

Sachbericht zum Verwendungsnachweis

Teil II: Eingehende Darstellung (max. 20 Seiten)

Projekttitle: EPINEURODEVO – Patientenzentriertes Targeting epigenetischer Vulnerabilitäten bei neuroentwicklungsbedingten Störungen: Eine interdisziplinäre Plattform für therapeutisch adressierbare Krankheitsmodelle

Acronym: EPINEURODEVO

Koordination: Prof. Andre Fischer (DZNE, Göttingen; Partner 1, P1)

Laufzeit: 01.05.2022 – 30.04.2025

Förderkennzeichen: 01EW2205

Berichtszeitraum: gesamt

1. Ausgangslage, wissenschaftlicher Stand und Zielsystem

Neuroentwicklungsbedingte geistige Behinderungen (Intellektuelle Entwicklungsstörungen; IES) sind schwere, früh einsetzende Erkrankungen mit erheblichen Einschränkungen von Lernen, Verhalten und Alltagskompetenzen. Wirksame, kausal ansetzende Therapien fehlen bislang. In den letzten Jahren hat sich gezeigt, dass Störungen der epigenetischen Genregulation, insbesondere der Histon-H3K4-Methylierung (H3K4me), ein zentrales, wiederkehrendes Merkmal dieser Erkrankungen darstellen ¹.

Auffällig ist die überproportionale Häufung von Patienten-Mutationen in Genen der H3K4-„*Writer*“ (KMT2A, KMT2D, SETD1B, etc), „*Eraser*“ (z. B. KDM1A/LSD1), welche Methylgruppen an Histonen anfügen bzw. abspalten und dadurch Genexpression regulieren, sowie Proteine wie GTF2I, welche H3K4 *Writer* und *Eraser* an die DNA rekrutieren ².

Diese Evidenz stützt die Arbeitshypothese, dass Dysbalancen der H3K4me wesentlich zur IES-Pathogenese beitragen und therapeutisch adressierbar sind.

Vor diesem Hintergrund verfolgte EPINEURODEVO das übergeordnete Ziel, H3K4-bezogene epigenetische Veränderungen in repräsentativen Modellen zu kartieren, daraus konvergente Krankheitsmechanismen abzuleiten um dabei zu helfen diese in präklinisch nutzbare Therapiestrategien zu überführen. Konkret sollten OMICS Daten (RNA-seq, CHIP-seq etc. mit (ii) Befunden bzgl Struktur-, Netzwerk- und Verhaltensphänotypen verknüpft und (iii) in eine translational einsetzbare Prüf-*Pipeline* überführt werden.

P1 sollte dabei speziell H3K4-bezogene epigenetische und transkriptomische Programme erfassen. Dieses Ziel wurde durch den Einsatz von Hochdurchsatz-Sequenzierung realisiert, wobei Partner 1 auf eine eigene Sequenziereinheit zurückgreifen konnte. Die Sachmittel wurden daher nicht für Auftragsforschung, sondern überwiegend für Sequenzierreagenzien sowie weitere notwendige Verbrauchsmaterialien der Nasslaborforschung eingesetzt. Darüber hinaus wurden die Fördermittel für die Finanzierung einer Doktorandenstelle verwendet.

2. Ergebnisse

Im Folgenden werden die Ergebnisse dargestellt, wobei der Schwerpunkt auf noch nicht publizierten Daten liegt. Diese Projekte werden vom EPINEURODEVO-Konsortium auch nach Projektende weiterbearbeitet und sollen 2025/26 veröffentlicht werden.

Während der Projektlaufzeit wurden uns durch neu erschienene Publikationen zusätzliche Befunde zu H3K4me-Veränderungen bei IES bekannt. So konnte beispielsweise für das von uns untersuchte SETD1B-Gen, dass für eine H3K4-Methyltransferase kodiert, die genetische Assoziation mit IES erneut bestätigt werden^{3 4}. Eine weitere Studie zeigte, dass bestimmte SETD1B-Mutationen auch mit neuropsychologischen Störungen wie Schizophrenie assoziiert sein können⁵. Darüber hinaus berichteten zwei Arbeiten, dass der Verlust der neuronalen GTF2I-Funktion, ebenfalls ein von uns untersuchtes Protein, dass die H3K4-Methylierung orchestriert, die Funktion von Mikrogliazellen beeinflusst. Diese externen Ergebnisse sind inhaltlich hoch relevant und bestätigen unseren Ansatz sowie unsere Hypothese, dass die Analyse von Prozessen der H3K4-Methylierung im Kontext von IES ein zielführender strategischer Ansatz für die Entwicklung neuer Therapien sein kann.

GTF2I kodiert den Transkriptionsfaktor TFII-I und liegt im Genomabschnitt 7q11.23. Dosage-Änderungen (Deletion/Duplikation) dieses Genomabschnitt, maßgeblich durch GTF2 vermittelt, sind zentral für zwei neuroentwicklungsbedingte Syndrome. Eine Deletion führt zum sogenannten Williams-Beuren-Syndrom (WBS), einer intellektuellen Entwicklungsstörung (IES), bei der die Haploinsuffizienz von GTF2I als Treiber der Pathogenese gilt. Eine Duplikation dieses Abschnitts führt zum 7q11.23-Duplikationssyndrom („Dup7“), das ebenfalls mit einer IES einhergeht und mit autismusähnlichen sowie sozialen Verhaltensphänotypen assoziiert ist, die ebenfalls durch das GTF2I-Gen vermittelt werden. Eine GTF2I-Überexpression stört u. a. Vorläufer-Proliferation, neurale Differenzierung und das Sozialverhalten in Mausmodellen.

GTF2I interagiert funktionell mit dem LSD1/KDM1A–CoREST–HDAC-Korepressor-Komplex und kontrolliert darüber vermutlich die H3K4-Methylierungszustände sowie neuronale Genprogramme.

Um dies zu untersuchen, stellte Partner 2 entsprechende Tiermodelle zur Verfügung, d. h. ein Gtf2i-Duplikations-Mausmodell als Modell für 7Dup (GTF2I-DUP) und eine Gtf2i-Knockout-Maus (GTF2I-DEL) als Modell für WBS. Außerdem konnte Partner 2 zeigen, dass LSD1-Inhibitoren sowie HDAC-Inhibitoren IES-Phänotypen teilweise retten konnten. Ziel von Partner 1 war es daher, Transkriptom und H3K4-Methylierung der beiden Tiermodelle zu untersuchen und mit gesunden Wildtyp-Tieren zu vergleichen. Außerdem sollte die Auswirkung der therapeutischen Behandlung auf epigenetische Genexpressions-Ebenen geprüft werden.

Dazu wurden die entsprechenden Hirngewebe von Partner 2 zur Verfügung gestellt und an Partner 1 geschickt. Gleichzeitig wurden die Tiere zur elektrophysiologischen und Verhaltensanalyse an Partner 4 sowie zur histologischen Analyse an Partner 6 geschickt. Partner 1 hat zunächst mittels FANS (*Fluorescence-Activated nuclei Sorting*) neuronale (NeuN⁺) und nicht-neuronale Zellkerne NeuN⁻) aus den Geweben isoliert, um die H3K4-Methylierung mittels Chromatin-Immunpräzipitation (ChIP) mit nachfolgender Sequenzierung zu messen. Parallel wurden aus Zellkernen Total-RNA für RNA-Sequenzierungen isoliert

(Abb. 1A).

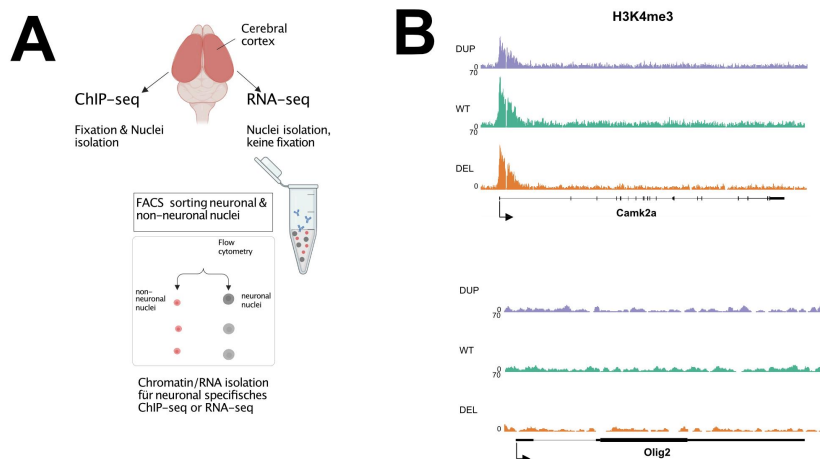


Abb. 1. Epigenetische Genexpressionsanalyse.

(A) Die Abbildung zeigt das experimentelle Schema. (B) Genbrowser-Ansichten, die das H3K4me3-Signal in mittels NeuN sortierten Zellkernen darstellen, wobei NeuN⁺-Zellkerne gezeigt werden. Ein

wichtige Qualitätskontrolle ist, dass NeuN⁺-Zellkerne in allen analysierten Gruppen ein starkes Signal des neuronalen Gens *CamK2a* aufweisen, während gliazellspezifische Gene wie *Olig2* kein H3K4me3-Signal zeigen.

