

Teil I - Kurzbericht zum Teilprojekt NMI im BMBF-Verbundprojekt BEST, Förderkennzeichen 01EK2101A

Das Teilvorhaben des NMI im Rahmen des vom Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF) geförderten Verbundprojekts „BEST – Biomarker Evaluation Supporting Clinical Translation in Schizophrenia“ verfolgte das Ziel, neuartige funktionelle Biomarker im Kontext schizophrener Erkrankungen systematisch zu validieren. Der wissenschaftliche Ausgangspunkt bestand in der zunehmenden Erkenntnis, dass Schizophrenie nicht als einheitliche Entität zu begreifen ist, sondern durch eine erhebliche interindividuelle Heterogenität gekennzeichnet ist. Diese Heterogenität erschwert sowohl die Diagnosestellung als auch die Prognoseabschätzung und die Auswahl individualisierter Therapieansätze. Daher wurde ein innovativer, multimodaler Ansatz gewählt, der genetische, molekulare und funktionelle Informationen in ein kohärentes in vitro-Modell integrieren sollte. Aufbauend auf patientenspezifischen, aus induzierten pluripotenten Stammzellen (iPSCs) gewonnenen neuronalen Zellkulturen und gestützt auf bereits existierende bioinformatische Signaturen vorangegangener Arbeiten, wurde das NMI mit der experimentellen Überprüfung und funktionellen Validierung dieser Marker auf zellulärer Ebene beauftragt.

In der initialen Projektphase wurde eine Harmonisierung der technischen Protokolle zwischen den vier Verbundpartnern – NMI, LMU München, ZI Mannheim und Universitätsklinik Tübingen – durchgeführt. Die Differenzierung standardisierter glutamaterger und GABAerger Neuronentypen aus NGN2- bzw. AD2-transduzierten iPSCs konnte etabliert werden. Parallel dazu wurden patientenspezifische iPSC-Linien hinsichtlich ihres Neuritenwachstums, der Morphologie und der Synapsenbildung untersucht. Die Resultate der ersten iPSC-Charge legten nahe, dass Zelllinien schizophrener Patienten im Vergleich zu Kontrolllinien eine signifikant erhöhte Neuritenverzweigung aufweisen, was im Widerspruch zu vereinzelt Literaturangaben steht, jedoch im Kontext genetischer Subgruppeninterpretationen plausibel erscheint. Aufbauend auf diesen Beobachtungen wurden im weiteren Verlauf isogene Zelllinien mit gezielten Deletionen (z. B. 15q13, 22q11) als krankheitstypische Modelle eingesetzt.

Ein besonderer Fokus lag auf der funktionellen Charakterisierung der neuronalen Netzwerke. Hierfür kamen sowohl hochauflösende Einzelzelltechniken (Patch-Clamp-Elektrophysiologie) als auch populationsbasierte Verfahren wie Mikroelektrodenarrays (MEA) und konfokales Kalzium-Imaging zum Einsatz. In beiden iPSC-Chargen zeigten

sich in den Schizophrenie-Modellen auffällige Netzwerkphänotypen: Eine verstärkte synchrone Aktivität, quantifiziert über den Global Synchronization Index (GSI), sowie eine erhöhte Frequenz exzitatorischer postsynaptischer Ströme (EPSCs) wurden detektiert. Diese Beobachtungen stützen die Hypothese einer exzitatorischen Übererregbarkeit bzw. einer gestörten inhibitorisch-exzitatorischen Balance, wie sie in der pathophysiologischen Diskussion der Schizophrenie vielfach beschrieben wird. Ergänzt wurden diese Erkenntnisse durch pharmakologische Blockadeexperimente (MK801, CNQX), die eine zentrale Rolle von NMDA- und AMPA-Rezeptoren im Kontext der beobachteten Hyperaktivität belegen.

Die Durchführung des Projekts war durch eine enge Kooperation mit den Verbundpartnern geprägt. Neben einem intensiven Materialaustausch und standardisierten Analysemethoden wurde der Projektfortschritt regelmäßig in virtuellen und Präsenztreffen koordiniert. Ein besonderes Augenmerk lag auf der iterativen Validierungsstrategie: Ergebnisse der ersten Zelllinie flossen in die bioinformatische Priorisierung neuer Modelle ein, welche anschließend experimentell getestet wurden. Diese zyklische Vorgehensweise ermöglichte eine sukzessive Schärfung der funktionellen Relevanz identifizierter Biomarkersignaturen.

Insgesamt zeigen die Ergebnisse, dass patientenabgeleitete neuronale Modelle ein vielversprechendes Werkzeug darstellen, um funktionelle Korrelate psychiatrischer Erkrankungen in vitro abzubilden. Das Projekt liefert belastbare Anhaltspunkte für eine funktionelle Hyperkonnektivität in Schizophrenie-Modellen und eröffnet damit Perspektiven für künftige, patientenspezifisch ausgerichtete Therapieansätze sowie für die stratifizierte Arzneimittelforschung in der Neuropsychiatrie.

Abschlussbericht

Verbundprojekt

Biomarker Evaluation Supporting Clinical Translation in Schizophrenia

Kurztitel

Teilprojekt NMI
BEST



Partner

NMI Naturwissenschaftliches und Medizinisches Institut an der
Universität Tübingen, Reutlingen

Förderkennzeichen

01EK2101A

NMI Projektnummer

121440

NMI Teilprojektleiter

Prof. Dr. Hansjürgen Volkmer

Laufzeit des Vorhabens

01.09.2021 – 31.08.2024

Berichtsdatum

30.09.2024



1 Vorhabensziel, ursprünglicher Arbeits- und Zeitplan

Ziel

Überblick

Psychosen sind eine Gruppe von Erkrankungen von außerordentlicher Heterogenität. Dies hat zur Folge, dass Diagnose, Prognose und Behandlungsentscheidungen für einzelne Patienten eine große Herausforderung darstellen. Das Vorhaben optimiert Biomarkersignaturen von Patienten mit hohem Risiko für Schizophrenie und Patienten mit definierten psychotischen Erkrankungen. Dies wird durch Integration von multimodalen Patientendaten und nachfolgender funktioneller Validierung von Biomarkersignaturen an patientenabgeleiteten Neuronen erreicht.

Die Ziele werden durch einen Verbund von vier Partnern erreicht:

NMI - Naturwissenschaftliches und Medizinisches Institut an der Universität Tübingen (Koordination)

ZI - Zentralinstitut für Seelische Gesundheit, Mannheim, Abt. für Psychiatrie und Psychotherapie

UKPP - Universitätsklinik Tübingen, Abt. für Allgemeine Psychiatrie und Psychotherapie mit Poliklinik

LMU – Ludwig-Maximilian-Universität, München, Abt. für Psychiatrie und Psychotherapie

Wissenschaftliche und/oder technische Arbeitsziele des Teilvorhabens (NMI)

In den Subprojekten 1 und 2 werden optimierte Biomarkersignaturen mit bioinformatischen Methoden von den Teilprojekten **ZI** und **LMU** erstellt. Ferner trägt das Teilprojekt **LMU** im Subprojekt 3 dazu bei, diejenigen iPSC von Patienten zu selektieren, die den identifizierten Biomarkersignaturen am nächsten kommen.

Ziel dieses Teilprojekts 3 - NMI ist die funktionelle Validierung von Biomarkersignaturen mittels selektierter, patientenabgeleiteter Neuronen in Subprojekt 3. Dazu werden morphologische und physiologische Parameter bestimmt, die für die Ausprägung von Schizophrenie aussagekräftig sind.

Die technischen Ziele sind

- Quantifizierung des Neuritenwachstums und Expression synaptischer Marker als Maß für frühe Entwicklungsdefizite der Schizophrenie wie defizitäre neuronale und synaptische Verschaltung.
- Messung von intrazellulären Kalziumkonzentrationen und elektrophysiologischen Parametern als Maß für defizitäre neuronale Signaltransmission.
- Funktionelle Validierung identifizierter intrazellulärer Signalwege durch den Einsatz geeigneter pharmakologischer oder genetischer Modulatoren.

Im Projekt ist ein reiterativer Schritt implementiert: Daten aus einer ersten iPSC Charge werden in die Teilprojekte 1 und 2 übermittelt. Die dort durchgeführte Analyse ergibt neue iPSC Chargen für die funktionelle Untersuchung, die dann einem zweiten Validierungsschritt unterworfen wird.

Arbeitsplan

TP 1	Meilenstein ●	Jahr 1	Jahr 2	Jahr 3
WP1 MS1	Harmonisierung der Datensätze aller Zentren	●		
WP1 MS2	Stratifikation und Verfeinerung der Biomarker		●	
WP1 MS3	Validierung der Biomarker		●	
WP1 MS4	Iterative Optimierung der Biomarker Profile			●

TP 2	Meilenstein ●	Jahr 1	Jahr 2	Jahr 3
WP2 MS1	Priorisierung der Stoffwechselwege zur Stratifikation	●		
WP2 MS2	Multi-omics Analyse von Schizophrenie-Signaturen	●		
WP1 MS3	Integrative, multi-trait PRS Analyse		●	
WP2 MS1	Schwellenwert-Bestimmung für zelluläre Analysen		●	
WP2 MS2	Integration von Omics mit klinischen/MRT Biomarkern			●
WP2 MS3	Iterative Optimierung der Algorithmen			●

TP 3	Meilenstein ●	Jahr 1	Jahr 2	Jahr 3
WP1 MS1	Transkriptom-Analyse von PBMCs und iNeuronen	PBMCs ●	iNeuronen ●	
WP2 MS2	iPSC Klone differenziert		●	
WP3 MS3	Morphologische Charakterisierung		●	
WP4 MS4	Funktionale Charakterisierung		●	
WP5 MS5	Bestimmung mitochondrialer Funktion		●	
WP6	Projekt-Koordination			●

Tab.1: Übersicht über die Arbeitspakete und Meilensteine des Gesamtprojekts. Das Teilprojekt NMI ist rot markiert. Angegebene Arbeitspakete und Meilensteine entsprechen den Angaben in der Teilprojektbeschreibung.

Meilensteinplan Teilprojekt NMI

AP2 MS2

1. Erste Lieferung von Astrozyten an die Verbundpartner (MS221, Monat 3)
2. Protokolle harmonisiert (MS222, Monat 6)
3. Validierungsstrategie für die erste iPSC Charge festgelegt (MS223, Monat 10)
4. Zweite Lieferung von Astrozyten an die Verbundpartner (MS224, Monat 16)
5. Validierungsstrategie für die zweite iPSC Charge modifiziert (MS225, Monat 26)

AP3 MS3

1. Neuritenwachstum der ersten iPSC Charge im Kurzzeitprotokoll quantifiziert (MS331, Monat 14)
2. Neuritenwachstum der zweiten iPSC Charge im Kurzzeitprotokoll quantifiziert (MS332, Monat 30)

Quantifizierung synaptischer Dichten werden von Partner ZI, Mannheim geleistet.

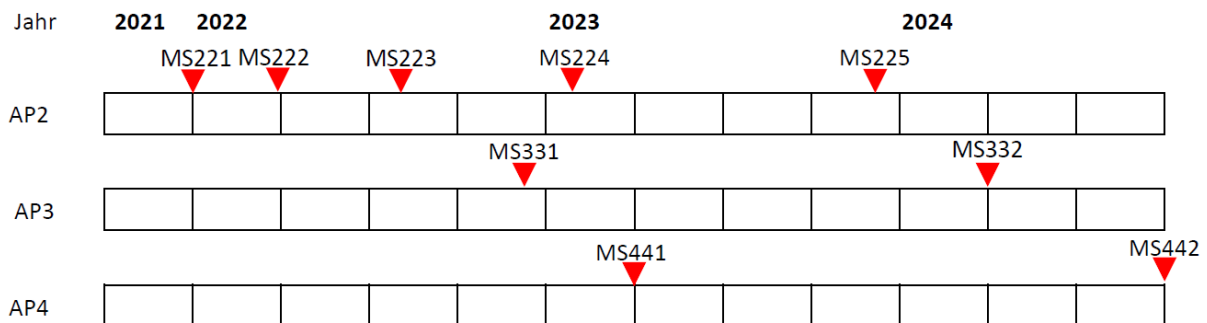
AP4 MS4

1. Kalziumkonzentrationen und elektrophysiologische Parameter der ersten iPSC Charge bestimmt (MS441, Monat 18)
2. Kalziumkonzentrationen und elektrophysiologische Parameter der zweiten iPSC Charge bestimmt (MS442, Monat 36)

AP6

1. Kontinuierliche Berichterstattung
2. Informationsaustausch mit Partnern
3. IP geprüft und Patente der Wettbewerber verfolgt

Die Aufgaben werden kontinuierlich von Monat 1-36 verfolgt.



Wissenschaftlich-technische Ergebnisse

1.1 Zusammenfassung der wichtigsten Ergebnisse

AP2: Analysestrategien wurden ausgetauscht. Zwei Chargen iPSC Klone zur morphologischen und funktionellen Analyse sind von LMU eingetroffen. Astrocyten wurden an Partner LMU ausgeliefert. Alle Meilensteine wurden erreicht. Somit ist AP2 erfolgreich abgeschlossen worden.

AP3: Das Neuritenwachstum zweier iPSC Charge wurde bestimmt. Während die erste Charge aus Patienten stammt, die sich genetisch unterscheiden, wurde für die zweite Charge ein genetisch definiertes, isogenes Modell gewählt. Mit beiden Chargen zeigte sich eine Erhöhung der Neuritenverzweigung im Vergleich zu „gesunden“ Kontrollen.

AP4: Die elektrophysiologische Analyse der ersten iPSC Charge (MS441) wurden finalisiert. Die Neuronen aus den Schizophrenieproben zeigten aberrante Netzwerkaktivität. Für eine ausgedehnte Qualifizierung der Linien wurden zusätzliche Optimierungsarbeiten (Einsatz von Inhibitoren der AMPA- und NMDA-Rezeptoren und Messung der Kalziumaktivität)

abgeschlossen. Ferner wurden Kalziummessungen für die zweite iPSC Charge durchgeführt. Durch die Erweiterung der Analyse um einen neuen Parameter, den Global Synchronization Index konnte deutlich dargestellt werden, daß die Proben schizophrener Patienten eine deutlich erhöhte Synchronizität aufwiesen, die Neurone also stärker miteinander erregend gekoppelt waren als die Proben von putativ gesunden Spendern. Mithilfe von Patch-Clamp Untersuchungen auf Einzelzellniveau konnte in den Schizophrenieproben eine signifikante Erhöhung der synaptischen Ereignisse (EPSC Frequenz) detektiert werden. Beide Ergebnisse weisen auf eine Imbalance der neuronalen Netzwerkaktivität in der Pathophysiologie der Schizophrenie hin.

1.2 Wissenschaftlich-technische Ergebnisse

AP 2: iPSC Differenzierung und Entwicklung einer Validierungsstrategie

Meilenstein MS221 – Lieferung einer ersten Charge Astrocyten an die Verbundpartner

Primäre Astrozyten aus der Maus wurden am NMI präpariert, expandiert und kryokonserviert. Die präparierten Astrozyten weisen eine sehr hohe Expression des Glial fibrillary acidic protein (GFAP) auf, ein Intermediärfilament, das vor allem im Cytoplasma von Astrozyten vorkommt. Zudem zeigen die Astrozytenkulturen nur eine sehr geringe Verunreinigung von verbleibenden Neuronen, Mikroglia oder Oligodendrozyten. In Langzeitkulturen mit iPSC-abgeleiteten Neuronen verbessern die Astrozyten die Viabilität und Integrität der neuronalen Netzwerke deutlich und tragen zur Stabilität synaptischer Verbindungen zwischen Nervenzellen bei (**Abbildung 1**). In neuronalen Kulturen ohne Astrozyten sind die Viabilität, Aktivität und Konnektivität deutlich reduziert, was den direkten Nutzen der Astrozyten-Zusatz verdeutlicht.

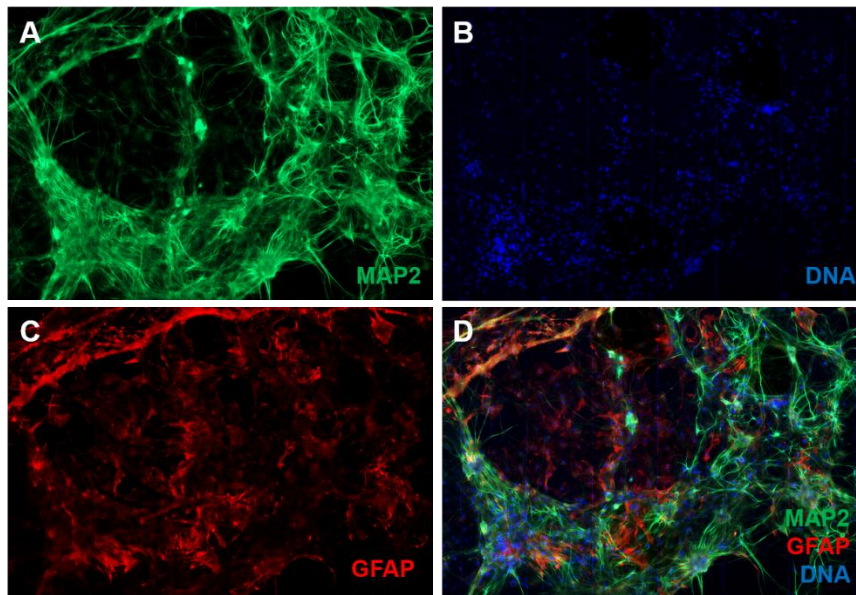


Abbildung 1: iPSC-abgeleitete Neurone werden zur verbesserten Differenzierungsfähigkeit und zur langfristigen Integrität und Aktivität der neuronalen Netzwerke gemeinsam mit primären Astrozyten aus der Maus kultiviert. MAP2 zeigt neuronale Netzwerke, GFAP ist ein Marker für Astrozyten. Die Immunfluoreszenzaufnahmen zeigen die räumliche Interaktion beider Zelltypen.

