ausprägung und Lokalisation der NRXN1-Mutation analysiert. Hierbei wiesen Patienten mit einer größeren Gendeletion eine schwerere Ausprägung der klinischen Symptome auf.

Das verwendete *in vitro*-Modell bildet durch die Abbildung vielfältiger zerebraler Zellstrukturen und unmittelbarer Interaktionspartner von Neurexin 1 eine wichtige Grundlage zur Untersuchung von DNA-Variationen in NRXN1 sowie weiterer Faktoren, die im Zusammenhang mit der Pathogenese der SCZ diskutiert werden.

Majer, Annika Liisa: Analyse Patienten-spezifischer Stammzellen und deren Differenzierung in verschiedene neuronale Subtypen zur Analyse von DNA-Variationen in Neurexin 1. Halle (Saale), Univ., Med. Fak., Diss., 80 S., 2021

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis
Abbildungsverzeichnis
Tabellenverzeichnis
Abkürzungsverzeichnis
1 Einleitung	1
1.1 Schizophrenie	1
1.1.1 Klinische Symptomatik der SCZ	1
1.1.2 Ätiopathogenese	2
1.1.3 Therapiekonzepte	4
1.1.4 Prognostik	4
1.2 Neurexine	5
1.2.1 Neurexin auf Transkriptebene	5
1.2.2 Funktionen und Interaktionspartner von Neurexin	5
1.2.3 Veränderungen in NRXN1 im Zusammenhang mit psychiatrischen Erkrankungen	..	6
1.3 Pluripotente Stammzellen und deren Anwendung	6
1.3.1 Die Entdeckung von iPS-Zellen	7
1.3.2 Nachweis der Pluripotenz	7
1.3.3 Wissenschaftliche Relevanz der iPS-Zellen	8
1.4 Differenzierung von iPS-Zellen in neuronale Subtypen und Gliazellen	9
1.4.1 Entstehung neuronaler Stammzellen	9
1.4.2 Neuronale Differenzierung	10
1.4.3 Gliazellen	11
2 Zielstellung	13
3 Material und Methodik	14
3.1 Zellkultur	14
3.1.1 Zellkulturmedien und Puffer	14
3.1.2 Beschichtungen	15
3.1.3 Zelllinien	16
3.1.4 Stammhaltung	17

3.1.5	Spontane Differenzierung.....	17
3.1.6	Neurale Differenzierung	17
3.1.7	Neuronale Differenzierung	17
3.2	Molekularbiologische Methoden	19
3.2.1	RNA-Isolation	19
3.2.2	Reverse Transkription der RNA (cDNA-Synthese)	19
3.2.3	Reverse-Transkriptase-PCR (RT-PCR)	20
3.2.4	Gelelektrophorese	20
3.2.5	Alkalische Phosphatase Färbung	21
3.2.6	Immunfluoreszenzfärbung	21
3.2.7	<i>Positive and negative syndrome scale (PANSS)</i>	22
3.2.8	Durchflusszytometrie	23
3.2.9	Diagramme	24
4	Ergebnisse	25
4.1	Analyse der iPS-Zelllinien	25
4.1.1	Morphologie	25
4.1.2	Alkalische Phosphatase	25
4.1.3	Transkriptanalyse von Pluripotenzmarkern in den iPS-Zellen	26
4.1.4	Analyse B-zellspezifischer Marker	26
4.1.5	Spontane Differenzierung der iPS-Zellen.....	27
4.2	Differenzierung patientenspezifischer iPS-Zellen zu kortikalen Neuronen	28
4.2.1	Morphologie	28
4.2.2	Transkriptanalyse der neuronalen Differenzierung	31
4.2.3	Expressionsanalyse mittels Immunfluoreszenz-Analyse.....	32
4.3	Charakterisierung der Neuronensubtypen und Gliazellen.....	33
4.3.1	Semiquantitative Transkriptanalyse.....	33
4.3.2	Expressionsanalyse mittels Immunfluoreszenz-Analyse.....	35
4.3.3	Durchflusszytometrische Analyse der Neurone und Gliazellen in terminal differenzierten Zellkulturen	36
4.4	Analyse der klinischen Symptomatik in Abhängigkeit zur Lokalisation der CNV in NRXN1.....	39
5	Diskussion	43
5.1	Pluripotenzmarker	43
5.2	B-Zellmarker.....	44

5.2.1	Nicht-exprimierte B-Zellmarker	44
5.3	Spontane Differenzierung der iPS-Zellen	45
5.3.1	Expression entodermaler Marker	45
5.3.2	Expression mesodermaler Marker	45
5.3.3	Expression ektodermaler Marker	46
5.4	Terminale Differenzierung.....	47
5.4.1	Generierung von NSC.....	47
5.4.2	Generierung von Neuronen.....	48
5.4.3	Transkript- und Proteinanalyse zum Nachweis von Neuronen	49
5.5	Analyse der Gliazellen.....	50
5.5.1	Oligodendrozyten	50
5.6	Differenzierungsprotokoll	51
5.7	Durchflusszytometrische Analyse.....	52
5.7.1	TH-Population	53
5.7.2	Astrozytenpopulation	54
5.7.3	Mikrogliapopulation	56
5.8	Epigenetische und funktionale Unterschiede bei aus demselben Individuum gewonnenen Stammzelllinien	57
5.9	Genotyp und Phänotyp von NRXN1.....	59
6	Zusammenfassung	61
	Literaturverzeichnis.....	62
	Thesen.....	77
	Anlagen	78
	Selbstständigkeitserklärung.....	
	Erklärung über frühere Promotionsversuche	
	Danksagung	

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung des <i>Two Hit</i> -Modells der SCZ.....	2
Abbildung 2: Gewinnung und Anwendung von iPS-Zellen	9
Abbildung 3: Versuchsablauf der neuronalen Differenzierung	18
Abbildung 4: Morphologie von iPS-Zellen	25
Abbildung 5: Alkalische Phosphatase in iPS-Zelllinien.....	25
Abbildung 6: Transkriptanalyse von Pluripotenzmarkern in iPS-Zelllinien.....	26
Abbildung 7: Transkriptanalyse spezifischer B-Zellmarker in iPS-Zelllinien im Vergleich zur B-lymphoblastoiden Zelllinie LCL-Ho (+)	27
Abbildung 8: Transkriptanalyse von Markern der Keimblattderivate	28
Abbildung 9: Morphologie der NSC an Tag 7.....	29
Abbildung 10: Morphologie der terminal differenzierten Zellen an 68 d (A-E) und 71 d (F) der Differenzierung.....	30
Abbildung 11: Morphologische Unterschiede innerhalb terminal differenzierter Mischkulturen aus Neuronen und Gliazellen	31
Abbildung 12: Transkriptanalyse der Zellen an 70 d der neuronalen Differenzierung	32
Abbildung 13: Immunfluoreszenz-Analyse der terminal differenzierten Zellen	33
Abbildung 14: Transkriptanalyse der Marker neuronaler Subtypen in terminal differenzierten Zelllinien	34
Abbildung 15: Transkriptanalyse glialer Marker.....	34
Abbildung 16: Immunhistochemische Analyse der Expression des Glutamaterezeptors GRIA1	35
Abbildung 17: Immunhistochemische Analyse der Expression des GABA-Rezeptors beta1.....	36
Abbildung 18: Quantitative Bestimmung von SLC17A7 und TH in differenzierten Zellkulturen mittels Durchflusszytometrie	37
Abbildung 19: Durchflusszytometrische Analyse des Astrozytenmarker EAAT1 in schizophre niespezifischen Zelllinien und Referenzzelllinie.....	37
Abbildung 20: Quantitative Bestimmung von Gliazellmarkern bei den differenzierten Zellen mittels Durchflusszytometrie	38
Abbildung 21: Darstellung mit 7-AAD markierter apoptotischer Zellen	39
Abbildung 22: Darstellung der PANSS inklusive Subskalen zum Zeitpunkt der Datenerhebung (A) sowie während bis dato schwerster Episode (B) bei den SCZ-Patienten 1-3	40
Abbildung 23: Darstellung der PANSS-Werte in schwerster Krankheitsphase (S, schwarz) und zum Zeitpunkt der Erhebung (E, grau)	41
Abbildung 24: Darstellung der Positiv- (A) und Negativskala (B) im Einzelnen	42

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verwendete Zellkulturmedien und Zusätze	14
Tabelle 2: Verwendete Beschichtungen in der Zellkultur.....	15
Tabelle 3: verwendete humane iPS-Zelllinien	16
Tabelle 4: Reaktionsansatz der reversen Transkription der Gesamt-RNA.....	19
Tabelle 5: RT-PCR Reaktionsansatz	20
Tabelle 6: Programm für RT-PCR.....	20
Tabelle 7: primäre Antikörper für Immunfluoreszenzfärbung	21
Tabelle 8 : sekundäre Antikörper für Immunfluoreszenzfärbung	22
Tabelle 9: primäre, sekundäre und konjugierte Antikörper für Durchflusszytometrie	24
Tabelle 10: Angaben zu CNV und Klinik der SCZ-Patienten	39
Tabelle 11: Verwendete Oligonukleotidpaare.....	78

Abkürzungsverzeichnis

APC	Allophycocyanin
B-LCL	<i>b-lymphoblastoid cell line</i>
BDNF	<i>brain-derived neurotrophic factor</i>
BME	β -Mercaptoethanol
BMP	<i>bone morphogenic protein</i>
BTLA	<i>B- and T-lymphocyte attenuator</i>
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
CD68 / CD11b / CD45	<i>cluster of differentiation 68/11b/45</i>
cDNA	<i>complementary DNA</i>
CGI-SCH	<i>clinical global impression - Schizophrenia</i>
CNTF	<i>ciliary neurotrophic factor</i>
CNV	<i>copy number variation</i>
CRISPR / Cas9	<i>clustered regularly interspaced short palindromic repeats / Caspase 9</i>
CXCR4	C-X-C motif chemokine receptor 4
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle's medium</i>
DMR	<i>differentially methylated regions</i>
DMS	<i>differentially methylated sites</i>
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i>
DNase	Desoxyribonuklease
dNTPs	Desoxyribonukleosidtriphosphat
EAAT1	<i>excitatory amino acid transporter 1</i>
EB	<i>embryoid body</i>
EBV	Epstein-Barr-Virus
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	<i>epidermal growth factor</i>
ES	embryonale Stammzellen
<i>et al.</i>	et alius
FBS	<i>fetal bovine serum</i>
FcRLA	<i>Fc receptor like A</i>
FOXA2	<i>forkhead box A2</i>

G	Globalskala
GABA	<i>gamma-aminobutyric acid</i>
GABRB1	GABA type A receptor subunit beta 1
GAD1/2	<i>glutamate decarboxylase 1/2</i>
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat Dehydrogenase
GDNF	<i>glial cell-derived neurotrophic factor</i>
GFAP	<i>glial fibrillary acidic protein</i>
GLAST	<i>glutamate aspartate transporter</i>
GPR183	G protein-coupled receptor 183
GRIA1/2	<i>glutamate ionotropic receptor AMPA Type Subunit 1</i>
GRIN2A	<i>glutamate ionotropic receptor subunit 2A</i>
GWAS	genomweite Assoziationsstudie
IBA1	<i>ionized calcium-binding adapter molecule</i>
iPS-Zellen	induziert pluripotente Stammzellen
KF4	<i>kruppel-like factor 4</i>
LIF	<i>leukemia inhibitory factor</i>
LNS	<i>laminin-neurexin-sex hormone binding globulin</i>
MAG	<i>myelin associated glycoprotein</i>
MOX1	<i>mesenchyme homeobox 1</i>
MSI1	<i>musashi 1</i>
N	Negativskala
NEAA	<i>non essential amino acids</i>
Ngn2	<i>neurogenin 2</i>
NIM	<i>neural induction medium</i>
NLGN1	<i>neuroligin 1</i>
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
NSC	neurale Stammzellen (<i>neural stem cells</i>)
NRXN1/2/3	<i>neurexin 1/2/3</i>
OCT4	<i>octamer binding transcription factor 4</i>
OLIG2	<i>oligodendrocyte transcription factor 2</i>
OPC	<i>oligodendrocyte progenitor cell</i>

P	Positivskala
PANSS	<i>positive and negative syndrome scale</i>
PAX6	<i>paired box protein 6</i>
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PFC	<i>prefrontal cortex</i>
PNS	Peripheres Nervensystem
PRRX1	<i>paired related homeobox 1</i>
RA	<i>retinoic acid</i>
RNA	<i>ribonucleic acid</i>
RT-PCR	Reverse-Transkriptase-PCR
SCNT	<i>somatic cell nuclear transfer</i>
SCZ	Schizophrenie
SHH	<i>sonic hedgehog</i>
SLC	<i>solute carrier family</i>
SNARE	<i>soluble N-ethylmaleimide-sensitive-factor attachment receptor</i>
SNP	<i>single nucleotide polymorphism</i>
SOX2	<i>SRY box-containing gene 2</i>
SOX17	<i>SRY box-containing gene 17</i>
STX2	<i>syntaxin 2</i>
SYT1	<i>synaptotagmin 1</i>
TBXT	<i>T box transcription factor T</i>
TGF	<i>transforming growth factor</i>
TH	tyrosine hydroxylase
TMEM119	<i>transmembrane Protein 119</i>
TUBB3	<i>tubulin β-3 class III</i>
VAMP2	<i>vesicle-associated membrane protein 2</i>
UK	<i>United Kingdom</i>
USA	<i>United States of America</i>
VGLUT1	Vesikulärer G lutamatttransporter1
WNT	<i>wingless-type MMTV integration site family</i>
ZNS	Zentrales Nervensystem

Einheiten

SI Einheiten werden nicht zusätzlich aufgeführt.

bp	Basenpaare
°C	Grad Celsius
d	Tag (<i>day</i>)
h	Stunde (<i>hour</i>)
kb	Kilobasen
min	Minute
N	Newton
% (v/v)	Volumenprozent
% (w/v)	Gewichtsprozent

1 Einleitung

Schizophrenie (SCZ) ist ein komplexes psychiatrisches Krankheitsbild, das mit seiner Prävalenz 0,5-1 % der Weltbevölkerung betrifft.

Aufgrund einer vielschichtigen Pathogenese sind die zugrundeliegenden Ursachen der Erkrankung trotz intensiver Forschung bisher nicht abschließend geklärt. Es bedarf reproduzierbarer Forschungsmodelle, die es möglich machen, vermutete Pathomechanismen *in vitro* zu untersuchen.

Zahlreiche Studien belegen einen Zusammenhang zwischen psychiatrischen Erkrankungen und DNA-Variationen.

Generell wird vermutet, dass einer Vielzahl dieser Erkrankungen strukturelle und funktionelle Veränderungen innerhalb zerebraler Prozesse zugrunde liegen. Unter anderem steht die Veränderung neuraler Prozesse in kortikalen Neuronen im Fokus der Forschung.

Da sich die Gewinnung patientInnenspezifischer Proben zu Forschungszwecken sehr invasiv und aufwendig gestalten würde, wäre es sinnvoll, ein reproduzierbares *in vitro* Modell zu verwenden, in welchem gezielt die Auswirkungen genetischer Variationen auf neurale Prozesse untersucht werden können.

Die in dieser Arbeit verwendeten humanen induziert pluripotenten Stammzellen (iPS-Zellen) von SCZ-Patienten und die Differenzierung dieser in kortikale Neurone eröffnen genau diese Möglichkeit. Auf diese Weise können die funktionellen Auswirkungen genetischer Varianten untersucht werden. Dies kann hoffentlich in Zukunft dazu beitragen, den Pathomechanismus der SCZ tiefgehender zu verstehen und somit neue und individuelle Therapiekonzepte zu entwickeln.

1.1 Schizophrenie

SCZ, als komplexes psychiatrisches Störungsbild, löst mit einer Reihe schwerwiegender Symptome einen hohen Leidensdruck aus und verkürzt die Lebenserwartung von Betroffenen um bis zu 14,6 Jahre (Jablensky 2000; Chang et al. 2011). Die Krankheit manifestiert sich meist in der dritten Lebensdekade, wobei das Ersterkrankungsalter bei Männern mit 21 Jahren etwas niedriger liegt als bei Frauen (26 Jahre) (Saha *et al.* 2005).

1.1.1 Klinische Symptomatik der SCZ

Grundlegend wird hinsichtlich der klinischen Präsentation Positiv- und Negativsymptomatik unterschieden. Mit der Positivsymptomatik wird ein Zustand definiert, der über die normalen

kognitiven Funktionen hinausgeht. Hierzu zählen Symptome wie Ich-Störungen, Wahnvorstellungen und Halluzinationen.

Bei der Negativsymptomatik, auch Minussymptomatik genannt, sind bestimmte Eigenschaften im Gegensatz zum Gesunden vermindert ausgeprägt. In diesem Zusammenhang wird häufig von den 6 A gesprochen. Diese beinhalten Affektverflachung, Apathie, Anhedonie, Alogie sowie Asozialität und Aufmerksamkeitsstörungen. Die Negativsymptomatik ist von zentraler Bedeutung, da sie bisher nur eingeschränkt medikamentös therapierbar ist und somit in stärkerem Ausmaß zur Funktionseinschränkung der Erkrankten beiträgt.

Die Erkrankung ist gekennzeichnet durch verschiedene Verlaufstypen. Am häufigsten zeigt sich bei PatientInnen ein chronischer Verlauf. Dieser ist durch das Auftreten mehrerer Schübe gekennzeichnet, wobei ein gewisser Anteil der Symptomatik zwischen den Schüben persistieren kann (sogenannte Residualsymptomatik).

im Laufe der Zeit wurde diese dichotome zweidimensionale Einteilung durch die Annahme mehrerer Krankheitsdimensionen ergänzt.

1.1.2 Ätiopathogenese

In der Ätiopathogenese der Erkrankung spielt das *Two-Hit*-Modell eine wesentliche Rolle. Dabei wird angenommen, dass ein frühzeitiger *First Hit* auftritt, beispielsweise in Form von Komplikationen während der Geburt oder durch das Auftreten einer pränatalen Infektion. Aus diesem resultiert eine neuronale Entwicklungsstörung, welche sich in einer veränderten funktionellen Konnektivität äußert. Zum Ausbruch der SCZ kommt es nach dem Einwirken eines *Second Hit*. Dies können kritische Lebensereignisse oder Stoffwechseleränderungen und -störungen im jungen Erwachsenenalter sein.

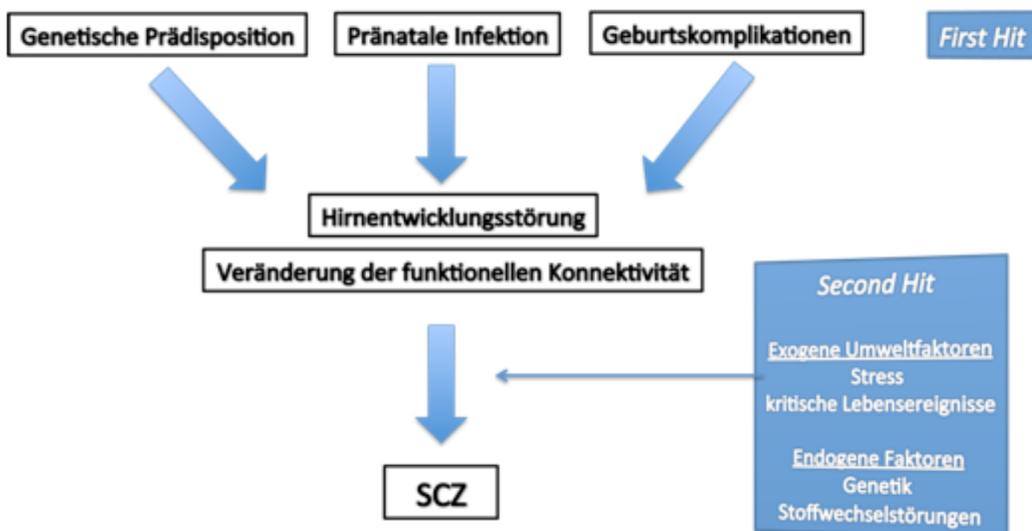


Abbildung 1: Schematische Darstellung des *Two Hit*-Modells der SCZ

Prä oder perinatale Ereignisse bedeuten einen *First Hit*, der zu Beeinträchtigungen in der frühkindlichen Entwicklung führt. Durch später eintretende endogene und exogene Faktoren in Form eines *Second Hits*, kann es zum Erkrankungsausbruch kommen.

Eine zentrale Komponente der SCZ-Pathogenese ist die genetische Prädisposition. Für Personen, deren Angehörige an SCZ leiden, ist das eigene Risiko zu erkranken erhöht. Es wird davon ausgegangen, dass der Einfluss genetischer Faktoren auf die Ätiologie der SCZ bei etwa 80% liegt (Hilker *et al.* 2018). In einer Zusammenfassung mehrerer Studien ergab sich zudem bei eineiigen Zwillingen eine durchschnittliche Konkordanzrate von 46% (Tsuang 2000). In den letzten Jahren wurde in verschiedenen genomweiten Assoziationsstudien (GWAS) Intelligenz als protektiver Faktor bei Menschen mit genetischer Prädisposition identifiziert (Kendler *et al.* 2014; Savage *et al.* 2018).

Genetische Komponenten sind strukturelle DNA-Variationen. Sogenannte *copy number variations* (CNV) und *single nucleotide polymorphisms* (SNP) können zu Mikrodeletionen oder auch -duplikationen innerhalb eines Genabschnitts führen. In groß angelegten GWAS konnten einige dieser Variationen mit SCZ assoziiert werden (Ripke *et al.* 2014). In einer Studie mit 7.907 SCZ PatientInnen und 10.585 Referenzen zeigten Kirov *et al.* eine Häufung von *de novo* CNV in den SCZ PatientInnen (Kirov *et al.* 2012). Marshall *et al.* wiesen in einer GWAS mit 41.321 Probanden nach, dass die CNV-Last für Gene, die mit synaptischen Funktionen verknüpft sind, bei SCZ erhöht ist (Marshall *et al.* 2017).

In der Ätiopathogenese der SCZ wird die Beteiligung verschiedenster Transmittersysteme sowie neuraler Subtypen vermutet. Im Forschungsfokus stehen Veränderungen in der dopaminergen und glutamatergen Neurotransmission.

Seit den 1960er Jahren wird die Rolle von Dopamin in Form der Dopaminhypothese der SCZ diskutiert. Die Entdeckung, dass der Effekt von Antipsychotika direkt mit ihrer Affinität zu Dopaminrezeptoren zusammenhängt und eine Blockade dieser Rezeptoren zu einer Besserung von psychotischen Symptomen führt, führte zu der Annahme, dass bei SCZ eine Überaktivität des dopaminergen Systems vorherrscht (Seeman and Lee 1975; Campden-Main and Wegielski 1955). Im Verlauf wurde die Hypothese durch die Vermutung erweitert, dass ein Defizit der Dopamintransmission im präfrontalen Kortex zur Negativsymptomatik und den kognitiven Symptomen bei SCZ beiträgt (Davis *et al.* 1991; Slifstein *et al.* 2015). Weiterhin wurde hypothetisiert, dass sich als Konsequenz daraus ein Dopaminüberschuss im Striatum entwickelt, welcher zur Positivsymptomatik beiträgt (Howes and Kapur 2009; McCutcheon *et al.* 2019)

Die Glutamathypothese der SCZ beruht auf einer Entdeckung, die im Zusammenhang mit der Wirkweise von Medikamenten gemacht wurde. Dazu zählt die Entdeckung, dass Ketamin,

welches als Antagonist am NMDA-Rezeptor wirkt und als dissoziatives Anästhetikum verwendet wird, in der Lage ist in gesunden Individuen schizophrenieähnliche Symptome auszulösen (Krystal *et al.* 1994). Ein hohes Evidenzniveau existiert für die Hypothese, dass bei SCZ eine NMDA-Rezeptor Dysfunktion vorliegt, welche Einfluss auf die Glutamat-Transmission im menschlichen Kortex hat. Auch auf genetischer Ebene wird die Beteiligung von Glutamat durch die Entdeckung von Ripke *et al.* gestützt, die eine Assoziation zwischen SCZ und DNA-Variationen im Gen GRIN2A zeigen konnten (Ripke *et al.* 2014).

1.1.3 Therapiekonzepte

Das Therapiekonzept der SCZ ist multimodal aufgebaut. In der akuten psychotischen Krankheitsphase können Antipsychotika verwendet werden. Durch ihre Blockade von Dopamin-Rezeptoren wird die Signalübertragung im synaptischen Spalt vermindert. Die klassischen Antipsychotika weisen jedoch eine Reihe schwerwiegender extrapyramidalen Nebenwirkungen auf. Im Vergleich dazu ist bei atypischen Antipsychotika wie Clozapin diese unerwünschte Wirkung weniger ausgeprägt, es kann jedoch zu anderen Effekten wie Blutbildveränderungen kommen.

Die Anwendung von Psychotherapie spielt in der Akutbehandlung eine eher untergeordnete Rolle, kann aber insgesamt zur Reduktion der Symptome und zu einer Verbesserung der kognitiven Leistung führen.

1.1.4 Prognostik

Die Prognose der Erkrankung hängt von verschiedenen Faktoren ab. Ein später und akuter Erkrankungsbeginn, das weibliche Geschlecht und ein gesichertes soziales Umfeld sind Prädiktoren, die mit einem günstigeren Verlauf einhergehen können.

Ein schleichender Beginn, eine lange Latenzzeit bis zum Behandlungsbeginn und vorherrschende Negativsymptomatik sind Prädiktoren für einen ungünstigen Verlauf.

Um die vielfältigen Krankheitsdimensionen der SCZ und deren individuelle Ausprägung standardisiert zu messen, wurden im Laufe der Jahrzehnte zahlreiche Messinstrumente entwickelt. Eine der Schwierigkeiten bestand darin, nicht nur die Präsenz sondern auch die Schwere der einzelnen Symptomdomänen gleichwertig und valide zu erfassen und eine Methode zu finden, die Behandlungseffekte effizient abbildet. Um diese Problematik zu beheben, entwickelten Kay *et al.* in den 80er Jahren das diagnostische Instrument *positive and negative syndrome scale* (PANSS), das bis heute im klinischen Alltag eine großflächige Anwendung findet (Kay, Fiszbein, and Opler 1987). Hierbei werden in 30-40 min neben der gezielten Abfrage von 30 Testelementen auch allgemeine anamnestische Angaben wie

beispielsweise die detaillierte Krankengeschichte der PatientInnen abgefragt. Jeweils 7 abgefragte Elemente dienen der Erfassung der Positiv- und Negativsymptomatik, weitere 16 zur Erfassung der allgemeinen Psychopathologie. Die Elemente werden dabei von den PatientInnen auf einer Skala von 1 (nicht vorhanden) bis 7 (extrem vorhanden) beurteilt. Aus darauffolgenden diversen faktorenanalytischen Studien ergab sich die Annahme einer mehrdimensionalen Einteilung der Symptomatik. Der größte Konsens geht von 5 vorliegenden Faktoren aus. Diese umfassen Positiv-, Negativ-, Desorganisiert-, Depressionssyndrom und Erregung.

Auch Bell und Lysaker (1994) fanden 5 Komponenten für die Bandbreite der Symptome, wenn auch teilweise mit abweichender Verteilung. Bestätigt wurde dieses 5-Komponentenmodell von Lindenmayer *et al.* (1994), Knorrung und Lindström (1995), Risperidone Study Group (1992), Wolthaus *et al.* (2000) und Maß *et al.* (2000c).

1.2 Neurexine

Neurexine sind präsynaptische Proteine, die eine zentrale Rolle in der Aufrechterhaltung der neuronalen Konnektivität innehaben. Sie gehören zu den Transmembranproteinen und finden sich vorrangig an der Zelloberfläche von Neuronen (Ushkaryov *et al.* 1992).

1.2.1 Neurexin auf Transkriptebene

Neurexine werden im menschlichen Organismus von den Genen *neurexin 1,2 und 3* (NRXN1, NRXN2, NRXN3) kodiert (Ushkaryov and Südhof 1993; Ullrich, Ushkaryov, and Südhof 1995). Die Gene für Neurexin 1 und 3 zählen dabei zu den größten bekannten Genen in Säugetieren und decken damit fast 0,1 % des menschlichen Genoms ab (Rowen *et al.* 2002). Grundlegend werden α - and β -Neurexine unterschieden: diese Isoformen entstehen durch unabhängige Promotoren auf NRXN 1-3 (Missler *et al.* 2012). Die α -Neurexine enthalten 6 *laminin-neurexin-sex hormone binding globulin* (LNS) Domänen und 3 *epidermal growth factor* (EGF)-like Domänen, sowie 5 Spleißstellen. Damit sind sie deutlich größer als die β -Neurexine, welche über eine LNS Domäne und 2 Spleißstellen verfügen. Durch alternatives Spleißen entstehen tausende Protein-Isoformen.

1.2.2 Funktionen und Interaktionspartner von Neurexin

Neurexine erfüllen eine Vielzahl von Funktionen innerhalb des Nervensystems. Unter anderem spielen sie eine wichtige Rolle in der Calcium-abhängigen Transmission an exzitatorischen und inhibitorischen Synapsen (Missler *et al.* 2003). Neurexine interagieren charakteristischerweise mit zahlreichen Interaktionspartnern, unter anderem mit den postsynaptischen Neuroliginen,

kodiert durch *neuroligin* (NLGN). Der transsynaptische Neurexin-Neuroligin-Komplex ist an exzitatorischen und inhibitorischen Synapsen lokalisiert, die in der synaptischen Spezifikation, der Reifung und der neuronalen Plastizität involviert sind. Des Weiteren spielt der Neurexin-Neuroligin-Komplex eine Rolle in der GABAergen und glutamatergen Synaptogenese (Graf *et al.* 2004). Eine Störung dieses Komplexes, beispielsweise durch Mutationen, kann folglich zu einer Imbalance in neuronalen Regelkreisen führen. Das dadurch verursachte Ungleichgewicht zwischen exzitatorischer und inhibitorischer Aktivität wird im Hinblick auf die Entstehung von Autismus-Spektrum-Störungen und SCZ als kritisch angesehen. Ein weiterer Interaktionspartner von Neurexin ist Synaptotagmin 1, das durch das Gen *synaptotagmin 1* (SYT1) kodiert wird (Hata *et al.* 1993). Dieses Calcium-bindende Membranprotein ist präsynaptisch lokalisiert und mit weiteren Proteinen an der Fusion von Vesikeln mit der präsynaptischen Membran und deren anschließender Exozytose beteiligt. Zu diesen weiteren Proteinen zählen Syntaxin 2 und Synaptobrevin 2, die Bestandteile des SNARE-Komplexes sind. Syntaxin 2 wird durch *syntaxin 2* (STX2), Synaptobrevin 2 durch *vesicle associated membrane protein 2* (VAMP2 alias *synaptobrevin 2*) codiert.

1.2.3 Veränderungen in NRXN1 im Zusammenhang mit psychiatrischen Erkrankungen

Strukturelle Variationen in NRXN1 auf Chromosom 2p16.3 wurden in Form von CNV zunächst mit Autismus und mentalen Entwicklungsstörungen in Verbindung gebracht (Kim *et al.* 2008; Marshall *et al.* 2008).

Etwa zur gleichen Zeit wurde erstmals auch eine Assoziation mit SCZ vermutet (Walsh *et al.* 2008; Kirov *et al.* 2008). In einer groß angelegten Studie mit 2.977 SCZ-PatientInnen und 33.746 Referenzen konnte belegt werden, dass PatientInnen eine signifikant höhere Anreicherung von CNV aufweisen, die zu Deletionen von Exons in NRXN1 führen (Rujescu *et al.* 2009). Die Vermutung, dass diese CNV zum SCZ-Risiko beitragen konnte durch weitere Studien und Metaanalysen gestützt werden (Kirov *et al.* 2009; Rees *et al.* 2014).

1.3 Pluripotente Stammzellen und deren Anwendung

Pluripotente Stammzellen sind durch ihre Fähigkeit zur Selbsterneuerung und ihre Differenzierung in jeden Zelltyp des Körpers charakterisiert. Das sich daraus ergebende Potential zur Erforschung komplexer Erkrankungen und zur Entwicklung neuer Therapiemöglichkeiten ist unumstritten. Lange Zeit war der Nutzen dieses Vorteils nur durch die Anwendung humaner embryonaler Stammzellen (ES) möglich. Der Arbeitsgruppe von James Thomson gelang 1998 als erstes die Gewinnung von humanen ES aus einem Präimplantationsembryo (Thomson *et al.* 1998). Die Extraktion geht jedoch zwangsläufig mit

der Zerstörung dieses Embryos einher. Das sich daraus ergebende ethische Dilemma mit der Frage, ab welchem Stadium menschliches Leben als dieses gilt und schützenswert ist, stellt noch immer eine große Limitation im Bereich der Forschung dar.

1.3.1 Die Entdeckung von iPS-Zellen

Daher war die von Takahashi und Yamanaka 2006 veröffentlichte Entdeckung von umso größerer Bedeutung. Ihnen gelang die Reprogrammierung von Mausfibroblasten zu pluripotenten Stammzellen (Takahashi and Yamanaka 2006). Aus 24 Kandidatengen identifizierten sie 4 Faktoren, die essenziell für die Pluripotenzinduktion in somatischen Zellen sind. Dazu zählen *MYC proto-oncogene* (MYC), *Kruppel-like factor 4* (KLF4), *octamer binding transcription factor 4* (OCT4 *alias* POU5F1) und *SRY box containing gene 2* (SOX2).