Zunächst wurde ChIP-seq für H3K4me3 durchgeführt und die Qualität der Probenaufbereitung einem Qualitätscheck unterzogen. Da H3K4me3 ein Marker für aktive Genexpression ist, wurde überprüft, ob in neuronalen Kernen (NeuN⁺) neuronale Gene wie *CamkII* entsprechende Peaks aufweisen, während in Gliazellen exprimierte Gene wie *Olig2*

(Oligodendrozyten) oder GFAP (Astrozyten) dies nicht tun. Dies war der Fall (**Abb. 1B**). Neben H3K4me3 haben wir auch H3K4me2 gemessen, da diese Modifikation zusätzliche Aussagen über die Dynamik der H3K4-Methylierung in den entsprechenden IES-Modellen erlaubt.

Die Ergebnisse waren qualitativ hochwertig. Exemplarisch wird im Folgenden die Analyse adulter Tiere (Alter 3 Monate) dargestellt, da diese für therapeutische Intervention am relevantesten sind. Es konnte deutliche Veränderungen der H3K4me3- und H3K4me2-Methylierung sowohl in GTF2I-DEL- als auch in GTF2I-DUP-Tieren (**Abb. 2A, B**). Dabei war H3K4me2 in beiden Modellen vorwiegend reduziert, wobei im GTF2I-DUP Modell grob doppelt so viele Gene betroffen waren, wie in der, GTF2I- DEL Maus (**Abb 2A-C**). H3K4me3 war im GTF2I-DEL fast ausschließlich erhöht, im GTF2I-DUP-Modell jedoch fast ausschließlich reduziert (**Abb. 2A-C**).

Diese Daten stützen unsere Hypothese, dass die GTF2I-Deletion zu verminderter Kdm1a-Aktivität an H3-Histonen führt und damit die Demethylierungsaktivität erniedrigt ist. Bei erhöhtem GTF2I-Gehalt wäre dagegen weniger H3K4me3 zu erwarten, was im GTF2I-DUP-Modell ebenfalls bestätigt wurde. Eine Gen-Ontologie (GO) Analyse zeigte, dass Gene die im GTF2I-DEL-Modell eine erhöhte H3K4me3 aufweisen mit Signalwegen wie "histone-modification", "synapse organization" oder "mRNA processing" assoziiert sind (**Abb. 2D**). Gene, die eine verminderte H3K4me2 aufwiesen, waren mit Prozessen wie "axonogenesis", "regulation of neurogenesis" oder "synapse organization" verknüpft (**Abb 2E**).

Für GTF2I-DUP Tiere zeigen die GO Analyse der Gene mit verminderter H3K4me3 eine Assoziation mit Signalwegen der Zellproliferation, wie z.B. "regulation of smooth muscle cell proliferation" oder "regulation of cell division" (**Abb 2F**). Für die wenigen Gene, die eine erhöhte H3K4me3 aufwiesen, konnte kein Zusammenhang mit bekannten molekularen Prozessen beobachtet werden. Bzgl. der H3K4me2 in GTF2I-DUP Tieren deutet die GO Analyse darauf hin, dass vor allem Gene die mit "axonogenesis" oder "synapse organization" assoziiert sind, betroffen sind (**Abb 2G**).

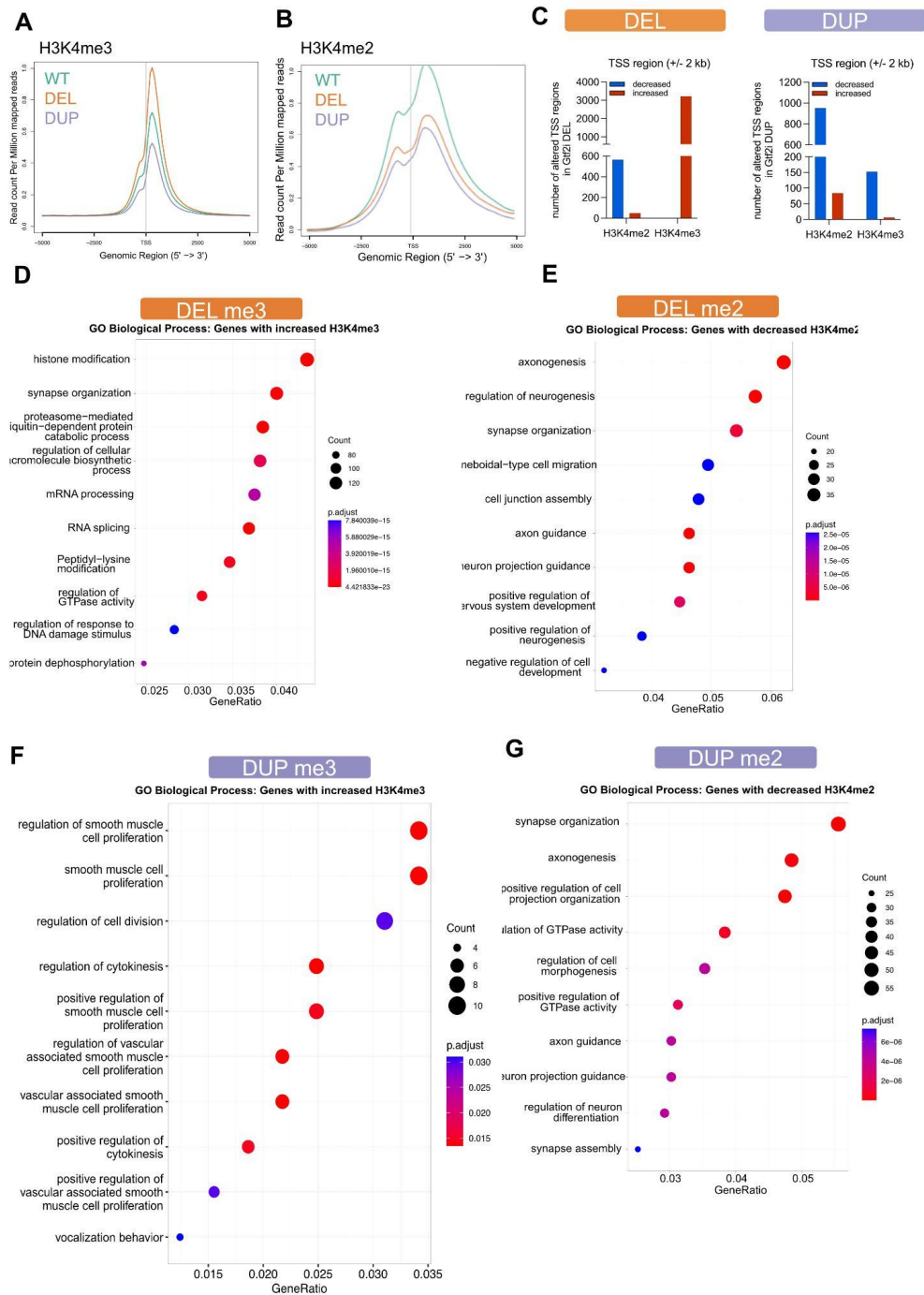


Abb. 2. Veränderungen der H3K4-Methylierung im Kortex von GTF2I-Del- und GTF2I-DUP-Mäusen.

(A) NGS-Diagramme, die das H3K4me3-Profil in GTF2I-Del- und GTF2I-DUP-Mäusen zeigen. (B) Wie in (A), jedoch für H3K4me2. (C) Balkendiagramme mit der Anzahl der signifikant veränderten H3K4me3- und H3K4me2-Peaks in GTF2I-Del- und GTF2I-DUP-Mäusen. (D) GO-Analyse mit den signifikant angereicherten GO-Terms für H3K4me3-Peaks, die in GTF2I-Del-Mäusen erhöht sind. (E) GO-Analyse mit den signifikant angereicherten GO-Terms für H3K4me2-Peaks, die in GTF2I-Del-Mäusen erhöht sind. (F) GO-Analyse mit den signifikant angereicherten GO-Terms für H3K4me3-Peaks, die in GTF2I-DUP-Mäusen erhöht sind. (G) GO-Analyse mit den signifikant angereicherten GO-

Terms für H3K4me2-Peaks, die in GTF2I-DUP-Mäusen erhöht sind. TSS: Transkriptionsstartstelle; bp: Basenpaare; Count: Anzahl der pro GO-Term angereicherten Gene; p-adjust: p-Wert nach Korrektur für multiples Testen.

Interessant ist dabei zu bemerken, dass insbesondere Veränderungen der H3K4me2 sowohl im GTF2I-DEL, also auch in GTF2I-DUP Modell mit Gene assoziiert sind, die synaptischen Prozesse regulieren.

