

**Molekulare und zelluläre Auswirkungen einer Defizienz
des Schizophrenie-Suszeptibilitätsgens *Neuregulin 1*
auf die Ausbildung des frontalen Cortex der Maus**

Zur Erlangung des akademischen Grades eines

DOKTORS DER NATURWISSENSCHAFTEN

(Dr. rer. nat.)

von der KIT-Fakultät für Chemie und Biowissenschaften

des Karlsruher Instituts für Technologie (KIT)

genehmigte

DISSERTATION

von

M. Sc. Lukas Lachenmaier

1. Referent: Prof. Dr. Martin Bastmeyer

2. Referentin: Prof. Dr. Sylvia Erhardt

Tag der mündlichen Prüfung: 06.02.2024

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen Personen herzlich danken, die in den vergangenen Jahren, Monaten und Wochen zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Martin Bastmeyer und Dr. Franco Weth, die mir die Möglichkeit gegeben haben, mich intensiv mit wissenschaftlichen Fragestellungen auseinanderzusetzen. Von ihren praktischen und theoretischen Hilfestellungen, den fachlichen Diskussionen und ihrer Betreuung und Unterstützung habe ich sehr profitiert.

Prof. Dr. Sylvia Erhardt danke ich für die freundliche Übernahme des Korreferats.

Prof. Dr. Holger Puchta möchte ich für die Möglichkeit danken, ddPCR Experimente durchführen zu dürfen.

Meinen Kolleginnen und Kollegen danke ich herzlich für ihre Hilfsbereitschaft und die unterstützende Zusammenarbeit. Die Diskussionen und Rücksprachen und das Erarbeiten und Umsetzen von gemeinsamen Methoden, Ideen und Strategien haben mir immer große Freude bereitet.

Bei Nina Lapszies, Janina Breining, Tyra Magold und Nils Kirschner bedanke ich mich für ihre engagierte Mitarbeit am Neuregulin 1 Projekt.

Meinen Eltern Martina und Hubert und meiner Schwester Julia danke ich für ihre immerwährende Unterstützung, für ihren Zuspruch und ihr Interesse an dieser Arbeit.

Bei Lena möchte ich mich besonders für ihren Rückhalt, ihren Beistand und ihren Glauben an mich bedanken.

Selbstständigkeitserklärung

Der experimentelle Teil der vorliegenden Arbeit wurde von Juni 2019 bis Juni 2023 am Zoologischen Institut in der Abteilung für Zell- und Neurobiologie des Karlsruher Instituts für Technologie (KIT) durchgeführt.

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst und keine anderen Hilfsmittel als angegeben verwendet habe. Insbesondere versichere ich, dass ich alle wörtlichen und sinngemäßen Übernahmen aus anderen Werken als solche kenntlich gemacht habe. Die Satzung zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis am Karlsruher Institut für Technologie (KIT) habe ich in der gültigen Fassung beachtet. Diese Arbeit wurde in keiner Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt. Ich versichere außerdem, dass die beigelegte elektronische Version der Arbeit mit der schriftlichen Version der Arbeit übereinstimmt.

Datum, Ort

Unterschrift

Inhalt

1	Zusammenfassung	13
2	Einleitung	14
2.1	<i>Neuregulin 1</i>	14
2.2	<i>Nrg1-ErbB4 signaling</i> in embryonalen und adulten Gehirnen	14
2.3	Schizophrenie	17
2.4	Risikofaktoren genetische Einflüsse der Schizophrenie	18
2.5	Pathophysiologie der Schizophrenie	19
2.6	<i>Neuregulin 1</i> und Schizophrenie	22
2.7	Migration kortikaler Progenitoren und embryonale Cortikogenese	24
2.8	Strategie	28
3	Material	31
3.1	Geräte	31
3.2	Software und Webseiten	32
3.3	Chemikalien	32
3.4	Puffer und Lösungen	33
3.5	Verbrauchsmaterialien, Enzym-Kits und Nukleinsäure-Kits	34
3.6	Enzyme, Proteine und Antikörper	35
3.7	Nukleotide und Nukleinsäuren	36
3.8	Oligonukleotide	36
3.9	RNA <i>antisense</i> Sonden und Plasmidvektor	38
3.10	Versuchstiere	39
4	Methoden	40
4.1	Bioinformatische Prozessierung der <i>Microarray</i> -Datensätze	40
4.2	<i>Principal Component Analyse</i>	41
4.3	Berechnung der <i>weighted average difference</i> (WAD)	42
4.4	Identifikation signifikant deregulierter Gentranskripte	42