Mittels dieser Faktoren gelang kurz danach auch die Reprogrammierung humaner Fibroblasten (Takahashi *et al.* 2007).

Somit war die Möglichkeit geschaffen, patientInnen- und erkrankungsspezifische iPS-Zellen herzustellen. Park *et al.* generierten 2008 iPS-Zellen von PatientInnen mit verschiedensten genetisch bedingten Erkrankungen, unter anderem Morbus Parkinson und Chorea Huntington (Park *et al.* 2008).

Neben Fibroblasten können auch andere somatische Zellen wie zum Beispiel B-Lymphozyten für die Reprogrammierung verwendet werden. Im Labor von Dr. Matthias Jung an der Martin-Luther-Universität Halle (Saale) wurde diese Methode etabliert. Zur Überprüfung der erfolgreichen Reprogrammierung werden die iPS-Zellen auf spezifische Marker getestet, welche klassischerweise in B-Zellen nicht aber in den iPS-Zellen exprimiert werden. Zu diesen Markergenen zählen unter anderem *G protein-coupled receptor 183* (GPR183A), *B and T lymphocyte associated* (BTLA) und *fc-receptor like A* (FcRLA).

1.3.2 Nachweis der Pluripotenz

Um die Pluripotenz der iPS-Zellen zu verifizieren, können spezifische Marker auf Gen- und Transkriptebeine herangezogen werden, wie zum Beispiel *lin-28 homolog A* (LIN28A), das für ein RNA-bindende Protein kodiert und dessen Expression zusammen mit anderen der oben genannten Faktoren ebenfalls zur Reprogrammierung von iPS-Zellen führt (Yu *et al.* 2007). Als weiterer Marker dient *Nanog homeobox* (NANOG). Das Gen kodiert für einen Transkriptionsfaktor, dessen zentrale Funktion es ist, die Pluripotenz in Zellen aufrechtzuerhalten und damit deren weitere Differenzierung zu verhindern.

Die Fähigkeit von iPS-Zellen sich in Derivate aller 3 Keimblätter und somit in jede somatische Zelle zu entwickeln, stellt neben dem Potenzial zur Selbsterneuerung eine der

charakteristischen Eigenschaften dar (Wernig *et al.* 2007; Maherali *et al.* 2007; Yu *et al.* 2007). Um diese Fähigkeit nachzuweisen, ist es sinnvoll entodermale, ektodermale sowie mesodermale Zellmarker in den Zellen zu bestimmen.

Die Präsenz von mesodermalen Strukturen kann über den Nachweis von *T box transcription factor T* (TBXT), *paired related homeobox 1* (PRRX1) und *mesenchyme homeobox 1* (MOX1) erfolgen. *Musashi 1* (MSI1), *paired box protein* (PAX6) und *sonic hedgehog* (SHH) werden unter anderem von neuronalen Vorläuferzellen exprimiert und zeigen das Vorhandensein ektodermaler Strukturen. Entodermale Strukturen können anhand von Markern wie *C-X-C motif chemokine receptor 4* (CXCR4), *SRY box-containing gene 17* (SOX17) und *forkhead box A2* (FOXA2) bestimmt werden.

1.3.3 Wissenschaftliche Relevanz der iPS-Zellen

Die Anwendung von iPS-Zellen stellt einen bahnbrechenden Erfolg in der aktuellen Forschung dar. Lange musste im Bereich der Entwicklung neuer Therapien, aufgrund mangelnder Alternativen, von Tiermodellen auf den menschlichen Organismus geschlossen werden. Auch wenn der Organismus und die Organentwicklung von Nagetieren und Menschen zu gewissen Teilen vergleichbar sind, bleiben trotzdem signifikante Unterschiede in molekularen und zellulären Mechanismen bestehen, die eine direkte Translation schwierig machen (Jung and Rujescu 2016). Mittels krankheits- und patientInnenspezifischer iPS-Zellen ist ein *in vitro*-Modell geschaffen, das es ermöglicht durch den Erhalt realitätsnaher zellulärer Verbände die Pathophysiologie von Krankheiten zu modellieren. Speziell für SCZ, bei der DNA-Variationen eine zentrale Rolle spielen, bieten die iPS-Zellen und deren Differenzierung eine Möglichkeit die Auswirkungen dieser Variationen zu untersuchen.

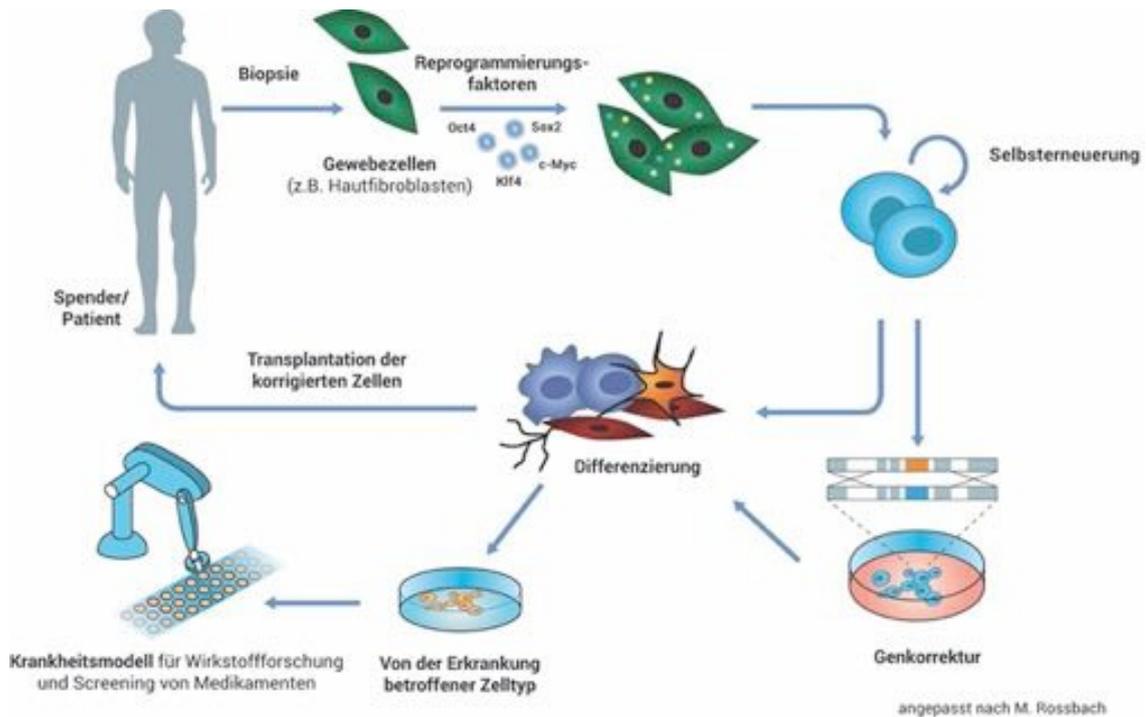


Abbildung 2: Gewinnung und Anwendung von iPS-Zellen

Somatische Zellen können mittels verschiedener Reprogrammierungsfaktoren zu pluripotenten Stammzellen reprogrammiert und anschließend zu unterschiedlichsten Gewebearten differenziert werden. Dieser Prozess bietet eine wichtige Grundlage zur Erforschung von Krankheiten und Wirkstoffen.

<https://stammzellen-verstehen.de/Grundlagen/Reprogrammierung.aspx>, aufgerufen am 20.11.20.

1.4 Differenzierung von iPS-Zellen in neuronale Subtypen und Gliazellen

Das menschliche Gehirn besteht aus Neuronen und Gliazellen, die untereinander komplex geordnete Netzwerke formen. Innerhalb dieser 2 Gruppen existieren weitere zahlreiche Zellsubtypen, die sich in Lokalisation und Funktion voneinander unterscheiden.

Die Entwicklung der einzelnen Hirnabschnitte- und -strukturen während der Embryogenese wird durch verschiedene Faktoren beeinflusst und gesteuert.

1.4.1 Entstehung neuraler Stammzellen

Das zentrale Nervensystem entwickelt sich aus dem Ektoderm. Aus dem über mehrere Zwischenstufen entstandenen Neuralrohr gehen die neuralen Stammzellen (NSC) hervor. Sie sind multipotent und bilden die Vorläuferzellen für alle neuronalen und glialen Subtypen. Entgegen der lange vorherrschenden Meinung, dass neurale Stammzellen, und damit die Neubildung zerebraler Zellen, im Erwachsenenalter keine Rolle mehr spielen, wurde in den späten 1990er-Jahren gezeigt, dass auch im adulten Gehirn noch Neurogenese stattfindet (Cameron and McKay 1999).

Durch die Zugabe von spezifischen Faktoren, lassen sich Zellen auch *in vitro* gerichtet differenzieren. Wird der *bone-morphogenic-protein*(BMP)-Signalweg inhibiert, wird die neurale Differenzierung gestartet und aus iPS-Zellen können sich neurale Stammzellen bilden (Sasai *et al.* 1995; Muñoz-Sanjuán and Brivanlou 2002). Durch unterschiedliche Gradienten von Morphogenen wie WNT, SHH, RA und *fibroblast growth factor* wird die Identität neuraler Progenitorzellen definiert.

1.4.2 Neuronale Differenzierung

Über Beeinflussung des WNT- und SHH-Signalweges lässt sich das Zellschicksal bestimmen. Bedeutung wurde dem WNT-Signalweg zunächst in seiner Rolle in der Karzinogenese zugesprochen, später wurde auch seine Relevanz während der embryonalen Entwicklung entdeckt. Dort spielt WNT eine Schlüsselrolle in der Entwicklung der anteroposterioren und dorsoventralen Achse. Des Weiteren werden über WNT-Signalwege Vorgänge wie die Differenzierung, Proliferation und Migration von Zellen kontrolliert, Prozesse, die für eine erfolgreiche Embryogenese unabdingbar sind (Logan and Nusse 2004).

Seit Beginn der Anwendung von iPS-Zellen, wurde eine Vielzahl an Protokollen entwickelt, um aus neuralen Stammzellen Zellen verschiedenster hirnregionaler Entitäten zu differenzieren.

Koch *et al.* publizierten 2009 ein Protokoll zur Differenzierung kortikaler Neurone mittels cyclischen Adenosinmonophosphats (cAMP). Die Wirkung von cAMP entfaltet sich über seine Funktion als *second messenger* und spielt eine Rolle in der Enzymaktivierung innerhalb zahlreicher Signalwege sowie längerfristig auch in der Regulation der Genexpression.

Um die Diversität des menschlichen Kortex *in vitro* widerzuspiegeln und nicht nur einen spezifischen Zelltyp zu differenzieren, ist durch Zugabe weiterer Faktoren wie *brain-derived neurotrophic factor* (BDNF) und *glial cell-derived neurotrophic factor* (GDNF) der Erhalt einer neuralen Mischkultur möglich.

BDNF ist ein Protein, das maßgeblich zum Schutz bereits bestehender Neurone und Synapsen beiträgt, aber auch an deren Neubildung beteiligt ist. Als Wachstumsfaktor unterstützt es die Ausbildung synaptischer Konnektivität und neuer neuronaler Bahnen (Huang and Reichardt 2001). GDNF als weiterer neurotropher Faktor unterstützt die Differenzierung und den Erhalt dopaminergener Neurone (Lin *et al.* 1993).

Der menschliche Kortex bildet sich hauptsächlich aus glutamatergen und GABAergen Neuronen sowie Interneuronen. In Neuronen sind vesikuläre Glutamattransporter wie *solute carrier family 17 member 7* (SLC17A7) für den Transport von Glutamat aus dem Zytoplasma in neuronale Vesikel verantwortlich. Es gibt verschiedene metabotrope und ionotrope Glutamatrezeptoren die auf den Neurotransmitter Glutamat reagieren, sie sind kennzeichnend

für glutamaterge Neurone. Ionotrope Glutamatrezeptoren wie die AMPA-Rezeptoren bestehen aus 4 Untereinheiten (u.a. *glutamate ionotropic receptor AMPA type subunit 1*; GRIA1). Neurone tragen auch verschiedene metabotrope und ionotrope GABA Rezeptoren. Die metabotropen GABAB-Rezeptoren werden durch verschiedene Untereinheiten gebildet (zum Beispiel *gamma-aminobutyric acid type A receptor subunit beta 1*; GABRB1). Neurone tragen auch das Enzym Glutamatdecarboxylase (kodiert durch *glutamate decarboxylase 1/2*; GAD1/2), das charakteristischerweise bei GABAergen Neuronen zu finden ist.

Ein wichtiges Enzym im Dopaminstoffwechsel ist das Enzym Tyrosinhydroxylase (kodiert durch *tyrosine hydroxylase*; TH), welches den regulierenden Schritt in der Dopaminsynthese darstellt und als Marker für dopaminerge Neurone verwendet werden kann.

Für den Nachweis neuronaler Strukturen ist die Auswahl spezifischer Marker unabdingbar. Hierfür eignen sich unter anderem die oben genannten Anteile des SNARE-Komplexes SYT 1, STX2 und VAMP2 sowie die synaptischen Proteine NLGN1 und NRXN1. Ebenso β -Tubulin III (kodiert durch *tubulin β -3 class III*, TUBB3), das einen integralen Bestandteil der Mikrotubuli darstellt und primär in Neuronen exprimiert wird.

1.4.3 Gliazellen

Auch Veränderungen in glialen Zellen werden hinsichtlich der Pathophysiologie der SCZ diskutiert. Zu den glialen Zellen zählen unter anderem Astrozyten, Mikroglia und Oligodendrozyten.

Wurde Ende des 19. Jahrhunderts noch von Rudolf Virchow postuliert, dass Astrozyten als Kittsubstanz des Gehirns dienen, ist heute nach jahrzehntelanger Forschung deutlich, dass dieser Zelltyp eine Vielzahl an Aufgaben innehat (Davis *et al.* 1991). Sie erfüllen beispielsweise eine wichtige Funktion am Aufbau der Blut-Hirn-Schranke und sind im frontalen Kortex in den Glukosestoffwechsel von Neuronen involviert. Astrozyten lassen sich durch die Expression des astrozytenspezifischen Markers *glial fibrillary acidic protein* (GFAP) nachweisen. Auch Glutamattransporter der Klasse EAAT (*excitatory amino acid transporters*) werden vorrangig von Astrozyten exprimiert. EAAT1 wird durch *solute carrier family 1 member 3* (SLC1A3) kodiert. Seine Funktion ist die Beseitigung von Glutamat aus dem synaptischen Spalt, was essenziell für das Überleben von Neuronen ist (Dong, Wang and Qin 2009). Gemeinsam mit EAAT2 (alias *solute carrier family 1 member 2*; SLC1A2) ist der Transporter für einen Großteil der Glutamatwiederaufnahme im Vorderhirn zuständig (Williams *et al.* 2005).

Eine Involvierung des Immunsystems bei SCZ wird schon lange diskutiert und somit auch die Rolle von Mikroglia als immunmodulative Zellen. Einige Studien gehen von einer Erhöhung

immunreaktiver Mikroglia im frontalen Kortex von SCZ-PatientInnen aus. Mikroglia lassen sich unter anderem mittels Detektion von Oberflächenantigenen nachweisen. Das Oberflächenantigen CD68 wird vom Gen *cluster of differentiation 68* (CD68) kodiert. Es findet sich bei zahlreichen immunreaktiven Zellen der Makrophagenlinie und eignet sich daher auch als Marker für Mikroglia.

Studien deuten darauf hin, dass auch Oligodendrozyten bei SCZ-PatientInnen veränderte Eigenschaften hinsichtlich ihrer Quantität und Qualität aufweisen können.

Ist die von Oligodendrozyten regulierte Myelinisierung von Nervenzellen verändert oder vermindert, kann dies zu einer Störung der zerebralen Konnektivität führen und somit zur Pathophysiologie der SCZ beitragen (Tkachev *et al.* 2003; Vikhreva *et al.* 2016).

In oligodendrozytären Vorläuferzellen (OPC) findet sich der Transkriptionsfaktor *oligodendrocyte transcription factor 2* (OLIG2) (Zhou and Anderson 2002). Reife aktivierte Oligendrozyten exprimieren das myelin-assoziierte Glykoprotein (MAG). Die Bestimmung dieser Marker erlaubt somit Rückschlüsse auf das Reifestadium oligodendrozytärer Zellen in Zellkulturen.

2 Zielstellung

In dieser Arbeit sollten schizophreniespezifische iPS-Zelllinien mit einer CNV im Gen Neurexin 1 (NRXN1) analysiert und charakterisiert werden. Dafür sollten von der AG neu hergestellte iPS-Zelllinien bezüglich ihrer Pluripotenz analysiert werden. Bereits etablierte schizophreniespezifische iPS-Zelllinien und iPS-Zelllinien von gesunden Spendern sollten mittels eines Differenzierungsprotokoll, ähnlich dem von Koch *et al.* (Koch *et al.* 2009a), zu Neuronen und Gliazellen differenziert und analysiert werden.

Ziele:

- Charakterisierung der Pluripotenz von schizophreneassoziierten iPS-Zelllinien (Spender: Eltern von an SCZ betroffenen Kindern) mit einer CNV im Gen Neurexin 1 (NRXN1)
- Analysen von Neuronen aus schizophreniespezifischen iPS-Zelllinien

Die Mischkultur aus Neuronen und Gliazellen sollte genauer beschrieben werden. Die neuronale Differenzierung sollte durch ausgewählte Marker überprüft werden. Hierfür sollte unter anderem die mRNA-Expression von TUBB3, SYT1, STX2, VAMP2 und NLGN1 untersucht werden. Da innerhalb der Pathogenese der SCZ nicht nur die Affektion verschiedener neuronaler Subtypen, sondern auch die Affektion glialer Zellen diskutiert wird, sollten diese ebenfalls untersucht werden. Mit dem genaueren Wissen über die Zusammensetzung der *in vitro* differenzierten neuronalen und glialen Mischkultur, sollte es in Zukunft möglich sein, gezielt Signalwege in bestimmten Zelltypen zu erforschen, bei denen ein Zusammenhang mit der Entstehung der SCZ vermutet wird.

Für die SCZ-Patienten, deren iPS-Zellen als Ausgangsmaterial für die Zellkulturen dienten, sind in der Klinik für Psychiatrie, Psychotherapie und Psychosomatik der Martin-Luther-Universität eine Vielzahl an Informationen archiviert. Diese beinhalten neben anamnestischen Informationen in Form von Arztbriefen auch verschiedene Fragebögen, beispielsweise die PANSS. Diese Daten sollten in einen Zusammenhang mit der genetischen Veränderung im Gen NRXN1 gebracht werden.

Obwohl in den letzten Jahren ein enormer Wissenszuwachs durch groß angelegte genetische Studien gewonnen wurde, besteht ein erheblicher Bedarf daran SCZ-assoziierte DNA-Veränderungen funktionell zu charakterisieren. Diese Promotion soll durch den angewandten zellbiologischen Ansatz einen Beitrag zur weiteren Aufklärung leisten.

3 Material und Methodik

3.1 Zellkultur

Die Kultivierung der Zellen erfolgte bei 37°C und einem CO₂-Gehalt von 5 %. Für die Erhaltung von iPS-Zellen und für die Herstellung von Neuronen und Gliazellen wurden unterschiedliche Medien verwendet (Tabelle 1). Jedes Medium wurde vor der Verwendung in einem Wasserbad bei 37°C erwärmt.

3.1.1 Zellkulturmedien und Puffer

Tabelle 1: Verwendete Zellkulturmedien und Zusätze

Medium	Zusammensetzung	Hersteller	Endkonzentration
mTeSR TM 1-Medium	mTeSR TM <i>basal medium</i>	Stemcell Technologies, Köln	~ 80 % (des Gesamtvolumens)
	mTeSR TM <i>supplement</i>	Stemcell Technologies, Köln	1 x
	Gentamycin	Biochrom, Berlin	0,1 mg / ml
Medium für spontane Differenzierung	DMEM/F-12	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt	~ 77 % (des Gesamtvolumens)
	<i>KnockOutTM Serum Replacement</i>	Life Technologies, Darmstadt	~ 20 %
	<i>Non-essentiell amino Acids (NEAA)</i>	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt	1%
	Gentamycin	Biochrom, Berlin	10,0 mg/ml
	Glutamin	Sigma Aldrich, Taufkirchen	200 mM
	β-Mercaptoethanol (BME)	Merck Millipore, Darmstadt	55 mM
NIM (<i>neural induction medium</i>)	STEMdiff TM <i>neural induction medium</i> Gentamycin	Stemcell Technologies, Köln Biochrom, Berlin	0,1 mg / ml
TDM1 (terminales Differenzierungs-Medium 1)	DMEM	} Thermo Fisher Scientific, Darmstadt	~ 25 % (des Gesamtvolumens)
	F12		~ 25 %
	Neurobasalmedium		~ 50 %
	Gentamycin		0,1 mg / ml
	N-2 Supplement (100x)	1x	
	B-27 TM Supplement (50x)	1x	
	Wnt3a	PeproTech, Hamburg	1,0 ng / ml
cAMP	Sigma Aldrich	0,3 µg / ml	
	Cyclopamine-KAAD	Merck Millipore	1 µM
TDM2 (terminales Differenzierungs-Medium 2)	DMEM	Invitrogen, Karlsruhe	~ 25 %
	F12	Invitrogen	~ 25 %
	Neurobasalmedium	Invitrogen	~ 50 %
	B-27 TM Supplement (50x)	Biochrom, Berlin	1x
	Gentamycin	Life Technologies, Darmstadt	0,1 mg / ml
	cAMP	Sigma-Aldrich,	0,3 µg / ml

	BDNF GDNF	Darmstadt PeproTech, Hamburg PeproTech, Hamburg	10,0 ng / ml 10,0 ng / ml
Stoppmedium	DMEM Fetales Kälberserum (FBS)	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt	90,0 % (v/v) 10,0 % (v/v)
FC-Puffer	PBS BSA <i>Stock Solution</i> EDTA	Merck, Darmstadt Miltenyi, Bergisch Gladbach	 0,5 % (v/v) 2 mM

3.1.2 Beschichtungen

Matrigel™

Um eine Nunclon™ Sphera™ Multischale 6-Well-Platte zu beschichten, wurde Matrigel™ in einem Verhältnis von 1:100 mit DMEM verdünnt. Von der Lösung wurde jeweils 1,0 ml pro Well aufgetragen und anschließend für eine h bei 37°C inkubiert (Tabelle 2). Vor Verwendung der beschichteten Platte wurde die Lösung entnommen.

Poly-L-Ornithin-Laminin

Für die terminale Differenzierung wurden 6-Well-Platte und Deckgläschen speziell behandelt. Es wurden 1,5 ml der Poly-L-Ornithin-Lösung (15,6 µg / cm²) in ein Well mit oder ohne Deckgläschen gegeben und über Nacht bei 37°C inkubiert (Tabelle 2). Nach Abnahme der Lösung wurden die Platten unter der Zellkulturbank getrocknet und anschließend 3 x mit entionisiertem Wasser gespült und erneut getrocknet.

Daraufhin erfolgte die Beschichtung mit Laminin (1,6 µg / cm²), welches im Vorhinein mit PBS verdünnt wurde (10 µl / ml PBS). Pro Well wurden etwa 3,0 ml appliziert und daraufhin für 1 h bei 37°C inkubiert. Die Lösung wurde vor der Anwendung entnommen.

Tabelle 2: Verwendete Beschichtungen in der Zellkultur

Zusammensetzung	Hersteller	Konzentration
Matrigel™-Beschichtung		
Matrigel™	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt	1,6 µg / cm ²
DMEM	Invitrogen, Karlsruhe	
Poly-L-Ornithin		
Natrium-Borat	Roth, Karlsruhe	10 mM
Poly-L-Ornithin Hydrochlorat	Merck, Darmstadt	15,6 µg / cm ²

Laminin-Beschichtung		
Laminin	Merck, Darmstadt	1,6 µg / cm ²
Phosphat-gepufferte Salzlösung (PBS)	Merck, Darmstadt	

3.1.3 Zelllinien

Die als Referenz verwendete Zelllinie iPS(IMR90)-4 (alias WISCi004-B; WiCell Research Institute, Wisconsin, USA) wurde aus Lungenfibroblasten mittels der Faktoren OCT4, SOX2, NANOG und LIN28A lentiviral reprogrammiert (Yu *et al.* 2007). Die iPS-Zelllinie DF19-9-7T (WiCell Research Institute, Wisconsin, USA) wurde mit denselben Faktoren mithilfe nicht-integrierender episomaler Vektoren reprogrammiert (Yu *et al.* 2009).

Die verwendeten patientenspezifischen Zelllinien wurden aus B-Lymphoblasten von SCZ-Patienten mittels episomaler Vektoren in der Arbeitsgruppe hergestellt. Die zu Neuronen differenzierten iPS-Zelllinien MLUi001-B/-F/-M und MLUi002-E/-G wurden aus den B-Lymphoblasten zweier SCZ-Patienten gewonnen, die eine CNV in NRXN1 aufweisen. Diese durch die CNV verursachte Mutation führt zu einer heterozygoten Deletion im betroffenen Genabschnitt. Die iPS-Zelllinie MLUi003-A gehört ebenfalls zu einem SCZ-Patienten mit einem CNV in NRXN1, sie wurde aber nur hinsichtlich ihrer Pluripotenz charakterisiert. Die in der Arbeit charakterisierten Klone der iPS-Zelllinien MLUi004-F/-H/-M und MLUi005-B stammen von den Eltern zweier an SCZ erkrankter Geschwister. Tabelle 3 zeigt die für die verwendeten Zelllinien relevanten Informationen.

In einem Ethikvotum der Ethikkommission des Klinikums Universität München wurde am 09.07.2008 von Prof. Dr. G. Baumgartner die Arbeit mit patientInnenspezifischen Proben zur Identifikation von Genen und/oder Loci, die mit Psychosen und deren Phänotyp assoziiert sind unter der Projektnummer 275-06 genehmigt.

Tabelle 3: Verwendete humane iPS-Zelllinien

Zuordnung	Alter / Geschlecht	Zelllinie / Klon
SCZ	37 Jahre männlich	MLUi001-B
		MLUi001-F
		MLUi001-M
SCZ	22 Jahre männlich	MLUi002-E
		MLUi002-G
SCZ	38 Jahre männlich	MLUi003-A

Elternteil von SCZ-PatientIn	67 Jahre weiblich	MLUi004-F
		MLUi004-H
		MLUi004-M
Elternteil von SCZ-PatientIn	64 Jahre männlich	MLUi005-B
Referenzzelllinie	Pränatal Fetus	WISCi004-B
Referenzzelllinie	Postnatal Neugeborenes	iPSDF19-9-7T

3.1.4 Stammhaltung

Die iPS-Zellen wurden in mTeSRTM1-Medium kultiviert (Tabelle 1). Der Medienwechsel erfolgte täglich durch Abnahme des alten und Zugabe von 1,5 ml frischem mTeSRTM1-Medium. Um das Wachstum der Zellen in einzelnen Kolonien beizubehalten, wurden die iPS-Zellen einmal pro Woche passagiert. Dazu wurden die Zellen nach Abnahme des Mediums zunächst mit 2,0 ml PBS gewaschen. Daraufhin wurde pro Well 1,0 ml Kollagenase Typ IV (ThermoFisher Scientific, Darmstadt) (1,0 mg / ml entsalztes Wasser) hinzugefügt, um ein Ablösen der Zellen zu gewährleisten. Nach circa 30 min Inkubation bei 37° C wurde die Tätigkeit der Kollagenase IV mit 1,0 ml mTeSRTM abgestoppt, die Zellen mithilfe einer Pipette vorsichtig vom Boden gespült und in ein Zentrifugenröhrchen überführt. Nach 5 min Zentrifugation bei 200 g und Abnahme des Überstandes wurde das Zellpellet mit 1,0 ml mTeSRTM resuspendiert und je nach gewünschter Zelldichte auf MatrigelTM-beschichtete Zellkulturschalen gegeben.

3.1.5 Spontane Differenzierung

Für die spontane Differenzierung mit dem Ziel, die Pluripotenz der iPS-Zellen zu verifizieren, wurden die iPS-Zellen für 10 d in einem speziellen Medium kultiviert (Tabelle 1). Die Kultivierung erfolgte auf einer MatrigelTM-Beschichtung.

3.1.6 Neurale Differenzierung

Vor dem Start der neuronalen Differenzierung wurden die iPS-Zellen zunächst wie oben beschrieben passagiert. 2-3 d nach der Passage wurden die Zellen mittels NIM für 7 d neural differenziert (Tabelle 1).

3.1.7 Neuronale Differenzierung

Die neuronale Differenzierung über 7 d hinaus wurde im Anschluss an die neurale Differenzierung mittels 2 verschiedener Medien durchgeführt. Die durch NIM neural differenzierten Zelllinien wurden ab 7 d bis 14 d mit TDM1 kultiviert (Tabelle 1). Danach

erfolgte der Wechsel auf TDM2, mit dem die Zelllinien bis zum Ende der Differenzierung kultiviert wurden. Die Erneuerung des Mediums erfolgte alle 2-3 d. Nach Abnahme des alten Mediums, wurden 2,0 ml neues Medium hinzugefügt.

Am 40. d der Differenzierung erfolgte eine Passage aller Zelllinien (Abbildung 3). Diese erfolgte auf Poly-L-Ornithin-Laminin-beschichtete 6-Well-Platten. Zunächst wurde das TDM2 abgenommen und die Zellen mit PBS gewaschen. Die Ablösung erfolgte mittels Accutase™ (Merck, Darmstadt). Dafür wurde 1,0 ml Accutase™ pro Well hinzugefügt und für 5 min bei 37°C inkubiert.

Die Enzymaktivität wurde im Anschluss mit Stoppmedium (Tabelle 1) gestoppt. Nach vorsichtigem Spülen wurden die Zellen in ein Zentrifugenröhrchen überführt und anschließend für 5 min zentrifugiert. Nachdem sich die Zellsuspension am Boden abgesetzt hat, wurde der Überstand abgenommen und die Zellen in 1,0 ml TDM2 vorsichtig resuspendiert und auf 6-Well-Platten verteilt, in denen bereits 2,0 ml TDM2 vorgelegt war. Je nach Zelldichte vor Passage und gewünschter Zelldichte nach Passage, wurden die Zellen in einem Verhältnis von 1:1 bis 1:3 gesplittet.

Die Passage der Zellen, die für spätere Immunfluoreszenzfärbungen verwendet werden sollten, erfolgte auf mit Poly-L-Ornithin-Laminin beschichteten Glasdeckgläschen in deutlich geringerer Dichte, um das Anfärben und Darstellen einzelner Zellen zu gewährleisten.

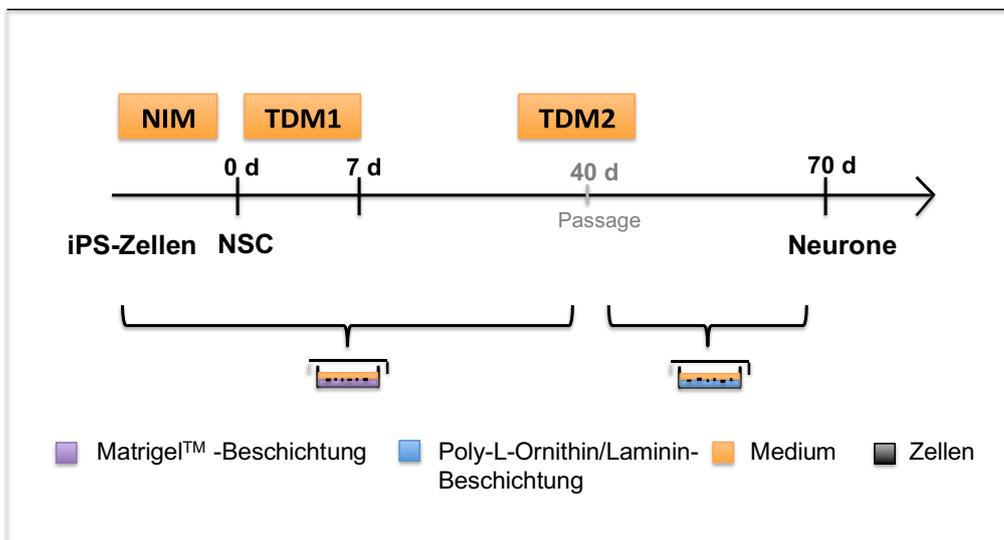


Abbildung 3: Versuchsablauf der neuronalen Differenzierung

Die Abbildung zeigt schematisch den Versuchsablauf zur Herstellung neuronaler Zellen ausgehend von iPS-Zellen über die Zwischenstufe NSC.