Die Tatsache, dass H3K4me2 in GTF2I-DEL Proben reduziert ist, stimmt dabei mit der Annahme überein, dass H3K4me2 eine Zwischenstufe auf dem Weg zu H3K4me3 darstellt. In diesem Fall weisen die Daten also auf eine beschleunigte H3K4-Methylierung hin. Im Speziellen lassen sich 173 Gene beobachten, welche im GTF2I-DEL Modell eine verminderte H3K4me2 bei gleichzeitig erhöhter H3K4me3 aufweisen (**Abb. 3A**). Eine GO Analyse zeigte, dass diese Gene Signalwege wie "synapse organization", "regulation of neurogenesis", "axonogenesis", "axon guidance" oder "synapse assembly" repräsentieren (**Abb. 3B**). Hervorzuheben sind hierbei Gene, die bereits mit IES in Verbindung gebracht wurden, wie z.B. SHANK3, CHD7, ANK3, COL4A1, ADGRL1 (LPHN1), NECTIN1, LINGO1 oder ZNF335, die alle genetisch mit IES assoziiert sind (**Tabelle 1**).

Tabelle 1: Gene, die in GTF2I-DEL Mäusen reduzierte H4K4m3 und H3K4me2 aufweisen und bereits mit IES in Verbindung gebracht wurden.

Gen (Symbol)	Voller Name	Assoziation mit IES	Literatur (Pubmed ID)
SHANK3	SH3 and multiple ankyrin repeat domains 3	Phelan-McDermid-Syndrom, Autismus-Spektrum Störungen	20301377; 30537371
CHD7	Chromodomain helicase DNA-binding protein 7	CHARGE-Syndrom; Autismus-Spektrum Störungen	20301296; 39610113
ANK3	Ankyrin-G	Verschiedenen ANK3-assoziierte IES	34218362; 38988293
COL4A1	Kollagen Typ IV, Alpha 1	COL4A1/2-assoziierte zerebrale Gefäßerkrankungen mit IES Phänotypen	20301768
ADGRL1 (LPHN1)	Adhesion G-Protein Coupled Receptor L1	Neuronale Entwicklungsstörungen mit IES Phänotypen/Autismus-Spektrum Störungen	35907405
NECTIN1 (PVRL1)	Nectin-1	CLPED1 (Spaltbildung/Ektodermale Dysplasie) mit IES Phänotypen	25913853
LINGO1	LRR and Ig domain containing, Nogo-Receptor-Interacting Protein 1	Genetisch mit IES Phänotypen assoziiert	28837161
ZNF335	Zinc Finger Protein 335 (human; Maus: Zfp335)	Primäre Mikrozephalie (MCPH10) mit schwerer IES	29652087

SPTBN2	Spectrin, Beta, Non-Erythrocytic (β-III-Spektrin)	2	Früh beginnende Ataxie-Spektrum mit IES Phänotypen in Subgruppen	33318253
LRRC4C (NGL-1)	Leucine Rich Repeat Containing 4C		Kandidat in 7q31.33–q32.1-Mikrodeletion (schwere IES/Autismus)	28224041
HEY1	Hairy/Enhancer-of-split related with YRPW motif 1		Kandidat im 8q21.11-Mikrodeletionssyndrom mit häufigen IES Symptomen	34549899
PLXND1	Plexin-D1		Möbius-Syndrom mit IES Phänotypen in Subgruppen	39202332
SEMA3F	Semaphorin-3F		Kandidat in 3q29-Rekurrenzdeletion bei Neuronale Entwicklungsstörungen mit IES Phänotypen	27656750
CASZ1	Castor Zinc Finger 1		CASZ1-assoziierte Neuronale Entwicklungsstörungen mit IES Phänotypen/Autismus-Spektrum Störungen in Subgruppen	26345236
OBSL1	Obscurin-like 1		3-M-Syndrom; selten IES Symptome	22624670
DIXDC1	DIX Domain-Containing 1		Assoziation mit AutismusSD/psychiatrische Phänotypen	27829159
SLIT2	Slit Guidance Ligand 2		Wichtig für neuronale Entwicklung aber keine etablierte genetische IES-Assoziation	30111362
NAP1L1	Nucleosome Assembly Protein 1-Like 1		Neurogenese (Tier/Cells); keine gesicherte human-ID	27421841
SMARCD3	SWI/SNF-Untereinheit BAF60C		Wichtig für neuronale Entwicklung aber keine etablierte genetische IES-Assoziation	30123105
C1QL3	Complement C1q-Like 3		Synaptische Funktionen; Ratten-kockt out führt zu IES-ähnlichen Phänotypen 38379452	
LRFN4	Leucine Rich Repeat and Fibronectin Type III Domain Containing 4		Mausmutanten zeigen Hinweise auf Funktion bei neuronaler Entwicklung und IES-ähnliche Phänotypen	27478018
PDZRN3	PDZ Domain Containing RING Finger 3		Aus Mausstudien Hinweise auf Funktion bei neuronaler Entwicklung	17576800
ARF6	ADP-Ribosylation Factor 6		Kein direktes ID-Gen; Relevanz aber über IQSEC2/ARF-Signalweg mit IES assoziiert	26733290

Im Gegensatz zum GTF2I-DEL Maus, waren im GTF2I-DUP Modell im Vergleich zur H3K4me3, deutlich mehr Gene durch eine veränderte H3K4me2 betroffen. Außerdem waren in GTF2I-DUP Modell wie gesagt sowohl die H3K4me3 und H3K2me2 reduziert (siehe auch Abb 2). Für insgesamt 21 Gene konnten gleichzeitig reduzierte H3K4me3 und H3K4me2 Level beobachtet werden (**Abb 3C**). Eine GO Analyse ergab, wie bei der Einzelanalyse von veränderten H3K3me3, Signalwege die generell auf eine veränderte Proliferation hinweisen,

wie z.B: “regulation of smooth muscle cell proliferation” oder "muscle cell proliferation" (**Abb 3D**).

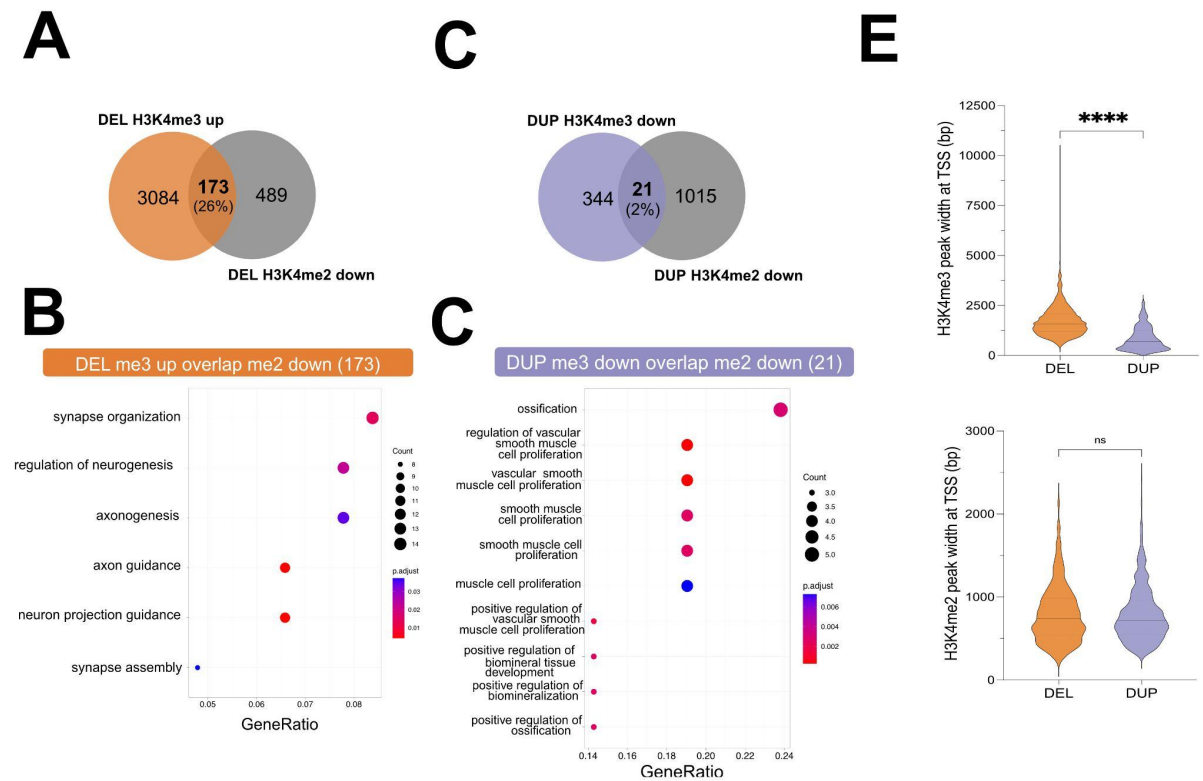


Abb. 3. Zelluläre Prozesse, die durch veränderte H3K4-Methylierungsmuster in GTF2I-DUP- und -DEL-Mäusen beeinflusst werden. (A) Venn-Diagramm, das die Überlappung von signifikant erhöhten H3K4me3-Peaks und verminderten H3K4me2-Peaks in GTF2I-DEL-Mäusen zeigt. **(B)** GO-Term-Analyse der 173 überlappenden Gene, die in **(A)** dargestellt sind. **(C)** Venn-Diagramm, das die Überlappung von signifikant verminderten H3K4me3- und H3K4me2-Peaks in GTF2I-DUP-Mäusen zeigt. **(D)** GO-Term-Analyse der 21 überlappenden Gene, die in **(C)** dargestellt sind. **(E)** Verteilung der Peak-Breiten für H3K4me3 (oberes Panel) und H3K4me2 (unteres Panel) in GTF2I-DEL- und -DUP-Mäusen.