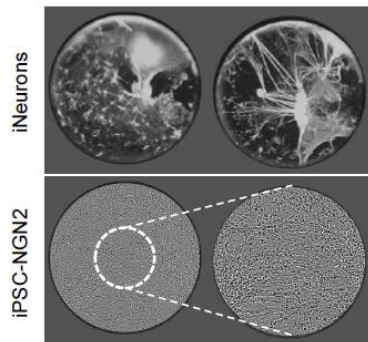
Die erste Charge an präparierten Astrozyten wurde im Herbst 2021 für den Abschluss von MS221 an die LMU nach München verschickt.

Meilenstein MS222 – Harmonisierung der Protokolle im Verbund

Protokolle für glutamaterge Differenzierung wurden von Partner LMU übernommen und erfolgreich für die Differenzierung von Neuronen eingesetzt (siehe MS223).

Meilenstein MS223 – Validierungsstrategie für die erste iPSC Charge festgelegt

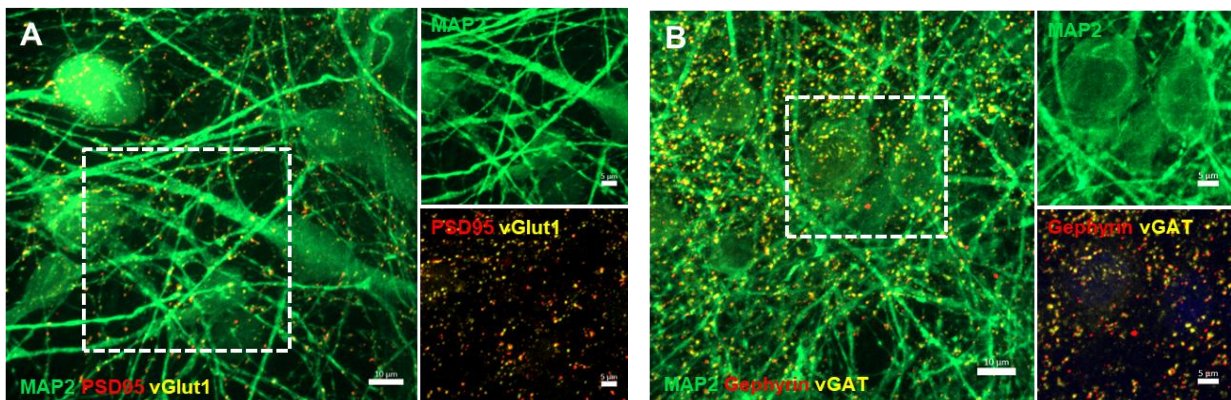
Es wurden von Partner LMU genetisch stabile NGN2- iPSC und andifferenzierte iNeurone des Testklons J1, sowie von fünf gesunden und fünf erkrankten Probanden für den Abschluss von MS223 geliefert.



iNeurone und iPSC-NGN2 des Testklons J1 wurden in Kultur genommen und morphologisch beurteilt. iNeuronen verklumpten und zeigten nach dem Auftauen eine geringe Vitalität, sowohl ohne AraC (44 %) als auch mit AraC (46 %). Hingegen waren aus NGN2-iPSC generierte Neuronen morphologisch unauffällig. Die Vitalität vor der Aussaat betrug 91 % in Gegenwart von AraC. Aufgründessen werden für nachfolgende Experimente Neuronen aus genetisch stabilen iPSC von dem Partner LMU differenziert und nicht aus iNeuronen.

iNeuronen.

Genetisch stabile iPSC des Klons J1 wurden im nächsten Schritt glutamaterg und GABAerg ausdifferenziert und anschließend in einer Kokultur kombiniert. Die Zellen bildeten MAP2-positive neuronale Netzwerke aus. Prä- (vGlut1) und post- (PSD95) synaptische Marker für glutamaterge (A) sowie prä- (vGAT) und post- (gephyrin) synaptische Marker für GABAerge Neuronen wurden wie erwartet exprimiert.



Somit wurde der Meilenstein MS223 erreicht.

Für die weiteren Experimente in AP3 und AP4 wurde auf diese Protokolle zurückgegriffen. Dazu lieferte Partner LMU folgende patientenabgeleiteten iPSC Klone als erste iPSC Charge:

- Kontrollklone von gesunden Probanden, MC2, MC5, MC7
- Klone von Patienten mit Schizophrenie, MS6, MS18, MS21

Meilenstein MS224 – Lieferung einer zweiten Charge Astrocyten an die Verbundpartner

Die Auslieferung der geplanten zweiten Charge (MS224) wurde nicht umgesetzt, weil die erste Charge (MS221) von Partner LMU noch nicht aufgebraucht war. Keine weitere Charge wurde angefordert.

Meilenstein MS225 - modifizierte Validierungsstrategie für die zweite iPSC Charge

Nach Diskussion der Ergebnisse der ersten Charge wurden isogene Klone als zweite Charge zur Darstellung genetischer Mutationen im Zusammenhang mit der Schizophrenie nominiert. Folgende Klone wurden von Partner LMU an NMI geliefert:

- Ausgangsklon SBA von einem gesunden Probanden
- Geneditierte Klone zur Darstellung der Schizophrenie 15q13 Del-8, 22q11 Del-18, 22q11 Del-29

AP 3: Morphologische Analyse

Meilenstein MS331 - Neuritenwachstum der ersten iPSC Charge quantifiziert

Mit dem Protokoll aus AP2 wurden drei Kontrollklone (MC2, MC5, MC7) und drei Klone von Erkrankten (MS6, MS18, MS21) untersucht. Dazu wurde das Neuritenwachstum mit Live-Cell-Imaging (Incucyte) quantifiziert.

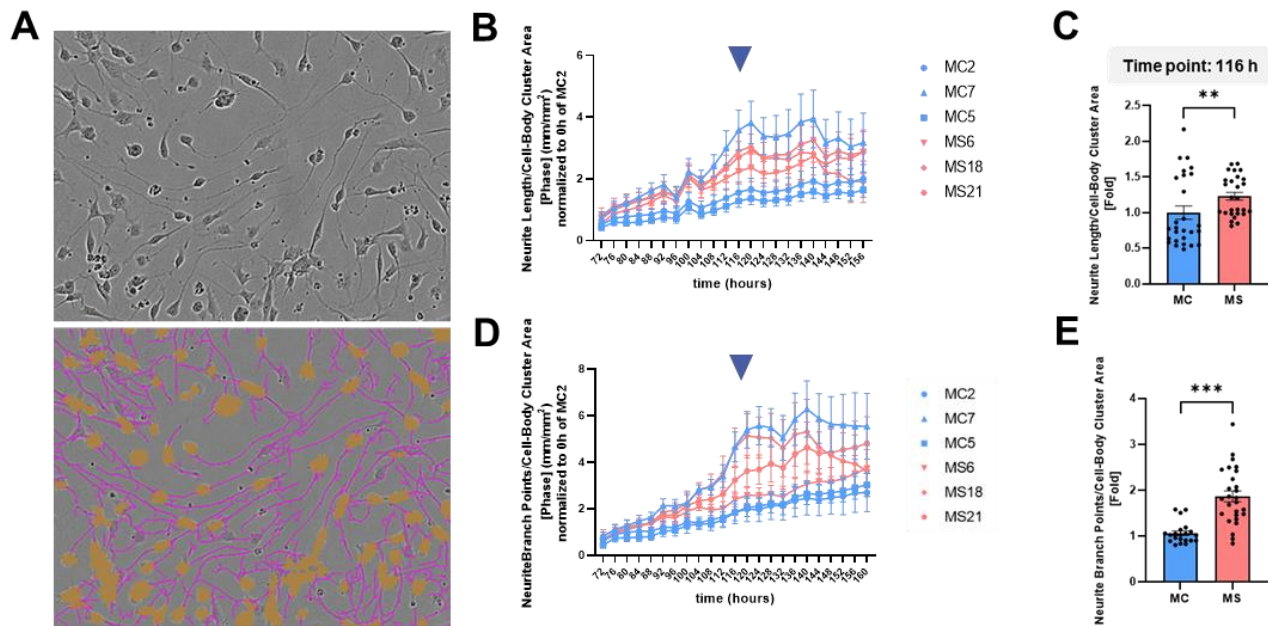


Abbildung 2: Analyse des Neuritenwachstums der ersten iPSC Charge mittels Live-Cell-Imaging.

Dabei handelt es sich um die stabilen iPSC-NGN2 Linien dreier Kontrollklone (MC2, MC5, MC7) und dreier SCZ-Klone (MS6, MS18, Ms21) **A)** Live-Cell-Imaging des Neuritenwachstums im Incucyte. Bild oben: Exemplarische Durchlicht-Aufnahme zeigt Zellkörper mit ausgewachsenen Neuriten. Bild unten: Exemplarische Aufnahme des Analyse-Tools. In orange dargestellt sind die Zellkörper, in magenta sind die ausgewachsenen Neuriten zu erkennen. **B)** Analyse des Neuritenwachstums über einen Zeitraum von 160 Stunden in 4 Stunden Intervallen. Alle Zeitpunkte sind auf den Startzeitpunkt von 72 Stunden normalisiert. **C)** Quantifizierung des Neuritenwachstums am 116 Stunden Zeitpunkt. Es wurde ein Mann-Whitney Test berechnet. Datenpunkte stellen Werte von einzelnen Wells dar \pm SEM. Datenpunkte wurden zum Mittelwert der Kontrolle normalisiert (MC n=27, MS n=27, $p < 0.001$). **D)** Analyse der Neuritenverzweigungen über einen Zeitraum von 160 Stunden in 4 Stunden Intervallen. Alle Zeitpunkte sind auf den Startzeitpunkt von 72 Stunden normalisiert. **E)** Quantifizierung der Neuritenverzweigungen am 120 Stunden Zeitpunkt. Es wurde ein Mann-Whitney Test berechnet. Datenpunkte stellen Werte von einzelnen Wells dar \pm SEM. Datenpunkte wurden zum Mittelwert der Kontrolle normalisiert (MC n=27, MS n=27, $p = 0.0087$).

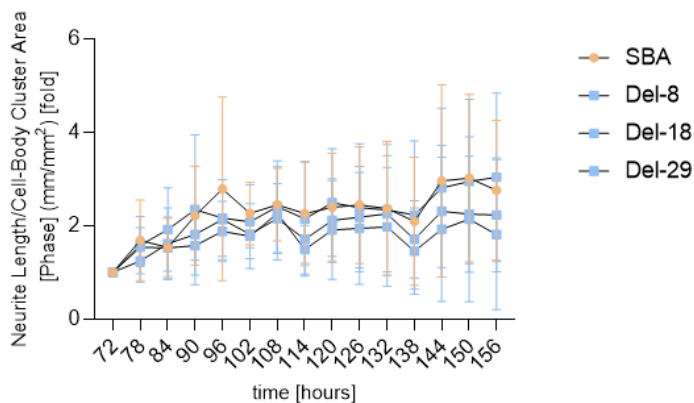
Mit dem Differenzierungsprotokoll aus AP2 wurden stabile NGN2-iPSC differenziert und das Neuritenwachstum in 4 Stunden Intervallen über 160 Stunden quantifiziert. Alle Klone bildeten Neuriten aus. Auf Grund von Neuritenfaszikulation wurde nach 116 Stunden ein Plateau maximal messbaren Wachstums erreicht. Um Unterschiede zwischen Kontrollklonen und Klone von Erkrankten zu messen, wurden daher die 116 Stundenwerte herangezogen.

Überraschenderweise war das Neuritenwachstum aus Klonen von Erkrankten bezüglich Länge und Verzweigung gegenüber den gesunden Kontrollen verstärkt. Dies steht im Widerspruch zur bekannten Literatur. Gleichzeitig war das Wachstum einer gesunden Kontrolle übermäßig stark (MC7). Das Neuritenwachstum der innerhalb der Kohorten erwies sich als unerwartet heterogen.

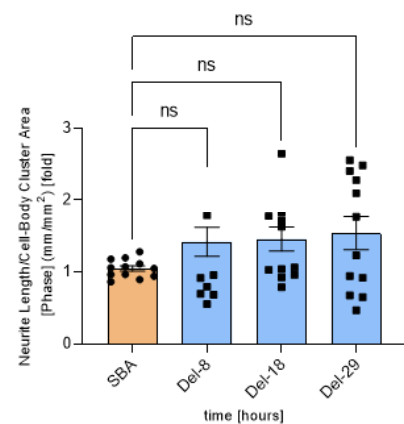
Meilenstein MS332 - Neuritenwachstum der zweiten iPSC Charge quantifiziert

Vor dem Hintergrund der Analyse der ersten Charge wurde die Strategie für die zweite Charge verändert. Die isogene Kontrolllinie (SBA) und drei abgeleitete Deletionslinien (15q13 Del-8, 22q11 Del-18, 22q11 Del-29) zur Darstellung einer genetischen Mutation, die mit Schizophrenie assoziiert ist, wurden sieben Tage differenziert und bezüglich Neuritenwachstum wie oben beschrieben analysiert.

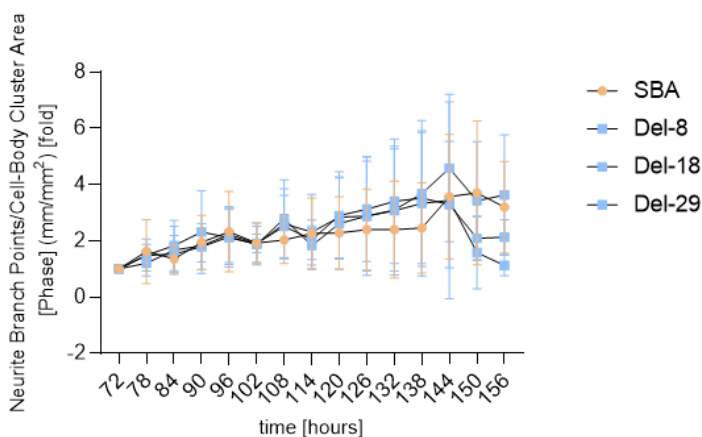
A Neurite Length:



B Time point: 120 h



C Neurite Branch Points:



D

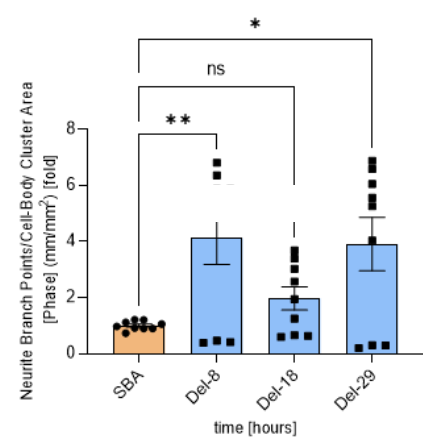


Abbildung 3: Analyse des Neuritenwachstums der zweiten iPSC Charge mittels Live-Cell-Imaging. Dabei handelt es sich um die stabilen iPSC-NGN2 Linien der isogenen Kontrolllinie SBA, sowie der drei Deletionslinien 15q13 Del-8, 22q11 Del-18, 22q11 Del-29. A) Analyse des Neuritenwachstums über einen Zeitraum von 160 Stunden in 6 Stunden Intervallen. Alle Zeitpunkte sind auf den Startzeitpunkt von 72 Stunden normalisiert. B) Quantifizierung des Neuritenwachstums am 120 Stunden Zeitpunkt. Es wurde eine Ordinary one-way Anova mit anschließendem Dunnett's multiple comparison test berechnet. Datenpunkte stellen Werte von einzelnen Wells dar \pm SEM. Datenpunkte wurden zum Mittelwert der Kontrolle normalisiert (SBA n=12, Del-8 n=12, Del-18 n=12, Del-29 n=12; $H(3)=1.533$, $p=0.2193$). C) Analyse der Neuritenverzweigungen über einen Zeitraum von 160 Stunden in 6 Stunden Intervallen. Alle Zeitpunkte sind auf den Startzeitpunkt von 72 Stunden normalisiert. D) Quantifizierung der Neuritenverzweigungen am 120 Stunden Zeitpunkt. Es wurde eine Ordinary one-way Anova mit anschließendem Dunnett's multiple comparison test berechnet. Datenpunkte stellen Werte von einzelnen Wells dar \pm SEM. Datenpunkte wurden zum Mittelwert der Kontrolle normalisiert (SBA n=12, Del-8 n=12, Del-18 n=12, Del-29 n=12; $H(3)=4.699$, $p=0.0079$). Datenpunkte stammen aus 4 unabhängigen Differenzierungen mit jeweils 3 Wells pro Linie.

Basierend auf den Ergebnissen der ersten iPSC Charge war bekannt, dass aufgrund von Neuritenfaszikulation nach etwa 120 Stunden ein Plateau maximal messbaren Wachstums erreicht wird. Daher wurden nach entsprechender Messzeit (120 Stunden), die Unterschiede im Neuritenwachstum zwischen isogener Kontrolllinie und den Deletionslinien dargestellt und die Parameter Neuritenlänge und -verzweigung analysiert. Die Deletionslinien zeigten einen nicht signifikanten Trend zu erhöhtem Neuritenwachstums gegenüber der isogenen Kontrolle SBA. Zudem zeigten zwei der drei Deletionslinien (15q13 Del-8, 22q11 Del-29) signifikant erhöhte Neuritenverzweigungen im Vergleich zur Kontrolllinie. Diese Ergebnisse sind im Einklang mit den Neuritenwachstumsergebnissen der ersten iPSC Charge, die ebenfalls erhöhtes Neuritenwachstum und -verzweigung in der Schizophrenie-Gruppe aufzeigten. In einem anderen Modell für Schizophrenie, das auf einer Mutation von DISC1 beruht, wurde eine Reduktion des Neuritenwachstums beobachtet (doi: 10.1186/s12868-024-00858-z). Somit variiert dieser Parameter zwischen verschiedenen Modellen.