3.2 Molekularbiologische Methoden

3.2.1 RNA-Isolation

Bevor die Zellen zur RNA-Isolation verwendet werden konnten, wurde zunächst das Medium abgenommen und die Zellen einmalig mit 1,0 ml PBS gewaschen. Nach erneuter Zugabe von 1,0 ml PBS, erfolgte das Lösen der Zellen vom Wellboden mittels eines Zellschabers. Die Zellen wurden daraufhin aufgenommen und für 5 min bei 200 g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 594,0 µl Lysepuffer aufgenommen. Anschließend wurden 6,0 µl BME hinzugegeben und das Ganze für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die RNA wurde mit dem RNeasy™ Mini Kits (Qiagen, Hilden) nach Herstellerangaben mit DNase-Verdau isoliert und im Anschluss in 30,0 µl nukleasefreiem Wasser gelöst. Vor der Lagerung bei -80°C, erfolgte die Konzentrationsbestimmung mit dem Plattenlesegerät von Synergymx (Biotek, Bad Friedrichshall). Als Referenz wurde 2,0 µl nukleasefreies Wasser verwendet.

3.2.2 Reverse Transkription der RNA (cDNA-Synthese)

Mit dem RevertAid™ M MuLV-Kit wurde die gewonnene RNA in cDNA umgeschrieben. Hierfür wurden zunächst pro Ansatz 1,0 µg RNA mit RNase-freiem Wasser und dem OligodT18-Primer für 5 min bei 65°C inkubiert und anschließend auf 4°C abgekühlt. Nach der Zugabe der übrigen Komponenten (Tabelle 4) erfolgte zunächst eine Inkubation bei 42°C für 60 min und daran anschließend 10 min bei 70°C. Beendet wurde die Synthese mit einer Abkühlung auf 4°C. Die Lagerung der fertigen cDNA fand anschließend bei -20°C statt.

Tabelle 4: Reaktionsansatz der reversen Transkription

Komponente	Volumen
RNA	x µl (= 1,0 µg)
OligodT18	1,0 µl
RNasefreies H ₂ O	Ad 12,5 µl
5x Reverse Transkriptase Puffer	4,0 µl
RNase-Inhibitor	0,5 µl
dNTPs (10 mM)	2,0 µl
Reverse Transkriptase (200 U / µl)	1,0 µl

3.2.3 Reverse-Transkriptase-PCR (RT-PCR)

Die RT-PCR dient zur Amplifikation spezifischer Genabschnitte. Durch anschließendes Auftragen auf ein Agarosegel, lassen sich die amplifizierten DNA-Fragmente auftrennen und mittels UV-Licht sichtbar machen. Die PCR-Reaktion wurde mit dem Master Gradient (Eppendorf, Hamburg) durchgeführt. Verwendete Primer wurden über <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/> konfiguriert. Die Hybridisierungstemperatur wurde gegebenenfalls primerspezifisch angepasst. Das verwendete Programm sowie die Zusammensetzung des Reaktionsansatzes sind in Tabelle 5 und 6 aufgeführt.

Tabelle 5: RT-PCR Reaktionsansatz

Komponente	Volumen
cDNA	1,0 µl
dNTPs (2,5mM)	2,0 µl
MgCl ₂	2,5 µl
Puffer B	2,5 µl
Primer (10 pmol/µl)	Je 0,5 µl
Taq-Polymerase (5 U/µl)	0,25 µl
Nuclease-freies H ₂ O	Ad 25,0 µl

Tabelle 6: Programm für RT-PCR

Programm		
Hitzenaturierung	95°C	10 min
Hitzenaturierung	95°C	30 s
Hybridisierung	60°C	30 s
Elongation	72°C	30 s
Elongation	72°C	10 min
Kühlung	4°C	∞

} 35x

3.2.4 Gelelektrophorese

Die Auftrennung der DNA-Fragmente mittels Gelelektrophorese erfolgte im Agarosegel aus 2 % (w/v) Agarose (Biozym, Hessisch Oldendorf) in Tris-Acetat-EDTA-Puffer versetzt mit 0,01 % Ethidiumbromid (Promega, Mannheim) versetzt wurde. Die Gelelektrophorese erfolgte in Tris-Acetat-EDTA-Puffer in einer Gelkammer (Biorad, München) bei 100 Volt für 30 min.

Um die Größe der DNA-Fragmente zu bestimmen, wurde der Maßstab 100 bp mit DNA Ladder Ready to Load (Solis Biodyne, Tartu, Estland) verwendet. Proben wurden in *DNA Loading Dye 6x* (Thermo Fischer Scientific, Darmstadt) aufgetragen.

3.2.5 Alkalische Phosphatase Färbung

Die Anfärbung der iPS-Zellen erfolgte mit dem AP Staining Kit (Biotac, Heidelberg) nach Herstellerangaben. Die Zellen wurden einmalig mit PBS gewaschen.

3.2.6 Immunfluoreszenzfärbung

Um Proben zur Immunfluoreszenzfärbung zu generieren, wurden mit Poly-L-Ornithin-Laminin beschichtete Glasdeckgläschen verwendet.

Nach Abnahme des Mediums, wurden die Deckgläschen einmal mit PBS gewaschen, für 15 min in 4 % Paraformaldehyd fixiert und anschließend 3 x mit PBS gewaschen. Im Anschluss erfolgte die Inkubation mit 80,0 µl Pferdeserum (1 %, v/v) und 0,2 % Triton™X-100 für 30 min je Deckgläschen bei Raumtemperatur. Dann folgte die Inkubation mit 80 µl 3,5 % Pferdeserum für 30 min. Jedes Deckgläschen wurde im Anschluss vorsichtig 3 x in PBS geschwenkt bevor die Inkubation mit dem primären Antikörper erfolgte. Antikörper wurden mit PBS verdünnt (Tabelle 7) und mit 80,0 µl je Deckgläschen über Nacht bei 4°C eingesetzt.

Am nächsten Tag wurden die Gläschen erneut in 3 Schritten mit PBS gewaschen, bevor die Inkubation mit dem sekundären Antikörper erfolgte (Tabelle 8). Dieser wurde 1:400 mit PBS verdünnt und 80,0 µl dieser Verdünnung auf die Deckgläschen appliziert. Die Inkubation des sekundären Antikörpers fand abgedunkelt für 2 h bei Raumtemperatur statt.

Für die Kernfärbung wurden die Deckgläschen nach 3 x Waschen mit PBS für 5 min mit 80,0 µl Hoechst-Kernfarbstoff in lichtgeschützter Umgebung und bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend mit entionisiertem Wasser gewaschen.

Zur längeren Haltbarkeit wurden die Präparate mit Einbettmedium Fluoromount G™ (Biozol, Eching) auf Objektträgern fixiert und über Nacht bei 4°C ausgehärtet. Im letzten Schritt erfolgte die Versiegelung mit Nagellack. Anschließend wurden die Präparate bei 4°C lichtgeschützt gelagert. Die Auswertung der Immunfluoreszenzfärbung erfolgte mithilfe des Fluoreszenzmikroskops BZ-8100E (Keyence, Neu-Isenburg).

Tabelle 7: Primäre Antikörper für Immunfluoreszenzfärbung

Antikörper	Aus Spezies	Klonalität	Hersteller	Verdünnung
TUBB3	Maus	monoklonal	Santa Cruz,	1:100
SYT1	Ziege	polyklonal	Heidelberg	1:100

NLGN1	Maus	monoklonal		1:100
NRXN1	Kaninchen	polyklonal	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt	1:1000
GRIA1	Maus	monoklonal	Santa Cruz	1:100
GABRB1	Maus	monoklonal	abcam, Cambridge UK	1:100

Tabelle 8 : Sekundäre Antikörper für Immunfluoreszenzfärbung

Antikörper	Aus Spezies	Gegen Spezies	Hersteller	Verdünnung
Cy TM 3-AffiniPure	Ziege	Maus	Dianova,	1:400
	Esel	Ziege	Hamburg	
	Maus	Kaninchen		
Alexa Fluor TM 488	Ziege	Maus	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt	

3.2.7 Positive and negative syndrome scale (PANSS)

Die PANSS ist ein strukturiertes 30-40 min Interview, das seine Anwendung vorrangig zur Erfassung der Psychopathologie bei PatientInnen mit SCZ findet.

Insgesamt werden 30 Symptome abgefragt, die 3 Skalen zugeordnet sind. Die Positivskala umfasst Symptomkomplexe wie Wahn, Halluzinationen und Erregung. Zur Negativskala werden Affektverarmung, soziale Isolation und Schwierigkeiten im abstrakten Denken gezählt. Die Skala der globalen Psychopathologie beinhaltet Symptome wie Angst, verlangsamte Motorik und Desorientiertheit.

Jedes der 30 Symptome wird von PatientInnen auf einer Skala von 1-7 bewertet, wobei 1 für nicht vorhanden steht und 7 extrem ausgeprägt bedeutet. Die PatientInnen bewerten die Symptomatik über den Zeitraum der letzten 7 d. In den zur Verfügung gestellten PANSS-Bögen wurden die PatientInnen bezüglich der letzten 7 d sowie der bis dato schlimmsten Episode befragt. So existieren zu den aufgeführten PatientInnen 2 PANSS- Werte.

Zur Einordnung der Werte existieren 4 Kategorien: bei einem Maximalwert von 210 Punkten entsprechen 58 Punkte einer leichten, 75 Punkte einer mittelgradigen, 95 Punkte einer deutlichen und 116 Punkte einer schwer ausgeprägten Symptomatik.

3.2.8 Durchflusszytometrie

Um die differenzierten Zellen quantitativ zu analysieren, wurde eine durchflusszytometrische Messung mit dem BD LSR Fortessa (BD Bioscience, Heidelberg) durchgeführt. Die Aufzeichnung der Daten erfolgte mit der zugehörigen Software FACSDIVA™ Version 6.1.3. (BD Bioscience, Heidelberg). Die benutzten Fluorochrome wurden jeweils einzeln gemessen. Als Negativkontrolle dienten Fibroblasten aus der Linie BJ-5ta. Die Zellen wurden ursprünglich aus der Vorhaut eines männlichen Neugeborenen isoliert und immortalisiert.

Die Ablösung der Zellen erfolgte mittels 1,0 ml TrypLE™ (ThermoFisher Scientific, Darmstadt). Vorangestellt wurde ein Waschschrift mit PBS. Nach Zugabe des TrypLE™ wurden die Zellen für 5 min bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde mit 1,0 ml Abstopppmedium (Tabelle 1) beendet und die Zellen anschließend in ein Zentrifugenröhrchen überführt und für 5 min bei 200 g zentrifugiert. Nach Abnahme des Überstandes wurden die Zellen mit Puffer (0,5 % BSA in PBS, 2 mM EDTA) resuspendiert und je 100-200 µl auf die FC-Röhrchen verteilt.

Zur Antikörpermarkierung wurden sowohl konjugierte (GFAP-APC, TH-AF488, GLAST-PE), als auch unkonjugierte Antikörper (SCL17A7, CD68) verwendet (Tabelle 9). Zur Antikörpermarkierung von intrazellulären Strukturen wurde das Inside Stain Kit (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach) nach Herstellerangaben verwendet. Die Färbung mit primären Antikörpern wurde nach Standardprotokollen durchgeführt. Spezielle Angaben zur Verdünnung wurden den Herstellerangaben entnommen. Von den sekundären Antikörper wurde pro FC-Röhrchen 1,0 µl eingesetzt und für 30 min bei Raumtemperatur und abgedunkelt inkubiert. Für die unkonjugierten Antikörper wurde eine Kontrolle *Fluorescence minus one* mitgeführt. Die bereits konjugierten Antikörper wurden ebenfalls nach Herstellerangaben verwendet. Zu jedem konjugierten Antikörper wurde zur Kontrolle eine Isotypenkontrolle mitgefärbt. Bis zur Durchführung der Messung wurden alle Proben im Kühlschrank aufbewahrt. Zur Unterscheidung von lebenden und toten Zellen wurden 2 Proben mit einer 7-AAD Staining Solution (Miltenyi, Bergisch Gladbach) gefärbt. Dafür wurden 10,0 µl der Lösung 5 min vor der Messung hinzugefügt. Das Gating im Vorwärts und Seitwärts-Streulicht wurde vor Beginn der ersten Messung festgelegt und standardisiert beibehalten. Die Daten wurden mit FACSDIVA™ Version 6.1.3 ausgewertet.

Die Messungen wurden mit Unterstützung durch die Core Facility Durchflusszytometrie und Herrn Dr. Alexander Navarrete Santos durchgeführt.

Tabelle 9: Primäre, sekundäre und konjugierte Antikörper für Durchflusszytometrie

Antikörper	Aus Spezies	Hersteller	Verdünnung
Primäre Antikörper			
SLC17A7	Kaninchen	Proteintech, Manchester UK	1:100
CD68	Maus	Bio-Techne, Wiesbaden	1:100

Sekundäre Antikörper			
Alexa Fluor 488 Anti Maus	Ziege	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt	1:100
Alexa Fluor 488 Anti Kaninchen	Ziege		
Konjugierte Antikörper			
TH-AF488	Maus	Bio-Techne, Wiesbaden	1:100
Isotypkontrolle- AF488	Maus	Thermofisher Scientific, Darmstadt	1:100
GFAP-APC	rekombinant	Miltenyi, Bergisch Gladbach	1:50
EAAT1-PE			
REA-Kontrolle-APC			
REA-Kontrolle-PE			

3.2.9 Diagramme

Diagramme wurden mit Microsoft Excel Version 14.7.7. erstellt.

4 Ergebnisse

4.1 Analyse der iPS-Zelllinien

4.1.1 Morphologie

In Kultur wuchsen die iPS-Zellen MLUi003-A, MLUi004-F/-H-M und MLUi005-B in Kolonien (Abbildung 4). Der Kolonierand ließ sich zur Umgebung hin scharf abgrenzen. Morphologisch zeigten sich relativ kleine Zellen mit einer hohen Kern-Zytoplasma-Relation. Die Zellen wuchsen mit epithelialer Morphologie.

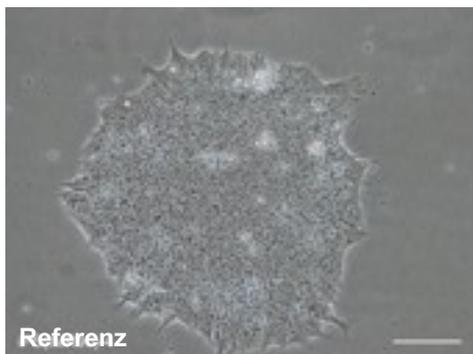


Abbildung 4: Morphologie von iPS-Zellen

Lichtmikroskopische Aufnahme in Phasenkontrast von iPS-Zell-Kolonie der pluripotenten Referenzzelllinie WISCI004-B (alias iPS(IMR90)-4). Maßstab 100 µm.

4.1.2 Alkalische Phosphatase

Pluripotente iPS-Zellen zeigen eine Aktivität alkalischer Phosphatasen. Der Nachweis dieser enzymatischen Aktivität wurde bei den iPS-Zelllinien MLUi003-A, MLUi004-F/-H-M und MLUi005-B durchgeführt und eignet sich zur frühen Bestimmung der Pluripotenz (Abbildung 5).

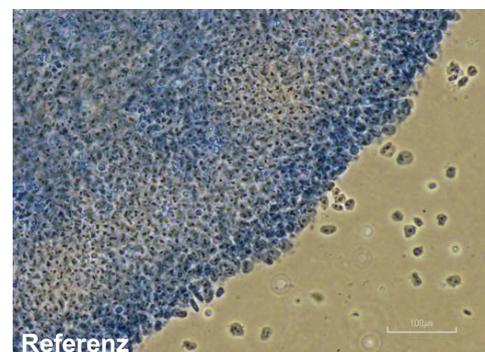
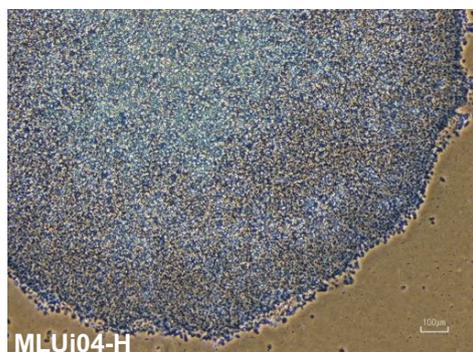


Abbildung 5: Alkalische Phosphatase in iPS-Zelllinien

Lichtmikroskopische Aufnahmen in 4- und 10-facher Vergrößerung von iPS-Zell-Kolonien (MLUi004-H und pluripotente Referenzzelllinie WISCI004-B), die nach Färbung bläulich erscheinen. Maßstab 100 µm.

4.1.3 Transkriptanalyse von Pluripotenzmarkern in den iPS-Zellen

Mittels PCR und Gelelektrophorese ließ sich bei allen untersuchten iPS-Zelllinien MLUi003-A, MLUi004-F/-H-M und MLUi005-B die Expression verschiedener pluripotenzassoziierter Marker nachweisen (Abbildung 6). Die nachgewiesenen Faktoren OCT4, MYC, SOX2, KLF4 und LIN28A wurden zur Reprogrammierung der iPS-Zellen eingesetzt. Als weiterer Pluripotenz-Marker diente der Transkriptionsfaktor NANOG. GAPDH wurde bei jeder Messung als Referenz verwendet.

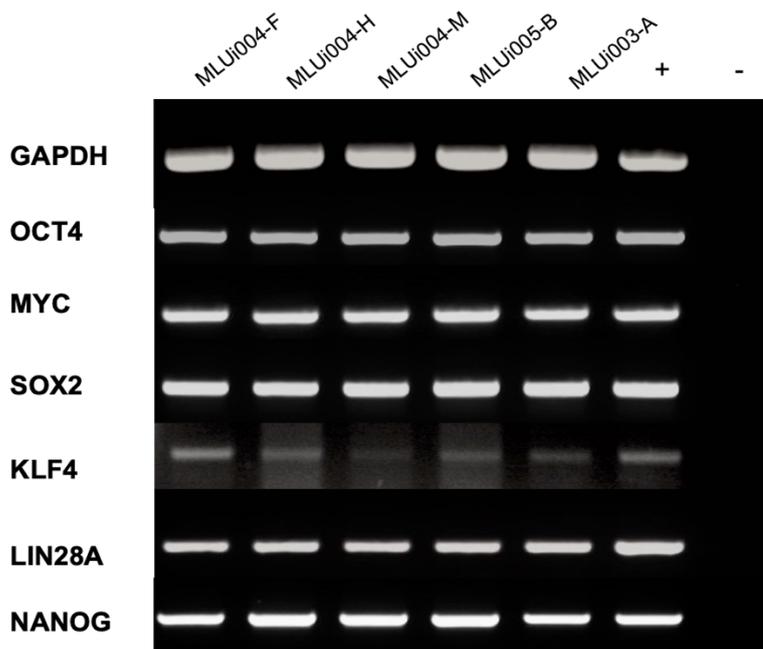


Abbildung 6: Transkriptanalyse von Pluripotenzmarkern in iPS-Zelllinien

Nachweis der pluripotenzassozierten Marker in allen iPS-Zelllinien (MLUi003-A, MLUi004-F/-H-M und MLUi005-B). Positivkontrolle (+) cDNA aus pluripotenten iPS-Zellen, Negativkontrolle (-) entionisiertes Wasser.

4.1.4 Analyse B-zellspezifischer Marker

Es wurden weitere PCR-Messungen auf die B-zellspezifischen Marker BTLA, FCRLA und GPR183 in MLUi003-A, MLUi004-F/-H-M und MLUi005-B durchgeführt, da im Zuge der Reprogrammierung zu iPS-Zellen B-lymphoblastoide Zellen verwendet wurden (Abbildung 7). Diese ließen sich in der als Positivkontrolle verwendeten cDNA der humanen B-lymphoblastoiden Zelllinie LCL-Ho nachweisen, wurden jedoch in keiner der cDNAs der iPS-Zellen nachgewiesen.



Abbildung 7: Transkriptanalyse spezifischer B-Zellmarker in iPS-Zelllinien im Vergleich zur B-lymphoblastoiden Zelllinie LCL-Ho (+)

Nachweis der B-Zellmarker nur in Positivkontrolle (+) LCL-Ho. Negativkontrolle mit entionisiertem Wasser (-).

4.1.5 Spontane Differenzierung der iPS-Zellen

Der Nachweis der Pluripotenz durch spontane Differenzierung in die 3 Keimblätter Mesoderm, Ektoderm und Entoderm stellt einen weiteren Beleg für die Pluripotenz der iPS-Zellen dar. Die iPS-Zellen MLUi003-A, MLUi004-F/-H-M und MLUi005-B wurden mit speziellem Medium bis 10 d kultiviert und auf diese Weise spontan differenziert. Die ursprünglich einheitlichen iPS-Zellen entwickelten sich im Laufe der Zeit zu Zellen uneinheitlicher Morphologie.

Es erfolgte eine RNA-Probenentnahme an 3 d, 5 d und 10 d und deren anschließende Analyse mittels PCR. Für die Zelllinie MLUi004-F wurde keine Probe von 10 d generiert. GAPDH wurde als Referenzgen verwendet, dessen Expression war bei den Proben aller Klone an allen Tagen vergleichbar. Als mesodermale Marker wurden die Gene TBXT, MOX1 und PRRX1 herangezogen. MSI1, PAX6 sowie SHH dienten zum Nachweis ektodermaler Strukturen. Für Derivate des Entoderms wurden FOXA2, SOX17 sowie CXCR4 untersucht.

Alle im Zuge der spontanen Differenzierung herangezogenen Marker wurden zu mindestens einem Zeitpunkt in den iPS-Zellen exprimiert.

Zusammenfassend unterstreicht das Ergebnis der PCR die Fähigkeit der iPS-Zellen sich in Derivate aller 3 Keimblätter zu differenzieren, was sich auf die zugrunde liegende Pluripotenz der iPS-Zellen zurückführen lässt.

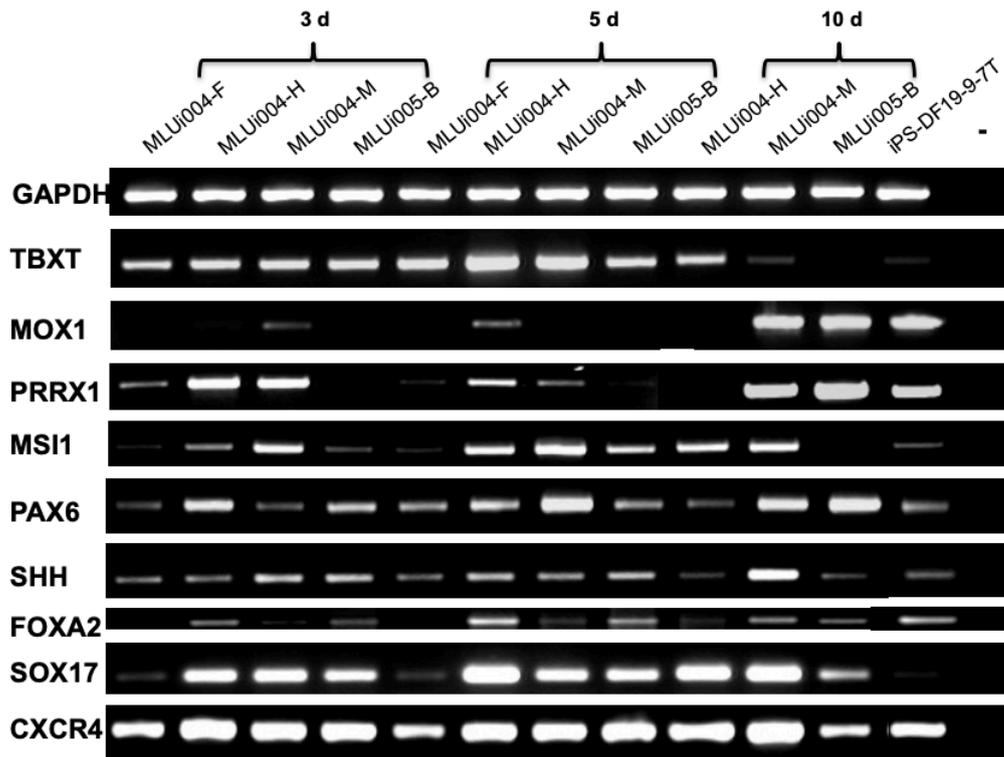


Abbildung 8: Transkriptanalyse von Markern der Keimblattderivate

Nachweis der pluripotenassoziierten Marker in allen iPS-Zelllinien (MLUi004-F/-H/-M und MLUi005-B) im Vergleich zu iPS-DF19-9-7T. Negativkontrolle (-) mit entionisiertem Wasser.

4.2 Differenzierung patientenspezifischer iPS-Zellen zu kortikalen Neuronen

5 schizophreniespezifische iPS-Zelllinien (MLUi001-B/-F/-M, MLUi002-E/-G) und eine Referenzzelllinie (WISCi004-B) wurden erst zu NSC und dann zu kortikalen Neuronen differenziert und verglichen. Daraufhin folgte die terminale Differenzierung zu Neuronen.

5.1.1 Morphologie

Die morphologische Entwicklung der Zelllinien wurde im NSC-Stadium (Abbildung 9) sowie am Ende der Differenzierung (Abbildung 10 + 11) in MLUi001-B/-F/-M, MLUi002-E/-G und der pluripotenten Referenzzelllinie WISCi004-B lichtmikroskopisch dokumentiert. Da über den langandauernden Prozess mit einem gewissen Zellverlust durch Absterben zu rechnen ist, wurde die Differenzierung mit hoher Zelldichte begonnen.

Nach 7 d Kultivierung sind aus den iPS-Zellen NSC entstanden. Diese stellten sich morphologisch dicht gepackt als homogene Zellmasse dar und wiesen rosettenartige Strukturen auf (Abbildung 9B).

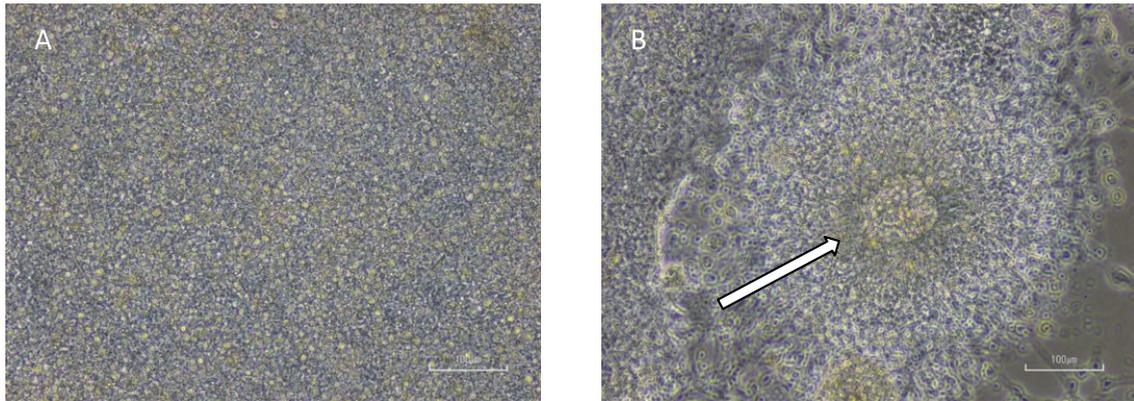


Abbildung 9: Morphologie der NSC an Tag 7

Lichtmikroskopische Aufnahmen in Phasenkontrast der NSC von MLUi001-F **A** Homogene Masse dichtgepackter Zellen mit kleinen Zellkernen **B** Rosettenartige Struktur (Pfeil) Maßstab 100 µm.

Das Vorliegen typischer neuronaler Zelleigenschaften konnte in allen Linien beobachtet werden (Abbildung 10). Die Zellen wiesen zum Großteil spindelförmige Zellkörper auf und waren multipolar, es konnten aber auch Zellen mit pyramidalen Zellkörpern ausgemacht werden. In manchen Bereichen waren die Zellen nahezu parallel angeordnet (Abbildung 10D), während sich die Zellen in anderen Bereichen eher haufenartig zusammenlagerten (Abbildung 10A).

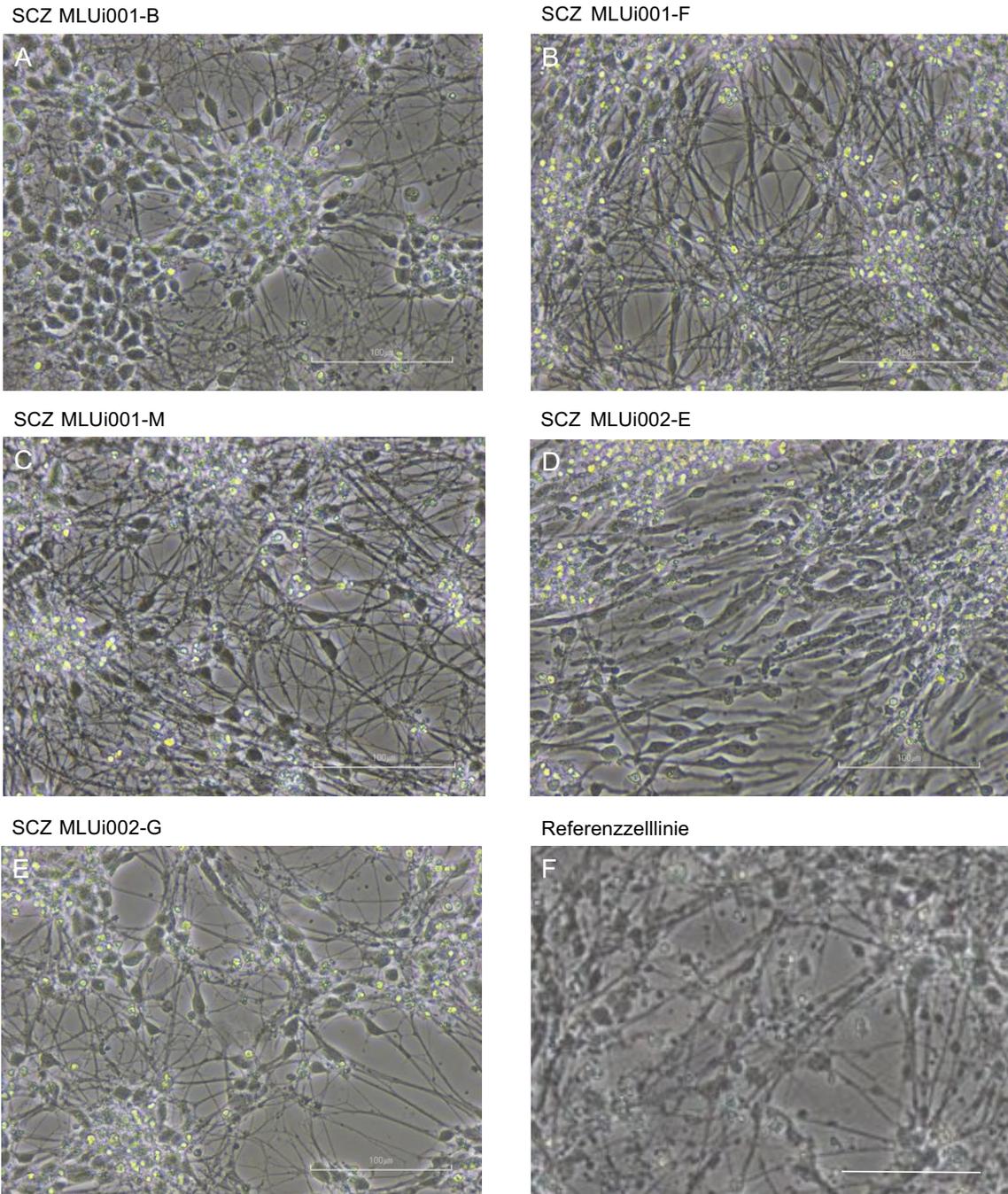


Abbildung 10: Morphologie der terminal differenzierten Zellen an 68 d (A-E) und 71 d (F) der Differenzierung
 Ausbildung neuronaler Morphologie in jeder der differenzierten SCZ-Zelllinien MLUi001-B/-F/-M, MLUi002-E/-G und der Referenzzelllinie WISCi004-B (Referenz). Maßstab 100 µm.

Im Verlauf der Differenzierung waren Unterschiede bezüglich der Dichte und Anordnung der Zellen zu erkennen (Abbildung 11). An Stellen mit geringerer Zelldichte wurde das Netzwerk der Dendriten sichtbar, das sich im Verlauf der Differenzierung kontinuierlich weiter ausprägte und verzweigte (Abbildung 11E).