Erwähnenswert ist zudem, dass sich die Breite der H3K4me3-Peaks insgesamt verändert. Hierbei gilt, dass Gene, welche für die zelluläre Identität wichtig sind, in diesem Fall z. B. spezifisch in Neuronen exprimierte Gene, in der Regel breitere H3K4me3-Peaks aufweisen aus ubiquitär exprimierten Gene.^{6 7} Eine Deregulation solcher Gene ist für neuronale Erkrankungen besonders ungünstig⁶. Bei Genen, die im GTF2I-DEL-Modell eine veränderte H3K4me3 zeigten, war die Peak-Breite deutlich größer als bei den entsprechenden Genen im GTF2I-DUP (**Abb. 3E**). Diese Befunde lassen insgesamt vermuten, dass H3K4me im GTF2I-DEL und im GTF2I-DUP massiv verändert ist, aber jeweils unterschiedliche Gensets eine veränderte H3K4me3 und H3K4me2 aufweisen. Dabei ist auch zu bemerken, dass es

publizierte Hinweise darauf gibt, dass H3K4me2 eine eigenständige regulatorische Funktion hat, als nicht ausschließlich eine Zwischenstufe auf dem Weg zur Trimethylierung darstellt⁸. Dieses könnte insbesondere für Patienten des 7-DUP Syndroms wichtig sein, da hier im Vergleich zu H3K4me3 eine massive Veränderung der H3K4me2 zu beobachten ist.

Insgesamt passen diese Befunde sehr gut zu dem Wissen um die H3K4 Demethylase KDM1A, für welche eine Präferenz, die H3K4 mono und di-Methylierung, beschrieben wurde⁹. Dieses steht auch in Einklang mit der Tatsache, dass die Gene, welche eine Veränderung H3K4me2 aufweisen, oder eine gleichzeitige H3K4 di- und tri-methylierung, eher mit Signalwegen der synaptischen Plastizität assoziiert sind als es für die Analyse der H3K4me3 Veränderungen zu beobachten war. Dieses ist vor allem vor dem Hintergrund der Therapieentwicklung wichtig, denn obwohl unsere Daten darauf hinweisen, dass WBS und 7DUP Patienten sich womöglich bzgl. der neuronalen H3K4me3 unterscheiden, weisen beide Modelle darauf hin, dass es zu einer verminderten H3K4me2 kommt, welche mit einer Deregulation von ähnlichen Signalwegen assoziiert ist, so z.B.: "*synapse organization*" oder "*axonogenesis*" (Siehe Abb 2). Diese Ergebnisse passen auch zu den Befunden von Partner 2, die darauf hindeuten, dass KDM1A Inhibitoren im 7DUP Modell therapeutische Wirksamkeiten zeigen¹⁰. Im WBS Modell wurden KDM1A Inhibitoren bisher nicht untersucht, aber auf Basis unserer Daten, sowie Hinweisen aus der Literatur, dass KDM1A Inhibitoren z.B. im Tiermodell für beschleunigte Alterungsdefizite im Sozialverhalten und kognitive Funktion verbessern¹¹, haben wir solche Untersuchungen initiiert.

Zusätzlich zu der H3K4 Analyse, haben wir die Genexpression analysiert. Wie in Abb 1A dargestellt, wurden hierzu ebenfalls neuronale Zellkerne von den gleichen Tieren verwendet. Sowohl im GTF2I-DEL und GTF2I-7dup Modell konnten erhebliche Expressionunterschiede beobachtet werden (**Abb. 4A, B**).

Die GO-Analyse ergab, dass die deregulierten Gene in den GTF2I-DEL Mäusen vornehmlich Signalwege der neuronalen Plastizität darstellen, wie z.B. "*regulation of synapse organization*", "*postsynapse organization*" oder "*dendritic spine development*" (**Abb. 4C**). Auch für die GTF2I-7dup Tiere zeigen die deregulierten Gene eine Anreicherung von Signalwegen der neuronalen Plastizität wie "*regulation of synapse organization*", und "*postsynapse organization*" (**Abb. 4D**). In Kombination mit den H3K4 ChIP-seq Daten, weisen diese Befunde darauf hin, dass insbesondere die veränderte H3K4me2 mit der veränderten Genexpression in den WBS und 7dup Modellen in Zusammenhang stehen könnte.

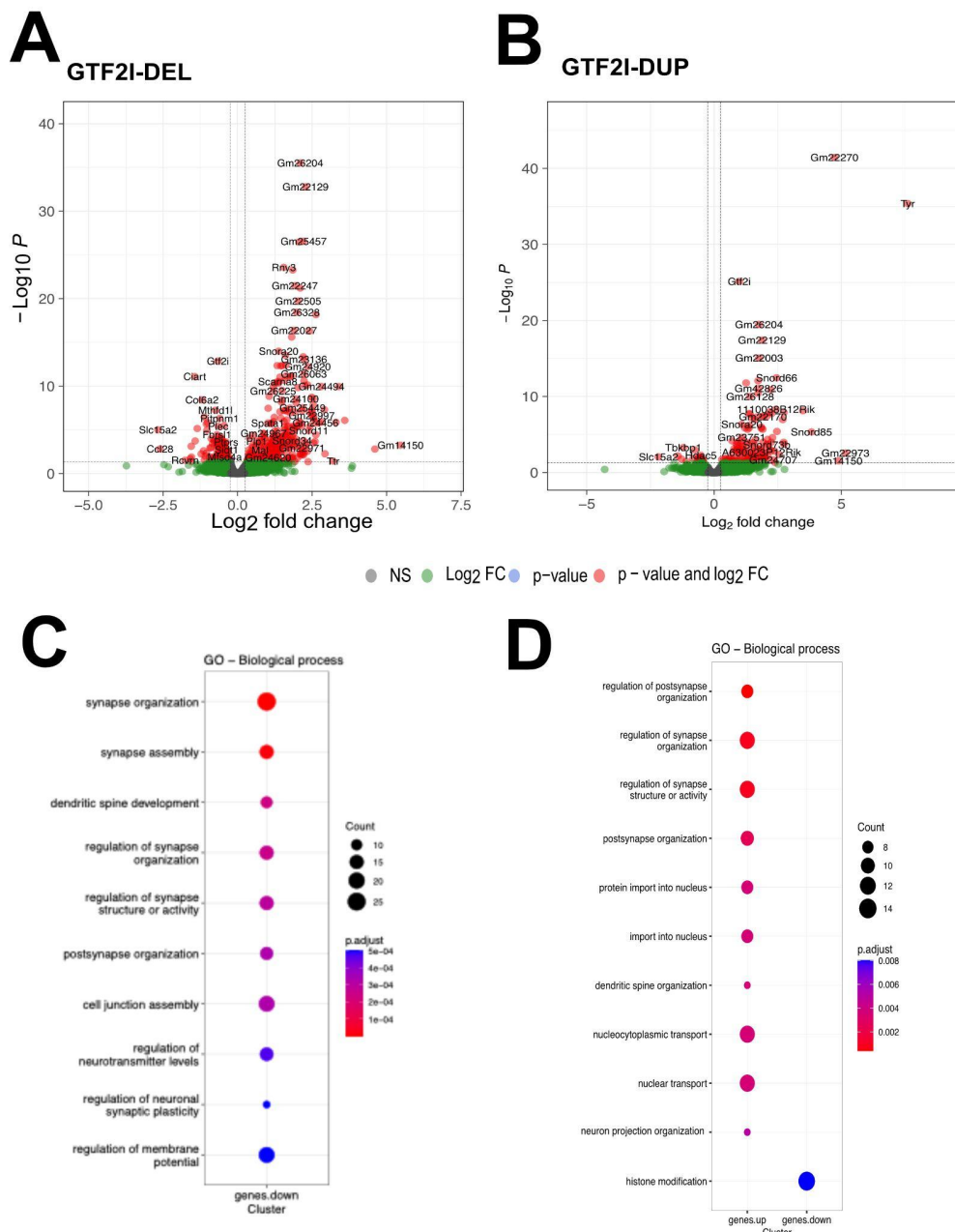


Abb. 4. Genexpressionsunterschiede im Kortex von GTF2I-DEL- und -DUP-Mäusen. (A) Volcano-Plot, der die differentiell exprimierte Gene in GTF2I-DEL-Mäusen im Vergleich zu den entsprechenden Kontroll-Wurfgeschwistern zeigt. **(B)** Wie in (A), jedoch dargestellt sind die Ergebnisse für GTF2I-DUP-Mäuse. **(C)** GO-Analyse unter Verwendung der signifikant deregulierten Gene (p-Wert und log₂FC), die in (A) gezeigt sind. **(D)** GO-Analyse unter Verwendung der signifikant deregulierten Gene (p-Wert und log₂FC), die in (B) gezeigt sind.

