
**Transkriptionsanalysen und metabolische Analysen von Neuronen
differenziert aus patienten-spezifischen induziert pluripotenten
Stammzellen zur Untersuchung von DNA-Variationen in Neurexin 1**

Dissertation
Zur Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Medizin (Dr. med.)

vorgelegt
der Medizinischen Fakultät
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Dorothee Jessica Reinsch
geboren am 30.08.1991 in Berlin

Betreuer: Prof. Dr. med. Dan Rujescu

Gutachterin & Gutachter: PD Dr. med. Dagmar Riemann
PD Dr. rer. nat. Dr. habil. med. Martin Schicht, Erlangen

14.09.2021
26.09.2022

Referat

Schizophrenie ist eine komplexe psychiatrische Erkrankung dessen Pathomechanismen bis heute noch nicht vollständig aufgeklärt sind. Die Erkrankung zeigt sich in verschiedenen Symptomkomplexen. Während sich die Positivsymptomatik, bestehend aus Halluzinationen und Wahn, medikamentös behandeln lässt, gibt es kaum Möglichkeiten die Negativsymptomatik und die kognitiven Einschränkungen der Patienten erfolgreich zu therapieren. Die Negativsymptomatik bestehend aus eingeschränktem Gefühlserleben und sozialem Rückzug sowie die kognitiven Einschränkungen stellen eine enorme Beeinträchtigung im Leben eines Patienten dar. Um neue therapeutische Angriffsmöglichkeiten ausfindig zu machen, ist die Untersuchung der zellulären und molekularbiologischen Pathomechanismen der Schizophrenie im Fokus der aktuellen Wissenschaft. Besonders die Entwicklung der kortikalen Interneurone nimmt bei der Entwicklung der Schizophrenie einen großen Stellenwert ein. Ebenso sind heterozygote DNA-Variationen im Gen Neurexin 1 signifikant mit einer Schizophrenie assoziiert.

Für diese Arbeit wurden induziert pluripotente Stammzellen zur Verfügung gestellt, welche von Schizophreniepatienten generiert wurden. Diese Patienten tragen eine DNA-Variation in Neurexin 1. Im Rahmen dieser Arbeit wurden aus den Stammzellen der Patienten Neurone differenziert und auf die Transkription spezifischer Interneuronmarker inklusive relevanter Transkriptionsfaktoren der Interneuronentwicklung untersucht. Es zeigte sich, dass sich dessen Transkription im Vergleich zur Kontrolle unterscheidet und im Einklang mit Ergebnissen aus anderen Schizophrenie-Modellen sind. Außerdem wurden die differenzierten Neurone metabolischen Analysen unterzogen. Auch hier zeigten sich Unterschiede im Vergleich zur Kontrolle und auch diese gewonnenen Ergebnisse sind im Einklang mit aktuell publizierten Ergebnissen.

Das verwendete *in vitro*-Modell ermöglicht die Auswirkungen der vorliegenden DNA-Variationen in Neurexin 1 auf zellulärer und molekularbiologischer Ebene zu untersuchen. Es trägt daher einen großen Teil dazu bei, die vorliegenden Pathomechanismen der Schizophrenie genauer zu beleuchten, um in Zukunft geeignete Angriffspunkte neuer Therapien zu finden.

Reinsch, Dorothee Jessica: Transkriptionsanalysen und metabolische Analysen von Neuronen differenziert aus Patienten-spezifischen induziert pluripotenten Stammzellen zur Untersuchung von DNA-Variationen in Neurexin 1. Halle (Saale), Univ., Med. Fak., Diss., 80S., 2022

Inhaltsverzeichnis

| | |
|---|----|
| Abbildungsverzeichnis..... | |
| Tabellenverzeichnis..... | |
| Abkürzungsverzeichnis | |
| 1 Einleitung | 1 |
| 1.1 Schizophrenie | 1 |
| 1.2 Induziert pluripotente Stammzellen und deren Verwendung..... | 4 |
| 1.3 Das zentrale Nervensystem | 5 |
| 1.4 IN im kortikalen Netzwerk..... | 6 |
| 1.5 Entwicklung kortikaler IN | 8 |
| 1.6 Stoffwechsel kortikaler Neurone..... | 15 |
| 1.7 Neurexine..... | 15 |
| 2 Zielstellung..... | 19 |
| 3 Material und Methodik..... | 20 |
| 3.1 Zellkultur | 20 |
| 3.2 Molekularbiologische Methoden | 24 |
| 3.3 Immunfluoreszenzfärbung..... | 26 |
| 3.4 <i>Agilent Seahorse XFe96 Analyzer</i> | 27 |
| 4 Ergebnisse | 32 |
| 4.1 Differenzierungsverlauf von iPSC zu kortikalen Neuronen | 32 |
| 4.2 Transkriptionsanalysen synaptischer Marker..... | 38 |
| 4.3 Expressionsanalyse von TUBB3 | 39 |
| 4.4 Transkriptionsanalysen molekularer Marker für IN | 39 |
| 4.5 Stoffwechselanalysen | 45 |
| 5 Diskussion..... | 48 |
| 5.1 Charakterisierung der aus iPSC gewonnenen Neurone | 48 |
| 5.2 IN | 48 |
| 5.3 Ergebnisse im Kontext mit NRXN1 | 49 |
| 5.4 Ergebnisse im Kontext zu anderen SCZ-Modellen | 52 |
| 5.5 Ergebnisse im Kontext der embryonalen Hirnentwicklung | 60 |
| 5.6 Bewertung des iPSC-Modells dieser Arbeit..... | 64 |
| 5.7 Stoffwechsel kortikaler Neurone..... | 67 |
| 6 Zusammenfassung..... | 71 |
| 7 Literaturverzeichnis | 72 |
| 8 Thesen..... | 80 |
| Anlagen..... | |

Abbildungsverzeichnis

| | |
|--|------|
| Abbildung 1: Risikofaktoren der SCZ..... | 3 |
| Abbildung 2: Die IN und ihre spezifischen synaptischen Verbindungen zu PZ..... | 7 |
| Abbildung 3: Einfluss bestimmter Morphogene auf die Entwicklung des ZNS..... | 8 |
| Abbildung 4: Charakterisierung kortikaler IN..... | 10 |
| Abbildung 5: Darstellung der molekularen und strukturellen Vielfalt der Neurexine | 16 |
| Abbildung 6: Funktionsweise des <i>Seahorse XF Cell Mito Stress Test</i> | 30 |
| Abbildung 7: iPSC | 32 |
| Abbildung 8: NSC generiert aus iPSC durch Kultivierung in NIM..... | 33 |
| Abbildung 9: Verlauf der Differenzierung von 12 d bis 68 d. | 34 |
| Abbildung 10: Differenzierung der Linie P2-E mit abweichender Morphologie. | 35 |
| Abbildung 11: Differenzierung der Linie KON1-B mit abweichendem Verlauf | 36 |
| Abbildung 12: Morphologische Entwicklung in Abhängigkeit von der Zelldichte..... | 37 |
| Abbildung 13: Transkription synaptischer Marker an TD | 38 |
| Abbildung 14: Expressionsanalyse von TUBB3 mittels Immunfluoreszenz..... | 39 |
| Abbildung 15: Transkription von IN-Markern im Vergleich TD Patient 1 und TD Patient 2 | 40 |
| Abbildung 16: Transkription von IN-Markern in den einzelnen Replikaten der TD der Patienten..... | 42 |
| Abbildung 17: Glycolytic-Rate-Assay. Vergleich TD der SCZ-Linien mit MO13.3 | 45 |
| Abbildung 18: Mito-Stress-Test. Vergleich der TD der SCZ-Linien mit TD KON4-B..... | 47 |
| Abbildung 19: Angriffspunkte der Reagenzien des <i>Seahorse XF Cell Mito Stress Test</i> an der Elektronentransportkette der inneren Mitochondrienmembran. | VII |
| Abbildung 20: Morphologie der TD am Tag der Probenentnahme 68 d. | VIII |
| Abbildung 21: Signifikante Unterschiede in der Expression bestimmter IN-Marker zwischen TD Patient 1 und TD Patient 2 | IX |
| Abbildung 22: Ergebnisse des Glycolytic Rate Assay der OL der Linie MO3.13 | X |
| Abbildung 23: Ergebnisse des Glycolytic Rate Assay der TD der SCZ-Linien. | X |

Tabellenverzeichnis

| | |
|---|-----|
| Tabelle 1: Verwendete humane iPSC-Kontrolllinien | 20 |
| Tabelle 2: Verwendete humane SCZ iPSC-Linien | 20 |
| Tabelle 3: Zusammensetzung der verwendeten Zellkulturmedien und Zusätze..... | 23 |
| Tabelle 4: Zusammensetzung eines Reverse-Transkriptions-Ansatzes..... | 24 |
| Tabelle 5: Zusammensetzung eines semiquantitativen PCR-Ansatzes | 25 |
| Tabelle 6: Programm für die semiquantitative PCR | 25 |
| Tabelle 7: Zusammensetzung eines quantitativen <i>real time</i> PCR-Ansatzes | 26 |
| Tabelle 8: Programm für die quantitative <i>real time</i> PCR | 26 |
| Tabelle 9: Zusammensetzung des <i>Glycolytic Rate Assay-Medium</i> | 28 |
| Tabelle 10: Zusammensetzung des <i>Mito-Stress-Test Assay-Medium</i> | 29 |
| Tabelle 11: Zusammensetzung TAE-Puffer für Gelelektrophorese | VI |
| Tabelle 12: Verwendete Oligonukleotidprimer für die semiquantitative PCR | VI |
| Tabelle 13: Verwendete Oligonukleotidprimer für die quantitative <i>real time</i> PCR | VI |
| Tabelle 14: Verwendete <i>PrimePCR</i> Assays (Bio-Rad, München) für die quantitative <i>real time</i> PCR..... | VII |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|-----------------|---|
| 2-DG | 2-Deoxy-D-Glukose |
| AS | alternatives/-e Spleißsegment/-e |
| ASCL1 | <i>achaete-scute family bHLH transcription factor</i> |
| ATP | Adenosintriphosphat |
| BMP | <i>bone morphogenic protein</i> |
| bp | Basenpaare |
| CALB1 | <i>calbindin 1</i> |
| CALB2 | <i>calbindin 2</i> |
| CGE | <i>caudal ganglionic eminence</i> |
| CNV | <i>copy number variations</i> |
| CO ₂ | Kohlenstoffdioxid |
| COUPTF1 | <i>nuclear receptor subfamily 2 group F member 1</i> |
| CXCL12 | <i>C-X-C motif chemokine ligand 12</i> |
| CXCR4 | <i>C-X-C motif chemokine receptor 4</i> |
| d | Tag/Tage |
| DLPFC | dorsolateraler präfrontaler Kortex |
| DLX1 | <i>distal-less homeobox 1</i> |
| DLX2 | <i>distal-less homeobox 2</i> |
| DMEM | <i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i> |
| ECAR | extrazelluläre Azidifikationsrate |
| EGF | <i>epidermal growth factor like</i> |
| FCCP | <i>carbonyl cyanide-p-trifluoromethoxyphenylhydrazone</i> |
| GABA | Gamma-Aminobuttersäure |
| GAD67 | <i>glutamate decarboxylase 67</i> |
| GAPDH | <i>glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase</i> |
| GE | <i>ganglionic eminences</i> |
| <i>glycoPER</i> | Protonen-Efflux-Rate im Rahmen der Glykolyse |
| IN | Interneuron/-e |
| iPSC | induziert pluripotente Stammzelle/-en |
| LGE | <i>lateral ganglionic eminence</i> |
| LGM | <i>low GABA marker</i> |
| LHX6 | <i>LIM homeobox 6</i> |
| LNS | <i>laminin/neurexin/sex-hormon-binding</i> |
| MGE | <i>medial ganglionic eminence</i> |
| NIM | neurales Induktionsmedium |
| NKX2.1 | <i>NK2 homeobox 1</i> |
| NPY | <i>neuropeptide Y</i> |
| NRXN1 | <i>neurexin 1</i> |
| NSC | neurale Stammzelle/-en |
| O ₂ | molekularer Sauerstoff |
| OCR | Sauerstoffkonsumrate |
| OL | Oligodendrozyt/-en |
| OLIG2 | <i>oligodendrocyte transcription factor 2</i> |
| OXPHOS | oxidative Phosphorylierung |
| PBS | phosphatgepufferte Salzlösung |
| pc | <i>post conceptionem</i> |
| PCR | Polymerasekettenreaktion |
| PFC | präfrontaler Kortex |
| PM | <i>post mortem</i> |
| PROX1 | <i>prospero homeobox 1</i> |
| PVALB | <i>parvalbumin</i> |
| PZ | Pyramidenzelle/-en |

| | | |
|--------|-------|--|
| RELN | | <i>reelin</i> |
| Rot/AA | | Rotenon plus Antimycin A |
| SCZ | | Schizophrenie |
| SHH | | <i>sonic hedgehog signaling molecule</i> |
| SP8 | | <i>specificity protein 8</i> |
| SST | | <i>somatostatin</i> |
| SYT1 | | <i>synaptotagmin 1</i> |
| TD | | terminal differenziertes/-e Neuron/-e |
| TDM1 | | terminales Differenzierungsmedium 1 |
| TDM2 | | terminales Differenzierungsmedium 2 |
| TF | | Transkriptionsfaktor/-en |
| TUBB3 | | <i>tubulin beta 3 class III</i> |
| VAMP2 | | <i>vesicle associated membrane protein 2</i> |
| VIP | | <i>vasoactive intestinal peptide</i> |
| WNT | | <i>wingless integrated protein</i> |

1 Einleitung

1.1 Schizophrenie

1.1.1 Symptomkomplexe und Therapieansätze

Schizophrenie (SCZ) ist eine psychiatrische Erkrankung, die bei Betroffenen erstmalig in der Adoleszenz oder im jungen Erwachsenenalter zwischen 15 – 35 Jahren klassischerweise durch Psychosen symptomatisch wird. Die Lebenszeitprävalenz liegt bei 1,0 %. Frauen und Männer sind gleich stark betroffen, wobei im Durchschnitt Männer etwas früher erkranken. Die Suizidrate liegt bei 10 % [1]. Zu den klassischen Symptomen zählen wahnhaft, paranoide Gedanken, akustische Halluzinationen, desorganisiertes Denken und desorganisierte Sprache, grob desorganisiertes Verhalten oder gestörte Motorik sowie Negativsymptomatik [2]. Negativsymptomatik fasst die nichtproduktive Symptomatik zusammen. Das sind Fähigkeiten, die den SCZ-Patienten im Vergleich zu nicht erkrankten Individuen fehlen. Zu den wichtigsten Negativsymptomen zählen Störungen des Affekts in Form von eingeschränktem Gefühlserleben, Antriebsminderung, Sprachverarmung und sozialer Rückzug. Kognitive Einschränkungen in Form von Aufmerksamkeits- und Konzentrationsstörungen, sowie Gedächtnisstörungen können sich im Verlauf entwickeln [2].

Der Begriff Psychose ist historisch geprägt und nicht klar definiert. Bei SCZ versteht man unter dem Begriff das Auftreten der oben beschriebenen Positivsymptome. Besonders typisch für SCZ sind dabei der Wahn und die Halluzinationen [2]. Zusätzlich ist in einer klinischen Longitudinalstudie gezeigt worden, dass Individuen, welche im Erwachsenenalter eine SCZ inklusiver Psychosen entwickelten, bereits im Kindesalter kognitive Einschränkungen zeigten. Verglichen wurden die Ergebnisse einer Gruppe von Kindern, die im Verlauf eine SCZ entwickelten, mit den Ergebnissen einer Gruppe von Kindern, welche bis zum Alter von 32 Jahren keine SCZ aufwiesen. Zu den beobachteten Defiziten zählen Einschränkungen des deklarativen Gedächtnisses, des Arbeitsgedächtnisses, des problemorientierten Handelns, der Koordination, der Aufmerksamkeit und der Konzentrationsfähigkeit [3]. Die Psychosen lassen sich mit klassischen und atypischen Antipsychotika behandeln, allerdings auf Kosten zum Teil starker Nebenwirkungen. Die häufigsten Nebenwirkungen sind neurologische Symptome, kardiale Nebenwirkungen sowie metabolische Veränderungen. Das jeweilige Ausmaß ist abhängig von der verwendeten Substanzklasse [4,5]. Die Antipsychotika greifen in das dopaminerge Neurotransmittersystem ein, welches einen

großen Einfluss auf die Entwicklung der produktiven Symptomatik bei Betroffenen nimmt. Daher können die Positivsymptome damit gut behandelt werden. Jedoch wird derzeit davon ausgegangen, dass auch weitere Neurotransmittersysteme an der Pathogenese der SCZ beteiligt sind, welche die erwähnten Negativsymptome und die kognitiven Defizite hervorrufen. Aktuell wird die Beteiligung der Neurone, welche Glutamat sowie Gamma-Aminobuttersäure (GABA) als Neurotransmitter nutzen, diskutiert [6,7]. Dies bietet einen Erklärungsansatz, weshalb die Negativsymptome sowie die kognitiven Einschränkungen mit bekannten Antipsychotika nicht effektiv behandelbar sind. Die zelluläre und molekularbiologische Grundlage der SCZ ist im großen Interesse aktueller Forschung mit dem Ziel, einen möglichen Angriffspunkt für weitere medikamentöse Therapien herauszuarbeiten [7].

1.1.2 Risikofaktoren

SCZ ist eine Erkrankung multifaktorieller Genese, hat ihren Ursprung bereits früh in der embryonalen Entwicklung und zählt daher zu den Neuroentwicklungsstörungen. Bekannte Risikofaktoren stellen genetische Disposition, Umweltfaktoren und psychosoziale Faktoren dar [8,6,9]. Mithilfe Genomweiter Assoziationsstudien ist es möglich, Risikogene, die im Zusammenhang mit SCZ stehen, zu identifizieren. Es sind bereits 145 Genloki bekannt [10]. Betroffen sind häufig Gene, die für Proteine kodieren, welche an der Signalübertragung zwischen den einzelnen Neuronen an den Synapsen einen großen Stellenwert einnehmen. Unter anderem können Rezeptorproteine der Neurotransmitter Glutamat und Dopamin betroffen sein oder spannungsabhängige Calcium-Kanäle, welche einen besonderen Stellenwert in der Freisetzung der Neurotransmitter einnehmen [6]. Ebenso ist das Gen eines weiteren synaptischen Proteins mit der SCZ assoziiert, das Neurexin 1 (NRXN1) [8]. Diese Daten deuten darauf hin, dass die Signalübertragung zwischen den Neuronen bei SCZ-Patienten verändert ist. Das Gen NRXN1 und die daraus kodierten Proteine, werden zu einem späteren Zeitpunkt näher erläutert. Abbildung 1 zeigt in einer schematischen Darstellung die weiteren bekannten Faktoren, die einen Einfluss auf die Entwicklung einer SCZ nehmen, sowie das Zeitfenster, in denen diese ein Risiko für das Individuum darstellen.

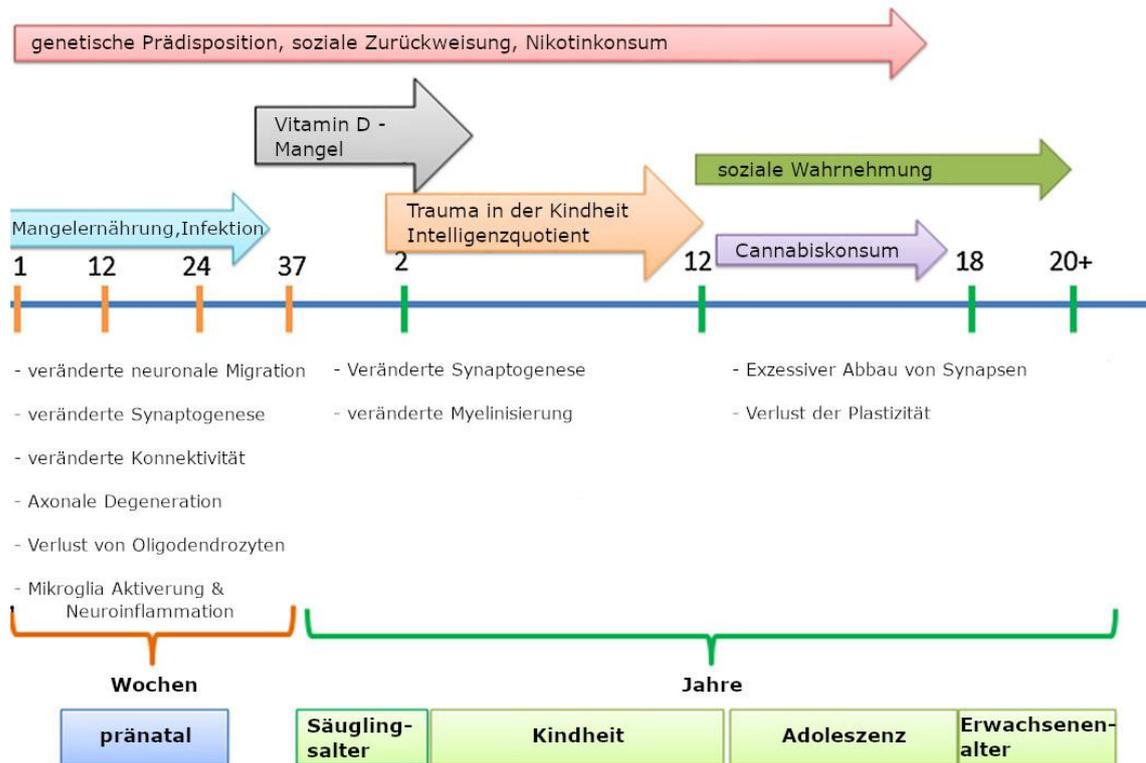


Abbildung 1: Risikofaktoren der SCZ. Das Schema zeigt Risikofaktoren mit dem Schwerpunkt Umwelteinflüsse, die die Entwicklung einer SCZ in einem bestimmten Zeitraum begünstigen. Der dargestellte Zeitstrahl stellt den Zeitraum der Entwicklung des Individuums von der Konzeption bis zum Ausbruch der SCZ im Erwachsenenalter dar. Oberhalb des Zeitstrahls sind die Umwelteinflüsse dargestellt. Anhand der Pfeile ist das Zeitfenster abzulesen, in dem diese einen Risikofaktor zur Entwicklung der SCZ darstellen. Unterhalb des Zeitstrahls ist die Auswirkung auf die Entwicklung des neuronalen Netzwerkes abzulesen. Die Abbildung verdeutlicht, dass in jedem Entwicklungsabschnitt einschlägige Ereignisse oder Umwelteinflüsse eine Entwicklung der SCZ bedingen können. Vor allem pränatale Umweltfaktoren wie maternale Mangelernährung, maternale Infektion/Inflammation und maternaler Nikotinkonsum nehmen dabei einen schwerwiegenden Einfluss ein. Traumata in der Kindheit können sowohl physisch als auch psychisch bedingt sein. Soziale Wahrnehmung/Kennntnis beinhaltet die Fähigkeit der Wahrnehmung, Interpretation und Verarbeitung sozialer Informationen. Große Defizite in der Erkennung und Wahrnehmung von Gefühlen anderer Menschen wirken sich negativ auf die soziale Interaktion aus und stellen einen Stressor und eine Barriere zur Aufrechterhaltung sozialer Kontakte dar. Dies begünstigt das Voranschreiten der SCZ. Cannabis- und Nikotinkonsum kann die Entstehung der SCZ begünstigen. Übersetzt und modifiziert nach [9].

1.1.3 Pathomechanismen bei der SCZ

Im Rahmen von bildgebenden Studien und *post mortem* (PM) Untersuchungen wurde gezeigt, dass sowohl strukturelle als auch funktionelle Veränderungen im Gehirn bei SCZ-Patienten gegenüber gesunden Individuen vorliegen [6]. Dazu gehören aus anatomischer Sicht eine Dilatation der zerebralen Ventrikel, ein Rückgang der grauen Substanz sowie eine Abnahme der Dichte der dendritischen *spines* an exzitatorischen Neuronen. Die synaptische Funktionsweise ist verändert. Beobachtet wurden veränderte dopaminerge, glutamaterge und GABAerge Neurotransmissionen. [6,11]. Im adulten Gehirn ist der Metabolismus von Neuronen bei SCZ-Patienten ebenfalls betroffen. Es sind Veränderungen der mitochondrialen Funktion und das Auftreten von oxidativem

Stress mehrfach im Zusammenhang mit der SCZ beschrieben worden [12,13]. Der oxidative Stress führt wiederum zu einer Demyelinisierung von Axonen und einer Schädigung von Neuronen [6]. Die Veränderungen im adulten Gehirn sind unter anderem auf eine gestörte Funktion und Entwicklung von sogenannten Interneuronen (IN) zurück zu führen [14]. Es ist jedoch wenig darüber bekannt, wie die Entwicklung von IN im Gehirn betroffener Patienten verändert ist. Auf die Definition und Funktion von IN sowie auf deren Entwicklung soll zu einem späteren Zeitpunkt genauer eingegangen werden.

1.2 Induziert pluripotente Stammzellen und deren Verwendung

SCZ zählt zu den Erkrankungen der Entwicklung. Um die in den Entwicklungsstadien vorliegenden Pathomechanismen der SCZ am humanen Gewebe zu untersuchen, ist ein Modell aus induziert pluripotenten Stammzellen (iPSC) sehr gut geeignet. Die iPSC sind Zellen, die in Ihrem Expressionsprofil und Entwicklungspotential den embryonalen Stammzellen sehr ähnlich sind. Der Unterschied liegt darin, dass iPSC aus somatischen Zellen adulter Individuen hergestellt werden. Im Jahre 2006 wurde diese sogenannte Reprogrammierung muriner Fibroblasten zu iPSC erstmalig erfolgreich durchgeführt. Im darauffolgenden Jahr erfolgte die erste Reprogrammierung humaner Fibroblasten in zwei voneinander unabhängigen Arbeitsgruppen. [15]. Die Reprogrammierung erfolgt durch die Transfektion bekannter Pluripotenzgene in die somatische Zelle. Die iPSC besitzen pluripotente Eigenschaften und können in nahezu jeden somatischen Zelltyp differenziert werden, vorausgesetzt der angestrebte Zelltyp geht während der physiologischen Embryonalentwicklung aus einem der drei embryonalen Keimblätter hervor [15,16]. Seither findet weltweit intensive Forschungsarbeit mit iPSC statt. Die Schwerpunkte liegen dabei auf der Erstellung eines Krankheitsmodells, um die Pathomechanismen von zugrundeliegenden Erkrankungen zu verstehen, der Medikamentenforschung sowie in der Re-Transplantation generierter Zellen in den humanen Organismus. iPSC bieten eine vielversprechende Grundlage zum Verständnis und zur Behandlung vieler Erkrankungen und werden mithilfe weiterer Technologien in Zukunft einen enormen Fortschritt in der Therapieentwicklung vieler aktuell noch schwer behandelbarer Erkrankungen ermöglichen [15,17].

Menschliche Studien zur Entwicklung der SCZ gestalten sich sehr schwierig, denn bis zum Ausbruch der Erkrankung vergehen meist etwa 20 – 25 Jahre. Vor dem Auftreten der Erkrankung ist nicht mit Sicherheit festzustellen, ob ein Individuum eine SCZ entwickeln wird. Bricht die Erkrankung aus, ist es unmöglich rückwirkend klinische oder bildgebende Untersuchungen des Individuums vorzunehmen. Molekularbiologische

Untersuchungen, die Probenentnahmen des Gehirns erfordern, unterliegen bei lebenden Individuen strengen ethischen Grundsätzen. Außerdem sind diese Probeentnahmen ebenfalls nicht rückwirkend durchführbar. Daher bietet ein iPSC-basiertes *in vitro*-Modell, welches aus Zellen von SCZ-Patienten erstellt wurde, die einzigartige Möglichkeit, die patientenspezifisch vorliegenden Pathomechanismen der Erkrankung zu untersuchen. Dabei ist vor allem die Differenzierung der iPSC zu Neurone von besonderem Interesse. Die generierten iPSC und die daraus hergestellten Neurone tragen die genetischen Informationen des Patienten [18,19]. Das iPSC-Modell ahmt die *in vivo* existierenden entwicklungsbiologischen Schritte der Neuronenentwicklung als *in vitro*-Modell nach. Das bedeutet ebenfalls, dass auch einige Wochen bis Monate notwendig sind, um reife Neurone zu erhalten [20,21]. Das kann, abhängig von den gesetzten Zielen der Untersuchung, eine Schwäche oder eine Stärke des Modells darstellen. Zur Untersuchung der embryonalen Entwicklung von Neuronen ist das iPSC-Modell sehr gut geeignet. So ist es möglich in einem *in vitro*-Modell die Hirnentwicklung nachzustellen und genauer zu untersuchen. Ebenso bieten iPSC eine permanente Quelle an Stammzellen und damit die Möglichkeit, immer wieder Neurone in ausreichender Menge für Analysen zu generieren. Dadurch ist sichergestellt, dass genügend Material zur Verfügung steht [22].

1.3 Das zentrale Nervensystem

Das zentrale Nervensystem setzt sich aus dem Gehirn und dem Rückenmark zusammen. Im adulten menschlichen Gehirn befinden sich etwa 86,1 Billionen Neurone [23]. Das menschliche Gehirn wird ab der 5. Entwicklungswoche *post conceptionem* (pc) in die verschiedenen Bereiche Telencephalon, Diencephalon, Mesencephalon, Metencephalon und Myelencephalon eingeteilt [24]. Da die Symptomatik der SCZ einer veränderten Entwicklung von Neuronen des Telencephalons zugeschrieben wird, sind die darin liegenden Hirnregionen großer Bestandteil aktueller Forschung. Im zentralen Nervensystem der Vertebraten lässt sich die graue von der weißen Substanz unterscheiden. Die graue Substanz enthält größtenteils die Zellkörper der Neurone, während die weiße Substanz überwiegend aus deren Zellfortsätzen besteht [25]. Im menschlichen Gehirn existiert eine große Neuronenvielfalt. Im humanen Kortex konnten in einer PM-Studie 69 verschiedene Neuronentypen hinsichtlich ihrer RNA-Expression nachgewiesen werden. Dabei wurden 24 Typen den exzitatorischen Neuronen und 45 Typen den inhibierenden Neuronen zugeschrieben [26]. Die exzitatorischen Neurone benutzen Glutamat als Neurotransmitter und stellen den größten Anteil im Kortex der Vertebraten dar. Dabei liegt der Anteil dieser Neurone im murinen Kortex bei etwa 80 %. Aufgrund ihrer

spezifischen Form werden sie auch Pyramidenzellen (PZ) genannt. Die inhibierenden Neurone nutzen GABA als Neurotransmitter und haben einen Anteil von etwa 20 % im murinen Kortex [27–29]. Im menschlichen Kortex konnte ein weitaus größerer Anteil inhibitorischer Neurone von bis zu 40-45 % gezeigt werden. Da die Fortsätze der GABAergen Zellen keine große Reichweite haben und sie den exzitatorischen Zellen zwischengeschaltet sind, werden sie auch IN genannt [30].

1.4 IN im kortikalen Netzwerk

1.4.1 Hauptklassen der IN

IN steuern den Informationsfluss im Kortex und formen dynamische neuronale Netzwerke. Daher spielen die Aktivitätsmuster der IN eine wichtige Rolle für die Informationsverarbeitung im Kortex. Um eine größtmögliche Variabilität in der Verarbeitung der neuronalen Signale zu erhalten, bedient sich der Organismus einer großen Vielfalt verschiedener Subtypen [31]. Die Unterscheidung der kortikalen IN in verschiedene Subtypen erfolgt auf Grundlage ihrer anatomischen Eigenschaften wie ihres Erscheinungsbildes, ihrer Verbindungen zu anderen Neuronen sowie ihrer laminaren Position im Kortex (Abbildung 2). Zur Unterscheidung werden zusätzlich ihre elektrophysiologischen Eigenschaften sowie ihre Expressionsmuster herangezogen. Kortikale IN exprimieren spezifische Gene, die als molekulare Marker zur Untersuchung der IN Subtypen herangezogen werden können. Die Unterscheidung der IN Subtypen ist möglich, weil die Variabilität der IN maßgeblich durch die unterschiedliche Kombination verschiedener Transkriptionsfaktoren (TF) ermöglicht wird [31,28,30,32,33]. Es wird davon ausgegangen, dass die hohen kognitiven Fähigkeiten der humanen und nicht-humanen Primaten auf die erhöhte Vielfalt der kortikalen IN zurückzuführen ist [34].

Die Expression bestimmter molekularer Marker definiert drei verschiedene Hauptklassen der reifen kortikalen IN. Die kortikalen IN einer Hauptklasse zeigen spezifische funktionelle Eigenschaften, die sich auf diese jeweilige Hauptklasse beschränken oder nur sehr schwach in den kortikalen IN anderer Hauptklassen ausgeprägt sind. Folgende drei Hauptklassen werden bei humanen kortikalen IN unterschieden [30]:

- (1) IN positiv für Parvalbumin (PVALB)
- (2) IN positiv für Somatostatin (SST)
- (3) IN weder positiv für PVALB oder SST

Ebenfalls relevante Marker für die weitere Charakterisierung von kortikalen IN sind Reelin (RELN), vasointestinales Peptid (VIP), die calciumbindenden Proteine

Calbindin 1 (CALB1) und Calbindin 2 (CALB2), die Neuropeptide Cholecystokin und Neuropeptid Y (NPY), sowie die Stickstoffmonoxidsynthase. Dabei sind die Expressionsmarker im humanen Kortex jeweils einer IN Hauptklasse zugeteilt (Abbildung 4A).

1.4.2 Funktion der IN

Eine der Schlüsselfunktionen der kortikalen IN ist die Synchronisierung der Hirnaktivität. Bei diesen sogenannten Oszillationen finden großflächige und synchrone Inhibitionen der PZ in verschiedenen Bereichen des Kortex bei einer bestimmten Frequenz statt. Entscheidend für die Ausübung kognitiver Fähigkeiten ist dabei die Erzeugung hochfrequenter Gamma-Oszillationen von 30 – 80 Hz im präfrontalen Kortex [35]. Dabei nehmen die PVALB-positiven kortikalen IN den größten Stellenwert ein. Besondere Fähigkeiten der PVALB-positiven Basket Zellen ist die schnelle, zuverlässige, starke und zeitlich präzise Inhibierung ihrer Zielzellen [36,31].

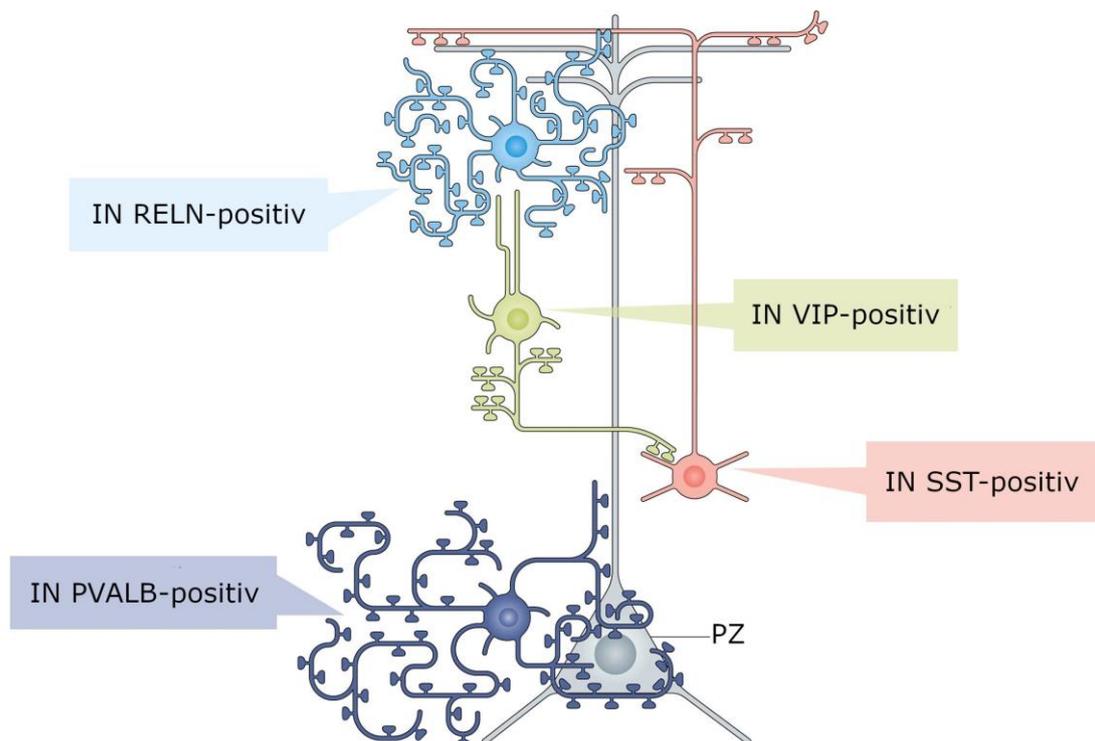


Abbildung 2: Die IN und ihre spezifischen synaptischen Verbindungen zu PZ. Die Abbildung zeigt schematisch anhand ausgewählter Beispiele die Vielfältigkeit der IN in ihrer Morphologie und vor allem in ihren synaptischen Verbindungen zu PZ. Beispielsweise bilden die PVALB-positiven Basket-IN direkt an den Somata der PZ ihre inhibitorischen Synapsen aus. Die SST-positiven Martinotti-IN und RELN-positiven IN bilden ihre Synapsen an den distalen Dendriten der PZ aus. VIP-positiven IN interagieren indirekt mit PZ indem sie Ihre Synapsen an den Dendriten der SST-positiven IN ausbilden. Modifiziert nach [33].

1.5 Entwicklung kortikaler IN

1.5.1 Allgemeine Entwicklung von Neuronen des Telencephalons

Die embryonale Entwicklung des menschlichen Nervensystems ist ein sehr komplexer Vorgang und noch nicht in allen Einzelheiten geklärt. Die Entwicklung neuronaler Gewebe geht aus Zellen des Ektoderms hervor. Dabei gehen aus dem Ektoderm multipotente neurale Stammzellen (NSC) hervor. Aus diesen NSC entwickeln sich im Verlauf Neurone und Gliazellen. Das weitere Differenzierungspotential der NSC ist abhängig von dessen Lage auf der sogenannten anterioren-posterioren-Achse. Die am weitesten anterior liegenden NSC bilden das Telencephalon aus, die am weitesten posterior liegenden NSC bilden das Rückenmark. Dazwischen befinden sich die Anlagen für die weiteren Hirnabschnitte. Neben der anterioren-posterioren-Achse existiert die dorsale-ventrale-Achse, die ebenfalls das Differenzierungspotential der NSC determiniert.