Ergänzend wurde die Synapsenbildung der zweiten iPSC Charge auf morphologischer Ebene betrachtet. Morphologisch auftretende Aberrationen in entweder exzitatorischer oder inhibitorischer Synapsenbildung können zu exzitatorischer-inhibitorischer Imbalance (E-I Imbalance) führen und damit die Mikroschaltung im Cortex beeinträchtigen. Daher wurden exzitatorische Synapsen, bestehend aus den Markern vGLUT1 (presynaptischer Marker) und PSD95 (postsynaptischer Marker), sowie inhibitorische Synapsen, bestehend aus den Markern vGAT (presynaptischer Marker) und Gephyrin (postsynaptischer Marker), einzeln und in Co-Lokalisation zueinander betrachtet und quantifiziert, was in Abbildung 4 und Abbildung 5 dargestellt ist.

Die Quantifizierung der exzitatorischen Synapsenbildung wies eine signifikante Reduktion des presynaptischen Markers vGLUT1, sowie eine signifikante Reduktion der exzitatorischen

Synapsen (Co-Lokalisation vGLUT1+PSD95) in allen drei Deletionslinien auf. Die Postsynapse, sowie das Verhältnis extrasynaptischen und synaptischen vGLUTs scheinen nicht beeinträchtigt zu sein (siehe Abbildung 4).

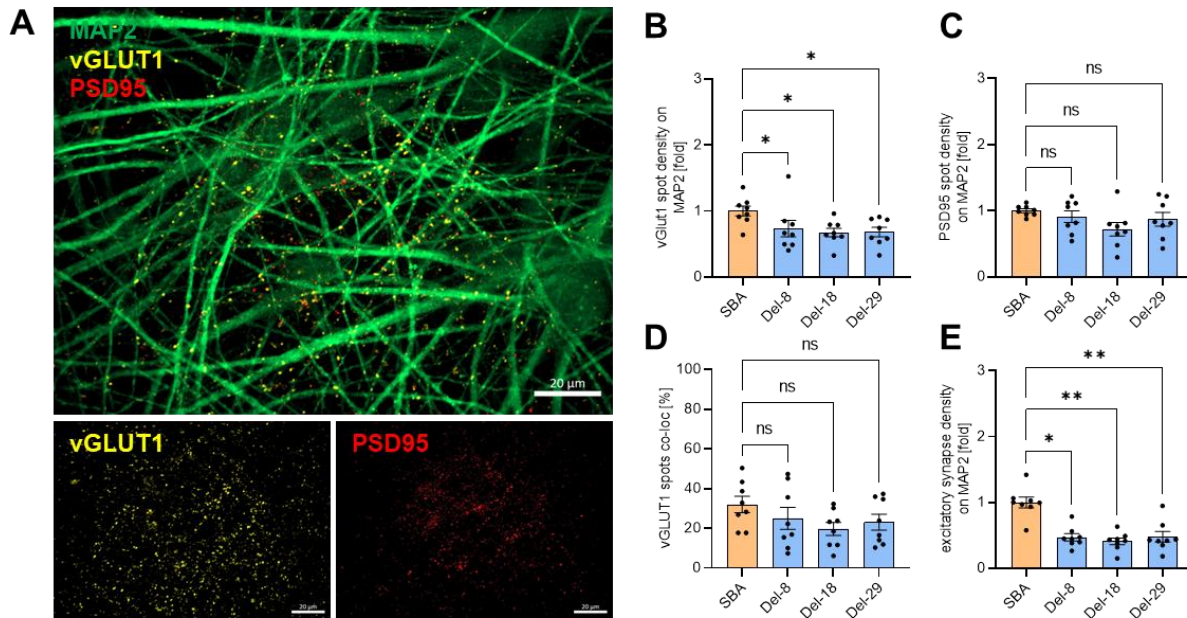


Abbildung 4: Quantifizierung der exzitatorischen Synapsen in der NGN2-AD2 Co-Kultur der zweiten iPSC Charge. Am Tag 42 der Kultivierung, wurde die Co-Kultur auf exzitatorische Synapsenmarker (vGLUT1+PSD95) getestet. **A)** Exemplarischer Ausschnitt einer immunhistologischen Färbung der Co-Kultur. Folgende Marker wurden gefärbt: MAP2 (grün) als neuronaler Marker, vGLUT1 (gelb) als presynaptischer Marker und PSD95 (rot) als postsynaptischer Marker. Maßstabsbalken 20 μm . **B)** Quantifizierung des presynaptischen Markers vGLUT1. Es wurde ein Kruskal-Wallis test mit anschließendem Dunnett's multiple comparison test berechnet. Datenpunkte stellen Werte von einzelnen Wells dar \pm SEM. Datenpunkte wurden zum Mittelwert der Kontrolle normalisiert (SBA n=8, Del-8 n=8, Del-18 n=8, Del-29 n=8; $H(3)=9.293$, $p=0.0256$). **C)** Quantifizierung des postsynaptischen Markers PSD95. Es wurde eine Ordinary one-way ANOVA mit anschließendem Dunnett's multiple comparison test berechnet. Datenpunkte stellen Werte von einzelnen Wells dar \pm SEM. Datenpunkte wurden zum Mittelwert der Kontrolle normalisiert (SBA n=8, Del-8 n=8, Del-18 n=8, Del-29 n=8; $H(3)=1.788$, $p=0.172$). **D)** Quantifizierung der co-lokalisierenden vGLUT1 Spots. Es wurde ein Kruskal-Wallis Test mit anschließendem Dunnett's multiple comparison test berechnet. Datenpunkte stellen Werte von einzelnen Wells dar \pm SEM. Datenpunkte wurden zum Mittelwert der Kontrolle normalisiert (SBA n=8, Del-8 n=8, Del-18 n=8, Del-29 n=8; $H(3)=16.06$, $p=0.0011$). **E)** Quantifizierung der Appositionen (Co-Lokalisierung vGLUT1+PSD95). Es wurde eine Ordinary one-way ANOVA mit anschließendem Dunnett's multiple comparison test berechnet. Datenpunkte stellen Werte von einzelnen Wells dar \pm SEM. Datenpunkte wurden zum Mittelwert der Kontrolle normalisiert (SBA n=8, Del-8 n=8, Del-18 n=8, Del-29 n=8; $H(3)=1.437$, $p=0.253$ Datenpunkte stammen aus 4 unabhängigen Differenzierungen mit jeweils 2 Wells pro Linie.

Die Quantifizierung der inhibitorischen Synapsenbildung wies lediglich eine Erhöhung des postsynaptischen Markers Gephyrin in allen drei Deletionslinien auf. Die anderen Parameter waren unauffällig und scheinen nicht beeinträchtigt zu sein (siehe Abbildung 5).

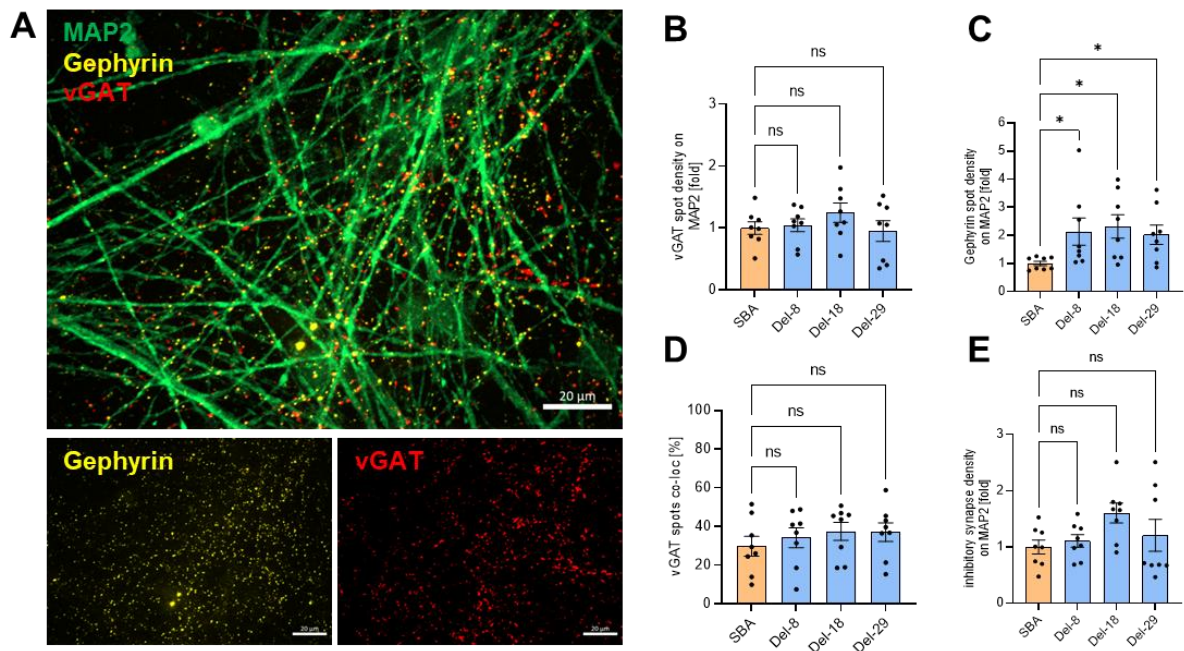
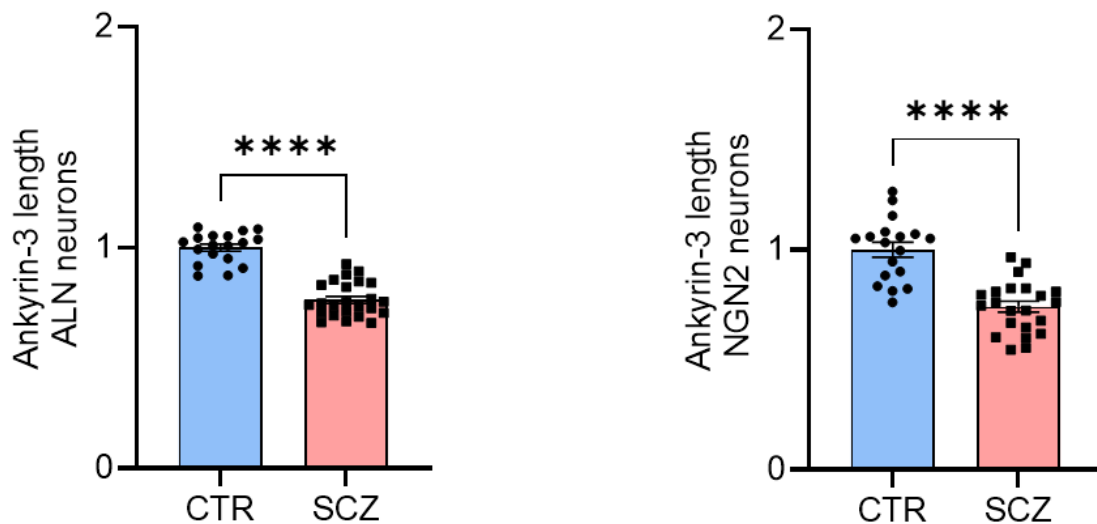


Abbildung 5: Quantifizierung der inhibitorischen Synapsen in der NGN2-AD2 Co-Kultur der zweiten iPSC Charge. Am Tag 42 der Kultivierung, wurde die Co-Kultur auf inhibitorische Synapsenmarker (vGAT+Gephyrin) getestet. **A)** Exemplarischer Ausschnitt einer immunhistologischen Färbung der Co-Kultur. Folgende Marker wurden gefärbt: MAP2 (grün) als neuronaler Marker, vGAT (rot) als presynaptischer Marker und Gephyrin (gelb) als postsynaptischer Marker. Maßstabsbalken 20 µm. **B)** Quantifizierung des presynaptischen Markers vGAT. Es wurde eine Ordinary one-way ANOVA mit anschließendem Dunnett's multiple comparison test berechnet. Datenpunkte stellen Werte von einzelnen Wells dar ± SEM. Datenpunkte wurden zum Mittelwert der Kontrolle normalisiert (SBA n=8, Del-8 n=8, Del-18 n=8, Del-29 n=8; $H(3)=0.921$, $p=0.443$). **C)** Quantifizierung des postsynaptischen Markers Gephyrin. Es wurde ein Kruskal-Wallis Test mit anschließendem Dunnett's multiple comparison test berechnet. Datenpunkte stellen Werte von einzelnen Wells dar ± SEM. Datenpunkte wurden zum Mittelwert der Kontrolle normalisiert (SBA n=8, Del-8 n=8, Del-18 n=8, Del-29 n=8; $H(3)=10.56$, $p=0.014$). **D)** Quantifizierung der co-lokalisierenden vGAT Spots. Es wurde ein Kruskal-Wallis Test mit anschließendem Dunnett's multiple comparison test berechnet. Datenpunkte stellen Werte von einzelnen Wells dar ± SEM. Datenpunkte wurden zum Mittelwert der Kontrolle normalisiert (SBA n=8, Del-8 n=8, Del-18 n=8, Del-29 n=8; $H(3)=1.330$, $p=0.722$). **E)** Quantifizierung der Appositionen (Co-Lokalisierung vGAT+Gephyrin). Es wurde eine Ordinary one-way ANOVA mit anschließendem Dunnett's multiple comparison test berechnet. Datenpunkte stellen Werte von einzelnen Wells dar ± SEM. Datenpunkte wurden zum Mittelwert der Kontrolle normalisiert (SBA n=8, Del-8 n=8, Del-18 n=8, Del-29 n=8; $H(3)=5.974$, $p=0.1129$). Datenpunkte stammen aus 4 unabhängigen Differenzierungen mit jeweils 2 Wells pro Linie.

Die Ergebnisse der Synapsenquantifizierung weisen hauptsächlich eine Aberration in der exzitatorischen Synapsenbildung auf, was Einfluss auf die Funktionalität der Neuronen haben kann.

Ein weiterer morphologischer Parameter wurde mit einer Kokultur aus exzitatorischen (NGN2) und dopaminergen (ALN) Neuronen identifiziert. Dazu wurden Zellen herangezogen, die vom NMI mit dem Projektpartner Universitätsklinik, Tübingen hergestellt wurden. Zur Unterscheidung glutamaterger und dopaminergener Neuronen wurden die glutamatergen Neuronen mit einem grün fluoreszierenden EGFP Marker versehen. Dopaminerge Neuronen wurden mit dem Marker Tyrosinhydroxylase detektiert. Axoninitialsegmente, die entweder mit TH-positiven oder EGFP-positiven Zellkörpern verbunden waren, wurden durch eine Ankyrin3-Färbung detektiert. Die Länge des Axoninitialsegments gibt über den Aktivitätszustand eines Neurons indirekt Auskunft. Bei erhöhter Aktivität wird das Axoninitialsegment in einer homeostatischen Antwort reduziert. Die Ergebnisse zeigen, dass das Axoninitialsegment von glutamatergen und dopaminergenen Neuronen in Kokultur verkürzt ist.



AP 4: Funktionelle Charakterisierung von iPSC-abgeleiteten Neuronen

Calciumtransiente als Surrogat für neuronale Aktivität sowie elektrophysiologische Messungen wurden durchgeführt, um in neuronalen Netzwerken aus exzitatorischen und inhibitorischen Neuronen aberrante Parameter in der Schizophrenie zu erarbeiten

Vorexperimente zur elektrophysiologischen Charakterisierung

iPSC Linien wurden entweder durch NGN2 Überexpression in glutamaterge oder durch ASCL1/DLX2 (AD2) Überexpression in GABAerge Neuronen differenziert. Die ausdifferenzierten Zellen werden 80%/20% gemischt und in Gegenwart von Mausastrozyten weiterinkubiert. Neuronale Kulturen wurden auf Mikroelektrodenarrays für die

elektrophysiologische Ableitung als Netzwerk oder für Einzelzellanalysen im Patch Clamp angelegt.

Die differenzierten Neurone wurden mithilfe manueller Patch-Clamps hinsichtlich neuronaler Charakteristika untersucht. Die Zellen zeigten im Voltage-Clamp charakteristische transiente Stromantworten auf depolarisierende Haltepotentiale. Aufgrund ihres Auftretens und ihrer Form wurden diese als putative spannungsabhängige Natrium (Na^+) bzw. Kalium (K^+) Ströme identifiziert; eine pharmakologische Bestätigung steht noch aus (Abb. 6 B)

Unter Current-Clamp Bedingungen ließen sich Aktionspotentiale (AP) auslösen. Dabei konnten zwei Neuronentypen identifiziert werden, zum einen tonisch feuernde Neurone (57% der untersuchten Zellen), die auf langanhaltende Depolarisationen mehrere APs hintereinander zu generieren in der Lage sind, sowie phasische Neurone (43% der untersuchten Zellen), die nur mit einem einzelnen AP reagieren, unabhängig von der Stimulationsstärke (Abb. 6, C bzw D).