Ein unerwarteter Befund ergab sich aus den RNAseq Daten. Bei der Betrachtung der unterschiedlichen RNA Spezies konnte festgestellt werden, dass neben protein-kodierenden mRNAs, vor allem snoRNA, sowohl in GTF2I-7dup als auch in GTF2I-DEL Tieren überproportional dereguliert waren (**Fig. 5A**).

SnoRNAs (small nucleolar RNAs) sind nicht-kodierenden RNA-Moleküle (ncRNAs) und lassen sich in kanonische und nicht-kanonische Formen unterteilen. Kanonische snoRNAs gehören überwiegend zu den Box-C/D- bzw. Box-H/ACA-Klassen und dirigieren chemische Modifikationen an rRNA und snRNA, wobei Box-C/D-snoRNAs 2'-O-Methylierungen vermitteln, während Box-H/ACA-snoRNAs Pseudouridylierungen katalysieren. Damit sind sie zentrale Akteure der Ribosomenbiogenese und tragen über die Feineinstellung von rRNA sowie die Modifikation von snRNAs zur effizienten Translation und zum präzisen Spleißen bei. Nicht-kanonische (häufig „orphan“) snoRNAs besitzen demgegenüber keine klassischen rRNA-Zielsequenzen und übernehmen extraribosomale Funktionen. Sie können zu snoRNA-abgeleiteten kleinen RNAs (sdRNAs/sno-miRNAs) prozessiert werden und damit miRNA-ähnlich die Genexpression regulieren, das alternative Spleißen, die mRNA-Stabilität und die Translation beeinflussen sowie in einzelnen Fällen chromatin-assoziierte Prozesse und zelluläre Stressantworten modulieren.

Insgesamt konnten wir sowohl im GTF2I-7dup-Modell als auch im GTF2I-DEL-Modell ein spezielles snoRNA-Cluster identifizieren, bestehend aus zwei snoRNAs, die wir vorläufig „IDD_SNORD_1“ und „IDD_SNORD_2“ genannt haben. Beide snoRNAs sind in GTF2I-7dup wie auch in GTF2I-DEL über alle analysierten Zeitpunkte hinweg signifikant hochreguliert, d. h. sowohl im Embryonalstadium (E14,5) als auch im adulten Tier. Vor diesem Hintergrund haben wir beschlossen, diese snoRNAs funktionell zu untersuchen. Die Entscheidung basierte auf der Überlegung, dass RNA-Therapien insgesamt, und insbesondere mit Blick auf den nichtkodierenden Anteil des Transkriptoms, ein großes Potenzial für die Entwicklung neuer Therapien bieten und die Analyse krankheitsassoziiertes ncRNAs den „druggable space“ signifikant erweitert (nur ca. 1,5 % aller beim Menschen transkribierten Gene kodieren für Proteine; 98,5 % sind ncRNAs) ^{12 13 14 15 16 17}.

Die Analyse von Gehirnen aus Mausmodellen für 7DUP und WBS via qPCR bestätigte eine Hochregulation von IDD_SNORD_1 und der IDD_SNORD_2 (**Abb. 5B**). Außerdem konnte beobachtet werden, dass die beiden snoRNAs an Synapsen angereichert waren (**Abb 5C**) und weitgehend hirspezifisch exprimiert sind (**Abb. 5D**). Manipulation der snoRNA *level* in primären Mausneuronen veränderte die Netzwerkaktivität (multielectrode array, MEA) und überraschenderweise deuten erste Ergebnisse darauf hin, dass diese synaptischen snoRNA Einfluss Dynamic synaptischer Vesikel hat (**Abb. 5E**). Die Analyse von IDD_SNORD_1 und der IDD_SNORD_2 wird daher über das EPINEUODEVO-Projekt hinaus fortgeführt.

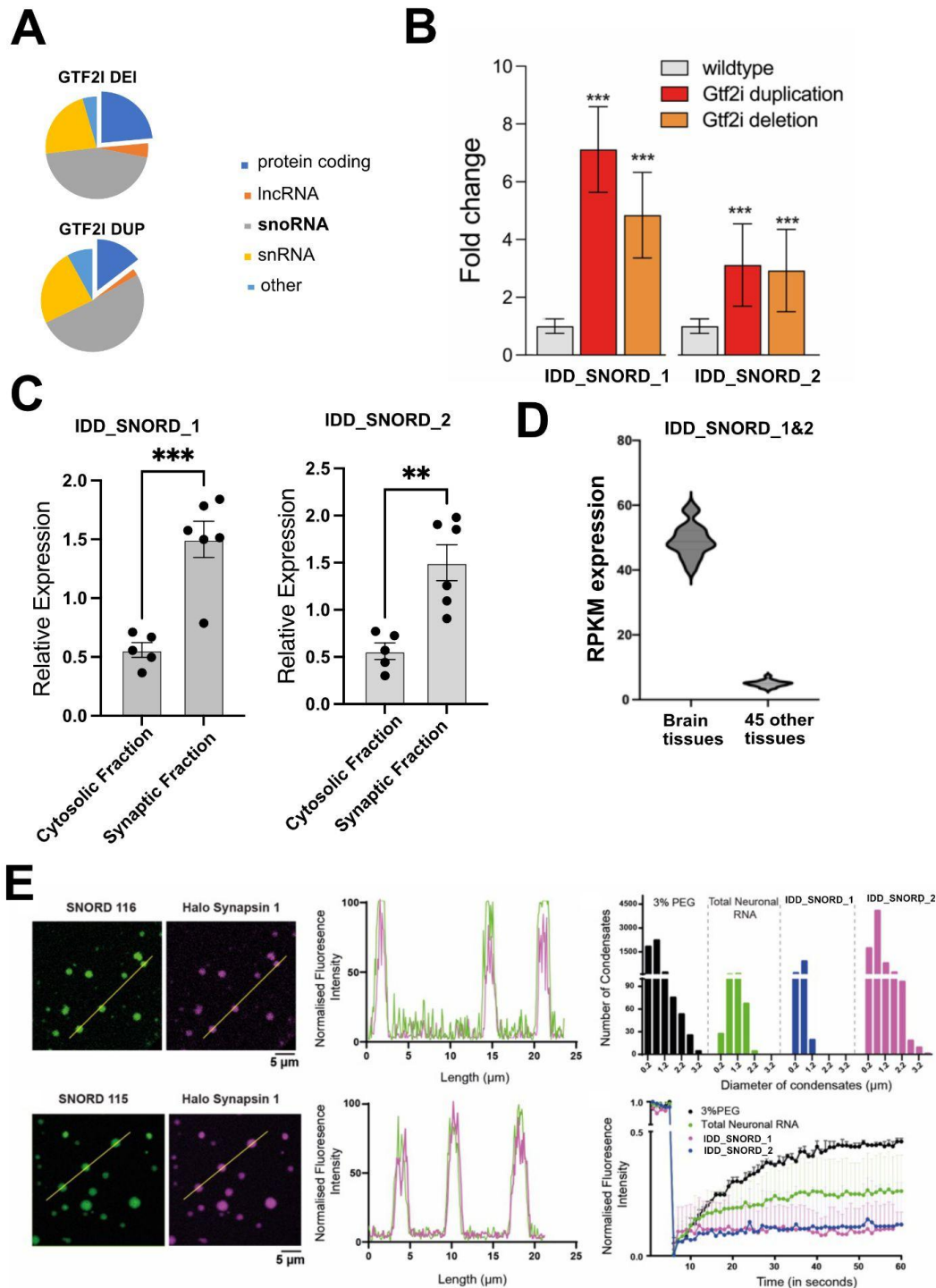


Abb. 5. Synaptische snoRNAs sind in GTF2I-DEL- und -DUP-Mäusen dereguliert. (A) Venn-Diagramm, das die unterschiedlichen RNA-Spezies zeigt, die in GTF2I-DEL- und -DUP-Mäusen differentiell exprimiert wurden. (B) qPCR-Daten, die die erhöhte Expression von IDD-SNORD_1 und IDD-SNORD_2 im Kortex von GTF2I-DEL- und -DUP-Mäusen bestätigen ($***P < 0,001$ vs. Kontrolle). (C) Balkendiagramme zeigen die qPCR-Analyse von IDD-SNORD_1 und IDD-SNORD_2 in zytosolischen und synaptischen Fraktionen, die aus primären kortikalen Neuronen isoliert wurden. (D)

