Förderkennzeichen 01EW2207

Verbundprojekt „Physiological and Molecular Effects of an Inflammation Episode on the Severity of Shank3-based ASD Phenotypes in Mouse and hPSC Models"

Schlussbericht zum Teilprojekt (TP) 2

Förderkennzeichen: 01EW2207

Laufzeit des Vorhabens: 01.05.2022 – 31.07.2025

Teilprojektleiter

Prof. Dr. med. Oliver Brüstle
Institut für Rekonstruktive Neurobiologie
Universitätsklinikum Bonn
Venusberg-Campus 1,
53127 Bonn
Tel.: 0228/6885-500, Fax.: 0228/6885-501, E-Mail: brustle@uni-bonn.de

Ko-Autor

Christian Felski
Institut für Rekonstruktive Neurobiologie
Universitätsklinikum Bonn
Venusberg-Campus 1,
53127 Bonn
Tel.: 0228/6885-576, E-Mail: cfelski@uni-bonn.de

1. Verwendung der Zuwendung und erzielte Ergebnisse im Einzelnen mit Gegenüberstellung der vorgegebenen Ziele

AP 2.1 Untersuchung der entzündungsbedingten Modulation synaptischer Funktionen in definierten menschlichen neuronalen Netzwerken

Unter Autismus-Spektrums-Störungen (ASD) versteht man eine Gruppe heterogener Erkrankungen, die durch Defizite in der sozialen Interaktion und Kommunikation, repetitives Verhalten sowie eine verzögerte Entwicklung charakterisiert werden. In etwa 1-2% aller Fälle von ASD weisen Patienten eine heterozygote Deletion des SHANK3-Gens auf, welches ein Gerüstprotein der Postsynapse in exzitatorischen Synapsen kodiert. Diese Haploinsuffizienz ist die monogenetische Ursache für das ASD-assoziierte Phelan McDermid-Syndrom (PMDS), welches mit einer globalen Entwicklungsstörung, Autismus sowie Sprachstörung, Hypotonie und leichten gesichtsmorphologischen Veränderungen verbunden ist. Obwohl PMDS-Patienten eine vergleichbare genetische Prädisposition aufweisen, unterscheiden sich einzelne Patienten deutlich hinsichtlich des Schweregrads der Symptome. Eine wachsende Datenlage weist darauf hin, dass bei vielen Neuroentwicklungs- und neuropsychiatrischen Erkrankungen eine signifikante Immunaktivierung vorliegt und dass neuroinflammatorische Prozesse während der Gehirnentwicklung einen wichtigen Risikofaktor für die Entwicklung von neuropsychiatrischen Erkrankungen sowie ASD darstellen.

Im Rahmen des InflASD-Verbundprojekts wird in diesem Kontext die Frage untersucht, ob eine proinflammatorische Mikroglia-Aktivierung in SHANK3-haploinsuffizienten Neuronen pathologische Phänotypen verstärken und so die evidente Heterogenität des Schweregrads zwischen Individuen teilweise erklären könnte. Das Institut für Rekonstruktive Neurobiologie (AG Brüstle) hat in diesem Rahmen humane pluripotente Stammzelllinien (hPSZ) mit heterozygoter SHANK3-Defizienz generiert und daraus mittels sogenannter Vorwärtsprogrammierung exzitatorische Neuronen hergestellt. In Kokulturen mit ebenfalls aus hPSZ differenzierten Mikrogliazellen sollte dann untersucht werden, inwieweit eine inflammatorische Stimulation die Entstehung von Pathophänotypen beeinflusst.

MS 2.1.1 Herstellung heterozygoter SHANK3 KO iPS-Zellen

Zur Generierung exzitatorischer Neuronen mittels Doxyzyklin (Dox)-induzierbarer Vorwärtsprogrammierung sollten in Arbeitspaket MS2.1.1 zunächst heterozygote SHANK3-Knockout (KO)-hPS-Zellen durch CRISPR/Cas9-vermittelte Genomeditierung hergestellt werden (Abb. 1). Als Ausgangszelllinie diente die humane embryonale Stammzelllinie (hES-Zelllinie) WA01, in der im Rahmen vorangegangener Arbeiten bereits eine Dox-induzierbare NGN2-Kassette in den AAVS1-“Safe Harbor”-Lokus unter Verwendung spezifischer TALENs integriert

worden war. Für die heterozygote Deletion von SHANK3 wurden mithilfe spezifischer gRNAs Indels in Exon 20 induziert. Mittels dieser Strategie wurden zwei wildtypische (SHANK3$^{+/+}$) und zwei haploinsuffiziente (SHANK3$^{+/-}$) Klone generiert. Zum Ausschluss eines möglichen Mosaizismus wurden die SHANK3$^{+/-}$-Klone anschließend subkloniert. Zusätzlich wurden zwei SHANK3$^{-/-}$ Klone generiert und in einer Reihe von Experimenten als Negativkontrolle eingesetzt. Im Rahmen einer externen Kollaboration wurde zudem eine weitere SHANK3$^{+/-}$ hES-Zelllinie (SA01) und eine nicht mutierte isogene Kontrolllinie akquiriert, bei denen wiederum eine Dox-induzierbare NGN2-Kassette in den AAVS1-Lokus integriert wurde.

Die genomische Identität aller Zelllinien wurde regelmäßig mittels Sanger-Sequenzierung überprüft. Aufgrund der GC-reichen Sequenzstruktur des editierten Exons war eine umfangreiche Optimierung der Primer erforderlich, um reproduzierbare Ergebnisse zu erzielen. Darüber hinaus wurden alle Linien durch SNP-Array-Analysen karyotypisiert, um größere chromosomale Aberrationen auszuschließen. Ebenso erfolgte eine regelmäßige Mykoplasma-Testung. Von allen Zelllinien wurden Zellbanken in geeigneter Größe angelegt und im Verlauf des Projekts bei Bedarf erweitert.

Parentale Linien	Im Rahmen der Studie editierte Zelllinien	
WA01 NGN2	2x NGN2 SHANK3 +/+ (Reserve: 4x) 2x NGN2 SHANK3 +/- (Reserve 5x) 1x Subklon je Klon (Reserve: 2x) 2x NGN2 SHANK3 -/- (Reserve 2x)	Durchgeführte Qualitätskontrolle für jede Linie: • Sanger Sequenzierung • SNP-Array-basierte molekulare Karyotypisierung • Mykloplasma-PCR
SA01 SHANK3 +/+	2x NGN2	
SA01 SHANK3 +/- Klon 1	2x NGN2	
SA01 SHANK3 +/- Klon 2	2x NGN2	

Abb. 1: Tabelle mit Anzahl der Zelllinien, die im Förderzeitraum für phänotypische Experimente hergestellt wurden, sowie eine Auflistung der durchgeführten Qualitätskontrollen.