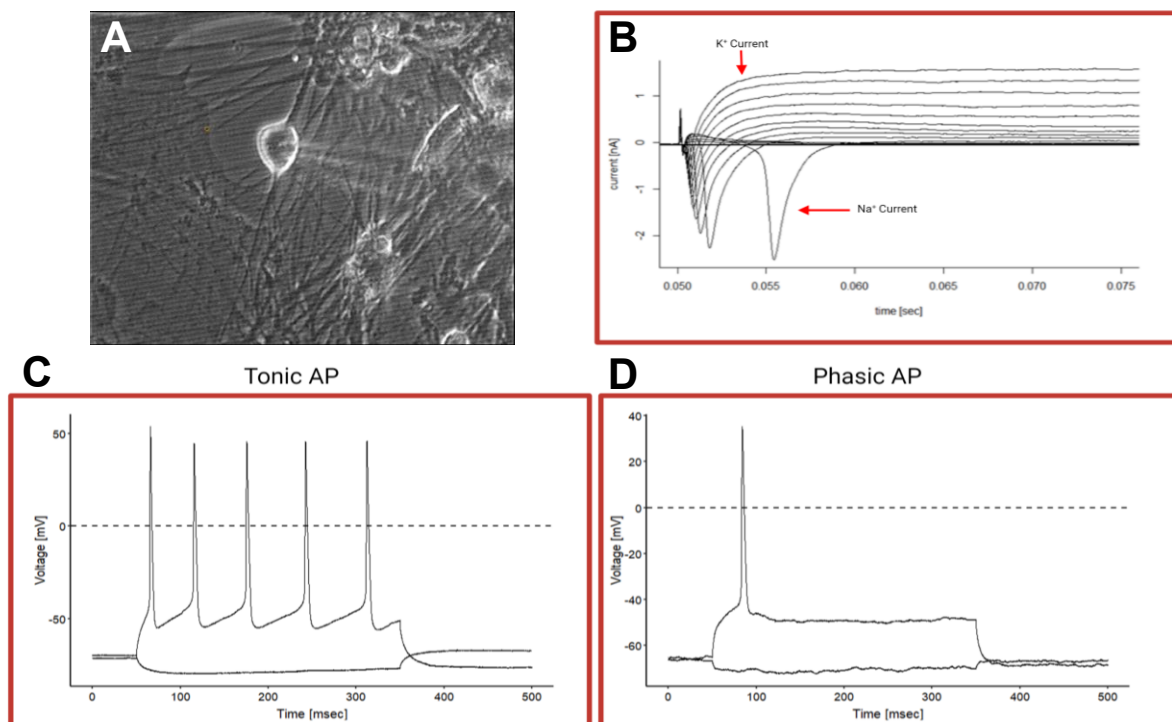


Abbildung 6: Neuronenableitung mit der Patch-Clamp Technik. **A)** Mikroskopische Aufnahme eines gepatchten Neurons. Deutlich ist die Patch-Pipette von rechts ins Bild laufend zu erkennen. **B)** Superposition depolarisierender Spannungspulse. Stärker depolarisierende Spannungen aktivieren spannungsaktivierte Na^+ Ströme (negative Deflektionen) gefolgt von langanhaltenden K^+ Strömen (positive Deflektionen). **C, D)** De- und hyperpolarisierende Ströme induzieren Aktionspotentiale. C: tonisches und D: phasisches Feuerverhalten.

Interessanterweise konnten in verschiedenen Aufnahmen zwischen den externen Stimulationen synaptische Ereignisse erfasst werden, die darauf hindeuten, daß es hier zur

Ausbildung funktioneller Synapsen kommt. Aufgrund ihrer Form und Richtung (depolarisierend) wird aktuell davon ausgegangen, dass es sich um glutamatinduzierte, exzitatorische, postsynaptische Potentiale handelt (Abb. 7), eine pharmakologische Bestätigung steht zu diesem Zeitpunkt noch aus.

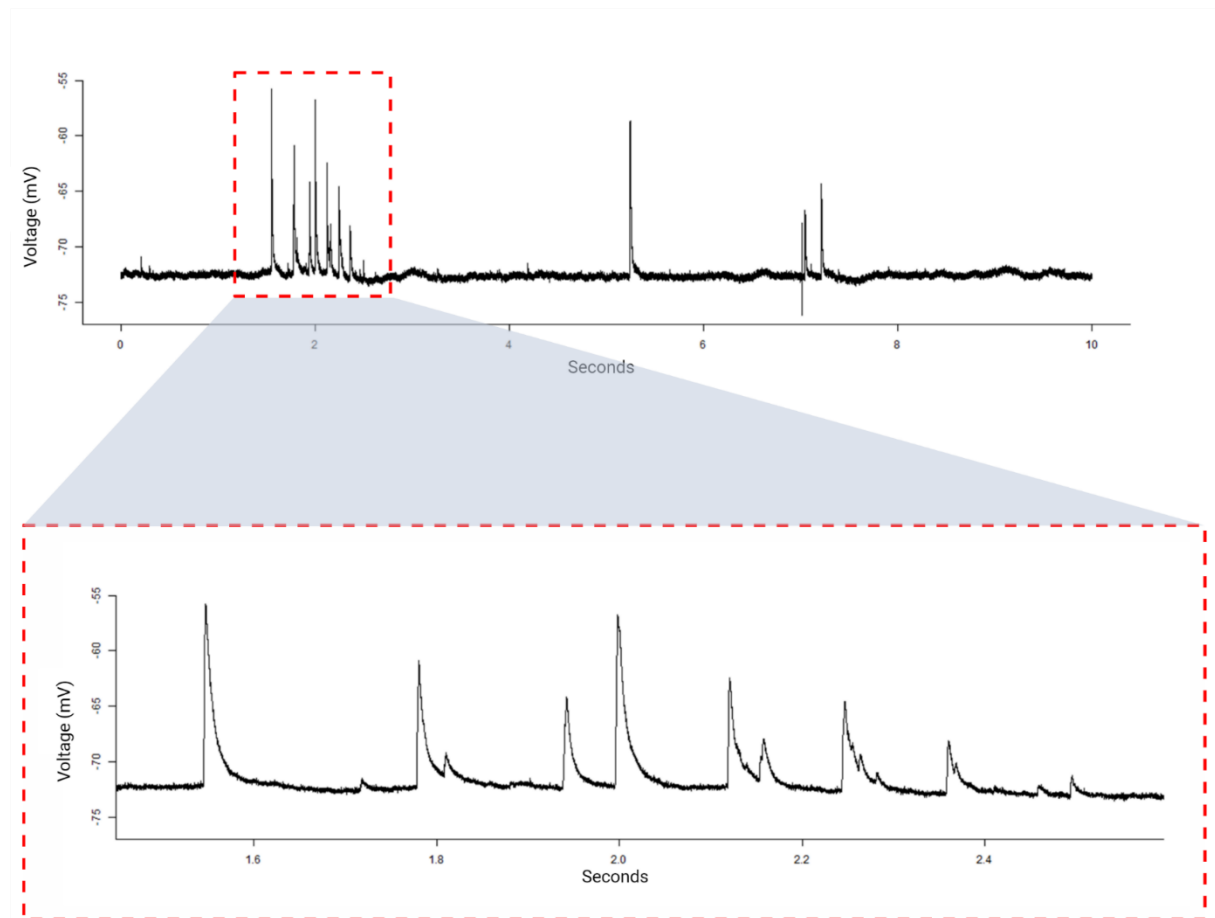


Abbildung 7: Spontan auftretende postsynaptische Potentiale in iPSC abgeleiteten Neuronen. Oben: Current clamp Aufnahme über 10 sec. Deutlich erkennbar sind transiente aufwärtsgewandte Depolarisationen. Unten: Detailaufnahme von oben über ca 1 sec.

Nachdem in den Patch-Clamp Versuchen gezeigt werden konnte, dass die differenzierten Zellen einen neuronalen Phänotyp aufweisen (Expression spannungsabhängiger Na⁺ und K⁺ Kanäle, Generierung von APs, Auftreten spontaner postsynaptischer Potentiale), wurde damit begonnen, neuronale Netzwerke auf Mikroelektrodenarray-Chips (MEA) zu kultivieren. Hierbei handelt es sich um ein System, auf dem die Neurone auf substratintegrierten Mikroelektroden wachsen und die elektrische Aktivität nichtinvasiv gemessen werden kann.

Auch mithilfe dieses Meßsystems konnten spontan auftretende Feldaktionspotentiale (fAPs) auf einigen Elektroden ermittelt werden (Abbildung 8). Zum aktuellen Zeitpunkt laufen Analysen, mithilfe derer untersucht wird, ob die erhaltenen Signale auf den einzelnen Elektroden synchron auftreten, was bedeuten würde, dass es sich um ein synaptisch

miteinander gekoppeltes, neuronales Netzwerk handelt, oder ob die entstehenden fAPs unabhängig voneinander auftreten.

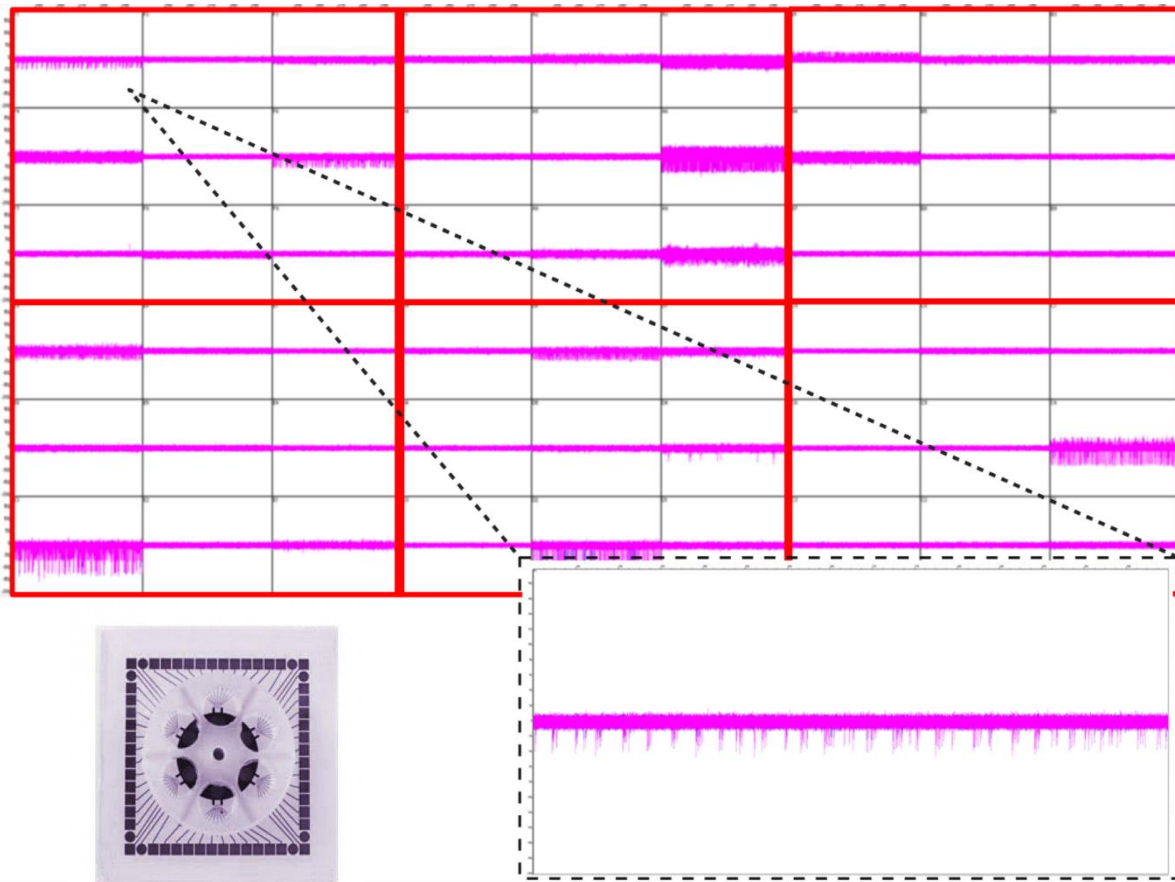
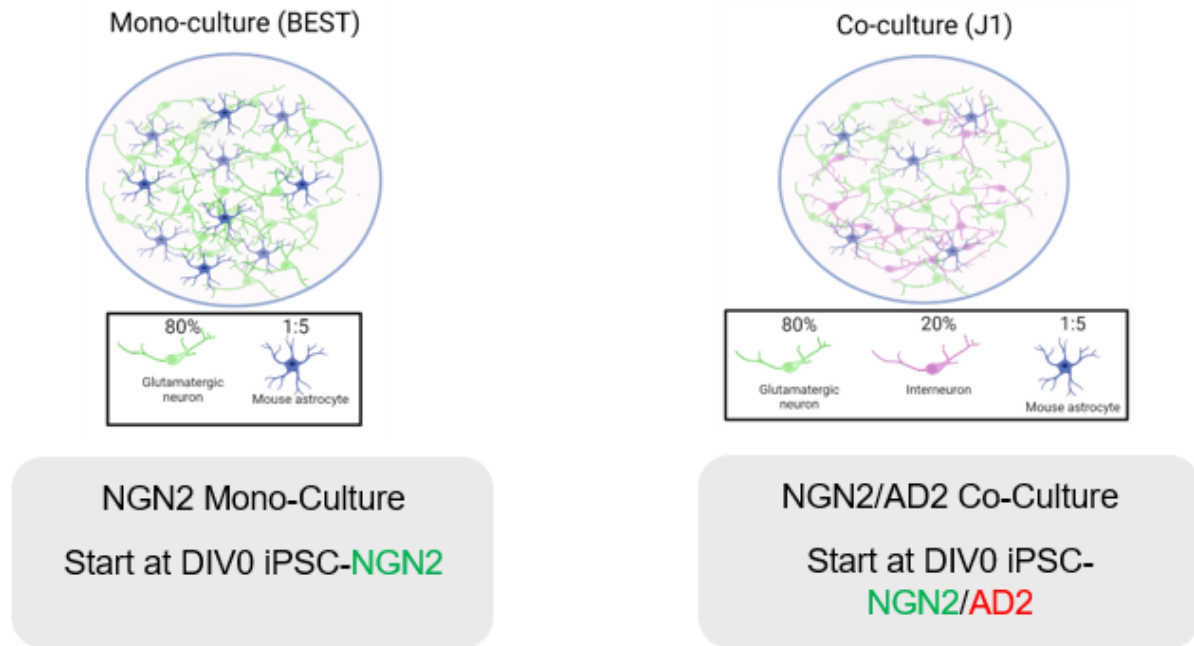


Abbildung 8: MEA Aufnahmen iPS-abgeleiteter neuronaler Kulturen. Hier wurde ein 6-well MEA verwendet (unten links), das erlaubt sechs Experimente unabhängig voneinander parallel durchzuführen. Jedes kleine Kästchen entspricht einer Spannung/Zeit-Aufnahme einer Elektrode, 9 Elektroden (3x3) entsprechen einem Well. Unten rechts herausvergrößert: spontane fAP Burst-Aktivität von einer Elektrode.

MEA-Aufzeichnungen zeigen spontane Netzwerkaktivität und die Bedeutung der Zelldichte. Die Experimente wurden mit zwei neuronalen Kulturprotokollen durchgeführt: Monokultur (glutamaterge Neuronen und Maus-Astrozyten, da AD2 iPSC-abgeleitete Interneuronen nicht verfügbar waren) und Co-Kultur (einschließlich Interneuronen). Die J1-Gruppe diente als Kontrollgruppe, während die BEST-Gruppe eine vom Patienten stammende Zelllinie (MS21) war.



Überblick über die verschiedenen hiPSC-abgeleiteten neuronalen Kulturmodi.

Die Aufnahmen wurden nach einer 10-minütigen Akklimatisierungsphase bei DIV49-50, 37°C, 95% O₂ und 5% CO₂ durchgeführt. Zur Erleichterung der Datenanalyse wurden sechs Aufzeichnungen von je 5 Minuten Dauer nacheinander durchgeführt, so dass sich die Gesamtzeit auf 30 Minuten belief.

Mossink et al. konnten einen Einfluss der Zelldichte auf die Funktionalität neuronaler Netzwerke nachweisen (Mossink et al., 2021). Daher zielten die ersten Experimente darauf ab, eine optimale Zelldichte mit stabilen und funktionalen neuronalen Netzwerkmerkmalen zu finden. Um dies zu erreichen, wurden verschiedene Parameter des neuronalen Netzes während der 30-minütigen Aufzeichnungszeit überwacht. Acht Parameter wurden bei der Analyse berücksichtigt: Netzwerk-Burst-Rate (nb rate), Kappa-Bursts, Kappa-Spikes, Spikes pro, Elektroden pro Netzwerk-Burst, Spikes im Netzwerk-Burst, Elektroden im Netzwerk-Burst und Netzwerk-Burst-Intervall (nb ibi). Cohens Kappa wurde zur Beschreibung der Synchronität der neuronalen Aktivität verwendet (Izsak et al., 2019). Die Parameter wurden auf die erste 5-minütige Aufzeichnung normalisiert, und eine stabile Netzwerkaufzeichnung sollte keine starke Variabilität der Parameter über die 30 Minuten der Aufzeichnung aufweisen.

