

Wirkstoffentwicklung

Psychiatrische Erkrankungen mit Stammzelltechnologien verstehen

RICARDA STOCK, HANSJÜRGEN VOLKMER

NATURWISSENSCHAFTLICHES UND MEDIZINISCHES INSTITUT AN DER UNIVERSITÄT TÜBINGEN, REUTLINGEN

It is a challenge to establish and use model systems for the study of complex neuropsychiatric diseases such as schizophrenia (SZ) and autism spectrum disorder (ASD). The development of induced pluripotent stem cell (iPSC) technologies now offers a promising approach which faithfully represents the varying genetic background of individual patients. Phenotypic analysis of iPSC-derived neurons reveals differences at the level of transcriptomes and calcium signalling allowing for a specific discrimination between SZ and ASD phenotypes.

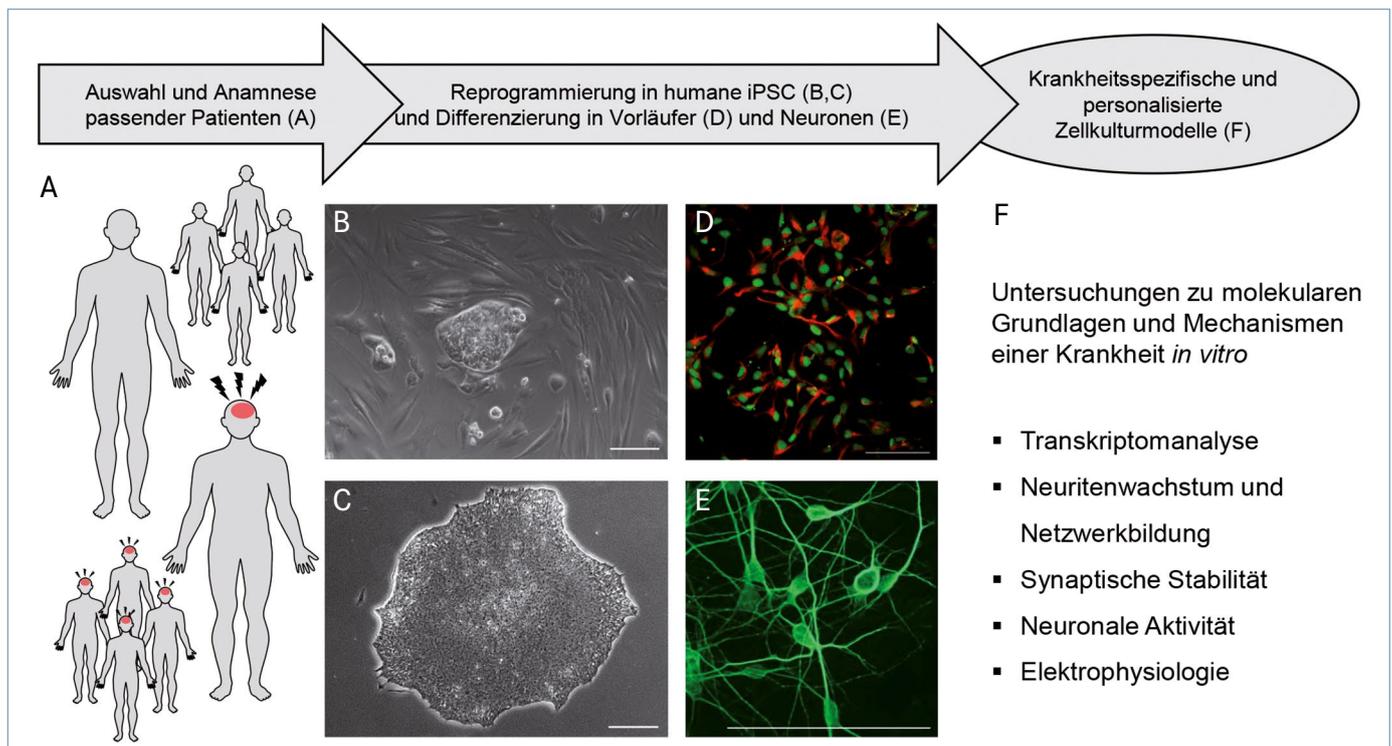
DOI: 10.1007/s12268-020-1321-6
© Springer-Verlag GmbH 2020

■ Schizophrenie ist eine psychische Erkrankung, die in der Pubertät und im frühen Erwachsenenalter auftritt, während die ersten Symptome von Autisten im frühen Kindesalter beobachtbar sind. Beide Erkrankungen sind höchst heterogen, sodass zugrunde

liegende individuelle Unterschiede personalisierte Ansätze erfordern. Ein wesentlicher Fortschritt wurde durch die Herstellung von humanen pluripotenten Stammzellen aus somatischen Zellen erreicht. Sie erlauben die Charakterisierung patientenspezifischer Nervenzellen, die das individuelle genetische Repertoire widerspiegeln (Abb. 1).