Somit konnten im Rahmen von MS2.1.1 mittels CRISPR/Cas9-Editierung hESZ-Linien mit einer heterozygoten Frameshift-Mutation in Exon 20 von SHANK3 etabliert werden. Die Integration einer Doxyzyklin-abhängigen NGN2 Transgenkassette erlaubt die schnelle Vorwärtsprogrammierung beider Zelllinien in exzitatorische Neurone und bietet damit die Grundlage für die Untersuchung des Einflusses inflammatorischer Stimulationen auf ein SHANK3-defizientes neuronales Netzwerk.

MS 2.1.2 Generierung von humanen heterozygoten SHANK3 KO Neuronen und von humanen Mikrogliazellen

Zur Herstellung humaner Neurone wurden die unter Arbeitspaket MS2.1.2 generierten WA01-NGN2- und SA01-NGN2-Zelllinien mittels transkriptionsfaktorbasierter Vorwärtsprogrammierung in exzitatorische Neurone differenziert. Die Induktion erfolgte durch Doxyzyklin (Dox)-abhängige Expression des integrierten NGN2-Transgens. Zu Beginn wurden Testchargen angelegt, um den Erfolg der Vorwärtsprogrammierung und die Effizienz der Differenzierung zu überprüfen. Im

weiteren Verlauf wurden neuronale Kulturen aller drei Genotypen einer umfassenden Qualitätskontrolle unterzogen und anschließend phänotypisiert.

Validierung des haploinsuffizienten SHANK3 knockouts

Die qPCR-Analysen der isolierten mRNA zeigten keine signifikante Reduktion der SHANK3-Transkriptmenge in heterozygoten oder homozygoten SHANK3-Neuronen, was vermuten lässt, dass es durch die eingeführte Frameshift-Mutation nicht zu einem Nonsense-mediated mRNA Decay kommt. In Immunoblot-Analysen hingegen wurde eine deutliche Reduktion der Hauptisoformen des SHANK3-Proteins um etwa 65 % in SHANK3$^{+/-}$-Neuronen nachgewiesen, während in SHANK3$^{-/-}$-Neuronen die Hauptisoformen vollständig fehlten. Dies weist darauf hin, dass es durch den CRISPR/Cas9-basierten haploinsuffizienten SHANK3 knockout nicht zu einer veränderten Transkription oder anschließenden Degradation der SHANK3 mRNA kommt, die Translation der mRNA allerdings durch die eingeführte Mutation nicht stattfindet.

Validierung der neuronalen Viabilität nach Kryokonservierung

Im Anschluss wurden differenzierte Neurone aller Genotypen kryokonserviert. Im Rahmen einer Qualitätskontrolle wurde das Überleben der Neurone unmittelbar nach dem Auftauen sowie eine Woche nach Ko-Kultivierung mit murinen Astrozyten untersucht. Die Bestimmung potenzieller Unterschiede in der Zellvitalität ist essenziell für die Standardisierung der Netzwerkdichte in nachfolgenden Phänotypisierungs-Experimenten. Es zeigte sich jedoch kein signifikanter Unterschied im Überleben zwischen den verschiedenen SHANK3-Genotypen.
Während der Etablierung der Tri-Kultur aus murinen Astrozyten, hPSZ-abgeleiteten Neuronen und Mikrogliazellen zeigte sich, dass verstärkter Zelltod die Stabilität der Mikroglia-Population negativ beeinflusst. Um dies zu minimieren, wurde das Überleben frisch differenzierter vs. kryokonservierter Neurone in Ko-Kulturen verglichen. Dabei war der Zelltod in Kulturen mit frisch differenzierten Neuronen um ca. 50% geringer. Beide Kulturtypen wiesen eine vergleichbare neuronale Zelldichte auf, wenn in den frischen Ko-Kulturen nur etwa 45 % der Zellzahl ausgesät wurden, die bei kryokonservierten Neuronen verwendet wurde. Folglich wurden im weiteren Projektverlauf bevorzugt frisch differenzierte Neurone eingesetzt, um ausgedehntes Waschen zur Entfernung von Zelltrümmern zu vermeiden und die Stabilität der Ko-Kulturen zu erhöhen.

Validierung der neuronalen Identität vorwärtsprogrammierter neuronaler Kulturen

Zusätzlich wurden Ko-Kulturen aus murinen Astrozyten und Neuronen nach vier und acht Wochen immunzytochemisch auf GABA und Peripherin gefärbt, um den Anteil GABAerger bzw. Peripherin-positiver Neurone zu quantifizieren. Dabei zeigte sich ein Anteil von etwa 2–3 % GABAerger und 15–20 % Peripherin-positiver Neurone, ohne signifikante Unterschiede zwischen den SHANK3-Genotypen. Diese Anteile an neuronalen Subtypen sind vergleichbar mit anderen Systemen zur NGN2-basierten Vorwärtsdprogrammierung (Lin et al., 2021). Zur weiteren Verringerung des Anteils Peripherin-positiver Neurone wurden vier verschiedene

Protokolle zur transkriptionsfaktorbasierten Vorwärtsprogrammierung miteinander verglichen. Allerdings führte keines der getesteten Verfahren zu einer signifikanten Reduktion, teilweise sogar zu einer leichten Zunahme dieses Zelltyps. Daher wurde im weiteren Verlauf das etablierte Standardprotokoll zur neuronalen Differenzierung beibehalten.

Untersuchung synaptischer Marker

Synaptische Marker wie PSD95 (postsynaptisch), SHANK2 (postsynaptisch) und Synapsin 1 (präsynaptisch) zeigten bereits nach zwei Wochen Ko-Kultivierung eine stabile Expression in immunzytochemischen Analysen neuronaler Netzwerke aller SHANK3-Genotypen. Ergänzend wurden qPCR-Analysen durchgeführt, um die Expression weiterer synaptischer Proteine und SHANK3-Interaktionspartner zu untersuchen. Hier ergaben sich jedoch keine signifikanten Unterschiede zwischen den verschiedenen SHANK3-Genotypen.

HPSZ-abgeleiteter Mikroglia zeigen zelltyp-charakteristische Eigenschaften

Zur Etablierung eines stabilen Tri-Kultursystems aus murinen Astrozyten, Neuronen und Mikroglia sollte ein bereits etabliertes hPSZ-basiertes Differenzierungsprotokoll für Mikroglia verwendet werden. Die geplante Differenzierung einer WA01-NGN2-SHANK3$^{+/+}$-Linie war jedoch wiederholt erfolglos. Da interne RNA-Seq-Daten zeigten, dass hPSZ-abgeleitete Mikroglia keine SHANK3-mRNA exprimieren, wurden stattdessen bereits etablierte hPS-Zelllinien zur Mikroglia-Differenzierung eingesetzt. Im Verlauf des Projekts wurden Mikrogliazellen aus vier unabhängigen Differenzierungsansätzen gewonnen. Um eine Aktivierung durch Gefrierprozesse zu vermeiden, wurde auf die Verwendung kryokonservierter Zellen verzichtet.