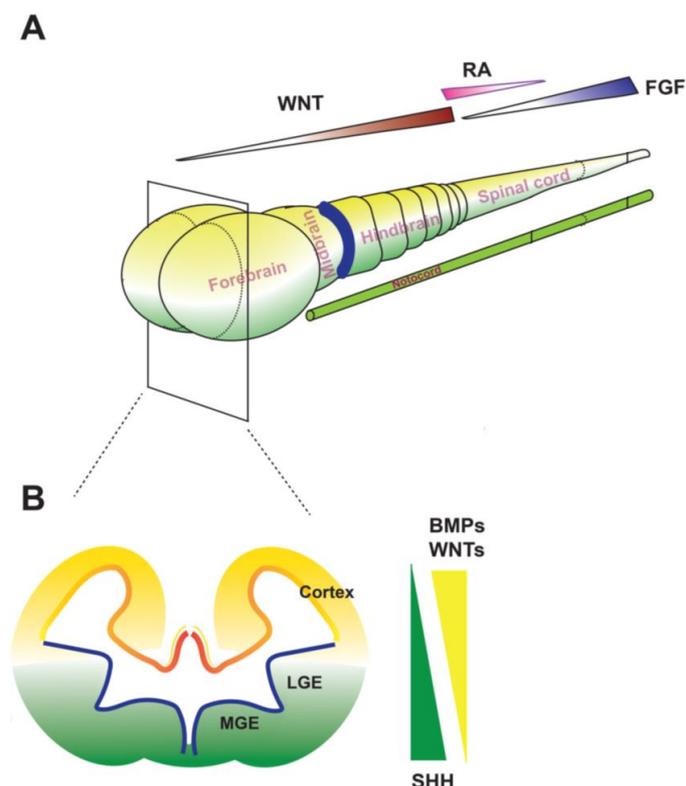


Abbildung 3: Einfluss bestimmter Morphogene auf die Entwicklung des ZNS. (A) Die schematische Darstellung zeigt die Abhängigkeit von Morphogenen zur Ausbildung der anterior-posterior-Achse. Zur Ausbildung des *Forebrains*, dem Telencephalon, ist lediglich eine geringe Konzentration der Morphogene notwendig. RA: *retinoic acids*, FGF: *fibroblast growth factors* **(B)** Die schematische Darstellung zeigt die Abhängigkeit von Morphogenen zur Ausbildung der dorsalen-ventralen-Achse. Dorsal im Kortex entstehen aus den NSC die Progenitoren der PZ. Dafür ist eine geringere Konzentration an SHH und eine höhere Konzentration an WNT als im ventralen Bereich notwendig. Ventral entstehen im Subpallium, den *ganglionic eminences* (GE), die IN. Dafür ist eine höhere Konzentration von SHH essentiell. Modifiziert nach [37].

Die Festlegung des Differenzierungsschicksals entlang der jeweiligen Achsen hängt von der Konzentration bestimmter Morphogene ab. Die Morphogene *bone morphogenic proteins* (BMP), *wingless integrated proteins* (WNT), *retinoic acids*, *fibroblast growth factors* und *sonic hedgehog signaling molecule* (SHH) bilden Konzentrationsgradienten entlang der jeweiligen Achsen und bestimmen so das Differenzierungspotential der NSC [37] (Abbildung 3).

Bereits ab der 6. Entwicklungswoche pc lässt sich im zentralen Nervensystem die graue von der weißen Substanz unterscheiden. Die graue Substanz des embryonalen humanen Telencephalons lässt sich zu diesem Zeitpunkt in das dorsal gelegene Pallium und das ventral gelegene Subpallium einteilen. Aus dem dorsalen Pallium geht im Verlauf der Neokortex, der Paleokortex und der Hippocampus hervor. Im ventralen Subpallium lassen sich bereits in der 6. Entwicklungswoche pc verschiedene Bereiche unterscheiden. Diese Bereiche werden die ganglionischen Hügel genannt [38,25]. Diese beinhalten die Bereiche *medial ganglionic eminence* (MGE), *caudal ganglionic eminence* (CGE) und *lateral ganglionic eminence* (LGE) [29,27] (Abbildung 4C). Aus diesen gehen im Verlauf Anteile der Basalganglien und der Amygdala hervor. Obwohl die exzitatorischen PZ und die inhibitorischen IN zusammen im adulten humanen Kortex vorliegen, sind diese unterschiedlichen Ursprungs. Im embryonalen Telencephalon werden die glutamatergen PZ des Kortex ab der 7. Entwicklungswoche pc im Pallium gebildet [23], die GABAergen IN werden im Subpallium gebildet. Die kortikalen IN wandern im Laufe der Entwicklung während der sogenannten Migration in das Pallium, den sich entwickelnden Kortex, ein. Die ersten GABAergen IN erreichen den Kortex bereits in der 9. Entwicklungswoche pc. Die Migration der kortikalen IN des Frontallappens ist erst wenige Monate postnatal abgeschlossen. [30,27]. Die Reifung des zentralen Nervensystems hält postnatal bis in das Alter von 25 – 30 Jahren an [23].

1.5.2 Neurogenese und Migration kortikaler IN

Die Neurogenese kortikaler IN kann durch Untersuchungen am Mausmodell auf zellulärer Ebene in Teilen nachvollzogen werden. Studien zur Erforschung der humanen IN-Entwicklung stellen vor allem bildgebende Untersuchungen *in vivo*, sowie PM-Analysen humaner Feten und das Generieren von iPSC-Modellen dar. Im Folgenden wird der Begriff Progenitoren für Vorläuferzellen verwendet, die noch aktiv Zellteilung betreiben. Der Begriff Neuroblast wird für Vorläuferzellen verwendet, die bereits den Zellzyklus verlassen haben.

Aus den NSC des Ektoderms gehen die Progenitoren hervor. Die Lage der Progenitoren im Subpallium während der Neurogenese bestimmt, welcher Hauptklasse die IN im reifen menschlichen Gehirn zuzuordnen sind. Neben der Lage hat der Zeitpunkt der beginnenden Differenzierung der Progenitoren einen Einfluss auf die Zuordnung zu einer der IN Hauptklassen. Im Subpallium lassen sich die Bereiche MGE, CGE und LGE einteilen [28,32] (Abbildung 4C). Jedes dieser Bereiche ist charakterisiert durch die Ansammlung von Progenitoren, welche eine bestimmte Hauptklasse von kortikalen IN hervorbringen. Bestimmt wird dieses Differenzierungsschicksal durch die spezifische Kombination von TF, die die Progenitoren ortsabhängig in sich tragen [27,32,29] (Abbildung 4B).

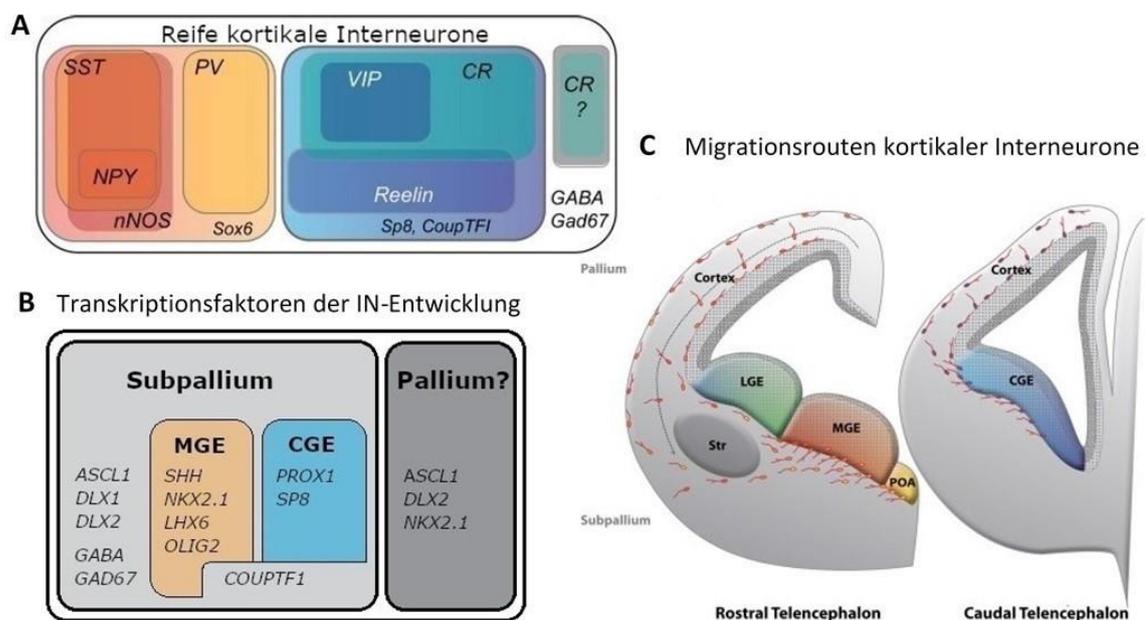


Abbildung 4: Charakterisierung kortikaler IN. (A) Einteilung reifer humaner kortikaler IN in drei Hauptklassen. SST-positive IN bilden eine Hauptklasse. NPY-positive IN und Stickstoffmonoxidsynthase (hier: nNOS) exprimierende IN gehören der Hauptklasse der SST-positiven IN an. PVALB-positive IN bilden eine weitere Hauptklasse. Die dritte Hauptklasse setzt sich aus den IN positiv für VIP, CALB2 (hier: CR) oder RELN zusammen. Als vierte Gruppe wurde in diesem Schema die Gruppe der CALB2-positiven IN (hier: CR) mit Ursprung im Pallium genannt. Dessen Existenz unterliegt aktueller Diskussion. **(B) Transkriptionsfaktoren der IN-Entwicklung.** Das Schema zeigt eine Auswahl von TF der IN-Entwicklung und dessen Vorkommen. Die Transkriptionsfaktoren ASCL1, DLX1/2, GABA und *glutamate decarboxylase 67* (GAD67) kommen im gesamten Subpallium vor. COUPTF1 wird nur im dorsalen MGE und CGE exprimiert. SHH, NKX2.1, LHX6, OLIG2 kommen im MGE vor. PROX1 und SP8 kommen im CGE vor. Das Schema zeigt die Untergruppe der IN mit fraglicher Herkunft aus dem humanen Kortex. **(C) Migrationsrouten kortikaler IN am Beispiel des murinen Kortex.** Die Abbildung zeigt zwei schematische Querschnitte durch das murine Telencephalon. Im rostralen Querschnitt ist die Lage des MGE und LGE zu erkennen. Im caudalen Querschnitt die Lage des CGE. Die Querschnitte zeigen, wie die in den GE gebildeten IN in den Kortex migrieren. Modifiziert nach [30].

Im MGE werden SST- und PVALB-positive IN gebildet. Diese machen 50 - 70 % der IN im murinen Kortex aus. Im CGE werden die IN weder positiv für PVALB und SST gebildet. Diese bilden einen Anteil 30 - 40 % im murinen Kortex aus [27,30,32,28]. Bei Primaten ist der Anteil der MGE-stämmigen kortikalen IN mit etwa 60 % geringer und variiert in Abhängigkeit von der jeweiligen Kortexregion. Diese relative Reduktion der MGE-stämmigen IN geht mit einem vermehrten Anteil an CGE-stämmigen IN bei Primaten einher [39].

Die aus den GE hervorgegangenen Progenitoren stellen im Zuge der weiteren Reifung ihre Zellteilung ein und verlassen die ganglionischen Hügel. Diese postmitotischen Neuroblasten gelangen durch Migration in den Kortex [29,27] (Abbildung 4C). Die weitere Reifung der in Hauptklassen eingeordneten kortikalen IN zu spezialisierten Typen von IN findet während des Migrationsprozesses statt. Dabei findet auch die Ausprägung weiterer biochemischer Marker statt [32]. Die Identität kortikaler IN prägt sich während der Migration aus und festigt sich, wenn die IN den sich entwickelnden Kortex erreichen und synaptische Verbindungen zu anderen Neuronen des kortikalen Netzwerkes eingehen. Der beschriebene Entwicklungsprozess bestimmt die späteren anatomischen, molekularen und elektrophysiologischen Eigenschaften der kortikalen IN [32,27].

Es gibt Anhaltspunkte, die zeigen, dass bei Primaten einschließlich des Menschen einige IN direkt im Kortex entstehen und nicht aus den GE immigrieren. Diese seien vor allem CALB2-positiv (Abbildung 4A, B). Derzeit fehlt jedoch noch der konkrete Beweis, dass diese IN tatsächlich im humanen Pallium entstehen. Es wäre ebenso denkbar, dass sehr früh in der Entwicklungsphase noch mitotisch aktive IN-Progenitoren aus den GE in das Pallium einwandern [40,34,41]. Das ist ein weiterer möglicher Erklärungsansatz für die besonders große Vielfalt der IN im menschlichen Kortex. Die Neurogenese von IN im humanen Kortex ist Gegenstand aktueller Untersuchungen.

Für die Entwicklung eines reifen und funktionalen Gehirns, ist ein ausgewogenes und koordiniertes Zusammenspiel der Aktivitäten exzitatorischer und inhibitorischer Neurone während der Entwicklung notwendig [30]. Nach der Migration in den Kortex bilden IN Verschaltungen mit den dort vorliegenden PZ aus. Von diesen PZ erhalten die kortikalen IN ihre exzitatorischen Signale. Die kortikalen IN, die zu wenig exzitatorische Signale erhalten, leiten den programmierten Zelltod ein. Dieser wird Apoptose genannt [32]. Die Interaktion mit exzitatorischen PZ ist daher für die endgültige postmitotische Ausdifferenzierung der kortikalen IN notwendig [42]. Die kortikalen IN

tragen wiederum ihrerseits zur Entwicklung der exzitatorischen PZ bei [32]. Postnatal reifen die IN im sich entwickelnden Kortex weiter und bilden die für den jeweiligen Subtyp spezifischen morphologischen und funktionellen Eigenschaften aus. Dabei werden auch weitere Verbindungen zu anderen Neuronen geknüpft. Dieser Prozess wird durch die Aktivitäten im kortikalen Netzwerk induziert [33].

1.5.3 Relevante TF für die Entwicklung aller Hauptklassen von IN

Die TF *achaete-scute family bHLH transcription factor 1* (ASCL1), *distal-less homeobox 1* (DLX1) und *distal-less homeobox 2* (DLX2) werden in allen GE exprimiert und sind für die Ausbildung des GABAergen Zellschicksals sehr wichtig. Mausmodelle zeigen, ein Funktionsverlust dieser TF führt zu einer Reduzierung der kortikalen IN um 50 - 80 % [30]. Während der embryonalen Hirnentwicklung ist ASCL1 der früheste bekannte Marker für die Spezifizierung von IN. ASCL1 wird bereits während der Vermehrung der Progenitoren in den GE während der frühen Entwicklung des Subpallium exprimiert [30,43]. Durch ASCL1 wird die Expression weiterer TF wie DLX1 und DLX2 in den frühen Progenitoren aktiviert. ASCL1 ist ebenso an der Entwicklung von Oligodendrozyten beteiligt (OL). Jedoch entwickeln sich die OL nur, wenn in den Progenitoren die Expression von DLX1 und DLX2 unterdrückt wird. Die Expression von ASCL1 wird in den IN-Neuroblasten herunterreguliert sobald diese den Kortex erreichen [30]. Die Expression von DLX1 und DLX2 findet während der frühen Entwicklung im gesamten Subpallium statt [30]. DLX1 und DLX2 sind für die Entstehung, Migration und Differenzierung der meisten IN des Kortex, des Hippocampus und des olfaktorischen Systems notwendig [44,45]. DLX1 und DLX2 werden durch neuronale Aktivität reguliert [32]. Die Expression von DLX1 und DLX2 unterdrückt die Expression von dem TF *oligodendrocyte transcription factor 2* (OLIG2) und wirkt einer Differenzierung der Progenitoren in OL entgegen [29].

Die Expression des TF *nuclear receptor subfamily 2 group F member 1* (COUPTF1) ist auf das dorsale MGE und das CGE beschränkt [28,46]. Ein Mausmodell zeigt, der Funktionsverlust von COUPTF1 führt zu einer verminderten Anzahl der VIP- und CALB2-positiven kortikalen IN des CGE und einer erhöhten Anzahl SST- und PVALB-positiven kortikalen IN des MGE. COUPTF1 reguliert die Progenitoren und erhält somit ein Gleichgewicht an kortikalen IN, die aus den CGE und MGE gebildet werden [46]. Mausmodelle zeigen, ein Funktionsverlust von COUPTF1 hat zur Folge, dass weniger SST-positive und mehr PVALB-positive kortikale IN gebildet werden. Es ist der erste bekannte TF, der einen regulatorischen Einfluss darauf hat, ob SST-positive oder PVALB-positive kortikale IN im MGE gebildet werden [47].

1.5.4 Relevante TF für die Entwicklung der IN des MGE

Für die Entwicklung kortikaler IN aus dem MGE sind bestimmte TF von besonderer Bedeutung. OLIG2 ist ein TF von Progenitoren im ventralen Subpallium. Progenitoren, welche OLIG2 exprimieren, differenzieren sich in einem frühen Stadium der Hirnentwicklung zu GABAerge Neurone oder in einem späterem Stadium zu OL [40]. In sich entwickelnden und ausgereiften OL ist OLIG2 stets exprimiert [48].

SHH wird im gesamten embryonalen Telencephalon exprimiert und erfüllt dort verschiedene Aufgaben. Die Konzentration von SHH nimmt von dorsal nach ventral stark zu. Dieser Gradient ermöglicht die Beeinflussung der regionalen Organisation des Gehirns, das auch als *dorsoventrales patterning* bezeichnet wird. SHH ist für die Ausbildung des ventralen Telencephalons unabdingbar [49,37,50]. Der SHH-Signalweg unterstützt die Vermehrung der Progenitoren in allen Bereichen des Gehirns während der Neurogenese, sowohl im Subpallium als auch im Pallium. Eine weitere Aufgabe ist die Induktion und Aufrechterhaltung der Expression des TF *NK2 homeobox 1* (NKX2.1) in den proliferierenden Progenitoren des MGE [50]. Dadurch wird die Etablierung bestimmter kortikaler IN-Subtypen gesichert.

Zusätzlich hemmt SHH die Expression des TF *GS homeobox 2*, einen TF der die Differenzierung der CALB2-positiven kortikalen IN aus dem CGE fördert [51]. Eine Unterbrechung des SHH-Signalweges führt zu einer Holoprosencephalie [50]. Die Holoprosencephalie fasst Fehlbildungen des Gehirns und der Gesichtsregion zusammen, welche aufgrund fehlender Mittellinienstrukturen entstehen. Dabei ist die Ausprägung sehr variabel. Bei stark ausgeprägten Fällen kann statt zwei Seitenventrikel ein unpaares Telencephalonbläschen vorliegen, sowie fusionierte Augenanlagen neben weiteren Gesichtsfehlbildungen [25]. Außerdem führt eine Unterbrechung des SHH-Signalweges zu einem selektiven Verlust der PVALB- und SST-positiven kortikalen IN [50]. Mausmodelle zeigen, die Progenitoren des MGE nehmen bei Verlust von SHH Eigenschaften des CGE an [51]. Auch innerhalb des MGE liegen Konzentrationsunterschiede von SHH vor. Liegt eine höhere SHH-Konzentration vor, bilden sich hauptsächlich SST-positiv IN im dorsalen MGE. Eine geringe Konzentration von SHH führt zu einer Ausbildung von hauptsächlich PVALB-positiven kortikalen IN im ventralen MGE [52].

NKX2.1 ist ein TF der frühembryonalen Entwicklung und wird von Progenitoren in der Hirnregionen MGE exprimiert [53,54]. Ein Mausmodell zeigt, bei Funktionsverlust weisen die Progenitoren im MGE dieselben Eigenschaften wie die Progenitoren im CGE

auf [54]. NKX2.1 reguliert die Entstehung, Migration und Differenzierung der PVALB- und SST-positiven kortikalen IN [55]. Hauptfunktion von NKX2.1 ist die Induktion der Expression von *LIM homeobox 6* (LHX6) in den Progenitoren [56]. Für die Entwicklung PVALB- und SST-positiver kortikaler IN ist die Expression von NKX2.1 und LHX6 essenziell [55,57]. Jedoch ist für eine normale Reifung und Funktionalität der postmitotischen PVALB-positiven kortikalen IN eine herunterregulierte Expression von NKX2.1 erforderlich. Dies gilt nicht für PVALB-positive IN des Striatum und Pallidum, da diese einem anderen Migrationsverhalten unterliegen [58,53].

LHX6 ist ein direktes Ziel von NKX2.1. Die Expression von LHX6 ist auf das MGE begrenzt. Die Expression von LHX6 beginnt ab dem postmitotischen Zeitpunkt in den Neuroblasten der PVALB- und SST-positiven kortikalen IN und bleibt bis in das Erwachsenenalter erhalten. Zu den Funktionen von LHX6 zählt die tangentielle und radiale Migration. LHX6 ist notwendig für die korrekte Positionierung der PVALB- und SST-positiven IN im Kortex sowie für die Ausdifferenzierung zu reifen Zellen [59,60,56,61,57,58]. Ein Mausmodell zeigt, ein vollständiger Funktionsverlust von LHX6 hat erhebliche Auswirkungen auf die Entwicklung, Migration und Differenzierung der PVALB- und SST-positiven kortikalen IN, und ist mit dem Leben nicht vereinbar [57,62]. LHX6 ist notwendig für die Expression weiterer TF, die in der Hirnregion des MGE exprimiert werden [60].

Neben den genannten TF spielt auch ein Rezeptor eine entscheidende Rolle bei der Entwicklung von IN der Hirnregion MGE. *C-X-C motif chemokine receptor 4* (CXCR4) ist ein Rezeptor für das Chemokin *C-X-C motif chemokine ligand 12* (CXCL12). CXCR4 ist unerlässlich für die tangentielle kortikale Migration der Neuroblasten und der richtigen Positionierung in der entsprechenden Lamina. GABAerge kortikale IN aus dem MGE tragen diesen Rezeptor. Der Ligand CXCL12 wird im Kortex von PZ exprimiert. Migrierende Neuroblasten, welche CXCR4 exprimieren, bilden Synapsen mit diesen PZ im Kortex aus [63].

1.5.5 Relevante TF für die Entwicklung der IN des CGE

Während der Embryonalphase sowie postnatal wird der TF *prospero homeobox 1* (PROX1) von Progenitoren, Neuroblasten und kortikalen IN der Region CGE exprimiert. PROX1 ist verantwortlich für die Migration und Reifung der CGE-stämmigen kortikalen IN [28]. Ein Mausmodell zeigt, dass PROX1 durch ASCL1 induziert wird. Zunächst ist PROX1 im MGE und CGE exprimiert. Zu einem späteren Zeitpunkt ist die Expression dann nur auf das CGE beschränkt. Kurz darauf co-exprimieren

PROX1-positive Zellen den TF *Specificity protein 8* (SP8). Bei einem Funktionsverlust liegt eine Reduktion der RELN-positiven kortikalen IN um etwa 40 % vor, die CALB2-/VIP-doppelt-positiven IN sind nicht mehr nachweisbar [28].

SP8 ist ein TF, der bei etwa 20 % der kortikalen IN aus dem CGE exprimiert ist. SP8-positive IN entstammen dem CGE und dem dorsalen LGE. Das dorsale LGE ist vor allem an der Bildung von IN des olfaktorischen Systems beteiligt. Es wird angenommen, dass 50 % der SP8-positiven kortikalen IN aus dem dorsalen LGE entstammen. Die Expression von SP8 findet sowohl in Progenitoren als auch in reifen kortikalen IN statt [64]. Jedoch markiert SP8 nicht alle kortikale IN, die außerhalb des MGE entstehen. Besonders im ventralen CGE gibt es kaum SP8-positive Zellen [64].

1.6 Stoffwechsel kortikaler Neurone

Das menschliche Gehirn verbraucht etwa 20 % des Sauerstoff- und 25 % des Glucose-Gesamtbedarfs und hat dabei lediglich einen Anteil von 2,0 % am Gesamtkörpergewicht [65]. Neurone, einschließlich der kortikalen IN, decken ihren Energiebedarf hauptsächlich über die oxidative Phosphorylierung (OXPHOS), bei der durch mitochondriale Aktivität Energie in Form von Adenosintriphosphat (ATP) generiert wird. Die OXPHOS setzt sich aus der Elektronentransportkette und der ATP-Synthase in der inneren Mitochondrienmembran zusammen. Eine weitere Form der Energiegewinnung stellt die Glykolyse dar. Diese wird bei postmitotischen Neuroblasten und Neuronen nur im geringen Umfang betrieben [66].

1.7 Neurexine

1.7.1 Aufbau und Funktion der Neurexine

Im Hinblick auf die synaptischen Veränderungen in adulten Neuronen spielen synaptische Proteine bei der SCZ eine wichtige Rolle. Neurexine sind präsynaptische Transmembranproteine, die für die Funktionalität der Synapsen sowohl im zentralen als auch peripheren Nervensystem unentbehrlich sind [67]. Neurexine interagieren sowohl mit postsynaptischen membranständigen Proteinen als auch mit frei sezernierten Proteinen [68]. Dabei sind die postsynaptischen Transmembranproteine Neuroligin 1 – 4 die bekanntesten Liganden. Neurexine bilden mit Neuroliginen transsynaptische Komplexe. Diese Interaktion ist nicht nur essenziell für die Funktionalität, sondern auch für Ausbildung und Reifung der Synapsen. Neurexine sind ebenso für die calciumabhängige Freisetzung der Neurotransmitter notwendig [69].

Im humanen Genom werden Neurexine durch drei verschiedene Gene kodiert, die als NRXN1, NRXN2 und NRXN3 bezeichnet werden. Es sind bisher drei Gruppen bekannt, denen Protein-Isoformen zugeordnet werden können. Diese sind α -Neurexine, β -Neurexine und γ -Neurexine. Die α -Neurexine besitzen eine sehr lange extrazelluläre Proteindomäne. Diese setzt sich aus verschiedenen Domänen zusammen. Dazu gehören die LNS-Domänen und die EGF-Domänen. Dabei steht LNS für die englische Bezeichnung *laminin-neurexin-sex hormone-binding globulin* (LNS). Die Abkürzung EGF steht im Zusammenhang für die Beschreibung der Neurexin-Protein-Struktur für *epidermal growth factor like* (EGF).

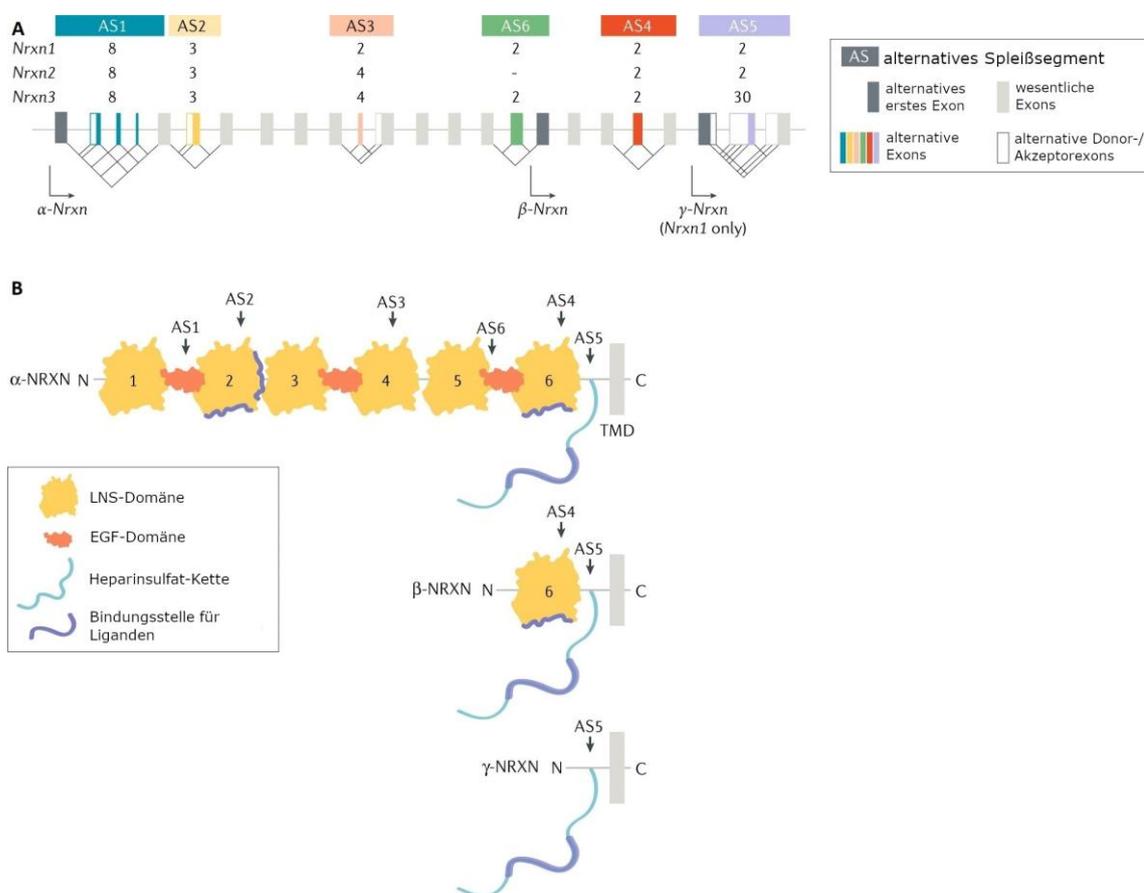


Abbildung 5: Darstellung der molekularen und strukturellen Vielfalt der Neurexine. (A) Die Abbildung zeigt vereinfacht den Aufbau der *Nrxn*-Gene am Mausmodell. In der Darstellung ist zu erkennen, dass die Gene für *Nrxn1*, *Nrxn2* und *Nrxn3* strukturell ähnlich aufgebaut sind. Die Gene beinhalten drei Promotoren und unterliegen exzessiven alternativen Spleißfen an den sechs alternativen Spleißsegmenten (AS1 – 6). Die Zahlen unterhalb der AS-Nummerierungen geben an, wie viele alternative Spleißvarianten für das jeweilig AS und das jeweilige Gen bekannt sind. **(B)** Die Abbildung zeigt den schematischen Aufbau der α -, β - und γ -Protein-Isoformen. Die drei Isoformen teilen sich die Transmembran (TMD) –Domäne und die zytoplasmatische Domäne. Die extrazelluläre Domäne des α -Neurexin zeigt sechs LNS-Domänen, drei EGF-Domänen und eine Heparinsulfat-Kette. Die Bindungsstellen für Liganden befinden sich an LNS2 und LNS6. Die Heparinsulfat-Kette bietet eine zusätzliche Bindungsstelle für Liganden. Die AS2 und AS4 kodieren für die Ligandenbindungsstellen. Die AS1, AS5 und AS6 kodieren für Regionen, die die Konfiguration bestimmen. Die extrazelluläre Domäne des β -Neurexin beinhaltet eine LNS-Domäne und eine Heparinsulfat-Kette, die extrazelluläre Domäne des γ -Neurexin lediglich die Heparinsulfatkette. Modifiziert nach [68].

Das α -Neurexin besitzt sechs LNS-Domänen. Zwischen den LNS-Domänen liegen einzeln eingeschoben drei EGF-Domänen. Die Extrazellulardomäne ist über eine Transmembrandomäne mit dem intrazellulären C-Terminus verbunden. Der intrazelluläre C-Terminus verfügt über Bindungsstellen für Adapterproteine des Zytoskeletts (Abbildung 5B). Das β -Neurexin besitzt extrazellulär nur eine LNS-Domäne. Diese ähnelt der sechsten LNS-Domäne des α -Neurexin. Weiterhin trägt das β -Neurexin keine EGF-Domäne. Daher fällt hier die extrazelluläre Proteindomäne im Vergleich zum α -Neurexin kürzer aus. Das γ -Neurexin besitzt extrazellulär weder eine LNS- noch eine EGF-Domäne (Abbildung 5B). Die extrazelluläre Proteindomäne aller drei Formen ist zuständig für die Bindung an Liganden. Die Transmembranregion und der intrazelluläre C-Terminus ist für α -, β - und γ -Neurexin gleich. [68,69,67].

Welcher Gruppe das Neurexin angehört, entscheidet sich durch den Promotor, durch den das ursprüngliche Transkript generiert wurde. Es sind bisher drei Promotoren beschrieben worden. Jedes NRXN-Gen enthält die α - und β -Promotoren (Abbildung 5A). Aufgrund mehrerer Promotoren liegt eine hohe Vielfältigkeit der NRXN-Transkripte vor. Durch den α -Promotor werden lange α -NRXN-Transkripte generiert, durch den β -Promotor kürzere β -NRXN-Transkripte. Diese α - und β -Transkripte codieren für die α - und β -Protein-Isoformen mit einer Länge von 1500 – 450 Aminosäuren. Der dritte sogenannte γ -Promotor wurde bisher nur in Nrnx1 im Mausmodell beschrieben (Abbildung 5A). Dieser generiert die besonders kurze γ -Protein-Isoform. Durch das Vorliegen der drei Promotoren ist es den Zellen möglich, eine große Vielfalt an Transkripten zu generieren [68,69,67]

Die Gene für NRXN1 und NRXN3 gehören zu den größten Genen der Vertebraten und umfassen knapp 0,1 % des gesamten humanen Genoms [69]. Das NRXN1-Gen liegt auf Chromosom 2 im Bereich 2p16.3, hat eine Länge von 1,1 Mb, besitzt 25 Exons und dazwischen viele große Introns [70,71]. Die Gene NRXN1, NRXN2 und NRXN3 werden nur in postmitotischen Zellen oder in sich sehr langsam teilenden Zellen transkribiert. Die Transkription solch großer Gene benötigt sehr viel Zeit, die während eines zügigen Zellzyklus nicht aufgebracht wird [69].

Die mRNA-Transkripte der Neurexine unterliegen einem exzessiven alternativen Spleißen. So ist es dem Organismus möglich mehrere tausend verschiedene Isoformen zu generieren. Die mRNA der α -Neurexine trägt 25 Exons und sechs alternative Spleißsegmente (AS) (Abbildung 5A). Die AS sind Stellen im Transkript, an denen das alternative Spleißen stattfindet und somit die Generierung unzähliger

Transkriptvarianten ermöglicht. Das Transkript der β -Neurexine entspricht dem Transkript der α -Neurexine abwärts von Exon 17 und beinhaltet daher sieben Exons und zwei verschiedene AS [71,69] (Abbildung 5A).

1.7.2 Neurexin 1 und SCZ

Eine Dysfunktion von Neurexin beeinträchtigt die Funktionalität der Synapsen und die Signalübertragung ohne jedoch die synaptische Weiterleitung von Reizen gänzlich zu unterbrechen [72]. Heterozygote Deletionen und Duplikationen auf dem Chromosom 2 im Bereich 2p16.3, welcher für das NRXN1 kodiert, sind mit der Erkrankung an SCZ assoziiert [72,8]. Heterozygote Deletionen und Duplikationen werden als *copy number variations* (CNV) bezeichnet. Sie kommen im gesamten Genom auch ohne Assoziation mit einer Erkrankung vor. Für das NRXN1 wurde aber gezeigt, dass SCZ-Patienten im Vergleich zur Kontrollgruppe häufiger eine heterozygote Deletion in NRXN1 tragen. Ebenso konnte gezeigt werden, dass SCZ-assoziierte CNV in NRXN1 häufiger Exons betreffen. Bisher wurden in der Literatur 101 Fälle beschrieben, bei denen eine SCZ mit einem CNV in NRXN1 einhergeht, wobei nur 21 Fälle β -Neurexine betreffen [73]. Neben den DNA-Variationen in NRXN1 sind auch DNA-Variationen in Neuroligin 2 im Zusammenhang mit SCZ beschrieben worden [74]. Mutationen im Neurexin-Neuroligin-Komplex führen zu einem Ungleichgewicht zwischen exzitatorischen und inhibitorischen Signalen in neuronalen Schaltkreisen und stellen einen Pathomechanismus der SCZ dar [69].

2 Zielstellung

Ziel dieser Arbeit ist es mithilfe von patientenspezifischen iPSC-Linien ein Krankheitsmodell für die SCZ *in vitro* zu generieren und zu analysieren. Zu diesem Zweck sollen die patientenspezifischen iPSC sowie iPSC einer Kontrollzelllinie zu kortikalen Neuronen differenziert, als kortikale Neurone charakterisiert und hinsichtlich der Entwicklung von IN analysiert werden. Für die Analyse sich entwickelnder IN soll die Transkription von molekularen Entwicklungsmarkern verschiedener Hauptklassen und Subtypen von IN quantifiziert werden. Zusätzlich sollen die generierten patientenspezifischen Neurone metabolischen Analysen unterzogen werden. Diese Analysen zielen darauf ab, Veränderungen in der mitochondrialen Respiration und der Glykolyse kortikaler Neurone im Zusammenhang mit SCZ genauer zu untersuchen.

Die iPSC wurden aus zwei verschiedenen Patienten, die an SCZ leiden, gewonnen. Beide Patienten tragen eine heterozygote Deletion in NRXN1. Patient 1 trägt ein CNV im Bereich 2p16.3. Bei Patient 1 liegt eine heterozygote Deletion in α -NRXN1 von Exon 1 - 6 und des α -NRXN1-Promoters vor. Patient 2 trägt ein CNV im Bereich 2p.16.3. Bei Patient 2 liegt eine heterozygote Deletion in α -NRXN1 von Exon 4 – 6 vor.