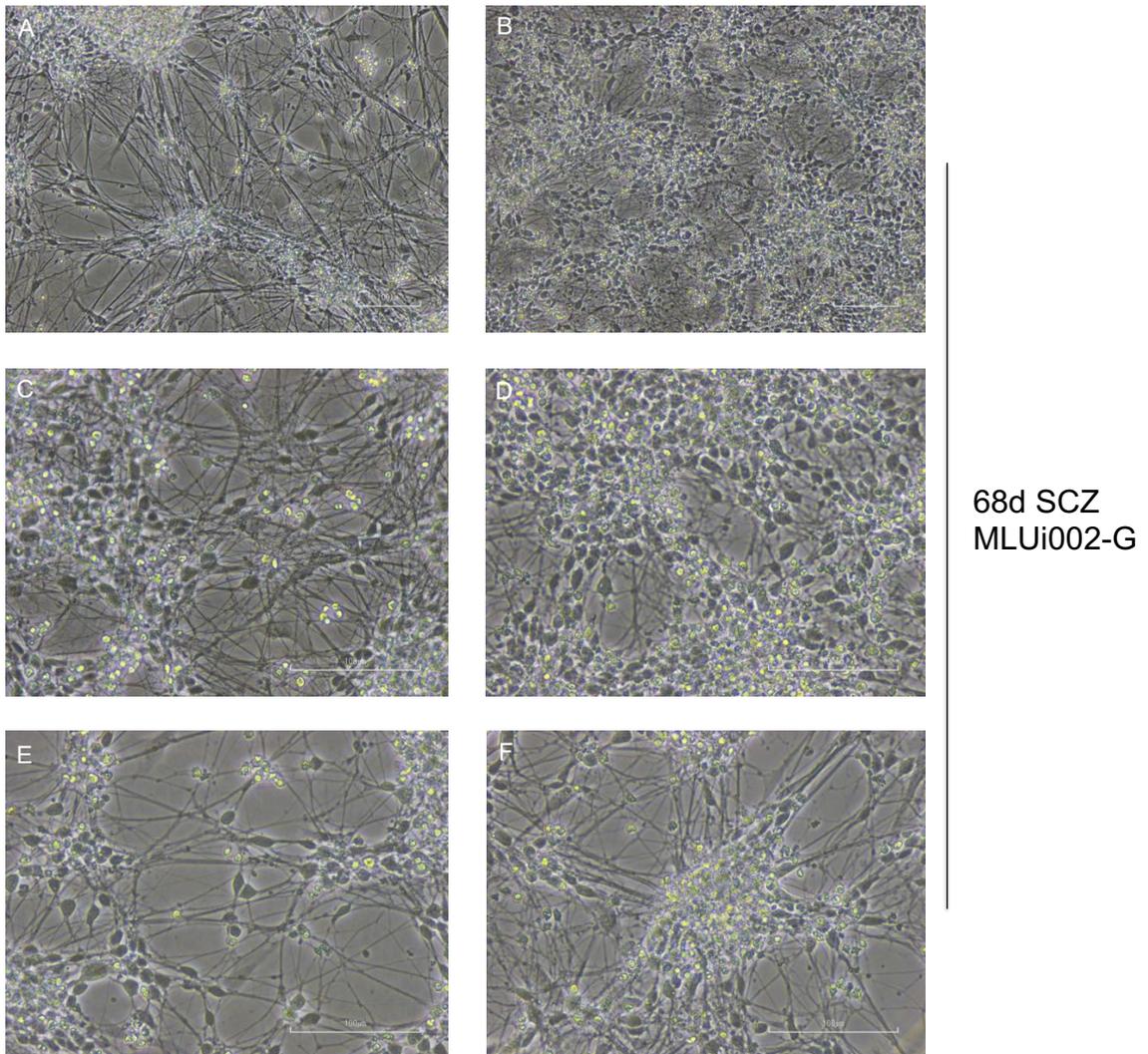


Abbildung 11: Morphologische Unterschiede innerhalb terminal differenzierter Mischkulturen aus Neuronen und Gliazellen

Die Zelldichte variierte stark. **A, C, E** Stellen mit geringerer Dichte. Teilweise wurde ein weit verzweigtes Dendritennetzwerk sichtbar. **B, D, F** Dichtere Bereiche mit kaum abgrenzbaren Zellausläufern. Maßstab 100 µm.

5.1.2 Transkriptanalyse der neuronalen Differenzierung

Um die Differenzierung der Zelllinien zu reifen Neuronen zu verifizieren, wurde eine PCR-Analyse auf Markergene (MSI1, TUBB3, SYT1, STX2, NLGN1) durchgeführt, die bei der neuronalen Differenzierung eine essenzielle Rolle spielen. Alle Marker wurden nachgewiesen (Abbildung 12).

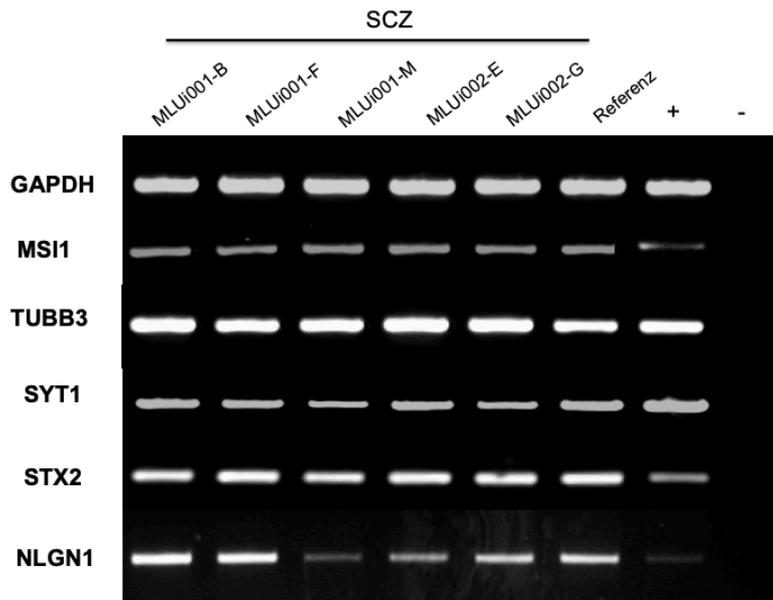


Abbildung 12: Transkriptanalyse der Zellen an 70 d der neuronalen Differenzierung

Nachweis der mit neuronaler Differenzierung assoziierten Marker in allen Zelllinien (MLUi001-B/-F/-M, MLUi002-E/-G, Referenz). Positivkontrolle cDNA aus humanem Hirngewebe. Negativkontrolle entionisiertes Wasser.

5.1.3 Expressionsanalyse mittels Immunfluoreszenz-Analyse

Ein weiterer Nachweis der erfolgreichen neuronalen Differenzierung der Zelllinien kann durch den Nachweis der Proteinexpression verschiedener Markerproteine, die in reifen Neuronen exprimiert werden, mittels Immunfluoreszenz-Analyse erfolgen. Hierfür wurden das neuronale Protein TUBB3 sowie die synaptischen Proteine NRXN1, NLGN1 und SYT1 mittels Antikörpermarkierungen in den Präparaten der differenzierten Zellkulturen detektiert (Abbildung 13). Die weite Vernetzung der neuronalen Zellen untereinander ist deutlich zu erkennen. Die Kernfärbung ist als Überlagerung mit den Markern gezeigt.

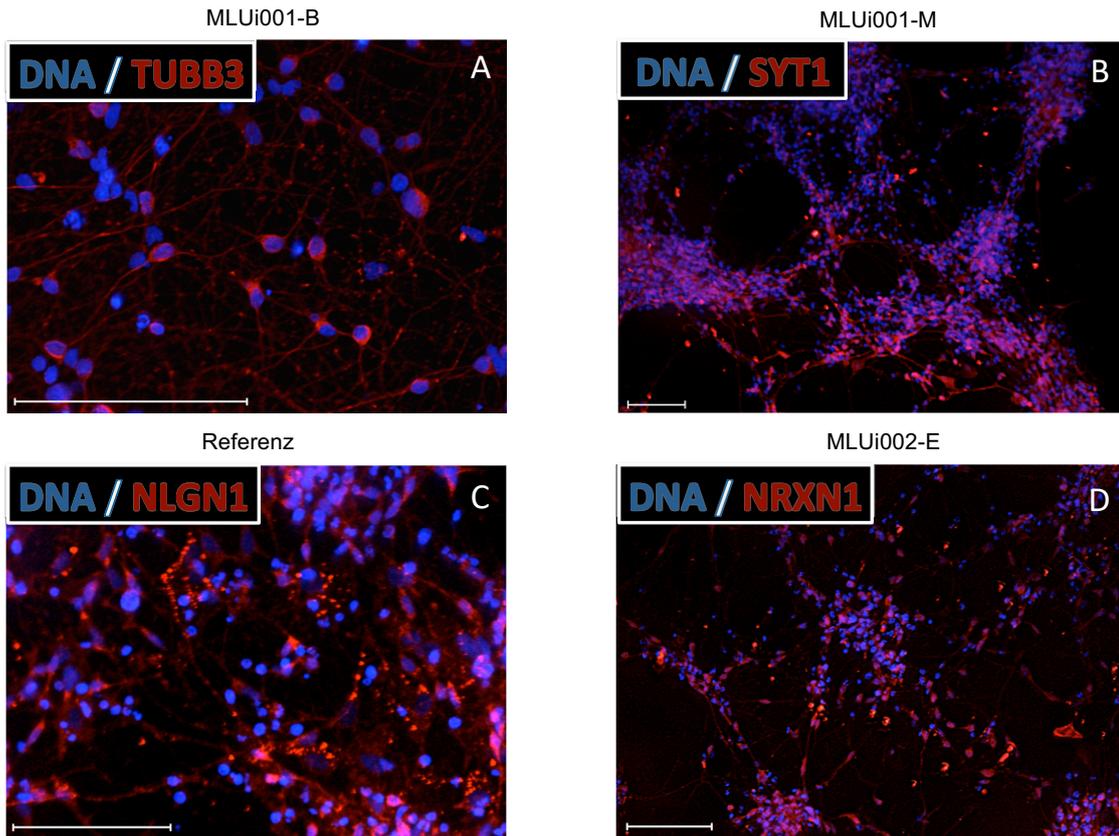


Abbildung 13: Immunfluoreszenz-Analyse der terminal differenzierten Zellen

A Nachweis des neuronalen Markers TUBB3 bei MLUi001-B. **B** SYT1 immunhistochemisch nachgewiesen bei MLUi001-M. **C** NLGN1, exprimiert von der Referenzzelllinie WISCi004-B. **D** Nachweis von NRXN1 in MLUi002-E. Maßstab 100 μ m.

4.3 Charakterisierung der Neuronensubtypen und Gliazellen

Im Laufe des Differenzierungsprozesses entwickelt sich keine reine Kultur kortikaler Neurone, sondern eine Mischkultur neuronaler und glialer Zellen. Die differenzierten Zelllinien wurden auf Marker neuronaler Subtypen sowie Gliazellen untersucht, um die Zellkultur weitergehend zu analysieren.

4.3.1 Semiquantitative Transkriptanalyse

Mittels PCR erfolgte in den differenzierten Zelllinien die Expressionsanalyse von Glutamat-Transporter SLC17A7 und Glutamat-Rezeptor GRIA2 als Marker glutamaterger Neurone sowie die Analyse des Enzyms GAD1 und des GABA-Rezeptors GABRB1 als Nachweis für das Vorliegen GABAerger Neurone. Die cDNA wurde aus Proben generiert, die an 70 d der Differenzierung entnommen wurden. Die Genexpression der Marker spezifischer neuronaler Subtypen konnte an 70 d der Differenzierung für alle Zelllinien nachgewiesen werden.

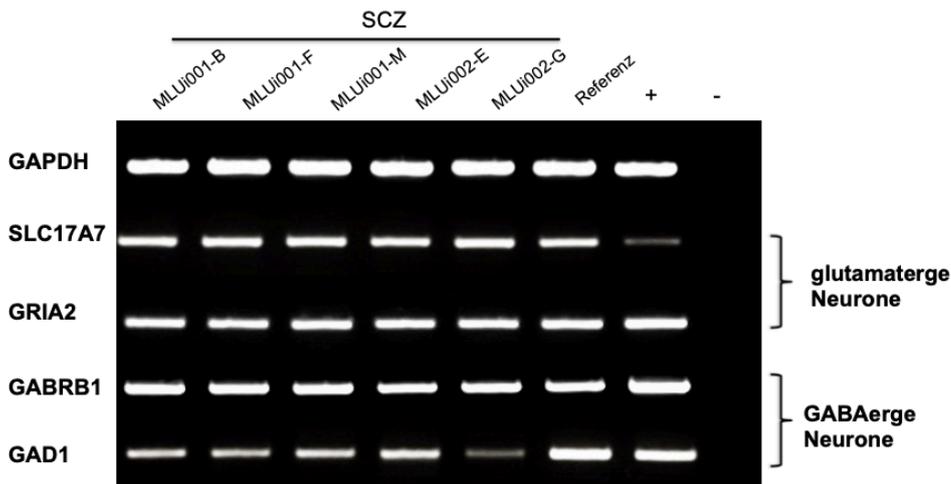


Abbildung 14: Transkriptanalyse der Marker neuronaler Subtypen in terminal differenzierten Zelllinien

Nachweis von Markern glutamaterger Neurone sowie GABAerger Neurone in allen Zelllinien (MLUi001-B/-F/-M, MLUi002-E/-G, Referenz). GAPDH als Referenzgen. Positivkontrolle (+) mit cDNA aus humanem Hirngewebe, Negativkontrolle (-) mit entionisiertem Wasser.

Zur Expressionsanalyse der Marker glialer Zellen wurden der Astrozytenmarker GFAP, der Oberflächenmarker CD68, der von Mikroglia exprimiert wird, MAG als Marker für reife Oligodendrozyten sowie OLIG2 als Marker für den Nachweis oligodendrozytärer Progenitorzellen untersucht. GFAP und CD68 waren in allen Zelllinien exprimiert. Mit Ausnahme von MLUi001-F konnte auch die Expression von OLIG2 in den differenzierten Zellen gezeigt werden. Der Oligodendrozytenmarker MAG wurde in keiner Zelllinie induziert.

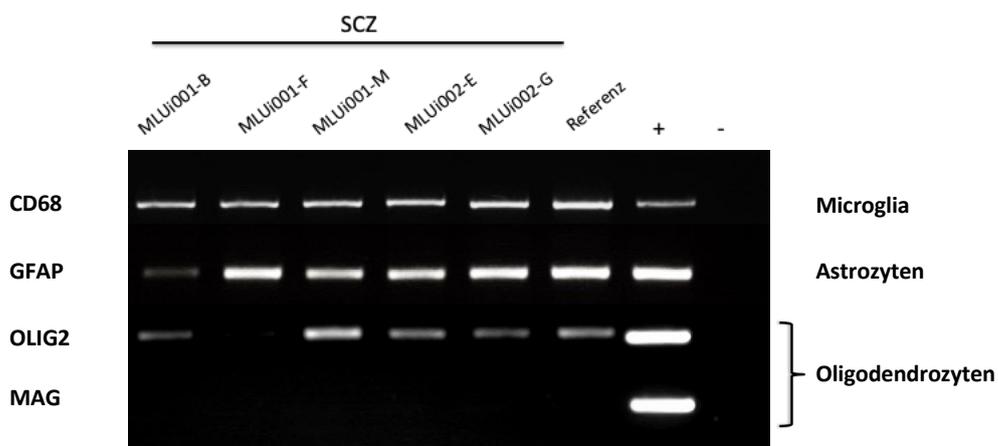


Abbildung 15: Transkriptanalyse glialer Marker

Nachweis von CD68 und GFAP in allen Zelllinien (MLUi001-B/-F/-M, MLUi002-E/-G, Referenz). OLIG2 mit Ausnahme von MLUi001-F überall exprimiert. Kein Nachweis von MAG in differenzierten Zelllinien. Positivkontrolle (+) cDNA aus humanem Hirngewebe. Negativkontrolle (-) entionisiertes Wasser.

4.3.2 Expressionsanalyse mittels Immunfluoreszenz-Analyse

Mittels Antikörpermarkierungen wurde die Expression einer Untereinheit des GABA-Rezeptors GABRB1 als Marker für GABAerge Neurone sowie eine Untereinheit des Glutamat-Rezeptors GRIA1 als Marker für glutamaterge Neurone untersucht. Abbildung 16 zeigt die deutliche Expression von GRIA1 in Zellen an 72 d der Differenzierung.

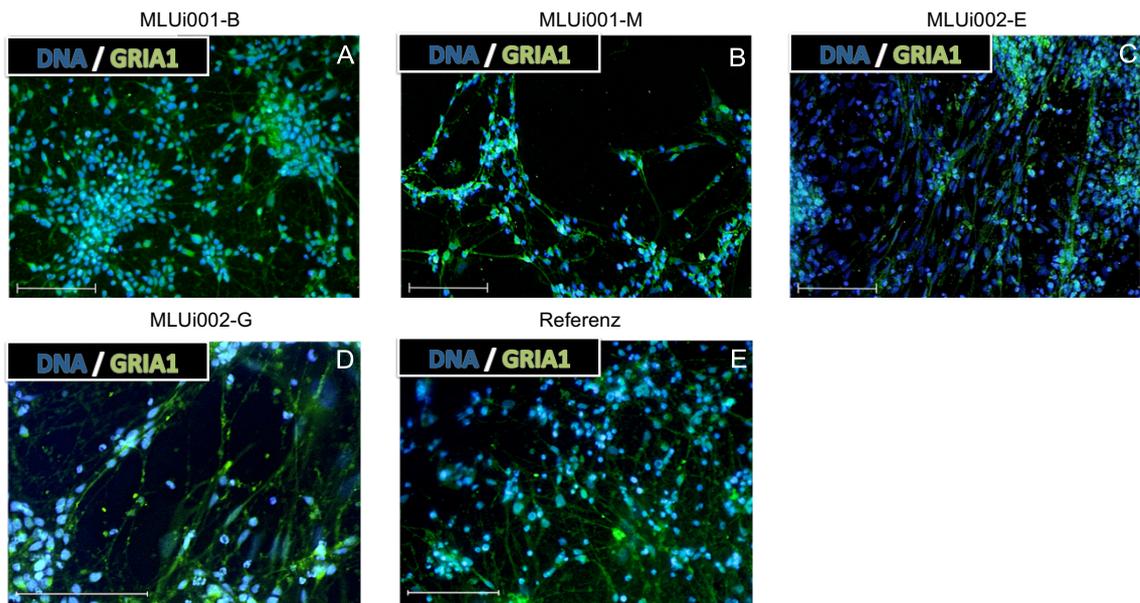


Abbildung 16: Immunhistochemische Analyse der Expression des Glutamatrezeptors GRIA1

Nachweis der Expression des Rezeptors GRIA1 in allen Zelllinien (MLUi001-B/-M, MLUi002-E/-G, Referenz). DNA (blau). Darstellung als Überlagerung. Maßstab 100 μm .

GABRB1 wurde in differenzierten Zelllinien mittels Immunfluoreszenz in der Mehrzahl der Zellen nachgewiesen (Abbildung 17).

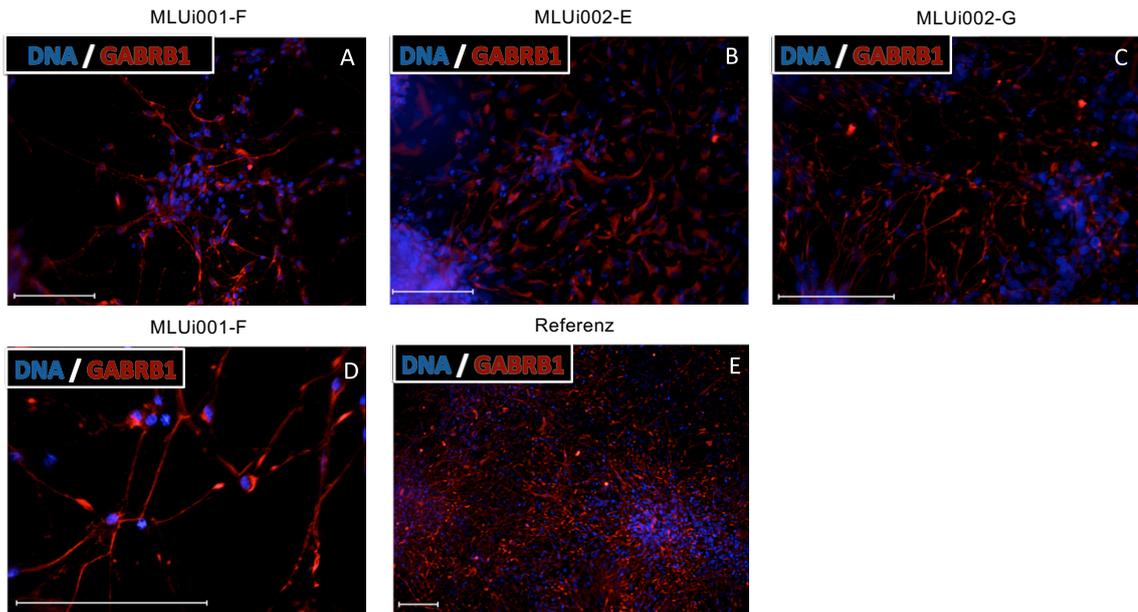


Abbildung 17: Immunhistochemische Analyse der Expression des GABA-Rezeptors beta1

Nachweis von GABRB1 in den Zelllinien MLUi001-F, MLUi002-E, -G, Referenz. DNA (blau) Darstellung als Überlagerung. Maßstab 100 µm.

4.3.3 Durchflusszytometrische Analyse der Neurone und Gliazellen in terminal differenzierten Zellkulturen

Um die Subpopulationen differenzierter Neurone und Gliazellen quantitativ zu bewerten, wurde eine durchflusszytometrische Analyse durchgeführt. Hierbei wurden nicht alle iPS-Zelllinien aus den vorangegangenen Versuchen herangezogen. Die Zellkulturen wurden am Ende der neuronalen Differenzierung analysiert.

Verglichen wurden zunächst MLUi002-E/-G und die pluripotente Referenzzelllinie WISCI004-B hinsichtlich glutamaterger und dopaminerger Neurone. Um glutamaterge Zellen zu detektieren, wurde SLC17A7 als Marker analysiert. Dieser wurde in den schizophreniespezifischen Neuronen der Linien MLUi002-E/-G in 71,6 % und 40,9 % der Zellen exprimiert. Die Analyse der Referenzzelllinie WISCI004-B ergab eine Expression in 61,2 % der Zellen (Abbildung 18). Dopaminerge Zellen wurden mittels eines Antikörpers gegen TH detektiert. Hier zeigte sich für die MLUi002-E/-G eine Expression in 12,4 % und 28,8 % der Zellen. In WISCI004-B waren 25,7 % der Zellen positiv für TH (Abbildung 18).

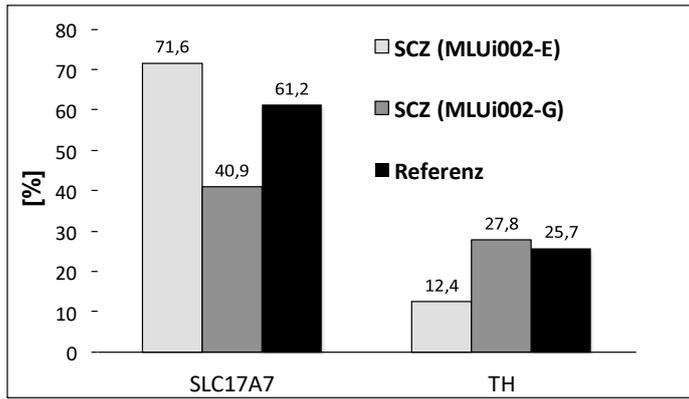


Abbildung 18: Quantitative Bestimmung von SLC17A7 und TH in differenzierten Zellkulturen mittels Durchflusszytometrie

Messung der Zelllinien MLUi002-E/-G und WISCi004-B nach Antikörpermarkierung, Ausschluss toter Zellen und Abgleich mit Isotypenkontrolle (>10.000 Events). Für die Analyse wurden 2 parallel differenzierte Kulturen vermischt und für jede Zelllinie gemessen. Balken zeigen den prozentualen Anteil glutamaterger Zellen positiv für SLC17A7 sowie den Anteil dopaminerger Zellen positiv für TH. n=1.

Um den Anteil von Astrozyten zu quantifizieren, wurden die Linien MLUi002-E/-G und Referenz hinsichtlich der Expression der astrozytenspezifischen Marker GFAP und EAAT1 analysiert. EAAT1 wurde in den beiden schizophreniespezifischen Zellkulturen im Vergleich zur Referenz in weniger Zellen nachgewiesen. Die quantitative Analyse des weiteren Astrozytenmarkers EAAT1 ergab für MLUi002-E/-G eine Expression von 16,8 % und 19,5 %. 26,0 % der terminal differenzierten Zellen der Referenzzelllinie WISCi004-B waren positiv für EAAT1 (Abbildung 19, Abbildung 20A). GFAP wurde im Vergleich zur Referenz ebenfalls in weniger Zellen der schizophreniespezifischen Linien MLUi002-E/-G detektiert. 0,1 % und 0,7 % der Zellen waren positiv für GFAP während in der Referenzzelllinie 0,8 % der Zellen GFAP-positiv waren (Abbildung 20A).

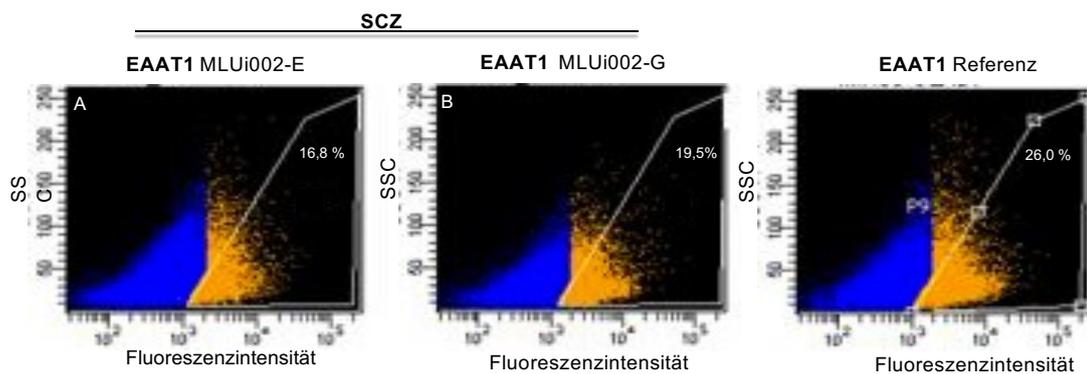


Abbildung 19: Durchflusszytometrische Analyse des Astrozytenmarker EAAT1 in schizophreniespezifischen Zelllinien und der Referenzzelllinie

Für die Analyse von Mikroglia wurde der Oberflächenmarker CD68 verwendet (Abbildung 20A).

Die patientenspezifischen Zellpopulationen exprimierten diesen in der Messung mit einem Wert von 29,5 % (MLUi002-E) und 20,8 % (MLUi002-G). Für die Referenzzelllinie wurde eine CD68-Expression von 29 % gemessen (Abbildung 20A).

Die Messung GFAP-positiver Zellen wurde auch für die Linien MLUi001-F/-M durchgeführt. Der Trend einer geringeren Anzahl an GFAP-positiven Zellen bestätigte sich (Abbildung 20B).

Zusammen zeigt die Analyse der GFAP-, EAAT1- und CD68-Expression das Vorhandensein von Zellen mit Eigenschaften von Astrozyten und Mikroglia in allen analysierten Zelllinien.

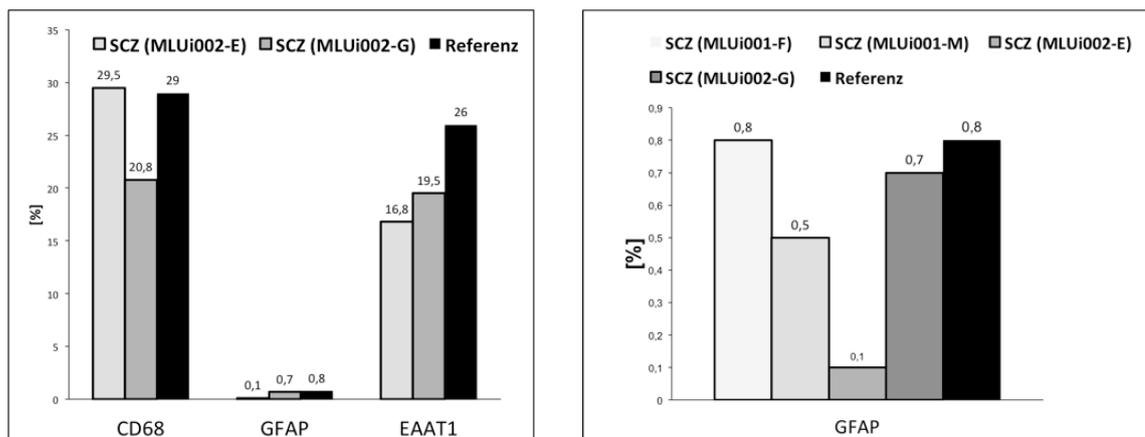


Abbildung 20: Quantitative Bestimmung von Gliazellmarkern bei den differenzierten Zellen mittels Durchflusszytometrie

A) Darstellung der Expression von CD68, GFAP und EAAT1 in den patientenspezifischen Zelllinien MLUi002-E, -G im Vergleich zur gesunden Referenzzelllinie WISCI004-B. **B)** Einzeldarstellung der GFAP-Expression in den terminal differenzierten patientenspezifischen Zellen im Vergleich zur Referenzzelllinie WISCI004-B.

In den aufbereiteten Proben findet sich immer ein gewisser Anteil toter Zellen der während der Differenzierung abstirbt oder durch die Präparation entsteht. Um diese apoptotischen Zellen zu detektieren, wurden 2 Proben der terminal differenzierten Zelllinien MLUi002-E/-G mit dem fluoreszierenden Interkalator 7-AAD markiert. Wie in Abbildung 21 zu sehen ist, befanden sich bei MLUi001-F 7,3 % und bei MLUi001-M 13,2 % der Zellen in avitalem Zustand.

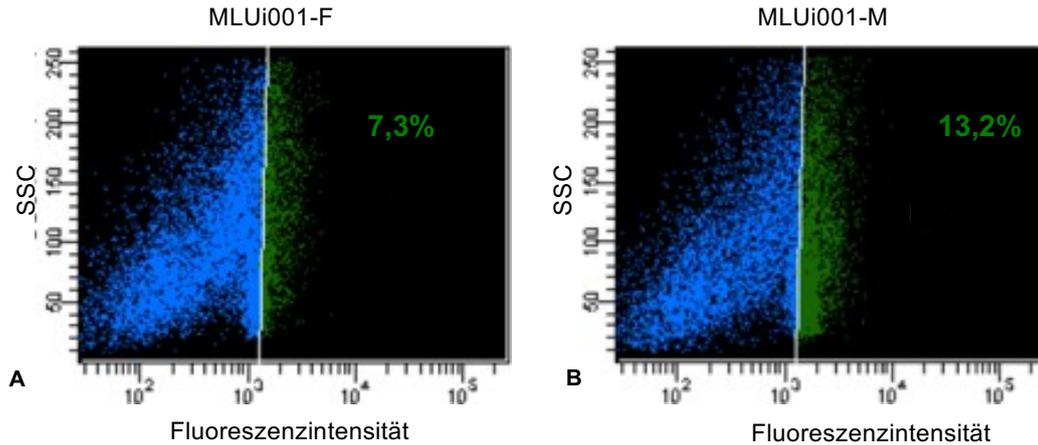


Abbildung 21: Darstellung mit 7-AAD markierter apoptotischer Zellen

Abgebildet ist die durchflusszytometrische Messung der Zelllinien MLUi001-F und -M, die mit 7-Aminoactinomycin (7-AAD) markiert wurden. Die als apoptotisch markierten Zellen (grün) machen bei MLUi002-E 7,3 % und bei MLUi002-G 13,2 % der Population aus.

4.4 Analyse der klinischen Symptomatik in Abhängigkeit zur Lokalisation der CNV in NRXN1

In Abhängigkeit zur Lokalisation der CNV in NRXN1 (der heterozygoten Deletion in NRXN1), wurde die Ausprägung der klinischen Symptomatik dreier an SCZ erkrankter Patienten analysiert. Diese werden im Folgenden als Patient 1 (IPS-Zellen nicht analysiert), Patient 2 (Spender für MLUi002-E/-G) und Patient 3 (Spender für MLUi003-A) bezeichnet.

Zur Erfassung und Objektivierung des klinischen Phänotyps der SCZ diente die PANSS (Tabelle 10). Hierbei wurde der Wert zum Zeitpunkt der Datenerfassung (E) betrachtet sowie der Wert der bis dato schwersten schizophrenen Episode (S), dargestellt auf Abbildung 22. Als anamnestische Ergänzung wurden Angaben aus Arztbriefen und zusätzlichen Fragebögen verwendet.

Tabelle 10: Angaben zu CNV und Klinik der SCZ-Patienten

Patient	CNV Name	CNV Länge (bp)	Fehlende Exons	Fehlender Promotor	PANSS (S)	PANSS (E)	Alter in Jahren bei Erstmanifestation
1	2p16.3	224.438	1-6	Ja	98 (P=29;N=25;G=44)	44 (P=9;N=13;G=22)	25
2	2p16.3	241.190	4-6	Nein	54 (P=16;N=14;G=24)	42 (P=16;N=11;G=15)	21
3	2p16.3	431.724	1-6	Ja	85 (P=24;N=22;G=39)	55 (P=15;N=17;G=23)	18

Patient 1 weist aufgrund der CNV mit einer Länge von 224.438 Basenpaaren eine heterozygote Deletion der Exone 1-6 in NRXN1 sowie ein Fehlen des Promotors auf. Die PANSS betrug während der schwersten Episode der Erkrankung insgesamt 98 (entspricht einer deutlichen Krankheitsbeeinträchtigung, Maximum 210), wobei sich dieser Wert aus 29 Punkten auf der Positivskala (P), 25 Punkten auf der Negativskala (N) und 44 Punkten auf der Skala der allgemeinen Psychopathologie (G) zusammensetzt. Zum Befragungszeitpunkt ergab sich ein Wert von 44 (P=9, N=13, G=22). In weiteren Fragebögen wurde der Verlauf der SCZ als episodisch eingeordnet. Bei dieser Verlaufsform zeigen sich klinisch mehrere Krankheitsepisoden sowie zusätzliche Residualsymptome zwischen den einzelnen Episoden. Als SCZ-Subtypus wurde für diesen Patienten ein paranoider Typus festgelegt. Der paranoide Typus zeichnet sich durch die übermäßige Beschäftigung mit einer oder mehrerer Wahnideen oder häufige akustische Halluzinationen aus. Anamnestisch ergaben sich bei Patient 1 Beziehungswahn, Verfolgungswahn, körperbezogener Wahn und Liebeswahn sowie akustische, optische und taktile Halluzinationen.