Die hPSZ-abgeleiteten Mikrogliazellen wurden regelmäßig immunzytochemisch charakterisiert und zeigten eine typische Expression der Marker IBA1, TMEM119, CD45, PU.1, P2RY12 und CX3CR1, wobei über 95 % der Zellen dieses Markerprofil aufwiesen. Der proinflammatorische Marker HLA-DR zeigte niedrige Expressionsraten (< 10 %). Funktionelle Tests der NLRP3-Inflammasom-Aktivierung durch LPS- und Nigericin-Stimulation ergaben konsistent robuste Zellantworten. Darüber hinaus zeigten Mikrogliazellen in Monokultur eine charakteristische Zellmotilität sowie Phagozytoseaktivität gegenüber Zelltrümmern im Live-Imaging.

Optimierung der Kokulturbedingungen

Da für die Langzeitkultur der humanen Neurone Maus-Astrozyten aus Primärgewebe eingesetzt wurden, musste eine potenzielle Kontamination durch murine Mikroglia ausgeschlossen werden. Zu diesem Zweck wurden verschiedene Passagen muriner Astrozyten aus unterschiedlichen Präparationsansätzen mittels Durchflusszytometrie auf die mikroglialen Marker IBA1 und CD45 untersucht. Diese Analysen zeigten in allen Präparationsansätzen eine Kontamination von 3 - 7% IBA1-positiver Zellen, wobei dieser Anteil über mehrere Zellpassagen hinweg stabil blieb.

Zur Minimierung dieser Kontamination wurde der CSF1R-Blocker PLX5622 in unterschiedlichen Konzentrationen getestet. Während hohe Konzentrationen (10 µM über drei Tage) die Anzahl IBA1-positiver Zellen auf etwa 0,5 % reduzierten, führten sie zugleich zu einer deutlichen Abnahme der astrozytären Zelldichte. Niedrigere Konzentrationen (1 - 2 µM) erzielten eine vergleichbare Reduktion der Mikroglia-Kontamination, ohne die Vitalität oder Dichte der Astrozyten signifikant zu beeinträchtigen. Abschließend wurde eine Behandlung mit 2 µM PLX5622 über 24 - 48 Stunden als optimal definiert, da sie die mikrogliale Kontamination auf ca. 0,3 % reduzierte und gleichzeitig die Vitalität der Astrozyten aufrechterhielt.

Für die Etablierung der Tri-Kultur und deren spätere Nutzung zur Charakterisierung inflammatorischer Prozesse in SHANK3-defizienten neuronalen Netzwerken (vgl. MS2.1.3) mussten im Anschluss optimale Kultivierungsparameter entwickelt werden. Dabei waren sowohl die initiale Zelldichte der Mikroglia als auch die Zusammensetzung des Kulturmediums entscheidend, um das Überleben und die funktionale Reifung aller drei Zelltypen zu gewährleisten. Zu diesem Zweck wurden 13 verschiedene Zellmedien getestet und die Kulturen nach vier Wochen immunzytochemisch analysiert. Die vier Bedingungen mit der höchsten Mikroglia-Überlebensrate und der ausgeprägtesten ramifizierten Morphologie wurden anschließend mittels Multiplex-ELISA auf die Sekretion proinflammatorischer Zytokine untersucht. Die Kombination der morphologischen und sekretorischen Merkmale ermöglichte schließlich die Identifikation eines geeigneten Basalmediums für die Tri-Kultur.

Da die Faktoren IL-34 und CSF1 entscheidend für das Überleben von Mikroglia sind und beide an denselben Rezeptor binden - jedoch mit unterschiedlicher Affinität abhängig vom Reifestadium der Zellen - wurden verschiedene Konzentrationen beider Faktoren getestet. Da IL-34 und M-CSF auch endogen von Astrozyten und Neuronen sekretiert werden, wurde zusätzlich geprüft, ob Tri-Kulturen ohne externe Zugabe dieser Faktoren stabil bleiben. Die immunzytochemischen Analysen zeigten, dass die Mikroglia in den Tri-Kulturen auf die Zugabe von IL-34 oder CSF1 angewiesen sind, wobei zu hohe Konzentrationen zu einer Überproliferation der Mikroglia führten. Im nächsten Schritt wurde das Verhältnis von Neuronen zu Mikroglia variiert, um optimale Bedingungen für die Netzwerkentwicklung zu bestimmen. Diese Experimente ergaben ein ideales Ausgangsverhältnis von 10:1 (Neuronen:Mikroglia).

In ersten phänotypischen Analysen der Tri-Kultur zeigte sich trotz definierter Medienbedingungen eine Überpopulation von Mikroglia, vermutlich infolge eines erhöhten Zelltrümmeranteils durch den Einsatz kryokonservierter Neurone. Diese Überpopulation konnte durch intensives Waschen der Kulturen sowie durch die Supplementierung mit TGFβ - einem Faktor, der Mikroglia in einem homöostatischen Zustand hält - deutlich reduziert werden.

Um zusätzliche Waschschritte zu vermeiden, wurde im weiteren Projektverlauf die Verwendung nicht-kryokonservierter Neurone bevorzugt (siehe MS2.1.2). Da das Tri-Kulturmedium aufgrund

der Verwendung muriner Astrozyten mit geringen Konzentrationen fötalem Kälberserum (FBS) supplementiert werden musste, wurde in einem abschließenden Experiment der Einfluss des Serums auf die Mikroglia untersucht. Immunozytochemische Analysen ergaben, dass die geringen FBS-Konzentrationen weder eine morphologische Veränderung der Mikroglia noch eine Veränderung der Zellzahl über einen Zeitraum von vier Wochen verursachten.

Zusammenfassend wurden im Rahmen von MS2.1.2 Netzwerke vorwärtsprogrammierter vorwiegend exzitatorischer Neurone etabliert. Dabei beeinträchtigte die heterozygote Deletion von SHANK3 nicht die Expression von synaptischen Markern. Durch die systematische Optimierung der Zellkulturbedingungen konnten im Anschluss ideale Bedingungen für eine reproduzierbare und stabile Langzeit-Tri-Kultur aus murinen Astrozyten, hPSZ-abgeleiteten Neuronen und Mikroglia etabliert werden. Diese Tri-Kulturbedingungen bildeten die Basis für nachfolgende Untersuchungen zum Einfluss einer inflammatorischen Stimulation auf SHANK3-defiziente neuronale Netzwerke.

MS 2.1.3 Charakterisierung inflammatorischer Prozesse in SHANK3-defizienten neuronalen Netzwerken

Zur phänotypischen Analyse inflammatorischer Prozesse in SHANK3-defizienten neuronalen Netzwerken sollten sowohl strukturelle als auch funktionelle Eigenschaften dieser Netzwerke untersucht werden. Hierfür wurden zwei komplementäre Ansätze verfolgt (Abb. 2):

Zum einen wurde die in MS2.1.2 etablierte Tri-Kultur aus murinen Astrozyten, humanen Neuronen und Mikroglia unter homöostatischen sowie inflammatorischen Bedingungen analysiert. Zum anderen wurde eine Ko-Kultur aus SHANK3-defizienten Neuronen und Astrozyten unter identischen Bedingungen untersucht, um mögliche Effekte zu identifizieren, die durch die Anwesenheit von Mikroglia vermittelt werden könnten.