4.5	<i>Gene Enrichment</i> Analysen	43
4.6	Genotypisierung der Versuchstiere	43
4.7	Gewebepräparation embryonaler und postnataler Mausgehirne	44
4.8	Herstellung von Kryomikrotomschnitten	45
4.9	Extraktion totaler RNA	45
4.10	cDNA Synthese - Reverse Transkription.....	46
4.11	<i>Digital droplet</i> PCR (ddPCR)	47
4.13	<i>Template</i> -Klonierung und Transkription Hapten-markierter RNA-Sonden	50
4.14	Quantitative, multiplexierte, fluoreszente <i>in situ</i> Hybridisierung (qmFISH)	52
4.15	Auswertung und Quantifizierung der verschiedenen FISH Experimente	54
4.16	NDEL1 Immunpräzipitation und Acyl-Biotin Exchange (IP-ABE) von palmitoyliertem NDEL1	57
4.17	Anfertigung embryonaler Ventrikulärzonenexplantate des frontalen Cortex	61
4.18	Histologische und immunfluoreszente Färbungen von interstitiellen Neuronen in der weißen Substanz	64
5	Ergebnisse	67
5.1	<i>In silico</i> Analyse der <i>Microarray</i> -Datensätze	67
5.1.1	<i>Principal Component</i> Analyse	68
5.1.2	<i>Gene Enrichment</i> Analyse der <i>Principal Components</i>	70
5.1.3	<i>Gene Enrichment</i> Analyse differenziell exprimierter Gentranskripte	74
5.2	Genexpressionsanalysen auffällig deregulierter Gentranskripte.....	82
5.2.1	<i>Digital droplet</i> PCR Genexpressionsanalysen embryonaler Gehirnregionen	82
5.2.2	Quantitative multiplexierte fluoreszente <i>in situ</i> Hybridisierung (qmFISH)	85
5.3	NDEL1 ist im frontalen Cortex <i>Nrg1</i> defizienter Embryos hyperpalmitoyliert	88
5.4	Im frontalen Cortex <i>Nrg1</i> defizienter Embryos ist die Verteilung <i>Zdhhc2</i> positiver Zellen verändert.....	92
5.5	Radial migrierende, exzitatorische Progenitoren akkumulieren in der SVZ des frontalen Cortex <i>Nrg1</i> defizienter Embryos.....	94

5.6	Zelluläre Untersuchung der cortikalen radialen Migration in Explantatkulturen.....	96
5.6.1	Etablierung embryonaler Ventrikulärzonenexplantate des frontalen Cortex.....	96
5.6.2	Der heterozygote <i>Nrg1 knockout</i> beeinflusst die Orientierung des Centrosoms in radial migrierenden, exzitatorischen Progenitoren.....	98
5.7	Analyse cortikaler Schichtdicken in <i>Nrg1</i> defizienten P28 Mäusen	102
5.8	Analyse der Zellzahl von interstitiellen Neuronen in der weißen Substanz <i>Nrg1</i> defizienter Mäuse	106
6	Diskussion	110
6.1	Einfluss des heterozygoten <i>Nrg1 knockouts</i> auf das Transkriptom schizophrenierelevanter Gehirnregionen und Entwicklungsstadien.....	110
6.1.1	<i>Principal Component</i> Analysen und <i>Gene Enrichment</i> Analysen der <i>Principal</i> <i>Components</i>	112
6.1.2	<i>Gene Enrichment</i> Analysen signifikant deregulierter Gentranskripte	114
6.1.3	<i>Nrg1</i> beeinflusst die Expression eines Genclusters auf Chromosom 8.....	115
6.1.4	<i>Zdhhc2</i> ist in <i>Nrg1</i> defizienten Tieren dereguliert und wird von genomweiten Assoziationsstudien hochsignifikant mit Schizophrenie assoziiert	116
6.2	NDEL1 ist ein Substrat von ZDHHC2 und ist ein Schlüsselement eines Schizophrenie-assoziierten molekularen Mechanismus.....	117
6.3	NDEL1 und die Migration neuronaler Progenitoren.....	120
6.4	Einfluss der NDEL1 Palmitoylierung auf die Kopplung und Ausrichtung des Centrosoms zum Nucleus.....	123
6.5	Einfluss des embryonalen Migrationsdefizits auf die Ausbildung cortikaler Schichten in <i>Nrg1</i> defizienten Mäusen	126
6.6	Einfluss des heterozygoten <i>Nrg1 knockouts</i> auf interstitielle Neuronen der weißen Substanz	128
7	Anhang	133