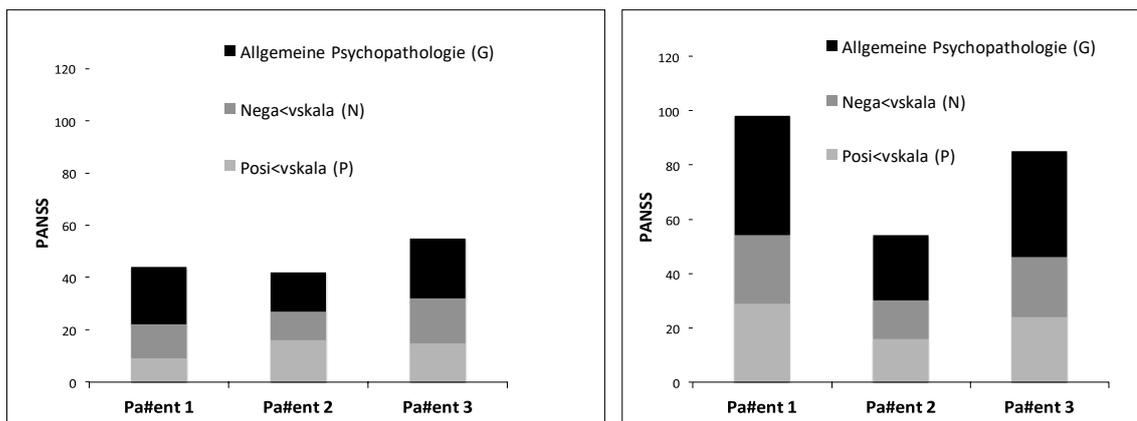


Abbildung 22: Darstellung der PANSS inklusive Subskalen zum Zeitpunkt der Datenerhebung (A) sowie während bis dato schwerster Episode (B) bei den SCZ-Patienten 1-3

A) Im Vergleich Patient 3 mit höchstem PANSS-Wert (55), gefolgt von Patient 1 (44) und Patient 2 (42). **B)** Maximalwert der PANSS 210. Höchster Wert erkennbar bei Patient 1 (98) gefolgt von Patient 3 (85) und Patient 2 (54).

Bei Patient 2 verursacht die CNV mit einer Länge von 241.190 bp eine heterozygote Deletion der Exone 4-6. Im Gegensatz zu den anderen beiden Patienten ist die Promotorregion nicht betroffen. Betrachtet man die klinische Symptomatik, so erreichte Patient 2 in der bis dato schwersten Episode einen PANSS Wert von 54. Der Wert setzte sich zusammen aus 16 Punkten auf der Positivskala, 14 Punkten auf der Negativskala und 24 Punkten auf der Skala der allgemeinen Psychopathologie. Der Wert zum Zeitpunkt der Befragung betrug 42 (P=16, N=11, G=15). In weiteren Fragebögen wurde der Verlaufstyp der SCZ bei Patient 2 als kontinuierlich

beschrieben, dabei liegen Symptome wie Wahn, Halluzinationen und Desorganisation (= A-Kriterium) fast immer vor. Bei der Beurteilung des Subtypus wurde Patient 2 eher dem paranoiden Typus zugeordnet. Anamnestisch ließen sich bei Patient 2 ein Beziehungswahn, Größenwahn sowie körperbezogener Wahn eruieren.

Patient 3 weist ebenso wie Patient 1 bei einer CNV mit einer Länge von 431.724 bp eine heterozygote Deletion der Exone 1-6 sowie ein Fehlen des Promotors auf. Im PANSS erreichte Patient 3 einen Wert von 85, zusammengesetzt aus 24 Punkten auf der Positivskala, 22 Punkten auf der Negativskala und 39 Punkten auf der Skala der allgemeinen Psychopathologie. Der Wert zum Befragungszeitpunkt betrug 55 (P=15, N=17, G=23). Der Verlauf wurde als episodisch beschrieben. Ebenso wie Patient 1 und 2, wurde Patient 3 dem paranoiden Typus zugeordnet. Anamnestisch wurden hier Verfolgungswahn, Beziehungswahn und optische sowie taktile Halluzinationen dokumentiert.

Vergleicht man die PANSS der 3 Patienten untereinander, so erreichten Patient 1 und 3 mit heterozygoter Deletion der Exone 1-6 und fehlendem Promotor des NRXN1 Gens sowohl zum Datenerfassungszeitpunkt als auch in der schwersten Krankheitsepisode relativ höhere Werte als Patient 2 mit heterozygoter Deletion von Exon 4-6 und nicht betroffenem Promotor. Da der Test unter anderem dazu dient, den Schweregrad der SCZ zu erfassen, kann man daraus schlussfolgern, dass Patient 1 und 3 unter einer stärkeren Krankheitsausprägung leiden, wobei Patient 1 mit einem Wert von 98 am schwersten betroffen ist.

Betrachtet man die pro Patient zu 2 Zweitpunkten erhobenen Skalen im Vergleich, lässt sich wie in Abbildung 23 dargestellt erkennen, dass die Werte bei Patient 2, bei dem ein kontinuierlicher Verlauf beschrieben wird, im Verhältnis weniger voneinander abweichen (S=55; E=42) als bei Patient 1 (S=98; E=44) und 3 (S=85; E=55), bei denen ein episodischer Verlauf vermerkt wurde.

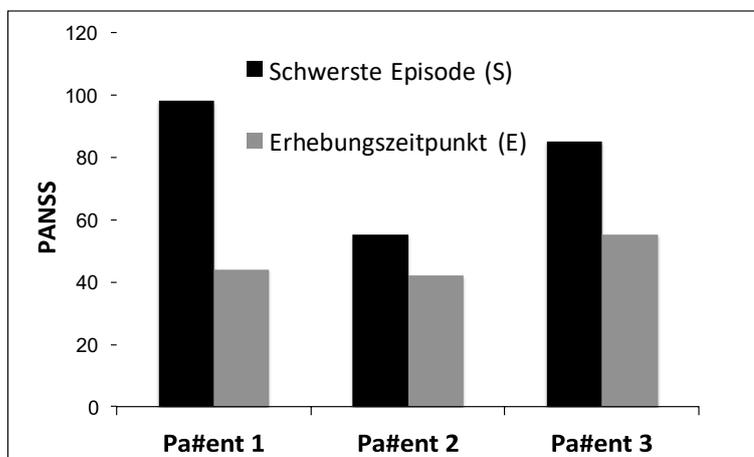


Abbildung 23: Darstellung der PANSS-Werte in schwerster Krankheitsphase (S, schwarz) und zum Zeitpunkt der Erhebung (E, grau)

Größte Varianz beider Werte erkennbar bei Patient 1. Patient 2 mit kontinuierlichem Krankheitsverlauf zeigte im Vergleich zu Patient 1 und 3 eher geringere Abweichung.

Des Weiteren ist erkennbar, dass der Wert der Positivskala zu den 2 Zeitpunkten bei Patient 1 und Patient 3 stärker variierte als der der Negativskala (Abbildung 24), was darauf zurückzuführen ist, dass während der schwersten Krankheitsphasen die psychotischen Symptome (=Positivsymptome) stark ausgeprägt sind, sich aber deutlich besser medikamentös behandeln lassen als die Negativsymptome, welche in den nicht-psychotischen Phasen eher im Vordergrund stehen.

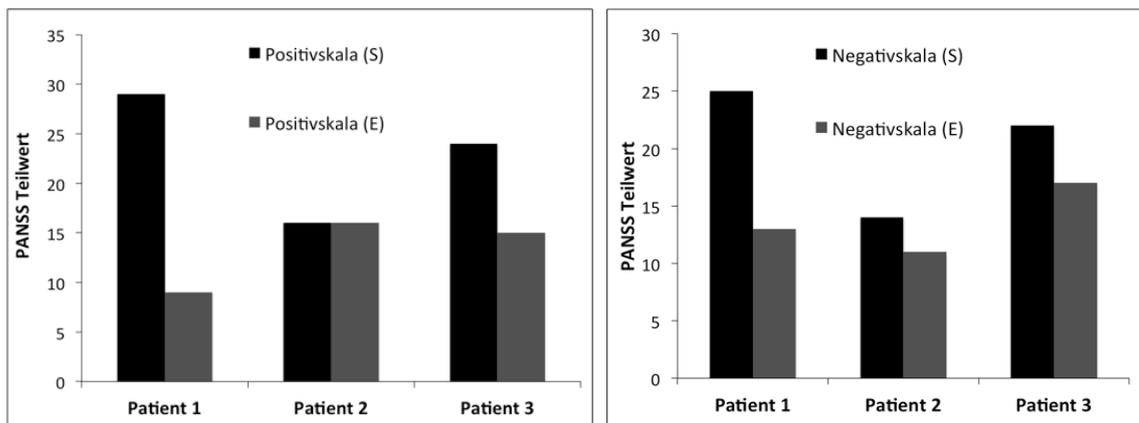


Abbildung 24: Darstellung der Positiv- (A) und Negativskala (B) im Einzelnen

A) Kein Abweichen der Positivskalenwerte bei Patient 2 mit kontinuierlichem Erkrankungsverlauf. Größte Abweichung beider Werte erkennbar bei Patient 1. **B)** Patient 1 mit größter Abweichung bei Vergleich beider Negativskalenwerte

Zusammenfassend zeigte sich in der Analyse der klinischen Symptomatik in Abhängigkeit von der Lokalisation der CNV in NRXN1 bei den Patienten mit fehlendem Exon 1-6 sowie fehlendem Promotor der gleiche zeitliche Verlaufstyp sowie höhere PANS Werte und eine größere Variation dieser in den beiden Erfassungssituationen im Vergleich zu Patient 2 mit betroffenem Exon 4-6.

5 Diskussion

Um die komplexe Pathogenese der SCZ zu verstehen, bedarf es mehrschichtiger und detaillierter Forschung. Die Herstellung und Analyse patientInnenspezifischer Neurone eröffnet die Möglichkeit vermutete Pathomechanismen *in vitro* zu untersuchen und mit Neuronen gesunder Referenzen zu vergleichen.

Die feste Etablierung eines Differenzierungsprotokolls sowie die Charakterisierung der differenzierten Zellen in der vorliegenden Arbeit schafft eine wichtige Grundlage, um die Auswirkungen von DNA-Variationen sowie deren vermutete schizophreneasoziierte Effekte auf zerebrale Prozesse weitergehend zu untersuchen. Im folgenden Abschnitt werden die Ergebnisse dieser Arbeit mit bisherigen wissenschaftlichen Erkenntnissen in Zusammenhang gestellt und kritisch beleuchtet.

5.1 Pluripotenzmarker

Um die Pluripotenz der in dieser Arbeit verwendeten iPS-Zellen nachzuweisen, wurden verschiedene Merkmale der Pluripotenz herangezogen. Eine Methode beinhaltete den Nachweis alkalischer Phosphatase-Aktivität in den iPS-Zellen (Abbildung 5). Die Aktivität dieses Enzyms wurde sowohl in ES als auch in iPS-Zellen in der Literatur mehrfach beschrieben (Pera, Reubinoff, and Trounson 2000; Takahashi *et al.* 2007; Nakagawa *et al.* 2008). Im Vergleich zu den nachfolgend diskutierten Markern, sind alkalische Phosphatasen auch in nicht vollständig reprogrammierten Zellen nachweisbar (Brambrink *et al.* 2008). Somit kann davon ausgegangen werden, dass diese Methode ein sinnvoller und evidenzbasierter Ansatz ist, um die Pluripotenz in den generierten iPS-Zellen zu einem frühen Zeitpunkt nachzuweisen.

Über eine Analyse der Genexpression wurde die Präsenz weiterer Pluripotenz-assoziiierter Marker nachgewiesen. Die Transkriptionsfaktoren OCT4, SOX2 und NANOG wurden als Hauptfaktoren zur Aufrechterhaltung der Pluripotenz und Selbsterneuerung von Stammzellen beschrieben (Boyer *et al.* 2005; Loh *et al.* 2006). Von den 3 Faktoren sind OCT4 sowie SOX2 essenziell für die erfolgreiche Reprogrammierung humaner Zellen, während NANOG entgegen der Ergebnisse, die Mitsui *et al.* in ES von Mäusen erzielten, nicht zwangsläufig erforderlich ist, sondern eher eine Rolle in der Aufrechterhaltung der Pluripotenz spielt (Takahashi *et al.* 2007; Mitsui *et al.* 2003). Die Transkriptionsfaktoren MYC und KLF4 wurden von Takahashi *et al.* ebenfalls als essenzielle Reprogrammierungsfaktoren identifiziert und können somit als Marker zur Verifizierung der Pluripotenz betrachtet werden (Takahashi *et al.* 2007). Die genannten Marker konnten in allen reprogrammierten Zelllinien auf Transkriptebene

nachgewiesen werden. Daher kann davon ausgegangen werden, dass die Zellen pluripotente Eigenschaften tragen (Abbildung 6).

Methodisch sinnvoll wäre eine weitere Verifizierung auf Proteinebene per Western Blot oder Immunfluoreszenzfärbung. Des Weiteren kann eine Analyse des DNA-Methylierungslevels sowie der Chromatinmodifizierung durchgeführt werden (Wernig *et al.* 2007). Eine weitere Möglichkeit, die Pluripotenz von iPS-Zellen nachzuweisen, würde ein Omics-basierter Ansatz wie der PluriTest bieten. Diese bioinformatische Methode weist über *microarray*-basierte Genexpressionsanalysen die Pluripotenz von Zellen hochsensitiv und spezifisch nach (Müller 2014; Müller *et al.* 2011).

5.2 B-Zellmarker

Zum weiteren Beweis, dass es sich bei den iPS-Zellen um keine differenzierten Zellen handelt, erfolgte die Untersuchung auf Marker differenzierter Zellen (Abbildung 7). Da es sich beim Ausgangsmaterial um B-Lymphozyten handelte und diese mittels EBV immortalisiert und zu B-lymphoblastoiden Zellen transduziert wurden, wurden die reprogrammierten iPS-Zellen auf B-zellspezifische Marker untersucht. Diese Marker sind spezifisch für differenzierte Lymphozyten und sollten in den reprogrammierten iPS-Zellen auf Transkriptebene nicht exprimiert werden.

5.2.1 Nicht-exprimierte B-Zellmarker

BTLA kodiert für den B- und T-Lymphozyten Attenuator, der eine Rolle in der Regulation der B-Zellaktivierung spielt und in unreifen B-Zell-Vorstufen relativ gering, dafür in den reifen B-Zellen der peripheren Blutbahn stärker exprimiert wird (Vendel *et al.* 2009). FCRLA als Gen kodiert für einen Fc-Rezeptor, der von der B-Zelllinie exprimiert wird (R. S. Davis *et al.* 2001; Hatzivassiliou *et al.* 2001). Die Expression intensiviert sich mit fortgeschrittenem Differenzierungsgrad der B-Zellen. Eine Überexpression konnte bei verschiedenen Lymphomen sowie Leukämien beobachtet werden und bietet somit ein potenzielles Therapieziel von Erkrankungen der B-Zelllinie (Leu *et al.* 2005; Du *et al.* 2008; Capone *et al.* 2016). Das Gen GPR183 kodiert für einen G-Protein-gekoppelten Rezeptor, der sich spezifisch in B-lymphozytären Zelllinien befindet (Birkenbach *et al.* 1993). Der Rezeptor unterstützt die richtige Anordnung von reifen B-Lymphozyten in Lymphfollikeln und ist sowohl in aktivierten als auch mit EBV-befallenen Zellen hochreguliert (Pereira *et al.* 2009; Cahir-McFarland *et al.* 2004). Das Fehlen dieser Marker in den iPS-Zellen konnte durch die Transkriptanalyse im Vergleich zu der lymphoblastoiden B-Zelllinie LCL-Ho, welche alle Marker exprimiert, gezeigt werden.

5.3 Spontane Differenzierung der iPS-Zellen

Ein Resultat der pluripotenten Eigenschaften der iPS-Zellen ist ihre Möglichkeit, sich in Derivate der 3 Keimblätter Mesoderm, Entoderm und Ektoderm zu differenzieren.

Auch wenn es Unterschiede hinsichtlich des zeitlichen Verlaufs der Expression jedes einzelnen Markers in den Zelllinien gab, exprimierte jede iPS-Zelllinie im Verlauf mindestens zu einen Zeitpunkt alle entoderm-, ektoderm- und mesodermspezifischen Marker (Abbildung 8).

5.3.1 Expression entodermaler Marker

Der Nachweis von CXCR4, SOX17 und FOXA2 bestätigte die Fähigkeit der iPS-Zellen sich in entodermale Strukturen zu differenzieren. CXCR4 kodiert für einen G-Protein-gekoppelten Rezeptor, der schon in der frühen Embryogenese in Zellen, die durch Primitivstreifen migrieren, exprimiert wird und in der Literatur als Entodermmarker beschrieben wird (Papapetrou *et al.* 2009). Während der Gastrulation findet sich CXCR4 nicht nur im definitiven Entoderm, sondern auch in mesodermalem Gewebe. Mit fortschreitender Embryogenese wird der Rezeptor in einer Vielzahl von Geweben exprimiert, so zum Beispiel auch im Neuroektoderm (McGrath *et al.* 1999; Yusuf *et al.* 2005). Im fertig entwickelten Organismus findet sich CXCR4 vor allem in B-Lymphozyten, aber auch in anderen Blutzellen wie Monozyten oder naiven T-Zellen (Förster *et al.* 1998). CXCR4 ist einer der Marker, der in der Transkriptanalyse von allen Zelllinien zu jedem Zeitpunkt exprimiert wurde. Es ist bekannt, dass iPS-Zellen eher in ihr Ursprungsgewebe differenzieren (K. Kim *et al.* 2010). Diese Beobachtung kann daher auch darauf beruhen, dass die Ursprungszellen der iPS-Zelllinien B-Lymphozyten waren.

SOX17 und FOXA2 und die von ihnen kodierten Transkriptionsfaktoren sind in der Entwicklung des definitiven Entoderms unabdingbar. Ying *et al.* zeigten in ihrer Studie, dass OCT4 neben der regulierenden Funktion innerhalb der Pluripotenzinduktion auch bei der Differenzierung embryonaler Stammzellen im Zusammenspiel mit den entoderm-regulierenden Faktoren SOX17 und FOXA2 eine wichtige Rolle innehat (Ying *et al.* 2015).

5.3.2 Expression mesodermaler Marker

Die Ausbildung mesodermaler Strukturen wurde über den Transkriptnachweis der Marker TBXT, PRRX1 und MOX1 nachgewiesen. TBXT kodiert für einen Transkriptionsfaktor, der ausschlaggebend für die Entwicklung des Mesoderms ist (Papaioannou 2014). Es wird zunächst während der Gastrulation im Primitivstreifen exprimiert und später auch in der *Chorda dorsalis* (Herrmann *et al.* 1990). PRRX1 spielt als Transkriptionsfaktor und Induktor der epithelialen-mesenchymalen Transition in embryonalen aber auch Krebszellen eine wichtige Rolle in der

Forschung zur Entstehung von Metastasen. Bei Verlust von PRRX1 sind Krebszellen in der Lage die oben genannte Transition umzukehren und weitere krebs-induzierende Fähigkeiten zu erlangen (Ocaña et al. 2012). MOX1 kodiert einen Transkriptionsfaktor, der während der Embryogenese eine Rolle in der Entwicklung der Somiten spielt und dem unter anderem eine Bedeutung bei der Entstehung von Brust- und Lungenkrebs beigemessen wird (Sun et al. 2019).

5.3.3 Expression ektodermaler Marker

Durch den vollständigen Transkriptnachweis von PAX6 und SHH wurde die Ausbildung ektodermaler Strukturen bestätigt. PAX6 wird als Marker neuroektodermaler Strukturen zur frühen Überprüfung der neuralen Induktion verwendet und seine Expression durch Neurotrophine wie BDNF erhöht (Chambers et al. 2009; Callaerts, Halder, and Gehring 1997; Kioussi and Gruss 1994). SHH wird in der embryonalen Entwicklung im Bereich der *Chorda dorsalis* sezerniert und maßgeblich an der Ventralisierung neuraler Vorläuferzellen beteiligt, was unter anderem für die Ausbildung von Interneuronen relevant ist (Kiecker and Lumsden 2012; Ericson et al. 1995; Lupo, Harris, and Lewis 2006).

Die hier analysierten Marker wurden zunächst auf Transkriptebene nachgewiesen. Eine weitere Möglichkeit wäre der Nachweis auf Proteinebene per Western Blot und immunhistochemischer Färbung.

Ein anderer Weg die Differenzierungsfähigkeit der iPS-Zellen zu testen, ist der *in vivo* Nachweis in Mäusen. Nach der Injektion von ES oder iPS-Zellen in immundefiziente Mäuse bildeten sich bei diesen daraufhin Teratome, wobei es bei iPS-Zellen zu einer schnelleren und effizienteren Teratomentwicklung kommt (Przyborski 2005; Gutierrez-Aranda et al. 2010). Als Teratome werden Tumore bezeichnet, die eine Mischung aus differenziertem Gewebe aller 3 Keimblätter enthalten. Diese Methode stellte lange eine wichtige Möglichkeit und den Goldstandard für das erweiterte Screening von iPS-Zellen dar, auch wenn standardisierte Protokolle dafür fehlten (Müller et al. 2010). Moderne Omics-basierte Verfahren werden aber heute von vielen WissenschaftlerInnen als gleichwertig hinsichtlich ihrer Aussagekraft über die Pluripotenz angesehen.

In Bezug auf zukünftige Therapiekonzepte, die mit der Transplantation von iPS-Zellen einhergehen, sollte die potenzielle Ausbildung von Teratomen als wichtiger, nicht zu vernachlässigender Risikofaktor berücksichtigt werden.

5.4 Terminale Differenzierung

Veränderungen im präfrontalen Kortex von SCZ-PatientInnen stellen einen der Schwerpunkte im Bereich der Erforschung der Pathogenese der Erkrankung dar.

In Studien wurden eine verringerte Dichte und Verzweigungen der *Spines* demonstriert sowie eine funktionelle Hypofrontalität sowie eine generelle Verminderung der grauen Substanz des PFC (Wong and Van Tol 2003; Selemon and Goldman-Rakic 1999; Carter *et al.* 1998; Schlaepfer 1994). Diese Ergebnisse beruhen vorrangig auf *post mortem* Studien, sowie auf der Auswertung bildgebender Verfahren. Brennand *et al.* untersuchten Neurone, die aus iPS-Zellen von SCZ-PatientInnen kultiviert wurden. Diese wiesen eine verminderte neuronale Konnektivität sowie Neuritenanzahl bei unveränderter Expression von Glutamatrezeptoren auf (Brennand *et al.* 2011). In der vorliegenden Arbeit konnte ebenfalls kein signifikanter Unterschied in der Expression detektiert werden. Wie sich die in GWAS detektierten SCZ-assoziierten Gene, im Falle dieser Arbeit NRXN1, auf molekularer Ebene auswirken ist jedoch nach wie vor eine der zentralen Fragen der Forschung.

5.4.1 Generierung von NSC

Um die iPS-Zellen zu reifen neuronalen Zellen zu differenzieren, erfolgte zunächst die Generierung neuraler Stammzellen. Zu diesem Zweck wurde der Weg einer schnellen neuronalen Induktion gewählt, indem die iPS-Zellen über 7 d mit NIM kultiviert wurden. Die Protokolle zur Generierung von NSC basierten lange Zeit auf einem *embryoid body* (EB)-Modell (S.-C. Zhang *et al.* 2001; Elkabetz *et al.* 2008). Bei EB handelt es sich um Zellaggregate, die in den Grundzügen die Embryogenese *in vitro* abbilden. Sie entstehen, wenn Stammzellen ohne Kontakt zu einer Oberfläche kultiviert werden. Nachteile dieses Modells sind jedoch relativ geringe Erträge trotz eines im Verhältnis langwierigen Differenzierungsprozesses, sowie viele Zwischenschritte, die unter relativ undefinierten Kultivierungsbedingungen ablaufen. Chambers *et al.* publizierten 2009 eine Methode, die über eine duale SMAD-Inhibition zur schnelleren und hoch effizienten neuronalen Induktion von pluripotenten Stammzellen führt (Chambers *et al.* 2009). Die duale SMAD-Inhibition wird über Noggin und SB431542 vermittelt, welche zu einer Blockade von SMAD-Molekülen im TGF-beta Signalweges führen. Noggin ist ein BMP-Inhibitor, der zunächst in Fröschen und später auch in Säugetieren als einer der für die neurale Induktion essenziellen Faktoren beschrieben wurde (W. C. Smith and Harland 1992; Valenzuela *et al.* 1995). SB431542 führte schon im EB-basierten Protokoll zu einer verbesserten neuronalen Induktion (J. R. Smith *et al.* 2008). In kombinierter Anwendung konnte bei >80 % der kultivierten Zellen eine

effiziente neurale Induktion durch den Nachweis von PAX6 detektiert werden, während bei der Zugabe einer der Faktoren eine Effizienz von <10 % beobachtet wurde (Chambers *et al.* 2009). Für die vorliegende Arbeit wurde die Differenzierung der iPS-Zellen zu NSC als epitheliale Kultur mittels NIM gewählt (Abbildung 9). Im Vergleich zu einem EB-basierten Protokoll ist sie schnell durchführbar und mit relativ simpler technischer Handbarkeit lässt sich eine adäquate Menge an Ausgangsmaterial für die terminale Differenzierung gewinnen.

5.4.2 Generierung von Neuronen

Die während der embryonalen Neurogenese stattfindende Entstehung unterschiedlicher regionaler Identitäten ist von Gradienten bestimmter Morphogene abhängig. Unterteilt werden eine anterior-posteriore sowie eine dorsal-ventrale Achse. *In vitro* lassen sich durch das Wissen um die Achsen und die Morphogengradienten, die diese beeinflussen, gezielt Progenitorzellen einer bestimmten regionalen Identität differenzieren. So lässt sich beispielsweise mittels RA und SHH eine Lenkung der Entwicklung in Richtung der posterioren und dorsalen Achse und somit die Differenzierung von Motorneuronen des Rückenmarks erreichen (Hu and Zhang 2009).

In der vorliegenden Arbeit wurden die NSC zunächst für 7 d in einem Medium, welchem Wnt3a und Cyclopamine-KAAD zugesetzt wurde, kultiviert. Cyclopamin sorgt für eine Blockade des SHH-Signalweges, indem es die zelluläre Antwort auf das *Hedgehog* Signal blockiert (Chen *et al.* 2002). In der Abwesenheit von SHH kommt es zur Ausbildung glutamaterger sowie GABAerger Neurone aus Progenitorzellen (Liu and Zhang 2011). Wnt3a sorgt je nach Konzentration für eine Lenkung der Differenzierung in Richtung des Vorder-, Mittelhirns oder Rhombencephalons und ist eines der Morphogene, das für die Entstehung von dopaminergen Neuronen verantwortlich ist (Liu and Zhang 2011; Arenas 2014).

Die weitere Reifung der neuronalen Vorläuferzellen lief unter der Zugabe der neurotrophen Faktoren BDNF, GDNF und cAMP ab. Die Verwendung dieser Faktoren findet eine breite Anwendung in bereits publizierten Protokollen zur Differenzierung von iPS-Zellen zu Neuronen (Israel *et al.* 2012; Kondo *et al.* 2013; Brennand *et al.* 2011; Zeng *et al.* 2010).

Lichtmikroskopisch ließen sich bei den Zellen für Neurone charakteristische Somata sowie ein dichtes weitverzweigtes Netzwerk ihrer Zellfortsätze beobachten. Diese mikroanatomischen Gegebenheiten lassen die Annahme zu, dass es sich bei den differenzierten Zellen um Neurone handelt (Abbildung 10 und 11).

5.4.3 Transkript- und Proteinanalyse zum Nachweis von Neuronen

Um die erfolgreiche Differenzierung der iPSC-Zellen zu Neuronen zu verifizieren, wurden neuronale Reifemarker auf Transkript- und Proteinebene untersucht.

Der Nachweis von MSI1 ist Hinweis auf die Präsenz von NSC in den Zelllinien. Das RNA-bindende Protein wird vorrangig im ZNS und PNS exprimiert und trägt zum Selbsterneuerungspotenzial von NSC bei (Sakakibara *et al.* 1996; Okano *et al.* 2005). Bei aufgehobener MSI1-Expression vermindert sich der Anteil reifer Neurone, daher trägt MSI zur verbesserten und erfolgreichen Differenzierung von NSC in reife Neurone bei (Battelli *et al.* 2006).

TUBB3 bildet einen integralen Bestandteil von Mikrotubuli. Das Protein wird im ZNS fast ausschließlich von Neuronen exprimiert und daher als allgemeiner neuronaler Marker verwendet (Katsetos *et al.* 2003; Wernig *et al.* 2008; Koch *et al.* 2009b; Israel *et al.* 2012). Mutationen im Bereich des Gens können zu Störungen in der Entwicklung kortikaler und axonaler Strukturen führen (Tischfield *et al.* 2010; Poirier *et al.* 2010). Der Marker konnte in den differenzierten Zelllinien auf Transkript- und Proteinebene nachgewiesen werden, was ein Hinweis dafür ist, dass eine erfolgreiche Ausbildung von Neuronen stattgefunden hat. Um den Anteil TUBB3-positiver Neurone im Verlauf der Differenzierung auch quantitativ zu bestimmen, wäre eine Analyse mittels Durchflusszytometrie denkbar.

Der Transkriptnachweis von SYT1, STX2, VAMP2 und NLGN1 deutet auf das Vorhandensein wesentlicher, für die Exozytose von Vesikeln notwendiger, Komponenten in den differenzierten Neuronen hin, zu denen auch NRXN1 zählt. STX2 UND VAMP2 bilden zusammen mit anderen Proteinen den SNARE-Komplex, welcher ein essenzieller Bestandteil der erfolgreichen Neurotransmitterausschüttung ist. In VAMP2-defizienten Mäusen konnte gezeigt werden, dass die Ca²⁺-getriggerte Vesikelfusion um ein 100-faches erniedrigt war (Schoch *et al.* 2001).

TUBB3, SYT1, NLGN1 und NRXN1 wurden auch auf Proteinebene nachgewiesen (Abbildung 13). Die Expression dieser Marker deutet darauf hin, dass es im Laufe der Differenzierung zu einer Ausbildung synaptischer Strukturen gekommen ist.

Der Nachweis von Markern glutamaterger sowie GABAerger Neurone auf Transkript- und Proteinebene unterstützt die These, dass die Differenzierung in eine kortikale Richtung gelenkt wurde. In der durchflusszytometrischen Analyse machten die SLC17A7-positiven Zellen den größten Anteil der neuronalen Mischkultur aus. Cao *et al.* zeigten mit einem ähnlichen Protokoll, dass die Zugabe von Cyclopamin die Zunahme des Anteils glutamaterger Neurone durch die Inhibierung des Anteils GABAerger Neurone bewirkt (Cao *et al.* 2017).

GAD1 ist ein Schlüsselenzym der GABA-Synthese und Veränderungen in der Qualität und Quantität dieses Enzyms werden immer wieder im Zusammenhang mit SCZ diskutiert. In *post mortem* Studien konnten wiederholt verminderte GAD1-Level bei SCZ gezeigt werden, was die These eines GABAergen Defizits bei SCZ stützt (Akbarian *et al.* 1995; Thompson *et al.* 2009; Duncan *et al.* 2010). Eine durchflusszytometrische Analyse hinsichtlich dieses Markers wäre sinnvoll, um diese Veränderungen auch *in vitro* replizieren zu können.

5.5 Analyse der Gliazellen

Zur Überprüfung der erfolgreichen Generierung von Gliazellen wurden Marker verschiedener glialer Zelltypen auf Transkriptebene analysiert. GFAP, als astrozytenspezifischer Marker, konnte in allen Zelllinien nachgewiesen werden. Die in diesem Protokoll erfolgte Zugabe von Cyclopamin fördert unter anderem die Entstehung von GFAP-positiven Zellen, wie bei der Differenzierung von ES gezeigt werden konnte (Lee *et al.* 2006). CD68 als Marker für Mikroglia wurde ebenfalls in allen Zelllinien detektiert (Abbildung 15).