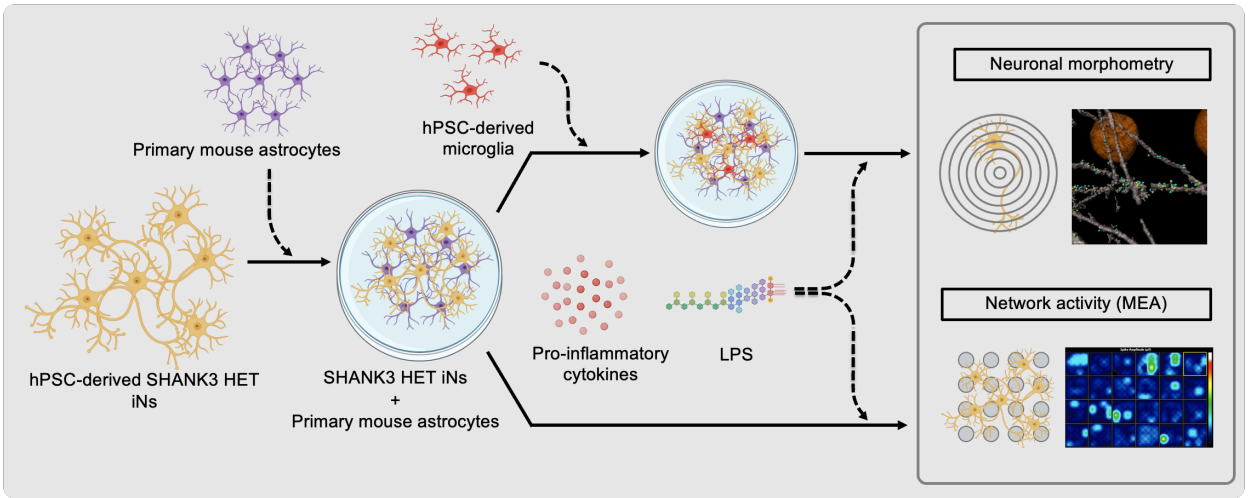

Abb. 2. Schematische Darstellung des experimentellen Ablaufs, beginnend mit der Ko-Kultivierung von murinen Astrozyten, hPSZ-basierten Neuronen und Mikroglia, den nachfolgenden inflammatorischen Stimulationsparadigmata, sowie den abschließenden phänotypischen Analysen der neuronalen Morphometrie und Funktion (Abbildungen generiert mithilfe von BioRender).

Proinflammatorische Aktivierung von Mikroglia-Monokulturen als zusätzliches, physiologischeres Stimulationsparadigma

Zur Simulation einer inflammatorischen Stimulation wurden die neuronalen Netzwerke nach vier und acht Wochen mit LPS behandelt. Da diese direkte Stimulation nicht die physiologische Situation widerspiegelt, erfolgte ergänzend eine Behandlung mit Überständen von LPS-stimulierten Mikroglia-Monokulturen. Multiplex-ELISA-Analysen identifizierten eine 6-stündige Konditionierungsphase nach vorangegangener 24-stündiger LPS-Stimulation als optimalen Zeitraum zur Gewinnung des Überstands. Im weiteren Projektverlauf wurden daher alle Ko-Kulturen sowohl einer direkten LPS-Stimulation als auch einer Behandlung mit konditioniertem Überstand proinflammatorisch aktivierter Mikroglia unterzogen.

SHANK3-defiziente Neurone zeigen eine verringerte morphologische Komplexität

Die strukturelle Analyse inflammatorisch stimulierter SHANK3-defizienter neuronaler Netzwerke erfolgte über verschiedene Morphometrie-Assays, insbesondere Sholl-Analysen und Bestimmung der synaptischen Dichte. Für die morphometrische Charakterisierung mittels Sholl-Analyse, die eine quantitative Erfassung der neuronalen Komplexität und Neuritenlänge ermöglicht, wurde ein kleiner Anteil des neuronalen Netzwerks durch Infektion mit einem GFP-AAV unter Synapsin-Promotor markiert. Eine Virusinfektion während der Vorwärtsprogrammierung der Neurone führte jedoch selbst bei geringen Viruskonzentrationen zu erhöhtem Zelltod und verringerter Effizienz der Differenzierung. Die nachfolgende Infektion bereits etablierter Ko-Kulturen aus Neuronen und Astrozyten erwies sich hingegen als erfolgreich: In Titrationsexperimenten konnte eine stabile Markierung von etwa 5 % der Neurone erreicht werden, ohne das Überleben von Neuronen oder Astrozyten zu beeinträchtigen.

Unter homöostatischen Bedingungen zeigte sich nach vier Wochen eine signifikant verringerte neuronale Komplexität in SHANK3$^{+/-}$-Neuronen. Nach weiteren vier Wochen Ko-Kultivierung war dieser Phänotyp nicht mehr nachweisbar. Weder 24 Stunden noch eine Woche nach inflammatorischer Stimulation mit LPS oder konditioniertem Mikroglia-Überstand konnten morphologische Veränderungen der Neurone beobachtet werden – unabhängig davon, ob die Stimulation nach vier oder acht Wochen der Ko-Kultivierung oder nach beiden Zeitpunkten erfolgte. Auch in den Tri-Kulturen traten keine weiteren strukturellen Veränderungen nach vergleichbarer Behandlung auf.

Mikrogliazellen kompensieren die Reduktion der Synapsendichte in SHANK3-defizienten neuronalen Netzwerken

Da die synaptische Dichte eng mit der funktionellen Aktivität neuronaler Netzwerke korreliert, wurde diese durch immunzytochemische Färbung präsynaptischer (Synapsin 1) und postsynaptischer (PSD95) Marker untersucht. Mithilfe der IMARIS-Software (Oxford Instruments) wurden dreidimensionale Rekonstruktionen konfokaler z-Stacks erstellt und die Ko-Lokalisation beider Marker quantifiziert.

Diese Analysen ergaben nach vier Wochen Ko-Kultivierung eine signifikant verringerte Synapsendichte in SHANK3$^{+/-}$-Netzwerken ohne Mikroglia. Die Integration von Mikrogliazellen führte in wildtypischen Netzwerken zu einer Abnahme der Synapsendichte, sodass weiterhin kein signifikanter Unterschied mehr zwischen den Genotypen erkennbar war. Nach acht Wochen zeigten sich keine Unterschiede in der Synapsendichte zwischen Netzwerken beider Genotypen - weder mit noch ohne Mikroglia. Dies deutet auf eine temporäre Verringerung der Synapsendichte aufgrund von SHANK3-Defizienz in Abwesenheit von Mikroglia hin, die auf eine verzögerte synaptische Reifung schließen lässt. Die Anwesenheit von Mikrogliazellen scheint diese Differenz jedoch auszugleichen. Eine proinflammatorische Stimulation führte ausschließlich in SHANK3-defizienten Netzwerken ohne Mikroglia zu einer signifikanten Reduktion der Synapsendichte. Somit scheinen SHANK3-heterozygote Netzwerke anfälliger gegenüber inflammatorischer Stimulation zu sein, während die Anwesenheit von Mikroglia einen protektiven Einfluss auf diese Vulnerabilität ausübt.