Transkriptome neuropsychiatrischer Modelle

Eine wichtige Möglichkeit, in einem *in vitro*-System Proben verschiedener Probanden zu unterscheiden, ist die Transkriptomanalyse. Eine vergleichende Transkriptomanalyse zwischen iPSC (*induced pluripotent stem cell*)-Neuronen aus gesunden und erkrankten Probanden erlaubte eine eindeutige Abgrenzung von Patienten mit Schizophrenie (SZ) von denen mit ASD (*autism spectrum disorder*) [1].



▲ **Abb. 1:** Übersicht Ablauf der iPSC-Generierung und Analyse. **A**, Entnahme von somatischen Zellen von genau diagnostizierten Patienten. **B,C** iPSC-Kolonien auf einem Fibroblastenrasen (**B**) und einem Matrigelsubstrat (**C**). **D**, iPSC-abgeleitete neuronale Vorläufer werden mit Nestin (rot)- und Sox1 (grün)-Färbungen detektiert. **E**, MAP2-positive Neurone. Maßstab 100 µm. **F**, Beispielhafte Analysemethoden.

Ein deregulierter WNT-Signalweg, ein reproduziertes Merkmal von SZ-Patienten [2], konnte anhand der Expression von *LEF1* in zwei verschiedenen Arbeiten beobachtet werden [1, 3]. In beiden Arbeiten wurden zusätzlich *DCT* und *SPOCK3* als deregulierte Gene identifiziert. Der Vergleich der Transkriptome von iPSC-Neuronen aus genetisch nicht charakterisierten Patienten mit solchen mit Timothy-Syndrom zeigte eine übereinstimmende Deregulation des Gens *IFITM2* (*interferon induced transmembrane protein 2*) [1, 4].

Neuritenlängen und synaptische Verbindungen

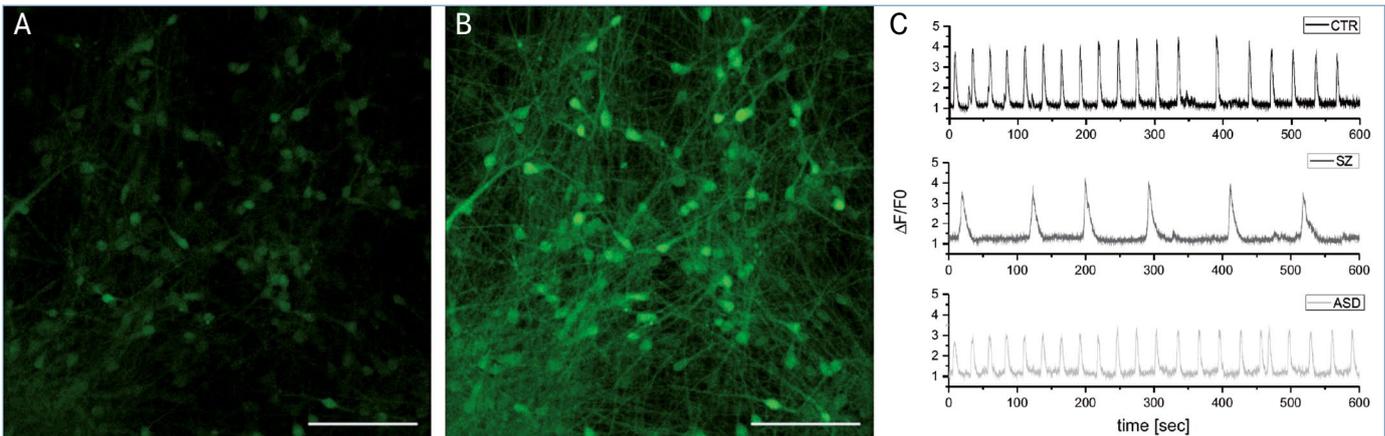
Schizophrenie und ASD werden als Entwicklungsstörungen des Nervensystems interpretiert, die möglicherweise mit reduziertem Neuritenwachstum und verminderter Synaptogenese von iPSC-abgeleiteten Neuronen *in vitro* korrelieren. Hier ergab die Mehrzahl der Studien mit SZ-Neuronen von genetisch nicht definierten Probanden eine Reduktion der Neuritenlängen [1, 3, 5]. Interessanterweise waren die Neuriten von dopaminergen Neuronen deutlich kürzer als diejenigen cortical differenzierter Neurone [5]. Im Gegensatz dazu waren mit cortical differenzierten Neuronen aus Patienten mit einer *DISC1*-Mutation, einem monogenetischen Modell für Schizophrenie, keine Unterschiede zu beobachten [6]. Ebenso wie im Falle von Schizophrenie war auch für ASD-Neuronen eine Reduktion der Neuritenlängen ersichtlich, die sowohl aus Patienten mit *FXS*-Mutationen als auch aus nicht genetisch charakterisierten Patienten reprogrammiert worden sind [1, 7]. Die Dichte synaptischer Markerproteine auf Neuriten wird als Maß für die Synaptogenese herangezogen. Cortical ausdifferenzierte SZ-Neuronen zeigten eine reduzierte Synapsendichte in iPSC-Neuronen mit einer *DISC1*-Mutation [6], eine Reduktion der synaptischen Konnektivität [3] und der Dichte von postsynaptischen Markerproteinen [1]. Für ASD