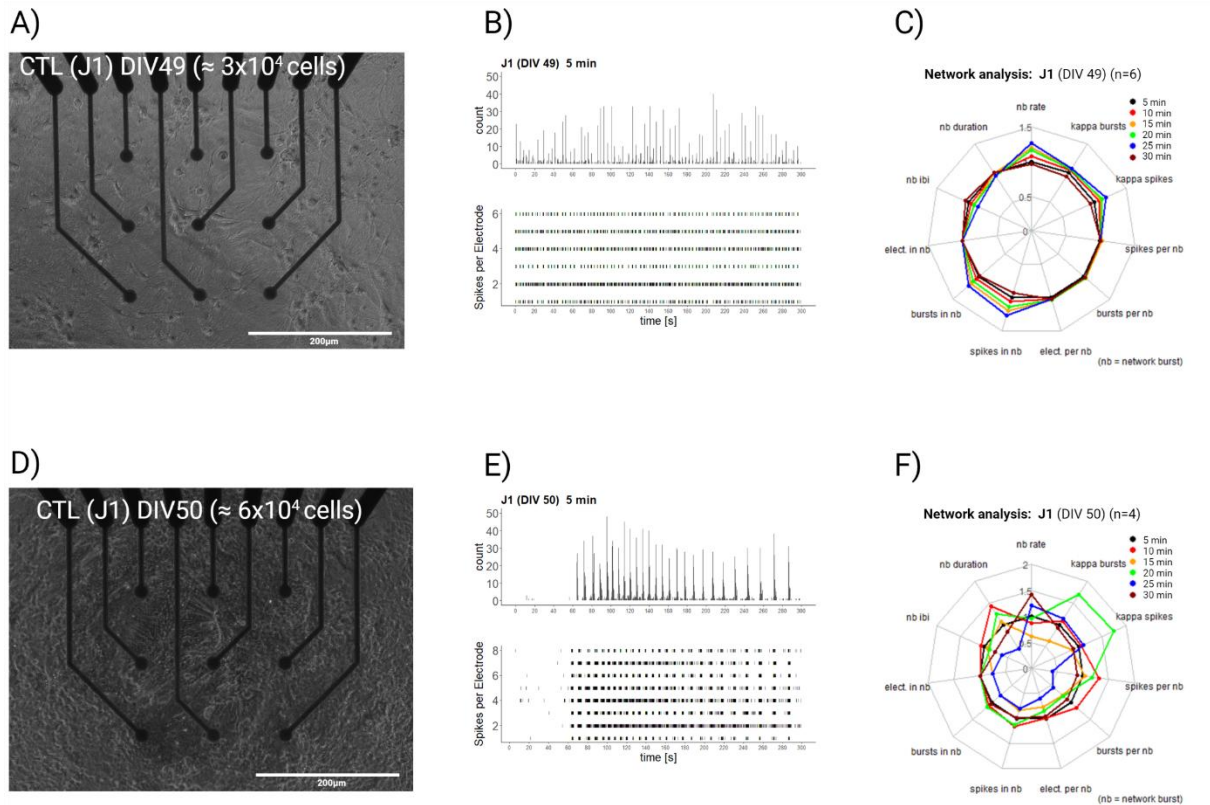


Abbildung 9: **A)** Bild der Co-Kultur mit einer Zelldichte von ($\approx 3 \times 10^4$ Zellen/Well). **B)** Histogramm und Rasterplot (oben bzw. unten), die die spontane Netzwerkaktivität in den ersten 5 Minuten der Aufnahme zeigen. **C)** Spiderplot mit stabilen Netzwerkparametern über die gesamte Aufnahmezeit. **D)** Bild der Co-Kultur mit einer Zelldichte von ($\approx 6 \times 10^4$ Zellen/Well). **E)** Histogramm und Rasterdiagramm. **F)** Spiderplot, bei dem die Parameter der Netzwerkaktivität über die 30 Minuten der Aufnahme eine erhöhte Variabilität aufweisen

Alle Klone zeigten während der 30-minütigen Aufnahme spontane Netzwerkaktivität. Interessanterweise zeigte die Kontrollgruppe (J1), die in einer höheren Dichte ($\approx 6 \times 10^4$ /Well) kultiviert wurde, während der 30-minütigen Aufnahme eine instabile spontane Netzwerkaktivität im Vergleich zu den Klonen, die in einer niedrigeren Konzentration ($\approx 3 \times 10^4$ /Well) plattiert wurden.

Um zu bestätigen, dass die Phänotypisierung des neuronalen Netzwerks Ähnlichkeiten und Reproduzierbarkeit aufweist, wurde die Hauptkomponentenanalyse (PCA) auf die relevanten MEA-Parameter für die Netzwerkaktivität angewendet (Tabelle 1).

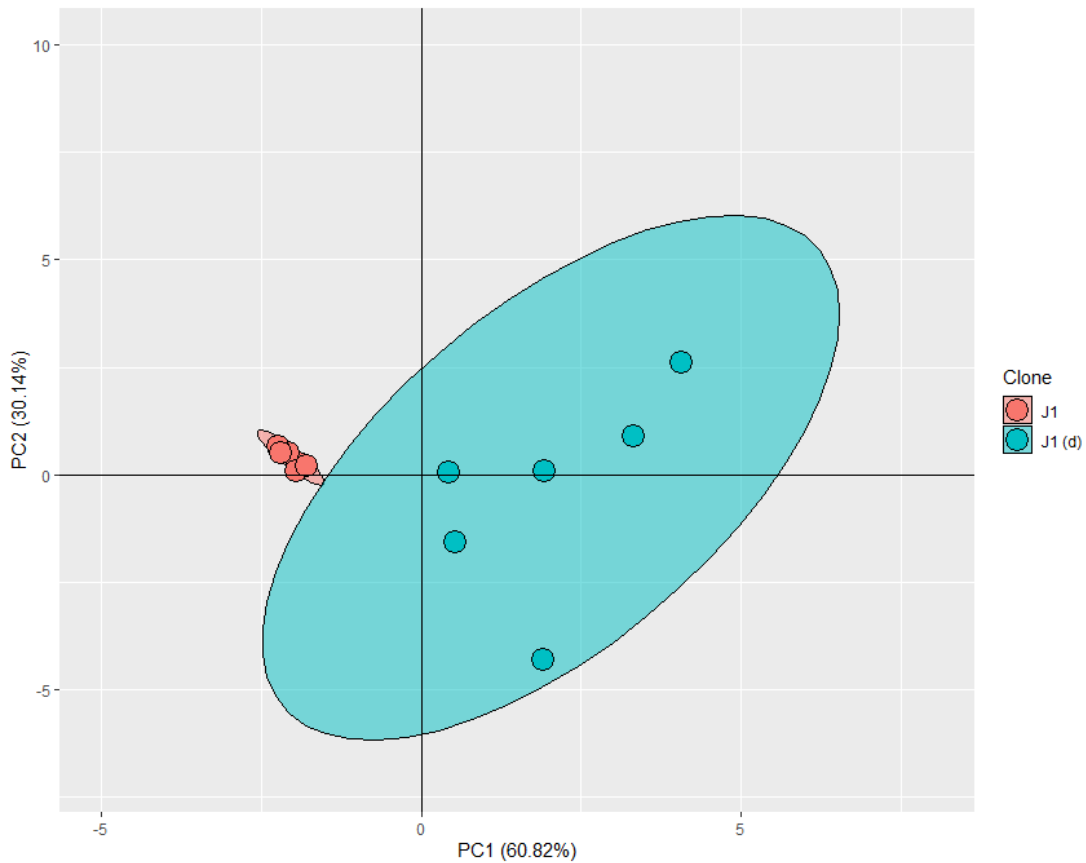
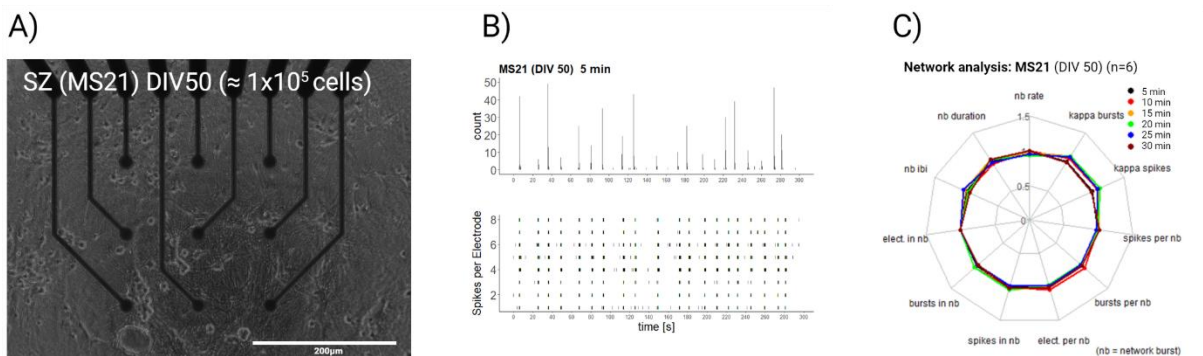


Abbildung 10: Die Principal-Component-Darstellung zeigt eine klare Clusterung des J1-Klons mit der optimalen Zelldichte im Vergleich zu dem sehr dichten J1(d). 60,82 % der Variation wird durch PC1 und 30,14 % durch PC2 erklärt.

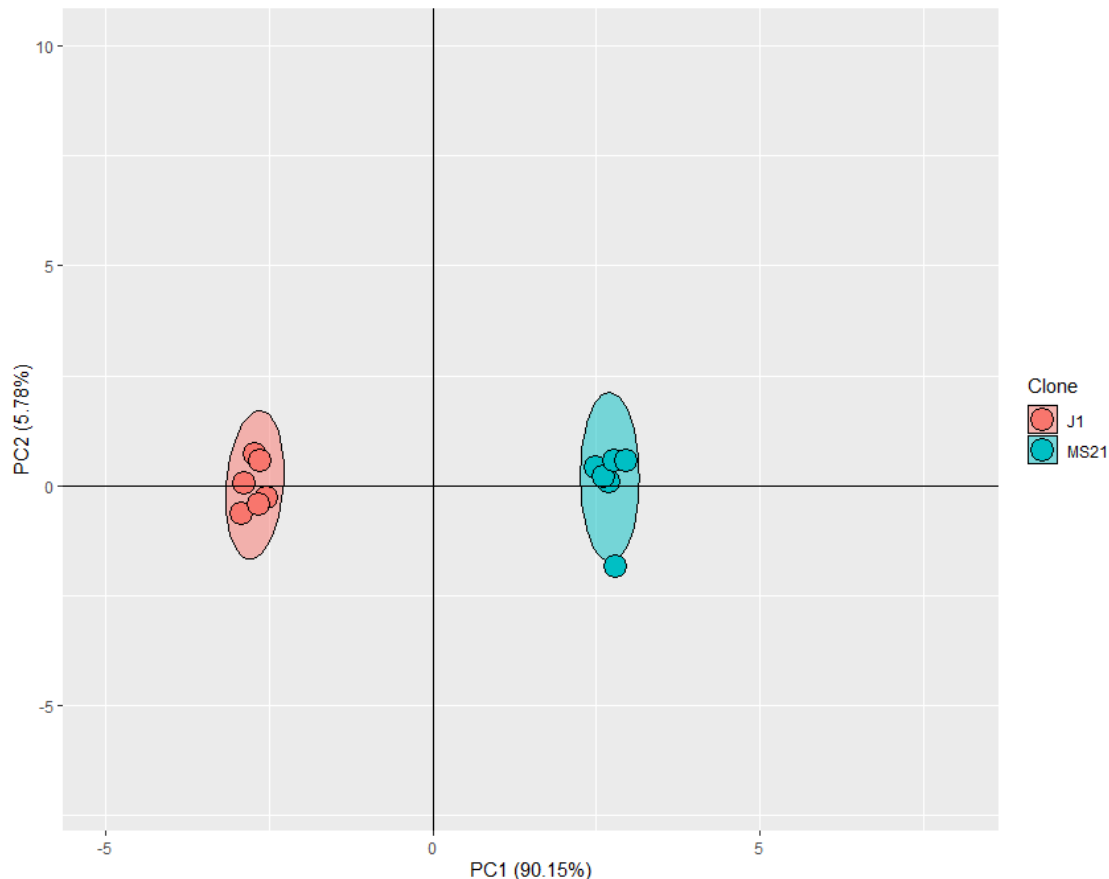
Die Ergebnisse der Hauptkomponentenanalyse (PCA) zeigen, dass bei Erreichen der optimalen Zelldichte eine deutliche Clusterung des J1-Klons zu beobachten ist. Die ersten beiden Hauptkomponenten erklären 91 % der Variation, wobei 60,82 % auf PC1 und 30,14 % auf PC2 entfallen. Die Zelldichte spielt eine wichtige Rolle für die Reproduzierbarkeit der Experimente und ist daher ein wichtiger Faktor, der bei der Versuchsplanung zu berücksichtigen ist.



Monokultur zeigt stabile spontane Netzwerkaktivität. A) Bild der Co-Kultur mit einer Zelldichte von (≈ 1x10⁵ Zellen/Vertiefung). B) Histogramm und Rasterplot (oben bzw. unten) zeigen die

spontane Netzwerkaktivität der ersten 5 Minuten der Aufzeichnung. C) Spiderplot mit stabilen Netzwerkparametern über die gesamte Aufzeichnungszeit.

Trotz des Fehlens von Interneuronen in der vom Patienten stammenden Linie (MS21) zeigte die Kultur eine stabile Netzwerkaktivität über die 30 Minuten der Aufzeichnung. Hier wurde die Zelldichte am Tag der Ausplattierung erhöht (1×10^5 Zellen/Vertiefung), da wir vermuten, dass die Lebensfähigkeit aufgrund der Exzitotoxizität abnahm.



PCA der Co-Kultur (J1) und der Monokultur (MS21). Es ist eine klare Clusterbildung zwischen den beiden unterschiedlichen Kulturen zu beobachten, wobei 90,15 % der Variation durch PC1 und 5,78 % durch PC2 erklärt werden. Die Co-Kultur hat also andere funktionelle Eigenschaften als die Monokultur.

Zusammenfassend zeigen die bisherigen Ergebnisse der Studie, dass iPSCs in funktionelle Neuronen differenziert werden können, deren Eigenschaften mit denen primärer Neuronen vergleichbar sind. Die Neuronen erzeugten spontane Netzwerkaktivität, und die optimale Zelldichte erwies sich als wichtig für die langfristige Stabilität dieser Aktivität. Die Hauptkomponentenanalyse erweist sich als nützliches Instrument zur Differenzierung zwischen den Klonen und wird im weiteren Projektverlauf weiterverfolgt.

Parameter	Abkürzung	Einheit	Explanation
Network burst rate	NBR	N.A.	Netzwerk burst/ Aufnahmezeit (300s)
Network burst duration	NBD	ms	Der NBD steht für die Dauer des Netzwerk-Bursts.
Network inter-burst interval	NIBI	s	Das NIBI ist das Intervall zwischen zwei aufeinanderfolgenden Netzwerk-Bursts.
Bursts in network bursts	BNB	%	
Spikes in network bursts	SNB	%	Prozentualer Anteil aller Spikes, die in einem Netzwerk-Burst organisiert sind.
Spikes per network burst	SPNB	N.A.	Durchschnittliche Anzahl von Spikes pro Netzwerk-Burst
cv_spikerate	CV _{SR}	N.A.	Der Variations-koeffizient wird berechnet, indem die Standardabweichung aller Spike-Raten durch den Mittelwert dividiert wird.
cv_burstrate	CV _{BR}	N.A.	Der Variations-koeffizient wird berechnet, indem die Standardabweichung aller Burst-Raten durch den Mittelwert dividiert wird.
cv_NIBI	CV _{NIBI}	N.A.	Der Variationskoeffizient wird berechnet, indem die Standardabweichung aller NIBI durch den Mittelwert dividiert wird. Der Wert liegt zwischen 0 (sehr regelmäßige Netzwerkausbrüche) und 1 (sehr unregelmäßige Netzwerkausbrüche).

Tabelle

1

Kurzzeitige, intrazelluläre Veränderungen der Kalziumkonzentration können durch konfokale Mikroskopie oder mit einem hochdurchsatzfähigen Kalziumimager (Hamamatsu) bestimmt werden.

Vorexperimente für Kalziummessungen im Durchsatz

Für die Kokultur (5×10^4 Zellen pro Vertiefung) im hohen Durchsatz wurde ein Kalzium-Imaging-System (Hamamatsu) für 96-Well-Platten verwendet. Zur Messung von Kalziumsignalen wurden die Zellen zunächst mit dem Farbstoff Cal520 in Brainphys-Medium für 45-50 Minuten inkubiert. Anschließend wurde das Medium durch Tyrode-Puffer ersetzt (Zusammensetzung in Mio.: 135 NaCl, 5 KCl, 10 D-Glucose, 0,2 MgCl₂, 10 HEPES, 2,5

CaCl₂ und 0,01 Glycin) und in das Hamamatsu-System überführt. Die Zellen wurden zunächst für 15 Minuten akklimatisiert. Während des gesamten Experiments wurde eine konstante Temperatur von 37 °C beibehalten. Vor der Zugabe von 10 µM MK801, einem nicht-kompetitiven NMDA-Kanal-Blocker, wurde fünf Minuten lang eine Grundlinie zur Erfassung der Basalaktivität aufgezeichnet. Anschließend wurden die Daten für weitere 13 Minuten aufgezeichnet. Nach diesem ersten Durchlauf wurde die Datenerfassung unterbrochen, damit die 96-Well-Platte mit den Zellen 15 Minuten lang im Hamamatsu ruhen konnte. Die Datenerfassung wurde dann wieder aufgenommen, um die erwartete Blockade des NMDA-Kanals zu bestätigen. Anschließend wurden 20 µM CNQX hinzugefügt, um den Beitrag von AMPA zu den Kalziumtransienten zu blockieren. Nach 8 Minuten wurde NMDA zugegeben, um eine vollständige NMDAR-Blockade sicherzustellen. Ziel dieser Experimente war es, den Beitrag der NMDA/AMPA-Rezeptoren zu den Kalziumtransienten aufzuklären und die Ergebnisse zwischen CTR- und SCZ-Klonen zu vergleichen.