5.5.1 Oligodendrozyten

OLIG2 und MAG wurden als Marker für den Transkriptnachweis oligodendrozytärer Strukturen gewählt. OLIG2 ist ein Transkriptionsfaktor, der sowohl die Bildung von OPC als auch die Ausbildung reifer Oligodendrozyten beeinflusst. Des Weiteren ist seine Anwesenheit für die Differenzierung von Motoneuronen notwendig (Lu *et al.* 2002). Der Weg von OPC zu reifen Oligodendrozyten ist *in vivo* und *in vitro* SHH-abhängig (Lu *et al.* 2000). Bei einer Abwesenheit von SHH oder dessen Inhibierung durch Cyclopamin ist die Generierung von OPC weitestgehend supprimiert. OLIG2 wurde in den differenzierten Zelllinien, abgesehen von MLUi001-F, auf Transkriptebene nachgewiesen. Dieses Ergebnis lässt allerdings keine quantitative Aussage zu, daher wäre eine Analyse mittels quantitativer real-time PCR oder Durchflusszytometrie denkbar, um die Ausbildung von OPC durch das vorliegende Differenzierungsprotokoll quantitativ zu bewerten. Auch die histochemische Darstellung der Myelinisierung der Oligodendrozyten wäre möglich.

Im Gegensatz zu OLIG2 konnte MAG in keiner der differenzierten Zelllinien nachgewiesen werden (Abbildung 15). Das Protein befindet sich in der Membran reifer Oligodendrozyten und ist in den Prozess der Myelinisierung von Axonen involviert (Trapp *et al.* 1989). Die Abwesenheit des Markers auf Transkriptebene ist Hinweis darauf, dass in der vorliegenden Kultur keine reifen Oligodendrozyten vorlagen. Das Auftreten reifer Oligodendrozyten während der Entwicklung des ZNS ist *in vivo*, aber auch *in vitro*, ein langwieriger Prozess und findet erst nach der Neurogenese und Astrogligenese statt. In der Literatur wird *in vitro* von

einem Auftreten nach etwa 15 Wochen gesprochen, es existieren jedoch auch Protokolle, in denen O4-positive Oligodendrozyten schon nach 10 Wochen detektiert werden konnten (Liu and Zhang 2011; Falk *et al.* 2012). Da der Fokus in der vorliegenden Arbeit vorrangig auf die Untersuchung der Neurone gelegt wurde und eine Kultivierung über den gewählten Untersuchungszeitraum hinaus schwierig zu bewerkstelligen ist, kann über die Existenz und Entstehung reifer Oligodendrozyten im weiteren Verlauf durch das verwendete Differenzierungsprotokoll nur begrenzt eine Aussage getroffen werden. Der Nachweis von OLIG2 kann jedoch als Hinweis auf die Anwesenheit oligodendrozytärer Vorläuferzellen gewertet werden. Um die Entstehung von Oligodendrozyten im Rahmen des verwendeten Protokolls noch weiter zu charakterisieren und gegebenenfalls deren Rolle in der Pathogenese der SCZ zu untersuchen, wäre eine längere Kultivierung der Zellen und die Anwendung weiterer Methoden denkbar.

5.6 Differenzierungsprotokoll

Das verwendete Zellkultursystem bietet eine solide Möglichkeit, iPS-Zellen in kortikale Strukturen zu differenzieren. Ein Manko ist jedoch die Zweidimensionalität des Systems, das die *in vivo* vorliegenden neuronalen Schaltkreise, deren Plastizität und generell die neuronale Entwicklung nur bedingt abbilden kann. Ein Ansatz, der dieses Defizit beheben kann, ist die Differenzierung von iPS-Zellen in sogenannte zerebrale Organoide. Hierbei werden iPS-Zellen ähnlich zur hier durchgeführten Methode mittels bestimmter Zusätze in den Medien in die neurale Richtung differenziert. Die Kultivierung findet in sogenannten *Spinning* Reaktoren statt, die das dreidimensionale Wachstum der Organoide ermöglichen. Mit diesem dreidimensionalen Ansatz besteht die Möglichkeit, gezielt bestimmte Hirnregionen zu differenzieren. Um den zerebralen Kortex *in vivo* in Organoiden abzubilden, wurden bisher verschiedene Protokolle etabliert (Mariani *et al.* 2012; Paşca *et al.* 2015). Qian *et al.* gelang die Generierung von Organoiden, welche der tatsächlichen Anatomie des menschlichen Kortex nahekommen. Neben einer äußeren Schicht von Gliazellen wiesen die Organoide alle 6 Schichten des Kortex auf, sowie Populationen verschiedener Interneurontypen (Qian *et al.* 2016). Ein weiterer Vorteil dieser Methode ist die, im Gegensatz zu den hier differenzierten Neuronen, längere Kultivierbarkeit, die auch über ein Jahr hinausreichen kann. Srikanth *et al.* untersuchten in Organoiden die Auswirkungen einer Unterbrechung des Gens DISC1, welches zu den assoziierten Risikogenen bei SCZ zählt und stellten unter anderem eine veränderte Morphologie in diesen fest (Srikanth *et al.* 2018). In der Literatur findet sich bisher kein Hinweis auf die Kultivierung von Organoiden aus iPS-Zellen mit NRXN1-Mutation. Somit bietet

diese Methode einen interessanten Ansatz zur *in vitro* Erforschung entwicklungs- und schizophreniespezifischer Veränderungen im Hinblick auf eine Mutation in NRXN1.

Durch die lange Differenzierungsdauer des verwendeten Protokolls wird gewährleistet, dass auch Zellsubtypen wie Interneurone und Gliazellen generiert werden, welche sowohl in der *in vivo* als auch in der *in vitro* Neurogenese erst zu einem späteren Zeitpunkt entstehen. Jedoch bringt dieser lange Prozess das Risiko mit sich, dass die Heterogenität von Zellsubpopulationen innerhalb der verschiedenen Linien zunimmt. Um dem entgegenzuwirken, wäre eine schnellere und ähnlich effiziente Differenzierung denkbar. Zhang *et al.* gelang es mittels der forcierten Expression von nur einem Transkriptionsfaktor innerhalb von 2 Wochen aus iPSC-Zellen hocheffizient IN-Zellen zu generieren (Y. Zhang *et al.* 2013). Die durch die Überexpression von NGN2 generierten Neurone entsprachen dem Phänotyp eines kortikalen Neurons aus der 2. und 3. Kortexschicht und waren in der Lage reife Synapsen auszubilden und sich in existierende neuronale Netzwerke integrieren zu lassen. Das Protokoll wurde von Ho *et al.* modifiziert, indem als Ausgangszellen für die neurale Induktion mittels NGN2 *forebrain* neurale Progenitorzellen gewählt wurden, um eine methodische Variabilität zu vermindern und diese aufgrund besserer Handbarkeit für große Versuchsreihen geeigneter zu machen (Ho *et al.* 2016).

Durch diese Protokolle ist es möglich hocheffizient und in kurzer Zeit reife Neurone zu generieren, was auch zum Modellieren psychiatrischer Erkrankungen sinnvoll wäre. Ein Nachteil gegenüber dem in der Arbeit von Ho *et al.* verwendeten Protokoll ist jedoch die Differenzierung in nur einen Neuronen-Phänotyp, was die Untersuchung von Interaktionen zwischen verschiedenen Zellsubpopulationen erschwert.

5.7 Durchflusszytometrische Analyse

Für die in der Durchflusszytometrie verwendeten Antikörper TH und SLC17A7 wurden als Negativkontrolle Fibroblasten gefärbt. Für den Marker TH war die Messung in Fibroblasten wie zu erwarten negativ. Ein Punkt, der in weiteren Arbeiten noch näher beleuchtet werden muss, ist die positive Negativkontrolle des Antikörpers für SLC17A7. Die Werte des Markers für glutamaterge Neurone in den Fibroblasten sind zurzeit inhaltlich nicht zu rechtfertigen. Möglicherweise lag eine Kreuzreaktivität (Bindung an sehr ähnliche Epitope) vor.

Um die hier gewonnen Erkenntnisse der quantitativen Subtypen-Charakterisierung mittels Durchflusszytometrie statistisch bewerten zu können, sind Wiederholungen und eine Ausweitung der zu messenden Marker sinnvoll. Eine Färbung von 3 Proben je Zelllinie und je Marker wäre adäquat, um statistisch aussagekräftige Ergebnisse zu erlangen.

Die Analyse von 3 Proben war in der vorliegenden Arbeit nicht möglich, da die Etablierung der Messung im Vordergrund stand und dazu nur eine begrenzte Anzahl an Probenmaterial verfügbar war. Zum einen ist eine Kultivierung der Neurone nicht unbegrenzt möglich, sowohl was die Lebensdauer als auch die Menge des Probenmaterials angeht. Zum anderen muss eine quantitative Analyse zu einem bestimmten Differenzierungszeitpunkt gemacht werden, damit diese Daten über verschiedenen iPS-Zelllinien verglichen werden können. Die Differenzierung umfasst einen dynamischen Prozess, in dessen Zuge sich die quantitativen Anteile der verschiedenen Zelltypen innerhalb der Kultur verändern. Um diese Dynamik und Entwicklung abzubilden, wäre es in weiteren Differenzierungsversuchen denkbar, die durchflusszytometrische Messung an mehreren Zeitpunkten für jeweils alle Zelllinien durchzuführen.

5.7.1 TH-Population

TH ist das regulierende Enzym des ersten Schrittes der Biosynthese von Katecholaminen wie Dopamin, Adrenalin und Noradrenalin. Das Enzym wird flächendeckend zur Detektion dopaminerger Neurone verwendet (Koch *et al.* 2009b; Sánchez-Danés *et al.* 2012; Hartfield *et al.* 2014).

In der durchflusszytometrischen Messung konnten bei der patientenspezifischen Zelllinie MLUi002-G und der Referenzzelllinie ähnliche Werte TH-positiver Zellen detektiert werden (Abbildung 18). MLUi002-E, gewonnen aus demselben Patienten, wies mit 12,4 % einen deutlich geringeren Anteil auf. Die quantitativen Unterschiede innerhalb der neuronalen Zellsubpopulationen zwischen den Zelllinien eines Patienten machen es schwer definitive Aussagen über schizophreniespezifische Veränderungen zu treffen. Um diese Aussagen treffen zu können, sollte die Messung anhand mehrerer Proben wiederholt werden und zusätzlich der mögliche Einfluss epigenetischer Veränderungen infolge der Reprogrammierung untersucht werden. Trotzdem ist die gewonnene Erkenntnis über die Präsenz dopaminerger Neurone in den differenzierten Zelllinien bedeutsam, um in Zukunft gezielt Signalwege zu untersuchen, die diese Neurone betreffen oder auch Neurotransmittermessungen durchführen zu können.

Hook *et al.* untersuchten die TH-Level in, aus iPS-Zellen differenzierten, Neuronen von SCZ-PatientInnen und gesunden ProbandInnen. Dabei konnten sie im Vergleich höhere Werte der Neurotransmitter Dopamin, Adrenalin und Noradrenalin bei den Patienten sowie einen höheren Anteil TH-positiver Zellen nachweisen (Hook *et al.* 2014). Die Neurotransmitterlevel der Neurone wurden basal und nach Stimulation mit Kaliumchlorid gemessen. Diese Methode überprüft die Funktionalität der Neurone und könnte bei weiteren Differenzierungsversuchen

zu wertvollen Erkenntnissen über mögliche Störungen des dopaminergen Systems bei SCZ beitragen.

5.7.2 Astrozytenpopulation

In der semiquantitativen Expressionsanalyse der differenzierten Zelllinien konnte den Astrozytenmarker GFAP auf Transkriptebene nachgewiesen werden (Abbildung 15). In der durchflusszytometrischen Analyse wurde GFAP ebenfalls, allerdings in sehr geringen Mengen, gefunden (Abbildung 20).

In der Literatur wird GFAP zwar als klassischer Marker für Astrozyten beschrieben, das Protein wird jedoch nicht in allen Astrozyten des Gehirns exprimiert. In Tierstudien konnte gezeigt werden, dass GFAP von bestimmten reifen Astrozyten-Subpopulationen nicht exprimiert wird (Kuegler *et al.* 2012). Vor allem reife immunreaktive Astrozyten, die sich infolge von ZNS-Verletzungen bilden, produzieren GFAP. Daher eignet sich der Marker vor allem zur Identifikation von Astrozyten im erkrankten Gehirn.

In differenzierten Zellkulturen betrug die GFAP-Expression in jeder der Linien <1 %, was ein Hinweis dafür sein kann, dass die Zellen nicht lange genug differenziert wurden und die Gliogenese, die später als die Neurogenese einsetzt, noch nicht vollständig vorangeschritten war. GFAP bildet sich erst im späteren Stadium der Astrogliogenese, während zum Beispiel Vimentin schon frühzeitig von unreifen Astrozyten exprimiert wird. Johnson *et al.* publizierten ein Differenzierungsprotokoll für ES, das unter anderem auch die Zugabe von BDNF, GDNF und cAMP vorsieht. In der daraus differenzierten neuronalen Zellkultur konnte ab der 9. Woche die Präsenz von Astrozyten mittels GFAP nachgewiesen werden (Johnson *et al.* 2007). Das entspricht in etwa der Differenzierungsdauer zum Zeitpunkt der durchflusszytometrischen Messung.

In den durchgeführten Versuchen zeigen MLUi001-F und MLUi002-G ähnliche GFAP-Expressionslevel wie die Referenzzelllinie (0,7-0,8 %), während der Anteil GFAP-positiver Zellen bei MLUi001-M und MLUi002-E geringer ausfiel (0,5 %, 0,1 %), sodass in der Gesamtschau eine geringfügig niedrigere GFAP-Expression in den patientenspezifischen Zelllinien beobachtet werden konnte. Auch in der Literatur herrscht Uneinigkeit über veränderte GFAP-Level bei SCZ-PatientInnen. Die Mehrheit der *post mortem* Studien findet keine Assoziation zwischen veränderten GFAP-Leveln und SCZ, während in wenigen Arbeiten sowohl eine erhöhte als auch eine erniedrigte GFAP-Expression in Zusammenhang mit SCZ beobachtet wurde (Trépanier *et al.* 2016).

In einer Studie mit Maus-Chimären, denen aus iPS-Zellen differenzierte gliale Progenitorzellen von SCZ-PatientInnen und gesunden Referenzen implantiert wurden, zeigten Windrem *et al.*

eine deutlich verminderte Anzahl an GFAP-positiven Zellen mit astrozytärem Phänotyp im Vorderhirn der SCZ-spezifischen Chimäre (Windrem et al. 2017). Des Weiteren konnte in den humanen glialen Progenitorzellen bei 3 von 4 SCZ-PatientInnen per quantitativer *real-time* PCR eine starke Herunterregulation von NRXN1 und anderen synaptischen Genen gezeigt werden (Windrem et al. 2017). Diese Ergebnisse lassen die Vermutung zu, dass ein Defekt in der Astrozytenreifung Auswirkungen auf die Synaptogenese haben kann.

So wäre es bei zukünftigen Differenzierungen von Interesse, die Zellen länger zu kultivieren und die GFAP-Expression im Verlauf zu messen, um einerseits Rückschlüsse auf das Vorhandensein und die quantitative Entwicklung von GFAP-positiven Astrozyten in Bezug auf das verwendete Differenzierungsprotokoll zu ziehen und andererseits gegebenenfalls schizophreniespezifische Veränderungen zu detektieren.

Alternativ wäre die Anwendung eines anderen Protokolls denkbar. TCW et al. zeigen mit ihrer Methode die effiziente Differenzierung von reifen Astrozyten aus iPS-Zellen innerhalb von 30 Tagen und die Möglichkeit einer Co-Kultur mit Neuronen, was im Rahmen der Erforschung psychiatrischer Erkrankungen ebenfalls denkbar wäre (TCW et al. 2017).

In Kontrast zur Messung der GFAP-Expression steht die quantitative Messung von EAAT1, welches ebenfalls als Astrozytenmarker fungiert und in den differenzierten Zelllinien deutlich höhere Werte im Vergleich zu GFAP aufweist (Abbildung 20A). Die Expression des Glutamattransporters beginnt bereits im Verlauf der Embryogenese und somit früher als die GFAP-Expression, was die höheren Werte erklären kann. In Mausmodellen wurde das Auftreten von EAAT1 als erstes Indiz der glialen Spezifikation während der Embryogenese gewertet (Araque and Navarrete 2010). In reifen Astrozyten wird EAAT1 von ruhenden Zellen exprimiert. Roybon et al. wiesen in ihren, aus Stammzellen (embryonal sowie induziert pluripotent) generierten, Astrozyten einen reifen ruhenden Astrozyten-Phänotyp nach, der durch geringe GFAP-Level und hohe EAAT1-Level gekennzeichnet war (Roybon et al. 2013). Der quantitative Unterschied zwischen den beiden Markern kann also ein Hinweis darauf sein, dass es sich bei den detektierten Zellen um reife, aber nicht reaktive Astrozyten handelt.

Mit 16,8 % und 19,5 % liegt die EAAT1-Expression der patientenspezifischen Zelllinien deutlich unter der der Referenzzelllinie, welche eine Expression von 26 % aufweist. Dieses Ergebnis deckt sich mit der negativen Tendenz der GFAP-Expression in den patientenspezifischen Zellen. Bauer et al. zeigten in einer *post mortem* Studie eine verminderte Proteinexpression von EAAT1 im präfrontalen Kortex von SCZ-PatientInnen, was zu den hier *in vitro* gemessenen Werten passt (Bauer et al. 2008).

Eine verminderte EAAT1-Expression bedeutet auch eine geringere Glutamatwiederaufnahme aus dem synaptischen Spalt. Erhöhte Glutamatlevel können zu einer Überaktivierung von Neuronen führen, was auf Dauer eine excitotoxische Wirkung auf das Gehirn haben könnte (Dong, Wang, and Qin 2009). Dieser Punkt passt zu der Annahme, dass es innerhalb der Pathogenese der SCZ zu einer glutamatergen Dysbalance kommt (Moghaddam and Javitt 2012). In einer Studie mit EAAT1-defizienten Mäusen wiesen diese psychiatrische Phänotypen auf, die bestimmten kognitiven sowie Negativsymptomen innerhalb der SCZ ähnelten (Karlsson *et al.* 2009). Walsh *et al.* identifizierten in einer *microarray*-basierten Genomanalyse von SCZ-PatientInnen und Referenzen eine Deletion im EAAT1-Gen bei einem der SCZ-PatientInnen (Walsh *et al.* 2008).

Die detektierten Astrozytenpopulationen sind in der differenzierten Zellkultur im Laufe der neuronalen Entwicklung ohne die Zugabe spezieller Astrozytenaktivatoren wie beispielsweise dem ziliär neutrophen (CNTF) oder leukämiehemmenden Faktor (LIF) entstanden. Da Astrozyten in der Funktion und Formation von Synapsen eine wichtige Rolle spielen, kann ihre Präsenz zur Förderung der Entwicklung reifer Neurone beitragen. Des Weiteren bietet die Koexistenz neuronaler und glialer Zellen mit dem gleichen genetischen Hintergrund die Möglichkeit, gezielt deren Interaktionen untereinander und mögliche krankheitsspezifische Mechanismen zu untersuchen.

5.7.3 Mikrogliapopulation

In den differenzierten Zelllinien konnten CD68-positive Zellen auf Transkript- sowie Proteinebene über die durchflusszytometrische Messung nachgewiesen werden (Abbildung 15 und 20). MLUi002-E zeigt im Vergleich zu der Referenzzelllinie eine ähnlich große Menge CD68-positiver Zellen, während MLUi002-G einen geringeren Anteil aufweist.

Mikroglia existieren im menschlichen Gehirn in verschiedenen Phänotypen, welche sich in unterschiedlichen Aktivierungszuständen befinden (Nimmerjahn *et al.* 2005). Durch ihre zentrale Rolle in der Immunabwehr gegenüber Pathogenen, sind sie essenziell an der Aufrechterhaltung der Homöostase des Gehirns beteiligt. Im intakten Gehirn wird über Mikroglia die Anzahl funktionaler Synapsen reguliert, was für die normale Gehirnentwicklung essenziell ist (Paolicelli *et al.* 2011; Ji *et al.* 2013; Schafer and Stevens 2015). CD68 wird von allen Mikroglia-Phänotypen exprimiert, auch von Mikroglia des ramifizierten Typs in kortikalen Schichten (Hendrickx *et al.* 2017). Die Interaktion zwischen Mikroglia und Neuronen, durch von Mikroglia ausgeschüttete Zytokine, Transmitter und neurotrophe Faktoren, scheint sowohl im erkrankten als auch im gesunden Gehirn von zentraler Bedeutung zu sein (Kettenmann, Kirchhoff, and Verkhratsky 2013). Gleichzeitig ist bekannt, dass die Morphologie und das

Verhalten von Mikroglia zu einem Teil durch GABAerge und glutamaterge Neurotransmission reguliert wird, was an Mikroglia innerhalb der Retina erforscht und nachgewiesen wurde (Fontainhas *et al.* 2011). Das Modell könnte, durch das nachgewiesene Vorhandensein einer Co-Kultur aus Mikroglia und Neuronen, die Plattform für eine gezielte Analyse von Interaktionen zwischen den verschiedenen Zelltypen bieten.

Anzumerken ist, dass CD68 nicht Mikroglia-spezifisch ist, sondern auch von anderen Zellen exprimiert wird, so dass es sich bei einem Anteil der detektierten Zellen um andere Zelltypen handeln könnte (Gottfried *et al.* 2008). CD68 ist jedoch auch kein neuraler Marker. Um die Mikroglia-Population in der Kultur näher zu charakterisieren, wäre eine Verwendung weiterer Marker sinnvoll, beispielsweise *transmembrane proteine 119* (TMEM119) und *allograft inflammatory factor 1* (AIF1 alias IBA1). Eine Detektion von CD11b und CD45 ist in der Literatur zur Unterscheidung ruhender Mikroglia und Makrophagen beschrieben.

5.8 Epigenetische und funktionale Unterschiede bei aus demselben Individuum gewonnenen Stammzelllinien

Bei den durchgeführten Analysen konnten Messwertdifferenzen für iPS-Zelllinien ausgemacht werden, die aus demselben Individuum stammen. Da die Linien ursprünglich dasselbe Ausgangsgenom aufweisen, stellt sich konsequenterweise die Frage wie sich diese Unterschiede einordnen und erklären lassen.

Während der Reprogrammierung der Zellen kommt es zu globalen Veränderungen des DNA-Methylierungs-Status. Diese Veränderungen werden in der Literatur unter anderem als DMR (*differentially methylated regions*) und DMS (*differentially methylated sites*) beschrieben. DMR sind genomische Bereiche, die in spezifischem Gewebe oder Zellen ein unterschiedliches Methylierungsmuster aufweisen und denen eine Funktion in der Regulation der Gentranskription zugeschrieben wird (Neidhart 2016). In welcher Ausprägung diese Regionen auftreten, hängt von einer Reihe verschiedener Faktoren ab, unter anderem von genetischen Variationen der Spenderzellen oder der Reprogrammierungsmethode. Ein Zurücksetzen der Methylierung, ähnlich des Methylierungsstatus von ES, kann durch die Reprogrammierung nicht erreicht werden. Kim *et al.* wiesen nach, dass iPS-Zellen eher in ihr Ursprungsgewebe differenzieren und somit über ein epigenetisches Gedächtnis verfügen (K. Kim *et al.* 2010). Lister *et al.* zeigten in ihrer Arbeit, dass vor allem eine fehlerhafte Reprogrammierung der Methylierung fortbesteht und diese in differenzierten iPS-Zellen erhalten bleibt. Die DNA-Methylierungsstellen treten an den Basenpaaren CG und gehäuft in Inseln in bestimmten Regionen der DNA auf. Erfolgreich reprogrammierte iPS-Zellen enthalten Methylierungsmuster

der somatischen Ursprungszellen (epigenetisches Gedächtnis) und iPS-zellspezifische Methylierungsmuster (Lister *et al.* 2011). Ruiz *et al.* fanden 5700 DMS, die iPS-Zelllinien-übergreifend detektiert wurden. Hypomethylierte Regionen befanden sich vor allem auf Genen, die in der Signaltransduktion, im Zellstoffwechsel sowie in der neuronalen Entwicklung eine Rolle spielen, während hypermethylierte Regionen eher für Zelladhäsionsmoleküle und Rezeptormodifikationen kodierten. Somit konnten sie nachweisen, dass abweichende epigenetische Muster die Genexpression gezielt beeinflussen und auf diese Weise funktionelle Unterschiede innerhalb von iPS-Zelllinien begründet sein könnten. Durch die abweichenden Methylierungsmuster in bestimmten Genen gelang ihnen auch die Abgrenzung und Unterscheidung von ES im Vergleich zu iPS-Zellen (Ruiz *et al.* 2012). Bei der Reprogrammierung können nicht nur Veränderungen in der DNA-Methylierung entstehen, sondern auch andere genetische Variationen. Ma *et al.* detektierten 10 *de novo* CNV in iPS-Zelllinien, die Transkriptionsfaktor-basiert reprogrammiert wurden und wiesen nach, dass diese Form der Reprogrammierung mit inkompletter genetischer Methylierung assoziiert ist.

Eine andere Methode für die Herstellung pluripotenter Stammzellen ist der somatische Zellkerntransfer (*SCNT - somatic cell nuclear transfer*). Mittels dieser Methode ist es möglich, die DNA-Methylierung und damit assoziierte Genexpression vollständig zu erneuern und Methylo- sowie Transkriptomprofile in Zellen zu erhalten, die ähnlich derer von ES sind, die durch *in vitro* Fertilisation gewonnen wurden (Ma *et al.* 2014).

In einer RNA-Sequenzieranalyse wiesen Rouhani *et al.* das Vorhandensein transkriptionsspezifischer Unterschiede zwischen den iPS-Zelllinien desselben Individuums nach (Rouhani *et al.* 2014). Somit lassen sich die gemessenen Unterschiede zwischen den Zelllinien eines Individuums durch ihre abweichenden epigenetischen Muster, die im Zuge der Reprogrammierung entstanden sind, und damit einhergehende Veränderungen in der Genexpression erklären.

Daraus ergibt sich das Ziel, die individuellen genetischen Phänotypen der iPS-Zelllinien einzelner PatientInnen und die daraus resultierenden Effekte einander anzugleichen, um gezielter mutationsspezifische Auswirkungen untersuchen zu können. Mittels Genom-Editierung ist es mittlerweile möglich krankheitsrelevante Mutationen in iPS-Zellen zu integrieren oder zu reparieren (Yusa *et al.* 2011). Eine der relevantesten und vielversprechendsten Methoden dahingehend ist das System CRISPR / Cas9. Durch diesen hocheffizienten Mechanismus der Genomeditierung können, wie im Fall der hier vorliegenden Arbeit, in GWAS entdeckte, mit Krankheiten assoziierte Genvarianten und ihre Auswirkungen in ansonsten isogenen Zelllinien untersucht werden (Hockemeyer and Jaenisch 2016). Es wäre

denkbar und sinnvoll, die NRXN1-Mutation in einer Linie von patientInnenenspezifischen iPSC-Zellen mittels CRISPR / Cas9 zu beheben und direkt mit einer Linie desselben Individuums, das nach wie vor die Mutation aufweist, zu vergleichen. Zusätzlich könnte das krankheitsspezifische Allel in die hier verwendete Referenzzelllinie WISCi004-B integriert werden. Einen ersten Anlauf dahingehend unternahm Ho *et al.*, die versuchten die NRXN1-Expression und die Expression weiterer SCZ-Kandidatengene in neuronalen Progenitorzellen, Neuronen und Astrozyten synthetisch zu aktivieren (Ho *et al.* 2017).

5.9 Genotyp und Phänotyp von NRXN1

Die durchgeführte Analyse der PANSS in Abhängigkeit zur Lage der heterozygoten Mutation im Gen NRXN1 deutete auf eine stärkere Krankheitsintensität bei den Patienten mit fehlendem Exon 1-6 sowie fehlendem Promotor hin (Abbildung 22). Die Positivsymptomatik, die sich aus den anamnestischen Angaben ergibt, ist bei Patient 1 stark ausgeprägt.

Zahlreiche Studien zeigen, dass heterozygote Deletionen im Gen NRXN1 zu einem erhöhten SCZ Risiko führen. Rujescu *et. al* belegten 2009, dass Deletionen, die im Bereich der Exons in NRXN1 liegen, bei einer Gruppe an SCZ-erkrankter PatientInnen im Vergleich zu einer Referenzgruppe signifikant erhöht sind (0,24% zu 0,015%) (Rujescu *et al.* 2009). Unterstützt wurde das Ergebnis von einer Meta-Analyse von Kirov *et al.*, in der das erhöhte SCZ-Risiko durch CNV in NRXN1 durch die Zusammenschau zahlreicher Daten noch einmal bestätigt wurde (Kirov *et al.* 2009).

Die Vermutung, dass sich Größe und Lokalisation der Deletion auf den krankheitsspezifischen Phänotyp auswirken wurde bisher noch nicht untersucht.

Die vorhandene Stichprobe von 3 Patienten ermöglicht es leider nicht, eine statistisch signifikante Aussage zu treffen. Auch spielen NRXN1-Deletionen in der Gesamtzahl der SCZ-PatientInnen eine eher untergeordnete Rolle weil diese sehr selten sind. Dennoch geht man davon aus, dass CNV in NRXN1 mit einer besonders starken Penetranz krankheitsrelevante Veränderungen in Neuronen und Gliazellen hervorrufen, die für alle SCZ-PatientInnen relevant sind. Das macht weitere Studien mit größeren Kohorten von Fällen und Referenzen sowie mit Technologien, die auch kleine CNV detektieren notwendig (Kirov *et al.* 2009). Trotzdem liegt es nah, dass die Pathogenität der CNV variiert, je nachdem welche Ausprägung und welchen funktionellen Effekt die CNV auf NRXN1 haben. Je größer die Deletion ist und je mehr Exons sie umfasst, desto mehr könnten Neurexin-assoziierte Signalkaskaden beeinträchtigt sein.

Zahlreiche wissenschaftliche Arbeiten belegen den Zusammenhang zwischen heterozygoten Mutationen in NRXN1 und klinischen Phänotypen (Schaaf *et al.* 2012; Béna *et al.* 2013). Hierbei

werden jedoch verschiedene Krankheitsbilder und nicht die Auswirkung einer Mutation auf die Ausprägung eines einzelnen Krankheitsbildes untersucht.

So wäre es perspektivisch denkbar, die in dieser Arbeit aufgezeigte These, in einer größeren Kohorte von SCZ-PatientInnen mit NRXN1-Deletionen zu untersuchen, welche die Exons des Gens betreffen und diese mit klinischen Angaben zu verknüpfen. Es wäre hierfür wichtig Faktoren zu identifizieren und zu berücksichtigen, die ebenfalls Einfluss auf die PANSS und die Klinik der Erkrankung haben (sogenannte *Confounder*). Hierzu zählt zum Beispiel, ob und womit untersuchte PatientInnen zum Untersuchungszeitpunkt medikamentös eingestellt waren. Marder *et. al* fanden in einer klinischen Studie heraus, dass es bei PatientInnen, die eine Medikation von 6-16 mg / d Risperidon erhielten, zu einer einheitlichen und relativ stärkeren Verbesserung des PANSS kam, als bei PatientInnen, die mit 20 mg / d Haloperidol behandelt wurden (Marder *et al.* 1997).

Die PANSS als Messinstrument zählt bis heute zum Goldstandard der Einschätzung der klinischen Ausprägung der SCZ. Ein 5-Komponentenmodell deckt die Ebenen Positiv-, Negativ-, Desorganisations-, Depressionssyndrom und Erregung ab (Bell *et al.* 1994). Die Anwendung der PANSS eignet sich vor allem im Bereich der Forschung. Die Durchführung ist allerdings, was den zeitlichen Umfang angeht, mit 30-45 min relativ aufwendig. Im Laufe der Jahre wurden neue Fragebögen zur Anwendung im klinischen Alltag konzipiert, zum Beispiel der CGI-SCH, der in der zeitlichen und methodischen Handhabung praktikabler ist (Haro *et al.* 2003). Was die Funktionalität und Validität angeht, stellt die PANSS allerdings für die hier durchgeführte Analyse eine methodisch adäquate Wahl dar.

Zusammenfassend spiegelt die Diskussion der erhaltenen Ergebnisse die aktuelle Datenlage der Literatur wieder und setzt neue Akzente hinsichtlich der funktionellen Aufklärung von CNV in NRXN1.

6 Zusammenfassung

SCZ als schwere psychiatrische Erkrankung kann bei Betroffenen zu gravierenden Einschränkungen des Alltags und der Lebensqualität führen. Auch wenn mithilfe antipsychotischer Medikation teilweise eine Besserung der Symptome erreicht werden kann, ist die Prognose der Erkrankung nach wie vor schlecht. Neue Therapiekonzepte werden dringend benötigt. Dafür ist jedoch ein besseres Verständnis der Krankheitsentstehung notwendig und unabdingbar, die auslösenden Faktoren sowie deren Auswirkungen genauer nachzuvollziehen. Somatische Zellen Betroffener, die eine Deletion in NRXN1 tragen, wurden in dieser Arbeit zu iPS-Zellen reprogrammiert. So ist es möglich, *in vitro* funktionelle Auswirkungen struktureller DNA-Variationen zu analysieren.