8	Verzeichnisse	134
8.1	Abkürzungsverzeichnis	134
8.2	Abbildungsverzeichnis	136
8.3	Tabellenverzeichnis	137
8.4	Literaturverzeichnis.....	138

1 Zusammenfassung

Schizophrenie ist eine schwerwiegende psychiatrische Erkrankung die größtenteils auf polygenen und heterogenen Gendefekten beruht. Aufgrund der Komplexität sind trotz umfangreicher genomweiter Studien die molekularen und zellulären Schlüsselprozesse der Ethologie der Schizophrenie bis heute nicht identifiziert. *Neuregulin 1* ist ein Schizophrenie Suszeptibilitätsgen. Es ist bekannt, dass es durch bidirektionales *signaling* mit *ErbB*-Rezeptoren in embryonalen und adulten Gehirnen an neuronaler Migration, Axonlenkung, sowie der Ausbildung und Plastizität von Synapsen beteiligt ist. Die tatsächlichen Auswirkungen leichter *Nrg1*-Deregulationen, wie sie im Gehirn Erkrankter gefunden werden, ist jedoch bislang unklar. In der vorliegenden Arbeit wurde daher der Einfluss einer heterozygoten *Nrg1*-Deletion auf das Gehirntranskriptom von Mäusen unvoreingenommen untersucht. Dazu wurde das Transkriptom von vier Gehirnregionen in zwei Entwicklungsstadien ausführlich mit Microarrays analysiert. Der frontale Cortex und der anteriore Thalamus dienen dabei als schizophrenierelevante Gehirnregionen, der somatosensorische Cortex und der posteriore Thalamus als Negativ-Kontrollregionen. Die Entwicklungsstadien E15.5 und P28 repräsentieren Zeitpunkte, die mit der Entstehung und Manifestation von Schizophrenie korrelieren.

Principal Component Analysen und *Gene Enrichment* Analysen der Datensätze offenbaren, dass der heterozygote *Nrg1 knockout* das embryonale frontale System, insbesondere den Frontalcortex am meisten beeinflusst. Im Frontalcortex beeinträchtigt *Nrg1* am stärksten den intrazellulären (Protein)Transport und die Organisation des Zytoskeletts, im anterioren Thalamus die Projektion von Neuronen. Es zeigt sich, dass im frontalen Cortex *Nrg1* defizienter Embryos *Zdhhc2* überexprimiert wird, eine Palmitoyltransferase, die mit genomweiter Signifikanz mit Schizophrenie assoziiert ist und NDEL1 palmitoyliert. NDEL1 ist ein aktivierendes Dynein Adapterprotein, dessen Palmitoylierung die Bindung an Dynein inhibiert. Die Überexpression von *Zdhhc2* führt tatsächlich zu einer Hyperpalmitoylierung von NDEL1 im frontalen Cortex von *Nrg1*^{+/-} Embryos. Gleichzeitig führt der heterozygote *Nrg1 knockout* zu einem Migrationsdefizit in radial migrierenden Progenitoren, die im Bereich der Subventrikulärzone akkumulieren. Dabei ist ihr Centrosom durchschnittlich weniger basal ausgerichtet, wodurch die directionale Persistenz ihrer Migration beeinträchtigt wird. Dies ist mechanistisch konsistent mit der verstärkten NDEL1 Palmitoylierung. In adulten Tieren beeinflusst das Migrationsdefizit die Ausbildung der cortikalen Schichten. In Schicht V sind *Er81*-positive, langreichweitige intracortikale exzitatorische Neuronen abgereichert und in der weißen Substanz NOS-positive, langreichweitige inhibitorische interstitielle Neurone angereichert. Die dadurch zu erwartende exzitatorische / inhibitorische Imbalance intracortikaler assoziativer Verbindungen ist ein suggestiver Mechanismus, der Symptomen der Krankheit zugrunde liegen könnte.