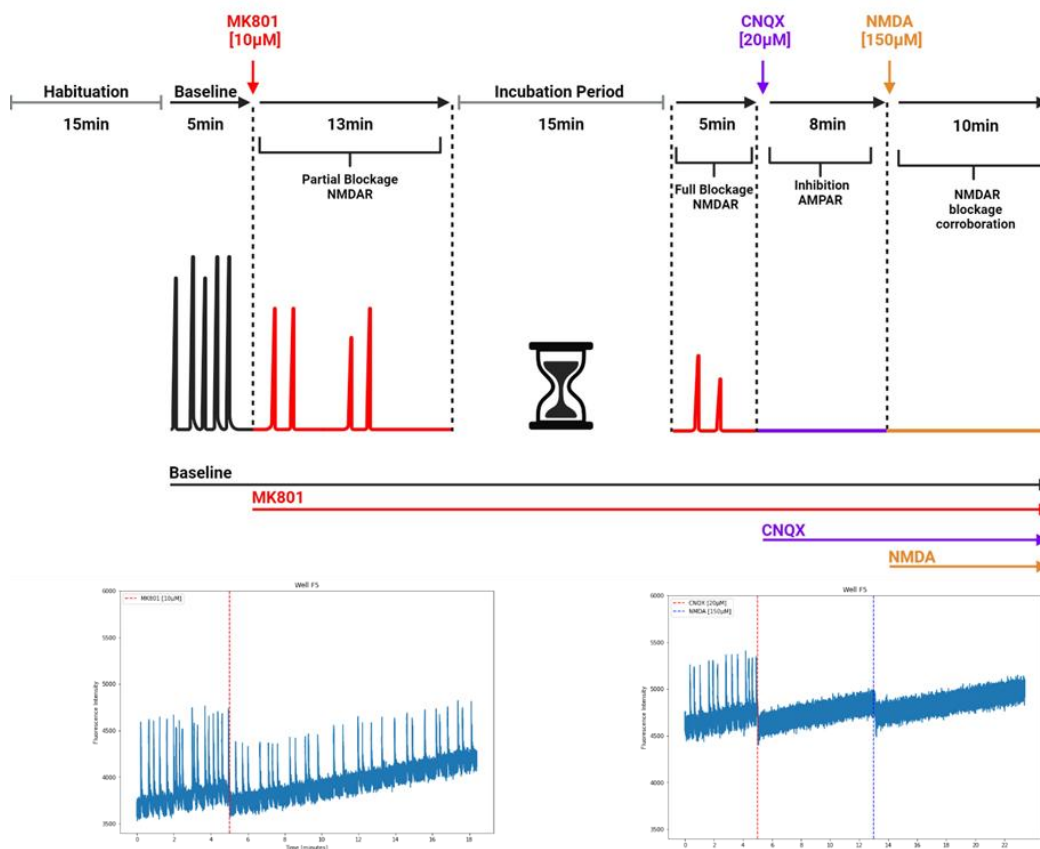


Abbildung 11: Versuchsaufbau zur Klärung des Beitrags von NMDA/AMPA-Rezeptoren zu den Kalziumtransienten. Oben: Schematischer Versuchsaufbau und zeitlicher Verlauf des Experiments. Unten: Beispielhafte Kalzium-Messungen des o.g. Protokolls. Daten aus demselben Experiment.

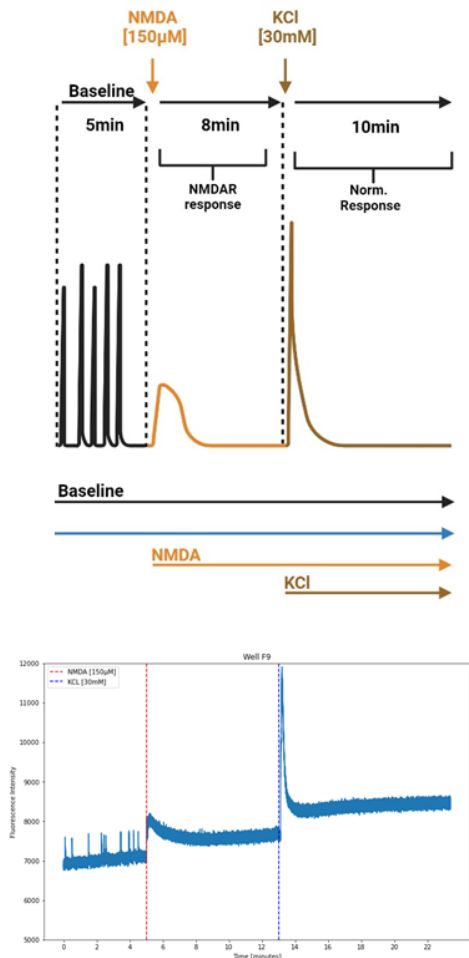


Abbildung 12: Versuchsaufbau für die Untersuchung der NMDA-Rezeptorempfindlichkeit.

Wir befolgten das in Abbildung 3 beschriebene Verfahren, einschließlich der Inkubation mit Cal-520, der Verwendung von Tyrode-Puffer und der Akklimatisierungsphase. Während der Datenerfassung wurde zunächst eine 5-minütige Grundlinie aufgezeichnet. Anschließend wurde NMDA [150µM] zugeführt, was zu einem plötzlichen Anstieg der Kalziumtransienten führte, die gemessen werden sollen. Um genaue Vergleiche zu gewährleisten, werden wir diese Reaktionen normalisieren, indem wir eine vollständige Depolarisierung aller Zellen in der Kultur mit KCl in einer Konzentration von 30 mM herbeiführen.

Um die Empfindlichkeit von NMDAR gegenüber seinem Liganden umfassend zu bewerten, wurde NMDA [150 µM] appliziert und der daraus resultierende Anstieg der Kalziumtransienten gemessen. Aufgrund der Tatsache, dass die Anzahl an Zellen in den einzelnen Versuchen aus technischen Gründen leicht variierte, besteht die Möglichkeit, dass daraus eine Variabilität der Amplitude resultiert, die nicht Teil des eigentlichen Mechanismus ist. Um diesen Effekt zu kompensieren, wurde eine Normalisierungsmethode entwickelt. Dazu wurden am Ende des jeweiligen Experiments alle Zellen der Kultur mit 30 mM KCl depolarisiert und die NMDA-Amplitude auf den resultierenden transienten KCl-Anstieg normalisiert.

Meilenstein MS441 – Kalziumkonzentrationen und elektrophysiologische Parameter der ersten iPSC Charge bestimmt

- Kalziumkonzentrationen der ersten iPSC Charge

Nach den initialen Ca^{2+} Experimenten wurde ermittelt, ob die in den SCZ-Klonen beobachtete erhöhte Netzwerkaktivität in einem anderen Funktionstest repliziert werden konnte, und untersuchen, wie NMDA-, AMPA- und Kainat-Rezeptoren die Netzwerkdynamik und die Gesamtaktivität in der Co-Kultur beeinflussen. Dies ist besonders wichtig, da Veränderungen von Neurotransmitter-Rezeptoren, wie z. B. NMDA-Rezeptoren, als Schlüsselerscheinungen der Schizophrenie diskutiert werden (Balu 2016). Zur Bewertung der neuronalen Aktivität verwendeten wir einen kalziumempfindlichen Farbstoff und ein Hochdurchsatz-Bildgebungssystem (Hamamatsu FDSS μCell). Die Zellen wurden in einer 96-Well-Platte in einer Dichte von 5×10^4 Zellen pro Vertiefung plattiert, wobei NGN2- und AD2-Zellen 80 % bzw. 20 % der Gesamtmenge ausmachten und primäre Maus-Astrozyten in einem Verhältnis von 1:5. Die Experimente wurden bei DIV42 (± 2 Tage) durchgeführt. Am Versuchstag wurden die Zellen 45-50 Minuten lang mit dem Farbstoff Cal-520 [$2 \mu\text{M}$] in Brainphys-Medium inkubiert. Das Medium wurde dann durch Tyrode-Puffer (in mM: 135 NaCl, 5 KCl, 10 D-Glucose, 0,2 MgCl_2 , 10 HEPES, 2,5 CaCl_2 , 0,01 Glycin) ersetzt, und die Zellen wurden in das Hamamatsu-System überführt, wo sie 10 Minuten lang bei 37°C akklimatisiert wurden.

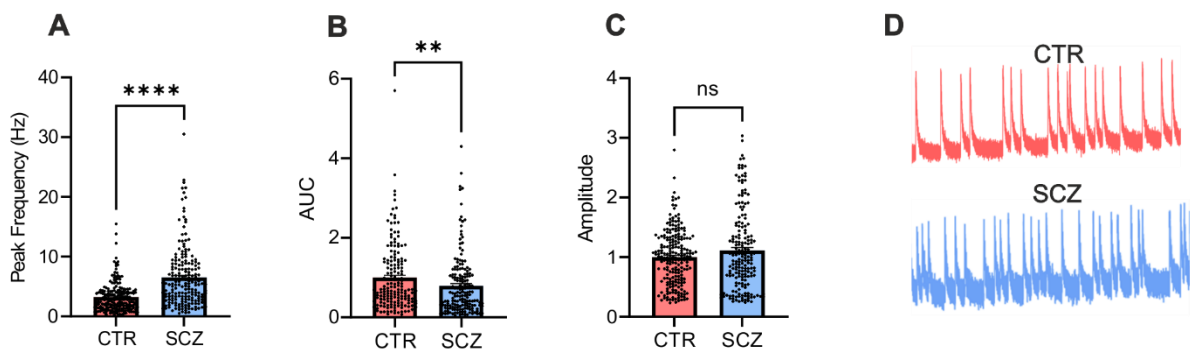


Abbildung 13 Baseline-Aufzeichnungen zeigen eine erhöhte Aktivität in SCZ-Klonen. Krankheitsklone zeigen (A) eine erhöhte Kalziumtransienten-Spitzenfrequenz und (B) eine verringerte Fläche unter der Kurve (AUC) im Vergleich zu Kontrollklonen (CTR). (C) Die Amplitude war nicht betroffen. (D) Dargestellt sind repräsentative Kalziumtransienten von CTR- und SCZ-Klonen.

SCZ-Klone weisen einen hyperaktiven Phänotyp auf, wie die erhöhte Spitzenfrequenz von Kalziumtransienten zeigt (Abbildung 13). Dieser Befund korreliert mit MEA-Experimenten, die ebenfalls eine erhöhte Network Burst Rate (NBR) zeigten (Abbildung 15), was auf eine veränderte exzitatorische Signalübertragung in diesen Neuronen hinweist.

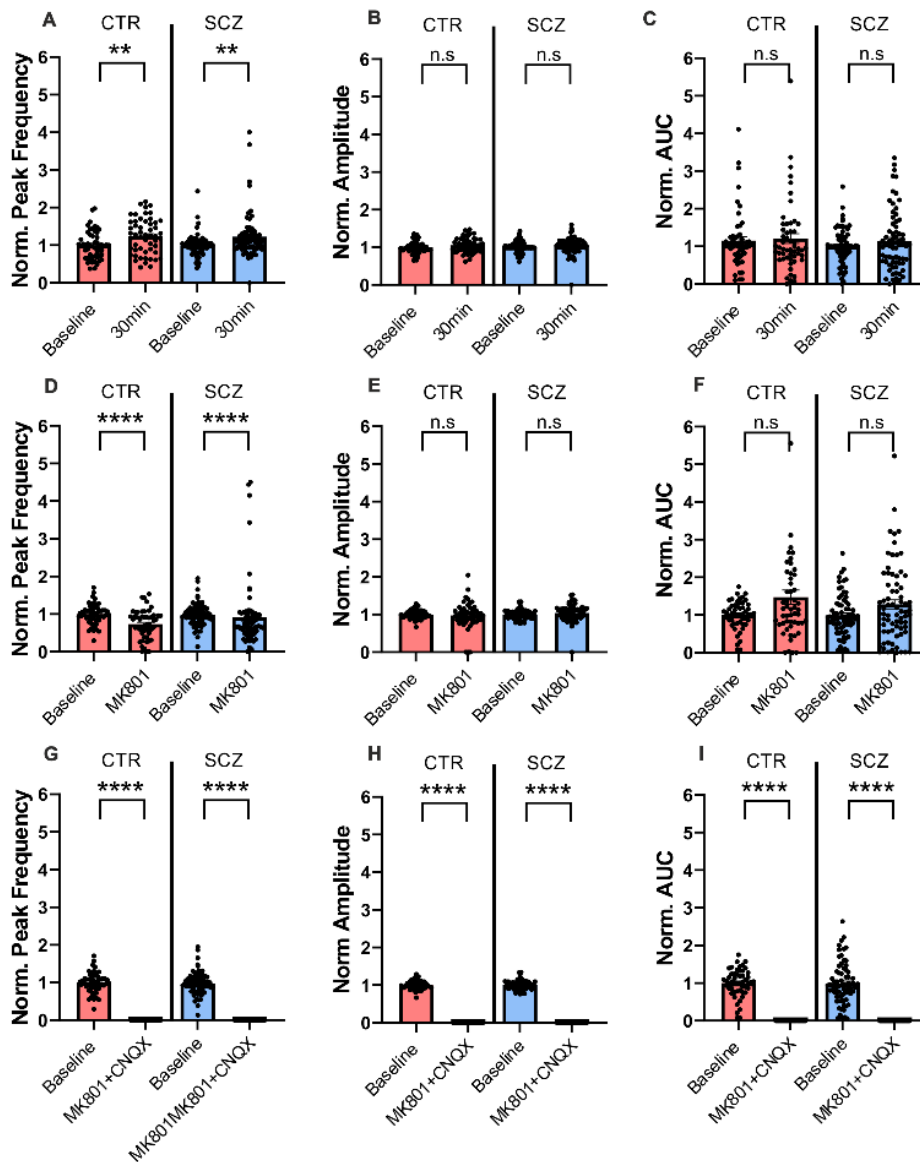


Abbildung 14 Die Klone zeigen einen zeitabhängigen Aktivitätsanstieg, der durch MK801 reduziert und durch CNQX vollständig gestoppt wird. Um die Stabilität der Parameter während des Aufzeichnungszeitraums zu bewerten, wurden Messungen zu Beginn und 30 Minuten später vorgenommen. (A) Die Spitzenfrequenz nahm sowohl bei den CTR- als auch bei den SCZ-Klonen zu, während (B) die Amplitude und (C) die AUC konstant blieben. Die Rolle der NMDA-Rezeptoren wurde dann durch den Vergleich der Ausgangswerte mit den 30 Minuten nach der Zugabe von MK801 aufgezeichneten Werten bewertet. Dies führte zu einer Abnahme der (D) Spitzenfrequenz sowohl für CTR- als auch für SCZ-Klone, während (E) Amplitude und (F) AUC unverändert blieben. Schließlich stoppte die Zugabe von CNQX die neuronale Aktivität vollständig (G-I).

Die Daten zeigen, dass die Kalziumspitzenfrequenz sowohl in CTR- als auch in SCZ-Klonen im Laufe der Zeit zunimmt, während Amplitude und AUC stabil bleiben. Der zeitabhängige Anstieg der Spitzenfrequenz im Laufe der Zeit ist ein Merkmal, das bei der Interpretation der pharmakologischen Ergebnisse berücksichtigt werden muss. Die Blockade des NMDA-Rezeptors mit MK801 führt zu einer deutlichen Verringerung der Spitzenfrequenz, was zeigt, dass NMDA-Rezeptoren eine entscheidende Rolle bei der Modulation der neuronalen Aktivitätsfrequenz spielen, ohne die Amplitude oder AUC zu verändern. Darüber hinaus unterstreicht das vollständige Aufhören der neuronalen Aktivität nach der CNQX-Behandlung die Rolle der AMPA- und Kainat-Rezeptoren bei der Aufrechterhaltung der exzitatorischen Signalübertragung. Diese Ergebnisse stimmen mit früheren Studien (7) überein und weisen darauf hin, dass die Netzwerkkommunikation, wie sie durch die Spitzenfrequenz angezeigt wird, durch NMDA-Rezeptoren reguliert wird, wobei AMPA- und Kainatrezeptoren einen entscheidenden Beitrag leisten. Bemerkenswerterweise wurden nach der NMDA-Rezeptorblockade keine Unterschiede zwischen CTR- und SCZ-Klonen festgestellt, was darauf hindeutet, dass die Auswirkungen der NMDA-Rezeptorblockade unter diesen Bedingungen ähnlich sind.

- Elektrophysiologische Messungen mit der ersten iPSC Charge

In einem weiteren Versuchsaufbau wurde die Netzwerkkommunikation der kokultivierten iPSC-Neuronen CTR und SCZ mithilfe der MEA Methode verglichen. In unserer Studie haben wir 6-Well-Multielektroden-Array (MEA) für die Messung der Netzwerkaktivität eingesetzt. In unserer Analyse wurden verschiedene Netzwerkparameter berücksichtigt:

- Netzwerk-Burst-Rate (NBR): Netzwerkburst/Zeitaufzeichnung (300s).
- Netzwerk-Burst-Dauer (NBD): Dauer des Netzwerkbursts in Millisekunden.
- Netzwerk Inter-Burst Intervall (IBI): Durchschnittliches Zeitintervall zwischen Netzwerk-Bursts in Sekunden.
- % der Bursts in Netzwerk-Bursts: Prozentualer Anteil aller Bursts, die in einem Network Burst organisiert sind.
- % der Spikes in Netzwerk-Bursts: Prozentualer Anteil aller Spikes, die in einem Network Burst organisiert sind.

Hierzu wurden glutamaterge NGN2- und GABAerge AD2-iPSC-Linien im Verhältnis 80% zu 20%, 5×10^4 Zellen pro Vertiefung in 6-Well-MEAs differenziert und kokultiviert, um die Netzwerkkonnektivität zwischen CTR- (MC2, MC5, MC7, MC9 und MC14) und SCZ- (MS6, MS18, MS21 und MS29) kortikalen Neuronen zu vergleichen. Zusätzlich wurde die Kultur mit

primären Mausastrozyten im Verhältnis 1:5 ergänzt. Die Aufzeichnungen wurden bei DIV42 (± 2 Tage), 37 °C, 95 % O₂ und 5 % CO₂ nach einer 10-minütigen Akklimatisierungszeit durchgeführt.