Der Zusammenhang zwischen den vorliegenden Deletionen in NRXN1 und Veränderungen in der Entwicklung von IN soll analysiert werden. Ebenso soll der Zusammenhang zwischen den vorliegenden Deletionen in NRXN1 und Veränderungen der mitochondrialen Respiration und dem Glykolyse-Stoffwechsel der generierten Neurone analysiert werden. Dazu wird zum einen der Vergleich zwischen den Patienten mit Deletion in NRXN1 und der Kontrollzelllinie herangezogen, zum anderen werden die Ergebnisse der Patienten miteinander verglichen. Es soll untersucht werden, ob auch zwischen den Patienten Unterschiede in der IN-Entwicklung vorliegen und ob der Umfang der Deletionen in NRXN1 einen Einfluss auf die Ergebnisse ausübt.

3 Material und Methodik

3.1 Zellkultur

3.1.1 Erworbene iPSC Kontrollen

Die iPSC WISCi004-B wurde durch lentivirale Reprogrammierung aus humanen fetalen Lungenfibroblasten gewonnen [75]. Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Klon 4 verwendet. Die iPSC WAI001-B wurde aus Vorhautfibroblasten eines Neugeborenen durch Reprogrammierung mithilfe episomaler Vektoren gewonnen [76]. Beide Linien wurden bei Wicell (*Wicell Research Institute*, Wisconsin, USA) erworben.

Tabelle 1: verwendete humane iPSC-Kontrolllinien

| Kontrolle | Alter / Geschlecht | hPSCreg | in Literatur auch bekannt | Kurzform in dieser Arbeit |
|-----------|-----------------------|------------|---------------------------|---------------------------|
| 1 | fetal / weiblich | WISCi004-B | iPS(IMR-90)-4 | KON4-B |
| 2 | neugeboren / männlich | WAI001-B | iPS DF19-9-7T | KON1-B |

hPSCreg: Register für humane pluripotente Stammzellen, Die Kurzform setzt sich aus KON für Kontrolle und den letzten drei Zeichen der hPSCreg-Nummer zusammen.

3.1.2 Patienten und SCZ-spezifische iPSC

Die in dieser Arbeit verwendeten iPSC von SCZ-Patienten wurden von der Arbeitsgruppe etabliert und entsprechend des Registers für humane pluripotente Stammzellen benannt. Die iPSC wurden aus peripheren mononukleären Blutzellen hergestellt. Dafür wurden die Blutzellen zunächst aus dem Blut isoliert und dann mithilfe des Epstein-Barr-Virus immortalisiert. Die erzeugten B-Lymphoblastoiden Zelllinien wurden mithilfe episomaler Vektoren zu den SCZ-spezifischen iPSC-Linien reprogrammiert (Tabelle 2). Für Patient 1 stehen drei iPSC-Linien zur Verfügung, für Patient 2 zwei iPSC-Linien.

Tabelle 2: verwendete humane SCZ iPSC-Linien

| Patient | Alter / Geschlecht | NRXN1-Variation | hPSCreg | Kurzform in dieser Arbeit |
|---------|---------------------|--|-----------|---------------------------|
| 1 | 37 Jahre / männlich | heterozygot CNV in 2p16.3; Deletion α -Promoter + Exon 1 - 6 | MLUi001-B | P1-B |
| | | | MLUi001-F | P1-F |
| | | | MLUi001-M | P1-M |
| 2 | 22 Jahre / männlich | heterozygot CNV in 2p16.3 Deletion Exon 4 - 6 | MLUi002-E | P2-E |
| | | | MLUi002-G | P2-G |

CNV: *Copy Number Variation*, NRXN1: Neurexin 1, hPSCreg: Register für humane pluripotente Stammzellen. Die Kurzform setzt sich aus P für Patient und den letzten drei Zeichen der hPSCreg-Nummer zusammen.

3.1.3 Stammhaltung der iPSC

Die iPSC wurden im Inkubator bei 37 °C, 5,0 % molekularem Sauerstoff (O₂) und 5,0 % Kohlenstoffdioxid (CO₂) in mTeSR-1-Medium (Tabelle 3) in 6-Well-Platten kultiviert. Die Wells wurden mit Matrigel (Thermo Fischer Scientific, Darmstadt) beschichtet. Für die Beschichtung wird das Matrigel 1:100 mit *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM) verdünnt, 1,0 ml der Verdünnung je Well aufgetragen und 1 h bei 37 °C inkubiert. Die iPSC wurden wöchentlich passagiert. Zum Ablösen der Zellen wurde das Kulturmedium vollständig entnommen. Anschließend wurden die iPSC mit 1,0 ml Kollagenase IV (Thermo Fischer Scientific, Darmstadt) (1,0 mg / ml) bedeckt und bei 37 °C für 40 min inkubiert. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von 1,0 ml mTeSR-1-Medium pro Well gestoppt und die abgelösten iPSC in ein Zentrifugenröhrchen überführt. Diese wurden bei 200 g für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen, die verbleibenden iPSC im Zentrifugenröhrchen wurden in neuem mTeSR-1-Medium aufgenommen und in bereits mit Matrigel beschichtete 6-Well-Platten ausgesät. Der Mediumwechsel erfolgte täglich.

3.1.4 Neurale Differenzierung zu neuronalen Stammzellen

Die iPSC wurden für 7 Tage (7 d) in neuralem Induktionsmedium (NIM) (Tabelle 3) bei 37 °C, 5,0 % O₂ und 5,0 % CO₂ kultiviert. Die Inhaltsstoffe des Mediums bewirken eine Differenzierung der iPSC in die neurale Richtung. Nach 7 d liegen NSC vor, die sich in verschiedene neurale Zellen differenzieren können.

3.1.5 Gerichtete Differenzierung zu terminal differenzierten kortikalen Neuronen

Die NSC wurden für 7 d in Terminalem Differenzierungsmedium 1 (TDM1) (Tabelle 3) bei 37 °C, 5,0 % O₂ und 5,0 % CO₂ kultiviert. Das Medium wurde alle 2 - 3 d gewechselt. Am 8 d wurde auf Terminales Differenzierungsmedium 2 (TDM2) (Tabelle 3) gewechselt. Weiterhin erfolgte der Mediumwechsel alle 2 – 3 d. Am 37 d erfolgte eine Passage. Das Kulturmedium wurde vollständig abgesaugt, die Neurone wurden mit phosphatgepufferter Salzlösung (PBS, Merck Millipore, Darmstadt) gespült, anschließend wurden diese mit 1,0 ml TrypLE (Thermo Fischer Scientific, Darmstadt) pro Well bedeckt und für 5 min bei 37 °C inkubiert. Nachdem die Neurone abgelöst waren, wurde die Reaktion mit einem Stoppmedium bestehend aus ~ 80 % DMEM und ~ 20 % *KnockOut Serum Replacement* (beide Thermo Fischer Scientific, Darmstadt) beendet. Die Neurone wurden in ein Zentrifugenröhrchen überführt, anschließend bei 200 g für 5 min zentrifugiert und der Überstand wurde abgenommen. Die im Zentrifugenröhrchen verbleibenden Neurone wurden in TDM2 aufgenommen und in Poly-L-Ornithin/Laminin beschichtete Wells überführt. Die Kultivierung erfolgte weiterhin

in TDM2. An 68 d wurden RNA-, Protein- und Immunfluoreszenz-Proben der terminal differenzierten Neurone (TD) gewonnen.

Für die Beschichtung der Zellkulturplatten und Deckgläser wurde Poly-L-Onithin Hydrochlorid (Merck, Darmstadt) in 10,0 mM Natriumborat (pH 8,4 Roth, Karlsruhe) gelöst. Jedes Well einer 6-Well-Zellkulturplatte wurde mit 1,5 ml dieser Lösung gefüllt und für mindestens 3 h bei 37 °C inkubiert. Die Lösung wurde vollständig abgenommen, die Wells dreimal mit sterilem Wasser gespült und anschließend unter der Sterilwerkbank luftgetrocknet. Kurz vor der Verwendung wurden die Wells mit 3,0 ml einer verdünnten Laminin-Lösung (10,0 µl Laminin / ml PBS; Laminin: Sigma-Aldrich, Taufkirchen) für 1 h bei 37 °C inkubiert. Nachdem die Laminin-Lösung vollständig abgesaugt wurde, war die Beschichtung verwendbar und wurde unmittelbar mit Kulturmedium bedeckt. Um die Neurone nach der Passage auf Deckgläsern (Carl Roth, Karlsruhe) zu kultivieren, wurden diese ebenfalls mit Poly-L-Ornithin/Laminin beschichtet. Die Deckgläser wurden mithilfe kleiner Silikontropfen an den Boden der einzelnen Wells befestigt und ebenfalls mit Poly-L-Ornithin-Lösung beschichtet. Diese wurde in Form von großen Tropfen auf die Deckgläser aufgetragen, damit der Zwischenraum zwischen den Deckgläsern nicht benetzt ist. Nach der Inkubation erfolgte die bereits beschriebene Beschichtung mit Laminin und die Aussaat der Neurone.

3.1.6 Erworbene OL-Linie und dessen Kultivierung

Die MO3.13 Humane Oligodendrozytische (Glial) Zelllinie ist eine immortalisierte proliferierende Hybridzelllinie aus humanen Rhabdomyosarkom-Zellen und humanen OL, welche die morphologischen und molekularen Eigenschaften primärer OL zeigt. Diese wurde bei tebu-bio (Offenbach) erworben. Die Linie wird im OL-Medium (Tabelle 3) im Inkubator bei 37 °C, 5,0 % O₂ und 5 % CO₂ kultiviert. Der Mediumwechsel erfolgt alle 2 – 3 d.

Tabelle 3: Zusammensetzung der verwendeten Zellkulturmedien und Zusätze

| Name | Hersteller | Endkonzentration |
|---|--------------------------------------|------------------|
| Stammzellmedium mTeSR-1 | | |
| mTeSR-1 <i>basal medium</i> | StemCell Technologies | ~ 80 % |
| mTeSR-1 <i>supplement</i> | Köln | 1 x |
| Gentamycin | Biochrom, Berlin | 0,1 mg / ml |
| Neurales Induktionsmedium | | |
| STEMdiff <i>neural induction medium</i> | StemCell Technologies, Köln | |
| Gentamycin | Biochrom, Berlin | 0,1 mg / ml |
| Terminales Differenzierungsmedium 1 | | |
| DMEM, <i>high Glucose</i> (1 x) | Thermo Fischer Scientific (31966021) | ~ 25 % |
| Ham's F - 12 <i>Nutrient Mix</i> | Thermo Fischer Scientific (31765027) | ~ 25 % |
| Neurobasal Medium | Thermo Fischer Scientific (21103049) | ~ 50 % |
| Gentamycin | Biochrom, Berlin | 0,1 mg / ml |
| N – 2 <i>Supplement</i> (100 x) | Thermo Fischer Scientific (17502048) | 1 x |
| B – 27 <i>Supplement</i> (50 x), <i>minus vitamin A</i> | Thermo Fischer Scientific (12587010) | 1 x |
| Cyclisches Adenosinmonophosphat * | Sigma-Aldrich (A9501) | 0,3 µg / ml |
| <i>Recombinant Murine Wnt - 3a</i> * | Peptotech (315-20) | 1 ng / ml |
| <i>Cyclopamine-KAAD</i> * | Merck Millipore (239804) | 1 µM |
| Terminales Differenzierungsmedium 2 | | |
| DMEM, <i>high Glucose</i> (1 x) | Thermo Fischer Scientific (31966021) | ~ 25 % |
| Ham's F - 12 <i>Nutrient Mix</i> | Thermo Fischer Scientific (31765027) | ~ 25 % |
| Neurobasal Medium | Thermo Fischer Scientific (21103049) | ~ 50 % |
| Gentamycin | Biochrom, Berlin | 0,1 mg / ml |
| B – 27 <i>Supplement</i> (50 x), <i>minus vitamin A</i> | Thermo Fischer Scientific (12587010) | 1 x |
| Cyclisches Adenosinmonophosphat * | Sigma-Aldrich (A9501) | 0,3 µg / ml |
| <i>Recombinant Human/ Murine/ Rat BDNF</i> * | Peptotech (450-02) | 10 ng / ml |
| <i>Recombinant Human GDNF</i> * | Peptotech (450-10) | 10 ng / ml |
| OL-Medium | | |
| DMEM | Thermo Fischer Scientific, Darmstadt | ~ 89 % |
| Fetales Rinderserum | Thermo Fischer Scientific, Darmstadt | ~ 10 % |
| Gentamycin | Biochrom, Berlin | 0,1 mg / ml |

* Zusätze erst direkt vor der Verwendung hinzufügen

DMEM: *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*, WNT: *wingless integrated proteins*, BDNF: *brain derived neurotrophic factor*, GDNF: *glial cell derived neurotrophic factor*

3.2 Molekularbiologische Methoden

3.2.1 RNA-Isolation

Die Isolation von RNA erfolgte mithilfe des *RNeasy mini elute cleanup kit* (Qiagen, Hilden). Die Zellen wurden im Well mit PBS gewaschen, mithilfe eines Schabers vom Well-Boden abgenommen und in ein Reaktionsgefäß überführt. Danach wurden die Zellen für 4 min bei 8000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in Lysepuffer aufgenommen. Die Probe wurde dann weiter entsprechend der Anleitung des Herstellers aufgearbeitet. Während der Isolation erfolgte der fakultative Desoxyribonuklease-Verdau. Die RNA-Konzentration wurde mithilfe des Plattenlesegeräts (Synergy mx) gegenüber der Referenz (nukleasefreies Wasser, Qiagen, Hilden) bestimmt. Die RNA-Probe wurde bei -80 °C gelagert oder direkt verwendet.

3.2.2 Reverse Transkription

Für die Transkription der zuvor isolierten RNA in komplementäre DNA (cDNA) wurde 1,0 µg RNA benötigt. Die Bestandteile unter Schritt 1 (Tabelle 4) wurden vereint, für 5 min bei 65 °C inkubiert und anschließend auf 4 °C heruntergekühlt. Im nächsten Schritt wurden die unter Schritt 2 genannten Bestandteile (Tabelle 4) hinzugefügt und bei 42 °C für 60 min inkubiert. Um die Reaktion zu beenden, wurde der Ansatz bei 70 °C für 10 min inkubiert und im Anschluss auf 4 °C gekühlt. Die gewonnene cDNA wurde bei -20 °C gelagert oder direkt für eine Polymerasekettenreaktion (PCR) weiterverwendet.

Tabelle 4: Zusammensetzung eines Reverse-Transkriptions-Ansatzes

| Bestandteil | Hersteller | Volumen |
|---------------------------------|--------------------------------------|---------------|
| Schritt 1 | | |
| RNA | | x µl (= 1 µg) |
| Oligo _{dt18} -Primer | Thermo Fischer Scientific, Darmstadt | 1,0 µl |
| nukleasefreies Wasser | Qiagen, Hilden | ad 12,5 µl |
| Schritt 2 | | |
| 5 x <i>Reaction Buffer RT</i> | Thermo Fischer Scientific, Darmstadt | 4,0 µl |
| dNTPs (10 mM) | Thermo Fischer Scientific, Darmstadt | 2,0 µl |
| <i>RevertAid M-MuLV Reverse</i> | Thermo Fischer Scientific, Darmstadt | 1,0 µl |
| <i>RiboLock RNase Inhibitor</i> | Thermo Fischer Scientific, Darmstadt | 0,5 µl |

dNTP: Desoxynukleotidtriphosphate

3.2.3 Semiquantitative PCR

Die Ansätze der semiquantitativen PCR mit einem Gesamtvolumen von 25,0 µl wurden entsprechend Tabelle 5 hergestellt. Die PCR-Reaktion folgte dem Tabelle 6 entsprechendem Programm. Die Primer wurden von der Arbeitsgruppe selbst entworfen und zur Verfügung gestellt (Tabelle 12 Anlagen).

Tabelle 5: Zusammensetzung eines semiquantitativen PCR-Ansatzes

| Bestandteil | Hersteller | Volumen |
|-----------------------------------|--------------------------------------|----------|
| cDNA | | 1,0 µl |
| dNTPs (2,5 mM) | Thermo Fischer Scientific, Darmstadt | 2,0 µl |
| MgCl ₂ (25,0 mM) | Sigma Aldrich, Taufkirchen | 2,5 µl |
| 10 x Puffer B | Solis Biodyne, Tartu, Estland | 2,5 µl |
| sense Primer (10,0 pmol / µl) | | 0,5 µl |
| antisense Primer (10,0 pmol / µl) | | 0,5 µl |
| Firepol DNA Polymerase (5 U / µl) | Solis Biodyne, Tartu, Estland | 0,25 µl |
| Nukleasefreies Wasser | Qiagen, Hilden | 15,75 µl |

cDNA: komplementäre DNA, dNTP: Desoxynukleotidtriphosphate

Tabelle 6: Programm für die semiquantitative PCR

| Reaktion | Temperatur | Zeit | |
|--------------------|------------|--------|------|
| Hitzenaturierung | 95 °C | 10 min | |
| Hitzenaturierung | 95 °C | 30 s | 35 x |
| Hybridisierung | 60 °C | 30 s | |
| Elongation | 72 °C | 30 s | |
| Elongation | 72 °C | 10 min | |
| Stopp durch Kühlen | 4 °C | ∞ | |

3.2.4 Agarosegelelektrophorese

In einem zweiprozentigen Agarosegel (LE Agarose; Biozym Scientific, Hess. Oldendorf) mit 0,01 % Ethidiumbromid (10,0 mg / ml, Promega, Mannheim) wurden die amplifizierten DNA-Fragmente durch Elektrophorese aufgetrennt. Dies geschah in 1 X Tris-Acetat-Ethylendiamintetraessigsäure-Puffer (TAE-Puffer, Tabelle 11 Anlagen). Die PCR-Ansätze sind mit 6 x Ladepuffer *DNA Loading Dye* (Thermo Fischer Scientific, Darmstadt) angereichert aufgetragen worden. Der *GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder* (Thermo Fischer Scientific, Darmstadt) ist als Längenstandard mitgeführt worden. Der Lauf erfolgte bei 80 – 100 V, 300 mA für circa 30 min.

3.2.5 Quantitative *Real Time* PCR

Die Analyse der Marker für IN wurde mithilfe der quantitativen *real time* PCR durchgeführt. Die Primer für die Gene PVALB, LHX6, SST, CALB1, CALB2, NPY, RELN, SP8, DLX1 und DLX2 wurden erworben (*PrimePCR SYBR Green Assay*, Bio-Rad, München, Tabelle 14 Anlagen). Die Primer der Gene ASCL1, COUPTF1, CXCR4, OLIG2, SHH, NKX2.1, PROX1 und *Glyceraldehyde-3-Phosphate-Dehydrogenase* (GAPDH) wurden durch die Arbeitsgruppe selbst entworfen und zur Verfügung gestellt (Tabelle 13 Anlagen). Die Standardkurven der Primer COUPTF1, SHH, OLIG2, PROX und GAPDH waren bereits in der Arbeitsgruppe etabliert. Für die übrigen Primer sind Standardkurven angefertigt worden, um die erhaltenen Werte von Proben mit der tatsächlichen Effizienz der Primer zu verrechnen. Die quantitativen *real time* PCR-Ansätze mit einem Volumen von 20,0 µl sind nach Tabelle 7 auf 96-Well-Platten

(Biozym Scientific, Hess. Oldendorf) pipettiert worden. Benutzt wurde der 5 x *Hot Firepol Eva Green qPCR Mix* (Solis Biodyne, Tartu, Estland) und das nukleasefreie Wasser (Qiagen, Hilden). Das quantitative *real time* PCR-Programm zeigt Tabelle 8. Die Messung wurde im BioRad CFX Connect (BioRad, München) vorgenommen und mithilfe der zugehörigen Software BioRad CFX Manager 3.1 ausgewertet. GAPDH diente als Referenzgen. Als Positivkontrolle wurde *human total brain* und *fetal human brain* (Thermo Fischer Scientific, Darmstadt) mitgeführt. Je Probe wurden dreifach Bestimmungen vorgenommen.

Tabelle 7: Zusammensetzung eines quantitativen *real time* PCR-Ansatzes

| Bestandteil | Volumen | |
|--|--------------------------------|--------------------------|
| cDNA | 1,0 µl | |
| 5 x <i>Hot Firepol EvaGreen qPCR Mix</i> | 4,0 µl | |
| Primer | Für AG-Primer | Für BioRad-Primer |
| | 1,0 µl <i>sense</i> Primer | 1,0 µl <i>PrimePCR</i> |
| | 1,0 µl <i>antisense</i> Primer | <i>SYBR Green Assay</i> |
| Nukleasefreies Wasser | ad 20,0 µl | |

cDNA: komplementäre DNA, qPCR: quantitative *real time* PCR, AG-Primer: Primer der Arbeitsgruppe

Tabelle 8: Programm für die quantitative *real time* PCR

| Temperatur | Zeit | |
|---------------|---------------------------|------|
| 95 °C | 5 min | |
| 95 °C | 15,0 s | 45 x |
| 60 °C | 30,0 s | |
| 60 °C - 95 °C | 0,05 s pro 0,5 °C Anstieg | |

3.2.6 Statistische Analyse der Daten aus der quantitativen *Real Time* PCR

Aus den generierten Daten wurde der Mittelwert und dessen Standardfehler berechnet. Für die gepoolten Daten wurde der Standardfehler aus biologischen Replikaten bestimmt. Die Erstellung der Diagramme erfolgte mit SigmaPlot 2.0. Für die Analyse der Signifikanz wurde ein einfacher t-test mithilfe des Programms SigmaPlot 2.0 durchgeführt. Das Signifikanzniveau wurde auf $p < 0,05$ festgelegt.

3.3 Immunfluoreszenzfärbung

Um in Neuronen bestimmte Proteine zu färben, erfolgte eine Fixierung der Zellen auf dem Deckglas. Nach Abnahme des Kulturmediums wurden die Deckgläser für 15 min bei Raumtemperatur mit 4,0 % Paraformaldehyd in PBS (Carl Roth, Karlsruhe) bedeckt. Anschließend wurden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen. Zum Blocken unspezifischer Bindungen von Antikörpern wurden die Zellen 30 min bei Raumtemperatur mit 80,0 µl 1,0 % Pferdeserum (Thermo Fischer Scientific, Darmstadt) und 0,02 % TritonX-100 in PBS (AppliChem, Darmstadt) pro Deckglas bedeckt. Danach wurden die Deckgläser für 30 min in 3,5 % Pferdeserum in PBS inkubiert. Die

Deckgläser wurden dreimal in PBS gewaschen und für 24 h bei 4 ° C mit dem primären Antikörper in 80,0 µl Volumen pro Deckglas inkubiert. Der primäre Antikörper MAB1637 *Anti-tubulin beta 3 class III* (TUBB3) (Merck Millipore, Darmstadt) wurde 1:100 in PBS verdünnt. Danach wurde das Deckglas dreimal mit PBS gewaschen und mit dem sekundären Antikörper gefärbt. Der sekundäre Antikörper 115-165-003 (Jackson Immuno Research, Ely, UK) wurde 1:400 in PBS verdünnt. Die Deckgläser wurden für 2 h bei Raumtemperatur mit dem sekundären Antikörper in 80,0 µl Volumen inkubiert. Anschließend wurden die Deckgläser dreimal in PBS gewaschen. Danach erfolgte die Kernfärbung mittels Hoechst-33342 (Invitrogen, Karlsruhe) mit 80,0 µl pro Deckglas für 5 min bei Raumtemperatur. Daraufhin wurden die Präparate mit entionisiertem Wasser gewaschen. Die Deckgläser wurden mit Fluoromount G (Biozol, Echingen) auf Objektträgern fixiert, für 24 h bei 4 °C ausgehärtet und anschließend mit Nagellack versiegelt. Die Präparate wurden bei 4 °C gelagert. Alle Inkubationen haben im lichtgeschützten Raum stattgefunden.

3.4 Agilent Seahorse XFe96 Analyzer

Der *Agilent Seahorse XFe96 Analyzer* ist ein Messgerät, das wiederholt die vorliegende O₂-Konzentration und den pH-Wert im Messmedium erfasst. Dadurch kann die sogenannte Sauerstoffkonsumrate (OCR) und die extrazelluläre Azidifikationsrate (ECAR) kontinuierlich bestimmt werden. Während der Glykolyse, die im Zytosol der Zelle stattfindet, wird Glukose zu Pyruvat verstoffwechselt. Dieses wird in den Mitochondrien durch den Zitrat-Zyklus und der OXPHOS weiter zu CO₂ und Wasser unter dem Verbrauch von O₂ verstoffwechselt. Betreiben die Zellen hauptsächlich Glykolyse zur Energiegewinnung, stellt das Endprodukt der Glykolyse das Laktat dar und führt in steigender Konzentration zu einer Verminderung des pH-Wertes. Protonen werden in den extrazellulären Raum abgegeben. Dieser verändert ebenfalls seinen pH-Wert. Die pH-Wert-Veränderung des Messmediums wird durch den *Seahorse Analyzer* in Form der ECAR gemessen. Ebenso misst dieser den veränderten O₂-Gehalt des Mediums. Ist die Elektronentransportkette in den Mitochondrien der Zellen aktiv, verbrauchen sie O₂. Der O₂-Gehalt im Messmedium sinkt und wird in Form der OCR ausgedrückt. Das bei der mitochondrialen Atmung entstehende CO₂ trägt ebenfalls zur Ansäuerung und damit auch zur pH-Wert-Absenkung des Messmediums bei. Dieser Einfluss kann jedoch durch die spezifische Anordnung der jeweiligen Versuche herausgerechnet werden. Somit wird die Ansäuerung durch CO₂ nicht dem glykolytischen Stoffwechsel zugeschrieben.

Um die Messungen mithilfe des *Seahorse Analyzers* durchführen zu können, wurden spezielle Zellkulturplatten (*Seahorse XF96 Cell Culture Microplates*), ein spezieller

Sensor (*Sensor Cartridge*) und eine Kalibrierlösung benötigt (*Seahorse XFe96 Extracellular Flux Assay Kit*). Die *Sensor Cartridge* ermöglicht das Messen des O₂-Gehaltes und pH-Wertes im sogenannten *Assay-Medium*, das Medium, das während der Messung im *Seahorse Analyzer* verwendet wird. Alle Produkte, abgesehen vom *Assay-Medium*, sind bei Agilent Technologies, Santa Clara, USA erhältlich.

3.4.1 Messung der Glykolyse mithilfe des *Seahorse XF Glycolytic Rate Assay*

Verwendet wurde das *Seahorse XF Glycolytic Rate Assay Kit* (Agilent Technologies, Santa Clara, USA). Das Kit beinhaltet die notwendigen Reagenzien: Rotenon plus Antimycin A (Rot/AA) und 2-Desoxy-D-Glukose (2-DG). Der *Glycolytic Rate Assay* wurde entsprechend der vom Hersteller bereitgestellten Anleitung durchgeführt. Das *Assay-Medium* (Tabelle 9) wird am Tag der Messung hergestellt und steril filtriert. Die Neurone der Patienten wurden an 113 d gemessen. Dafür wurden die Neurone 10 d zuvor von den Zellkulturplatten abgelöst, in die *Seahorse* Zellkulturplatte überführt und bis zum Tag der Messung in TDM2 kultiviert. Die OL MO3.13 wurden 1 d vor der Messung in die *Seahorse* Zellkulturplatte überführt und bis zur Messung im OL-Medium gehalten. 1 d vor der Messung wurde die *Sensor Cartridge* in die Kalibrierlösung gelegt und in einem 37 °C warmen und CO₂-freien Inkubator gestellt. Am Tag der Messung wurde das Zellkulturmedium abgenommen, die Zellen zweimal mit dem *Assay-Medium* gewaschen, daraufhin mit 175,0 µl *Assay-Medium* pro Well bedeckt und in einem CO₂-freien Inkubator bei 37 °C für 45 min inkubiert. Die Reagenzien aus dem *Glycolytic Rate Assay Kit* wurden entsprechend der Herstellerangaben gelöst und in die *Sensor Cartridge* eingefügt. Nachdem die Inkubation der Zellen im CO₂-freien Inkubator beendet war, wurde die *Sensor Cartridge* der *Seahorse* Zellkulturplatte aufgesetzt und die Messung im *Seahorse XFe96 Analyzer* durchgeführt. Die Auswertung erfolgte mithilfe der Firmensoftware *Wave*

Tabelle 9: Zusammensetzung des *Glycolytic Rate Assay-Medium*

| Name | Hersteller | Endkonzentration |
|--------------------------------|---|-------------------|
| DMEM <i>without Phenol Red</i> | Agilent Technologies, Santa Clara, USA (103335-100) | ~ 97,5 % |
| HEPES (1 M) | Agilent Technologies, Santa Clara, USA | 5 mM |
| D-(+) Glukose | Sigma-Aldrich, Taufkirchen | 10 mM |
| L-Glutamine | AppliChem, Darmstadt (A3704) | 2 mM |
| Sodium Pyruvate | AppliChem, Darmstadt (A4859) | 1 mM |
| NaOH | AppliChem, Darmstadt (A1432) | pH 7,4 einstellen |

DMEM: *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*,

HEPES: 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure

3.4.2 Funktionsweise des *Glycolytic Rate Assay*

Zu Beginn wurde die basale Glykolyse gemessen. Das ist die Stoffwechsellage, die unter normalen Bedingungen stattfindet. Durch die Zugabe von Rot/AA werden die Komplexe I und III der Elektronentransportkette gehemmt (Abbildung 19 Anlagen). Die OXPHOS steht zur ATP-Generierung nicht mehr zur Verfügung. Das führt zu einem Absenken der OCR, da weniger O₂ verbraucht wird. ATP muss mithilfe der Glykolyse bereitgestellt werden. Die Glykolyse der Zellen wird bis zu deren Maximum gesteigert. Während der Glykolyse kommt es zur Azidifizierung durch das gebildete Laktat. Diese wird in Form der ECAR gemessen und steigt an. Da der Zitrat-Zyklus unterbrochen ist, kann davon ausgegangen werden, dass die gesteigerte Azidifizierung auf die Glykolyse zurückzuführen ist. Unter diesen Bedingungen wurde die kompensatorische Glykolyse bestimmt. Die Zugabe von 2-DG hemmt die Glykolyse durch kompetitive Hemmung der Glukose-6-Phosphat-Isomerase und bringt den ECAR auf ein nicht-glykolytisches Level. Durch die CO₂-freie Inkubation wird verhindert, dass andere Störfaktoren den pH-Wert des Mediums zu beeinflussen. Mithilfe der gemessenen ECAR wird der Wert *glycoPER* berechnet. Dieser gibt die genaue Protonen-Efflux-Rate aufgrund der Glykolyse an. Die Azidifizierung aufgrund anderer Stoffwechselfvorgänge wird dabei herausgerechnet.

3.4.3 Messung der mitochondrialen Atmung mithilfe des *Seahorse XF Mito Stress Test Kit*

Verwendet wurde das *Seahorse XF Mito Stress Test Kit* (Agilent Technologies, Santa Clara, USA). Das Kit beinhaltet die notwendigen Reagenzien: Oligomycin, *carbonyl cyanide-p-trifluoromethoxyphenylhydrazone* (FCCP) und Rot/AA. Die Neurone der Patienten wurden an 90 d untersucht. Die Vorbereitung der Zellkulturen entspricht der für den *Glycolytic Rate Assay* beschriebenen Prozedur. Die Reagenzien des Kits wurden so gelöst, dass für Oligomycin eine Endkonzentration von 2,0 µM, für FCCP von 2,0 µM und für Rot/AA von 0,5 µM je Well bestand. Die Zusammensetzung des *Assay-Mediums* ist in Tabelle 10 zusammengefasst. Die Daten waren bereits in der Arbeitsgruppe vorhanden und wurden im Rahmen dieser Arbeit analysiert.

Tabelle 10: Zusammensetzung des *Mito-Stress-Test Assay-Medium*

| Name | Hersteller | Endkonzentration |
|-----------------|---|-------------------|
| DMEM | Agilent Technologies, Santa Clara, USA (103334-100) | ~ 98 % |
| D-(+) Glukose | Sigma-Aldrich, Taufkirchen | 25 mM |
| L-Glutamine | AppliChem, Darmstadt (A3704) | 2 mM |
| Sodium Pyruvate | AppliChem, Darmstadt (A4859) | 1 mM |
| NaOH | AppliChem, Darmstadt (A1432) | pH 7,4 einstellen |

DMEM: *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*

3.4.4 Funktionsweise des Mito Stress Test

Zu Beginn wurde die basale Respiration gemessen. Diese entspricht der normalen Stoffwechsellage. Durch Zugabe von Oligomycin wird die ATP-Synthase gehemmt (Abbildung 19 Anlagen) und der O₂-Verbrauch (OCR) sinkt um den Anteil, der für die Herstellung des ATPs über OXPHOS unter Ruhebedingungen benötigt wurde (Abbildung 6). Um die maximale Leistungsfähigkeit der Elektronentransportkette zu bestimmen, wird daraufhin FCCP hinzugegeben. FCCP wirkt als Entkoppler (Abbildung 19 Anlagen), wodurch der Protonengradient zusammenbricht. Um dem entgegen zu wirken, steigt der Elektronenfluss auf das Maximum an. Das führt zu einem stark erhöhten O₂-Verbrauch an Komplex IV. Aus diesem OCR Anstieg lässt sich die maximale Respirationsrate ablesen (Abbildung 6). Zum Schluss wird Rot/AA hinzugegeben. Durch die Hemmung der Komplexe I und III wird die Elektronentransportkette unterbrochen und der verbleibende O₂-Verbrauch der Zellen ist Stoffwechselaktivitäten zuzuordnen, welche nicht den Mitochondrien entspringen (Abbildung 6).

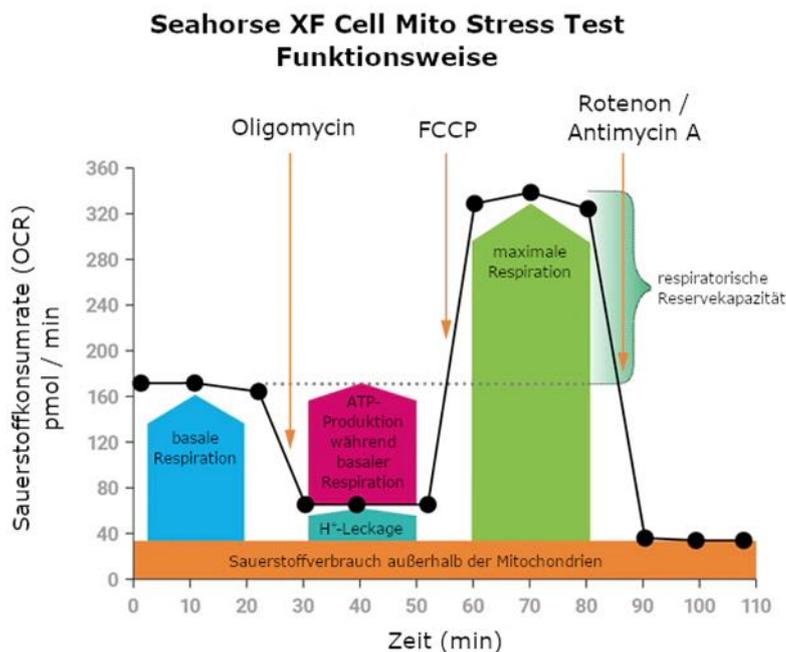


Abbildung 6: Funktionsweise des Seahorse XF Cell Mito Stress Test. Basale Respiration beinhaltet den O₂-Verbrauch, um den ATP-Bedarf der Zelle zu decken, sowie den O₂-Verbrauch um der Protonen-Leckage zu begegnen. ATP-Produktion: Die Abnahme der OCR nach Zugabe von Oligomycin zeigt den O₂-Verbrauch an, der zur ATP-Produktion im Rahmen der basalen Respiration erfolgte. Die Protonen-Leckage kann physiologisch sowie pathophysiologisch in Zellen vorkommen und reguliert die mitochondriale ATP-Produktion. Maximale Respiration: Die OCR nach FCCP-Injektion entspricht dem O₂-Verbrauch im Rahmen der maximal möglichen Respiration. Die OXPHOS zeigt die höchstmögliche Leistung, um den Protonengradienten aufrecht zu erhalten. Die respiratorische Reservekapazität ergibt sich aus der Differenz der maximalen Respiration und der basalen Respiration. Sie zeigt das theoretische Maximum der Zellen auf, um das sie ihre mitochondriale Atmung in Energiemangelzuständen steigern können. Durch Zugabe von Rot/AA wird die OXPHOS gehemmt und die verbleibende OCR zeigt den O₂-Verbrauch außerhalb der Mitochondrien an. FCCP: *carbonyl cyanide-p-trifluoromethoxyphenylhydrazone*, H⁺: Proton.

3.4.5 Normalisierung im Anschluss

Zur Normalisierung im Anschluss wird das *Pierce BCA Protein Assay Kit* (Thermo Fischer Scientific, Darmstadt) angewendet, um die optische Dichte zu bestimmen. Es wird dem *Assay-Medium* ein Protease-Inhibitor (*complete, mini, EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail*, Roche, Merck, Darmstadt) zugegeben und danach das *Assay-Medium* aus der *Seahorse* Zellkulturplatte abgenommen. Die Kulturplatte wurde einmal mit PBS gewaschen. Dann wurden 50,0 µl Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris) - Triton-Lösung (0,1 % Triton (AppliChem, Darmstadt) in 50,0 mM Tris-Puffer (Carl Roth, Karlsruhe) pro Well hinzugegeben und 15 min bei 37 ° C inkubiert. Anschließend wurden 150,0 µl Tris (50 mM) pro Well dazugegeben und gemischt. 10,0 µl der Probe und 200,0 µl der *BCA working solution* werden in Doppelbestimmung auf eine 96-Well-Platte aufgetragen, kurz gevortext, für 30 min bei 37 °C inkubiert und die optische Dichte mithilfe eines Plattenlesegerätes bestimmt. Die erhaltenen Werte wurden zur Auswertung in die Firmensoftware *Wave* importiert.

4 Ergebnisse

4.1 Differenzierungsverlauf von iPSC zu kortikalen Neuronen

Aus den iPSC der SCZ-Linien (Tabelle 2) und den iPSC der Kontrollzelllinien (Tabelle 1) wurden NSC generiert, um sie im folgenden Verlauf weiter zu kortikalen Neuronen zu differenzieren. Der Verlauf der Differenzierung wurde lichtmikroskopisch begutachtet und dokumentiert.