Im Rahmen der Arbeit wurden iPS-Zelllinien auf ihre pluripotenten Eigenschaften überprüft. In der Transkriptanalyse zeigten alle Linien die Expression pluripotenzassoziierter Marker wie NANOG, LIN28A und OCT4. Die Fähigkeit, sich in die 3 Keimblattderivate zu differenzieren, konnte ebenfalls mittels Transkriptanalyse von TBXT, PAX6 und SOX17 nachgewiesen werden. Die differenzierten patientenspezifischen Neurone und die Referenzzelllinie wiesen morphologisch betrachtet neuronentypische Eigenschaften auf. Durch den Transkriptnachweis neuronaler Marker wie TUBB3, SYT1, STX2, MSI1, VAMP2 und NLGN1 wurde die erfolgreiche Differenzierung nachgewiesen. Dieser Nachweis konnte durch Immunfluoreszenz-Analyse bestätigt werden. Die Analyse der neuronalen Subtypen und Gliazellen mittels PCR und Immunfluoreszenz-Analyse ergab ein Vorhandensein von glutamatergen und GABAergen Neuronen sowie Astrozyten, Mikroglia und oligodendrozytären Vorläuferzellen. In einer quantitativen durchflusszytometrischen Analyse wiesen schizophreniespezifische Zellkulturen einen geringeren Anteil EAAT1-positiver Zellen auf. Bei der Analyse glutamaterger und dopaminergener Neurone sowie Mikroglia und GFAP-positiver Zellen konnte kein einheitlicher Unterschied zwischen patientenspezifischen Linien und Referenzlinie ausgemacht werden. Die Analyse der klinischen Symptomatik im Hinblick auf die Größe der Deletion in NRXN1 zeigte bei Patienten mit größerer Deletion eine anhand der PANSS gemessene schwerere Krankheitsausprägung.

Auf Grundlage der in dieser Arbeit erhobenen Daten eignet sich das verwendete Modell der neuronalen Mischkultur, um vermutete pathogenetische Vorgänge zu untersuchen. Durch die Reprogrammierung und Differenzierung von iPS-Zellen gelingt es, individuelle patientenInnenspezifische Daten zu gewinnen, ohne dabei invasiv vorgehen zu müssen. Dies kann dazu beitragen, neue Therapieansätze zur Behandlung der SCZ zu finden.

Literaturverzeichnis

- Akbarian, Schahram, James J. Kim, Steven G. Potkin, Jennifer O. Hagman, Alireza Tafazzoli, William E. Bunney, and Edward G. Jones. 1995. "Gene Expression for Glutamic Acid Decarboxylase Is Reduced Without Loss of Neurons in Prefrontal Cortex of Schizophrenics." *Archives of General Psychiatry* 52 (4): 258–66.
- Araque, Alfonso, and Marta Navarrete. 2010. "Glial Cells in Neuronal Network Function." *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 365 (1551): 2375–81.
- Arenas, Ernest. 2014. "Wnt Signaling in Midbrain Dopaminergic Neuron Development and Regenerative Medicine for Parkinson's Disease." *Journal of Molecular Cell Biology* 6 (1): 42–53.
- Battelli, Chiara, George N. Nikopoulos, Jane G. Mitchell, and Joseph M. Verdi. 2006. "The RNA-Binding Protein Musashi-1 Regulates Neural Development through the Translational Repression of P21WAF-1." *Molecular and Cellular Neuroscience* 31 (1): 85–96.
- Bauer, Deborah, Daya Gupta, Vahram Harotunian, James H. Meador-Woodruff, and Robert E. McCullumsmith. 2008. "Abnormal Expression of Glutamate Transporter and Transporter Interacting Molecules in Prefrontal Cortex in Elderly Patients with Schizophrenia." *Schizophrenia Research* 104 (1–3): 108–20.
- Bell, Morris D., Paul H. Lysaker, Joseph L. Beam-Goulet, Robert M. Milstein, and Jean-Pierre Lindenmayer. 1994. "Five-Component Model of Schizophrenia: Assessing the Factorial Invariance of the Positive and Negative Syndrome Scale." *Psychiatry Research* 52 (3): 295–303.
- Béna, Frédérique, Damien L. Bruno, Mats Eriksson, Conny van Ravenswaaij-Arts, Zornitza Stark, Trijnie Dijkhuizen, Erica Gerkes, et al. 2013. "Molecular and Clinical Characterization of 25 Individuals with Exonic Deletions of NRXN1 and Comprehensive Review of the Literature." *American Journal of Medical Genetics Part B: Neuropsychiatric Genetics* 162 (4): 388–403.
- Birkenbach, M., K. Josefsen, R. Yalamanchili, G. Lenoir, and E. Kieff. 1993. "Epstein-Barr Virus-Induced Genes: First Lymphocyte-Specific G Protein-Coupled Peptide Receptors." *Journal of Virology* 67 (4): 2209–20.
- Boyer, Laurie A., Tong Ihn Lee, Megan F. Cole, Sarah E. Johnstone, Stuart S. Levine, Jacob P. Zucker, Matthew G. Guenther, et al. 2005. "Core Transcriptional Regulatory Circuitry in Human Embryonic Stem Cells." *Cell* 122 (6): 947–56.
- Brambrink, Tobias, Ruth Foreman, G. Grant Welstead, Christopher J. Lengner, Marius Wernig, Heikyung Suh, and Rudolf Jaenisch. 2008. "Sequential Expression of Pluripotency Markers during Direct Reprogramming of Mouse Somatic Cells." *Cell Stem Cell* 2 (2): 151–59.
- Brennand, Kristen, Anthony Simone, Jessica Jou, Chelsea Gelboin-Burkhart, Ngoc Tran, Sarah

- Sangar, Yan Li, et al. 2011. "Modeling Schizophrenia Using HiPSC Neurons." *Nature* 473 (7346): 221–25.
- Cahir-McFarland, Ellen D., Kara Carter, Andreas Rosenwald, Jena M. Giltnane, Sarah E. Henrickson, Louis M. Staudt, and Elliott Kieff. 2004. "Role of NF- κ B in Cell Survival and Transcription of Latent Membrane Protein 1-Expressing or Epstein-Barr Virus Latency III-Infected Cells." *Journal of Virology* 78 (8): 4108–19.
- Callaerts, Patrick, Georg Halder, and Walter J. Gehring. 1997. "Pax-6 in Development and Evolution." *Annual Review of Neuroscience* 20 (1): 483–532.
- Cameron, Heather A., and Ronald D. G. McKay. 1999. "Restoring Production of Hippocampal Neurons in Old Age." *Nature Neuroscience* 2 (10): 894–97.
- Campden-Main, Brian C., and Zygmunt Wegielski. 1955. "The Control of Deviant Behavior in Chronically Disturbed Psychotic Patients by the Oral Administration of Reserpine." *Annals of the New York Academy of Sciences* 61 (1): 117–22.
- Cao, Shi-Ying, Yao Hu, Cheng Chen, Fang Yuan, Min Xu, Qi Li, Kai-Heng Fang, Yaoyu Chen, and Yan Liu. 2017. "Enhanced Derivation of Human Pluripotent Stem Cell-Derived Cortical Glutamatergic Neurons by a Small Molecule." *Scientific Reports* 7 (1): 3282.
- Capone, Mollie, John Matthew Bryant, Natalie Sutkowski, and Azizul Haque. 2016. "Fc Receptor-Like Proteins in Pathophysiology of B-Cell Disorder." *Journal of Clinical & Cellular Immunology* 7 (3).
- Carter, Cameron S., William Perlstein, Rohan Ganguli, Jaspreet Brar, Mark Mintun, and Jonathan D. Cohen. 1998. "Functional Hypofrontality and Working Memory Dysfunction in Schizophrenia." *American Journal of Psychiatry* 155 (9): 1285–87.
- Chambers, Stuart M., Christopher A. Fasano, Eirini P. Papapetrou, Mark Tomishima, Michel Sadelain, and Lorenz Studer. 2009. "Highly Efficient Neural Conversion of Human ES and IPS Cells by Dual Inhibition of SMAD Signaling." *Nature Biotechnology* 27 (3): 275–80.
- Chang, Chin-Kuo, Richard D. Hayes, Gayan Perera, Mathew T. M. Broadbent, Andrea C. Fernandes, William E. Lee, Mathew Hotopf, and Robert Stewart. 2011. "Life Expectancy at Birth for People with Serious Mental Illness and Other Major Disorders from a Secondary Mental Health Care Case Register in London." *PLOS ONE* 6 (5): e19590.
- Chen, James K., Jussi Taipale, Michael K. Cooper, and Philip A. Beachy. 2002. "Inhibition of Hedgehog Signaling by Direct Binding of Cyclopamine to Smoothed." *Genes & Development* 16 (21): 2743–48.
- Davis, K. L., R. S. Kahn, G. Ko, and M. Davidson. 1991. "Dopamine in Schizophrenia: A Review and Reconceptualization." *The American Journal of Psychiatry* 148 (11): 1474–86.

- Davis, Randall S., Yui-Hsi Wang, Hiromi Kubagawa, and Max D. Cooper. 2001. "Identification of a Family of Fc Receptor Homologs with Preferential B Cell Expression." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98 (17): 9772–77.
- Dong, Xiao-xia, Yan Wang, and Zheng-hong Qin. 2009. "Molecular Mechanisms of Excitotoxicity and Their Relevance to Pathogenesis of Neurodegenerative Diseases." *Acta Pharmacologica Sinica* 30 (4): 379–87.
- Du, Xing, Satoshi Nagata, Tomoko Ise, Maryalice Stetler-Stevenson, and Ira Pastan. 2008. "FCRL1 on Chronic Lymphocytic Leukemia, Hairy Cell Leukemia, and B-Cell Non-Hodgkin Lymphoma as a Target of Immunotoxins." *Blood* 111 (1): 338–43.
- Duncan, Carlotta E., Maree J. Webster, Debora A. Rothmond, Sabine Bahn, Michael Elashoff, and Cynthia Shannon Weickert. 2010. "Prefrontal GABAA Receptor α -Subunit Expression in Normal Postnatal Human Development and Schizophrenia." *Journal of Psychiatric Research* 44 (10): 673–81.
- Elkabetz, Yechiel, Georgia Panagiotakos, George Al Shamy, Nicholas D. Socci, Viviane Tabar, and Lorenz Studer. 2008. "Human ES Cell-Derived Neural Rosettes Reveal a Functionally Distinct Early Neural Stem Cell Stage." *Genes & Development* 22 (2): 152–65.
- Ericson, J, J Muhr, M Placzek, T Lints, T. M Jessel, and T Edlund. 1995. "Sonic Hedgehog Induces the Differentiation of Ventral Forebrain Neurons: A Common Signal for Ventral Patterning within the Neural Tube." *Cell* 81 (5): 747–56.
- Falk, Anna, Philipp Koch, Jaideep Kesavan, Yasuhiro Takashima, Julia Ladewig, Michael Alexander, Ole Wiskow, et al. 2012. "Capture of Neuroepithelial-Like Stem Cells from Pluripotent Stem Cells Provides a Versatile System for In Vitro Production of Human Neurons." *PLOS ONE* 7 (1): e29597.
- Fontainhas, Aurora M., Minhua Wang, Katharine J. Liang, Shan Chen, Pradeep Mettu, Mausam Damani, Robert N. Fariss, Wei Li, and Wai T. Wong. 2011. "Microglial Morphology and Dynamic Behavior Is Regulated by Ionotropic Glutamatergic and GABAergic Neurotransmission." *PLoS ONE* 6 (1).
- Förster, Reinhold, Elisabeth Kremmer, Andreas Schubel, Dagmar Breitfeld, Andrea Kleinschmidt, Christoph Nerl, Günter Bernhardt, and Martin Lipp. 1998. "Intracellular and Surface Expression of the HIV-1 Coreceptor CXCR4/Fusin on Various Leukocyte Subsets: Rapid Internalization and Recycling Upon Activation." *The Journal of Immunology* 160 (3): 1522–31.
- Gottfried, E., L. A. Kunz-Schughart, A. Weber, M. Rehli, A. Peuker, A. Müller, M. Kastenberger, G. Brockhoff, R. Andreesen, and M. Kreutz. 2008. "Expression of CD68 in Non-Myeloid Cell Types." *Scandinavian Journal of Immunology* 67 (5): 453–63.

- Graf, Ethan R., XueZhao Zhang, Shan-Xue Jin, Michael W. Linhoff, and Ann Marie Craig. 2004. "Neurexins Induce Differentiation of GABA and Glutamate Postsynaptic Specializations via Neuroligins." *Cell* 119 (7): 1013–26.
- Gutierrez-Aranda, Ivan, Veronica Ramos-Mejia, Clara Bueno, Martin Munoz-Lopez, Pedro J Real, Angela Mácia, Laura Sanchez, Gertrudis Ligeró, Jose L Garcia-Parez, and Pablo Menendez. 2010. "Human Induced Pluripotent Stem Cells Develop Teratoma More Efficiently and Faster Than Human Embryonic Stem Cells Regardless the Site of Injection." *Stem Cells (Dayton, Ohio)* 28 (9): 1568–70.
- Haro, J. M., S. A. Kamath, S. Ochoa, D. Novick, K. Rele, A. Fargas, M. J. Rodríguez, et al. 2003. "The Clinical Global Impression-Schizophrenia Scale: A Simple Instrument to Measure the Diversity of Symptoms Present in Schizophrenia." *Acta Psychiatrica Scandinavica. Supplementum*, no. 416: 16–23.
- Hartfield, Elizabeth M., Michiko Yamasaki-Mann, Hugo J. Ribeiro Fernandes, Jane Vowles, William S. James, Sally A. Cowley, and Richard Wade-Martins. 2014. "Physiological Characterisation of Human IPS-Derived Dopaminergic Neurons." *PLoS ONE* 9 (2).
- Hata, Yutaka, Bazbek Davletov, Alexander G. Petrenko, Reinhard Jahn, and Thomas C. Südhof. 1993. "Interaction of Synaptotagmin with the Cytoplasmic Domains of Neurexins." *Neuron* 10 (2): 307–15.
- Hatzivassiliou, Georgia, Ira Miller, Jun Takizawa, Nallasivam Palanisamy, Pulivarthi H. Rao, Shinsuke Iida, Shinichi Tagawa, et al. 2001. "IRTA1 and IRTA2, Novel Immunoglobulin Superfamily Receptors Expressed in B Cells and Involved in Chromosome 1q21 Abnormalities in B Cell Malignancy." *Immunity* 14 (3): 277–89.
- Hendrickx, Debbie A. E., Corbert G. van Eden, Karianne G. Schuurman, Jörg Hamann, and Inge Huitinga. 2017. "Staining of HLA-DR, Iba1 and CD68 in Human Microglia Reveals Partially Overlapping Expression Depending on Cellular Morphology and Pathology." *Journal of Neuroimmunology* 309 (August): 12–22.
- Herrmann, Bernhard G., Siegfried Labeit, Annemarie Poustka, Thomas R. King, and Hans Lehrach. 1990. "Cloning of the T Gene Required in Mesoderm Formation in the Mouse." *Nature* 343 (6259): 617.
- Hilker, Rikke, Dorte Helenius, Birgitte Fagerlund, Axel Skytthe, Kaare Christensen, Thomas M. Werge, Merete Nordentoft, and Birte Glenthøj. 2018. "Heritability of Schizophrenia and Schizophrenia Spectrum Based on the Nationwide Danish Twin Register." *Biological Psychiatry* 83 (6): 492–98.
- Ho, Seok-Man, Brigham J. Hartley, Erin Flaherty, Prashanth Rajarajan, Rawan Abdelaal, Ifeanyi

- Obiorah, Natalie Barretto, et al. 2017. "Evaluating Synthetic Activation and Repression of Neuropsychiatric-Related Genes in hiPSC-Derived NPCs, Neurons, and Astrocytes." *Stem Cell Reports* 9 (2): 615–28.
- Ho, Seok-Man, Brigham J. Hartley, TCW Julia, Michael Beaumont, Khalifa Stafford, Paul A. Slesinger, and Kristen J. Brennand. 2016. "Rapid Ngn2-Induction of Excitatory Neurons from hiPSC-Derived Neural Progenitor Cells." *Methods (San Diego, Calif.)* 101 (May): 113–24.
- Hockemeyer, Dirk, and Rudolf Jaenisch. 2016. "Induced Pluripotent Stem Cells Meet Genome Editing." *Cell Stem Cell* 18 (5): 573–86.
- Hook, Vivian, Kristen J. Brennand, Yongsung Kim, Thomas Toneff, Lydiane Funkelstein, Kelly C. Lee, Michael Ziegler, and Fred H. Gage. 2014. "Human iPSC Neurons Display Activity-Dependent Neurotransmitter Secretion: Aberrant Catecholamine Levels in Schizophrenia Neurons." *Stem Cell Reports* 3 (4): 531–38.
- Howes, Oliver D., and Shitij Kapur. 2009. "The Dopamine Hypothesis of Schizophrenia: Version III—The Final Common Pathway." *Schizophrenia Bulletin* 35 (3): 549–62.
- Hu, Bao-Yang, and Su-Chun Zhang. 2009. "Differentiation of Spinal Motor Neurons from Pluripotent Human Stem Cells." *Nature Protocols* 4 (9): 1295–1304.
- Huang, Eric J, and Louis F Reichardt. 2001. "Neurotrophins: Roles in Neuronal Development and Function." *Annual Review of Neuroscience* 24 (1): 677–736.
- Israel, Mason A., Shauna H. Yuan, Cedric Bardy, Sol M. Reyna, Yangling Mu, Cheryl Herrera, Michael P. Hefferan, et al. 2012. "Probing Sporadic and Familial Alzheimer's Disease Using Induced Pluripotent Stem Cells." *Nature* 482 (7384): 216–20.
- Jablensky, Assen. 2000. "Epidemiology of Schizophrenia: The Global Burden of Disease and Disability." *European Archives of Psychiatry and Clinical Neuroscience* 250 (6): 274–85.
- Ji, Kyungmin, Gulcan Akgul, Lonnie P. Wollmuth, and Stella E. Tsirka. 2013. "Microglia Actively Regulate the Number of Functional Synapses." *PLoS ONE* 8 (2).
- Johnson, M. Austin, Jason P. Weick, Robert A. Pearce, and Su-Chun Zhang. 2007. "Functional Neural Development from Human Embryonic Stem Cells: Accelerated Synaptic Activity via Astrocyte Coculture." *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience* 27 (12): 3069–77.
- Jung, Matthias, and Dan Rujescu. 2016. "Translational Medicine: From Disease- and Patient-Specific Stem Cell Research to Clinical Trials and Back Again." *European Archives of Psychiatry and Clinical Neuroscience* 266 (8): 679–80.
- Karlsson, Rose-Marie, Kohichi Tanaka, Lisa M. Saksida, Timothy J. Bussey, Markus Heilig, and Andrew Holmes. 2009. "Assessment of Glutamate Transporter GLAST (EAAT1)-Deficient Mice

- for Phenotypes Relevant to the Negative and Executive/Cognitive Symptoms of Schizophrenia." *Neuropsychopharmacology* 34 (6): 1578–89.
- Katsetos, Christos D., Agustin Legido, Elias Perentes, and Sverre J. Mörk. 2003. "Class III β -Tubulin Isozyme: A Key Cytoskeletal Protein at the Crossroads of Developmental Neurobiology and Tumor Neuropathology." *Journal of Child Neurology* 18 (12): 851–66.
- Kay, Stanley R., Abraham Fiszbein, and Lewis A. Opler. 1987. "The Positive and Negative Syndrome Scale (PANSS) for Schizophrenia." *Schizophrenia Bulletin* 13 (2): 261–76.
- Kendler, Kenneth S., Henrik Ohlsson, Jan Sundquist, and Kristina Sundquist. 2014. "IQ and Schizophrenia in a Swedish National Sample: Their Causal Relationship and the Interaction of IQ With Genetic Risk." *American Journal of Psychiatry* 172 (3): 259–65.
- Kettenmann, Helmut, Frank Kirchhoff, and Alexei Verkhratsky. 2013. "Microglia: New Roles for the Synaptic Stripper." *Neuron* 77 (1): 10–18.
- Kiecker, Clemens, and Andrew Lumsden. 2012. "The Role of Organizers in Patterning the Nervous System." *Annual Review of Neuroscience* 35 (1): 347–67.
- Kim, Hyung-Goo, Shotaro Kishikawa, Anne W. Higgins, Ihn-Sik Seong, Diana J. Donovan, Yiping Shen, Eric Lally, et al. 2008. "Disruption of Neurexin 1 Associated with Autism Spectrum Disorder." *American Journal of Human Genetics* 82 (1): 199–207.
- Kim, K., A. Doi, B. Wen, K. Ng, R. Zhao, P. Cahan, J. Kim, et al. 2010. "Epigenetic Memory in Induced Pluripotent Stem Cells." *Nature* 467 (7313): 285–90.
- Kioussi, C., and P. Gruss. 1994. "Differential Induction of Pax Genes by NGF and BDNF in Cerebellar Primary Cultures." *The Journal of Cell Biology* 125 (2): 417–25.
- Kirov, G, A J Pocklington, P Holmans, D Ivanov, M Ikeda, D Ruderfer, J Moran, et al. 2012. "De Novo CNV Analysis Implicates Specific Abnormalities of Postsynaptic Signalling Complexes in the Pathogenesis of Schizophrenia." *Molecular Psychiatry* 17 (2): 142–53.
- Kirov, George, Dilihan Gumus, Wei Chen, Nadine Norton, Lyudmila Georgieva, Murat Sari, Michael C. O'Donovan, et al. 2008. "Comparative Genome Hybridization Suggests a Role for NRXN1 and APBA2 in Schizophrenia." *Human Molecular Genetics* 17 (3): 458–65.
- Kirov, George, Dan Rujescu, Andres Ingason, David A. Collier, Michael C. O'Donovan, and Michael J. Owen. 2009. "Neurexin 1 (NRXN1) Deletions in Schizophrenia." *Schizophrenia Bulletin* 35 (5): 851–54.
- Koch, Philipp, Thoralf Opitz, Julius A. Steinbeck, Julia Ladewig, and Oliver Brüstle. 2009a. "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 (9): 3225–30.

- . 2009b. "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 (9): 3225–30.
- Kondo, Takayuki, Masashi Asai, Kayoko Tsukita, Yumiko Kutoku, Yutaka Ohsawa, Yoshihide Sunada, Keiko Imamura, et al. 2013. "Modeling Alzheimer's Disease with iPSCs Reveals Stress Phenotypes Associated with Intracellular A β and Differential Drug Responsiveness." *Cell Stem Cell* 12 (4): 487–96.
- Krystal, J. H., L. P. Karper, J. P. Seibyl, G. K. Freeman, R. Delaney, J. D. Bremner, G. R. Heninger, M. B. Bowers, and D. S. Charney. 1994. "Subanesthetic Effects of the Noncompetitive NMDA Antagonist, Ketamine, in Humans. Psychotomimetic, Perceptual, Cognitive, and Neuroendocrine Responses." *Archives of General Psychiatry* 51 (3): 199–214.
- Kuegler, Philipp B., Bettina A. Baumann, Bastian Zimmer, Sascha Keller, Andreas Marx, Suzanne Kadereit, and Marcel Leist. 2012. "GFAP-Independent Inflammatory Competence and Trophic Functions of Astrocytes Generated from Murine Embryonic Stem Cells." *Glia* 60 (2): 218–28.
- Lee, Dong-Seok, Kweon Yu, Jeung-Yon Rho, Eunyoung Lee, Jee-Soo Han, Deog-Bon Koo, Yee Sook Cho, Janghwan Kim, Kyung-Kwang Lee, and Yong-Mahn Han. 2006. "Cycloamine Treatment of Human Embryonic Stem Cells Followed by Culture in Human Astrocyte Medium Promotes Differentiation into Nestin- and GFAP-Expressing Astrocytic Lineage." *Life Sciences* 80 (2): 154–59.
- Leu, Chuen-Miin, Randall S. Davis, Lanier A. Gartland, W. David Fine, and Max D. Cooper. 2005. "FcRH1: An Activation Coreceptor on Human B Cells." *Blood* 105 (3): 1121–26.
- Lin, L. F., D. H. Doherty, J. D. Lile, S. Bektesh, and F. Collins. 1993. "GDNF: A Glial Cell Line-Derived Neurotrophic Factor for Midbrain Dopaminergic Neurons." *Science* 260 (5111): 1130–32.
- Lister, Ryan, Mattia Pelizzola, Yasuyuki S. Kida, R. David Hawkins, Joseph R. Nery, Gary Hon, Jessica Antosiewicz-Bourget, et al. 2011. "Hotspots of Aberrant Epigenomic Reprogramming in Human Induced Pluripotent Stem Cells." *Nature* 471 (7336): 68–73.
- Liu, Huisheng, and Su-Chun Zhang. 2011. "Specification of Neuronal and Glial Subtypes from Human Pluripotent Stem Cells." *Cellular and Molecular Life Sciences* 68 (24): 3995–4008.
- Logan, Catriona Y., and Roel Nusse. 2004. "The Wnt Signaling Pathway in Development and Disease." *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 20 (1): 781–810.
- Loh, Yui-Han, Qiang Wu, Joon-Lin Chew, Vinsensius B. Vega, Weiwei Zhang, Xi Chen, Guillaume Bourque, et al. 2006. "The Oct4 and Nanog Transcription Network Regulates Pluripotency in Mouse Embryonic Stem Cells." *Nature Genetics* 38 (4): 431–40.

- Lu, Q. Richard, Tao Sun, Zhimin Zhu, Nan Ma, Meritxell Garcia, Charles D. Stiles, and David H. Rowitch. 2002. "Common Developmental Requirement for Olig Function Indicates a Motor Neuron/Oligodendrocyte Connection." *Cell* 109 (1): 75–86.
- Lu, Q. Richard, Dong-in Yuk, John A Alberta, Zhimin Zhu, Inka Pawlitzky, Joanne Chan, Andrew P McMahon, Charles D Stiles, and David H Rowitch. 2000. "Sonic Hedgehog–Regulated Oligodendrocyte Lineage Genes Encoding BHLH Proteins in the Mammalian Central Nervous System." *Neuron* 25 (2): 317–29.
- Lupo, Giuseppe, William A. Harris, and Katharine E. Lewis. 2006. "Mechanisms of Ventral Patterning in the Vertebrate Nervous System." *Nature Reviews Neuroscience* 7 (2): 103–14.
- Ma, Hong, Robert Morey, Ryan C. O’Neil, Yupeng He, Brittany Daughtry, Matthew D. Schultz, Manoj Hariharan, et al. 2014. "Abnormalities in Human Pluripotent Cells Due to Reprogramming Mechanisms." *Nature* 511 (7508): 177–83.
- Maherali, Nimet, Rupa Sridharan, Wei Xie, Jochen Utikal, Sarah Eminli, Katrin Arnold, Matthias Stadtfeld, et al. 2007. "Directly Reprogrammed Fibroblasts Show Global Epigenetic Remodeling and Widespread Tissue Contribution." *Cell Stem Cell* 1 (1): 55–70.
- Marder, S. R., J. M. Davis, and G. Chouinard. 1997. "The Effects of Risperidone on the Five Dimensions of Schizophrenia Derived by Factor Analysis: Combined Results of the North American Trials." *The Journal of Clinical Psychiatry* 58 (12): 538–46.
- Mariani, Jessica, Maria Vittoria Simonini, Dean Palejev, Livia Tomasini, Gianfilippo Coppola, Anna M. Szekeley, Tamas L. Horvath, and Flora M. Vaccarino. 2012. "Modeling Human Cortical Development in Vitro Using Induced Pluripotent Stem Cells." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109 (31): 12770–75.
- Marshall, Christian R., Daniel P. Howrigan, Daniele Merico, Bhooma Thiruvahindrapuram, Wenting Wu, Douglas S. Greer, Danny Antaki, et al. 2017. "Contribution of Copy Number Variants to Schizophrenia from a Genome-Wide Study of 41,321 Subjects." *Nature Genetics* 49 (1): 27–35.
- Marshall, Christian R., Abdul Noor, John B. Vincent, Anath C. Lionel, Lars Feuk, Jennifer Skaug, Mary Shago, et al. 2008. "Structural Variation of Chromosomes in Autism Spectrum Disorder." *American Journal of Human Genetics* 82 (2): 477–88.
- McCutcheon, Robert A., Anissa Abi-Dargham, and Oliver Howes. 2019. "Schizophrenia, Dopamine and the Striatum: From Biology to Symptoms." *Trends in Neurosciences* (3): 205–20.
- McGrath, Kathleen E., Anne D. Koniski, Kathleen M. Maltby, Judeth K. McGann, and James Palis. 1999. "Embryonic Expression and Function of the Chemokine SDF-1 and Its Receptor, CXCR4." *Developmental Biology* 213 (2): 442–56.

- Missler, Markus, Thomas C. Südhof, and Thomas Biederer. 2012. "Synaptic Cell Adhesion." *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 4 (4).
- Missler, Markus, Weiqi Zhang, Astrid Rohlmann, Gunnar Kattenstroth, Robert E. Hammer, Kurt Gottmann, and Thomas C. Südhof. 2003. "α-Neurexins Couple Ca²⁺ Channels to Synaptic Vesicle Exocytosis." *Nature* 423 (6943): 939–48.
- Mitsui, Kaoru, Yoshimi Tokuzawa, Hiroaki Itoh, Kohichi Segawa, Mirei Murakami, Kazutoshi Takahashi, Masayoshi Maruyama, Mitsuyo Maeda, and Shinya Yamanaka. 2003. "The Homeoprotein Nanog Is Required for Maintenance of Pluripotency in Mouse Epiblast and ES Cells." *Cell* 113 (5): 631–42.
- Moghaddam, Bitá, and Daniel Javitt. 2012. "From Revolution to Evolution: The Glutamate Hypothesis of Schizophrenia and Its Implication for Treatment." *Neuropsychopharmacology* 37 (1): 4–15.
- Müller, Franz-Josef. 2014. "Assessment of Human Pluripotent Stem Cells with PluriTest." *StemBook*.
- Müller, Franz-Josef, Johanna Goldmann, Peter Löser, and Jeanne F. Loring. 2010. "A Call to Standardize Teratoma Assays Used to Define Human Pluripotent Cell Lines." *Cell Stem Cell* 6 (5): 412–14.
- Müller, Franz-Josef, Bernhard M. Schuldt, Roy Williams, Dylan Mason, Gulsah Altun, Eirini Papapetrou, Sandra Danner, et al. 2011. "A Bioinformatic Assay for Pluripotency in Human Cells." *Nature Methods* 8 (4): 315–17.
- Muñoz-Sanjuán, Ignacio, and Ali H. Brivanlou. 2002. "Neural Induction, the Default Model and Embryonic Stem Cells." *Nature Reviews Neuroscience* 3 (4): 271–80.
- Nakagawa, Masato, Michiyo Koyanagi, Koji Tanabe, Kazutoshi Takahashi, Tomoko Ichisaka, Takashi Aoi, Keisuke Okita, Yuji Mochiduki, Nanako Takizawa, and Shinya Yamanaka. 2008. "Generation of Induced Pluripotent Stem Cells without Myc from Mouse and Human Fibroblasts." *Nature Biotechnology* 26 (1): 101–6.
- Neidhart, Michel. 2016. "DNA Methylation – Introduction." In *DNA Methylation and Complex Human Disease*, 1–8. Elsevier.
- Nimmerjahn, Axel, Frank Kirchhoff, and Fritjof Helmchen. 2005. "Resting Microglial Cells Are Highly Dynamic Surveillants of Brain Parenchyma in Vivo." *Science* 308 (5726): 1314–18.
- Ocaña, Oscar H., Rebeca Córcoles, Ángels Fabra, Gema Moreno-Bueno, Hervé Acloque, Sonia Vega, Alejandro Barrallo-Gimeno, Amparo Cano, and M. Angela Nieto. 2012. "Metastatic Colonization Requires the Repression of the Epithelial-Mesenchymal Transition Inducer Prrx1." *Cancer Cell* 22 (6): 709–24.