wurden Modelle für das Phelan-McDermid- und das Rett-Syndrom herangezogen, die in cortical differenzierten Neuronen eine Reduktion exzitatorischer synaptischer Marker in den Patientenproben aufwiesen [8, 9]. Dies deckt sich mit Ergebnissen aus der Untersuchung von iPSC-Neuronen einer weiteren Kohorte von ASD-Patienten [1]. Insgesamt weisen die Befunde darauf hin, dass die Modelle die entwicklungsabhängigen Defekte neuropsychiatrischer Erkrankungen

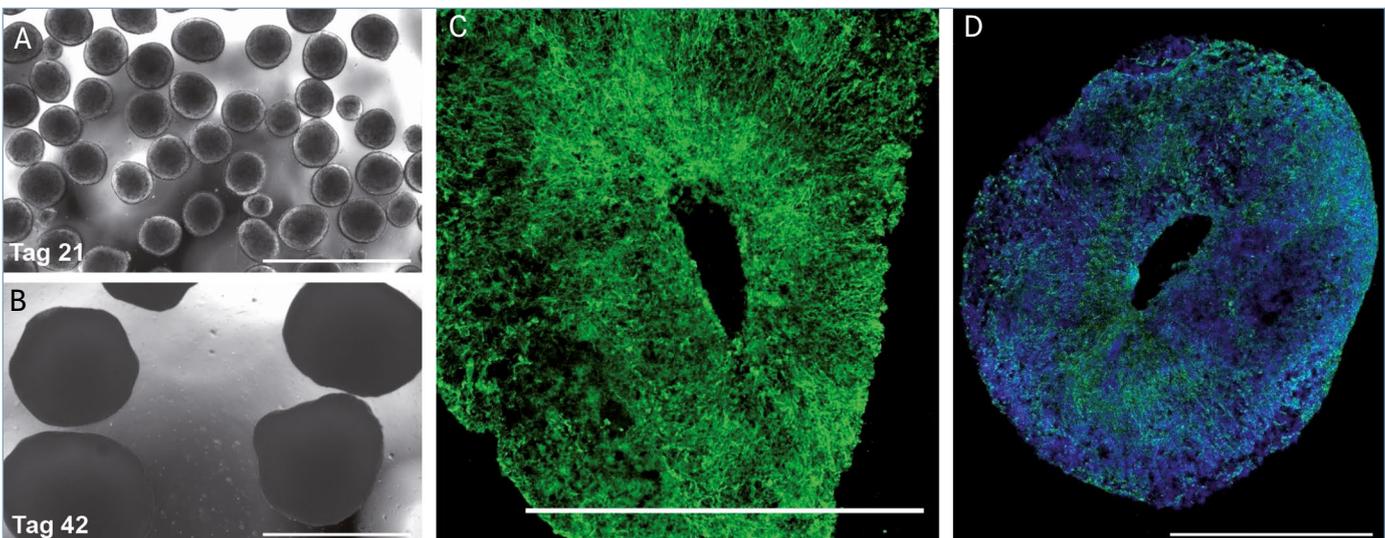
widerspiegeln, jedoch Schizophrenie und ASD nicht voneinander unterscheiden.