Die iPSC zeigen die typischen morphologischen Kriterien mit großen Zellkernen und verhältnismäßig geringem Zytoplasma. Sie wachsen in Kolonien, zeigen nur sehr geringe Zellzwischenräume und sind adhäsiv (Abbildung 7).

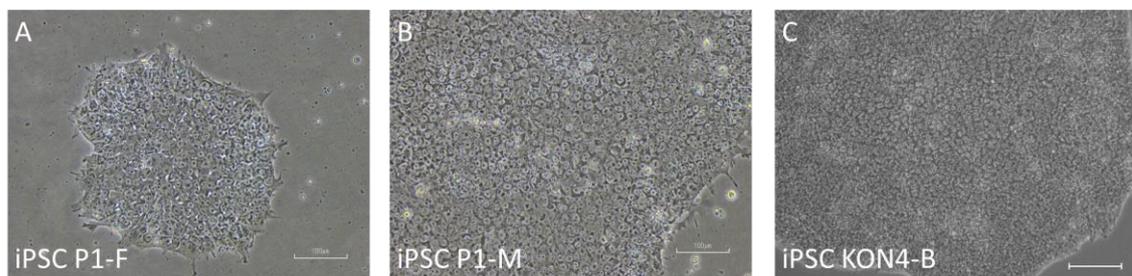


Abbildung 7: iPSC. (A) Die Abbildung zeigt eine kleine iPSC-Kolonie direkt nach der Passage der Linie iPSC P1-F (B) Die Abbildung zeigt eine iPSC-Kolonie 5 d nach der Passage der Linie iPSC P1-M. Es ist eine deutlich größere Kolonie als auf (A) zu erkennen. Dies ist auf hohe Zellteilungsraten zurückzuführen. An 7 d erfolgt die nächste Passage. (C) zeigt eine iPSC-Kolonie der Kontrollzelllinie iPSC KON4-B. Maßstab entspricht 100 µm (rechts unten je Bild).

4.1.1 Morphologischer Verlauf der Differenzierung von iPSC zu NSC

Die iPSC wurden 7 d in NIM kultiviert und an 7 d lichtmikroskopisch dokumentiert. Beispielhaft wird hier die Entwicklung von iPSC zu NSC der Linie P1-F vorgestellt. Im Unterschied zu den iPSC sind die NSC kleiner, von rundem Zellkörper und weisen sehr kleine Zellkerne auf. Es liegt ein geringeres Kern-Zytoplasma-Verhältnis vor. In der Zellkultur überwiegt das Bild einer homogenen Zellmasse bestehend aus diesen NSC (Abbildung 8A). Typisch während der Kultivierung in NIM ist das Auftreten von dreidimensional wachsenden neuralen Rosetten, bei denen sich die Zellen radiär um einen zentralen Kanal anordnen (Abbildung 8B). Die neuralen Rosetten kommen in der gesamten Zellkultur vor, sind aber besonders in den lichter Randbereichen gut zu erkennen. Einige Bereiche der Zellkultur zeigen das Auftreten von unreifen Zellen, die noch nicht den Charakter von NSC besitzen. Diese sind gekennzeichnet durch eine starke Lichtbrechung und einem verhältnismäßig größeren Kern (Abbildung 8C). Sie kommen in jedem Well und bei jeder Linie vor, stellen allerdings bei weitem nicht den größten Anteil dar.

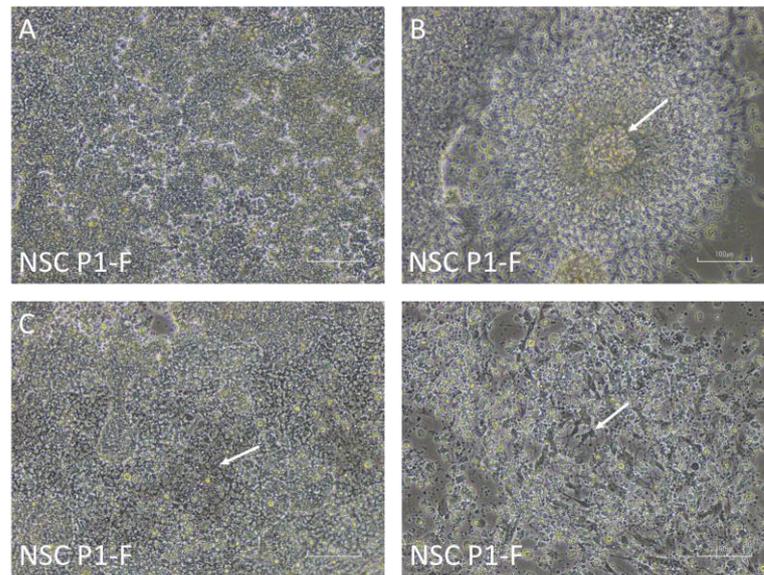


Abbildung 8: NSC generiert aus iPSC durch Kultivierung in NIM. Dargestellt sind die NSC am Beispiel der Linie P1-F. Maßstab in Abbildung A - D entspricht 100 μm (rechts unten je Bild). **(A)** Die Abbildung zeigt eine klassische homogene Verteilung kleiner runder NSC mit geringem Kern-Zytoplasma-Verhältnis. **(B)** Die Abbildung zeigt eine dreidimensional wachsende neurale Rosette mit zentralem Kanal (Pfeil). **(C)** Diese Abbildung zeigt das Vorhandensein unreifer, nicht-neuronaler Zellen mit großem Zellkern und starker Lichtbrechung (Pfeil) in der Kultur. **(D)** Die Kultur enthält außerdem Zellen mit fortgeschrittener neuraler Differenzierung (Pfeil).

Im Gegenteil dazu gibt es auch sehr wenige Bereiche, die deutlich über das NSC-Stadium hinaus differenzierte Zellen enthalten. Diese Zellen weisen keine runden, sondern vieleckige Zellkörper auf, sind polarisiert und besitzen kleine verästelte Zellfortsätze (Abbildung 8D). Auch der Anteil dieser Zellen an der Gesamtkultur ist gering. Der Großteil, der sich nach 7 d im NIM befindlichen Zellen zeigen das klassische Bild der NSC. Die Differenzierung zu NSC lief in allen Zellen der SCZ-spezifischen Linien und denen der Kontrollzelllinien vergleichbar ab. Es zeigten sich keine morphologischen Unterschiede untereinander.

4.1.2 Morphologischer Verlauf der Differenzierung von NSC zu Neurone

Der weitere Differenzierungsverlauf wird an den Tagen 12 d, 20 d, 33 d, 40 d und 68 d lichtmikroskopisch dokumentiert. Über den gesamten Differenzierungsverlauf sind deutliche morphologische Veränderungen zu erkennen.

Nach 7 d Kultur in TDM1 sind die Zellen morphologisch den NSC recht ähnlich. Sie zeigen ebenfalls kleine runde Zellen mit kleinen Zellkernen. An 12 d zeigen sich besonders an den lichter Stellen größere Zellkörper mit einer ovalen oder pyramidalen Form. Zu beobachten ist, dass diese sich zunächst besonders am Rand einer neuralen Rosette befinden (Abbildung 9A). Die Ausläufer der Zellen, Dendriten und Axone, entwickeln sich und beginnen, in Kontakt zu anderen Zellen zu treten (Abbildung 9B). Zunächst erscheinen sie dünn und zaghaft. Sie werden im Laufe der Zeit länger, kräftiger

und verzweigter und bilden ein immer größeres und dichteres Netzwerk zwischen den Nervenzellen aus. Abbildung 9C zeigt, dass auch zu diesem Zeitpunkt keine homogene Masse an gleichartig differenzierten Zellen vorliegt. Nahe der Rosette sind viele dem beschriebenen Stadium entsprechende Zellen vorzufinden, aber auch viele unreife Zellen (Abbildung 9C Pfeil rechts unten im Bild) und Zellen nicht neuraler Herkunft (Abbildung 9C Pfeil links oben im Bild). Bereits an 20 d liegt ein ausgeprägtes Netzwerk unter den Zellen vor (Abbildung 9D). Die Zellfortsätze nehmen an Zahl und Stärke zu und werden bis zu 100 μm lang oder länger (Abbildung 9E). Das Vorkommen lichtmikroskopisch erkennbarer neuraler Rosetten nimmt deutlich ab. Die Zellkörper gruppieren sich zunehmend zu Anhäufungen und bilden wiederum lichtere Bereiche, die durch Verbindungsstraßen zwischen ihnen gekennzeichnet sind.

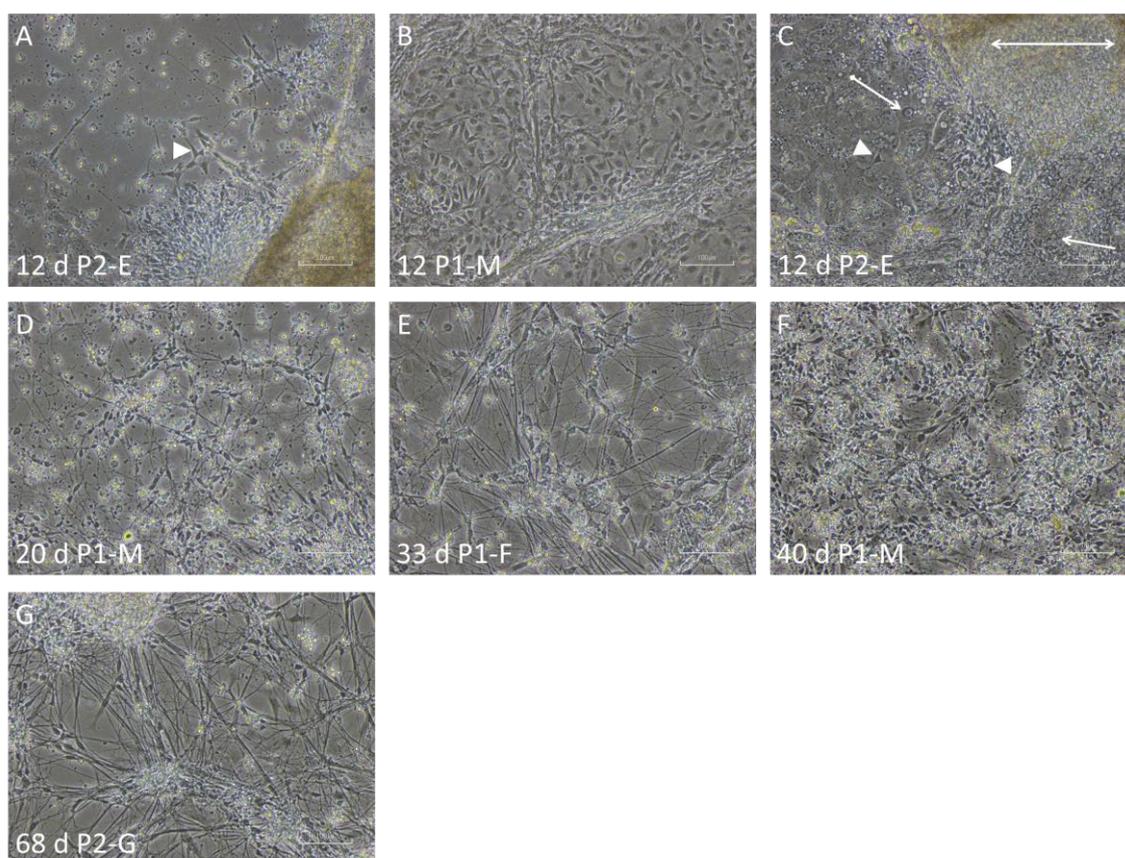


Abbildung 9: Verlauf der Differenzierung von 12 d bis 68 d. In den Abbildungen A und C zeigt die Pfeilspitze auf pyramidale Zellkörper. Maßstab in Abbildung A - G entspricht 100 μm (rechts unten je Bild). **(A)** 12 d: Am Rand der neuralen Rosetten beginnen sich Neurone mit pyramidalem Zellkörper heraus zu differenzieren (Pfeilspitze) **(B)** 12 d: Innerhalb der Kultur nehmen die Zellfortsätze Kontakt zueinander auf **(C)** 12 d: Der Großteil der Zellen der Kultur zeigt zu diesem Zeitpunkt ein einheitliches morphologisches Erscheinungsbild wie in Abbildung A und B. Dennoch liegen auch zu diesem Zeitpunkt unreife Zellen (Pfeil rechts unten) und Zellen nicht neuraler Herkunft (Pfeil links oben) in der Kultur vor. Der Doppelpfeil markiert eine Rosette. Die Pfeilspitze zeigt Neurone mit pyramidalen Zellkörper. **(D)** 20 d: Ein ausgeprägtes neuronales Netzwerk liegt vor. **(E)** 33 d: Zellfortsätze sind bis zu 100 μm lang. **(F)** 40 d / 3 d nach der Passage: Die Zellausläufer sind nach der Passage wieder erkennbar. **(G)** 68 d: Morphologischen Strukturen zum Zeitpunkt der Probenentnahme: Ein morphologisch ausgeprägtes neuronales Netzwerk liegt vor.

An 37 d fand eine Passage der Neurone auf neue 6-Well-Platten statt. Die Neurone der SCZ-Linien wurden 1:1 übertragen. Die Neurone der Linie KON4-B wurden 2:1 aufgetragen. Direkt nach der Passage war wieder eine homogene Verteilung kleiner runder Zellen lichtmikroskopisch zu erkennen. Bereits 3 d nach der Passage waren wieder erste Zellausläufer und Netzwerke untereinander zu erkennen (Abbildung 9F). Diese wuchsen zu einem größeren und reiferen Netzwerk als vor der Passage aus. Ebenfalls gruppierten sich die Zellkörper wieder zu Anhäufungen und gaben lichtere Stellen, die lediglich Zellfortsätze enthielten, frei (Abbildung 9F). Die Neurone der Linien P2-G und P1-B wurden an 57 d nochmals passagiert, da die Zellen drohten, sich abzulösen. An 68 d wurden RNA-, Protein- und Immunfluoreszenz-Proben der Neurone gewonnen. Ab diesem Zeitpunkt werden die Neurone als terminal differenzierte Neurone (TD) bezeichnet. Abbildung 9G zeigt beispielhaft an den TD der Linie P2-G die morphologischen Strukturen der TD aller Linien zum Zeitpunkt der Probenentnahme. In Abbildung 20 (Anlagen) sind die TD aller Linien zum Zeitpunkt der Probenentnahme dargestellt. Die Entwicklung der Zellen der Linie P2-E wird im nächsten Kapitel genauer betrachtet.

4.1.3 Unterschiede im Verlauf

Bis zum Zeitpunkt 20 d gab es keine morphologischen Anzeichen für einen unterschiedlichen Differenzierungsverlauf zwischen den Zellen der SCZ-Linien. Die Zellen von P2-E zeigten ab 20 d an wenigen Stellen eine leicht veränderte Morphologie, die sich in den darauffolgenden Wochen zunehmend ausprägte. Es zeigt sich eine auffällige gleichmäßige Ausrichtung der Zellfortsätze (Abbildung 10A). Das lichtmikroskopische Bild erscheint sortierter. Dabei dominieren eher länglich ovale bis zylindrisch geformte Zellkörper. Die Zellen sind hauptsächlich bipolar (kleiner Pfeil Abbildung 10C). Multipolare und unipolare Neurone kommen ebenfalls vor. Nach der Passage an 40 d ist vorerst kein Unterschied zwischen den Zellen der SCZ-Linien auszumachen.

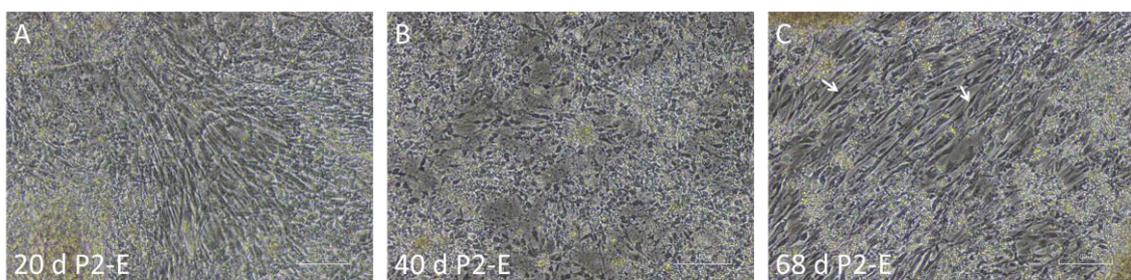


Abbildung 10: Differenzierung der Linie P2-E mit abweichender Morphologie. Die Linie P2-E zeigt im Verlauf eine abweichende Morphologie ab 20 d. Maßstab in Abbildung A - C entspricht 100 μm (rechts unten je Bild). **(A)** 20 d: Es liegt eine gleichmäßige Ausrichtung der Zellen vor **(B)** 40 d / 3 d nach Passage: Vorerst ist kein morphologischer Unterschied zu den Zellen der anderen SCZ-Linien ersichtlich. **(C)** 68 d: Es zeigen sich zum Zeitpunkt der Probenentnahme wieder gleichgerichtete, bipolare Zellen (Pfeil) in der Kultur.

Die Zellen sind auch bei P2-E direkt nach der Passage homogen im Well verteilt und zeigen, wie auch die Zellen der anderen Linien, die erneute Ausbildung eines Netzwerkes (Vgl. Abbildung 10B, Abbildung 9F). Ab 52 d macht die veränderte Morphologie den Großteil des Erscheinungsbildes in der Kultur aus und setzt sich bis zum Tag der Probenentnahme an 68 d fort (Abbildung 10C).

Die Zellen der Kontrollzelllinie KON1-B zeigten im Vergleich zu den Zellen der anderen Linien einen verlangsamten Differenzierungsverlauf. An 33 d zeigten die Zellen des KON1-B ein Erscheinungsbild, dass in etwa dem von 12 d – 20 d der anderen Zelllinien entsprach (Vgl. Abbildung 9B, Abbildung 11A). Es sind einige Neurone mit ovalen bis dreieckigen Zellkörpern zu finden, dessen sehr zaghafte Fortsätze erst beginnen, miteinander in Kontakt zu treten (Abbildung 11A). Die Dichte an Zellen hat in den letzten 30 d des Differenzierungsverlaufes abgenommen. Viele Zellen starben ab und lagerten sich als Zelldetritus ab. Im weiteren Verlauf zeigen sich Zellen von gänzlich abweichender Morphologie. Sie zeigen einen polygonalen Zellkörper mit rundem Zellkern und 1 – 2 kräftigen Nucleoli (Abbildung 11B Pfeil).

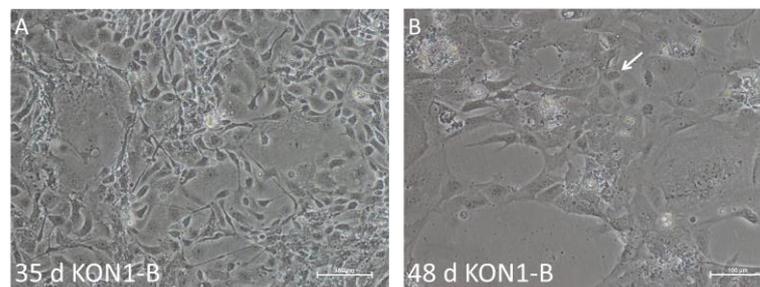


Abbildung 11: Differenzierung der Linie KON1-B mit abweichendem Verlauf. Maßstab in Abbildung A und B entspricht 100 μm (rechts unten je Bild). **(A)** 35 d: Das Erscheinungsbild der Zellen von KON1-B erinnert an die Zellen der übrigen Zelllinien zum Zeitpunkt 12 d **(B)** 48 d: Zellen zeigen polygonale Zellkörper mit rundem Zellkern (Pfeil). Es liegt eine deutliche morphologische Abweichung gegenüber den Zellen der übrigen Linien zu diesem Zeitpunkt vor. An diesem Tag wurde die Probe TD KON1-B generiert.

4.1.4 Abhängigkeit von der Zelldichte

Die TD aller Linien zeigten ab 68 d bis zu 85 d keine starken morphologischen Veränderungen. Die TD der SCZ-Linien P1-B, P1-F, P1-M, P2-E, P2-G und die TD der Kontrolle KON4-B wurden an 85 d erneut passagiert, in unterschiedlicher Zelldichte wieder ausgesät und 1 d später lichtmikroskopisch dokumentiert. Eine Abhängigkeit der Morphologie von der Zelldichte in der Kultur konnte an 86 d gezeigt werden. TD P1-B wurde am dünnsten ausgesät. In der Kultur sind sehr wenige Zellen enthalten, die morphologisch an Neurone erinnern. Größtenteils sind tote Zellkerne aufzufinden. Bereits an 92 d liegen keine Neurone mehr im Well vor (Abbildung 12 Reihe A). TD P2-G war ebenfalls recht dünn ausgesät, zeigte jedoch an 86 d viele Zellen mit

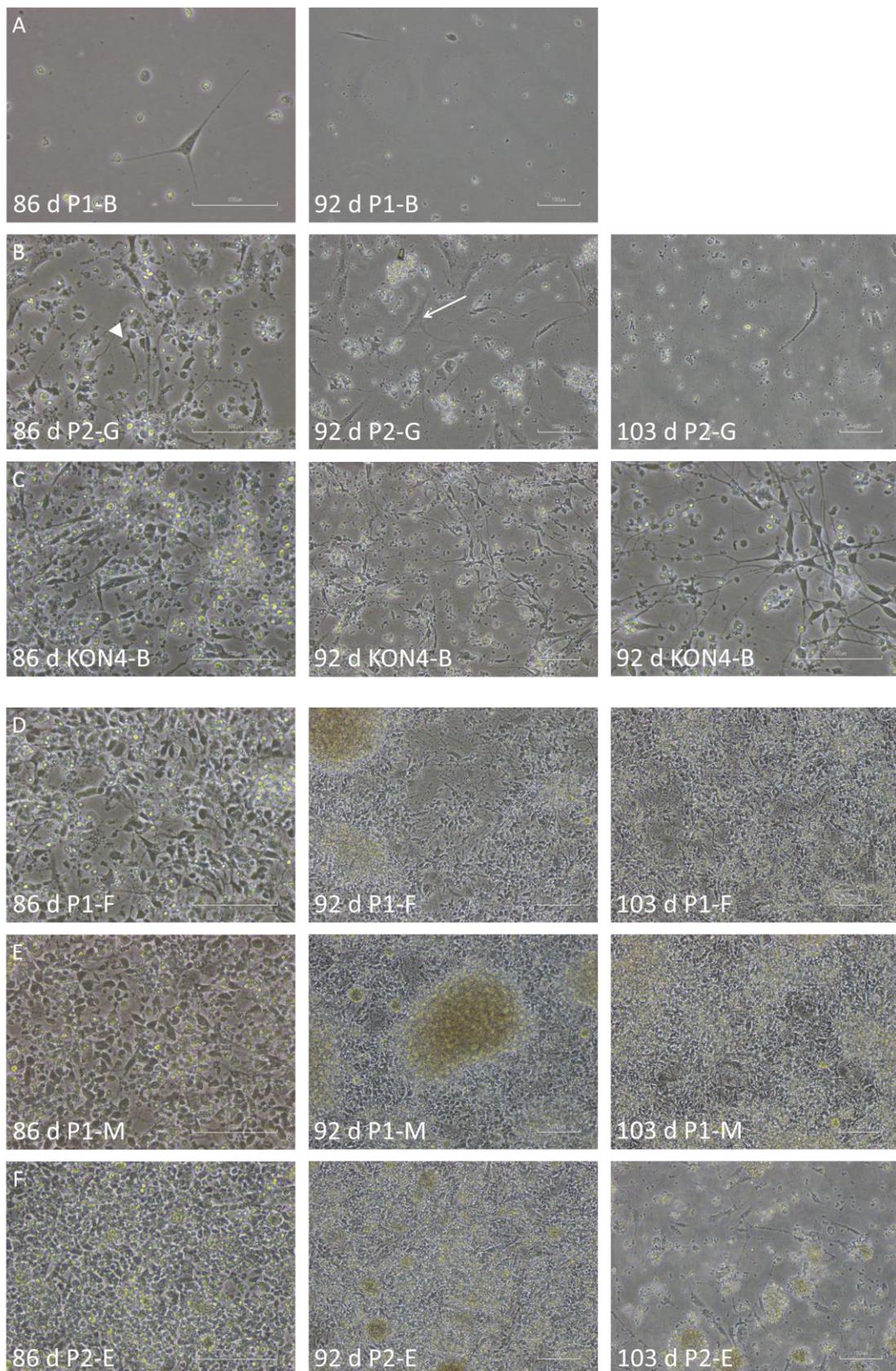


Abbildung 12: Morphologische Entwicklung in Abhängigkeit von der Zelldichte. Reihe A mit niedrigster Zelldichte nach Passage, Reihe F mit höchster Zelldichte. Die Abbildungen zeigen, dass die morphologische Entwicklung der Neurone von der Zelldichte abhängig ist. Maßstab entspricht 100 µm (rechts unten je Bild). **(A)** TD P1-B **(B)** TD P2-G **(C)** TD KON4-B **(D)** TD P1-F **(E)** TD P1-M **(F)** TD P2-E.

charakteristischen morphologischen Kriterien für Neurone. Zellen mit pyramidalem Zellkörper sind vorhanden. Sie bilden nicht viele Kontakte zu anderen Zellen aus. Das erinnert an das Erscheinungsbild eines recht unreifen Stadiums zwischen 12 d – 20 d. An 92 d sind kaum noch Neurone aufzufinden. Das Bild erinnert an die Differenzierung von KON1-B mit ähnlichen nicht-neuronalen Zellen in der Kultur. An 103 d liegen keine reifen Neurone mehr vor (Abbildung 12 Reihe B).

TD KON4-B wurde nur bis 92 d beobachtet. Die ausgesäte Zelldichte hat ausgereicht, um ein neuronales Netzwerk aufzubauen (Abbildung 12 Reihe C). TD P1-F besitzt bereits 1 d nach der Passage ein kräftiges und stark verzweigtes neuronales Netzwerk. An 92 d zeigt sich in der Kultur wieder die typische Anhäufung der Zellkerne und die lichter Stellen, die durch die Zellfortsätze geprägt sind (Abbildung 12 Reihe D). TD P1-M zeigt eine vergleichbare Entwicklung mit höheren Zellzahlen (Abbildung 12 Reihe E). TD P2-E besitzt die höchste Zelldichte, zeigte jedoch bereits zuvor in der Differenzierung morphologische Auffälligkeiten. An 92 d sind trotz vieler vorkommender Zellen nur sehr wenig neuronale Verbindungen auszumachen. Dieses Bild setzte sich auch an den lichter Rändern der Kultur fort. An 103 d waren kaum noch Zellen im Well vorzufinden und die wenigsten zeigten neuronale Ausläufer (Abbildung 12 Reihe F).

4.2 Transkriptionsanalysen synaptischer Marker

Die TD der SCZ-Linien und Kontrollzelllinien wurden mithilfe der semiquantitativen PCR auf die Transkription der RNA synaptischer Proteine untersucht. Als Positivkontrolle wurde *human total brain* mitgeführt. Die Transkripte zu *synaptotagmin 1* (SYT1) und *vesicle associated membrane protein 2* (VAMP2) werden in allen Linien der TD exprimiert (Abbildung 13). Als Referenz wurde die Transkription von GAPDH untersucht und ist ebenfalls in allen Linien nachweisbar.

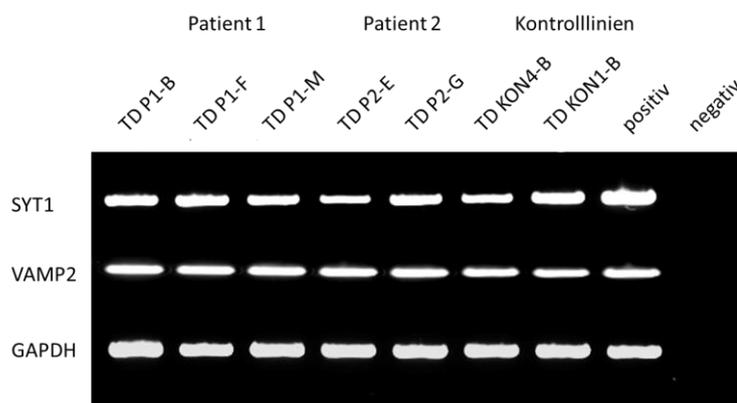


Abbildung 13: Transkription synaptischer Marker. Die Abbildung zeigt, dass die TD aller Linien die synaptischen Marker SYT1 und VAMP2 transkribieren. GAPDH wurde als Referenz mitbestimmt.

4.3 Expressionsanalyse von TUBB3

Mittels Immunfluoreszenzanalyse wurde die Expression des neuronalen Proteins TUBB3 in allen Linien der TD 68 d untersucht. Abbildung 14 zeigt das Protein TUBB3 besonders in den Axonen der Neurone.

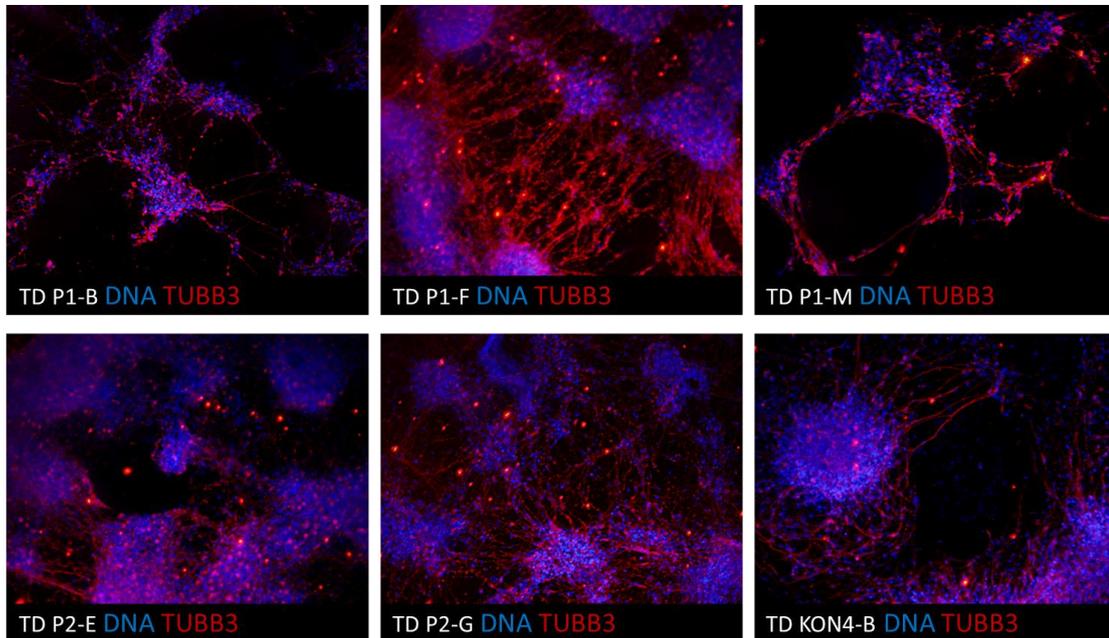


Abbildung 14: Expressionsanalyse von TUBB3 mittels Immunfluoreszenz. DNA ist in blau und das Protein TUBB3 in rot dargestellt. TUBB3 ist in den TD aller Linien vor allem in den Zellfortsätzen exprimiert.

4.4 Transkriptionsanalysen molekularer Marker für IN

Die TD von 68 d wurden auf die Transkription spezifischer IN-Marker untersucht. Durchgeführt wurde eine quantitative *real time* PCR. Es erfolgte eine 3-fach Bestimmung je Probe. Untersucht wurde sowohl die Transkription der entwicklungsrelevanten Gene ASCL1, DLX1, DLX2, LHX6, NKX2.1, SHH, OLIG2, CXCR4, SP8, COUPTF1, PROX1 als auch die IN-Subtypenmarker PVALB, SST, CALB1, CALB2, NPY und RELN. Die TD der SCZ-Linien werden mit den TD der Kontrollzelllinie KON4-B verglichen und in ein Verhältnis gesetzt, bei dem TD KON4-B immer 1 beziehungsweise 100 % entspricht. Wenn im Wortlaut nicht konkret anders beschrieben, nehmen die relativen Wertangaben Bezug auf die Kontrollzelllinie TD KON4-B.

4.4.1 Vergleich der Patienten 1 und 2

Die Transkription bestimmter IN-Marker in TD wurde im Vergleich zwischen Patient 1 und Patient 2 untersucht. Dabei stehen für Patient 1 drei biologische Replikate (TD P1-B, TD P1-F, TD P1-M) und für Patient 2 zwei biologische Replikate (TD P2-E, TD P2-G) zur Verfügung (Tabelle 2). Mithilfe eines einfachen t-tests wurde die unterschiedliche Transkription desselben Gens zwischen den Patienten auf Signifikanz geprüft.

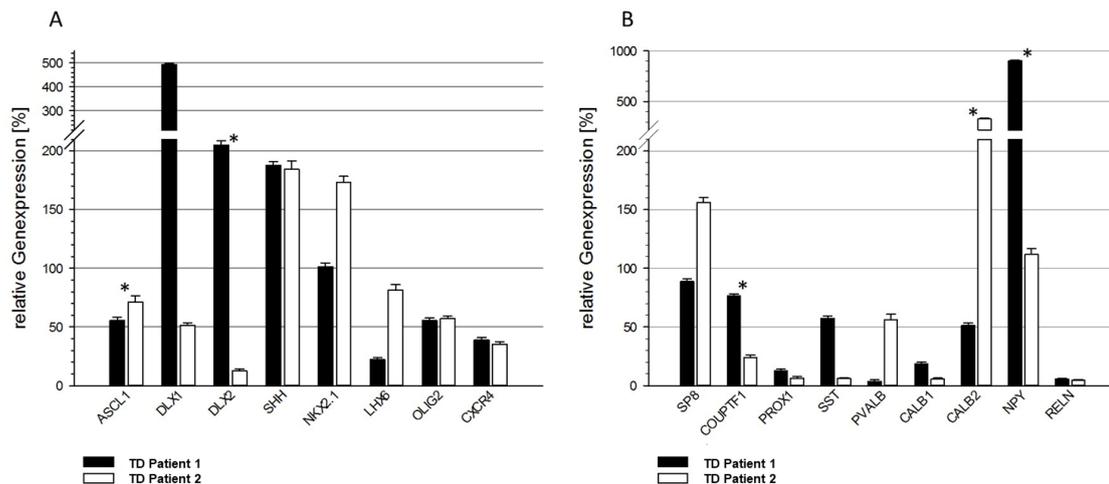


Abbildung 15: Transkription von IN-Markern im Vergleich TD Patient 1 und TD Patient 2. Dargestellt wurden die Werte in Prozent relativ zur Transkription desselben Gens in TD KON4-B. Normalisiert wurde gegen das Referenzgen GAPDH. **(A)** zeigt Transkriptionsfaktoren aller GE und des MGE. **(B)** zeigt Transkriptionsfaktoren des CGE und IN-Subtypenmarker.

Keines der untersuchten Gene entspricht in seiner Transkription die der Kontrollzelllinie TD KON4-B (Abbildung 15). Die **ASCL1**-Transkription zeigt in den TD beider Patienten eine Verringerung um etwa 30 - 45 % im Vergleich zu TD KON4-B (Abbildung 15). Unter den TD der Patienten ist ein signifikanter Unterschied festzustellen. TD Patient 2 weist eine um 28 % stärkere ASCL1-Transkription gegenüber TD Patient 1 auf (Abbildung 21 Anlagen). Die **DLX1**-Transkription unterscheidet sich deutlich zwischen TD Patient 1 und TD Patient 2. Die DLX1-Transkription ist in TD Patient 1 fünffach erhöht, in TD Patient 2 um die Hälfte gegenüber TD KON4-B reduziert (Abbildung 15). In der Analyse der einzelnen TD der SCZ-Linien ist diese Tendenz ebenfalls zu erkennen. Die DLX1-Transkription in den Replikaten aus TD Patient 1 entspricht etwa $\geq 150\%$ von TD KON4-B. Die DLX1-Transkription in den Replikaten aus TD Patient 2 zeigen eine Reduktion um etwa 50 % (Abbildung 16). Die **DLX2**-Transkription unterscheidet sich signifikant zwischen TD Patient 1 und TD Patient 2. TD Patient 1 zeigt eine 93% stärkere DLX2-Transkription als TD Patient 2 (Abbildung 21 Anlagen). Ähnlichkeiten zum Transkriptionsmuster von DLX1 zeigen sich darin, dass TD Patient 1 deutlich mehr DLX2 transkribiert als TD KON4-B und TD Patient 2 mit 13 % deutlich unterhalb des Transkriptionslevels in TD KON4-B liegt (Abbildung 15).

Die **LHX6**-Transkription liegt für beide Patienten unterhalb des Transkriptionslevels in TD KON4-B. Dabei zeigt TD Patient 1 eine deutliche Reduktion von 78 % im Vergleich zu TD KON4-B. Die LHX6-Transkription ist in TD Patient 2 um 19 % geringer und zeigt demnach eine höhere Transkriptionsrate als TD Patient 1 (Abbildung 15). Die **NKX2.1**-Transkription ist ebenfalls unterschiedlich zwischen den Patienten. TD Patient 1

zeigt eine nahezu gleichwertige Transkription wie TD KON4-B. Die in TD Patient 2 entspricht etwa dem 1,7 -fachen (Abbildung 15). Für **OLIG2** (55 - 57 %) und **SHH** (185 - 188 %) scheint eine ähnliche Transkription in den TD beider Patienten vorzuliegen (Abbildung 15). Dennoch ist die Transkription für OLIG2, SHH und NKX2.1 innerhalb der TD der einzelnen Patienten zwischen den Replikaten sehr unterschiedlich. Die **CXCR4**-Transkription ist in TD beider Patienten auf etwa einem Niveau und liegt um die 35 - 40 % (Abbildung 15).

Die **SP8**-Transkription unterscheidet sich deutlich zwischen den TD der Patienten. TD Patient 1 zeigt mit etwa 90 % eine nahe bei TD KON4-B liegende Transkription. TD Patient 2 transkribiert 55 % mehr als TD KON4-B (Abbildung 15). Die **COUPTF1**-Transkription unterscheidet sich signifikant zwischen den TD der Patienten. TD Patient 1 transkribiert über das dreifache an COUPTF1 als TD Patient 2 (Abbildung 21 Anlagen). Dabei liegt das COUPTF1-Transkriptionslevel der TD beider Patienten unterhalb des COUPTF1-Transkriptionslevels in TD KON4-B. TD Patient 1 erreicht 76 % und TD Patient 2 liegt bei 23 % (Abbildung 15). Die **PROX1**-Transkription ist in den TD beider Patienten deutlich herunterreguliert und weist dadurch eine Gemeinsamkeit zwischen den Patienten auf. Sie entspricht in etwa 12 % für TD Patient 1 und 6 % für TD Patient 2 (Abbildung 15).