SHANK3-defiziente Netzwerke weisen eine verringerte Bursting-Aktivität auf, die durch die Integration von Mikroglia kompensiert wird

Neben den morphometrischen Untersuchungen wurden funktionelle Netzwerk-Analysen durchgeführt, um den Einfluss inflammatorischer Stimulation auf die spontane Aktivität SHANK3-defizienter neuronaler Netzwerke zu charakterisieren.

Hierfür kam ein Multi-Electrode-Array (MEA)-System (Axion Biosystems) zum Einsatz, das im 24-Well-Format eine nicht-invasive Analyse elektrophysiologischer Netzwerkparameter ermöglichte. Über einen Zeitraum von neun Wochen erfolgten wöchentliche Messungen, ergänzt

durch zusätzliche Aufzeichnungen in kurzen Intervallen nach Stimulation in Woche 4 und 8. Ko-Kulturen aus vorwärtsprogrammierten hPSZ-abgeleiteten Neuronen und murinen Astrozyten zeigten in den ersten Wochen der Reifung eine leicht reduzierte mittlere Feuerrate in SHANK3$^{+/-}$-Netzwerken sowie eine signifikant verringerte Anzahl an Bursts. Die Netzwerk-Burst-Frequenz war dagegen erhöht, jedoch mit einer geringeren Anzahl an Spikes pro Burst im Vergleich zu Wildtyp-Netzwerken. Nach Stimulation der Astrozyten-Neuron-Kulturen konnten keine anhaltenden genotypspezifischen Unterschiede festgestellt werden. Allerdings zeigte sich eine vorübergehende Erhöhung der Feuerrate innerhalb von 0,25 bis 5 Stunden nach Stimulation mit LPS oder konditioniertem Überstand aktivierter Mikroglia.

Die Integration von Mikrogliazellen führte in den ersten Wochen der Ko-Kultivierung unter homöostatischen Bedingungen zu einer Erhöhung der mittleren Feuerrate in Wildtyp- und SHANK3-defizienten Netzwerken. Zudem wiesen SHANK3-defiziente Netzwerke in Anwesenheit von Mikroglia in den ersten vier Wochen eine signifikant höhere Burstanzahl auf – bis zu doppelt so viele Bursts wie in Netzwerken ohne Mikroglia. In diesem Zeitraum erreichten die SHANK3-defizienten Netzwerke mit Mikroglia Burstzahlen vergleichbar zu Wildtyp-Netzwerken mit Mikroglia. Dies weist auf eine Mikroglia-vermittelte Kompensation der durch SHANK3-Defizienz verursachten Reduktion des Bursting-Verhaltens hin.

Darüber hinaus war die Synchronität der Netzwerkaktivität in Netzwerken beider Genotypen in Anwesenheit von Mikroglia während der ersten beiden Wochen signifikant erhöht.

Die inflammatorische Stimulation der Tri-Kulturen beider Genotypen zeigte - analog zu den Beobachtungen in den Ko-Kulturen aus murinen Astrozyten und hPSZ-abgeleiteten Neuronen - keine genotypspezifischen Unterschiede.

Zusammenfassend zeigen die Daten eine SHANK3-Defizienz-bedingte verminderte Komplexität der neuronalen Fortsätze – unabhängig von inflammatorischer Stimulation. In Abwesenheit von Mikroglia konnte in SHANK3-defizienten Neuronen eine verringerte Synapsendichte beobachtet werden. Nach Kokultur mit Mikroglia nahm diese weiter ab und zeigte keine Unterschiede mehr zwischen SHANK3$^{-/+}$ und SHANK3$^{+/+}$-Kulturen. Die funktionellen Untersuchungen neuronaler SHANK3$^{-/+}$ Netzwerke zeigen eine deutliche Reduktion des Burst-Verhaltens unter homöostatischen Bedingungen, die durch die Integration von Mikroglia revertiert werden kann – unabhängig von einer zusätzlichen inflammatorischen Stimulation. Zusätzlich lässt sich unabhängig vom Genotyp ein neurotropher Effekt der Mikroglia auf die funktionelle Ausreifung und die neuronale Aktivität beobachten.

AP3.1 Screening aktiver Moleküle zur Regulierung von Entzündungseffekten an menschlichen SHANK3-defizienten Neuronen

MS3.1 Implementierung eines Kultursystems für High-Content-Screening-Anwendungen

Im Kontext des Konsortiums sollte der Effekt von Lithium und anderer Wirkstoffe auf SHANK3-defiziente und Kontrollnetzwerke getestet werden. Hierfür sollte die AG Brüstle die o.g. etablierten zellulären Modelle (MS 2.1.2) bereitstellen und externe Mitarbeiter in die Technologie einführen. Zu diesem Zweck wurden mehrere Chargen kryopreservierter SHANK3$^{-/+}$ und SHANK3$^{+/+}$-Neurone hergestellt eine Mitarbeiterin der AG Hosy in einem dreitägigen Kurs in Bonn in die Kultivierung der Neurone und deren Ko-Kultivierung mit anderen Zelltypen eingewiesen.

2. Wichtigste Positionen des zahlenmäßigen Nachweises

Die Anteile der verschiedenen Positionen des zahlenmäßigen Nachweises sind in Abbildung 3 aufgeschlüsselt. 55,4% des Gesamtbudgets wurden für Personalkosten aufgewendet. Dabei fielen 100% auf wissenschaftliches Personal. Die Kosten für Verbrauchsmittel beliefen sich auf 31,3% des Gesamtbudgets. Für Materialkosten, die im Rahmen der Leistungserbringung der Core Facility Cell Programming des Universitätsklinikums Bonn für das Projekt berechnet wurden, wurden 12% des Gesamtbudgets verausgabt. Die verbleibenden 1,3% wurden für Dienstreisen verausgabt, bei denen im Jahr 2022 Dr. Michael Peitz als krankheitsbedingte Vertretung für Prof. Brüstle (Principle Investigator) teilgenommen hat. Die Reisekosten von Prof. Brüstle konnten aufgrund der Kurzfristigkeit nicht erstattet werden. Im Jahr 2023 haben Prof. Brüstle, der Projektmitarbeiter Christian Felski sowie Dr. Michael Peitz teilgenommen. Dr. Peitz hat im Rahmen dieses Projektmeetings über die in seinem Zuständigkeitsbereich liegende Generierung von Zelllinien für das Projekt vorgetragen. Investitionen wurden im Rahmen des Projektes nicht getätigt. Die tatsächlichen Projektkosten entsprechen den geplanten Projektkosten, größere Abweichungen ergeben sich nicht.