2 Einleitung

2.1 *Neuregulin 1*

Neuregulin 1 (Nrg1) liegt auf Chromosom 8 und codiert einen trophischen Faktor, der während der embryonalen Gehirnentwicklung und in adulten Gehirnen fundamentale neurobiologische Prozesse reguliert. Im humanen Genom besteht *Nrg1* aus über 20 Exons und großen intronischen Regionen, sodass durch alternatives Spleißen über 30 verschiedene *Nrg1* Isoformen produziert werden können (Abb. 1A, Abb. 2). Anhand ihrer spezifischen N-terminalen Sequenzen, lassen sich die verschiedenen *Nrg1* Isoformen in sechs Untergruppen (NRG1 I-VI) einteilen. Die NRG1 Isoformen der Untergruppen I, II, IV und V enthalten Immunoglobulin (Ig) *like* Domänen und werden als Ig-NRG1 definiert. Typ III NRG1 besitzt eine cysteinreiche Domäne (CRD) sowie eine zusätzliche, N-terminale Transmembrandomäne (TMn). Aufgrund der CRD-Domäne wird NRG1 Typ III auch als CRD-NRG1 bezeichnet. Die EGF-*like* Domäne ist in allen NRG1 Isoformen enthalten und ist notwendig für die Interaktion von NRG1 mit den EGF-Rezeptor-Tyrosinkinasen ERBB3 und ERBB4. NRG1 Proteine werden in der Regel als vorläufige Transmembranproteine (Pro-NRG1) synthetisiert, die durch extrazelluläre proteolytische Spaltung von Proteasen (u.a. BACE1, ADAM17, ADAM19) aktiviert werden (Abb. 1B). Aufgrund ihrer zweiten Transmembrandomäne bleiben NRG1 Typ III Proteine in der Membran verankert und signalisieren als membranständige Proteine. Die restlichen NRG1 Isoformen werden durch die Proteolyse in den extrazellulären Raum sekretiert, sodass NRG1 als membrangebundener und löslicher Wachstumsfaktor parakrin und juxtrakrin wirken kann (Falls 2003; Mei und Xiong 2008; Mostaid et al. 2016).

2.2 *Nrg1-ErbB4 signaling in embryonalen und adulten Gehirnen*

NRG1 interagiert über die EGF-*like* Domäne mit den Rezeptor-Tyrosinkinasen ERBB3 und ERBB4. Die Interaktion von NRG1 und ERBB Rezeptoren führt zur hetero- und homo-Dimerisierung der Rezeptor-Tyrosinkinasen. Dabei zeigt sich, dass ERBB3 Homodimere katalytisch inaktiv sind und ERBB3 durch die Ausbildung von Heterodimeren lediglich als Corezeptor agieren kann. Entsprechend kann ERBB4 als primärer NRG1 Interaktionspartner bezeichnet werden, der effizientes *Nrg1-ErbB4 signaling* ermöglicht (Mei und Xiong 2008). Die Bindung von NRG1 und ERBB4 führt zu diversen Signalkaskaden, die im Wesentlichen die Transkription und Translation spezifischer zellulärer Programme beeinflussen. Die Signalübertragung erfolgt bidirektional, sodass der Rezeptor-Ligand-Komplex durch *forward* und *reverse signaling* wirken kann (Mei und Nave 2014).