Zwischen TD Patient 1 und TD Patient 2 liegt ein gegensätzliches Transkriptionsverhalten von **PVALB** und **SST** vor. Die Transkription von PVALB ist in TD Patient 1 deutlich reduziert und entspricht 3,7 % der PVALB-Transkription in TD KON4-B. In TD Patient 2 liegt die PVALB-Transkription bei 56 %. Die SST-Transkription zeigt ebenfalls Unterschiede zwischen den TD beider Patienten. Die SST-Transkription in TD Patient 1 liegt bei 57 % und damit deutlich über der SST-Transkription in TD Patient 2 (6 %) (Abbildung 15).

Die **CALB1**-Transkription zeigt sich in den TD beider Patienten deutlich reduziert, dabei transkribiert TD Patient 1 mit 18 % mehr als TD Patient 2 mit 5,5 %. Ein signifikanter Unterschied ist in der **CALB2**-Transkription zwischen den TD beider Patienten zu erkennen. Die Transkription ist in TD Patient 2 deutlich erhöht und beträgt das 6,4 -fache der Transkription in TD Patient 1 (Abbildung 21 Anlagen). Außerdem ist zu beobachten, dass TD Patient 1 etwa um die Hälfte weniger CALB2 transkribiert als TD KON4-B. TD Patient 2 zeigt im Vergleich zu TD KON4-B eine sehr stark erhöhte Transkription um 328 %. Die Transkription von **NPY** weist ebenfalls einen signifikanten Unterschied zwischen den TD beider Patienten auf. TD Patient 1 weist eine

Transkriptionsrate von 111 % auf und liegt damit auf einem ähnlichen Transkriptionsniveau wie TD KON4-B. Die NPY-Transkription ist in TD Patient 2 mit 901 % neunfach höher. Die **RELN**-Transkription ist hingegen in beiden Patienten einheitlich gering und liegt bei 4,5 - 5,5 % (Abbildung 15).

Die Gene DLX1, DLX2, SHH, NKX2.1, CALB2 und NPY sind in mindestens einem der beiden Patienten besonders stark ($\geq 150\%$) transkribiert. Dem gegenüber zeigen DLX2, LHX6, PVALB, SST, CALB1 und RELN besonders verringerte Transkriptionsraten ($\leq 50\%$) im Vergleich zur Kontrollzelllinie TD KON4-B. Diese Gene bedürfen einer ausführlicheren Betrachtung.

4.4.2 Analyse der einzelnen Linien der Patienten und der Kontrolle in TD

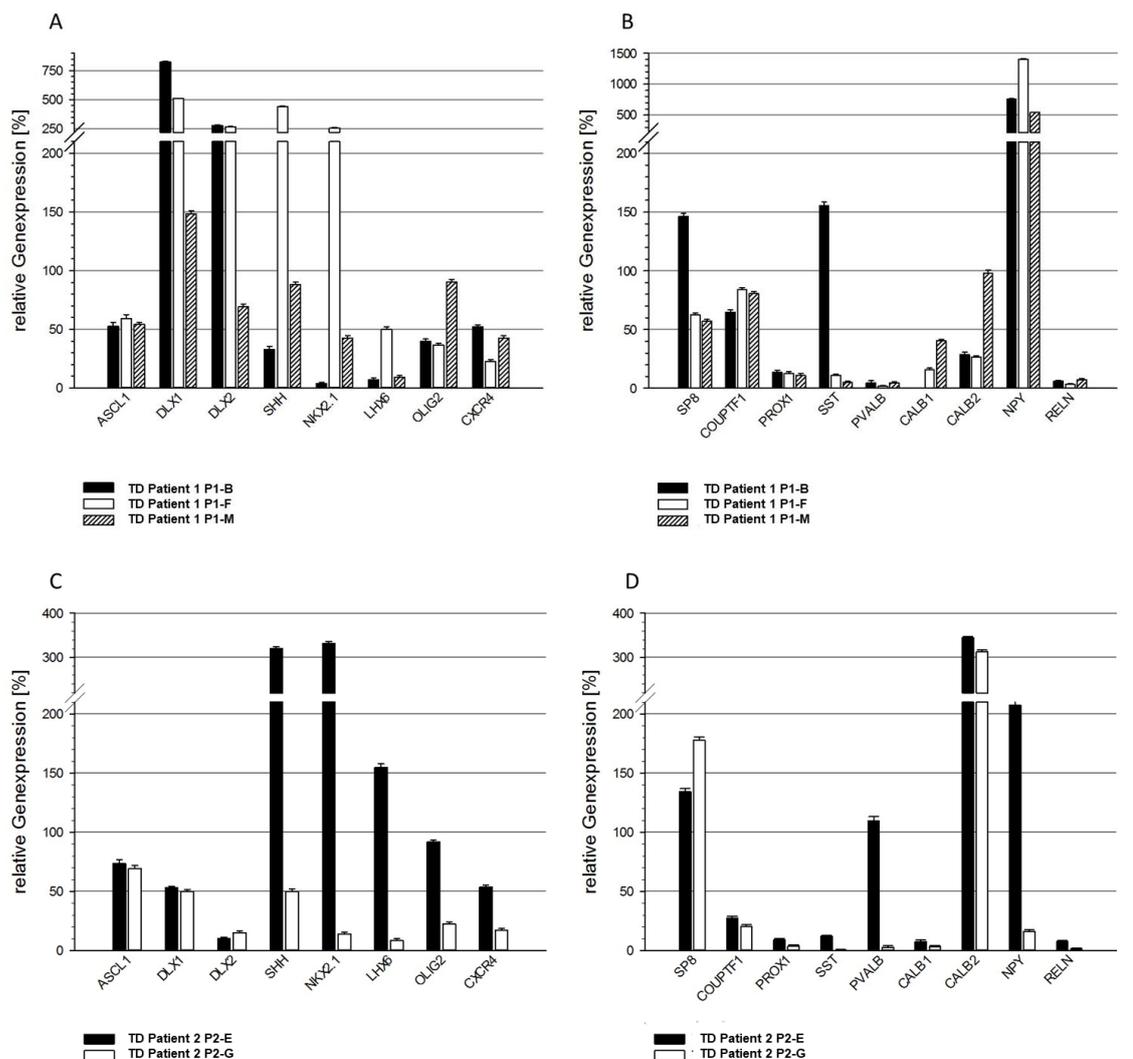


Abbildung 16: Transkription von IN-Markern in den einzelnen Replikaten der TD der Patienten. Dargestellt wurden die Werte in Prozent relativ zur Transkription desselben Gens in TD KON4-B. Normalisiert wurde gegen das Referenzgen GAPDH. **(A, B)** zeigt die Replikate des TD Patient 1 **(C, D)** zeigt die Replikate des TD Patient 2.

Die Transkription von **DLX1** unterscheidet sich zwischen den einzelnen SCZ-Linien. In der Betrachtung der einzelnen Linien ist der patientenabhängige Unterschied deutlich zu sehen. In TD P1-B und TD P1-F liegt die DLX1-Transkription bei dem 5 – 8,2 -fachen von TD KON4-B. TD P1-M steigt auf einen Wert von 148 % und die Linien TD P2-E und TD P2-G zeigen eine etwa um die Hälfte verringerte DLX1-Transkription (Abbildung 16A, C). Die **DLX2**-Transkription zeigt große Unterschiede bei der Betrachtung aller Linien. Das Transkriptionslevel in TD P1-B und TD P1-F ist etwa das 2,5 -fache im Vergleich zur Kontrollzelllinie TD KON4-B. TD P1-M, TD P2-E und TD P2-G liegen unterhalb des Transkriptionslevels in TD KON4-B. TD P1-M liegt etwa bei 69 % und TD P2-E und TD P2-G befinden sich auf einem Niveau von 10 – 15 %. Dennoch ist zu erkennen, dass die Replikate des TD Patient 1 mehr DLX2 transkribieren (≥ 50 %) als die Replikate des TD Patient 2 (≤ 25 %) (Abbildung 16A, C).

Bei genauer Untersuchung der einzelnen Linien zeigt sich im Gegensatz zu DLX1 und DLX2 kein einheitliches patientenabhängiges Transkriptionsmuster für **SHH**. Sowohl innerhalb des TD Patient 1 als auch TD Patient 2 zeigt die SHH-Transkription große Abweichungen. TD P1-F und TD P2-E zeigen die stärkste SHH-Transkription und liegen bei dem 3,2 – 4,4 -fachen Transkriptionsniveau im Vergleich zu TD KON4-B. TD P1-M kommt mit 88 % dem der TD KON4-B nahe. TD P2-G und TD P1-B zeigen eine deutliche Verringerung der SHH-Transkription um 30 – 50 % im Vergleich zu TD KON4-B (Abbildung 16A, C). Die **NKX2.1**-Transkription ist ähnlich der SHH-Transkription. Sie ist in TD P1-F und TD P2-E am stärksten ausgeprägt und ist um das 2,5 – 3,3 -fache höher als in TD KON4-B. Eine verringerte NKX2.1-Transkription zeigen TD P1-M (42 %) TD P2-G (14 %) und TD P1-B (3,5 %) (Abbildung 16A, C). Die **LHX6**-Transkription folgt einem ähnlichen Muster. Die SCZ-Linien TD P2-E und TD P1-F zeigen erneut die stärkste Transkription des Gens. TD P2-E übersteigt um 54 % die Transkription von TD KON4-B. In allen anderen Linien fällt die LHX6-Transkription deutlich geringer aus. Die Transkription in TD P1-F ist in Bezug auf TD KON4-B nur halb so stark ausgeprägt. TD P1-B, TD P1-M und TD P2-G liegen bei 7 - 9 % (Abbildung 16A, C). Die SCZ-Linien transkribieren einheitlich weniger **OLIG2** als TD KON4-B. Hier ist keine deutliche patientenabhängige Transkription zu erkennen. TD P1-M und TD P2-E liegen mit 90 % relativ nahe am Transkriptionsniveau der TD KON4-B. TD P1-B, TD P1-F und TD P2-G zeigen eine 60-78 % geringere OLIG2-Transkription (Abbildung 16).

TD P2-E zeigt als einzige SCZ-Linie eine deutliche **PVALB**-Transkription (Abbildung 16). Diese ist im Vergleich zu TD KON4-B um 9 % erhöht. Die Linien TD P1-F, TD P2-G, TD P1-B und TD P1-M zeigen im Vergleich eine sehr geringe

PVALB-Transkription von 1,8 - 5 % (Abbildung 16B, D). Die Linien TD P1-B, TD P1-F, TD P1-M und TD P2-G weisen eine geringe PVALB-Transkription von 2 - 5 % auf und zeigen zugleich eine LHX6-Transkription von unter 50 %. TD P2-E zeigt als einzige Linie eine PVALB-Transkription von ≥ 100 %. Diese weist ebenfalls als einzige Linie eine LHX6-Transkription von ≥ 100 % auf (Abbildung 16 B, D). Die **SST**-Transkription ist in den TD bei TD P1-B am höchsten ausgeprägt und überschreitet um 55 % die des TD KON4-B. Ansonsten zeigen die Linien TD P1-M, TD P1-F und TD P2-E eine geringe SST-Transkription von 5 - 11 %. TD P2-G zeigt eine noch geringere SST-Transkription von 0,3 %. TD P1-B zeigt als einzige Linie eine nennenswerte SST-Transkription (150 %) (Abbildung 16B, D).

CALB1 ist in den TD unterschiedlich ausgeprägt, jedoch transkribieren alle SCZ-Linien weniger CALB1 als TD KON4-B. Die höchste CALB1-Transkription liegt in TD P1-M mit 40 % vor. TD P2-G, TD P2-E und TD P1-F weisen eine Transkriptionsrate zwischen 7 - 16 % auf (Abbildung 16B, D). Der patientenspezifische Unterschied in der **CALB2**-Transkription kann durch die Betrachtung der einzelnen Linien bestätigt werden. TD P2-G und TD P2-E weisen mit dem 3,1 - 3,4 -Fachen von TD KON4-B eindeutig die stärkste CALB2-Transkription auf. TD P1-M transkribiert etwa genauso viel CALB2 wie TD KON4-B. TD P1-F und TD P1-B weisen Transkriptionsraten von 26-29 % auf und zeigen damit die geringste CALB2-Transkription unter den TD (Abbildung 16B, D). In den Linien TD P1-B und TD P1-F kann gezeigt werden, dass eine sehr hohe DLX1- und DLX2-Transkription (> 200 %) vorliegt, bei gleichzeitig sehr gering transkribierten CALB2 (25 – 30 %). TD P1-M zeigt eine DLX1- und DLX2-Transkription zwischen 70 – 150 %, die CALB2-Transkription liegt bei 100 %, ebenfalls nahe dem in TD KON4-B. In TD P2-E und TD P2-G liegt die DLX1- und DLX2-Transkription zwischen 15 – 55 %, die CALB2-Transkription ist bei diesen Linien > 200 % (Abbildung 16A, B, C, D).

Ein patientenabhängiger Effekt ist für die **NPY**-Transkription nicht klar zu erkennen. Die NPY-Transkription ist in den Linien TD P1-B und TD P1-F am stärksten ausgeprägt und beträgt etwa das 7 – 14 -Fache der in TD KON4-B. Ebenfalls transkribiert TD P1-M mit 500 % weitaus mehr NPY als TD KON4-B. TD P2-E weist zweifache Transkription im Vergleich zu TD KON4-B auf. Als einzige Linie zeigt TD P2-G eine deutlich verringerte NPY-Transkription mit 16 % (Abbildung 16B, D). Die **RELN**-Transkription zeigt in den TD ein anderes Muster wie NPY. TD KON4-B zeigt eindeutig die stärkste RELN-Transkription. Die RELN-Transkription der TD der SCZ-Linien ist sehr stark

vermindert im Vergleich zu der in TD KON4-B und liegt zwischen 1,4 – 8 % (Abbildung 16B, D).

4.5 Stoffwechselanalysen

4.5.1 Glycolytic Rate Assay

Mithilfe des *Seahorse Flux Analyzers* wurde der *Glycolytic Rate Assay* an den Zellen der OL-Linie MO3.13 und den TD der SCZ-Linien durchgeführt. Die Messung wird an den Zellen der OL vorgenommen, um die Methode zu etablieren und die geeignete Zellzahl zu bestimmen. Der *Glycolytic Rate Assay* wurde an den OL in drei Gruppen durchgeführt. OL Gruppe 1 enthält 15.000 Zellen je Well, OL Gruppe 2 20.000 Zellen je Well und OL Gruppe 3 enthält 30.000 Zellen je Well. Der Versuch wurde einmal durchgeführt. 14 Replikate stehen der OL Gruppe 1 und je 16 Replikate den OL Gruppen 2 und 3 zur Verfügung in Form von Wells. OL Gruppe 3 zeigt die höchste basale Glykolyse von allen drei Gruppen. Diese ist 2,6 -fach höher als in OL Gruppe 1 mit der geringsten Zellzahl. Ebenso weist OL Gruppe 3 die größte kompensatorische Glykolyse mit 640 % auf (Abbildung 17).

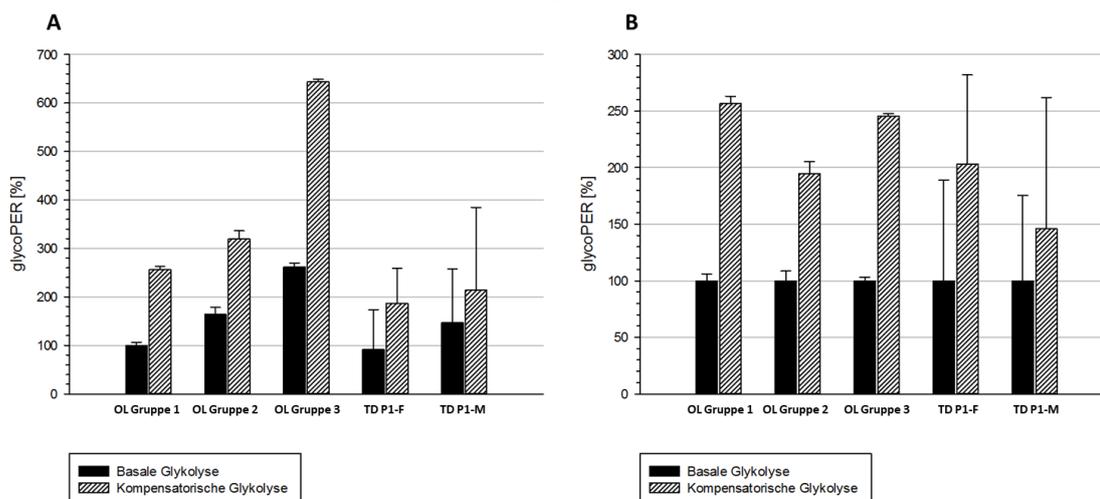


Abbildung 17: Glycolytic-Rate-Assay. Vergleich TD der SCZ-Linien mit MO13.3. (A) Die absoluten glycoPER-Werte sind in einem Verhältnis zueinander gesetzt, bei dem die basale Glykolyse der OL Gruppe 1 = 100 % ist. **(B)** Die absoluten glycoPER-Werte einer Zellgruppe sind in einem Verhältnis zueinander gesetzt, bei dem die basale Glykolyse der jeweiligen Zellgruppe = 100 % ist. Angegeben ist der Standardfehler berechnet durch die Software WAVE von Agilent.

Diese Überlegenheit den OL Gruppen 1 und 2 gegenüber zeigt OL Gruppe 3 bereits während der Betrachtung des glycoPER zu allen Messzeitpunkten. Zum einen ist die höchste Basalrate bei Betrachtung des glycoPER in OL Gruppe 3 ersichtlich (Abbildung 22 Anlagen), zum anderen zeigt OL Gruppe 3 nach Zugabe von Rot/AA den steilsten Anstieg des glycoPER um 684,1 pmol / min. Da durch das Rot/AA die Elektronentransportkette gehemmt wurde, steigt die Glykolyse. Damit steigt auch die

extrazelluläre Azidifizierung gemessen in ECAR und glycoPER. Die Reaktionen der OL Gruppen 1 und 2 fielen deutlich geringer aus und zeigen Veränderungen von etwa 280 pmol / min. Ebenso ist auch die Veränderung, die durch Zugabe von 2-DG verursacht wird, in OL Gruppe 3 am deutlichsten zu erkennen. Der glycoPER fällt um 740 pmol / min (Abbildung 22 Anlagen).

Der *Glycolytic Rate Assay* wurde ebenfalls an den TD der SCZ-Linien durchgeführt. Untersucht wurden die TD P1-F und TD P1-M von Patient 1 an 113 d. Ausgesät wurden 100.000 Zellen je Well. Es stehen pro Linie drei Replikate in Form von Wells zur Verfügung. Der Versuch wurde einmal durchgeführt. Die basale Glykolyse des TD P1-F ist mit 92 % der basalen Glykolyse der OL Gruppe 1 recht ähnlich. TD P1-M zeigt mit 147 % eine basale Glykolyse, die näher an OL Gruppe 2 reicht. Die TD beider SCZ-Linien weisen eine deutlich geringere kompensatorische Glykolyse als OL Gruppe 1 auf. Die Werte liegen dabei für TD P1-F bei 187 % und für TD P1-M bei 214 % (Abbildung 17). Wird die kompensatorische Glykolyse jeweils im Verhältnis zur basalen Glykolyse derselben Zellgruppe betrachtet, zeigt sich deutlich, dass die Zellen der OL ihre Glykolyse um das 2 – 2,5 -Fache steigern können, während die TD der SCZ-Linien ihre Glykolyse lediglich um das 1,5 – 2 -Fache ihrer basalen Glykolyse steigern (Abbildung 17). Dieses Verhalten ist auch bei der Betrachtung der absoluten Werte der ECAR und des glycoPER im Verlauf deutlich zu sehen. Im Vergleich zu den OL zeigen die TD der SCZ-Linien nur eine geringe Steigerung des glycoPER nach Zugabe von Rot/AA. TD P1-F zeigt eine Steigerung des glycoPERs von 170 pmol / min und TD P1-M weist eine Erhöhung um 120,8 pmol / min nach Zugabe von Rot/AA auf (Abbildung 23 Anlagen). Ein deutlicher Abfall des glycoPERs ist nach Zugabe von 2-DG in den TD beider Linien zu erkennen (Abbildung 23 Anlagen).

4.5.2 Mito-Stress-Test

Die folgenden Daten wurden durch die Arbeitsgruppe zur Verfügung gestellt und wurden im Rahmen dieser Arbeit analysiert. Der Mito-Stress-Test wurde an den TD P1-M, TD P2-G und der Kontrollzelllinie TD KON4-B an 90 d der Differenzierung durchgeführt. Pro Zelllinie wurden zwei Replikate in Form von Wells gemessen. Es zeigt sich eindeutig, dass die TD der SCZ-Linien in allen untersuchten Parametern mitochondrialer Atmung deutlich unterhalb der basalen Respiration von TD KON4-B liegen. Dabei zeigen sich zwischen den TD beider Patienten in der basalen Respirationsrate kaum Unterschiede, jedoch eine deutliche Reduktion gegenüber der basalen Respiration von TD KON4-B. TD P1-M weist eine um 53 % verminderte und TD P2-E eine um 57% verminderte basale Respiration im Vergleich zu TD KON4-B auf (Abbildung 18).

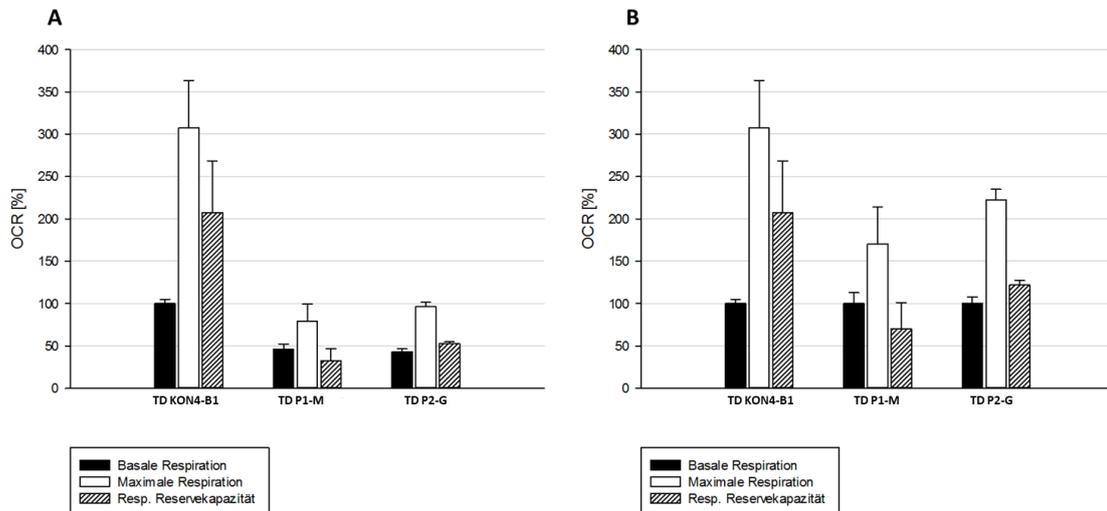


Abbildung 18: Mito-Stress-Test. Vergleich der TD der SCZ-Linien mit TD KON4-B. (A) Die absoluten OCR-Werte wurden in ein Verhältnis zueinander gesetzt, bei dem die basale Respiration der TD KON4-B = 100 % ist. **(B)** Die absoluten OCR-Werte einer Zelllinie wurden in ein Verhältnis gesetzt, bei dem die basale Respiration der jeweiligen Zelllinie = 100 % ist.

Die maximale Respiration der TD der SCZ-Linien ist nicht nur geringer als die basale Respiration von TD KON4-B, sondern weist auch Unterschiede im Verhältnis zu ihrer eigenen basalen Respiration auf. TD KON4-B zeigt eine maximale Respiration, die dreifach so hoch ist wie die eigene basale Respiration. TD P1-M und TD P2-E zeigen nicht solche starken Steigerungsfähigkeiten der mitochondrialen Atmung. In TD P1-M liegt die maximale Respiration bei dem 1,7 -Fachen der eigenen basalen Respiration. In TD P2-E liegt die maximale Respiration bei dem 2,2 -Fachen der eigenen basalen Respiration (Abbildung 18). Ähnlich verhält es sich für die respiratorische Reservekapazität. Die respiratorische Reservekapazität der TD KON4-B ist zweifach größer als die eigene basale Respiration. Bei TD P1-M ist zu beobachten, dass die respiratorische Reservekapazität mit 70 % unterhalb der eigenen basalen Respiration liegt. Für TD P2-E konnte eine 1,2 -fach erhöhte respiratorische Reservekapazität im Vergleich zur eigenen basalen Respiration detektiert werden (Abbildung 18).

5 Diskussion

5.1 Charakterisierung der aus iPSC gewonnenen Neurone

Die in dieser Arbeit beschriebenen Ergebnisse zeigen, dass die verwendeten iPSC zu reifen Neuronen differenziert wurden. Das konnte unter anderem mit dem Vorhandensein bestimmter neuronaler Marker gezeigt werden. VAMP2 stellt einen Teil des sogenannten *soluble N-ethylmaleimide-sensitive-factor attachment receptor* Komplexes dar und erfüllt seine Funktion in der Fusion der synaptischen Vesikel und der Freigabe des Neurotransmitters in den synaptischen Spalt [77]. SYT1 fungiert als Calcium-Sensor und ermöglicht eine schnelle Transmitterfreigabe [78]. Demnach charakterisieren VAMP2 und SYT1 die Zellen als Neurone. Die Expression von TUBB3 ist ein weiterer Marker für Neurone. TUBB3 wird für die Bildung der Mikrotubuli benötigt und unterstützt die Proliferation, Migration und laminare Organisation der Neurone [79].

5.2 IN

IN zeigen eine starke Vielfalt und haben dabei einen verhältnismäßig geringen Anteil unter den Neuronen im menschlichen Kortex. Aufgrund dieser Eigenschaften ist es eine Herausforderung die IN und deren Rolle im Organismus zu untersuchen [31]. Dennoch ist es notwendig, sich dieser komplexen Thematik zu widmen, denn es gibt immer mehr Belege dafür, dass Erkrankungen wie SCZ, bipolare Störung, schwere Depression und Epilepsie ihren Ursprung in der fehlerhaften Entwicklung von kortikalen IN haben. Einschränkungen in Proliferation, Differenzierung, Reifung und Migration der kortikalen IN führen zu Defiziten in der GABAergen Neurotransmission [80]. Besonders die PVALB-positiven kortikalen IN nehmen eine Schlüsselfunktion dabei ein [35]. Es konnte bereits gezeigt werden, dass SCZ-Patienten während der Ausübung kognitiver Leistungen veränderte Aktivitäten im dorsolateralen präfrontalen Kortex (DLPFC) und eine geringere Stärke der Gamma-Oszillationen aufweisen [81,82]. Das lässt die Vermutung zu, dass bei der SCZ eine gestörte GABAerge Neurotransmission die veränderten Gamma-Oszillationen verursacht und die kognitiven Einschränkungen hervorruft [35,83]. In einem *in vitro*-Modell konnte bereits gezeigt werden, dass eine gestörte GABAerge Transmission zu geringeren Gamma-Oszillationen führt [84].

Es wird noch ein zweiter Erklärungsansatz für die Beeinträchtigung der Gamma-Oszillationen bei der SCZ verfolgt, denn es gibt ebenfalls Belege für eine gestörte glutamaterge Neurotransmission. Eine verminderte exzitatorische Reizübertragung von PZ an kortikale IN wird derzeit diskutiert [36]. Da Neurexin 1 für die

synaptische Kopplung glutamaterger und GABAerger Neurone unentbehrlich ist, ist es durchaus möglich, dass heterozygote Deletionen in NRXN1 einen entscheidenden Einfluss auf die Neurotransmission haben können. Ein Funktionsverlust von NRXN1 könnte die Abnahme der Gamma-Oszillationen bei SCZ-Erkrankten begünstigen.

5.3 Ergebnisse im Kontext mit NRXN1

Diese Arbeit zeigt, dass die Transkription der IN-Marker zwischen den Patienten sehr unterschiedlich ausgeprägt ist. Eine veränderte Expression der IN-Marker ist bereits mehrfach im Zusammenhang mit der SCZ beschrieben worden. Inwiefern eine heterozygote Deletion in NRXN1 auf die veränderte Expression der TF der IN-Entwicklung zurückzuführen ist, wurde bisher noch nicht konkret untersucht. Mehrere publizierte Arbeiten zeigen, dass die Expression von NRXN1 für die Ausbildung funktionaler inhibitorischer Synapsen im Kortex von Vertebraten notwendig ist [85–87].

Ein *knock-out* Mausmodell zeigt, die Deletion der Gene NRXN1, NRXN2 und NRXN3 in IN hat Auswirkung auf die synaptische Übertragung von IN auf PZ der Lamina 5. Diese Auswirkung hängt jedoch vom jeweiligen betroffenen Zelltyp ab [87]. Eine Deletion aller NRXN-Gene in PVALB-positiven IN zeigte eine Verringerung der Synapsen um 50 %. Die Anzahl der Zellen, die miteinander in Verbindung stehen, bleibt dabei unverändert. Bei SST-positiven IN verhält es sich umgekehrt. Bei einer Deletion aller NRXN-Gene zeigen sich bei SST-positiven IN keine Veränderungen in der Anzahl der Synapsen pro Zelle, jedoch treten weniger SST-positive IN mit PZ in Kontakt. Das zeigt eindeutig, welche unentbehrliche Funktion Neurexine in der Ausbildung leistungsfähiger Neuronen-Kontakte einnehmen. Das benannte Modell erklärt dabei jedoch nicht, welche unterschiedlichen Funktionen die einzelnen Gene NRXN1, NRXN2 und NRXN3 übernehmen [87].

In einer weiteren Arbeit wurden aus humanen embryonalen Stammzellen, die eine heterozygote Genvariation von α - und β -NRXN1 trugen, Neurone generiert [88]. Bei diesen generierten Neuronen war die synaptische Übertragung von Signalen beeinträchtigt. Die Anzahl an Synapsen ist dabei nicht verändert. Es zeigt sich eine geringere Freigabe von Neurotransmittern in den synaptischen Spalt [88]. Da GABAerge IN während ihrer Entwicklung auf die Präsenz exzitatorischer Reize angewiesen sind, ist anzunehmen, dass ein Funktionsverlust in NRXN1 die Ausdifferenzierung und Reifung von IN stark beeinträchtigt. Da ein Funktionsverlust von NRXN1 die Übertragung synaptischer Signale beeinträchtigt, ist davon auszugehen, dass dadurch auch die Ausübung der Gamma-Oszillationen im Gehirn eingeschränkt ist.

Die Ergebnisse der folgenden humanen PM-Studie zeigen, dass während der pränatalen Entwicklungsphase im zweiten Trimester die Transkription von α - und β -NRXN1 von Woche zu Woche stetig steigt. Perinatal wird die höchste Transkriptionsrate erreicht. Postnatal sinken die Transkriptionsraten von α - und β -NRXN1 bis zum Beginn des vierten Lebensjahres. Das zu Beginn des vierten Lebensjahres erreichte Transkriptlevel von α - und β -NRXN1 bleibt bis ins Erwachsenenalter erhalten [89]. Da die Transkription von NRXN1 besonders in der frühen Entwicklung am höchsten ist, nimmt NRXN1 höchstwahrscheinlich einen hohen Stellenwert in der Neurogenese ein. Das lässt den Umkehrschluss zu, dass eine Variation von NRXN1 zu einer Neuroentwicklungsstörung führen kann.

In der hier vorliegenden Arbeit wurden Neurone aus iPSC differenziert, welche die genetischen Informationen der Patienten tragen. Bei Patient 1 liegt eine heterozygote Deletion im α -NRXN1 der Exons 1 - 6 und des α -NRXN1-Promoters vor. Bei Patient 2 liegt eine heterozygote Deletion im α -NRXN1 der Exons 4 – 6 vor. Die Genabschnitte der β -NRXN1-Isoform sind bei beiden Patienten nicht verändert. Exon 1 ist für die Kodierung der LNS1-Domäne und der ersten EGF-Domäne zuständig. Die Exons 3 – 5 sind am alternativen Spleißen an AS1 mit inbegriffen und kodieren den Abschnitt zwischen erster EGF-Domäne und LNS2-Domäne. Exon 6 kodiert einen großen Anteil der LNS2-Domäne [71]. Durch die sechs vorhandenen Spleißstellen im NRXN1 ist es möglich, eine Vielzahl von Proteinvarianten zu generieren. Bisher sind 247 α -NRXN1 und 11 β -NRXN1 Spleißvarianten bekannt. Exon 6 fehlt nur in etwa 7 % der verschiedenen Spleißvarianten. Diese Spleißvarianten ohne Exon 6 zählen nicht zu den 90 % der am häufigsten von den Zellen exprimierten Transkripten [71]. Diese Tatsache unterstreicht die Bedeutung des Exons 6 zur Ausbildung einer funktionalen α -Neurexin1-Isoform.

Die LNS2-Domäne, kodiert durch Exon 6, stellt die Bindungsstelle für die Liganden Dystroglycan und weitere Proteine der Gruppe der Neurexophilline dar. Es ist wenig über die Interaktion mit Neurexophillinen bekannt, beispielsweise deren Funktionsweise oder welche Neurexophilline an welche Neurexine binden [67]. Durch RNA-Analysen muriner Neurone ist bekannt, dass Neurexophilline besonders von IN exprimiert und sezerniert werden, im speziellen von PVALB-positiven IN [90], welche auch für die Generierung der Gamma-Oszillationen notwendig sind. Durch eine veränderte Interaktion von α -Neurexin1 und Neurexophillin könnte es zu einer fehlerhaften Ausbildung inhibitorischer Synapsen kommen. Hier kann ein Zusammenhang zu den

eingeschränkten kognitiven Fähigkeiten, die mit einer SCZ-Erkrankung einhergehen, bestehen.

A-Neurexine sind für die primäre Ausbildung und Entwicklung der groben Struktur der Synapsen nicht essenziell. Sie haben jedoch vor allem in der Modulation der Synapsen eine wichtige Bedeutung. A-Neurexine übernehmen die Feineinstellung während der Synapsenentwicklung. Ein *knock-out* Mausmodell zeigt, ein vollständiger Verlust aller α -Neurexine führt zu einer Reduktion inhibitorischer Synapsen um etwa 30 % [91]. Bei denen in dieser Arbeit verwendeten iPSC könnte aufgrund des Fehlens relevanter Strukturen im α -NRXN1 eine geringere Expression an α -Neurexin 1-Proteinen in den Neuronen der Patienten vermutet werden. Ob eine Reduktion von α -Neurexin 1 ebenfalls zu einer Reduktion inhibitorischer Synapsen führt oder ob lediglich ein *knock-out* aller α -Neurexine zu diesem Ergebnis führt, ist unklar. Denkbar wäre, dass vor allem bei Patient 1 aufgrund der heterozygoten Deletion des α -Promotors eine geringere Anzahl an α -NRXN1-Transkripten und α -Neurexin 1-Proteinisofomen vorliegt und eine verminderte Anzahl an inhibitorischen Synapsen nach sich ziehen könnte.

Das α -NRXN1-Transkript trägt ebenfalls die Information für die Ausbildung der LNS6-Domäne. Die LNS6-Domäne enthält das AS4, welche durch Exon 22 kodiert wird. Jeder Neuronen-Subtyp exprimiert Zelltyp-spezifische Neurexin 1-Proteinisofomen. Im Mausmodell wurde gezeigt, dass unter physiologischen Umständen in den α -Neurexin 1-Isoformen der PZ das AS4 nicht vorliegt. In IN liegt AS4 jedoch vor [85,92]. Ein Mausmodell zeigt die Folgen einer Deletion des Exon 22 in PVALB-positiven IN. In diesen PVALB-positiven IN ist dementsprechend wie in den PZ kein AS4 nachweisbar. Es zeigen sich keine Veränderungen in der Dichte der Synapsen zu den Zellkörpern sowie kein Unterschied in den Synapsen zwischen den PVALB-positiven IN. Jedoch wurde eine veränderte Netzwerkaktivität beobachtet. Die Mäuse zeigen keine veränderte Lokomotion, keine Anzeichen für Angst-Verhalten, jedoch Anzeichen für ein eingeschränktes Kurzzeitgedächtnis [85]. Daraus ergibt sich die Schlussfolgerung, dass eine verminderte Transkription von α -NRXN1 aufgrund der reduzierten AS4 in PVALB-positiven Zellen zu einer Einschränkung der kognitiven Eigenschaften führen kann.

Eine Veränderung des AS4 der LNS6 hat Auswirkungen auf die Interaktion mit Bindungspartnern, vor allem mit Neuroliginen. Diese binden nur, wenn eine bestimmte Neurexin-Konformation vorliegt [67]. Dies trifft sowohl für α - und β -Neurexin 1 zu. Es ist davon auszugehen, dass bei den beiden untersuchten Patienten die β -Neurexin 1-Expression intakt ist, da keine DNA-Variationen in den dafür relevanten

Bereichen vorkommen. Jedoch entstammt unter physiologischen Bedingungen der Großteil der in den Zellen exprimierten Neurexine den α -NRXN1-Transkripten [93]. Es ist zu vermuten, dass ein teilweiser α -NRXN1-Transkriptverlust nicht oder nur teilweise durch eine vermehrt β -NRXN1-Transkription kompensiert werden kann, da die beiden Isoformen Zelltyp-spezifisch gebildet werden. B-Neurexin 1 wird vor allem von PZ exprimiert und geht mit postsynaptischem Neuroligin 1 eine Bindung ein. Damit charakterisiert β -Neurexin 1 exzitatorische Synapsen. A-Neurexin 1 geht mit Neuroligin 2 eine Interaktion ein und charakterisiert inhibitorische Synapsen [86]. Die untersuchten Patienten weisen eine Deletion in α -NRXN1 auf, die sich der Literatur nach auf die Interaktion mit Neuroligin 2 auswirkt. Dadurch ist anzunehmen, dass heterozygote Deletionen in α -NRXN1 die Modulation inhibitorischer Synapsen beeinflussen.