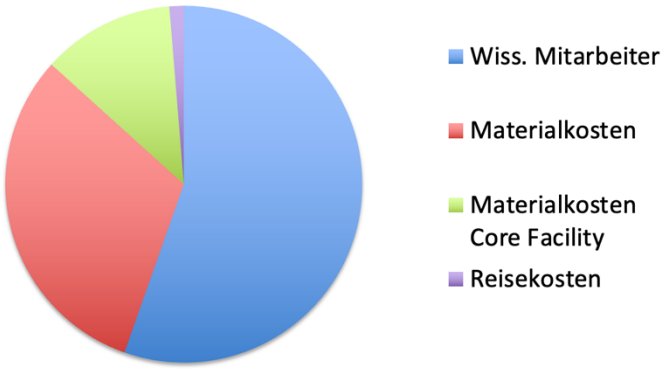

Abb. 3: Verteilung der wichtigsten Positionen des zahlenmäßigen Nachweises über die Gesamtprojektdauer.

3. Notwendigkeit und Angemessenheit der geleisteten Arbeit

Die durchgeführten Arbeiten sowie die dafür aufgewandten Ressourcen und Mittel waren notwendig und angemessen, da sie den im Projektantrag bzw. in den Zwischenberichten dargelegten Planungen entsprachen und dazu eingesetzt wurden, die im Arbeitsplan formulierten Aufgaben möglichst erfolgreich zu erfüllen.

4. Voraussichtlicher Nutzen insbesondere der Verwertbarkeit des Ergebnisses im Sinne des fortgeschriebenen Verwertungsplans

Im Rahmen dieses Projekts ließ sich ausschließlich in Abwesenheit von Mikroglia eine Reduktion der synaptischen Dichte nach inflammatorischer Stimulation im Vergleich zu homöostatischen Bedingungen nachweisen. Darüber hinaus waren keine genotypspezifischen Veränderungen der neuronalen Struktur oder Funktion infolge inflammatorischer Ereignisse erkennbar. Dass diese synaptische Vulnerabilität unter inflammatorischen Bedingungen in Anwesenheit von Mikroglia nicht mehr nachweisbar war, deutet - zusammen mit einigen funktionellen Daten der Tri-Kulturen unter homöostatischen Bedingungen - auf einen funktionellen Einfluss der Mikroglia-Inkorporation auf das neuronale Netzwerk hin.

Somit stellen die in AP2.1.2 etablierte Tri-Kultur aus Astrozyten, Neuronen und Mikroglia einen vielversprechenden Ausgangspunkt dar, um inflammatorische Prozesse zusätzlich auch in anderen genetischen Hintergründen zu untersuchen. Darüber hinaus bietet die Plattform ein hohes Anwendungspotenzial für molekulare Screening-Ansätze im Rahmen der präklinischen Medikamentenentwicklung.

Im Kontext eines SHANK3-assoziierten Krankheitsmodells ermöglicht die Modularität der Tri-Kultur, murine wildtypische Astrozyten gezielt durch SHANK3-defiziente Zellen zu ersetzen. Da Astrozyten sowohl eine relevante SHANK3-Expression aufweisen als auch eine zentrale Rolle in der inflammatorischen Antwort spielen, eröffnet die Integration SHANK3-defizienter Astrozyten einen vielversprechenden Ansatz für weiterführende Untersuchungen.

Da der Fokus des vorliegenden Projekts auf der neuronalen Struktur und Funktion im Rahmen inflammatorischer Prozesse lag, wären ergänzende funktionelle und strukturelle Analysen *der Mikroglia-Subpopulati* innerhalb der Tri-Kultur von großem wissenschaftlichem Interesse.

Eine Weiterentwicklung des Kultursystems von 2D zu 3D stellt zudem einen entscheidenden nächsten Schritt dar, um ein aussagekräftigeres SHANK3-defizientes Modell zu etablieren. Ein solches Modell würde nicht nur eine physiologischere Gewebearchitektur, sondern auch eine realistischere Entwicklung von Stammzellen über neuronale Vorläuferzellen bis hin zu ausgereiften neuralen Derivaten ermöglichen.

Die erzielten Projektergebnisse werden einer direkten wissenschaftlichen Verwertung zugeführt, insbesondere durch Publikationen in renommierten Fachzeitschriften sowie Präsentationen auf internationalen wissenschaftlichen Konferenzen. Darüber hinaus bilden sie die Grundlage für die Einwerbung weiterer Drittmittel im Rahmen einer Anschlussförderung und tragen so zur nachhaltigen Fortführung der Forschungsarbeiten bei.

5. Während der Durchführung des Vorhabens des Zuwendungsempfängers bekannt gewordener Fortschritte auf dem Gebiet des Vorhabens bei anderen Stellen

Dem Zuwendungsempfänger sind im Laufe der Projektdauer keine Ergebnisse Dritter bekannt geworden, welche wesentlichen Einfluss auf das Vorhaben hatten.

6. Erfolgte oder geplante Veröffentlichungen des Ergebnisses

Felski, C, Peitz, M. and Brüstle, O. A neuron-immune co-culture model for studying inflammation-mediated structural and functional modulation in SHANK3 deficiency (in preparation)

Kongressbeiträge

Felski, C., Mathews-Ajendra, M., Peitz, M. and Brüstle, O.
Using human iPSC-derived microglia and neurons to study inflammation-mediated modulation of neuronal development and synaptic function in SHANK3 deficiency
Midterm Symposium of the JTC2021 ‘Neurodevelopmental Disorders’
May 15 – 16, 2024

Felski, C., Mathews-Ajendra, M., Peitz, M. and Brüstle, O.
Using human iPSC-derived microglia and neurons to study inflammation-mediated modulation of neuronal development and synaptic function in SHANK3 deficiency
14th Internal Meeting of the Stem Cell Network NRW
Bonn Germany, May 27-28, 2024
Poster presentation

Felski, C., Mathews-Ajendra, M., Peitz, M. and Brüstle, O.
Using human iPSC-derived microglia and neurons to study inflammation-mediated modulation of neuronal development and synaptic function in SHANK3 deficiency
11th International Meeting of the Stem Cell Network NRW
Aachen Germany, May 16- 17, 2025
Poster presentation

Felski, C., Quadrubbi, M., Segschneider, M., Peitz, M. and Brüstle, O.
Using human iPSC-derived microglia and neurons to study inflammation-mediated modulation of neuronal development and synaptic function in SHANK3 deficiency
Bonner Forum Biomedicine Annual Meeting
Hennef, Germany, February 24-25, 2025
Flash talk and poster presentation