Vergleich der kombinierten Expression von *IDD-SNORD_1* und *IDD-SNORD_2* im menschlichen Gehirn gegenüber 45 anderen Geweben. **(E) Oberes Panel:** Repräsentatives Bild (links) und Linienprofil (rechts) von 5 μ M Halo-Synapsin-1 (chemisch markiert mit Janelia Fluor 647) zusammen mit 100 ng/ μ l *IDD-SNORD_1*. Es zeigt sich eine Kolokalisation von Synapsin-1 und SNORDs in Kondensaten. Maßstab: 5 μ m. (Rechts) Histogramm, das die Größen-Zahl-Verteilung von 5 μ M EGFP-Synapsin-1 mit 3% PEG (schwarz), 30 ng/ μ l gesamter neuronaler RNA (grün), 100 ng/ μ l *IDD-SNORD_1* (blau) und 100 ng/ μ l *IDD-SNORD_2* (magenta) darstellt. **Unteres Panel:** Repräsentatives Bild (links) und Linienprofil (Mitte) von 5 μ M Halo-Synapsin-1 (chemisch markiert mit Janelia Fluor 647) zusammen mit 100 ng/ μ l *IDD-SNORD_2*. Auch hier ist eine Kolokalisation von Synapsin-1 und SNORDs in Kondensaten zu sehen. Maßstab: 5 μ m. (Rechts) Fluoreszenz-Recovery nach Photobleaching von EGFP-Synapsin-1, die unterschiedliche Erholungsraten für EGFP-Synapsin-1 zeigt, rekonstruiert mit 3% PEG (schwarz), 30 ng/ μ l gesamter neuronaler RNA (grün), 100 ng/ μ l *IDD-SNORD_1* (blau) und 100 ng/ μ l *IDD-SNORD_2* (magenta). Die in (E) dargestellten Daten wurden in Kooperation mit dem Labor von D. Milovanovic (DZNE) generiert.

In enger Kooperation mit Partner 2 wurden vergleichbare Analysen an humanen, iPSC-abgeleiteten Organoiden (GTF2I Mutationen für WBS bzw. 7dup im Vergleich zu gesunden Kontrollen) durchgeführt. Hierzu hat Partner 2 entsprechende Organoide zu den Zeitpunkten DIV25, DIV50 und DIV125 an Partner 1 gesandt. Die Qualität der Daten war sehr gut. Die von Partner 1 erzeugten H3K4-ChIP-seq-Daten wurden von Partner 2 zusammen mit den dort erhobenen Single-Cell-RNA-seq-Daten integrativ analysiert; die Ergebnisse sind dort im Detail beschrieben. Gleiches gilt für die Analyse der 3D-Chromatin-Architektur, die an denselben Maus- und Organoid-Proben von Partner 3 durchgeführt wurde. Die vorläufigen Daten bestätigen die Befunden aus den Mausmodellen und weisen darauf hin, dass therapeutische Strategien, welche die H3K4me2 erhöhten, sowohl für 7Dup als auch WBS hilfreich sein könnten. Das können, wie von Partner 2 und 4 untersucht KDM1A Inhibitoren sein. Zudem fand Partner 2 Hinweise darauf, dass auch HDAC Inhibitoren therapeutisch wirksam sein können. Diese Ergebnisse sind eingebettet in die komplementäre Untersuchung von Partner 6 bzgl. den histologischen Analyse von Synapsen in 7 Dup- und WBS-Organoid Modell und in den GTF2I-DEL, sowie GTF2I-DUP Mäusen. Gleiches gilt für verhaltensbiologische Analysen durch Partner 4.

Neben GTF2I hat das Konsortium weitere Akteure der H3K4-Methylierung untersucht. Besonders hervorzuheben sind unsere Arbeiten zur epigenetischen Genexpression bei IES-assoziierten Mutationen des SETD1B-Gens. SETD1B ist eine H3K4-Methyltransferase, die für normale kognitive Prozesse essentiell ist. Arbeiten aus dem Labor von Partner 1 zeigen, dass der Verlust der Setd1b-Aktivität die kognitive Leistungsfähigkeit sowie die mit neuronaler Plastizität assoziierte neuronale Genexpression stärker beeinträchtigt als Störungen anderer

H3K4-Methyltransferasen, etwa KMT2A oder KMT2B, die ebenfalls genetisch mit IES verknüpft sind ^{18 6}.

Tatsächlich sind Mutationen im *Setd1b*-Gen mit IES assoziiert ^{19 20 21}. Zu diesem Zweck erzeugten wir humane iPSCs, die eine in IES-Patienten beschriebene *Setd1b*-Mutation tragen ²¹, nämlich die R1885W-Mutation, die sich innerhalb der SET-Domäne von *Setd1b* befindet und für die Methylierungsreaktion essentiell ist. Daher war es wahrscheinlich, dass diese Mutation die Histonmethylierung beeinflusst, auch wenn dies zu Beginn des Projektes noch nicht gezeigt wurde. Für die molekularen und funktionellen Analysen wurden drei verschiedene Klone verwendet. Zusätzlich generierten wir iPSCs, in denen *Setd1b* deletiert wurde, um ein vollständiges Loss-of-Function-Modell zum Vergleich zu schaffen, da genetische Daten die Hypothese stützen, dass *Setd1b*-Mutationen bei IDDs einen Funktionsverlust darstellen ²².

Mit diesen Zelllinien erzeugten wir, in Zusammenarbeit mit dem Labor von Partner 2 kortikale Organoide nach einem etablierten Protokoll und führten zunächst eine Vorabanalyse an Tag 25 durch, einem Zeitpunkt, der durch eine hohe Anzahl neuronaler Vorläuferzellen und aktive Proliferation gekennzeichnet ist. Ein Klon fiel aus technischen Gründen aus, sodass wir Wildtyp-Organoide im Vergleich zu den *Setd1b*-Klonen R1884W.3 und R1885W.22 sowie zu den *Setd1b*-Knockout-Organoiden analysieren konnten.

Zunächst führten wir eRNA-seq der gesamten Organoiden durch. Die beiden R1885W-Klone wurden als unabhängige Replikate behandelt und mit der entsprechenden Wildtyp-Linie verglichen. Die PCA-Analyse zeigt, dass sich die unterschiedlichen Klone untereinander nicht wesentlich unterscheiden, jedoch in PCA1 klar von den Wildtyp-Organoiden getrennt sind (**Abb. 7A**). Wir identifizierten 867 signifikant hochregulierte und 807 signifikant herunterregulierte Gene (**Abb. 7B**). Die GO-Analyse ergab, dass die hochregulierten Gene mit Signalwegen der Entwicklung assoziiert sind, während die herunterregulierten Gene vor allem mit metabolischen und Entwicklungsprozessen in Verbindung stehen (**Abb. 7C**).

Für die SETD1B-Knockout-Organoide fanden wir 812 hochregulierte und 530 herunterregulierte Gene (**Abb. 7D**). Hier waren die hochregulierten Gene beispielsweise mit der Organisation von Synapsen verknüpft, während die herunterregulierten Gene mit Entwicklungsprozessen assoziiert waren (**Abb. 7E**). Beim Vergleich der differentiell exprimierten Gene zwischen den *Setd1b*-Knockout-Organoiden und den R1885W-Mutanten identifizierten wir 184 gemeinsame hochregulierte und 137 gemeinsame herunterregulierte Gene (**Abb. 7F**). Die GO-Analyse zeigte, dass die gemeinsamen hochregulierten Gene biologische Prozesse der Synapsenfunktion darstellen, während die gemeinsamen

herunterregulierten Gene mit Prozessen der extrazellulären Matrix (ECM) in Verbindung stehen (Abb. 7G).