Neurexine werden besonders während der Entwicklung von Neuronen stark exprimiert. Diese Tatsache impliziert, dass Neurexine in der Entwicklung einen besonders hohen Stellenwert einnehmen. Bei den untersuchten Patienten kommt die Vermutung auf, dass aufgrund der heterozygoten Deletion im α -NRXN1 die Bindungsstellen des α -Neurexins 1 für IN-spezifische Liganden dysfunktional sind. Das betrifft bei Patient 2 die Interaktion mit Neurexophilin über die LNS2-Domäne. Bei Patient 1 betrifft es das gesamte α -Neurexin 1, das heißt sowohl die Interaktion mit Neurexophilin über die LNS2-Domäne sowie die Interaktion mit Neuroligin 2 über die LNS6-Domäne. Dieses deutet auf eine fehlerhafte Regulierung von inhibitorischen Synapsen hin. Das könnte einen Erklärungsansatz für die stark veränderte Expression der IN-Marker bei den untersuchten Patienten in dieser Arbeit bieten, da IN während der Entwicklung auf neurogene Signale angewiesen sind. Inwiefern die heterozygote Deletion in NRXN1 einen Einfluss auf die Expression der IN-Marker hat, kann mit dieser Arbeit nicht sicher beurteilt werden. Zusammenfassend liegt die Vermutung nahe, dass die in Patient 1 und Patient 2 vorliegenden heterozygoten Deletionen in NRXN1 die Fehlentwicklung von IN bei SCZ begünstigt haben, da essentielle Transkriptvarianten des NRXN1 bei diesen Patienten wahrscheinlich vermindert vorliegen.

5.4 Ergebnisse im Kontext zu anderen SCZ-Modellen

Diese Arbeit zeigt, dass in differenzierten Neuronen keines der untersuchten Gene in seiner Transkription mit der der Kontrollzelllinie TD KON4-B (TD WISCi004-B) übereinstimmt. Eine veränderte Expression der hier untersuchten molekularen Marker für IN ist bereits mehrfach im Zusammenhang mit der SCZ beschrieben worden. Die Ergebnisse dieser Arbeit werden mit Arbeiten verglichen, die einen Zusammenhang

dieser molekularen Marker für IN und SCZ mithilfe diverser SCZ-Modelle untersucht haben. Bei den zum Vergleich herangezogenen Arbeiten handelt es sich hauptsächlich um humane PM-Studien und um Maus- oder Ratten-Modelle.

5.4.1 Betrachtung von PVALB

In mehreren Maus- und Rattenmodellen, die bekannte Risikofaktoren für die SCZ tragen, ist eine um 17 – 48 % reduzierte Proteinexpression von PVALB mithilfe der Immunfluoreszenz im Vergleich zum jeweiligen Wildtyp gezeigt worden [94]. Es ist aus mehreren PM-Studien bekannt, dass bei SCZ-Patienten eine Reduktion der Transkription und Proteinexpression von PVALB im Rahmen von 17 – 50 % in diversen Kortextbereichen vorliegt [95–102]. Einige PM-Studien zeigen wiederum einen nicht signifikanten Unterschied zwischen SCZ und Kontrollen [103,104].

In einer weiteren PM-Studie wurde ebenfalls eine Reduktion der PVALB-Transkription bei Gesamtbetrachtung der SCZ-Patienten um 22 % gegenüber der Kontrollen nachgewiesen [105]. Die zuletzt genannte Studie von Volk und Kollegen zeigte jedoch, dass die SCZ nicht zwingend mit einer Reduktion der PVALB- und SST-Expression einhergeht. Es wurde gezeigt, dass nicht alle SCZ-Patienten dem sogenannten *low GABA marker*-Typ (LGM) entsprechen. Mit dem LGM-Typ sind Individuen definiert, die einheitlich eine verminderte Expression typischer GABAerger Marker, wie der *glutamate decarboxylase 67* (GAD67), PVALB, SST und LHX6, vorweisen. Dieser molekulare Phänotyp kommt sowohl bei gesunden als auch bei psychiatrisch erkrankten Individuen vor. Volk und Kollegen zeigten, dass 48,8 % der SCZ-Patienten, 47,8 % der Patienten mit schizoaffektiver Störung, 28,6 % der Patienten mit bipolarer Störung und 4,6 - 7 % der gesunden Kontrollen in der untersuchten Stichprobe den LGM-Typ aufweisen [106,105]. Anhand dieses Unterscheidungskriteriums zeigt sich eine enger eingefasste signifikante Expressionsreduktion von PVALB um 28-34 % bei SCZ-Erkrankten des LGM-Typs gegenüber der Gruppe des nicht-LGM-Typs. Diese Ergebnisse zeigen, dass der LGM-Typ allein keine Ursache der SCZ ist, allerdings einen Risikofaktor psychiatrischer Erkrankungen darstellen könnte. Diese Vermutung ist darauf begründet, dass der LGM-Typ bei gesunden am geringsten in der Stichprobe zu finden war.

In dieser Arbeit konnte im iPSC-Modell gezeigt werden, dass die Transkription von PVALB bei der SCZ gegenüber der Kontrolle reduziert ist. Das iPSC-Modell zeigte eine Reduktion der Transkription von PVALB von bis zu 98 %. PM-Studien zeigten eine weniger starke Reduktion der PVALB-Expression. Das lässt die Vermutung zu, dass eine heterozygote Deletion in NRXN1 im Zusammenhang mit der Entwicklung des LGM-Typs

stehen könnte. Diese Hypothese muss jedoch durch weitere ausführliche Untersuchungen bestätigt werden. Die verminderte Transkription von GAD67 ist ebenfalls ein Merkmal für Neurone des LGM-Typs, weswegen die Untersuchung dieses Markers in weiteren Experimenten die aufgestellte Hypothese weiter stützen könnte. Darüber hinaus wäre es wichtig zu untersuchen, welche Auswirkungen eine Deletion in NRXN1 auf molekularbiochemischer Ebene in gesunden Individuen hat. Käme es ebenfalls zur Ausbildung eines LGM-Typs? Ebenso wichtig ist es, besser zu verstehen, ob der LGM-Typ Auswirkungen auf den klinischen Phänotyp der Erkrankung zeigt.

5.4.2 Betrachtung von SST

SST betreffend wurde in mehreren PM-Studien gezeigt, dass die Transkription von SST bei SCZ gegenüber der Kontrolle in diversen Kortexregionen um 20 - 51 % reduziert ist [107,98,104,100,96,105]. Eine weitere PM-Studie zeigt ebenfalls einen Trend zur Reduktion der SST-Transkription, allerdings ist diese nicht signifikant [95]. Auch hier lässt sich die große Spannbreite der Angaben und das nicht signifikante Ergebnis mit dem Vorhandensein zweier unterschiedlicher molekularer Phänotypen innerhalb der Erkrankung SCZ erklären. Denn die genannten PM-Studien zur SST-Transkription haben nicht zwischen dem LGM-Typ und dem nicht-LGM-Typ unterschieden. Vergleicht man direkt den LGM-Typ mit dem nicht LGM-Typ, zeichnet sich eine signifikante Reduktion der SST-Transkription um 48 % ab [106]. Allen Arbeiten gemeinsam ist, dass sie eine Reduktion der SST-Transkription zeigen, ebenso wie in diesem iPSC-Model. Dies ist ein weiterer Hinweis, dass eine heterozygote Deletion in NRXN1 eine Ausbildung des LGM-Typs begünstigen könnte. Allerdings zeigen sich hier bei den meisten der iPSC-abgeleiteten SCZ-spezifischen Neurone eine stärkere Reduktion um mindestens 89 %.

5.4.3 Betrachtung von CALB1 und CALB2

In einigen PM-Studien wurden Reduktionen der Proteinexpression von CALB1 in verschiedenen Kortexbereichen bei SCZ-Patienten beschrieben [102,103,108,97]. Jedoch gibt es auch eine Arbeit, die zeigt, dass die Proteinexpression von CALB1 bei der SCZ erhöht ist [109]. Eine andere Arbeit konnte eine erhöhte CALB1-Transkription um 22,7 – 27,2 % bei der SCZ nachweisen [100,104]. In dieser Arbeit wurde eine verminderte Transkription von CALB1 gezeigt. Diesem uneinheitlichen Bild folgend könnte eine Vermutung lauten, dass es bei den verschiedenen SCZ-Patienten keinen einheitlichen Pathomechanismus hinsichtlich der CALB1-Expression betreffend gibt. Die CALB1-Expression ist vermutlich von dem jeweiligen Risikofaktor und der Ätiologie der betroffenen Patienten abhängig. Ebenfalls könnte das Vorliegen der verschiedenen Ergebnisse auf die Untersuchung zweier verschiedener Zeitpunkte zurückzuführen sein.

Das iPSC-Modell stellt die Verhältnisse während der embryonalen Neurogenese nach und die PM-Analysen wurden zum Endpunkt der Erkrankung in einem adulten Gehirn durchgeführt.

Die calciumbindenden Proteine PVALB, CALB1 und CALB2 weisen neuroprotektive Eigenschaften auf. So zeigen CALB1-positive Zellen in einem murinen *in vitro*-Modell eine effektivere Reduktion der intrazellulären Calcium-Konzentration, eine bessere Pufferung des intrazellulären Calciums sowie höhere Überlebenschancen beispielsweise nach hypoglykämischen Zuständen. Ebenso schützen die calciumbindenden Proteine die Neurone vor oxidativem Stress. Eine verringerte Expression der calciumbindenden Proteine macht die Zelle sensibler und störanfälliger für äußere Einflussfaktoren [110]. Eine Theorie zur Ätiologie der SCZ beinhaltet, dass Traumata während des pränatalen oder des frühen postnatalen Entwicklungszeitraumes, in dem die calciumbindende Proteine noch nicht oder nicht im ausreichenden Maße exprimiert werden, die Anfälligkeit für SCZ enorm erhöhen können [97]. Ob die veränderten CALB1-Expressionen Ursache oder Folge der bei SCZ vorliegenden Pathomechanismen darstellt, ist jedoch wenig erforscht.

In mehreren PM-Studien zeigte sich keine veränderte CALB2-Expression zwischen SCZ-Gruppe und Kontrollgruppe auf Protein- und auf Transkriptebene [102,101,103,109,104,98,99,97]. Eine weitere PM-Studie zeigte ebenfalls keinen Unterschied in der CALB2-Transkription zwischen SCZ und Kontrollen, außer im primären visuellen Kortex. In diesem war eine Steigerung der Transkription um 41 % bei SCZ zu erkennen [96]. In einer anderen PM-Studie konnte bei SCZ eine um 9 % erhöhte CALB2-Transkription gezeigt werden [105]. Das iPSC-Modell dieser Arbeit zeigt nicht so ein einheitliches Ergebnis, sondern Unterschiede zwischen den Neuronen der verschiedenen Patienten. Die Replikate des Patienten 2 zeigen eine dreifach stärkere Transkription als die Kontrollzelllinie, während zwei Replikate des Patienten 1 eine Reduktion der Transkription von 26 – 29 % vorweisen. Dieses Ergebnis passt nicht zu den genannten PM-Studien. Die Unterschiede zwischen den Patienten wurden in den jeweiligen biologischen Replikaten bestätigt. Daher ist die Vermutung zulässig, dass dies eine Veränderung in Abhängigkeit zu den unterschiedlich vorliegenden Deletionen in NRXN1 sein könnte. Da der Zusammenhang zwischen der NRXN1-Funktion mit der IN-Entwicklung bisher kaum untersucht wurde, sind aktuell auch keine weiteren Untersuchungen in Zusammenhang mit CALB2 publiziert worden.

5.4.4 Betrachtung von NPY und RELN

In diesem iPSC-Modell zeigte sich eine bis zu 14-fach erhöhte Transkription von NPY in Abhängigkeit zur SCZ. Im Gegensatz dazu konnte in einigen PM-Studien gezeigt werden, dass die Transkription von NPY im präfrontalen Kortex (PFC) beziehungsweise im DLPFC bei SCZ um 15 – 28 % reduziert ist [104,107,95]. Ebenfalls wurde in weiteren PM-Studien gezeigt, dass die NPY-Transkription in der SCZ unverändert ist [111,100]. Die auf den ersten Blick gegensätzlich erscheinenden Aussagen resultieren eventuell aus einer sehr heterogenen Patientengruppe. 2009 konnte in einer weiteren PM-Studie gezeigt werden, dass bei einer reinen SCZ keine Veränderungen der NPY-Transkription zwischen SCZ und Kontrolle vorliegen. Bei Patienten, die an einer schizoaffektiven Störung litten, zeigten sich jedoch eine signifikante Reduktion der NPY-Expression in der oberflächlichen weißen Substanz des DLPFC gegenüber der gesunden Kontrolle [112]. Das lässt die Vermutung zu, dass reduziertes NPY mit der Entwicklung von Störungen der Stimmungsregulierung mit zusätzlicher Störung der Realitätswahrnehmung einhergeht. Denn die Patienten, die ausschließlich an Psychosen im Rahmen einer SCZ-Erkrankung oder ausschließlich an einer gestörten Stimmungsregulierung im Rahmen einer schweren Depression litten, zeigten keine Veränderung der NPY-Expressionsraten [112]. Die Ergebnisse der zuvor genannten Arbeiten könnten darauf zurückzuführen sein, dass innerhalb der Patientengruppen die SCZ-Erkrankung und die schizoaffektive Störung zusammengefasst wurden und nicht separiert betrachtet worden sind. Vor dem Hintergrund dieser Feststellung gilt es zu überprüfen, wie sich der Unterschied zwischen diesen beiden klinischen Phänotypen auch auf die Expression aller hier untersuchten IN-Marker widerspiegelt. In den bisher veröffentlichten PM-Studien, welche für die Beurteilung dieser Arbeit herangezogen worden sind, ist eventuell nicht deutlich genug zwischen Patienten mit SCZ und Patienten mit schizoaffektiver Störung unterschieden worden.

Eine skandinavische Assoziationsstudie hat RELN als Risikogen für SCZ identifiziert [113]. In einigen PM-Studien konnte eine Reduktion der RELN-Transkription bei der SCZ um 30 - 50 % gezeigt werden [11,114,115]. Diese Arbeit zeigt ebenfalls eine Reduktion der RELN-Transkription, die mit 92 – 98 % Werte aus PM-Studien übertrifft.

5.4.5 Betrachtung der TF SHH, NKX2.1 und LHX6

Im Zebrafisch konnte nachgewiesen werden, dass SHH einen Einfluss auf die Expression des Gens *disrupted in schizophrenia 1* hat. Mutationen in *disrupted in schizophrenia 1* sind bereits in der SCZ beschrieben worden [116]. Aus diesem Grund kann angenommen werden, dass eine geringe SHH-Expression mit der SCZ in

Zusammenhang steht. SHH ist essenziell für die Entwicklung der kortikalen IN. Eine fehlerhafte SHH-Expression hätte daher eventuell krankheitsrelevante Folgen. In diesem iPSC-Modell weisen die Patienten gegenüber der Kontrolle deutlich veränderte SHH-Transkriptionen auf. Die NKX2.1-Expression wurde im direkten Zusammenhang mit SCZ bisher kaum untersucht. Der TF NKX2.1 übernimmt eine wichtige Funktion bei vielen molekularen Signalwegen, die bei SCZ einer veränderten Regulation unterliegen [58]. Da die NKX2.1-exprimierenden Progenitorzellen eine Schlüsselfunktion in Entwicklung der PVALB- und SST-positiven kortikalen IN einnehmen, ist davon auszugehen, dass die in dieser Arbeit festgestellte Veränderung der NKX2.1-Transkription eine wichtige Rolle im Pathomechanismus der SCZ einnimmt.

In PM-Studien konnte gezeigt werden, dass bei SCZ im PFC eine Reduktion der LHX6-Transkription um 10 – 15 % vorliegt im Vergleich zur gesunden Kontrolle [105,59]. Im Gegensatz dazu konnte eine andere PM-Studie keine signifikanten Unterschiede auf Transkriptebene zwischen SCZ-Patienten und Kontrolle in mehreren Kortexbereichen, einschließlich des DLPFC, feststellen [96]. Diese Ergebnisse stellen keinen Widerspruch zueinander dar, wenn in Betracht gezogen wird, dass in den genannten Arbeiten nicht zwischen dem LGM-Typ und dem nicht-LGM-Typ unterschieden wurde. Es konnte gezeigt werden, dass SCZ-Patienten, die dem LGM-Typ angehören, eine signifikante Reduktion der LHX6-Transkription von 23 % gegenüber dem nicht-LGM-Typ vorweisen [106]. In dieser Arbeit war eine Reduktion der LHX6-Transkription im iPSC-Modell bei SCZ im Vergleich zur Kontrollzelllinie um 50 % bis zu 93 % zu verzeichnen. Dies ist ein weiterer Hinweis darauf, dass eine heterozygote Deletion in NRXN1 bei SCZ-Patienten die Ausbildung eines LGM-Typs begünstigen könnte. Im iPSC-Modell zeichnet sich eine Reduktion der LHX6-Transkription in einem größeren Umfang ab, als dies in den PM-Studien der Falls ist.

5.4.6 Betrachtung von OLIG2 und CXCR4

Der Zusammenhang zwischen OLIG2 und SCZ ist in Assoziationsstudien beschrieben worden. Dabei wurde zum einen eine Kohorte der britischen Inseln, zum anderen eine chinesische Population betrachtet [117,118]. In Japan ist jedoch kein Zusammenhang festgestellt worden [119]. Demnach ist die Herkunft der Probanden hier von Bedeutung. In einer nordamerikanischen PM-Studie konnte mithilfe der Immunhistochemie gezeigt werden, dass die Anzahl der OLIG2-positiven Zellen um 21 % bei SCZ-Patienten reduziert ist [48]. Das Ergebnis legt nahe, dass die OL während ihrer Differenzierung gestört werden oder im Verlauf der SCZ degenerieren. In einer weiteren PM-Studie wurde mittels Durchflusszytometrie jedoch kein signifikanter Unterschied in der

Proteinexpression von OLIG2 im frontalen und hinteren Kortex zwischen SCZ-Patienten und Kontrollen gefunden [120]. Eine weitere PM-Studie zeigte keinen signifikanten Unterschied in der OLIG2-Transkription zwischen SCZ-Patienten und Kontrollen im DLPFC [121]. Die zuletzt genannte PM-Studie hat jedoch eine signifikant verminderte OLIG2-Transkription bei homo- und heterozygoten Trägern des Risiko-A-Allels festgestellt, ein Allel, das bereits in der oben genannten Assoziationsstudie [117] im Zusammenhang mit der SCZ beschrieben wurde. Die in diesem iPSC-Modell untersuchten Neurone zeigen eine verminderte Transkription von OLIG2. Unklar ist, ob die untersuchten Patienten ebenfalls ein Risiko-A-Allel im Gen OLIG2 tragen.

In einer PM-Studie konnte gezeigt werden, dass die Transkription des Chemokinrezeptors CXCR4 bei der SCZ um 14 % erhöht ist gegenüber den Kontrollen [122]. Im Gegensatz dazu wurde in dieser Arbeit eine um 46 – 82 % niedrigere CXCR4-Transkription gegenüber der Kontrolle gezeigt. Es gibt dafür sinnvolle Erklärungsansätze im Kontext der SCZ. Ein Mausmodell zeigt, dass ein CXCR4-Funktionsverlust in PVALB-positiven IN zu einem veränderten Verhalten führt. Die Mäuse wiesen Stereotypien auf, sowie eine Hyperaktivität im *open field test* und ein eingeschränktes Sozialverhalten [123]. Dies sind auch typische Symptome der SCZ. CXCR4 ist für die Migration der MGE-stämmigen kortikalen IN notwendig. Das lässt vermuten, dass ein Funktionsverlust des funktionellen Komplexes aus Chemokinrezeptor CXCR4 und des dazugehörigen Liganden CXCL12 einen Anteil an den pathophysiologischen Veränderungen in der SCZ haben kann. Der Komplex aus Ligand CXCL12 und Rezeptor CXCR4 ist notwendig für die Migration und für die Ausbildung inhibitorischer Synapsen von PVALB-positiven kortikalen IN zu PZ im PFC. Ein Mausmodell zeigt, bei einem Verlust von CXCL12 liegen weniger inhibitorische Synapsen an den PZ der Lamina 5 im Kortex vor [63]. Es ist durchaus wahrscheinlich, dass ein Verlust des Rezeptors CXCR4 zu ähnlichen Ergebnissen führt. In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass beide SCZ-Patienten eine reduzierte CXCR4-Transkription gegenüber der Kontrolle vorweisen. Das lässt vermuten, dass in diesem Model eine verminderte Anzahl inhibitorischer Synapsen an PZ vorliegt. Diese Synapsen sind jedoch notwendig, um die erforderlichen Gamma-Oszillationen im PFC zu erzeugen, die für die Leistung kognitiver Fähigkeiten notwendig sind.

5.4.7 Betrachtung von ASCL1, DLX1 und DLX2

In der Literatur ist wenig über die Expression von ASCL1 im Zusammenhang mit SCZ bekannt. Aufgrund seiner essentiellen Funktion in der frühen Entwicklung kortikaler IN ist zu vermuten, dass eine veränderte Expression von ASCL1 die Entwicklung

kortikaler IN beeinflussen kann und damit auch zum Pathomechanismus der SCZ beitragen kann. Auch DLX2 ist wichtig für die Neurogenese. In einer DNA-Analyse von SCZ-Patienten und Kontrollen wurden DNA-Variationen in DLX2 in beiden Gruppen ohne signifikante Tendenz gefunden [124]. Aufgrund der Funktion von DLX2 haben Veränderungen in der Expression wahrscheinlich auch Auswirkungen auf die Entwicklung kortikaler IN. DLX2 ist daher eventuell auch an der Pathophysiologie der SCZ beteiligt.

In einer skandinavischen Assoziationsstudie wurde DLX1 als Risikogen für die SCZ identifiziert [113]. Eine PM-Studie an 62 SCZ-Erkrankten und 62 Kontrollen zeigte eine verminderte Transkription von DLX1 um etwa 20 % bei der SCZ [125]. In einer anderen PM-Studie ist jedoch keine Veränderung der DLX1-Transkription bei SCZ gegenüber der Kontrolle nachgewiesen worden [126]. Mithilfe der *in situ*-Hybridisierung konnte in einer weiteren PM-Studie gezeigt werden, dass die Transkription von DLX1 signifikant um 35 % bei psychiatrischen Patienten, die unter einer Psychose litten, gegenüber der Kontrolle reduziert war [127]. In der beschriebenen Studie wird sich nicht nur auf die SCZ beschränkt. In der Gruppe der Untersuchten, die an Psychosen litten, wurden Patienten mit einer SCZ, einer bipolaren Störung oder einer schweren Depression eingeschlossen. Die Kontrollgruppe setzte sich aus Patienten derselben Krankheiten ohne Psychosen und psychiatrisch unauffälligen Personen zusammen. Daraus erschließt sich, dass DLX1 wahrscheinlich eine wichtige Funktion in der Pathogenese der Psychose und damit der Positivsymptomatik der SCZ einnimmt. Eine Reduktion der DLX1-Expression konnte in diesem iPSC-Modell nicht für beide Patienten gezeigt werden. Hier zeigen sich Unterschiede zwischen beiden Patienten, wobei Patient 1 eine erhöhte Transkription um 500 % gegenüber der Kontrollzelllinie zeigt und Patient 2 eine verminderte Transkription von DLX1 um etwa 50 % aufweist. Beide Patienten zeigten im Krankheitsverlauf Psychosen. Zusammen legen eigene Daten und die Literatur nahe, dass DLX1 in der SCZ fehlerhaft reguliert ist und mit der Entwicklung von Psychosen im Zusammenhang steht.

Die Ergebnisse dieser Arbeit lassen vermuten, dass DLX1 aufgrund seiner Funktion einen Einfluss auf den Pathomechanismus der SCZ hat, jedoch nicht zwingend charakteristisch für eine SCZ ist. Kongenitale Infektionen und Immunreaktionen der Mutter sind ebenfalls bekannte Risikofaktoren für die Entwicklung einer SCZ [128]. In einem entsprechendem Mausmodell konnte gezeigt werden, dass unter anderem die Transkription von DLX1 und LHX6 verändert ist, wenn der Embryo pränatal einer Immunreaktion der Mutter ausgesetzt war [129]. Möglicherweise ist DLX1 in der SCZ ein

wichtiger Bestandteil der durch NRXN1 und immunregulatorische Signalwege gesteuert wird.

5.4.8 Betrachtung von SP8

SP8 ist bei einer genomweiten Assoziationsstudie in der japanischen Bevölkerung als Risikogen für SCZ identifiziert worden [130]. Daraus lässt sich schließen, dass SP8 eventuell einen Anteil an der Pathophysiologie der SCZ hat. In dieser Arbeit zeigten sich entweder verminderte oder erhöhte Transkriptionen von SP8 in SCZ-spezifischen Neuronen im Vergleich zur Kontrolle.

5.5 Ergebnisse im Kontext der embryonalen Hirnentwicklung

Der Fokus dieser Arbeit liegt auf der Untersuchung von Zusammenhängen zwischen SCZ und der Entwicklung kortikaler IN. Die erhaltenen Ergebnisse bestätigen die aktuelle Literatur und die Annahme, dass bei SCZ bestimmte Pathomechanismen tiefgreifend in die Entwicklung kortikaler IN eingreifen. Es ist daher wichtig die Ergebnisse durch weitere Experimente zu validieren.

5.5.1 Betrachtung des Signalwegs: SHH → NKX2.1 → LHX6 → PVALB

Ein Mausmodell zeigt, dass ein Funktionsverlust von SHH zu einer signifikanten Reduktion an NKX2.1-exprimierenden Progenitorzellen des MGE führt und einen Verlust von PVALB- und SST-positiven kortikalen IN mit sich brachte [50]. In diesem iPSC-Modell ist dies ebenfalls zu beobachten. Die Expression von NKX2.1 hängt deutlich von der SHH-Expression ab. Allerdings könnte ein krankheitsspezifischer Effekt sein, dass eine deutlich höhere Expression von SHH bei den Patienten notwendig ist als bei der Kontrollzelllinie, um eine Expression von NKX2.1 zu generieren. Die SCZ-spezifischen Neurone zeigen eine verminderte NKX2.1-Expression, wenn die SHH-Expression nicht deutlich über 100 % lag.

Es ist bekannt, dass eine höhere Menge an SHH eher zu einer Ausbildung von SST-positiven kortikalen IN anstelle von PVALB-positiven kortikalen IN führt. Diese entwicklungsbiologischen Gesetzmäßigkeiten werden von diesem SCZ-iPSC-Modell nicht immer erfüllt. Neurone des P2-E (MLUi002-E) zeigten zwar eine PVALB-Transkription ähnlich der Kontrollzelllinie, weisen jedoch eindeutig höhere Level an SHH auf, als es bei den Neuronen des P1-B (MLUi001-B) mit den etwas über dem normalen SST-Transkriptionslevel der Fall ist. Ebenso ist dieses Muster bei den nachfolgenden TF zu beobachten. Aus einem Mausmodell ist bekannt, dass bei einem Funktionsverlust von NKX2.1 kein LHX6 exprimiert wird [54]. Ebenso ist bekannt, dass LHX6 dem NKX2.1 direkt nachgeschaltet ist und durch dieses aktiviert wird [56]. Hier in

diesem iPSC-Modell zeigt sich jedoch nur eine ausreichende LHX6-Expression bei übermäßig starker NKX2.1-Expression im Vergleich zur Kontrollzelllinie (> 250 %).

Dieses iPSC-Modell zeigt auch, dass ausreichend LHX6 benötigt wird, um PVALB exprimieren zu können. Im Mausmodell konnte gezeigt werden, dass eine Reduktion der LHX6-Expression um 40 - 45 % bei gesunden Individuen keine Auswirkung auf die Anzahl der PVALB-positiven kortikalen IN oder auf die Menge der PVALB-Transkripte hat [59,62]. Liegt bei SCZ-Patienten ein Verlust der LHX6-Expression in derselben oder in kleinerer Größenordnung vor, sind deutliche Veränderungen im GABAergen System zu beobachten. Dazu gehören eine beeinträchtigte Migration und Differenzierung sowie veränderte Transkriptionslevel von GAD67, PVALB und SST [106,105]. Die Ergebnisse aus diesem iPSC-Modell zeigen dieses Verhalten ebenfalls. Eine Reduktion der LHX6-Expression um 50 % führt zu einer deutlichen Reduktion der PVALB-Expression um knapp 80 %. Diese Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass hier ein SCZ-bedingter Effekt vorliegen muss. Im Einklang mit dieser Schlussfolgerung wurde im Mausmodell gezeigt, dass es bei gesunden Individuen bei teilweisem Verlust von LHX6 zu keiner Abnahme der PVALB-Expression kommt. Demnach liegt die Vermutung nahe, dass ein weiterer Regulationsmechanismus der PVALB-Expression bei der SCZ beeinträchtigt sein könnte und die Abnahmen der PVALB-Expression bei der SCZ nicht nur auf die verminderte LHX6-Expression zurückzuführen ist.

Dieses iPSC-Modell zeigt ebenfalls, dass eine verminderte LHX6-Transkription bei SCZ nicht die Ursache sondern die Folge des bei SCZ zugrunde liegenden Pathomechanismus sein könnte [59]. Es wird vermutet, dass LHX6 in Folge der SCZ herunterreguliert wird, wenn andere im Signalweg davorliegende TF krankheitsbedingt bereits verändert vorliegen und diese den Phänotyp der PVALB- und SST-positiven kortikalen IN verändern. Ein Mausmodell zeigt, in gesunden Individuen führt ein Verlust von mehr als 50 % des LHX6 zu einer reduzierten terminalen Differenzierung von SST-positiven kortikalen IN aber nicht der PVALB-positiven kortikalen IN [62]. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass bei der SCZ diese entwicklungsbiologischen Gesetzmäßigkeiten nicht immer gelten. Bei einer Reduktion der LHX6-Expression um 50 % zeigt sich eine deutliche Transkriptionsreduktion von SST und PVALB im Vergleich zur Kontrollzelllinie. Dies legt die Vermutung nahe, dass ein bedeutender Regulationsmechanismus dieses Signalweges bei der SCZ wichtig ist. Dieser Phänotyp könnte durch die heterozygote Deletion in NRXN1 hervorgerufen worden sein. Mausmodelle zeigen, bei einem vollständigen Verlust der LHX6-Expression ist jedoch

eine normale Entwicklung und Migration der kortikalen IN auch bei gesunden Individuen nicht möglich [57,62].

5.5.2 Betrachtung von ASCL1, DLX1, DLX2 und COUPTF1

ASCL1 ist ein Marker der in den Progenitoren von allen kortikalen IN exprimiert ist. In dieser Arbeit liegt bei beiden Patienten eine Reduktion der Transkription von ASCL1 gegenüber der Kontrolle vor. Das lässt vermuten, dass bei den Patienten im iPSC-Modell weniger kortikale IN ausgebildet werden als in der Kontrolle. Bekannt ist, dass die Kombination der TF ASCL1 und DLX1 und DLX2 in den Progenitoren notwendig ist, um kortikale IN zu generieren [30]. Bei Neuronen aus Patient 2 ist die Transkription von DLX1 und DLX2 geringer als in der Kontrollzelllinie. Das ließe vermuten, dass sich weniger IN-Progenitoren entwickelt haben und stattdessen Vorläufer der Gliazellen hervorgegangen sind. Dieser Vermutung widerspricht der Fakt, dass Patient 2 dennoch keine auffällig veränderte OLIG2-Transkription gegenüber Patient 1 vorweist. Möglicherweise exprimieren die TD aufgrund anderer veränderter Regulationsmechanismen weniger DLX1 und DLX2.

DLX1 und DLX2 werden während der Entwicklung in allen IN-Progenitoren exprimiert, wobei die TF eine besondere Bedeutung für die Entwicklung von SST-, NPY- und CALB2-positiven kortikalen IN haben [131,55]. Ein Mausmodell zeigt, dass ein DLX1-Funktionsverlust zu einer Reduktion von rund 22 % der kortikalen IN führt [131]. Dabei handelte es sich vor allem um eine verminderte Expression von SST um 22 %, von CALB2 um 30 % und von NPY um 42 %, gemessen im sensomotorischen Kortex zwei Monate postnatal [131]. Ein mausbasiertes *in vitro*-Modell zeigt, dass es bei einer heterozygoten Deletion von DLX1 und DLX2 bereits pränatal zu einem Verlust GABAerger kortikaler IN von etwa 75 % kommt [55]. Während SST-positive und NPY-positive kortikale IN stark reduziert waren, war das Vorkommen von CALB2-positiven kortikalen IN kaum noch nachweisbar [55]. Obwohl DLX1 und DLX2 überall im Subpallium exprimiert werden, scheinen besonders die CGE-stämmigen CALB2-positiven kortikalen IN auf die Expression von DLX1 und DLX2 angewiesen zu sein [55].

Dieser Zusammenhang zeigt sich in diesem untersuchten iPSC-Modell nicht eindeutig. In Bezug auf CALB2 verhält sich dieses Modell genau entgegengesetzt. Je mehr DLX1 in den einzelnen Linien transkribiert ist, desto geringer fällt die CALB2-Transkription aus. In diesem iPSC-Modell zeigt sich jedoch, dass die Linie mit der höchsten SST-Transkription ebenfalls die stärkste DLX1-Transkription aufweist. NPY ist ebenfalls

in den Linien höher exprimiert, die ein hohes DLX1-Transkriptionslevel besitzen. Das zeigt, dass in diesem SCZ-spezifischen *in vitro*-Modell das Zusammenspiel der natürlichen Regulationsmechanismen vorhanden ist. Jedoch verhält sich die CALB2-Transkription entgegengesetzt der physiologischen Erkenntnisse. Bei Neuronen aus Patient 2 liegt eine um 50 % reduzierte DLX1-Transkription vor, während sie bei Patient 1 stark gesteigert ist. Da es beim DLX1-Funktionsverlust zu einer Verminderung der Anzahl kortikaler IN kommt, kann bei verminderter DLX1-Expression von einem SCZ-Risiko ausgegangen werden. Eine Erklärung für die Unterschiede in den Patienten könnte die unterschiedliche Lokalisation der heterozygoten Deletion im Gen NRXN1 bieten.

Ein Mausmodell zeigt, ein Verlust von COUPTF1 führt zu einer verminderten Generierung SST-positiver IN und einer erhöhten Anzahl an PVALB-positiven IN [47]. Dieser regulatorische Einfluss von COUPTF1 zeigt sich auch beim Vergleich beider Patienten miteinander. Patient 1 weist eine signifikant höhere Expression von COUPTF1 auf und besitzt ebenfalls eine höhere Expression von SST als Patient 2. Patient 2 zeigt bei geringeren COUPTF1-Expressionen eine höhere PVALB-Expression als Patient 1. Dass beide Patienten generell weniger COUPTF1, SST und PVALB als die Kontrolle exprimieren, lässt vermuten, dass noch weitere Regulatoren einen Einfluss auf die Expression von PVALB und SST haben und hier durch die SCZ verändert sind. Außerdem zeigt ein Mausmodell, dass ein Funktionsverlust von COUPTF1 zu einer verminderten Anzahl der CALB2-positiven kortikalen IN des CGE führt [46]. Dieser Zusammenhang kann in diesem iPSC-Modell nicht gezeigt werden. Patient 2 zeigt bei signifikant geringeren COUPTF1-Expressionen deutlich höhere CALB2-Transkriptionen. Das lässt vermuten, dass CALB2 bei Patient 2 aufgrund anderer Regulationsmechanismen erhöht exprimiert wird.

5.5.3 Betrachtung des Signalwegs: PROX1 → SP8

Ein Mausmodell zeigt, dass ein reiner PROX1-Funktionsverlust keinen Einfluss auf die SP8-Transkription hat [28]. In dieser Arbeit zeigen sich einheitlich geringere PROX1-Transkriptionen und erhöhte SP8-Transkriptionen bei den SCZ-spezifischen Neuronen im Vergleich zur Kontrollzelllinie. Das deutet darauf hin, dass die zum Teil erhöhte und die zum Teil verminderte SP8-Expression bei SCZ noch einem anderen regulatorischen Mechanismus unterliegt als nur dem TF PROX1. Dafür spricht auch, dass Neurone aus Patient 1 verhältnismäßig mehr PROX1 exprimieren als Neurone aus Patient 2 und dabei trotzdem eine geringere SP8-Transkription aufweist. Das genannte Mausmodell zeigt auch, dass ein PROX1-Funktionsverlust zu einer geringeren

CALB2-Expression führt [28]. Diese Arbeit zeigt, dass es zusätzlich noch weitere Regulationsmechanismen für die Expression von CALB2 geben muss. Die Neurone beider Patienten exprimieren sehr wenig PROX1 im Vergleich zu den Neuronen der Kontrollzelllinie, wobei Patient 1 ebenfalls deutlich verminderte CALB2-Transkriptionen zeigt, Patient 2 jedoch deutlich erhöhte CALB2-Transkriptionen vorweist. Ebenso wurde im genannten Mausmodell nachgewiesen, dass ein Funktionsverlust von PROX1 zu einer reduzierten RELN-Expression führt [28]. Diese Arbeit zeigt dies ebenfalls. Alle SCZ-spezifischen Neurone zeigen eine geringere Transkription von PROX1 und ebenso geringe Transkription von RELN im Vergleich zur Kontrollzelllinie.

5.6 Bewertung des iPSC-Modells dieser Arbeit

Das Arbeiten mit einem iPSC-Modell bietet viele Vorteile. Allerdings gibt es auch Grenzen. Im *in vitro* iPSC-Modell nimmt die Generierung der Neurone einen ähnlichen Zeitverlauf, wie dies in der *in vivo*-Entwicklung des fetalen Gehirns der Fall ist. Die typische Symptomatik der Schizophrenie zeigt sich erst nach etwa 20 - 25 Jahren. Daher ist die Darstellung der Pathophysiologie mithilfe des iPSC-Modells zum Zeitpunkt des Krankheitsausbruches begrenzt. Außerdem ist bei längerer Kultivierung der Neurone die Gefahr des Verlusts von Material oder die der Infektion mit Mikroorganismen gegeben. Aus diesen Gründen wird das iPSC-Modell hauptsächlich genutzt, um die entwicklungsbiologischen Veränderungen bei der SCZ zu untersuchen. Somit steht der Wissenschaft ein weiterer Zweig zur Untersuchung humanen Gewebes zur Verfügung. Bis vor 10 Jahren war es nur möglich den Endpunkt der Erkrankung mithilfe von PM-Studien zu untersuchen.