Felski, C., Quadrubbi, M., Segschneider, M., Peitz, M. and Brüstle, O.
Inflammation-mediated Modulation of Synaptic Function in SHANK3-deficient Human Neuronal Networks
13th German Stem Cell Network
Munich Germany, October 15-17
Poster presentation

Felski, C., Quadrubbi, M., Segschneider, M., Peitz, M. and Brüstle, O.
Using neuronal-immune cell co-culture models to study inflammation-mediated structural and functional modulation in SHANK3 deficiency
Immunosensation Cluster Science Days 2025
Bonn Germany, November 18-19, 2025
Poster presentation

1. Aufgabenstellung

Trotz vergleichbarer genetischer Prädisposition – einer Haploinsuffizienz des postsynaptischen Gerüstproteins SHANK3 – zeigen Patienten des ASD-assoziierten Phelan-McDermid-Syndroms stark variable symptomatische Schweregrade. Neben der genetischen Disposition weist eine wachsende Datenlage auf eine signifikante Immunaktivierung und anhaltende Neuroinflammation als zusätzliche umweltbedingte Komponente in der ASD-Entwicklung hin. Daher wurde im InflASD-Verbund die Hypothese aufgestellt, dass neuroinflammatorische Episoden, insbesondere durch proinflammatorische Mikroglia-Aktivierung, in SHANK3-haploinsuffizienten Individuen pathologische Phänotypen verstärken und so die Heterogenität des Schweregrads teilweise erklären können.

Die Aufgabe des Instituts für Rekonstruktive Neurobiologie (AG Brüstle) im ERANET-InflASD-Projekt bestand in der Generierung humaner pluripotenter Stammzelllinien (hPSZ) mit heterozygoter SHANK3-Defizienz sowie isogener Kontrollen. Anschließend sollten diese Linien in Nervenzellen differenziert werden, um zusammen mit wildtypischen hPSZ-differenzierten Mikrogliazellen Ko-Kulturen zu etablieren. Im Rahmen dieser Kulturen sollte der Einfluss inflammatorischer Prozesse auf neuronale Netzwerke moduliert und charakterisiert werden. Die konkreten Arbeitsziele waren: i) die Herstellung isogener hPSZ mit heterozygot mutiertem SHANK3-Allel, sowie deren Konversion in Neurone und Mikroglia (AP2.1.1 und AP2.1.2, ii) die Implementierung eines robusten Kultursystems aus hPSZ-abgeleiteten Neuronen, Mikroglia und murinen Astrozyten für Hochdurchsatz-Screenings (AP3.1) sowie iii) die morphometrische und funktionelle Charakterisierung inflammatorischer Prozesse in neuronalen Netzwerken dieses Kultursystems (AP2.1.3).

2. Planung und Ablauf des Vorhabens

Das Teilprojekt wurde in Meilensteine gegliedert (Abb. 1) und so konzipiert, dass es mit den bereits zur Verfügung stehenden und beantragten Ressourcen innerhalb des Zeitrahmens von drei Jahren durchführbar ist.

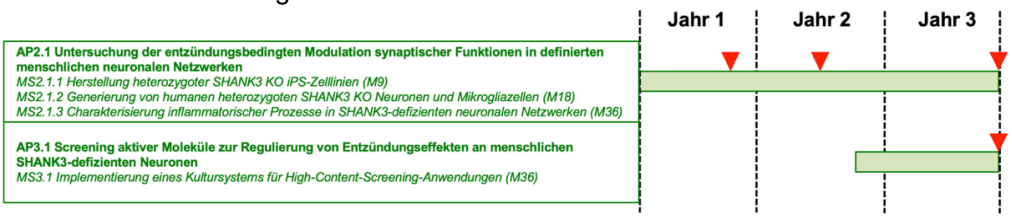

Abb. 1: Balkendiagramm zum geplanten Ablauf der Arbeitspakete

3. Wissenschaftlicher und technischer Stand, an den angeknüpft wurde

ASD umfasst ein heterogenes Spektrum neurologischer Entwicklungsstörungen mit Defiziten in sozialer Interaktion, Kommunikation und repetitivem Verhalten. Mutationen im SHANK3-Gen, das für ein Gerüstprotein exzitatorischer Synapsen kodiert, verursachen 1–2 % aller ASD-Fälle, wobei die zentralen neurologischen Merkmale des Phelan-McDermid-Syndroms (PMDS) auf eine SHANK3-Haploinsuffizienz zurückzuführen sind (Bonaglia et al., 2001; Bey et al., 2018). Derzeit wird die Entwicklung pharmakologischer Therapieansätze insbesondere durch das mangelnde Verständnis der funktionellen Folgen der SHANK3-Insuffizienz und die interindividuelle Variabilität bei den Patienten beeinträchtigt.

Innerhalb der letzten Jahre häufen sich klinische und wissenschaftliche Befunde aus Tiermodellen für ASD und weiteren neuropsychiatrischen Erkrankungen, dass neben der genetischen Prädisposition auch eine verstärkte inflammatorische Aktivierung des Immunsystems mit für die Erkrankung typischen Symptomen assoziiert ist. So weisen autistische Patienten häufig lebenslang veränderte Entzündungsreaktionen auf (Lucchina und Depino, 2014), während eine mütterliche Infektion das ASD-Risiko der Nachkommen deutlich erhöht (Jiang et al., 2016). Murine Modelle belegen dabei eindeutig, dass eine mütterliche Immunaktivierung während der Schwangerschaft autistische Verhaltensstörungen in den Nachkommen auslöst (Tartaglione et al., 2022; Dutra et al., 2023).

Daten des Projektpartners Bellone zeigen, dass junge SHANK3-heterozygote Mäuse nach akuter systemischer LPS-Inflammation zuvor nicht vorhandene, vorübergehende Verhaltensdefizite entwickeln (Tzanoulinou et al., 2022), was die Bedeutung von Immunprofilen für den pathophänotypischen Schweregrad unterstützt. Eine neue Studie weist zudem auf ein verändertes Immunprofil im ZNS SHANK3-defizienter Mäuse hin (Qiao et al., 2025), was eine Neuroinflammation nahelegt.

Neuroinflammation ist durch reaktive Glia und deren Proliferation gekennzeichnet. Bei Verletzung oder Infektion werden proinflammatorische Mediatoren wie Zytokine und Chemokine freigesetzt, die sowohl die Immunantwort als auch neuronale Aktivität und synaptische Funktion regulieren. Während einer anhaltenden Entzündung führen diese glialen Veränderungen zu einer abnormalen Immunreaktion, in deren Folge auch Defizite der neuronalen Funktion sowie des Verhaltens beobachtet wurden (Matta et al., 2019).

Mikroglia, die residenten Immunzellen des ZNS, sind entscheidend am Aufbau, Umbau und Abbau synaptischer Verbindungen beteiligt. Neue Erkenntnisse deuten darauf hin, dass ihre Aktivierung zur Entwicklung und Progression psychiatrischer Störungen beitragen kann. So wurden bei ASD-Patienten eine Zunahme reaktiver Mikrogliazellen sowie eine veränderte räumliche Organisation dieser Zellen beobachtet (Morgan et al., 2010; Liao et al., 2020).