Neuronale Aktivität

Entwicklungsbedingte Störungen der Synapsenbildung lassen vermuten, dass die neuronale Signalübertragung in Schizophrenie- und ASD-Patienten gestört ist. Die neuronale Aktivität wurde mit der Messung elektrophysiologischer Parameter oder der Analyse dynamischer Veränderungen von intrazellu-



▲ **Abb. 2:** Die Aktivität neuronaler Netzwerke kann mithilfe Calcium-sensitiver Farbstoffe (Ca_v2, grün) nachgewiesen werden. **A,** Während einer Ruhephase ist die Fluoreszenz des Farbstoffes gering. **B,** Synchroner Calciumstrom in neuronalen Netzwerken erhöht das Fluoreszenzsignal. Maßstab: 100 μ m. **C,** Unterschiedliche Calciumsignale in Neuronen von einem gesunden Probanden (CTR) sowie Patienten mit Schizophrenie (SZ) und ASD (autism spectrum disorder).



▲ **Abb. 3:** Gehirnganoide **A, B,** Aus induzierten pluripotenten Stammzellen (iPSC) generierte Organoide an Tag 21 (**A**) und Tag 42 (**B**) in Kultur. **C,** MAP2-gefärbte Kryoschnitte der Organoide identifizieren radial auswachsende Neuriten in Grün. **D,** Darstellung zur Übersicht eines Organoids mit vernetzten Neuronen (grün) und Zellkernen (blau). Maßstab: 1 mm.

lären Calciumkonzentrationen bestimmt (**Abb. 2**). Untersuchungen an iPSC-Neuronen von Patienten mit ASD (Rett-Syndrom) zeigten eine Reduktion der Frequenz von Calciumsignalen [8], während anhand genetisch nicht charakterisierter Proben in einer anderen Studie diesbezüglich keine signifikanten Unterschiede verzeichnet wurden [1]. Letztere Untersuchung hingegen wies eine reduzierte Amplitude auf. Somit scheint es von spezifischen Patientenkohorten abzuhängen, ob und wie Calciumsignale moduliert werden. Im Falle der Schizophrenie sind die Ergebnisse ebenfalls uneinheitlich. In einer früheren Publikation werden keine Veränderungen der Calciumsignale berichtet [3], während später eine Verminderung der Peakfrequenz und eine Vergrößerung der

Fläche unter den Kurven der Peaksignale beobachtet wurden [1]. Insbesondere im direkten Vergleich zwischen SZ- und ASD-Neuronen ließ sich feststellen, dass die Analyse von Calciumsignalen dazu beitragen kann, die Neurone genau diagnostizierter Patienten mit Schizophrenie oder ASD *in vitro* zu unterscheiden [1].

Elektrophysiologische Ableitungen an iPSC-Neuronen aus genetisch nicht näher charakterisierten Schizophrenie-Spendern zeigten keine Unterschiede im Vergleich zu Kontrollen aus gesunden Probanden [3]. In iPSC-Neuronen mit einer Mutation in DISC1 hingegen wurde eine Reduktion spontaner synaptischer Potenziale bei gleichbleibender Amplitude beobachtet. Dies wurde als präsynaptischer Defekt interpretiert [6]. In den

ASD-Modellen für Phelan-McDermid- und Rett-Syndrom äußerte sich die Reduktion der Synapsendichte in einer verminderten Frequenz und Amplitude von spontanen exzitatorischen postsynaptischen Potenzialen. Die Aktivität inhibitorischer Synapsen blieb jeweils unverändert [8, 9]. Vergleichende elektrophysiologische Studien mit SZ- und ASD-Proben stehen jedoch noch aus.

Neue Ansätze mit Gehirnganoiden

Gehirnganoide eröffnen die Möglichkeit, iPSC als 3D-Strukturen wachsen und differenzieren zu lassen, die die Morphologie und Verschaltung von Neuronen besser reproduzieren als die planaren Kultursysteme (**Abb. 3**). Obwohl die Reproduzierbarkeit solcher Systeme stark verbessert wurde [10],

ist es zum gegenwärtigen Zeitpunkt schwierig, aussagekräftige funktionelle Studien durchzuführen. Daher beschränken sich viele Arbeiten auf immunhistologische oder Transkriptom-Vergleiche von Organoiden. In einem Modell für schweren idiopathischen Autismus zeigte sich eine Überaktivierung von Genen, die an der Steuerung des Zellzyklus, der neuronalen Differenzierung und der Synptogenese beteiligt sind. Insgesamt äußerte sich dies in einer Überproduktion GABAerger Neurone in der Entwicklung der Organoiden [11]. In Organoiden aus iPSC von Patienten mit Schizophrenie zeigte sich eine aberrante Zellmigration von proliferierenden neuronalen Vorläuferzellen, die eine reduzierte intracorticale Konnektivität verursachte [12].