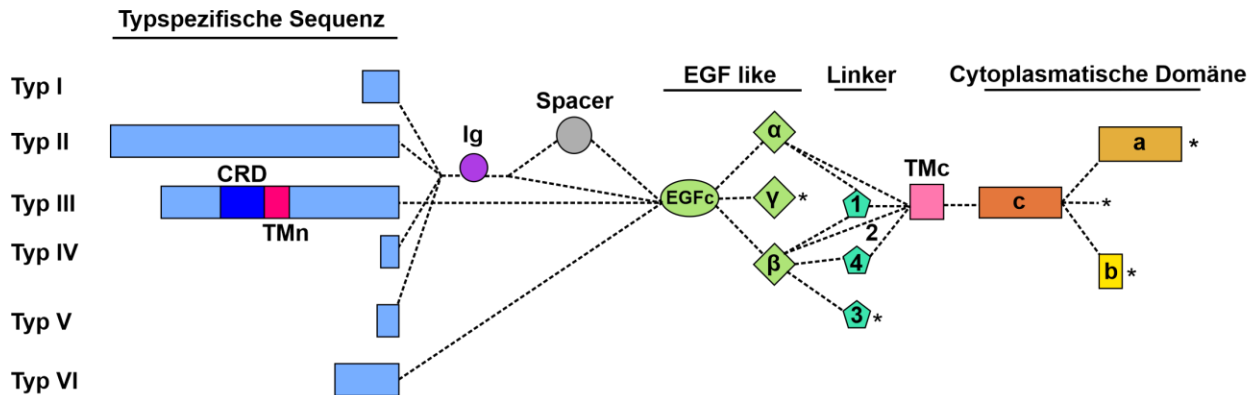
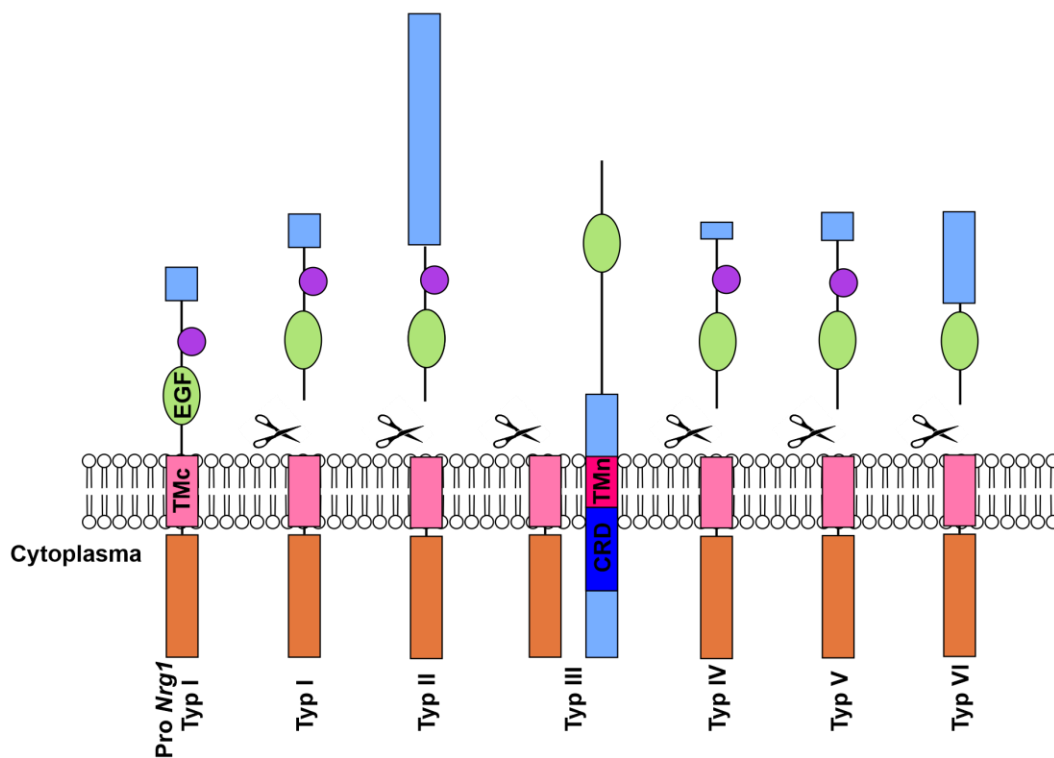
A**B**