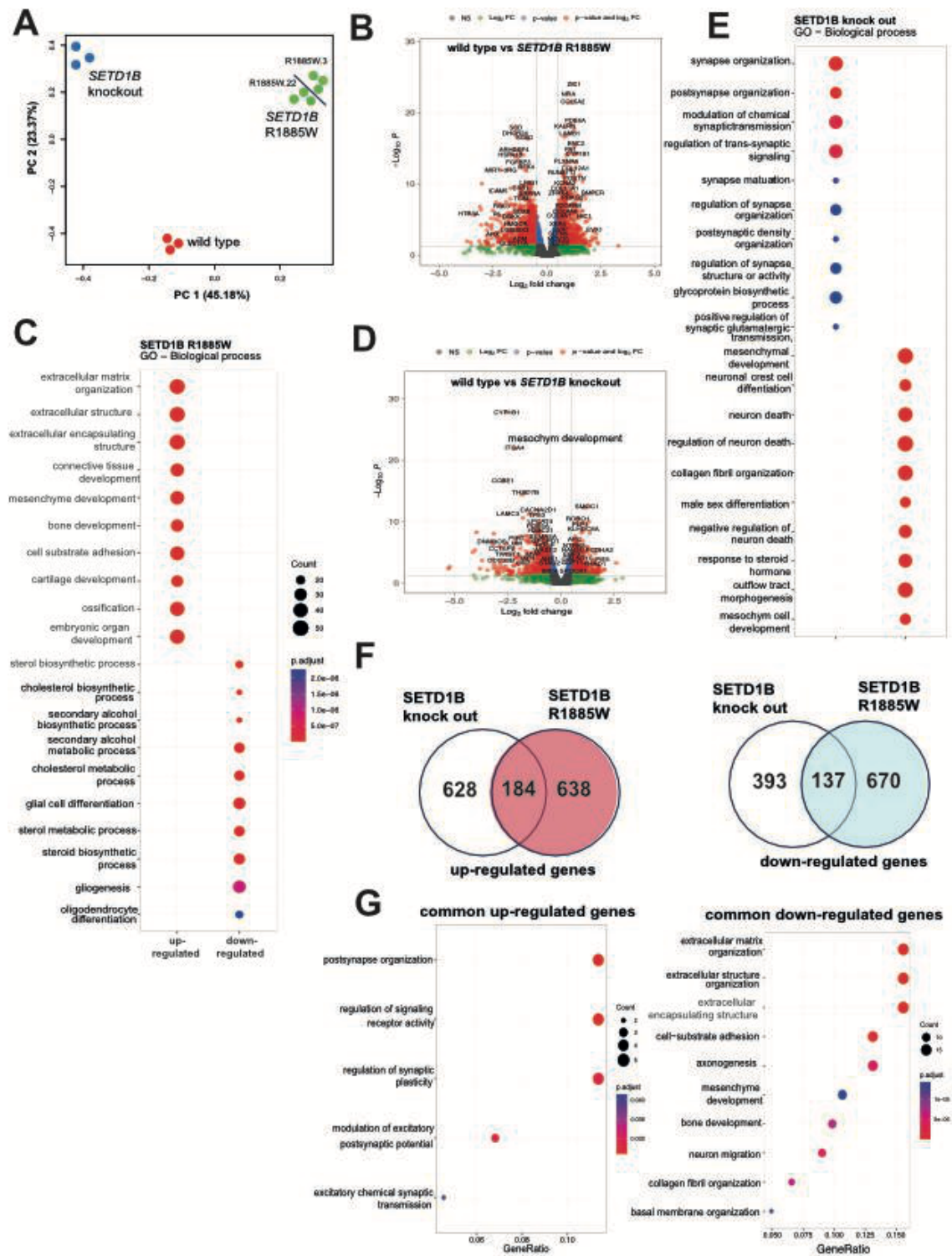


Abb. 2. Analyse von aus humanen iPSC-Zellen abgeleiteten kortikalen Organoiden mit SETD1B-Deletion oder R1885W-Mutation. (A) PCA-Analyse basierend auf RNAseq-Daten von Wildtyp-Organoiden im Vergleich zu SETD1B-Knockout- und SETD1B-R1885W-Mutanten. Es wurden jeweils

zwei Klone analysiert. **(B)** Volcano-Plot, der die differentiell exprimierte Gene im Vergleich von Wildtyp (WT) zu SETD1B-R1885W-Mutanten-Organoiden darstellt. **(C)** GO-Analyse basierend auf den in (B) dargestellten differentiell exprimierten Genen. **(D)** Volcano-Plot, der die differentiell exprimierten Gene im Vergleich von WT zu SETD1B-Knockout-Organoiden zeigt. **(E)** GO-Term-Analyse basierend auf den in (D) dargestellten differentiell exprimierten Genen. **(F)** Venn-Diagramme, die die Überlappung zwischen den hoch- und herunterregulierten Genen zeigen, die beim Vergleich von Wildtyp mit entweder SETD1B-R1885W-Mutanten (linkes Panel) oder Knockout-Organoiden (rechtes Panel) nachgewiesen wurden. **(G)** GO-Analyse basierend auf den überlappenden Genen, die in den in (F) dargestellten Venn-Diagrammen identifiziert wurden.

Diese Daten belegen, dass mit IDD assoziierte Mutationen sowie der Verlust von Setd1b zu einer erheblichen Deregulierung des Transkriptoms in humanen kortikalen Organoiden führen, wenn diese an DIV 25 untersucht werden.

Um erste Hinweise darauf zu erhalten, ob eine Manipulation der Setd1b-Funktion funktionelle Konsequenzen hat, führten wir, in Zusammenarbeit mit Partner 2 einen neuronalen Migrationsassay durch. Unsere vorläufigen Daten deuten darauf hin, dass die neuronale Migration in den Setd1b-R1885W-Mutanten ebenso wie in den Knockout-(KO)-Organoiden verstärkt ist (**Abb. 8**). GFP-markierte Neuronen wurden per Live-Imaging analysiert, und die gesamte zurückgelegte Strecke, die Geschwindigkeit sowie Phasen ohne Bewegung wurden berechnet. Im Vergleich zu Wildtyp-Organoiden waren sowohl die Gesamtdistanz als auch die Geschwindigkeit während der Beobachtungszeit in allen drei Klonen mit der R1885W-Mutation sowie in den Setd1b-KO-Organoiden erhöht. Entsprechend waren die unbewegten Phasen in allen Gruppen im Vergleich zu den Wildtypen signifikant reduziert (**Abb. 8**).

Die Daten für die Zeitpunkte DIV50 und DIV125 befinden sich in der Auswertung und werden mit von Partner 2 erhobenen Single-Cell-RNA-seq-Daten korreliert. Insgesamt weisen die Daten darauf hin, dass therapeutische Strategien zur gezielten Erhöhung des neuronalen H3K4me3 bei IES-Patienten mit SETD1B-Mutation/Dysfunktion zielführend sein könnten.

Neben den hier dargestellten, noch nicht publizierten Ergebnissen konnten im Rahmen der Projektlaufzeit durch Partner 1 zwei wissenschaftliche Publikationen realisiert werden, die thematisch eng an die im Projekt entwickelten Konzepte und Methoden anschließen.

Während der Projektlaufzeit konnten durch Partner 1 zudem zwei thematisch eng verwandte Publikationen realisiert werden, die die im Projekt entwickelten Konzepte und Methoden stützen. Kaurani et al., 2024²³ beschreibt die Rolle nicht-kodierender RNAs im Kontext der Schizophrenie, und Kaurani et al., 2025¹⁵ befasst sich mit genetischen Formen der Frontotemporaldeemenz. Beide Arbeiten stellen eine wichtige Vorarbeit dar, die die im Projekt

eingesetzten Analysen und Hypothesen unterstützt. Sie sind damit relevant für das Verständnis neuroentwicklungsbedingter Störungen und tragen zur Sichtbarkeit des Projekts in der internationalen Forschungsgemeinschaft bei.

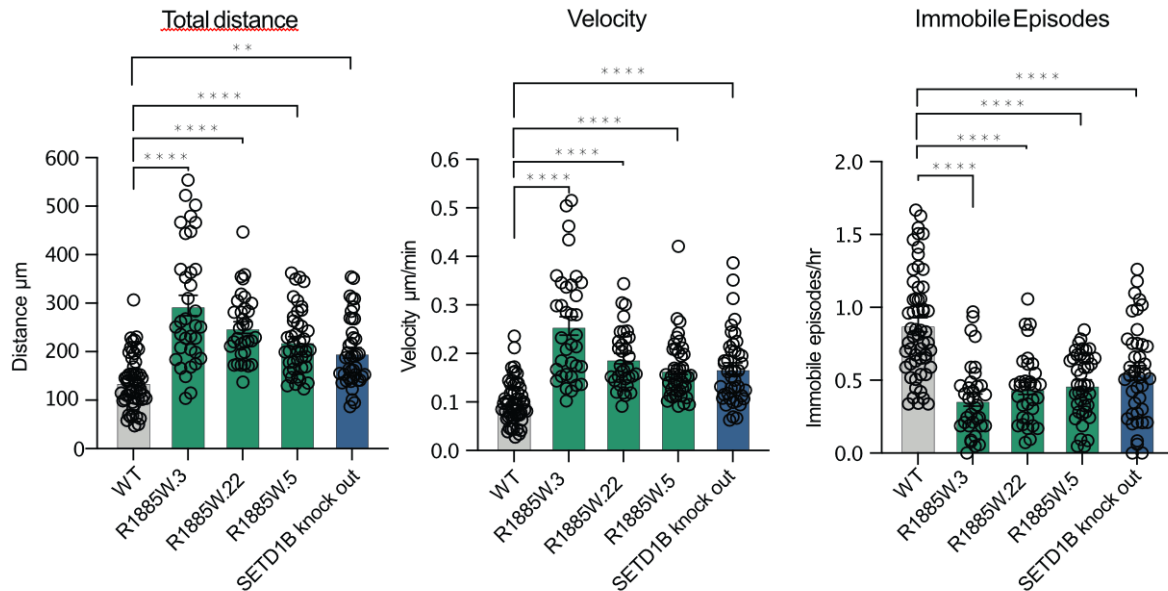


Abb. 8. Neuronales Migrations-Assay in kortikalen Organoiden mit dereguliertem SETD1B. GFP-markierte Neuronen wurden mittels Live-Cell-Imaging in aus SETD1B-R1885W-Mutanten (3 verschiedene Klone: 3, 22, 5) und SETD1B-Knockout gewonnenen kortikalen Organoiden analysiert. Die gesamte Wanderstrecke (linkes Panel), die Geschwindigkeit (mittleres Panel) und die Anzahl unbeweglicher Episoden (rechtes Panel) waren im Vergleich zu Wildtyp-Kontrollen (WT) signifikant verändert. Eine einfaktorielle ANOVA zeigte einen signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen ($P < 0,05$); für die Post-hoc-Analyse wurde ein ungepaarter t-Test verwendet ($****P < 0,00001$). Die Daten wurden von Partner 2 generiert.