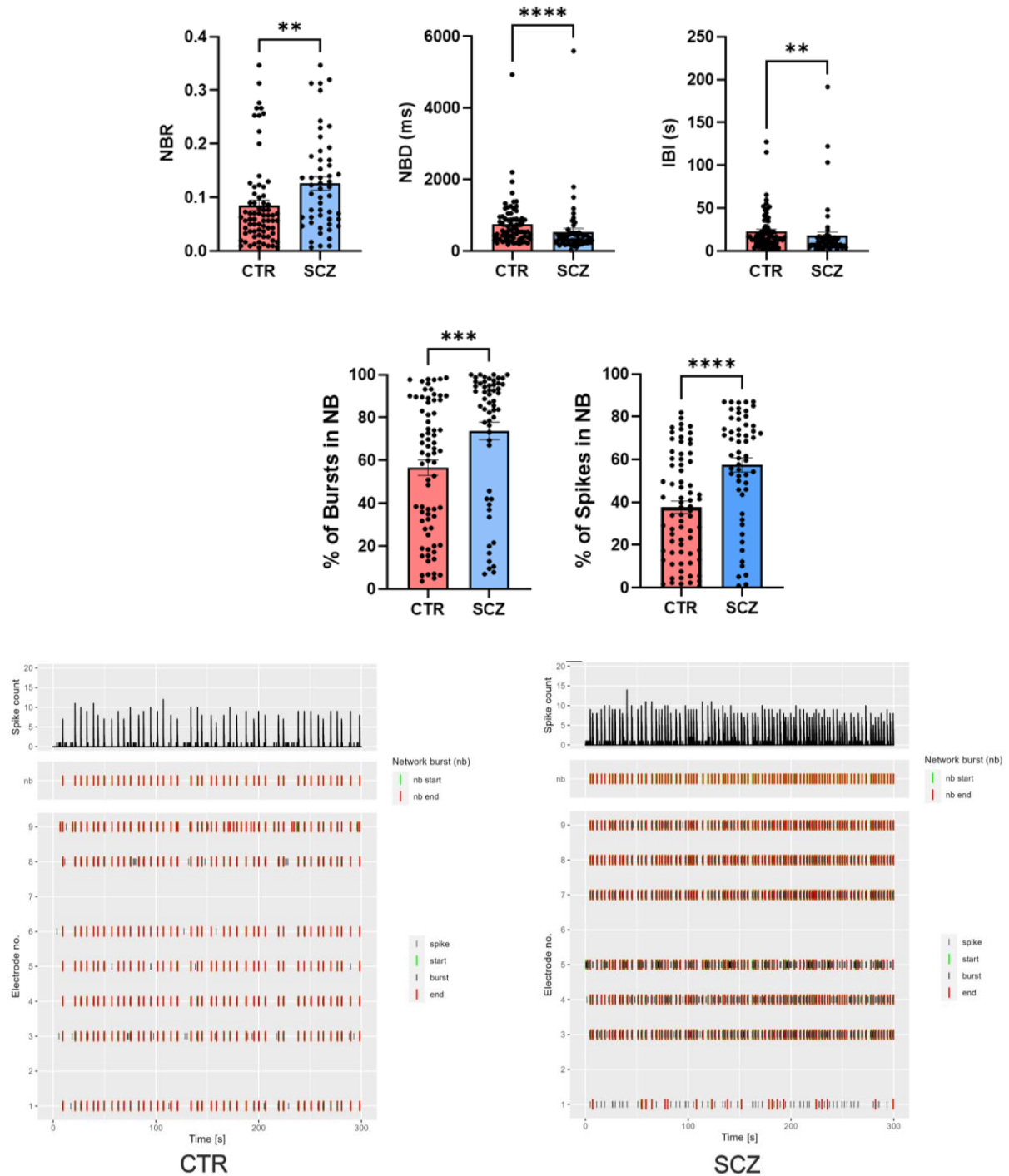


Abbildung 15: Von SCZ abgeleitete Neuronen weisen eine erhöhte Netzwerkkonnektivität auf. Daten gepoolt aus allen bisher zur Verfügung stehenden Klonen. NBR Network burst rate, NBD Network burst duration, IBI Inter burst interval, NB Network burst. Rot: Kontroll-Klone (CTR), Blau: Patienten-Klone (SCZ). Repräsentative Aktivitätsplots sind im unteren Teil dargestellt (links Kontrolle, rechts Schizophreniepatient)

Die gepoolten Daten von drei biologischen Replikaten jedes der bisherigen gemessenen Klone zeigen, dass SCZ-abgeleitete Klone eine erhöhte Netzwerkaktivität aufweisen. Dies wird durch einen Anstieg der Network Burst Ratio (NBR) sowie durch einen höheren Prozentsatz von Bursts innerhalb von Network Bursts und Spikes innerhalb von Network Bursts belegt. Darüber hinaus ist ein Rückgang der Network Burst Duration (NBD) und der Interburst Intervalle (IBI) zu verzeichnen. Diese Ergebnisse zeigen eine unterschiedliche Dynamik der Netzwerkkommunikation zwischen den von Patienten stammenden Klonen und der Kontrollgruppe.

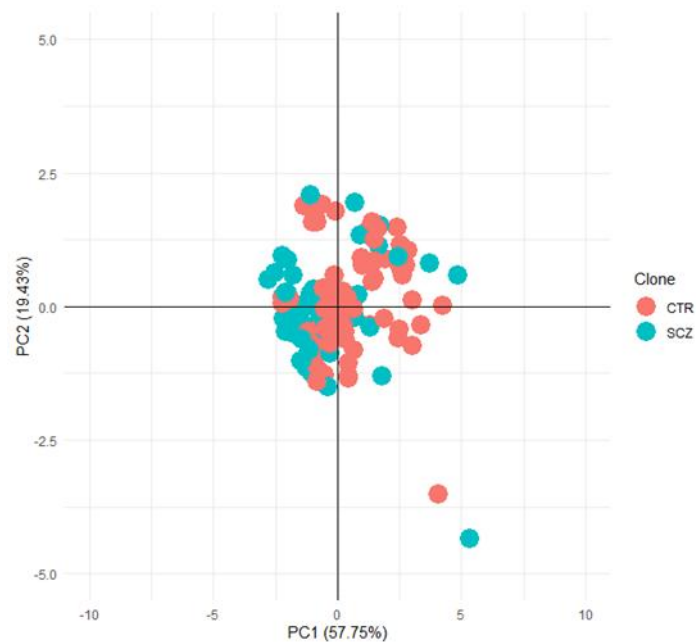


Abbildung 16: Principal Component Analyse (PCA). Es sind keine Unterschiede zwischen den Datensätzen der Kontroll- und der Patientenlinien erkennbar.

Principal Component Analysis (PCA) wurde auf die vorherigen Netzwerkkonnektivitätsparameter angewandt, um mögliche Unterschiede in der Clusterbildung zwischen CTR- und SCZ-Neuronen zu untersuchen. Die resultierende Darstellung zeigte kein ausgeprägtes Clustermuster, wobei 57,75 % der Variation durch PC1 und 19,43 % durch PC2 erklärt wurden.

Meilenstein MS444 – Kalziumkonzentrationen und elektrophysiologische Parameter der zweiten iPSC Charge bestimmt

- Kalziumkonzentrationen der zweiten iPSC Charge

Zusätzlich wurden in diesem Arbeitspaket physiologische Messungen mit neuronalen Co-Kulturen (glutamaterge NGN2 Neuronen und GABAerge AD2 Neuronen) der zweiten iPSC Charge, isogene Kontrolllinie und drei Deletionslinien, mit Einzelzellanalyse durchgeführt. Intrazelluläre Kalziummessungen konnten am Tag 42 der Kultivierung erfolgreich durchgeführt werden. Dabei wurden die Messungen nicht wie bisher im Kultivierungsmedium, sondern im oben beschriebenen Tyrode-Puffer vollzogen. Diese Pufferlösung ist für einen erhöhten Anteil an Kaliumchlorid bekannt, wodurch das Ruhemembranpotential der Neuronen erhöht und die Entstehung der Aktionspotentiale erleichtert wird.

Die Kalziummessungen wurden mit 5 unabhängigen Differenzierungen durchgeführt. Dabei wurden die neuronalen Co-Kulturen am Tag 42 mit dem kalziumsensitiven Farbstoff Cal520-AM für 30 Minuten gefärbt, zum Tyrode-Puffer als Aufnahme-medium gewechselt und nach einer 10-minütigen Akklimatisierungsphase bei 37 °C und 5 % CO₂ für 3 Minuten am CellObserver aufgenommen. Insgesamt wurden pro Linie, zwei Wells gefärbt und pro Well 2 Videos aufgenommen.

Die drei Deletionslinien zeigten eine signifikante erhöhte Area under the Curve (AUC), sowie eine signifikant erhöhte Amplitude ($\Delta F/F_0$) im Vergleich zur Kontrolllinie. Zudem wiesen die drei Deletionslinien eine signifikant reduzierte Frequenz (Peak Frequency) auf, im Vergleich zur Kontrolle (siehe Abbildung 14).

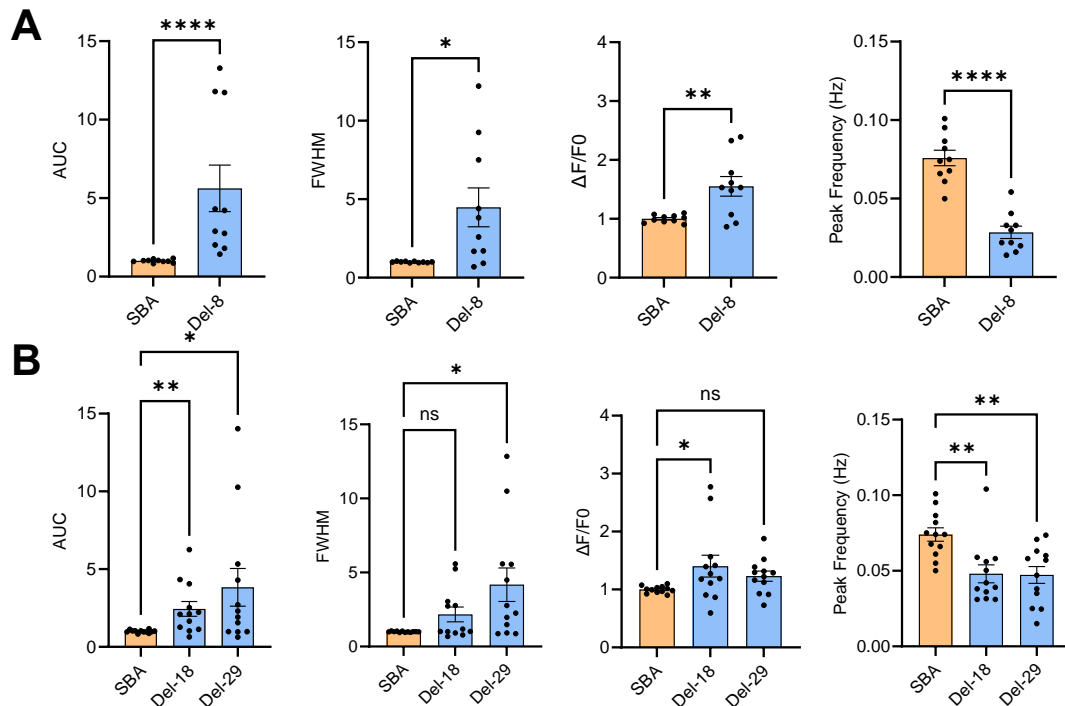


Abbildung 17: Calcium Imaging Analyse der neuronalen Co-Kulturen aus der zweiten iPSC Charge. A) Analyse spontaner somatischer Calcium-Aktivität von Neuronen der Del-8 am Tag 42 der Co-Kultur. Folgende Parameter wurden analysiert: area under the curve (AUC), full width at half maximum (FWHM), amplitude ($\Delta F/F_0$) and peak frequency (Hz). Datenpunkte stellen Werte von einzelnen Wells dar \pm SEM. Datenpunkte wurden zum Mittelwert der Kontrolle normalisiert, wobei die Frequenz in absoluten Werten dargestellt wurde (SBA n=10, Del-8 n=10). **B)** Analyse spontaner somatischer Calcium-Aktivität von Neuronen der Del-18 und Del-29 am Tag 42 der Co-Kultur. Folgende Parameter wurden analysiert: area under the curve (AUC), full width at half maximum (FWHM), amplitude ($\Delta F/F_0$) and peak frequency (Hz). Datenpunkte stellen Werte von einzelnen Wells dar \pm SEM. Datenpunkte wurden zum Mittelwert der Kontrolle normalisiert, wobei die Frequenz in absoluten Werten dargestellt wurde (SBA n=10, Del-18 n=10, Del-29 n=10).

Während den Kalziummessungen konnte synchrone Netzwerkaktivität in den Co-Kulturen detektiert werden, weshalb der Global Synchronization Index (GSI), ein Maß für die Synchronizität, in einem zusätzlichen Experiment ermittelt wurde (siehe Abbildung 18). Der GSI wurde angewandt, um das Ausmaß der Netzwerkkommunikation innerhalb der Kulturen auf der Grundlage von Kalziumbilddaten zu quantifizieren. Der Index liefert einen numerischen Wert, der das Ausmaß der Synchronisation zwischen den in der Kultur beobachteten spontanen Kalziumausbrüchen charakterisiert. Die Daten wurden durch Berechnung der Delta-Fluoreszenz/Fluoreszenz (dff) normalisiert und der GSI wurde mit einem angepassten Python-Code berechnet.

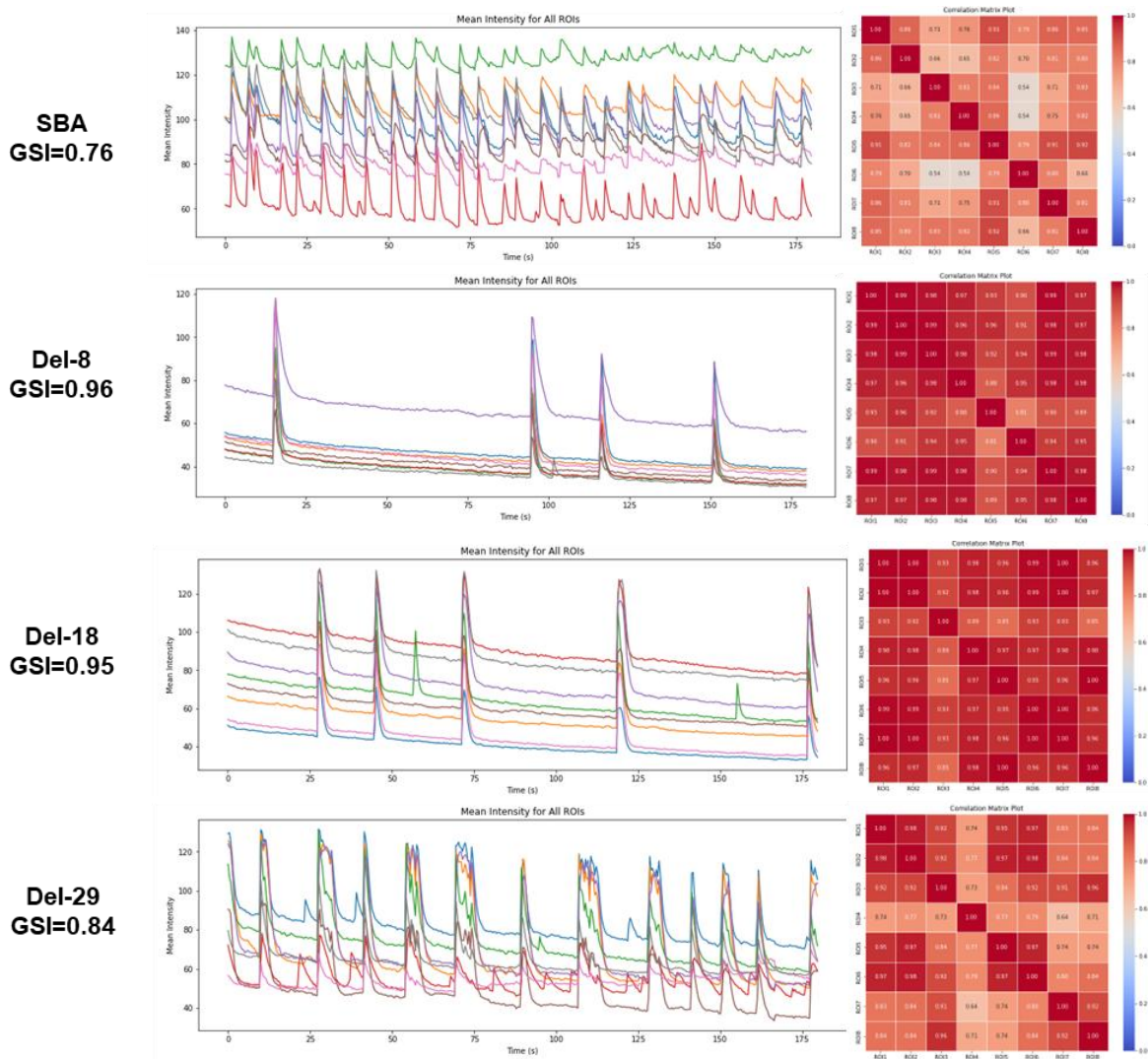


Abbildung 18: Analyse des Global Synchronization Index (GSI) in den neuronalen Co-Kulturen aus der zweiten iPSC Charge basierend auf Kalziumbilddaten. Exemplarische Darstellung der Kalzium-Traces über die Zeit der isogenen Kontrolllinie und der drei Deletionslinien an Tag 42 der Co-Kultur. Zusätzlich wurde mittels des angewandten Python-Codes Korrelationsmatrizes ausgegeben, die numerische Werte enthalten, und somit Maß für die Synchronizität der ROIs zueinander darstellen. Anschließend wird der GSI für jede Aufnahme berechnet.

Die Analyse der Kalziummessungen umfasste acht Zellen pro Video, die als Region of Interest (ROI) ausgewählt und gegen die Zeit abgebildet wurden, was in Abbildung 5 zu sehen ist. Zudem wurde eine Korrelationsmatrix erstellt, die jedes ROI in Gegenüberstellung mit den anderen ROIs zeigt. GSI-Werte im Bereich von -1 bis 1 wurden dabei ausgegeben. Werte von -1 bis 0 bedeuten keine Synchronizität, wohingegen Werte ab 0 bis 1 eine Synchronizität aufzeigen. Die drei Deletionslinien zeigten deutlich höhere GSI-Werte im Vergleich zur Kontrolle (siehe Abbildung 16). Diese konnte ebenfalls in den Kalziumtraces der einzelnen ROIs beobachtet werden.