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass Experimente mit Stammzell-abgeleiteten Neuronen verschiedene neuropsychiatrische Erkrankungen darstellen und unterscheiden lassen. Es besteht die Hoffnung, dass solche humanen Modelle, die die genetische Vielfalt der Patienten repräsentieren, bestehende Tiermodelle, z. B. für die Wirkstoffentwicklung, entscheidend ergänzen. ■

- [4] Pasca SP, Portmann T, Voineagu I et al. (2011) Using iPSC-derived neurons to uncover cellular phenotypes associated with Timothy syndrome. *Nat Med* 17:1657–1662
- [5] Robicsek O, Karry R, Petit I et al. (2013) Abnormal neuronal differentiation and mitochondrial dysfunction in hair follicle-derived induced pluripotent stem cells of schizophrenia patients. *Mol Psychiatry* 18:1067–1076
- [6] Wen Z, Nguyen HN, Guo Z et al. (2014) Synaptic dysregulation in a human iPSC cell model of mental disorders. *Nature* 515:414–418
- [7] Doers ME, Musser MT, Nichol R et al. (2014) iPSC-derived forebrain neurons from FXS individuals show defects in initial neurite outgrowth. *Stem Cells Dev* 23:1777–1787
- [8] Marchetto MC, Carroneu C, Acab A et al. (2010) A model for neural development and treatment of Rett syndrome using human induced pluripotent stem cells. *Cell* 143:527–539
- [9] Shcheglovitov A, Shcheglovitova O, Yazawa M et al. (2013) SHANK3 and IGF1 restore synaptic deficits in neurons from 22q13 deletion syndrome patients. *Nature* 503:267–271
- [10] Yoon SJ, Elahi LS, Pasca AM et al. (2019) Reliability of human cortical organoid generation. *Nat Methods* 16:75–78
- [11] Mariani J, Coppola G, Zhang P et al. (2015) FOXP1-dependent dysregulation of GABA/glutamate neuron differentiation in autism spectrum disorders. *Cell* 162:375–390
- [12] Stachowiak EK, Benson CA, Narla ST et al. (2017) Cerebral organoids reveal early cortical maldevelopment in schizophrenia-computational anatomy and genomics, role of FGFR1. *Transl Psychiatry* 7:6

Literatur

- [1] Grunwald LM, Stock R, Haag K et al. (2019) Comparative characterization of human induced pluripotent stem cells (hiPSC) derived from patients with schizophrenia and autism. *Transl Psychiatry* 9:179
- [2] Topol A, Zhu S, Tran N et al. (2015) Altered WNT signaling in human induced pluripotent stem cell neural progenitor cells derived from four schizophrenia patients. *Biol Psychiatry* 78:e29–e34
- [3] Brennand KJ, Simone A, Jou J et al. (2011) Modelling schizophrenia using human induced pluripotent stem cells. *Nature* 473:221–225

Korrespondenzadresse:

Ricarda Stock
 Prof. Dr. Hansjürgen Volkmer
 Molekulare Neurobiologie
 Naturwissenschaftliches und Medizinisches
 Institut an der Universität Tübingen
 Markwiesenstraße 55
 D-72770 Reutlingen
 Ricarda.stock@nmi.de
 volkmer@nmi.de

AUTOREN



Ricarda Stock

2015–2017 Masterstudium Molekulare Zellbiologie und Immunologie an der Universität Tübingen. Seit 2018 Promotionsstudium der Molekularen Neurobiologie am Naturwissenschaftlichen und Medizinischen Institut (NMI) an der Universität Tübingen, Reutlingen.



Hansjürgen Volkmer

1979–1989 Biologiestudium und Promotion an der Universität Tübingen. 1989–1993 Zentrum für Molekulare Neurobiologie, Hamburg. 1993–1997 Max-Delbrück-Centrum, Berlin-Buch. Seit 1998 Gruppenleiter und Bereichsleiter am Naturwissenschaftlichen und Medizinischen Institut (NMI) an der Universität Tübingen, Reutlingen.