Insgesamt hat das von Partner 1 durchgeführte Vorhaben eine Reihe neuer, für die Entwicklung innovativer Therapieansätze bei IES relevanter Erkenntnisse hervorgebracht und damit wesentlich zum Erfolg des gesamten Konsortiums beigetragen. Der Schwerpunkt lag, wie im Antrag vorgesehen, auf umfangreichen Sequenzierarbeiten, die wenn angezeigt, durch gezielte funktionelle Untersuchungen ergänzt wurden. Letztere ermöglichten insbesondere die vertiefte Analyse der unerwartet identifizierten, aber hochrelevanten Befunde zur snoRNA-Expression bei IES. Insgesamt erweitern Ergebnisse das Verständnis der molekularen Krankheitsmechanismen und eröffnen neue Ansatzpunkte für präklinische Prüfungen. Damit leistet das Projekt einen wichtigen Beitrag zur wissenschaftlichen Grundlage zukünftiger therapeutischer Strategien und stärkt zugleich die Anschlussfähigkeit der Arbeiten im Rahmen weiterer Forschungs- und Entwicklungsaktivitäten.

Literatur:

1. Iwase, S., Bérubé, N.G., Zhou, Z., Kasri, N., N. , Battaglioli, E., Scandaglia, M., and Barco, A. (2017). Epigenetic Etiology of Intellectual Disability. *J Neurosci.* 37 (45), 10773-10782.
2. Gabriele, M., Lopez Tobon, A., D'Agostino, G., and Testa, G. (2018). The chromatin basis of neurodevelopmental disorders: Rethinking dysfunction along the molecular and temporal axes. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 84, 306-327.
3. Pande, S., Majethia, P., Nair, K., Rao, L.P., Mascarenhas, S., Kaur, N., do Rosario, M.C., Neethukrishna, K., Chaurasia, A., Hunakunti, B., et al. (2024). De novo variants underlying monogenic syndromes with intellectual disability in a neurodevelopmental cohort from India. . *European Journal of Human Genetics* 32, 1291–1298. <https://doi.org/10.1038/s41431-023-01513-7>.
4. Li, Y., Pan, Z., Zheng, Z., Zhu, S.Y., Gong, Q., Yin, F., Peng, J., and Chen, C. (2025). Clinical characteristics of epilepsy with intellectual disability associated with SETD1B gene in three pediatric cases and a literature review. *Chinese journal of contemporary pediatrics* 27, 574-579.
5. Ünsel-Bolat, G., and Bolat, H. (2024). Phenotypes of autism spectrum disorder and schizoaffective disorder associated with SETD1B gene but without intellectual disability and seizures. *International journal of developmental neuroscience* 84. <https://doi.org/10.1002/jdn.10369>.
6. Michurina, A., Sakib, S., Kerimoglu, C., Krüger, D.M., Kaurani, L., Islam, R., Pena Centeno, T., Cha, J., Xu, X., Zeisberg, E.M., et al. (2022). Postnatal expression of the lysine methyltransferase SETD1B is essential for learning and the regulation of neuron-enriched genes. *EMBO J* 41, e106459.
7. Benayoun, B.A., Pollina, E.A., Ucar, D., Mahmoudi, S., Karra, K., Wong, E.D., Devarajan, K., Daugherty, A.C., Kundaje, A.B., Mancini, E., et al. (2015). H3K4me3 Breadth Is Linked to Cell Identity and Transcriptional Consistency. *Cell* 165, 1281–1286.
8. Soares, L.M., He, P.C., Chun, Y., Suh, H., Kim, T., and Buratowski, S. (2017). Determinants of Histone H3K4 Methylation Patterns. *Molecular cell. Molecular cell* 68, 773–785.
9. Dimitrova, E., Turberfield, A.H., and Klose, R.J. (2015). Histone demethylases in chromatin biology and beyond. *EMBO reports* 16, 1620-1639. <https://doi.org/10.15252/embr.201541113>.
10. López-Tobón, A., Shyti, R., Villa, C.E., Cheroni, C., Fuentes-Bravo, P., Trattaro, S., Caporale, N., Troglio, F., Tenderini, E., Mihailovich, M., et al. (2023). GTF2I dosage regulates neuronal differentiation and social behavior in 7q11.23 neurodevelopmental disorders. *Science advances*, 9, eadh2726. <https://doi.org/10.1126/sciadv.adh2726>.
11. Maes, T., Mascaró, C., Rotllant, D., Lufino, M.M.P., Estiarte, A., Guibourt, N., Cavalcanti, F., Griñan-Ferré, C., Pallàs, M., Nadal, R., et al. (2020). Modulation of KDM1A with vafidemstat rescues memory deficit and behavioral alterations. *PLOS ONE* 15, e0233468. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0233468>.
12. Damase, T.R., Sukhovshin, R., Boada, C., Taraballi, F., Pettigrew, R.I., and Cooke, J.P. (2021). The Limitless Future of RNA Therapeutics. *Frontiers in bioengineering and biotechnology. Frontiers in bioengineering and biotechnology*, 9, 628137.
13. Schröder, S., Fuchs, U., Gisa, V., Pena, T., Krüger, D.M., Hempel, N., Burkhardt, S., Salinas, G., Schütz, A.L., Delalle, I., et al. (2024). PRDM16-DT: A Brain and Astrocyte-Specific lncRNA Implicated in Alzheimer's Disease. *Acta Neuropathol.* 148, 32.
14. Schröder, S., Sakib, M.S., Krüger, D.M., Pena, T., Burkhardt, S., Schütz, A.L., Sananbenesi, F., and Fischer, A. (2025). lncRNA 3222401L13Rik Is Upregulated in

- Aging Astrocytes and Regulates Neuronal Support Function Through Interaction with Npas3. *Non-coding RNA* 11, 2. <https://doi.org/10.3390/ncrna11010002>.
15. Kaurani, L., Pradhan, R., Schröder, S., Burkhardt, S., Schuetz, A.L., Krüger, D.M., Pena, T., Heutink, P., Sananbenesi, F., and Fischer, A. (2025). A role for astrocytic miR-129-5p in frontotemporal dementia. *Translational psychiatry* 15, 142. <https://doi.org/10.1038/s41398-025-03338-y>.
 16. Winkle, M., El-Daly, S.M., Fabbri, M., and Calin, G.A. (2021). Noncoding RNA therapeutics - challenges and potential solutions. *Nat Rev Drug Discov.* 20, 629-651.
 17. K., K.Y. (2022). RNA therapy: rich history, various applications and unlimited future prospects. *Experimental & molecular medicine* 54, 455-465. <https://doi.org/10.1038/s12276-022-00757-5>.
 18. Kerimoglu, C., Sakib, M.S., Jain, G., Benito, E., Burkhardt, S., Capece, V., Kaurani, L., Halder, R., Agís-Balboa, R.C., Stilling, R., et al. (2017). KMT2A and KMT2B Mediate Memory Function by Affecting Distinct Genomic Regions. *Cell reports* 20, 538-548.
 19. Hiraide, T., Nakashima, M., Yamoto, K., Fukuda, T., Kato, M., Ikeda, H., Sugie, Y., Aoto, K., Kaname, T., Nakabayashi, K., et al. (2018). De novo variants in SETD1B are associated with intellectual disability, epilepsy and autism. *Hum Genet.* 137, 95-104.
 20. Labonne, J.D., Lee, K.H., Iwase, S., Kong, I.K., Diamond, M.P., Layman, L.C., Kim, C.H., and Kim, H.G. (2016). An atypical 12q24.31 microdeletion implicates six genes including a histone demethylase KDM2B and a histone methyltransferase SETD1B in syndromic intellectual disability. *Hum Genet.* 135, 757-771.
 21. Roston, A., Evans, D., Gill, H., McKinnon, M., Isidor, B., Cogné, B., Mwenifumbo, J., van Karnebeek, C., An, J., Jones, S.J.M., et al. (2020). SETD1B-associated neurodevelopmental disorder. *J Med Genet.* 58, 196-204.
 22. Weerts, M.J.A., Lanko, K., Guzmán-Vega, F.J., Jackson, A., Ramakrishnan, R., Cardona-Londoño, K.J., Peña-Guerra, K.A., van Bever, Y., van Paassen, B.W., Kievit, A., et al. (2012). Delineating the molecular and phenotypic spectrum of the SETD1B-related syndrome. *Genetics in medicine* 23, 2122–2137. <https://doi.org/10.1038/s41436-021-01246-2>.
 23. Kaurani, L., Islam, M.R., Heilbronner, U., Krüger, D.M., Zhou, J., Methi, A., Strauss, J., Pradhan, R., Schröder, S., Burkhardt, S., et al. (2024). Regulation of Zbp1 by miR-99b-5p in microglia controls the development of schizophrenia-like symptoms in mice. *The EMBO journal, Advance online publication*, 10.1038/s44318-44024-00067-44318.