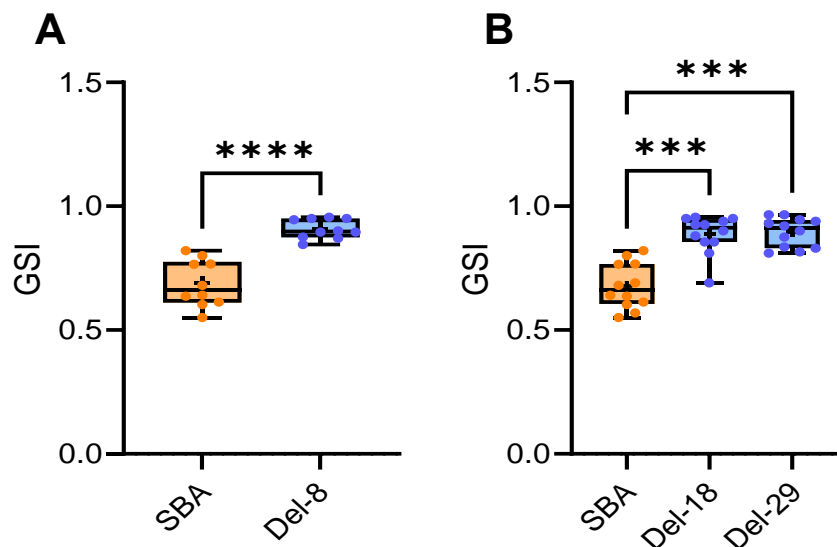


Abbildung 19: Analyse des Global Synchronization Index (GSI) in den neuronalen Co-Kulturen aus der zweiten iPSC Charge basierend auf Kalziumbilddaten. GSI Analyse der isogenen Kontrolllinie und der drei Deletionslinien an Tag 42 der Co-Kultur. Der GSI-Wert wurde mittels Python Code bestimmt. **A)** Del-8 zeigte signifikant erhöhte GSI-Werte. Es wurde ein unpaired t-test berechnet. Datenpunkte stellen Werte von einzelnen Wells dar \pm SEM. (SBA n=10, Del-8 n=10, $p < 0.0001$). **B)** Del-18 and Del-29 zeigten signifikant erhöhte GSI-Werte. Es wurde ein Kruskal-Wallis Test mit anschließendem Dunnett's multiple comparison test berechnet. Datenpunkte stellen Werte von einzelnen Wells dar \pm SEM. (SBA n=10, Del-18 n=10, Del-29 n=10, $H(2)=21.01$, $p < 0.0001$).

- Elektrophysiologische Messungen mit der zweiten iPSC Charge

Ein wichtiger Aspekt der elektrophysiologischen Experimente der zweiten iPSC Charge war die Datenerhebung zur Messung exzitatorischer postsynaptischer Ströme (EPSCs). Mithilfe dieser Methode kann zeitlich-räumlich hochauflösend analysiert werden, ob bzw. wie stark eine funktionelle synaptische Kommunikation stattfindet. EPSCs sind Ströme, die in einem postsynaptischen Neuron aufgrund der Freisetzung des Neurotransmitters Glutamat aus einem präsynaptischen Neuron auftreten, der an erregende Rezeptoren auf der postsynaptischen Membran bindet (Balu 2016). Um die Kommunikationsdynamik innerhalb der Co-Kultur besser zu verstehen, wurden die exzitatorischen NGN2-Neuronen mit grün fluoreszierendem Protein (GFP) versehen. iPSCs wurden vor der Differenzierung mit einem EF1alpha-GFP-Hygro-Lentivirus transduziert, weswegen diese exzitatorischen Neuronen während der Experimente anschließend klar von den inhibitorischen AD2-Neuronen unterschieden werden konnten.

Für die EPSC-Aufzeichnungen enthielt die extrazelluläre Lösung (in mM): NaCl 135, CaCl₂ 2, MgCl₂ 1, HEPES 10, Glucose 10 und KCl 2,5 (pH 7,3, ~300 mOsm). Die Pipetten wurden mit einer intrazellulären Lösung von (in mM) gefüllt: CH₃CsO₃S 140, NaCl 4, MgCl₂ 1, EGTA 1, HEPES 10, und NaATP 2 (pH 7,3, ~285 mOsm). Die Neuronen wurden bei -70 mV im Voltage-Clamp-Modus gehalten, um spontane EPSCs für 150 Sekunden aufzuzeichnen. Um

den glutamatergen Ursprung zu bestätigen, wurde am Ende 20 μM CNQX hinzugefügt. Die EPSCs wurden mit der Minhee-Software (Kim et al 2021) analysiert.

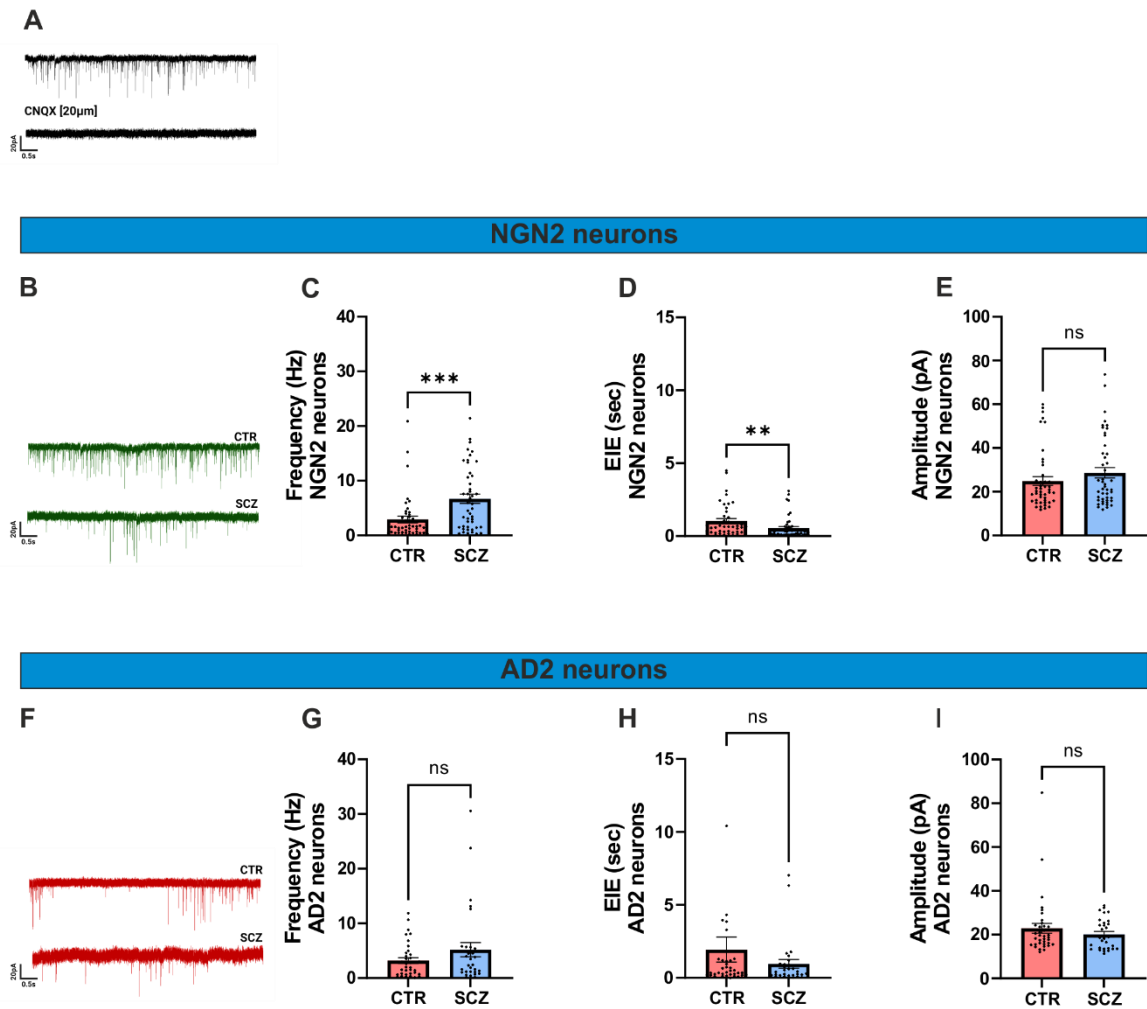


Abbildung 20 . Veränderte EPSC-Häufigkeit in SCZ-NGN2-Neuronen (A) Repräsentative EPSC-Spuren von Kontrollneuronen, deren EPSCs durch CNQX blockiert wurden. (B) Vergleich der EPSC-Spuren zwischen Kontroll- (oben) und SCZ (unten) NGN2-Neuronen. (C) SCZ NGN2 Neuronen zeigen einen signifikanten Anstieg der EPSC Frequenz im Vergleich zu Kontrollneuronen. (D) Zusätzlich zeigen SCZ NGN2 Neuronen eine gleichzeitige Verringerung des exzitatorischen Inter-Event Intervalls (EIE), während die (E) Amplitude unverändert bleibt. (F) Repräsentative EPSC-Spuren für AD2-Neuronen. (G-I) Bei AD2-Neuronen änderten sich weder die EPSC-Häufigkeit, das EIE noch die Amplitude signifikant zwischen Kontroll- und SCZ-Klonen.

Der signifikante Anstieg der EPSC-Häufigkeit und die entsprechende Verringerung der EIE in SCZ-NGN2-Neuronen deuten darauf hin, dass diese Zellen im Vergleich zu den Kontrollpersonen auf synaptischer Ebene aktiver sind. Diese erhöhte synaptische Aktivität könnte ein Hinweis auf eine veränderte exzitatorische Signalübertragung sein, die zur Pathophysiologie der Schizophrenie beitragen könnte.

AP 6: Management

Berichterstattung über den Projektfortschritt, Besuch von Projekttreffen, Überprüfung von patentierbaren Ergebnissen, Patentrecherche zu vergleichbaren Arbeiten der Wettbewerber und Beobachtung des Marktes, um mögliche Kunden zu identifizieren. Die Koordination zu Beginn des Projekts, Austausch von Materialien und Informationen wurde sichergestellt.

Wichtigste Positionen zum zahlenmässigen Nachweis

Im Verlauf des Projekts wurden die zur Verfügung gestellten Fördermittel vorrangig zur Finanzierung von wissenschaftlichem Personal sowie zur Deckung der für die experimentelle Umsetzung erforderlichen Verbrauchsmaterialien eingesetzt. Ergänzend erfolgte eine gezielte Anschaffung spezialisierter Chips, insbesondere für funktionelle Analysen im Bereich Elektrophysiologie (Mikroelektrodenarray-Chips). Die Mittelverwendung entsprach dem bewilligten Zweck und war für die erfolgreiche Durchführung des Vorhabens angemessen und zielführend.

Notwendigkeit und Angemessenheit der geleisteten Projektarbeiten

Die durchgeführten Projektarbeiten waren sowohl erforderlich als auch in ihrer inhaltlichen und methodischen Tiefe angemessen, um die im Förderantrag formulierten wissenschaftlich-technischen Zielstellungen vollständig zu erreichen. Die funktionelle Validierung patientenspezifischer Biomarkersignaturen erforderte die Kombination etablierter und neuer experimenteller Methoden, darunter stabile iPSC-Differenzierungsprotokolle, multimodale Analyseverfahren wie Kalziumimaging, Netzwerkelektrophysiologie (MEA) sowie Einzelzelleitungen mittels Patch-Clamp. Zudem war eine iterative Abstimmung mit den bioinformatisch identifizierten Zielsignaturen notwendig. Diese Vorgehensweise ermöglichte es, aussagekräftige funktionelle Phänotypen zu definieren, deren Validierung wesentlich zum Verständnis schizophrener Krankheitsmechanismen beiträgt.

Nutzen und Verwertbarkeit der Ergebnisse im Sinne des fortgeschriebenen Verwertungsplans

Die im Rahmen des Teilprojekts erzielten Ergebnisse leisten einen substantiellen Beitrag zur funktionellen Charakterisierung neuropsychiatrischer Erkrankungen und stellen ein valides Fundament für weiterführende Forschungsaktivitäten im Bereich der personalisierten Medizin dar. Für die nähere Zukunft sind konkrete Anschlussarbeiten geplant, darunter

pharmakologische Tests zur Modulation der identifizierten pathologischen Netzwerkphänotypen sowie eine Erweiterung auf weitere genetisch definierte Krankheitsmodelle. Des Weiteren ist die Überführung der entwickelten methodischen Ansätze in industriennahe Testverfahren vorgesehen, um eine translationale Nutzbarkeit der Ergebnisse zu gewährleisten.

Im Lauf der Projektlaufzeit bekannt gewordene Fortschritte Dritter auf dem Gebiet des Vorhabens

Im Verlauf der Projektlaufzeit wurden auch wissenschaftliche Fortschritte auf dem Gebiet der funktionellen Modellierung psychiatrischer Erkrankungen bei externen Forschungseinrichtungen wahrgenommen. Insbesondere wurden am Broad Institute (Harvard/MIT, Kathuria et al. 2023) sowie an der Universität Budapest (Fargas et al 2025) parallele Arbeiten veröffentlicht, in denen ebenfalls patientenabgeleitete iPSC-Modelle zur Untersuchung neuronaler Netzwerkveränderungen bei Schizophrenie eingesetzt werden. Im Unterschied zu diesen Ansätzen zeichnet sich das vorliegende Vorhaben jedoch durch eine besonders umfassende und systematische Kombination von Einzelzellanalysen, Netzwerkverfahren und bioinformatisch-basierten Biomarkerkonzepten aus. Dies erlaubt eine besonders tiefgehende funktionelle Charakterisierung relevanter Krankheitsmechanismen und eröffnet weitergehende Perspektiven für zukünftige Forschungsprojekte.

Virtuelle Projekttreffen

Pandemiebedingt waren Möglichkeiten für Präsenztreffen eingeschränkt. Ersatzweise wurden virtuelle Treffen am 12.10.2021, am 5.11.2021, 29.04.2022 und am 9.12.2022 durchgeführt.

Projekttreffen in Präsenz

Das gesamte Konsortium hat sich am 13.10.2023 am NMI in Reutlingen und für den Abschluss am 5.7.2024 an der LMU in München getroffen.

Austausch von Projektergebnissen

Eine webbasierende Plattform zum Informationsaustausch wurde für das Konsortium vom ZI, Mannheim eingerichtet (Foldercase).

Patente

Bisher konnten keine patentfähigen Ergebnisse für dieses Teilprojekt identifiziert werden.

Publikationen nach Peer Review

Hartmann et al (2024) Molecular Psychiatry, under review.

Heider J, Pardo González E, Hartmann SM, Kannaiyan N, Vogel S, Wüst R, Fallgatter AJ, Rossner MJ, Kraushaar U, Volkmer H (2024) Aberrant Neuronal Connectivity and Network Activity of Neurons Derived from Patients with Idiopathic Schizophrenia. Neurobiol. Disease. Accepted.

Konferenzbeiträge

Ergebnisse dieses Teilprojekts wurden auf Tagungen mit Postern präsentiert. Teilaspekte dieses Projekts wurden als Poster auf Tagungen präsentiert oder sind derzeit in Vorbereitung.

Emilio Pardo-González, Sophia-Marie Hartmann, Johanna Heider, Sabrina Vogel, Udo Kraushaar, Hansjürgen Volkmer. Dysfunctional Excitatory/Inhibitory Signaling in Schizophrenia using Human-Induced Pluripotent Stem Cells Derived Neurons. BIOCUBE, Sestriere, Italy, 11.12-18.12.2022.

Sophia-Marie Hartmann, Johanna Heider, Ricarda Breitmeyer, Sabrina Vogel, Richard Wüst, Andreas J. Fallgatter, Hansjürgen Volkmer. Modeling neuropsychiatric diseases using hiPSC-derived co-culture models of glutamatergic and dopaminergic neurons. NeNa, 10.10.-12.10.2022, Bad Urach.

Emilio Pardo-González, Sophia-Marie Hartmann, Johanna Heider, Sabrina Vogel, Udo Kraushaar, Hansjürgen Volkmer.
Development of an electrophysiological multi-purpose test platform for hiPSCs derived neuronal disease and toxicology models. NMI PhD Seminar. Bad Boll 10.11-11.11.2022

Sophia-Marie Hartmann, Johanna Heider, Sabrina Vogel, Ricarda Breitmeyer, Richard Wüst, Andreas J. Fallgatter, Hansjürgen Volkmer. hiPSC-derived dopaminergic and glutamatergic neurons of schizophrenia patients show neuronal aberrations in a co-culture model compared to dopaminergic monocultures. ISSCR, 14.06.-17.06.2023, Boston, USA.

Sophia-Marie Hartmann, Johanna Heider, Sabrina Vogel, Ricarda Breitmeyer, Richard Wüst, Andreas J. Fallgatter, Hansjürgen Volkmer. hiPSC-derived dopaminergic and glutamatergic neurons of schizophrenia patients show neuronal aberrations in a co-culture model compared to dopaminergic monocultures. NeNa, 11.09.-13.09.2024, Frankfurt.

Sophia-Marie Hartmann, Johanna Heider, Sabrina Vogel, Ricarda Breitmeyer, Richard Wüst, Andreas J. Fallgatter, Hansjürgen Volkmer. hiPSC-derived dopaminergic and glutamatergic neurons of schizophrenia patients show neuronal aberrations in a co-culture model. FENS, 25.06.-29.06.2024, Vienna, Austria.

Vorträge

Emilio Pardo-González, Sophia-Marie Hartmann, Johanna Heider, Sabrina Vogel, Udo Kraushaar, Hansjürgen Volkmer. Dysfunctional Excitatory/Inhibitory Signaling in Schizophrenia using Human-Induced Pluripotent Stem Cells Derived Neurons. NeNa, 11.09.-13.09.2024, Frankfurt