Interessanterweise korreliert der durch eine Immunreaktion ausgelöste veränderte Umbau glutamaterger Synapsen mit Verhaltensdefiziten (Paolicelli und Ferretti, 2017). Obwohl die Hypothese aufgestellt wurde, dass

proinflammatorischen Zytokine eine direkte Rolle bei der Beeinflussung des Sozialverhaltens spielen, sind die zugrunde liegenden Mechanismen noch weitgehend unbekannt.

4. Wesentliche Ergebnisse sowie ggf. Zusammenarbeit mit anderen Forschungseinrichtungen

4.1. Generierung SHANK3 haploinsuffizienter hPS-Zelllinien

In der ersten Phase des Vorhabens wurden verschiedene SHANK3-defiziente humane pluripotente Stammzelllinien (hPSZ) generiert. Hierfür wurden mittels CRISPR/Cas9-vermittelter Genomeditierung Frameshift-Mutationen in Exon 20 des SHANK3-Gens in die embryonale Stammzelllinie WA01 eingeführt. In der Ausgangszelllinie war zuvor im Rahmen vorangegangener Arbeiten eine Doxyzyklin-induzierbare NGN2-Kassette in den AAVS1-„Safe harbor"-Lokus integriert worden, um eine Vorwärtsprogrammierung zu exzitatorischen Neuronen zu ermöglichen.

Im Rahmen der Genomeditierung wurden neben zwei wildtypischen Subklonen (Kontrollen) zwei Klone mit SHANK3$^{+/-}$-Genotyp isoliert. Alle generierten Klone wurden zur Qualitätskontrolle anhand von Single-Nucleotide-Polymorphism-(SNP)-Arraydaten virtuell karyotypisiert, um chromosomale Aberrationen auszuschließen. Zusätzlich erfolgten regelmäßige Genotypisierungen sowie Tests auf Mykoplasma-Kontaminationen.

4.2. Etablierung einer Ko-Kultur aus hPSZ-differenzierten Neuronen und Mikroglia

Im nächsten Schritt wurden die WA01-basierten NGN2-SHANK3-Linien durch NGN2-basierte Überexpression per Vorwärtsprogrammierung in postmitotische Neurone differenziert.

Des Weiteren wurden wildtypische hiPSZ zu Mikroglia differenziert und gemeinsam mit den NGN2-Neuronen sowie wildtypischen murinen primären Astrozyten kokultiviert. In einer umfassenden Experimentreihe musste eine Basalmediumkomposition identifiziert werden, die die Ko-Kultivierung aller drei Zelltypen ermöglichte. Im Anschluss musste die Supplementation einzelner Mediumkomponenten titriert werden um eine stabile, mehrwöchige Kultivierung der Mikroglia zu gewährleisten und gleichzeitig eine übermäßige Proliferation der Zellen zu verhindern. SHANK3-heterozygote Ko-Kulturen mit und ohne Mikroglia wurden anschließend für Phänotypisierungsstudien unter inflammatorischer Stimulation eingesetzt.

4.3. Morphologische Analysen von SHANK3-defizienten Neuronen unter homöostatischen und inflammatorischen Bedingungen zeigen eine durch SHANK3-Defizienz verursachte Reduktion der neuronalen Komplexität

Sholl-Analysen zeigten unter Standardbedingungen eine Verringerung der neuronalen Komplexität in SHANK3-defizienten Netzwerken. Eine inflammatorische Stimulation der Ko-Kulturen mittels LPS oder Überständen aktivierter Mikroglia führte innerhalb von 24 Stunden bzw. einer Woche zu keinen strukturellen Veränderungen.

SHANK3$^{+/-}$-Netzwerke wiesen nach vierwöchiger Ko-Kultivierung mit murinen Astrozyten eine verringerte Synapsendichte auf, die nach weiteren vier Wochen jedoch nicht mehr nachweisbar war.

In Anwesenheit von Mikroglia-Zellen (Tri-Kulturen) zeigte sich auch in wildtypischen neuronalen Netzwerken eine Reduktion der synaptischen Dichte um ca. 38%, sodass unter diesen Bedingungen kein signifikanter Unterschied zwischen den Genotypen bestand.

Somit beeinflusste eine inflammatorische Stimulation (LPS bzw. Überstände aktivierter Mikroglia) die synaptische Dichte ausschließlich in Abwesenheit von Mikroglia-Zellen und betraf dabei nur SHANK3$^{+/-}$-Netzwerke.

4.4. *Funktionale Untersuchungen SHANK3 haploinsuffizienter neuronaler Netzwerke weisen auf eine inflammations-unabhängige Verringerung des Burstingverhaltens hin, welches durch Mikroglia kompensiert wird*

In funktionellen Analysen SHANK3-defizienter neuronaler Netzwerke mittels Multielektroden-Array (MEA) zeigten sich Hinweise auf eine reduzierte mittlere Feuerrate (MFR) sowie ein vermindertes Burst-Verhalten im Vergleich zu isogenen Kontrollen.

Die Integration von Mikroglia-Zellen in diese Netzwerke führte dagegen zu einer erhöhten MFR, einem verstärkten Burst-Verhalten und einer erhöhten Netzwerksynchronität in den ersten Wochen der Ko-Kultivierung, was insgesamt auf eine beschleunigte Reifung der Netzwerke in Anwesenheit von Mikroglia hinweist. Dieser Effekt war jedoch nicht genotypspezifisch.

Das vergleichbare Burst-Verhalten beider Genotypen in Tri-Kultur deutet auf eine mögliche funktionelle Kompensation der reduzierten elektrophysiologischen Aktivität in SHANK3-defizienten Netzwerken durch Mikroglia hin. Die inflammatorische Stimulation mit LPS oder konditioniertem Medium aktivierter Mikroglia führte sowohl in Abwesenheit als auch in Anwesenheit von Mikroglia zu einem temporären Anstieg der MFR beider Genotypen im Zeitraum von 0,25 bis 5 Stunden nach Stimulation.

Zusammenfassend deuten die Ergebnisse auf eine durch heterozygote SHANK3-Defizienz verursachte verzögerte frühe Reifung neuronaler Netzwerke hin. Die Integration von Mikroglia-Zellen fördert zwar die Netzwerkreifung, der beschriebene SHANK3$^{+/-}$-Phänotyp bleibt jedoch überwiegend bestehen. Eine inflammatorische Stimulation bewirkt zudem einen Mikroglia- und Genotyp-unabhängigen transienten Anstieg der neuronalen Aktivität. Diese Befunde weisen auf ein frühes entwicklungsbiologisches Zeitfenster hin, in dem Mikroglia und deren inflammatorische Aktivierung einen maßgeblichen Einfluss auf die Differenzierung und Reifung neuronaler Netzwerke ausüben könnten.