- Okano, Hideyuki, Hironori Kawahara, Masako Toriya, Keio Nakao, Shinsuke Shibata, and Takao Imai. 2005. "Function of RNA-Binding Protein Musashi-1 in Stem Cells." *Experimental Cell Research*, Molecular Control of Stem Cell Differentiation, 306 (2): 349–56.
- Paolicelli, Rosa C., Giulia Bolasco, Francesca Pagani, Laura Maggi, Maria Scianni, Patrizia Panzanelli, Maurizio Giustetto, et al. 2011. "Synaptic Pruning by Microglia Is Necessary for Normal Brain Development." *Science* 333 (6048): 1456–58.
- Papaioannou, Virginia E. 2014. "The T-Box Gene Family: Emerging Roles in Development, Stem Cells and Cancer." *Development (Cambridge, England)* 141 (20): 3819–33.
- Papapetrou, Eirini P., Mark J. Tomishima, Stuart M. Chambers, Yvonne Mica, Evan Reed, Jayanthi Menon, Viviane Tabar, Qianxing Mo, Lorenz Studer, and Michel Sadelain. 2009. "Stoichiometric and Temporal Requirements of Oct4, Sox2, Klf4, and c-Myc Expression for Efficient Human iPSC Induction and Differentiation." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106 (31): 12759–64.
- Park, In-Hyun, Natasha Arora, Hongguang Huo, Nimet Maherali, Tim Ahfeldt, Akiko Shimamura, M. William Lensch, Chad Cowan, Konrad Hochedlinger, and George Q. Daley. 2008. "Disease-Specific Induced Pluripotent Stem Cells." *Cell* 134 (5): 877–86.
- Paşca, Anca M, Steven A Sloan, Laura E Clarke, Yuan Tian, Christopher D Makinson, Nina Huber, Chul Hoon Kim, et al. 2015. "Functional Cortical Neurons and Astrocytes from Human Pluripotent Stem Cells in 3D Culture." *Nature Methods* 12 (7): 671–78.
- Pera, M. F., B. Reubinoff, and A. Trounson. 2000. "Human Embryonic Stem Cells." *J Cell Sci* 113 (1): 5–10.
- Pereira, João P, Lisa M Kelly, Ying Xu, and Jason G Cyster. 2009. "EBV Induced Molecule-2 Mediates B Cell Segregation between Outer and Center Follicle." *Nature* 460 (7259): 1122–26.
- Poirier, Karine, Yoann Saillour, Nadia Bahi-Buisson, Xavier H. Jaglin, Catherine Fallet-Bianco, Rima Nabbout, Laetitia Castelnau-Ptakhine, et al. 2010. "Mutations in the Neuronal SS-Tubulin Subunit TUBB3 Result in Malformation of Cortical Development and Neuronal Migration Defects." *Human Molecular Genetics* 19 (22): 4462–73.
- Przyborski, Stefan A. 2005. "Differentiation of Human Embryonic Stem Cells After Transplantation in Immune-Deficient Mice." *STEM CELLS* 23 (9): 1242–50.
- Qian, Xuyun, Ha Nam Nguyen, Mingxi M. Song, Christopher Hadiono, Sarah C. Ogden, Christy Hammack, Bing Yao, et al. 2016. "Brain-Region-Specific Organoids Using Mini-Bioreactors for Modeling ZIKV Exposure." *Cell* 165 (5): 1238–54.
- Rees, Elliott, James T. R. Walters, Lyudmila Georgieva, Anthony R. Isles, Kimberly D. Chambert, Alexander L. Richards, Gerwyn Mahoney-Davies, et al. 2014. "Analysis of Copy Number

- Variations at 15 Schizophrenia-Associated Loci." *The British Journal of Psychiatry* 204 (2): 108–14.
- Ripke, Stephan, Benjamin M Neale, Aiden Corvin, James TR Walters, Kai-How Farh, Peter A Holmans, Phil Lee, et al. 2014. "Biological Insights From 108 Schizophrenia-Associated Genetic Loci." *Nature* 511 (7510): 421–27.
- Rouhani, Foad, Natsuhiko Kumasaka, Miguel Cardoso de Brito, Allan Bradley, Ludovic Vallier, and Daniel Gaffney. 2014. "Genetic Background Drives Transcriptional Variation in Human Induced Pluripotent Stem Cells." *PLOS Genetics* 10 (6): e1004432.
- Rowen, Lee, Janet Young, Brian Birditt, Amardeep Kaur, Anup Madan, Dana L. Philipps, Shizhen Qin, et al. 2002. "Analysis of the Human Neurexin Genes: Alternative Splicing and the Generation of Protein Diversity." *Genomics* 79 (4): 587–97.
- Roybon, Laurent, Nuno J. Lamas, Alejandro Garcia-Diaz, Eun Ju Yang, Rita Sattler, Vernice Jackson-Lewis, Yoon A. Kim, et al. 2013. "Human Stem Cell-Derived Spinal Cord Astrocytes with Defined Mature or Reactive Phenotypes." *Cell Reports* 4 (5): 1035–48.
- Ruiz, Sergio, Dinh Diep, Athurva Gore, Athanasia D. Panopoulos, Nuria Montserrat, Nongluk Plongthongkum, Sachin Kumar, et al. 2012. "Identification of a Specific Reprogramming-Associated Epigenetic Signature in Human Induced Pluripotent Stem Cells." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109 (40): 16196–201.
- Rujescu, Dan, Andres Ingason, Sven Cichon, Olli P.H. Pietiläinen, Michael R. Barnes, Timothea Toulopoulou, Marco Picchioni, et al. 2009. "Disruption of the Neurexin 1 Gene Is Associated with Schizophrenia." *Human Molecular Genetics* 18 (5): 988–96.
- Saha, Sukanta, David Chant, Joy Welham, and John McGrath. 2005. "A Systematic Review of the Prevalence of Schizophrenia." *PLoS Medicine* 2 (5).
- Sakakibara, Shin-ichi, Takao Imai, Kayoko Hamaguchi, Masataka Okabe, Jun Aruga, Kazunori Nakajima, Daisuke Yasutomi, et al. 1996. "Mouse-Musashi-1, a Neural RNA-Binding Protein Highly Enriched in the Mammalian CNS Stem Cell." *Developmental Biology* 176 (2): 230–42.
- Sánchez-Danés, Adriana, Yvonne Richaud-Patin, Iria Carballo-Carbajal, Senda Jiménez-Delgado, Carles Caig, Sergio Mora, Claudia Di Guglielmo, et al. 2012. "Disease-Specific Phenotypes in Dopamine Neurons from Human IPS-Based Models of Genetic and Sporadic Parkinson's Disease." *EMBO Molecular Medicine* 4 (5): 380–95.
- Sasai, Yoshiki, Bin Lu, Herbert Steinbeisser, and Eddy M. De Robertis. 1995. "Regulation of Neural Induction by the Chd and Bmp-4 Antagonistic Patterning Signals in *Xenopus*." *Nature*
- Savage, Jeanne E., Philip R. Jansen, Sven Stringer, Kyoko Watanabe, Julien Bryois, Christiaan A. de Leeuw, Mats Nagel, et al. 2018. "Genome-Wide Association Meta-Analysis in 269,867

- Individuals Identifies New Genetic and Functional Links to Intelligence.” *Nature Genetics* 50 (7): 912–19.
- Schaaf, Christian P., Philip M. Boone, Srirangan Sampath, Charles Williams, Patricia I. Bader, Jennifer M. Mueller, Oleg A. Shchelochkov, et al. 2012. “Phenotypic Spectrum and Genotype–Phenotype Correlations of *NRXN1* Exon Deletions.” *European Journal of Human Genetics* 20 (12): 1240–47.
- Schafer, Dorothy P., and Beth Stevens. 2015. “Microglia Function in Central Nervous System Development and Plasticity.” *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 7 (10).
- Schlaepfer. 1994. “Decreased Regional Cortical Gray Matter Volume in Schizophrenia.” *American Journal of Psychiatry* 151 (6): 842–48.
- Schoch, Susanne, Ferenc Deák, Andreas Königstorfer, Marina Mozhayeva, Yildirim Sara, Thomas C. Südhof, and Ege T. Kavalali. 2001. “SNARE Function Analyzed in Synaptobrevin/VAMP Knockout Mice.” *Science* 294 (5544): 1117–22.
- Seeman, P., and T. Lee. 1975. “Antipsychotic Drugs: Direct Correlation between Clinical Potency and Presynaptic Action on Dopamine Neurons.” *Science* 188 (4194): 1217–19.
- Selemon, Lynn D., and Patricia S. Goldman-Rakic. 1999. “The Reduced Neuropil Hypothesis: A Circuit Based Model of Schizophrenia.” *Biological Psychiatry* 45 (1): 17–25.
- Slifstein, Mark, Elsmarieke van de Giessen, Jared Van Snellenberg, Judy L. Thompson, Rajesh Narendran, Roberto Gil, Elizabeth Hackett, et al. 2015. “Deficits in Prefrontal Cortical and Extrastriatal Dopamine Release in Schizophrenia: A Positron Emission Tomographic Functional Magnetic Resonance Imaging Study.” *JAMA Psychiatry* 72 (4): 316–24.
- Smith, Joseph R., Ludovic Vallier, Giuseppe Lupo, Morgan Alexander, William A. Harris, and Roger A. Pedersen. 2008. “Inhibition of Activin/Nodal Signaling Promotes Specification of Human Embryonic Stem Cells into Neuroectoderm.” *Developmental Biology* 313 (1): 107–17.
- Smith, William C., and Richard M. Harland. 1992. “Expression Cloning of Noggin, a New Dorsalizing Factor Localized to the Spemann Organizer in *Xenopus* Embryos.” *Cell* 70 (5): 829–40.
- Srikanth, Priya, Valentina N. Lagomarsino, Christina R. Muratore, Steven C. Ryu, Amy He, Walter M. Taylor, Constance Zhou, Marlise Arellano, and Tracy L. Young-Pearse. 2018. “Shared Effects of *DISC1* Disruption and Elevated WNT Signaling in Human Cerebral Organoids.” *Translational Psychiatry* 8 (April).
- Sun, Lichao, Hebao Yuan, Joseph Burnett, Mari Gasparyan, Yuan Zhang, Feng Zhang, Zhihua Yang, Yuliang Ran, and Duxin Sun. 2019. “*MEOX1* Promotes Tumor Progression and Predicts Poor Prognosis in Human Non-Small-Cell Lung Cancer.” *International Journal of Medical*

Sciences 16 (1): 68–74.

Takahashi, Kazutoshi, Koji Tanabe, Mari Ohnuki, Megumi Narita, Tomoko Ichisaka, Kiichiro Tomoda, and Shinya Yamanaka. 2007. "Induction of Pluripotent Stem Cells from Adult Human Fibroblasts by Defined Factors." *Cell* 131 (5): 861–72.

Takahashi, Kazutoshi, and Shinya Yamanaka. 2006. "Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors." *Cell* 126 (4): 663–76.

TCW, Julia, Minghui Wang, Anna A. Pimenova, Kathryn R. Bowles, Brigham J. Hartley, Emre Lacin, Saima I. Machlovi, et al. 2017. "An Efficient Platform for Astrocyte Differentiation from Human Induced Pluripotent Stem Cells." *Stem Cell Reports* 9 (2): 600–614.

Thompson, Mia, Cynthia Shannon Weickert, Eugene Wyatt, and Maree J. Webster. 2009. "Decreased Glutamic Acid Decarboxylase67 mRNA Expression in Multiple Brain Areas of Patients with Schizophrenia and Mood Disorders." *Journal of Psychiatric Research* 43 (11): 970–77.

Thomson, James A., Joseph Itskovitz-Eldor, Sander S. Shapiro, Michelle A. Waknitz, Jennifer J. Swiergiel, Vivienne S. Marshall, and Jeffrey M. Jones. 1998. "Embryonic Stem Cell Lines Derived from Human Blastocysts." *Science* 282 (5391): 1145–47.

Tischfield, Max A., Hagit N. Baris, Chen Wu, Guenther Rudolph, Lionel Van Maldergem, Wei He, Wai-Man Chan, et al. 2010. "Human TUBB3 Mutations Perturb Microtubule Dynamics, Kinesin Interactions, and Axon Guidance." *Cell* 140 (1): 74–87.

Tkachev, Dmitri, Michael L Mimmack, Margaret M Ryan, Matt Wayland, Tom Freeman, Peter B Jones, Michael Starkey, Maree J Webster, Robert H Yolken, and Sabine Bahn. 2003. "Oligodendrocyte Dysfunction in Schizophrenia and Bipolar Disorder." *The Lancet* 362 (9386): 798–805.

Trapp, B. D., S. B. Andrews, C. Cootauco, and R. Quarles. 1989. "The Myelin-Associated Glycoprotein Is Enriched in Multivesicular Bodies and Periaxonal Membranes of Actively Myelinating Oligodendrocytes." *The Journal of Cell Biology* 109 (5): 2417–26.

Trépanier, M. O., K. E. Hopperton, R. Mizrahi, N. Mechawar, and R. P. Bazinet. 2016. "Postmortem Evidence of Cerebral Inflammation in Schizophrenia: A Systematic Review." *Molecular Psychiatry* 21 (8): 1009–26.

Tsuang. 2000. "Schizophrenia: Genes and Environment." *Biological Psychiatry* 47 (3): 210–20.

Ullrich, Beate, Yuri A Ushkaryov, and Thomas C Südhof. 1995. "Cartography of Neurexins: More than 1000 Isoforms Generated by Alternative Splicing and Expressed in Distinct Subsets of Neurons." *Neuron* 14 (3): 497–507.

Ushkaryov, Y. A., A. G. Petrenko, M. Geppert, and T. C. Südhof. 1992. "Neurexins: Synaptic Cell

- Surface Proteins Related to the Alpha-Latrotoxin Receptor and Laminin." *Science* 257 (5066): 50–56.
- Ushkaryov, Y. A., and T. C. Südhof. 1993. "Neurexin III Alpha: Extensive Alternative Splicing Generates Membrane-Bound and Soluble Forms." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 90 (14): 6410–14.
- Valenzuela, D. M., A. N. Economides, E. Rojas, T. M. Lamb, L. Nunez, P. Jones, N. Y. Lp, R. Espinosa, C. I. Brannan, and D. J. Gilbert. 1995. "Identification of Mammalian Noggin and Its Expression in the Adult Nervous System." *Journal of Neuroscience* 15 (9): 6077–84..
- Vendel, Andrew C., Jill Calemine-Fenau, Anita Izrael-Tomasevic, Vandana Chauhan, David Arnott, and Dan L. Eaton. 2009. "B and T Lymphocyte Attenuator Regulates B Cell Receptor Signaling by Targeting Syk and BLNK." *The Journal of Immunology* 182 (3): 1509–17.
- Vikhreva, O. V., V. I. Rakhmanova, D. D. Orlovskaya, and N. A. Uranova. 2016. "Ultrastructural Alterations of Oligodendrocytes in Prefrontal White Matter in Schizophrenia: A Post-Mortem Morphometric Study." *Schizophrenia Research, Post-mortem Pathology in Schizophrenia*, 177 (1): 28–36.
- Virchow, Rudolf. 1862. *Gesammelte Abhandlungen zur wissenschaftlichen Medicin*. Grote.
- Walsh, Tom, Jon M. McClellan, Shane E. McCarthy, Anjené M. Addington, Sarah B. Pierce, Greg M. Cooper, Alex S. Nord, et al. 2008. "Rare Structural Variants Disrupt Multiple Genes in Neurodevelopmental Pathways in Schizophrenia." *Science (New York, N.Y.)* 320 (5875): 539–43.
- Wernig, Marius, Alexander Meissner, Ruth Foreman, Tobias Brambrink, Manching Ku, Konrad Hochedlinger, Bradley E. Bernstein, and Rudolf Jaenisch. 2007. "In Vitro Reprogramming of Fibroblasts into a Pluripotent ES-Cell-like State." *Nature* 448 (7151): 318–24.
- Wernig, Marius, Jian-Ping Zhao, Jan Pruszak, Eva Hedlund, Dongdong Fu, Frank Soldner, Vania Broccoli, Martha Constantine-Paton, Ole Isacson, and Rudolf Jaenisch. 2008. "Neurons Derived from Reprogrammed Fibroblasts Functionally Integrate into the Fetal Brain and Improve Symptoms of Rats with Parkinson's Disease." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105 (15): 5856–61.
- Williams, Susan M., Robert K. P. Sullivan, Heather L. Scott, David I. Finkelstein, Paul B. Colditz, Barbara E. Lingwood, Peter R. Dodd, and David V. Pow. 2005. "Glial Glutamate Transporter Expression Patterns in Brains from Multiple Mammalian Species." *Glia* 49 (4): 520–41.
- Windrem, Martha S., Mikhail Osipovitch, Zhengshan Liu, Janna Bates, Devin Chandler-Militello, Lisa Zou, Jared Munir, et al. 2017. "Human iPSC Glial Mouse Chimeras Reveal Glial Contributions to Schizophrenia." *Cell Stem Cell* 21 (2): 195-208.e6.

- Wong, Albert Hung Choy, and Hubert H. M. Van Tol. 2003. "Schizophrenia: From Phenomenology to Neurobiology." *Neuroscience & Biobehavioral Reviews* 27 (3): 269–306.
- Ying, Lei, Jason A. Mills, Deborah L. French, and Paul Gadue. 2015. "OCT4 Coordinates with WNT Signaling to Pre-Pattern Chromatin at the SOX17 Locus during Human ES Cell Differentiation into Definitive Endoderm." *Stem Cell Reports* 5 (4): 490–98.
- Yu, Junying, Kejin Hu, Kim Smuga-Otto, Shulan Tian, Ron Stewart, Igor I. Slukvin, and James A. Thomson. 2009. "Human Induced Pluripotent Stem Cells Free of Vector and Transgene Sequences." *Science (New York, N.Y.)* 324 (5928): 797–801.
- Yu, Junying, Maxim A. Vodyanik, Kim Smuga-Otto, Jessica Antosiewicz-Bourget, Jennifer L. Frane, Shulan Tian, Jeff Nie, et al. 2007. "Induced Pluripotent Stem Cell Lines Derived from Human Somatic Cells." *Science* 318 (5858): 1917–20.
- Yusa, Kosuke, S. Tamir Rashid, Helene Strick-Marchand, Ignacio Varela, Pei-Qi Liu, David E. Paschon, Elena Miranda, et al. 2011. "Targeted Gene Correction of A1-Antitrypsin Deficiency in Induced Pluripotent Stem Cells." *Nature* 478 (7369): 391–94.
- Yusuf, Faisal, Rizwan Rehimi, Fangping Dai, and Beate Brand-Saberi. 2005. "Expression of Chemokine Receptor CXCR4 during Chick Embryo Development." *Anatomy and Embryology* 210 (1): 35–41.
- Zeng, Hui, Min Guo, Kristen Martins-Taylor, Xiaofang Wang, Zheng Zhang, Jung Woo Park, Shuning Zhan, et al. 2010. "Specification of Region-Specific Neurons Including Forebrain Glutamatergic Neurons from Human Induced Pluripotent Stem Cells." *PLoS ONE* 5 (7).
- Zhang, Su-Chun, Marius Wernig, Ian D. Duncan, Oliver Brüstle, and James A. Thomson. 2001. "In Vitro Differentiation of Transplantable Neural Precursors from Human Embryonic Stem Cells." *Nature Biotechnology* 19 (12): 1129–33.
- Zhang, Yingsha, Changhui Pak, Yan Han, Henrik Ahlenius, Zhenjie Zhang, Soham Chanda, Samuele Marro, et al. 2013. "Rapid Single-Step Induction of Functional Neurons from Human Pluripotent Stem Cells." *Neuron* 78 (5): 785–98.
- Zhou, Qiao, and David J. Anderson. 2002. "The BHLH Transcription Factors OLIG2 and OLIG1 Couple Neuronal and Glial Subtype Specification." *Cell* 109 (1): 61–73.

Thesen

1. Das vorliegende Modell und dessen Etablierung eröffnet die Möglichkeit, funktionelle krankheitsspezifische Auswirkungen auf Zellebene zu untersuchen.
2. Die Pluripotenz der reprogrammierten iPS-Zellen wurde durch den Nachweis pluripotenzassoziierter Marker und spontaner Differenzierung belegt.
3. Die terminal differenzierten Zellen wiesen mikroskopisch, auf Transkriptebene und auf Proteinebene Eigenschaften reifer Neurone auf.
4. Eine durchflusszytometrische Analyse zur quantitativen Bestimmung neuronaler und glialer Subtypen wurde etabliert.
5. Die entstandene neuronale Mischkultur enthielt Gliazellen, glutamaterge, GABAerge und dopaminerge Neurone. Sie bietet eine valide Grundlage für verschiedenste zellspezifische Untersuchungen zur Pathogenese der Schizophrenie.
6. Die in der Arbeit untersuchten Patienten mit fehlendem Promotor und Exon 1-6 in NRXN1 zeigen eine ausgeprägtere klinische Symptomatik als Patienten mit einer Deletion in Exon 4-6.

Anlagen

Tabelle 11: Verwendete Oligonukleotidpaare für die PCR

Gen	Forward Primer	Reverse Primer	bp	NCBI Referenz-Sequenz für Primer-Design
GAPDH	caaggtcatccatgacaacttg	gtccaccacctgttgctgtag	497	NM_001256799.2
OCT4	caagccctcatttcaccag	ttgatgtcctgggactcctc	467	NM_002701.5
MYC	ttcgggtagtggaaccag	taggaggccagcttctctga	490	NM_002467.4
SOX2	agtctcaagcgacgaaaaa	ggaaagtgggatcgaaca	410	NM_003106.3
KLF4	tgattgtagtgctttctggctggctcc	acgatcgtggccccggaaaaggacc	387	NM_004235.5
LIN28A	ggttcggcttcctgtccatga	ggtagcagcttgcattcctg	313	NM_024674.5
NANOG	ttccttccatggatctg	actggatgtctgggtctgg	483	NM_024865.3
BTLA	gacacagcaggaaggaaat	atggccctgttggagttag	331	NM_181780.3
FCRLA	aaccctaggtgttggctct	tggtaggaagggtgagtagc	295	NM_032738.3
GPR183	gaccgaacgagtcactgat	acacaaggcatctccgattc	352	NM_004951.4
TBXT	aattggtccagccttggat	tactggctgtccacgatgc	290	NM_003181.3
MOX1	gcagcgtaccctgacttctc	cggttctggaaccacacttt	500	NM_013999.3
PRRX1	gaccatgacctccagctacg	gagcaggacgaggtacgatg	557	NM_022716.3
MSI1	aaggagtgctggtgatgcg	ggcgaggcctgtataactcc	571	NM_002442.3
PAX6	aataacctgcctatgcaacc	aactgaaactggaactgacac	207	NM_001258465.1
SHH	cgaagatggccaccactcag	gcttccaccagcagtgatg	174	NM_001310462.1
FOXA2	tgggagcgtgaagatggaaggcac	tcatgccagcggccagctacgacgac	216	NM_021784.4
SOX17	tagttgggtggtcctgcat	cgcttcatggtgtgggcta	166	NM_022454.3
CXCR4	gcctgttggctgccttacta	caggaaaaacgttccacggg	674	NM_003467.2
TUBB3	aagaggcgagatgtacgaa	gcctggagctgcaataagac	267	NM_006086.3
SYT1	ttctactgactgcccaagg	gcaaaagagcttggccccttc	508	NM_001135806.1
STX2	ctgacggcgttaggaagaa	gtctgtggtggttctcccag	462	NM_194356.2
VAMP2	gccaaactcaagcgcaata	gcaaatgaaggacttgggg	373	NM_014232.2
NLGN1	caacacaatgccttacctgtg	atgccatcactgcttccaaa	458	NM_014932.3
SLC17A7	gacgacagcctttgtggtt	gggagatgagcagcaggtag	353	NM_020309.3
GRIA2	gaatgctggaggtgcatttt	tgatgcaccgttacatggat	373	NM_000826.3
GABRB1	gtcatcgaccaacaacaacg	cagaactcacaggggacat	422	NM_001319053.1
GAD1	cagaaaactggggctcaaga	atgtccaccactccaggag	249	NM_000817.2
CD68	tgacaccacggttacagag	cgctccggatgatgcagaa	928	NM_001040059.1
GFAP	ggccccactgacaggagtaccagg	cttctgctcggggccctcatgagacg	328	NM_002055.4
OLIG2	cagaagcgtgatggtcata	tcggcagttttgggtattc	209	NM_005806.3
MAG	caccgcgaggaacctctatg	gcctctcgtctctgacttc	263	NM_002361.3

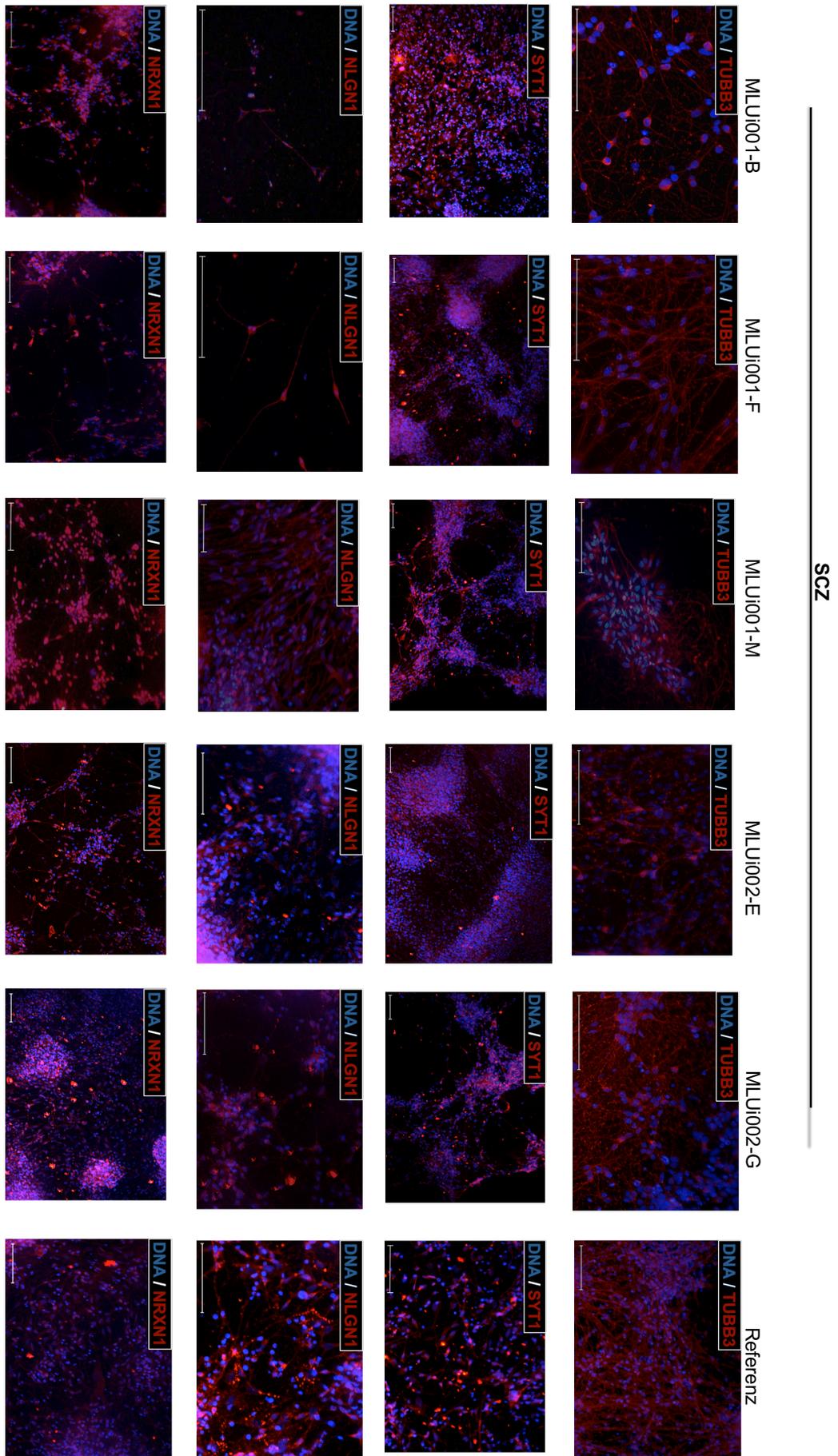


Abbildung 25: Immunhistochemische Analyse der terminal differenzierten Zellen

Nachweis neuronaler Proteine in allen Zelllinien (MLUi001-B/-F/-M, MLUi002-E/-G, Referenz).

SCZ

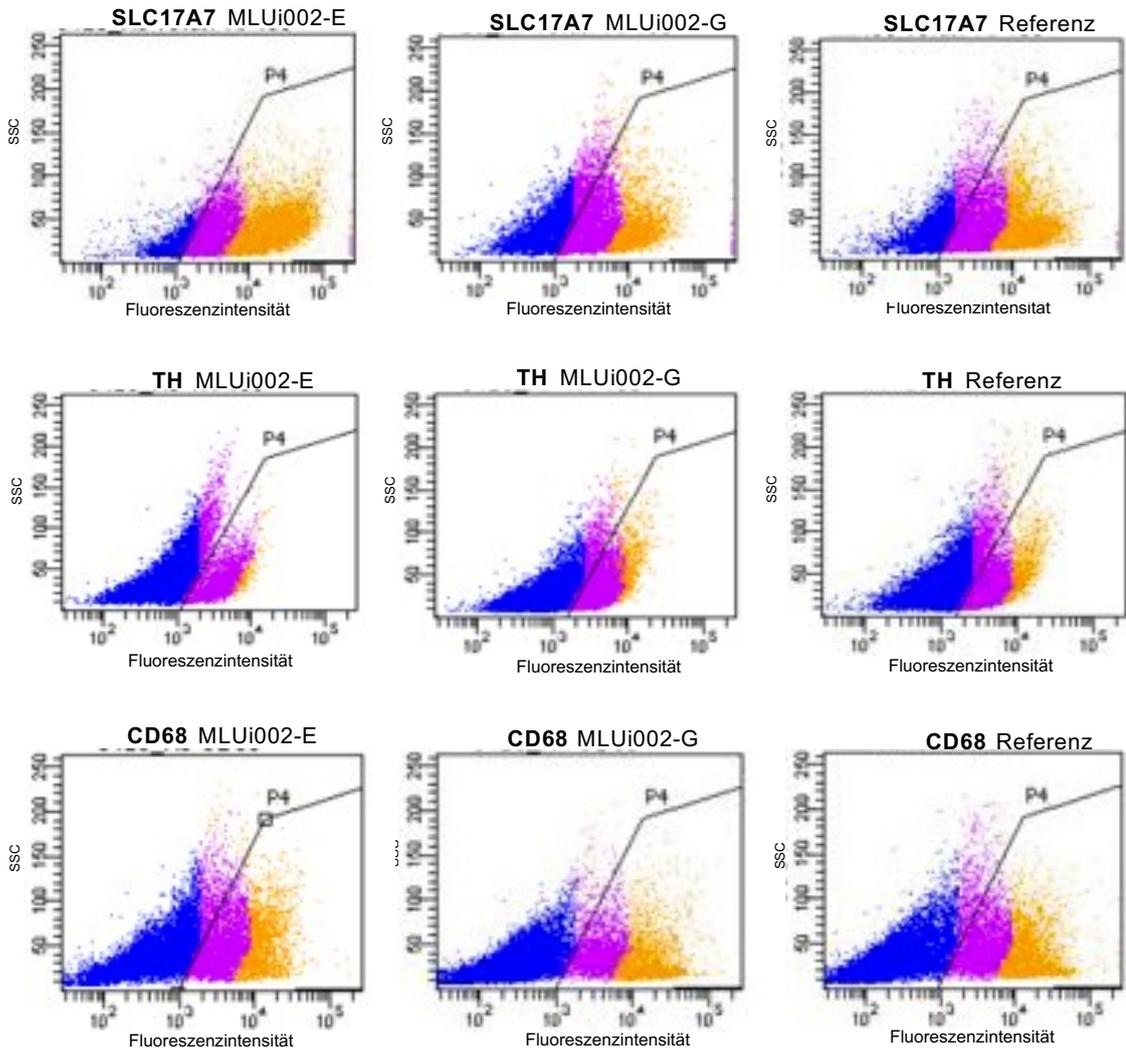


Abbildung 26: Durchflusszytometrische Analyse neuronaler und glialer Marker von patientenspezifischen Neuronen und Referenz

Selbstständigkeitserklärung

Ich erkläre an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit mit dem Titel „Analyse Patientenspezifischer Stammzellen und deren Differenzierung in verschiedene neuronale Subtypen zur Analyse von DNA-Variationen in Neurexin 1“ selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe. Alle Regeln der guten wissenschaftlichen Praxis wurden eingehalten; es wurden keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt und die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht.

Ich versichere, dass ich für die inhaltliche Erstellung dieser Arbeit nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- und Beratungsdiensten (Promotionsberater oder andere Personen) in Anspruch genommen habe. Niemand hat von mir unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen.

Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.



Köln, den 22.07.2021

Erklärung über frühere Promotionsversuche

Ich erkläre hiermit, dass ich mich an keiner anderen Hochschule einem Promotionsverfahren unterzogen bzw. eine Promotion begonnen habe.

Ich erkläre, die Angaben wahrheitsgemäß gemacht und die wissenschaftliche Arbeit an keiner anderen wissenschaftlichen Einrichtung zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht zu haben. Den Antrag auf Eröffnung des Promotionsverfahrens stelle ich erstmalig an der Medizinischen Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle (Saale).



Köln, den 22.07.2021

Danksagung

Danke an Prof. Dr. med. Dan Rujescu, der mir diese Promotion in seinem Institut ermöglicht und mich zum Einschlagen des experimentellen Weges ermutigt hat.

Ein besonderes Danke an Dr. rer. nat. Matthias Jung, der mir als Ansprechpartner im Labor immer mit offenem Ohr sowie Rat und Tat zur Seite gestanden hat.

Danke an eine tolle und immer unterstützende Arbeitsgruppe.

Danke an Jessica Reinsch, partner in crime für so viele Labortage, das haben wir gut gemacht.

DANKE an all die tollen Menschen in meinem privaten Umfeld, die mir zur Seite gestanden haben. Ihr seid Alles.

Und zu guter Letzt noch ein kleines Danke an mich selbst.