5.6.1 Aussagekraft von IN-Markern

In dieser Arbeit wurden verschiedene IN-Marker während der *in vitro*-Differenzierung zu SCZ-spezifischen Neurone untersucht. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Entwicklung von IN im Vorderhirn von Patienten der SCZ verändert ist. Diese Arbeit bietet deutliche Hinweise darauf, dass eine heterozygote Deletion in NRXN1 in Zusammenhang mit diesen Veränderungen gebracht werden kann. Diese Arbeit zeigt auch, dass die aus den PM-Studien bekannten Transkriptveränderungen sich bereits während der Neurogenese abzeichnen. Diese Transkriptveränderungen scheinen im Zeitraum der Neurogenese zum Teil deutlich stärker vorzuliegen als dies zum Endpunkt der SCZ in PM-Studien gezeigt wurde. Dies wurde mithilfe dieser Arbeit für PVALB, SST, LHX6 und RELN gezeigt. Das ist ein Hinweis darauf, dass dies einen großen Beitrag zur Pathogenese der SCZ darstellt. Allerdings konnte wiederum für CALB1, CALB2 und NPY gezeigt werden, dass die in dieser Arbeit gezeigten Ergebnisse im Widerspruch zu den

Ergebnissen der PM-Studien stehen. Unklar ist, ob diese Widersprüche auf die Untersuchung der Gewebe zu zwei unterschiedlichen Entwicklungsstadien zurückzuführen sind oder ob weitere Gründe ursächlich sind. Beispielsweise könnten unterschiedliche Ein- und Ausschlusskriterien der Patienten zur untersuchten Gruppe zwischen den Forschungsgruppen ursächlich sein. Beispielhaft konnte für NPY beschrieben werden, dass dessen Expressionsveränderungen in PM-Studien deutlich vom Vorhandensein einer schizoaffektiven Störung abhängig sind oder die Transkriptveränderungen bei PVALB vom Vorliegen des LGM-Typs abhängig sind.

5.6.2 Genetische Diversität von iPSC-Linien

Die Diversität zwischen lebenden Individuen spiegelt sich auch in der Diversität der iPSC verschiedener Spender wider. Es wurden unterschiedliche Genexpressionen im Vergleich der iPSC verschiedener Spender und verschiedener Ausgangsgewebe beobachtet. Lange wurde das epigenetische *imprinting*, also die Methylierungsmuster der somatischen Ausgangszellen, dafür verantwortlich gemacht. Mittlerweile konnte aber gezeigt werden, dass weniger das epigenetische *imprinting* für die unterschiedliche Expression relevanter Gene zwischen verschiedenen iPSC verantwortlich ist, sondern der individuelle genetische Hintergrund des Spenderindividuums [132]. Das macht das Vergleichen der verschiedenen publizierten Modelle schwierig.

Ein Vorteil des iPSC-Modells ist, dass der genetische Hintergrund des Spenderindividuums einen starken Einfluss auf die Expressionsraten diverser Gene nimmt. Im vorliegenden Modell ist es der Einfluss der heterozygoten Deletion in NRXN1. Um diese Heterogenität von Transkriptionsmustern so gering wie möglich zu halten und die Ergebnisse der Modelle besser miteinander vergleichen zu können, ist es besonders wichtig Kontrollen zu verwenden, die gleichen Geschlechts, gleichen Alters und ähnlicher Herkunft sind. Es konnte gezeigt werden, dass so ausgewählte humane iPSC-Linien sich sehr ähnlich in ihrem Transkriptionsmuster und ihren epigenetischen Eigenschaften sind [133].

Ein weiterer Punkt ist die Frage, ob die genetische Information des Individuums während der Reprogrammierung der somatischen Zellen in iPSC tatsächlich unbeschadet bleibt. Besonderes Augenmerk liegt dabei bei diesen Patienten auf der Deletion in NRXN1. Obwohl die Literatur beschreibt, dass die genetischen Informationen der Patienten erhalten wird, gilt es durch weitere Untersuchungen zu überprüfen, inwiefern die iPSC sowie die differenzierten Neurone verlässlich die genetische Information der Patienten

wiedergeben. Das Vorkommen von genomischen Aberrationen in einer iPSC-Kultur ist bereits beschrieben worden [134].

5.6.3 Diversität von Kontrollen im iPSC-Modell

Im Rahmen dieser Arbeit wurden iPSC der Linie KON4-B (WISCi004-B) als Kontrolle in der Differenzierung mitgeführt und als gesunde Kontrolle im Vergleich zu den SCZ-spezifischen iPSC analysiert. Die Kontrolle ist hinsichtlich ihrer Herkunft gleich mit den Patienten, da sie ebenfalls aus einer somatischen Zelle zu einer iPSC reprogrammiert wurde. Die verwendete Kontrolllinie WISCi004, auch unter dem Namen iPS(IMR-90)-4 bekannt, ist eine häufig publizierte iPSC-Linie. Sie wird seit über einem Jahrzehnt international verwendet und wurde mehrfach erfolgreich in diverse Zelltypen ausdifferenziert. Diese Tatsache lässt auf die Qualität der iPSC-Linie schließen.

Die SCZ-spezifischen iPSC entstammen aus zwei männlichen Patienten, wobei die Kontrolle weiblich ist. Die Linie KON4-B (WISCi004-B) ist einem fetalen Spender entnommen worden. Demnach ist der fetale Spender sehr viel jünger als die Spender der SCZ-spezifischen Linien. Diese sind zum Zeitpunkt der Spende 22 und 37 Jahre alt. Der Unterschied, dass beispielsweise die Expression von PVALB in diesem iPSC-Modell um bis zu 98 % reduziert ist und in PM-Studien Reduktionen zwischen 23 - 34 % beschrieben wurden, kann demnach durch die Diversität der Kontrolle mit beeinflusst worden sein. Um die Diversität der Kontrollen besser abzubilden, ist es sinnvoll für zukünftige Versuche weitere Kontrollzelllinien mitzuführen. Die Kontrollen sollten möglichst hinsichtlich Alter, Geschlecht, Herstellung der iPSC und Zelltyp des Ausgangsmaterials angeglichen werden. Steht einem eine große Auswahl verschiedener Kontrollen zur Verfügung, kann man durch einen Vergleich der genomweiten *single nucleotide polymorphisms* eine genetisch passende Kontrolle für einen Spender zu suchen.

5.6.4 Variabilität des Differenzierungserfolgs

Ein weiterer wichtiger Punkt ist die Reproduzierbarkeit. Es gilt kritisch zu betrachten, wie oft Versuche durchgeführt wurden. Die Ergebnisse dieser Arbeit müssen in weiteren Analysen weiter untersucht werden. Umso höher die Anzahl an Differenzierungen und biologischen Replikaten ist, umso klarer können Aussagen getroffen werden. Weiterhin ist es sinnvoll, die aus iPSC generierten Neurone bestehend aus glutamatergen und GABAergen Zellen besser zu charakterisieren. Der genaue prozentuale Anteil beider Zellarten in der jeweiligen Kultur und Probe wurde in dieser Arbeit nicht bestimmt. Obwohl die untersuchten Marker charakteristisch für IN sind, könnte im Sinne der Genauigkeit eine Sortierung der Zellen vor Probenentnahme durchgeführt werden,

beispielsweise mittels Durchflusszytometrie. Die Zellsortierung würde die Untersuchung einer besser charakterisierten IN-Probe ermöglichen.

Selbst wenn Wiederholungen der hier gezeigten Versuche dieselben Ergebnisse zeigen, bleibt offen, ob die heterozygote Deletion in NRXN1 der SCZ-Patienten wirklich die Ursache der gefundenen Phänotypen darstellt. Der Literatur nach unterliegt die Ausbildung der SCZ einer multifaktoriellen Genese [9]. Das besagt, dass nicht allein die genetische Vorbelastung ausreicht, um den Ausbruch einer SCZ bei einem Individuum hervorzurufen. Träger einer heterozygoten Deletion in NRXN1 haben jedoch ein vielfach erhöhtes Risiko an der SCZ zu erkranken. Demnach ist es wahrscheinlich, dass NRXN1 Teil eines Krankheitsmechanismus ist.

Es ist auch wichtig in Betracht zu ziehen, dass Patient 1 und Patient 2 mit höchster Wahrscheinlichkeit während der pränatalen Periode, der Kindheit und / oder der Adoleszenz unterschiedlichen risikohaften Umwelt- und psychosozialen Faktoren ausgesetzt gewesen sind. Diese Faktoren können ebenfalls einen großen Einfluss auf den Ausbruch und die Entwicklung der SCZ-Erkrankung haben. Welche Gewichtung nehmen diese zusätzlichen Faktoren ein? Sind diese größtenteils verantwortlich für die veränderten Expressionsraten der IN-Marker? Hier zeigt sich wiederum, dass die Genese der SCZ eine komplexe Kombination multipler Faktoren darstellt und vieles noch unbekannt ist und weiterer stetiger Untersuchung bedarf.

5.7 Stoffwechsel kortikaler Neurone

5.7.1 Oxidative Phosphorylierung

Es sind bereits mehrfach mitochondriale Dysfunktionen in Zusammenhang mit der SCZ beschrieben worden [13,12]. Die mitochondriale Aktivität der SCZ-spezifischen Neurone fällt in dieser Arbeit geringer aus, als die der Kontrollzelllinie KON4-B (WISCI004-B). Das ist sowohl durch die verringerte basale Respiration als auch durch die deutlich reduzierte maximale Respiration und respiratorische Reservekapazität erkenntlich. Eine andere Studie analysierte bereits die mitochondriale Atmung iPSC-abgeleiteter kortikaler Neurone ebenfalls mithilfe des *Seahorse XF Analyzers* [135]. Diese Studie verglich ebenfalls SCZ-spezifische Neurone und Kontrollen mit dem Ergebnis, dass die maximale Respiration als auch die respiratorische Reservekapazität bei der SCZ gegenüber der Kontrolle signifikant reduziert ist. Jedoch zeigte sich keine Veränderung der basalen Respiration. Das unterscheidet die publizierte Studie von den Ergebnissen dieser Arbeit. Eine mögliche Ursache könnte sein, dass die genannte Studie zu jedem SCZ-Patienten

eine genetisch gematchte Kontrolle verwendete. Außerdem untersucht die besagte Studie kortikale IN und PZ getrennt voneinander. In dieser Arbeit wurde eine Co-Kultur beider Neuronentypen untersucht. Die glutamatergen Neurone der genannten Studie von Ni und Kollegen zeigte hingegen keine Einschränkung in der respiratorischen Atmung. Ebenso konnte mithilfe von Transkriptionsanalysen in der Studie gezeigt werden, dass die Expression OXPHOS-relevanter Gene in den iPSC-abgeleiteten kortikalen IN signifikant bei SCZ gegenüber der Kontrolle vermindert ist. Die Expression dieser Gene war bei den iPSC-abgeleiteten PZ Neuronen jedoch nicht verändert. Diese Ergebnisse lassen folgende Schlussfolgerungen zu: Eine verminderte Expression OXPHOS-relevanter Gene führt nachweislich zu einer eingeschränkten respiratorischen Funktion der Mitochondrien.

Diese Hypothese basiert auch auf Ergebnissen von Expressionsanalysen aus PM-Studien, in denen Expressionsreduktionen und Aktivitätsmuster der OXPHOS-Bestandteile im Zusammenhang mit der SCZ beschrieben wurden [136,137]. Mithilfe von PM-Studien ist ein Zusammenhang zwischen eingeschränkter mitochondrialer Funktion, genauer der OXPHOS-Funktionalität, mit einer gesteigerten Bildung reaktiver Sauerstoffverbindungen in den Mitochondrien beschrieben worden [138,65,137]. Folgen des sogenannten oxidativen Stresses sind Schäden an Lipiden, Proteinen und DNA [139]. PM-Studien deuten darauf hin, dass Neurone bei der SCZ vermehrten reaktiven Sauerstoffverbindungen beziehungsweise oxidativem Stress ausgesetzt sind [140,138,137].

In einem weiteren iPSC-Modell konnte mithilfe von Expressionsanalysen gezeigt werden, dass bei der SCZ die Zellen einem erhöhtem oxidativen Stress ausgesetzt sind und einen dadurch induzierten Schaden vorweisen [22]. Starker Schaden an Zellen aufgrund von oxidativem Stress führt zur Apoptose. Da Neurone postmitotische Zellen sind und keiner Erneuerung unterliegen, sind die Folgen des oxidativen Stresses für das Gehirn weitreichender als bei regenerativen Geweben. Aufgrund des hohen Lipidgehaltes und der hohen metabolischen Aktivität, sind Neurone besonders anfällig für oxidativen Stress [139]. Es gibt Hinweise zur Annahme, dass besonders die PVALB-positiven IN empfänglich für oxidativen Stress und dem dadurch induzierten Schaden sind. Daher nehmen sie eine wichtige Rolle im Pathomechanismus der SCZ ein [141]. In mehreren Maus- und Rattenmodellen, die bekannte Risikofaktoren für SCZ tragen, wurde gezeigt, dass es eine negative Korrelation zwischen gesteigertem oxidativem Stress und verminderter PVALB-Expression gibt [94]. In einer weiteren PM-Studie zeigten Transkriptionsanalysen von PVALB-positiven kortikalen IN und von

PZ der Lamina 3, dass Gene der mitochondrialen Funktion in beiden Zelltypen verändert exprimiert sind. 22 von 91 Genen, die für die Funktion OXPHOS notwendig sind, sind bei PVALB-positiven kortikalen IN der Lamina 3 geringer exprimiert. Eine verringerte ATP-Produktion und höhere Aussetzung gegenüber oxidativem Stress ist bei diesen Zellen anzunehmen [138]. Ein Mausmodell zeigt, eine mitochondriale Dysfunktion in PVALB-positiven IN führt zu veränderten Gamma-Oszillationen, verändertem Sozialverhalten und verändertem sensomotorischen *gating* [142].

Da die aus iPSC-abgeleiteten Neurone dieser Arbeit eine eingeschränkte respiratorische Funktion vorweisen, kommt die Vermutung auf, dass die Expression OXPHOS-relevanter Gene ebenfalls pathologisch verändert sein könnte. Es wurde bereits beschrieben, dass die calciumbindenden Proteine neuroprotektive Eigenschaften übernehmen und Neurone vor oxidativem Stress schützen. Liegt bei der SCZ eine verminderte Expression des calciumbindenden Proteins PVALB vor, könnte der Verlust der neuroprotektiven Funktion des PVALB mit einem vermehrten Auftreten des oxidativen Stresses und einer verminderten metabolischen Respiration in diesem Zelltyp in Zusammenhang stehen. In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass SCZ-Patienten, die eine heterozygote Deletion in NRXN1 tragen, neben der veränderten Transkription von IN-Markern ebenfalls eine eingeschränkte mitochondriale Funktionalität vorweisen. Es erscheint sinnvoll, zukünftig den Einfluss des oxidativen Stresses in weiteren Versuchen genauer zu untersuchen.

5.7.2 Glykolyse

In einer der bereits vorgestellten PM-Studie wurde eine signifikante Hochregulierung des Insulins und des *insulin like growth factor 2* im PFC bei SCZ-Erkrankten gefunden. Diese beiden Proteine regulieren die Expression glykolytischer Enzyme [137]. Eine Expressionssteigerung von Insulin und *insulin like growth factor 2* kann als Kompensationsmechanismus zum relativen Energiemangel verstanden werden. Der Energiemangel kommt durch die Einschränkung der OXPHOS und der damit einhergehenden verminderten ATP-Produktion zustande. Es besteht die Annahme, dass SCZ-Patienten eine gesteigerte Glykolyse zur Deckung des Energiebedarfs aufzeigen. Humane *in vivo* Untersuchungen stützen diese Annahme mithilfe bildgebender Verfahren oder Liquor-Untersuchungen [143–145].

In dieser Arbeit wurde die Glykolyse in SCZ-spezifischen Neuronen untersucht. Im Vergleich wurden die mitotisch aktiven und immortalisierten OL der Zelllinie MO3.13 untersucht. Die basale Glykolyse als auch die glykolytische Reservekapazität der

SCZ-spezifischen Neurone erreichte nicht das Level der mitotisch aktiven MO3.13. Sowohl die basale als auch die kompensatorische Glykolyse fallen in den SCZ-spezifischen Neuronen trotz sehr stark erhöhter Zellzahl geringer aus als in der reifen Zelllinie MO3.13. Das Ergebnis ist nicht ungewöhnlich, denn bei den untersuchten SCZ-Linien handelt es sich um eine neurale Kultur, die hauptsächlich postmitotische Nervenzellen beinhaltet. Postmitotische Neurone decken den eigenen Energiebedarf hauptsächlich über die OXPHOS [66]. OL nutzen, wie auch proliferative Zellen, hauptsächlich die Glykolyse, um ihren Energiebedarf zu decken [146]. Um jedoch zu überprüfen, ob bei SCZ-Patienten in diesem iPSC-Modell eine gesteigerte basale Glykolyse beziehungsweise glykolytische Reservekapazität vorliegt, gilt es diese im Vergleich zu generierten Neuronen einer gesunden Kontrolllinie zu untersuchen. Ein ähnlicher Versuchsaufbau wie für den Mito-Stress-Test sollte angestrebt werden. Leider war dies im Rahmen dieser Arbeit nicht möglich, da die generierten Neurone der Kontrollzelllinie zum Zeitpunkt der Messung nicht mehr zur Verfügung standen.

Die Durchführung des *Glycolytic-Rate-Assays* an der Zelllinie MO3.13 in den verschiedenen Gruppen zeigt, dass eine bestimmte Zellzahl notwendig ist, um die Stoffwechseleränderung durch den *Seahors Flux Analyzer* erfassen zu können. Es handelt sich bei allen drei Gruppen um dieselbe Zelllinie, jedoch unterscheidet sich deren Zellzahl zwischen den verschiedenen Gruppen. Gruppe 1 und Gruppe 2 zeigen eine geringere basale und kompensatorische Glykolyse. Da es sich bei allen Gruppen um dieselbe Zelllinie handelt und davon auszugehen ist, dass jede Zelle einer Linie die gleichen Stoffwechseleigenschaften mitbringt, sind die Unterschiede auf die zu geringe Zellzahl zurückzuführen. Bei zu geringen Zellzahlen können die Veränderungen durch das Gerät nicht erfasst werden. Um deutliche Effekte zu sehen, sind mindestens 30.000 Zellen notwendig. Die Vermutung könnte aufkommen, dass die geringe basale und kompensatorische Glykolyse der Neurone ebenfalls durch eine verminderte Zellzahl zustande gekommen sei. Das ist jedoch unwahrscheinlich, da für den *Mito-Stress-Test* ebenfalls nur 30.000 Zellen ausgesät worden sind und deutliche Veränderungen im Stoffwechsel beobachtet werden konnten. Der Versuch sollte mit Neuronen, die einem jüngeren Tag in ihrem Differenzierungsdurchlauf entsprechen, wiederholt werden, um eine bessere Vergleichbarkeit zum *Mito-Stress-Test* zu erzielen. Der *Mito-Stress-Test* wurde an 90 d der Differenzierung durchgeführt.

6 Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass iPSC für ein *in vitro*-Modell zur Analyse der SCZ verwendet werden können. Dabei wurden aus iPSC kortikale Neurone generiert, welche die patientenspezifischen genetischen Informationen des Spenders tragen. Es wurde gezeigt, dass Neurone von Patienten, die eine heterozygote Deletion in NRXN1 tragen, ein stark verändertes Transkriptionsmuster von molekularen Markern der verschiedenen Hauptklassen von IN tragen. Weiterhin war auch die Transkription von Entwicklungsmarkern von IN verändert. Diese Ergebnisse zeigen, dass NRXN1 an der Entwicklung von IN beteiligt ist. Im Rahmen dieser Arbeit wurde gezeigt, dass Neurone von Patienten mit einer heterozygoten Deletion in NRXN1 ebenfalls eine verminderte mitochondriale Funktion aufweisen. Veränderungen sowohl im Expressionsmuster molekularer Marker für IN als auch Veränderungen im Stoffwechsel bezüglich einer gestörten mitochondrialen Energiegewinnung wurden bereits mehrfach in der Literatur im Zusammenhang mit der SCZ beschrieben und stehen im Einklang mit den Ergebnissen dieser Arbeit. Jedoch wurde ein solches Ergebnis noch nicht im direkten Zusammenhang mit einer Veränderung des Gens NRXN1 veröffentlicht. Dieser Zusammenhang wird im Rahmen dieser Arbeit erstmalig beschrieben. Um diesen Zusammenhang hinsichtlich der Entstehung und Behandlung der SCZ besser zu verstehen, bedarf es weiterer Untersuchungen.

Sollten sich die in dieser Arbeit gewonnen Erkenntnisse in vertiefenden Studien weiter bestätigen, besteht die Möglichkeit, dass Patienten, die an SCZ leiden, in Zukunft davon profitieren. SCZ-Patienten vom LGM-Typ könnten von einer Therapie profitieren, die den GABAergen Signalweg modelliert. Es kommt erschwerend hinzu, dass auch diagnostische Möglichkeiten weiterentwickelt werden müssen, um diesen Typ der SCZ *in vivo* erkennen zu können. Die aktuelle Literatur deutet darauf hin, dass ein Elektroenzephalogramm, welches die Gamma-Oszillationen misst, kombiniert mit einer Magnetresonanztomographie, welche die kortikale Konzentration von GABA messen kann, als geeignete Verfahren in Betracht gezogen werden können. Das hier etablierte iPSC-basierte *in vitro*-Modell stellt eine Möglichkeit dar, die humanen molekularen Pathomechanismen der SCZ zu erforschen und zu verstehen. Das Modell ermöglicht ebenfalls, neue Angriffspunkte medikamentöser Therapien zu erforschen und Medikamentenscreenings durchzuführen, um in Zukunft den Patienten, die an SCZ leiden, weitere Therapieoptionen anbieten zu können.

7 Literaturverzeichnis

1. Schultz SH, North SW, Shields CG (2007) Schizophrenia: a review. *American family physician* 75 (12): 1821–1829.
2. Falkai P, Wittchen H-U, Döpfner M, Gaebel W, Maier W et al., editors (2018) Diagnostisches und statistisches Manual psychischer Störungen DSM-5®. Göttingen: Hogrefe. S. 133-142 p.
3. Reichenberg A, Caspi A, Harrington H, Houts R, Keefe RSE et al. (2010) Static and dynamic cognitive deficits in childhood preceding adult schizophrenia: a 30-year study. *The American journal of psychiatry* 167 (2): 160–169.
4. Wubeshet YS, Mohammed OS, Desse TA (2019) Prevalence and management practice of first generation antipsychotics induced side effects among schizophrenic patients at Amanuel Mental Specialized Hospital, central Ethiopia: cross-sectional study. *BMC psychiatry* 19 (1): 32.
5. Pillinger T, McCutcheon RA, Vano L, Mizuno Y, Arumham A et al. (2020) Comparative effects of 18 antipsychotics on metabolic function in patients with schizophrenia, predictors of metabolic dysregulation, and association with psychopathology: a systematic review and network meta-analysis. *The Lancet Psychiatry* 7 (1): 64–77.
6. Owen MJ, Sawa A, Mortensen PB (2016) Schizophrenia. *The Lancet* 388 (10039): 86–97.
7. Yang AC, Tsai S-J (2017) New Targets for Schizophrenia Treatment beyond the Dopamine Hypothesis. *International journal of molecular sciences* 18 (8).
8. Rujescu D, Ingason A, Cichon S, Pietiläinen OPH, Barnes MR et al. (2009) Disruption of the neurexin 1 gene is associated with schizophrenia. *Human molecular genetics* 18 (5): 988–996.
9. Davis J, Eyre H, Jacka FN, Dodd S, Dean O et al. (2016) A review of vulnerability and risks for schizophrenia: Beyond the two hit hypothesis. *Neuroscience and biobehavioral reviews* 65: 185–194.
10. Pardiñas AF, Holmans P, Pocklington AJ, Escott-Price V, Ripke S et al. (2018) Common schizophrenia alleles are enriched in mutation-intolerant genes and in regions under strong background selection. *Nature genetics* 50 (3): 381–389.
11. Guidotti A, Auta J, Davis JM, Di-Giorgi-Gerevini V, Dwivedi Y et al. (2000) Decrease in reelin and glutamic acid decarboxylase67 (GAD67) expression in schizophrenia and bipolar disorder: a postmortem brain study. *Archives of general psychiatry* 57 (11): 1061–1069.
12. Bergman O, Ben-Shachar D (2016) Mitochondrial Oxidative Phosphorylation System (OXPHOS) Deficits in Schizophrenia: Possible Interactions with Cellular Processes. *Canadian journal of psychiatry. Revue canadienne de psychiatrie* 61 (8): 457–469.
13. Cuperfain AB, Zhang ZL, Kennedy JL, Gonçalves VF (2018) The Complex Interaction of Mitochondrial Genetics and Mitochondrial Pathways in Psychiatric Disease. *Molecular neuropsychiatry* 4 (1): 52–69.
14. Dienel SJ, Lewis DA (2019) Alterations in cortical interneurons and cognitive function in schizophrenia. *Neurobiology of disease* 131: 104208.
15. Shi Y, Inoue H, Wu JC, Yamanaka S (2017) Induced pluripotent stem cell technology: a decade of progress. *Nature reviews. Drug discovery* 16 (2): 115–130.
16. Takahashi K, Yamanaka S (2006) Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 126 (4): 663–676.
17. Jung M, Rujescu D (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): 679–680.
18. Imaizumi Y, Okano H (2014) Modeling human neurological disorders with induced pluripotent stem cells. *Journal of neurochemistry* 129 (3): 388–399.

19. Noh H, Shao Z, Coyle JT, Chung S (2017) Modeling schizophrenia pathogenesis using patient-derived induced pluripotent stem cells (iPSCs). *Biochimica et biophysica acta. Molecular basis of disease* 1863 (9): 2382–2387.
20. Nicholas CR, Chen J, Tang Y, Southwell DG, Chalmers N et al. (2013) Functional maturation of hPSC-derived forebrain interneurons requires an extended timeline and mimics human neural development. *Cell stem cell* 12 (5): 573–586.
21. Mariani J, Simonini MV, Palejev D, Tomasini L, Coppola G et al. (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): 12770–12775.
22. Brennand K, Savas JN, Kim Y, Tran N, Simone A et al. (2015) Phenotypic differences in hiPSC NPCs derived from patients with schizophrenia. *Molecular psychiatry* 20 (3): 361–368.
23. Silbereis JC, Pochareddy S, Zhu Y, Li M, Sestan N (2016) The Cellular and Molecular Landscapes of the Developing Human Central Nervous System. *Neuron* 89 (2): 248–268.
24. Dubuis-Grieder C (2009) Allgemeine Entwicklung des Gehirns. Available: <http://www.embryology.ch/allemand/vcns/vesicule02.html>. Accessed 4 February 2021.
25. Sadler TW, Langman J, Drews U (2020) Taschenlehrbuch Embryologie. Die normale menschliche Entwicklung und ihre Fehlbildungen. 536seiten p.
26. Hodge RD, Bakken TE, Miller JA, Smith KA, Barkan ER et al. (2019) Conserved cell types with divergent features in human versus mouse cortex. *Nature* 573 (7772): 61–68.
27. Hu JS, Vogt D, Sandberg M, Rubenstein JL (2017) Cortical interneuron development: a tale of time and space. *Development (Cambridge, England)* 144 (21): 3867–3878.
28. Miyoshi G, Young A, Petros T, Karayannis T, McKenzie Chang M et al. (2015) Prox1 Regulates the Subtype-Specific Development of Caudal Ganglionic Eminence-Derived GABAergic Cortical Interneurons. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 35 (37): 12869–12889.
29. Sultan KT, Shi S-H (2018) Generation of diverse cortical inhibitory interneurons. *Wiley interdisciplinary reviews. Developmental biology* 7 (2).
30. Laclef C, Métin C (2018) Conserved rules in embryonic development of cortical interneurons. *Seminars in cell & developmental biology* 76: 86–100.
31. Tremblay R, Lee S, Rudy B (2016) GABAergic Interneurons in the Neocortex: From Cellular Properties to Circuits. *Neuron* 91 (2): 260–292.
32. Lim L, Mi D, Llorca A, Marín O (2018) Development and Functional Diversification of Cortical Interneurons. *Neuron* 100 (2): 294–313.
33. Wamsley B, Fishell G (2017) Genetic and activity-dependent mechanisms underlying interneuron diversity. *Nature reviews. Neuroscience* 18 (5): 299–309.
34. Molnár Z, Butt SJB (2013) Best-laid schemes for interneuron origin of mice and men. *Nature neuroscience* 16 (11): 1512–1514.
35. Lewis DA, Curley AA, Glausier JR, Volk DW (2012) Cortical parvalbumin interneurons and cognitive dysfunction in schizophrenia. *Trends in neurosciences* 35 (1): 57–67.
36. Lewis DA, Fish KN, Arion D, Gonzalez-Burgos G (2011) Perisomatic inhibition and cortical circuit dysfunction in schizophrenia. *Current opinion in neurobiology* 21 (6): 866–872.
37. Tao Y, Zhang S-C (2016) Neural Subtype Specification from Human Pluripotent Stem Cells. *Cell stem cell* 19 (5): 573–586.
38. Dubuis-Grieder C (2009) Entwicklung des Telencephalons (erstes Hirnbläschen). Available: <http://www.embryology.ch/allemand/vcns/telenceph01.html>. Accessed 11 February 2021.
39. Ma T, Wang C, Wang L, Zhou X, Tian M et al. (2013) Subcortical origins of human and monkey neocortical interneurons. *Nature neuroscience* 16 (11): 1588–1597.
40. Al-Jaberi N, Lindsay S, Sarma S, Bayatti N, Clowry GJ (2015) The early fetal development of human neocortical GABAergic interneurons. *Cerebral cortex* 25 (3): 631–645.

41. Radonjić NV, Ayoub AE, Memi F, Yu X, Maroof A et al. (2014) Diversity of cortical interneurons in primates: the role of the dorsal proliferative niche. *Cell reports* 9 (6): 2139–2151.
42. Ansen-Wilson LJ, Lipinski RJ (2017) Gene-environment interactions in cortical interneuron development and dysfunction: A review of preclinical studies. *Neurotoxicology* 58: 120–129.
43. Achim K, Salminen M, Partanen J (2014) Mechanisms regulating GABAergic neuron development. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 71 (8): 1395–1415.
44. Anderson S, Mione M, Yun K, Rubenstein JL (1999) Differential origins of neocortical projection and local circuit neurons: role of *Dlx* genes in neocortical interneuronogenesis. *Cerebral cortex* 9 (6): 646–654.
45. Pleasure SJ, Anderson S, Hevner R, Bagri A, Marin O et al. (2000) Cell migration from the ganglionic eminences is required for the development of hippocampal GABAergic interneurons. *Neuron* 28 (3): 727–740.
46. Lodato S, Tomassy GS, Leonibus E de, Uzcategui YG, Andolfi G et al. (2011) Loss of COUP-TFI alters the balance between caudal ganglionic eminence- and medial ganglionic eminence-derived cortical interneurons and results in resistance to epilepsy. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 31 (12): 4650–4662.
47. Hu JS, Vogt D, Lindtner S, Sandberg M, Silberberg SN et al. (2017) Coup-TF1 and Coup-TF2 control subtype and laminar identity of MGE-derived neocortical interneurons. *Development* 144 (15): 2837–2851.
48. Mauney SA, Pietersen CY, Sonntag K-C, Woo T-UW (2015) Differentiation of oligodendrocyte precursors is impaired in the prefrontal cortex in schizophrenia. *Schizophrenia research* 169 (1-3): 374–380.
49. Anderson NC, Chen CY, Grabel L (2016) Hedgehog Promotes Production of Inhibitory Interneurons in Vivo and in Vitro from Pluripotent Stem Cells. *Journal of developmental biology* 4 (3).
50. Xu Q, Wonders CP, Anderson SA (2005) Sonic hedgehog maintains the identity of cortical interneuron progenitors in the ventral telencephalon. *Development* 132 (22): 4987–4998.
51. Xu Q, Guo L, Moore H, Waclaw RR, Campbell K et al. (2010) Sonic hedgehog signaling confers ventral telencephalic progenitors with distinct cortical interneuron fates. *Neuron* 65 (3): 328–340.
52. Tyson JA, Goldberg EM, Maroof AM, Xu Q, Petros TJ et al. (2015) Duration of culture and sonic hedgehog signaling differentially specify PV versus SST cortical interneuron fates from embryonic stem cells. *Development* 142 (7): 1267–1278.
53. Nóbrega-Pereira S, Kessar N, Du T, Kimura S, Anderson SA et al. (2008) Postmitotic *Nkx2-1* controls the migration of telencephalic interneurons by direct repression of guidance receptors. *Neuron* 59 (5): 733–745.
54. Sussel L, Marin O, Kimura S, Rubenstein JL (1999) Loss of *Nkx2.1* homeobox gene function results in a ventral to dorsal molecular respecification within the basal telencephalon: evidence for a transformation of the pallidum into the striatum. *Development* 126 (15): 3359–3370.
55. Xu Q, Cobos I, La Cruz E de, Rubenstein JL, Anderson SA (2004) Origins of cortical interneuron subtypes. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 24 (11): 2612–2622.
56. Du T, Xu Q, Ocbina PJ, Anderson SA (2008) *NKX2.1* specifies cortical interneuron fate by activating *Lhx6*. *Development* 135 (8): 1559–1567.
57. Liodis P, Denaxa M, Grigoriou M, Akufo-Addo C, Yanagawa Y et al. (2007) *Lhx6* activity is required for the normal migration and specification of cortical interneuron subtypes. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 27 (12): 3078–3089.
58. Malt EA, Juhasz K, Malt UF, Naumann T (2016) A Role for the Transcription Factor *Nk2 Homeobox 1* in Schizophrenia: Convergent Evidence from Animal and Human Studies. *Frontiers in behavioral neuroscience* 10: 59.

59. Volk DW, Edelson JR, Lewis DA (2014) Cortical inhibitory neuron disturbances in schizophrenia: role of the ontogenetic transcription factor Lhx6. *Schizophrenia Bulletin* 40 (5): 1053–1061.
60. Vogt D, Hunt RF, Mandal S, Sandberg M, Silberberg SN et al. (2014) Lhx6 Directly Regulates Arx and CXCR7 to Determine Cortical Interneuron Fate and Laminar Position. *Neuron* 82 (2): 350–364.
61. Grigoriou M, Tucker AS, Sharpe PT, Pachnis V (1998) Expression and regulation of Lhx6 and Lhx7, a novel subfamily of LIM homeodomain encoding genes, suggests a role in mammalian head development. *Development* 125 (11): 2063–2074.
62. Neves G, Shah MM, Liodis P, Achimastou A, Denaxa M et al. (2013) The LIM homeodomain protein Lhx6 regulates maturation of interneurons and network excitability in the mammalian cortex. *Cerebral cortex* 23 (8): 1811–1823.
63. Wu P-R, Cho KKA, Vogt D, Sohal VS, Rubenstein JLR (2017) The Cytokine CXCL12 Promotes Basket Interneuron Inhibitory Synapses in the Medial Prefrontal Cortex. *Cerebral cortex* 27 (9): 4303–4313.
64. Ma T, Zhang Q, Cai Y, You Y, Rubenstein JLR et al. (2012) A subpopulation of dorsal lateral/caudal ganglionic eminence-derived neocortical interneurons expresses the transcription factor Sp8. *Cerebral cortex* 22 (9): 2120–2130.
65. Breuer ME, Koopman WJ, Koene S, Nooteboom M, Rodenburg RJ et al. (2013) The role of mitochondrial OXPHOS dysfunction in the development of neurologic diseases. *Neurobiology of disease* 51: 27–34.
66. Zheng X, Boyer L, Jin M, Mertens J, Kim Y et al. (2016) Metabolic reprogramming during neuronal differentiation from aerobic glycolysis to neuronal oxidative phosphorylation. *eLife* 5.
67. Südhof TC (2017) Synaptic Neurexin Complexes: A Molecular Code for the Logic of Neural Circuits. *Cell* 171 (4): 745–769.
68. Gomez AM, Traunmüller L, Scheiffele P (2021) Neurexins: molecular codes for shaping neuronal synapses. *Nature reviews. Neuroscience*.
69. Reissner C, Runkel F, Missler M (2013) Neurexins. *Genome biology* 14 (9): 213.
70. Lowther C, Speevak M, Armour CM, Goh ES, Graham GE et al. (2017) Molecular characterization of NRXN1 deletions from 19,263 clinical microarray cases identifies exons important for neurodevelopmental disease expression. *Genetics in medicine : official journal of the American College of Medical Genetics* 19 (1): 53–61.
71. Treutlein B, Gokce O, Quake SR, Südhof TC (2014) Cartography of neurexin alternative splicing mapped by single-molecule long-read mRNA sequencing. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111 (13): E1291-9.
72. Kirov G, Rujescu D, Ingason A, Collier DA, O'Donovan MC et al. (2009) Neurexin 1 (NRXN1) Deletions in Schizophrenia. *Schizophrenia Bulletin* 35 (5): 851–854.
73. Viñas-Jornet M, Esteba-Castillo S, Gabau E, Ribas-Vidal N, Baena N et al. (2014) A common cognitive, psychiatric, and dysmorphic phenotype in carriers of NRXN1 deletion. *Molecular genetics & genomic medicine* 2 (6): 512–521.
74. Sun C, Cheng M-C, Qin R, Liao D-L, Chen T-T et al. (2011) Identification and functional characterization of rare mutations of the neuroligin-2 gene (NLGN2) associated with schizophrenia. *Human molecular genetics* 20 (15): 3042–3051.
75. Yu J, Vodyanik MA, Smuga-Otto K, Antosiewicz-Bourget J, Frane JL et al. (2007) Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science* 318 (5858): 1917–1920.
76. Yu J, Hu K, Smuga-Otto K, Tian S, Stewart R et al. (2009) Human induced pluripotent stem cells free of vector and transgene sequences. *Science* 324 (5928): 797–801.
77. Brunger AT (2000) Structural insights into the molecular mechanism of Ca(2+)-dependent exocytosis. *Current opinion in neurobiology* 10 (3): 293–302.
78. Xu J, Mashimo T, Südhof TC (2007) Synaptotagmin-1, -2, and -9: Ca(2+) sensors for fast release that specify distinct presynaptic properties in subsets of neurons. *Neuron* 54 (4): 567–581.

79. Romaniello R, Arrigoni F, Fry AE, Bassi MT, Rees MI et al. (2018) Tubulin genes and malformations of cortical development. *European journal of medical genetics* 61 (12): 744–754.
80. Marín O (2012) Interneuron dysfunction in psychiatric disorders. *Nature reviews. Neuroscience* 13 (2): 107–120.
81. Minzenberg MJ, Firl AJ, Yoon JH, Gomes GC, Reinking C et al. (2010) Gamma oscillatory power is impaired during cognitive control independent of medication status in first-episode schizophrenia. *Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology* 35 (13): 2590–2599.
82. Cho RY, Konecky RO, Carter CS (2006) Impairments in frontal cortical gamma synchrony and cognitive control in schizophrenia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103 (52): 19878–19883.
83. Volk DW, Lewis DA (2014) Early developmental disturbances of cortical inhibitory neurons: contribution to cognitive deficits in schizophrenia. *Schizophrenia Bulletin* 40 (5): 952–957.
84. Whittington MA, Traub RD, Faulkner HJ, Jefferys JG, Chettiar K (1998) Morphine disrupts long-range synchrony of gamma oscillations in hippocampal slices. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95 (10): 5807–5811.
85. Nguyen T-M, Schreiner D, Le Xiao, Traunmüller L, Bornmann C et al. (2016) An alternative splicing switch shapes neurexin repertoires in principal neurons versus interneurons in the mouse hippocampus. *eLife* 5.
86. Futai K, Doty CD, Baek B, Ryu J, Sheng M (2013) Specific trans-synaptic interaction with inhibitory interneuronal neurexin underlies differential ability of neuroligins to induce functional inhibitory synapses. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 33 (8): 3612–3623.
87. Chen LY, Jiang M, Zhang B, Gokce O, Südhof TC (2017) Conditional Deletion of All Neurexins Defines Diversity of Essential Synaptic Organizer Functions for Neurexins. *Neuron* 94 (3): 611-625.e4.
88. Pak C, Danko T, Zhang Y, Aoto J, Anderson G et al. (2015) Human Neuropsychiatric Disease Modeling using Conditional Deletion Reveals Synaptic Transmission Defects Caused by Heterozygous Mutations in NRXN1. *Cell stem cell* 17 (3): 316–328.
89. Jenkins AK, Paterson C, Wang Y, Hyde TM, Kleinman JE et al. (2016) Neurexin 1 (NRXN1) splice isoform expression during human neocortical development and aging. *Molecular psychiatry* 21 (5): 701–706.
90. Földy C, Darmanis S, Aoto J, Malenka RC, Quake SR et al. (2016) Single-cell RNAseq reveals cell adhesion molecule profiles in electrophysiologically defined neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 113 (35): E5222-31.
91. Dudanova I, Tabuchi K, Rohlmann A, Südhof TC, Missler M (2007) Deletion of alpha-neurexins does not cause a major impairment of axonal pathfinding or synapse formation. *The Journal of comparative neurology* 502 (2): 261–274.
92. Fuccillo MV, Földy C, Gökce Ö, Rothwell PE, Sun GL et al. (2015) Single-Cell mRNA Profiling Reveals Cell-Type-Specific Expression of Neurexin Isoforms. *Neuron* 87 (2): 326–340.
93. Schreiner D, Simicevic J, Ahrné E, Schmidt A, Scheiffele P (2015) Quantitative isoform-profiling of highly diversified recognition molecules. *eLife* 4: e07794.
94. Steullet P, Cabungcal J-H, Coyle J, Didriksen M, Gill K et al. (2017) Oxidative stress-driven parvalbumin interneuron impairment as a common mechanism in models of schizophrenia. *Molecular psychiatry* 22 (7): 936–943.
95. Mellios N, Huang H-S, Baker SP, Galdzicka M, Ginns E et al. (2009) Molecular determinants of dysregulated GABAergic gene expression in the prefrontal cortex of subjects with schizophrenia. *Biological psychiatry* 65 (12): 1006–1014.
96. Tsubomoto M, Kawabata R, Zhu X, Minabe Y, Chen K et al. (2018) Expression of Transcripts Selective for GABA Neuron Subpopulations across the Cortical Visuospatial Working Memory Network in the Healthy State and Schizophrenia. *Cerebral cortex*.

97. Reynolds GP, Beasley CL, Zhang ZJ (2002) Understanding the neurotransmitter pathology of schizophrenia: selective deficits of subtypes of cortical GABAergic neurons. *Journal of neural transmission* 109 (5-6): 881–889.
98. Hashimoto T, Bazmi HH, Mirnics K, Wu Q, Sampson AR et al. (2008) Conserved regional patterns of GABA-related transcript expression in the neocortex of subjects with schizophrenia. *The American journal of psychiatry* 165 (4): 479–489.
99. Hashimoto T, Volk DW, Eggan SM, Mirnics K, Pierri JN et al. (2003) Gene expression deficits in a subclass of GABA neurons in the prefrontal cortex of subjects with schizophrenia. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 23 (15): 6315–6326.
100. Fung SJ, Webster MJ, Sivagnanasundaram S, Duncan C, Elashoff M et al. (2010) Expression of interneuron markers in the dorsolateral prefrontal cortex of the developing human and in schizophrenia. *The American journal of psychiatry* 167 (12): 1479–1488.
101. Chung DW, Fish KN, Lewis DA (2016) Pathological Basis for Deficient Excitatory Drive to Cortical Parvalbumin Interneurons in Schizophrenia. *The American journal of psychiatry* 173 (11): 1131–1139.
102. Beasley CL, Zhang ZJ, Patten I, Reynolds GP (2002) Selective deficits in prefrontal cortical GABAergic neurons in schizophrenia defined by the presence of calcium-binding proteins. *Biological psychiatry* 52 (7): 708–715.
103. Cotter D, Landau S, Beasley C, Stevenson R, Chana G et al. (2002) The density and spatial distribution of GABAergic neurons, labelled using calcium binding proteins, in the anterior cingulate cortex in major depressive disorder, bipolar disorder, and schizophrenia. *Biological psychiatry* 51 (5): 377–386.
104. Fung SJ, Fillman SG, Webster MJ, Shannon Weickert C (2014) Schizophrenia and bipolar disorder show both common and distinct changes in cortical interneuron markers. *Schizophrenia research* 155 (1-3): 26–30.
105. Volk DW, Matsubara T, Li S, Sengupta EJ, Georgiev D et al. (2012) Deficits in transcriptional regulators of cortical parvalbumin neurons in schizophrenia. *The American journal of psychiatry* 169 (10): 1082–1091.
106. Volk DW, Sampson AR, Zhang Y, Edelson JR, Lewis DA (2016) Cortical GABA markers identify a molecular subtype of psychotic and bipolar disorders. *Psychological medicine* 46 (12): 2501–2512.
107. Hashimoto T, Arion D, Unger T, Maldonado-Avilés JG, Morris HM et al. (2008) Alterations in GABA-related transcriptome in the dorsolateral prefrontal cortex of subjects with schizophrenia. *Molecular psychiatry* 13 (2): 147–161.
108. Chance SA, Walker M, Crow TJ (2005) Reduced density of calbindin-immunoreactive interneurons in the planum temporale in schizophrenia. *Brain research* 1046 (1-2): 32–37.
109. Daviss SR, Lewis DA (1995) Local circuit neurons of the prefrontal cortex in schizophrenia: selective increase in the density of calbindin-immunoreactive neurons. *Psychiatry research* 59 (1-2): 81–96.
110. Eyles DW, McGrath JJ, Reynolds GP (2002) Neuronal calcium-binding proteins and schizophrenia. *Schizophrenia research* 57 (1): 27–34.
111. Caberlotto L, Hurd YL (1999) Reduced neuropeptide Y mRNA expression in the prefrontal cortex of subjects with bipolar disorder. *Neuroreport* 10 (8): 1747–1750.
112. Morris HM, Stopczynski RE, Lewis DA (2009) NPY mRNA expression in the prefrontal cortex: Selective reduction in the superficial white matter of subjects with schizoaffective disorder. *Schizophrenia research* 115 (2-3): 261–269.
113. Kähler AK, Djurovic S, Kulle B, Jönsson EG, Agartz I et al. (2008) Association analysis of schizophrenia on 18 genes involved in neuronal migration: MDGA1 as a new susceptibility gene. *American journal of medical genetics. Part B, Neuropsychiatric genetics : the official publication of the International Society of Psychiatric Genetics* 147B (7): 1089–1100.
114. Hahl G, Schmitt A, Zink M, Wilmsdorff M von, Yeganeh-Doost P et al. (2012) Decreased reelin expression in the left prefrontal cortex (BA9) in chronic schizophrenia patients. *Neuropsychobiology* 66 (1): 57–62.

115. Impagnatiello F, Guidotti AR, Pesold C, Dwivedi Y, Caruncho H et al. (1998) A decrease of reelin expression as a putative vulnerability factor in schizophrenia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95 (26): 15718–15723.
116. Boyd PJ, Cunliffe VT, Roy S, Wood JD (2015) Sonic hedgehog functions upstream of disrupted-in-schizophrenia 1 (*disc1*): implications for mental illness. *Biology open* 4 (10): 1336–1343.
117. Georgieva L, Moskvina V, Peirce T, Norton N, Bray NJ et al. (2006) Convergent evidence that oligodendrocyte lineage transcription factor 2 (*OLIG2*) and interacting genes influence susceptibility to schizophrenia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103 (33): 12469–12474.
118. Huang K, Tang W, Tang R, Xu Z, He Z et al. (2008) Positive association between *OLIG2* and schizophrenia in the Chinese Han population. *Human genetics* 122 (6): 659–660.
119. Usui H, Takahashi N, Saito S, Ishihara R, Aoyama N et al. (2006) The 2',3'-cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase and oligodendrocyte lineage transcription factor 2 genes do not appear to be associated with schizophrenia in the Japanese population. *Schizophrenia research* 88 (1-3): 245–250.
120. Hayashi Y, Nihonmatsu-Kikuchi N, Hisanaga S, Yu X, Tatebayashi Y (2012) Neuropathological similarities and differences between schizophrenia and bipolar disorder: a flow cytometric postmortem brain study. *PLoS one* 7 (3): e33019.
121. Mitkus SN, Hyde TM, Vakkalanka R, Kolachana B, Weinberger DR et al. (2008) Expression of oligodendrocyte-associated genes in dorsolateral prefrontal cortex of patients with schizophrenia. *Schizophrenia research* 98 (1-3): 129–138.
122. Volk DW, Chitrapu A, Edelson JR, Lewis DA (2015) Chemokine receptors and cortical interneuron dysfunction in schizophrenia. *Schizophrenia research* 167 (1-3): 12–17.
123. Cash-Padgett T, Sawa A, Jaaro-Peled H (2016) Increased stereotypy in conditional *Cxcr4* knockout mice. *Neuroscience research* 105: 75–79.
124. Laroche F, Ramoz N, Leroy S, Fortin C, Rousselot-Paillet B et al. (2008) Polymorphisms of coding trinucleotide repeats of homeogenes in neurodevelopmental psychiatric disorders. *Psychiatric genetics* 18 (6): 295–301.
125. Joshi D, Fung SJ, Rothwell A, Weickert CS (2012) Higher gamma-aminobutyric acid neuron density in the white matter of orbital frontal cortex in schizophrenia. *Biological psychiatry* 72 (9): 725–733.
126. Volk DW, Edelson JR, Lewis DA (2016) Altered expression of developmental regulators of parvalbumin and somatostatin neurons in the prefrontal cortex in schizophrenia. *Schizophrenia research* 177 (1-3): 3–9.
127. Kromkamp M, Uylings HBM, Smidt MP, Hellemons AJCGM, Burbach JPH et al. (2003) Decreased thalamic expression of the homeobox gene *DLX1* in psychosis. *Archives of general psychiatry* 60 (9): 869–874.
128. Feigenson KA, Kusnecov AW, Silverstein SM (2014) Inflammation and the two-hit hypothesis of schizophrenia. *Neuroscience and biobehavioral reviews* 38: 72–93.
129. Richetto J, Massart R, Weber-Stadlbauer U, Szyf M, Riva MA et al. (2017) Genome-wide DNA Methylation Changes in a Mouse Model of Infection-Mediated Neurodevelopmental Disorders. *Biological psychiatry* 81 (3): 265–276.
130. Kondo K, Ikeda M, Kajio Y, Saito T, Iwayama Y et al. (2013) Genetic variants on 3q21 and in the *Sp8* transcription factor gene (*SP8*) as susceptibility loci for psychotic disorders: a genetic association study. *PLoS one* 8 (8): e70964.
131. Cobos I, Calcagnotto ME, Vilaythong AJ, Thwin MT, Noebels JL et al. (2005) Mice lacking *Dlx1* show subtype-specific loss of interneurons, reduced inhibition and epilepsy. *Nature neuroscience* 8 (8): 1059–1068.
132. Rouhani F, Kumasaka N, Brito MC de, Bradley A, Vallier L et al. (2014) Genetic background drives transcriptional variation in human induced pluripotent stem cells. *PLoS genetics* 10 (6): e1004432.
133. Choi J, Lee S, Mallard W, Clement K, Tagliacuzzi GM et al. (2015) A comparison of genetically matched cell lines reveals the equivalence of human iPSCs and ESCs. *Nature biotechnology* 33 (11): 1173–1181.

134. Laurent LC, Ulitsky I, Slavin I, Tran H, Schork A et al. (2011) Dynamic Changes in the Copy Number of Pluripotency and Cell Proliferation Genes in Human ES and iPS Cells during Reprogramming and Time in Culture. *Cell stem cell* 8 (1): 106–118.
135. Ni P, Noh H, Park G-H, Shao Z, Guan Y et al. (2019) iPSC-derived homogeneous populations of developing schizophrenia cortical interneurons have compromised mitochondrial function. *Molecular psychiatry*.
136. Maurer I, Zierz S, Möller H (2001) Evidence for a mitochondrial oxidative phosphorylation defect in brains from patients with schizophrenia. *Schizophrenia research* 48 (1): 125–136.
137. Prabakaran S, Swatton JE, Ryan MM, Huffaker SJ, Huang JT-J et al. (2004) Mitochondrial dysfunction in schizophrenia: evidence for compromised brain metabolism and oxidative stress. *Molecular psychiatry* 9 (7): 684-97, 643.
138. Enwright JF, Huo Z, Arion D, Corradi JP, Tseng G et al. (2017) Transcriptome alterations of prefrontal cortical parvalbumin neurons in schizophrenia. *Molecular psychiatry* 23 (7): 1606–1613.
139. Uttara B, Singh AV, Zamboni P, Mahajan RT (2009) Oxidative stress and neurodegenerative diseases: a review of upstream and downstream antioxidant therapeutic options. *Current neuropharmacology* 7 (1): 65–74.
140. Gawryluk JW, Wang J-F, Andreatza AC, Shao L, Young LT (2011) Decreased levels of glutathione, the major brain antioxidant, in post-mortem prefrontal cortex from patients with psychiatric disorders. *The international journal of neuropsychopharmacology* 14 (1): 123–130.
141. Hardingham GE, Do KQ (2016) Linking early-life NMDAR hypofunction and oxidative stress in schizophrenia pathogenesis. *Nature reviews. Neuroscience* 17 (2): 125–134.
142. Inan M, Zhao M, Manuszak M, Karakaya C, Rajadhyaksha AM et al. (2016) Energy deficit in parvalbumin neurons leads to circuit dysfunction, impaired sensory gating and social disability. *Neurobiology of disease* 93: 35–46.
143. Du F, Cooper AJ, Thida T, Sehovic S, Lukas SE et al. (2014) In vivo evidence for cerebral bioenergetic abnormalities in schizophrenia measured using 31P magnetization transfer spectroscopy. *JAMA psychiatry* 71 (1): 19–27.
144. Rowland LM, Pradhan S, Korenic S, Wijtenburg SA, Hong LE et al. (2016) Elevated brain lactate in schizophrenia: a 7 T magnetic resonance spectroscopy study. *Translational psychiatry* 6 (11): e967.
145. Regenold WT, Phatak P, Marano CM, Sassan A, Conley RR et al. (2009) Elevated cerebrospinal fluid lactate concentrations in patients with bipolar disorder and schizophrenia: implications for the mitochondrial dysfunction hypothesis. *Biological psychiatry* 65 (6): 489–494.
146. Rone MB, Cui Q-L, Fang J, Wang L-C, Zhang J et al. (2016) Oligodendrogliopathy in Multiple Sclerosis: Low Glycolytic Metabolic Rate Promotes Oligodendrocyte Survival. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 36 (17): 4698–4707.

8 Thesen

1. Eine heterozygote Deletion in NRXN1 bei Schizophreniepatienten führt zu einer veränderten Transkription molekularer Marker für Interneurone in abgeleiteten Neuronen aus patientenspezifischen iPSC.
2. Eine heterozygote Deletion in NRXN1 bei Schizophreniepatienten führt zu einer verminderten Transkription der IN-Hauptklassenmarker PVALB und SST in abgeleiteten Neuronen aus patientenspezifischen iPSC.
3. Eine heterozygote Deletion in NRXN1 bei Schizophreniepatienten führt zu einer verminderten Transkription der IN-Marker CALB1 und RELN in abgeleiteten Neuronen aus patientenspezifischen iPSC.
4. Eine heterozygote Deletion in NRXN1 bei SCZ führt zu einer verminderten Transkription der TF der IN-Entwicklung ASCL1, LHX6, OLIG2, COUPTF1, CXCR4 und PROX1 in abgeleiteten Neuronen aus patientenspezifischen iPSC.
5. Die Transkription des IN-Subtypenmarker CALB2 sowie der TF DLX1 in abgeleiteten Neuronen aus patientenspezifischen iPSC ist vom vorliegenden CNV in NRXN1 bei SCZ abhängig.
6. Eine heterozygote Deletion in NRXN1 bei SCZ führt zu einer verminderten basalen respiratorischen Aktivität, zu einer verminderten maximalen respiratorischen Aktivität und zu einer verminderten respiratorischen Reservekapazität mitochondrialer Atmung in abgeleiteten Neuronen aus patientenspezifischen iPSC.

Anlagen

Tabelle 11: Zusammensetzung TAE-Puffer für Gelelektrophorese

| Name | Bestandteil | | Hersteller |
|-----------------|-------------|--|-----------------------------------|
| 10 x TAE-Puffer | 4,8 g | Tris(hydroxymethyl)-aminomethane (Tris Base) (0,4 M) | Serva Electrophoresis, Heidelberg |
| | 3,80 g | Na ₄ EDTA (0,01 M, pH 8,4) | Carl Roth, Karlsruhe |
| | ad 100 ml | Wasser destilliert | |
| 1 x TAE | 10 ml | 10 x TAE-Puffer | |
| | ad 100 ml | Wasser destilliert | |

TAE: Tris Acetat Ethylendiamintetraessigsäure, Na₄ EDTA: Tetrasodiummethylenediamintetraessigsäure

Tabelle 12: Verwendete Oligonukleotidprimer für die semiquantitative PCR

| Bezeichnung | Sequenz | Größe [bp] | RefSeq ID |
|-------------|------------------------|------------|----------------|
| h SYT1 as | gcaaaaagagcttgccccttc | 508 | NM_001135806.1 |
| h SYT1 s | gacgatgaaagatcaggccc | | NM_001291901.1 |
| h STX2 as | ctgacggcgtgtaggaagaa | 462 | NM_005639.2 |
| h STX2 s | gtctgtgggtggttctcccag | | NM_001135805.1 |
| h VAMP2 s | gccaaagctcaagcgcaaata | 373 | NM_194356.2 |
| h VAMP2 as | gcaaatgaagggacttgggg | | NM_001980.3 |
| h GAPDH s | caaggatcatcatgacaacttg | 497 | NM_014232.2 |
| h GAPDH as | gtccaccaccctgttgctgtag | | NM_001256799.2 |
| | | | NM_001289746.1 |
| | | | NM_001289745.1 |
| | | | NM_002046.5 |

h: human, s: sense, as: antisense, bp: Basenpaare, RefSeq ID: NCBI Reference Sequence Database Identifikationsnummer

Tabelle 13: Verwendete Oligonukleotidprimer für die quantitative real time PCR

| Bezeichnung | Sequenz | Größe [bp] | RefSeq ID |
|--------------|---------------------------|------------|----------------|
| h ASCL1 s | ggagcttctcgacttcacca | 128 | NM_004316.3 |
| h ASCL1 as | aacgccactgacaagaaagc | | |
| h COUPTF1 s | agaagctcaaggcgctacac | 124 | NM_005654.5 |
| h COUPTF1 as | gacttctcctgcaggctctc | | |
| h CXCR4 s | ggatcagcatcgactcctca | 61 | NM_003467.2 |
| h CXCR4 as | ttctcaaactcacacccttgctt | | |
| h NKX2.1 s | aaaccacaaaggccaaactg | 101 | NM_001008540.2 |
| h NKX2.1 as | gcgcttgggtgttttcatt | | |
| h OLIG2 s | tccaatctcaatatctgggtcaatc | 82 | NM_001348056.1 |
| h OLIG2 as | attctcccaaatcaacgagagaca | | |
| h SHH s | cagtggacatcaccacgtct | 103 | NM_000193.3 |
| h SHH as | gccttgactcgtagtacacc | | |
| h PROX 1 s | acagggtcttgaacatgcac | 111 | NM_001270616.1 |
| h PROX1 as | tgcgataatggcattgaaaa | | |

| | | | |
|------------|----------------------|-----|---|
| h GAPDH s | cagcctcaagatcatcagca | 143 | NM_001289746.1 |
| h GAPDH as | gtcttctgggtggcagtgat | | NM_001289745.1 NM_001256799.2 NM_002046.5 |

h: human, s: *sense*, as: *antisense*, bp: Basenpaare, RefSeq ID: NCBI *Reference Sequence Database* Identifikationsnummer

Tabelle 14: Vewendete *PrimePCR* Assays (Bio-Rad, München) für die quantitative *real time* PCR

| Bezeichnung | Assay ID |
|-------------|----------------|
| h PVALB | qHsaCID0014001 |
| h SST | qHsaCED0057374 |
| h CALB1 | qHsaCID0010913 |
| h CALB2 | qHsaCID0017945 |
| h RELN | qHsaCID0021778 |
| h NPY | qHsaCID0016006 |
| h DLX1 | qHsaCED0045194 |
| h DLX2 | qHsaCJD0034576 |
| h LHX6 | qHsaCED0036400 |
| h SP8 | qHsaCID0013916 |

h: human

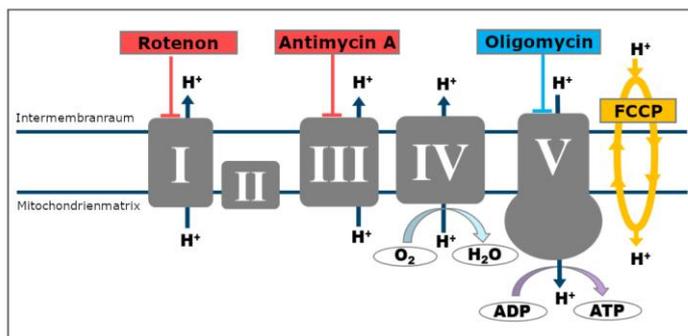


Abbildung 19: Angriffspunkte der Reagenzien des *Seahorse XF Cell Mito Stress Test* an der Elektronentransportkette der inneren Mitochondrienmembran. Rotenon hemmt Komplex I der Elektronentransportkette. Antimycin A hemmt Komplex III. Oligomycin hemmt die ATP-Synthase und verhindert dadurch die Umwandlung von ADP zu ATP. FCCP wirkt als Entkoppler der Elektronentransportkette. Dadurch folgen die Protonen ihrem Konzentrationsgradienten, unabhängig von der ATP-Synthase.

H⁺: Proton, O₂: Sauerstoff, H₂O: Wasser, ADP: Adenosindiphosphat, ATP: Adenosintriphosphat, FCCP: *carbonyl cyanide-p-trifluoromethoxyphenylhydrazone*

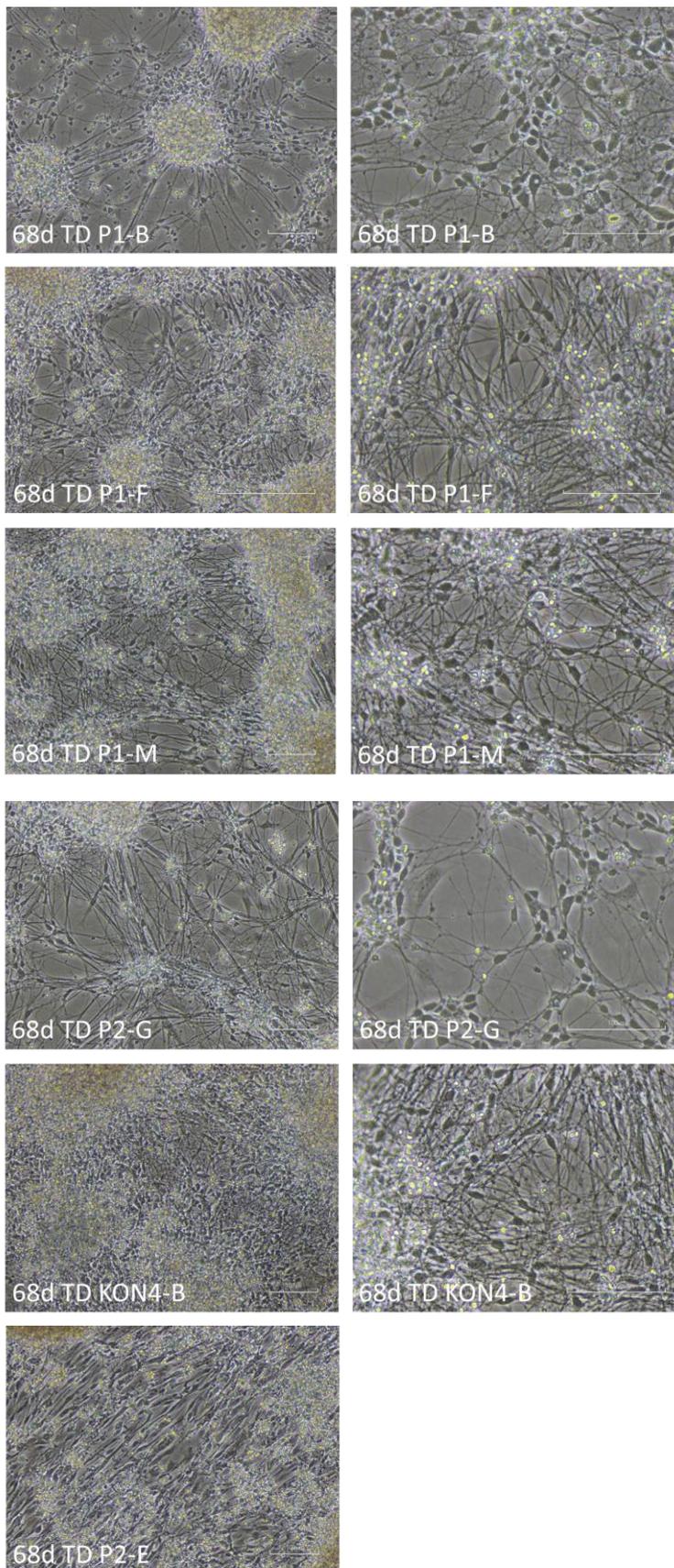


Abbildung 20: Morphologie der TD am Tag der Probenentnahme 68 d. Die Zellkerne liegen hauptsächlich in Ansammlungen vor. Dazwischen in den lichterem Bereichen sind die kräftigen Zellfortsätze zu erkennen. Sie bilden ein ausgeprägtes Netzwerk. Maßstab je 100 µm (rechts unten je Abbildung).

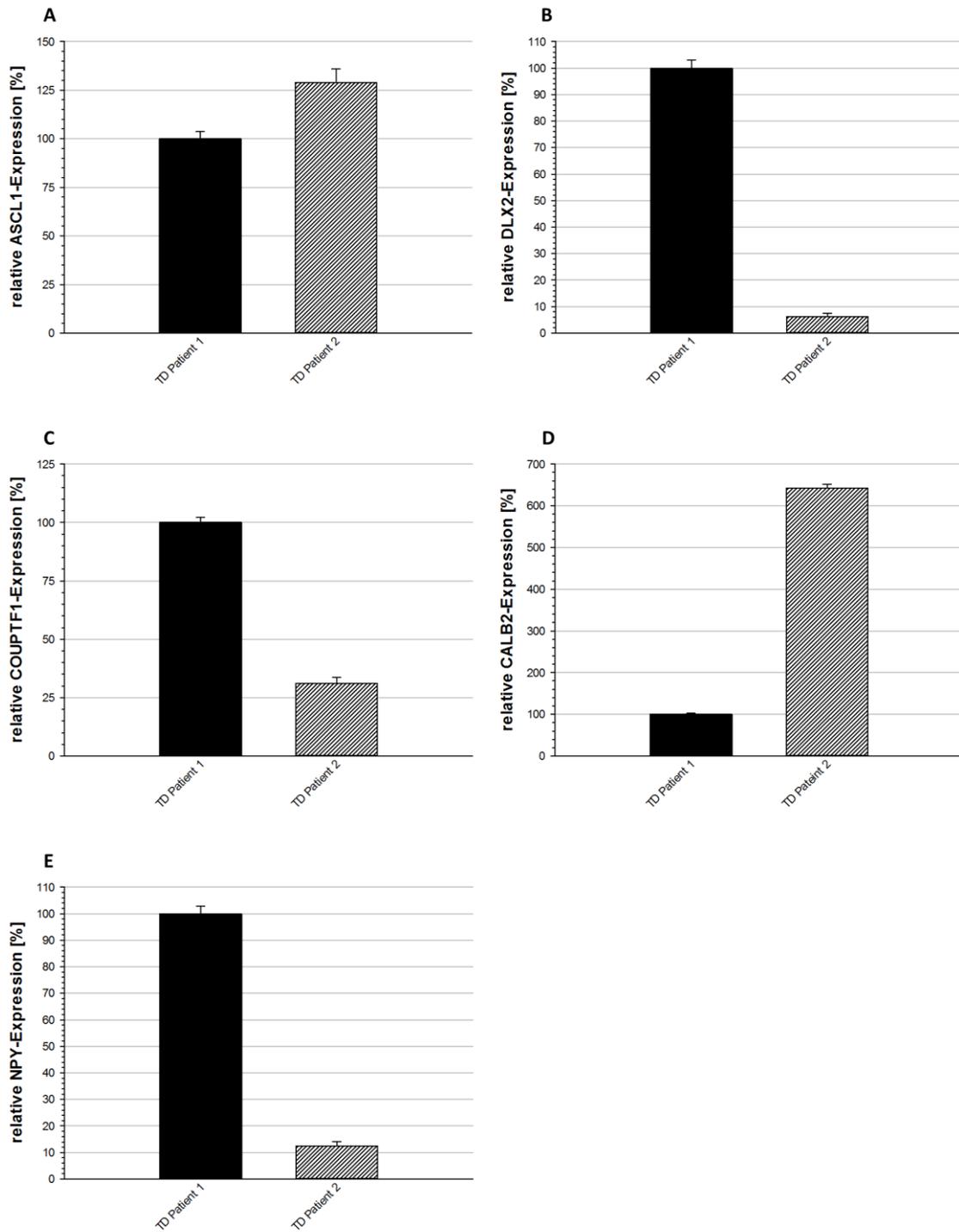


Abbildung 21: Signifikante Unterschiede in der Expression bestimmter IN-Marker zwischen TD Patient 1 und TD Patient 2. Dargestellt wurde die relative Expression eines Gens in Prozent. Dabei entspricht die Expression desselben Gens in TD Patient 1 100%. (A) ASCL1 (B) DLX2 (C) COUPTF1 (D) CALB2 (E) NPY.

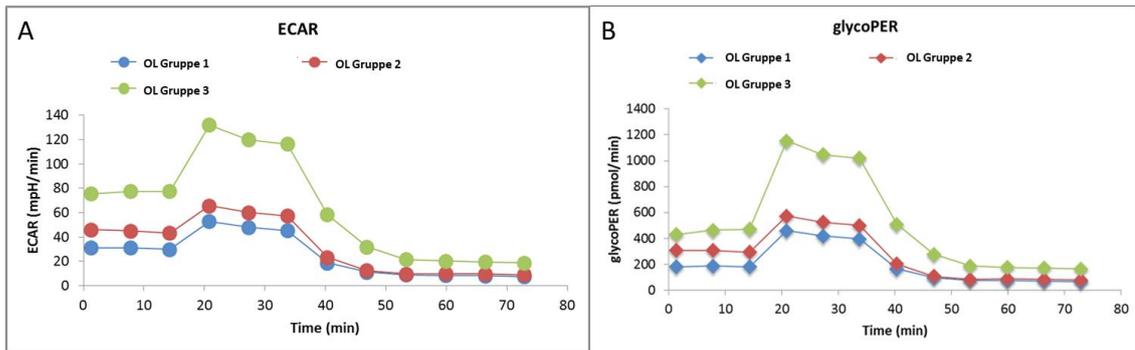


Abbildung 22: Ergebnisse des Glycolytic Rate Assay der OL der Linie MO3.13. (A) zeigt die absoluten Werte der ECAR. **(B)** zeigt die absoluten Werte des glycoPER. Sowohl in A und B zeigt sich die höchste Azidifikationsrate bei der OL Gruppe 3.

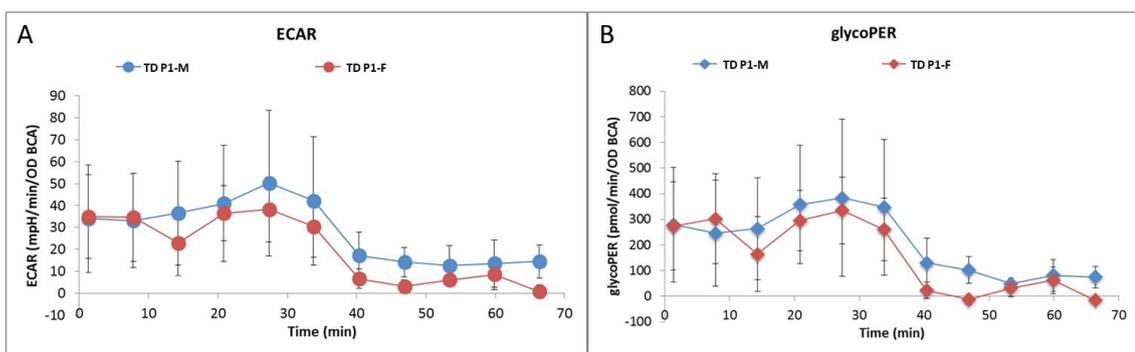


Abbildung 23: Ergebnisse des Glycolytic Rate Assay der TD der SCZ-Linien. (A) zeigt die absoluten Werte der ECAR. **(B)** zeigt die absoluten Werte des glycoPER. A und B zeigen, dass die glykolytischen Eigenschaften der TD beider SCZ-Linien recht ähnlich sind. Im Vergleich zu Abbildung 22 ist erkenntlich, dass die Werte für ECAR und glycoPER bei beiden TD SCZ-Linien deutlich geringer sind als die Werte der OL Gruppe 3.

Selbstständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit mit dem Titel „Transkriptionsanalysen und metabolische Analysen von Neuronen differenziert aus patienten-spezifischen induziert pluripotenten Stammzellen zur Untersuchung von DNA-Variationen in Neurexin 1“ selbstständig verfasst habe. Ich habe keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet und die den benutzten Werken und Websites entnommenen Zitate als solche gekennzeichnet.

16.01.2022

Jessica Reinsch

Erklärung über frühere Promotionsversuche

Hiermit erkläre ich, dass ich keinen vorausgegangenen Promotionsversuch unternommen habe, weder an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg noch an einer anderen wissenschaftlichen Einrichtung. Ich erkläre, diese von mir angefertigte Arbeit an keiner anderen wissenschaftlichen Einrichtung zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht zu haben.

16.01.2022

Jessica Reinsch

Danksagung

Ich möchte mich bei Prof. Dr. med. Dan Rujescu, Direktor der Klinik für Psychiatrie, Psychotherapie und Psychosomatik, für das Ermöglichen meiner Promotion in seiner Forschungsgruppe bedanken. Dass meine Ideen Unterstützung fanden und im Rahmen meiner Arbeit ermöglicht wurden, weiß ich sehr zu schätzen.

Ein großer Dank gilt Dr. rer. nat. Matthias Jung, Leiter der Forschungsgruppe Molekular- und Stammzellbiologie psychiatrischer Erkrankungen, für die Betreuung, fachliche Kompetenz und Hilfsbereitschaft, ohne die meine Arbeit sicher nicht von solcher Qualität möglich gewesen wäre.

Carla Hartmann, Jenny Pfeifer, Bernadette Harwardt und Jana Hirschfeld danke ich für die stete fachliche sowie moralische Unterstützung in der Zellkultur als auch bei der Durchführung der Analysen. Durch ihre offene und herzliche Art wussten sie mich immer aufzubauen, wenn der ein oder andere Versuch missglückt ist.

Ganz herzlich möchte ich meiner Mitdotorandin Annika Majer für all die schönen Momente während unserer gemeinsamen Zeit im Labor danken. Ich habe in ihr nicht nur eine verantwortungsbewusste und zuverlässige Unterstützung im Labor gefunden, sondern darüber hinaus auch eine liebevolle und verständnisvolle Freundin.

Ein besonderer Dank gilt meiner Familie und meinen Freunden, die mir nicht nur während der Promotion, sondern auch in allen übrigen Lebensabschnitten stets zur Seite standen.