Abbildung 1: A: Proteinstruktur und Zusammensetzung verschiedener Neuregulin 1 Typen und Isoformen
 Anhand ihrer N-terminalen, typspezifischen Sequenz (hellblau), lassen sich Nrg1 Proteine in sechs Untergruppen einteilen (Nrg1 Typ I-VI). In der typspezifischen Sequenz von Nrg1 Typ III befindet sich eine cysteinreiche Domäne (CRD, dunkelblau), die eine zusätzliche N-terminale Transmembrandomäne (TMn, pink) enthält. Die EGF Domäne (grün) ist in allen Nrg1 Isoformen enthalten und ist notwendig für die Interaktion von Nrg1 mit Erbb3 und Erbb4. Nrg1 Typ I, II, IV und V enthalten Immunoglobulin Domänen (Ig, lila), die mit oder ohne Spacer (grau) zwischen der N-terminalen Sequenz und der EGF Domäne angeordnet sind. Durch Splicing der Linker (türkis)- und C-terminalen Domänen (braun, gelb, ocker) entstehen weitere Nrg1 Isoformen. Die C-terminale Transmembrandomäne (TMC, rosa) ist wie die EGF Domäne in allen Nrg1 Proteinen enthalten. **B: Enzymatische Aktivierung und Sekretion von Neuregulin 1.** Nrg1 Proteine werden als vorläufige Transmembranproteine (Pro-Nrg1) synthetisiert. Die Aktivierung der Nrg1 Vorläuferproteine erfolgt durch die extrazelluläre proteolytische Spaltung von Proteasen (Schere). Durch die Proteolyse werden Nrg1 Typ I, II, IV, V und VI in den extrazellulären Raum sekretiert, wo sie als löslicher Wachstumsfaktor wirken. Aufgrund ihrer zweiten Transmembrandomäne (TMn) bleiben Nrg1 Typ III Proteine in der Membran verankert und signalisieren als membranständige Proteine. Die gestrichelten Linien stellen Splicing Varianten verschiedener Nrg1 Isoformen dar. Die Schere repräsentiert verschiedene Proteasen (u.a. BACE1, ADAM17, ADAM19). *Sterne bilden Stopcodons ab. Abbildung modifiziert nach Mei and Xiong (2008)

In Mäusen wird *ErbB4* ab dem 13. Embryonaltag in der medialen ganglionischen Eminenz (MGE) exprimiert (Yau et al. 2003; Flames et al. 2004). Aus den neuronalen Progenitoren der MGE entstehen Somatostatin- (SST) und Parvalbumin- (PV) positive Interneuronen, die tangential aus dem ventralen Telencephalon in den embryonalen Cortex wandern. Ausgehend von der MGE, migrieren die inhibitorischen Vorläufer durch einen Korridor zwischen der lateralen ganglionischen Eminenz (LGE) und dem sich bildenden Striatum. Dieser Migrationskorridor wird durch verschiedene NRG1 Isoformen beeinflusst, die unterschiedlich auf die migrierende Zellpopulation wirken. NRG1 Typ I und II wirken als lösliche, attraktive Liganden im Cortex, während NRG1 Typ III im Striatum als membrangebundener, permissiver Ligand einen Korridor für *ErbB4* exprimierende GABAerge Vorläufer schafft (Flames et al., 2004). In adulten Mäusen wird *ErbB4* überwiegend in PV-positiven Interneuronen exprimiert. Dort ist der Rezeptor im terminalen Axon und in der postsynaptischen Membran lokalisiert. Der *knockout* von *ErbB4* bzw. die Reduktion von *Nrg1-ErbB4 signaling* führt zu einer geringeren Anzahl GABAerger Interneuronen im embryonalen und postnatalen Cortex (Flames et al. 2004) und beeinflusst die Ausbildung von Axonen, Dendriten und Synapsen GABAerger Interneuronen (Fazzari et al. 2010; Del Pino et al. 2013). *Nrg1-ErbB4 signaling* induziert sowohl die Ausbildung von exzitatorischen Synapsen auf GABAerge Interneuronen als auch die Ausbildung von inhibitorischen Synapsen auf exzitatorische Pyramidenneuronen. Dadurch kontrollieren NRG1 und ERBB4 den GABAergen *input* und *output* der für die Balance zwischen Inhibition und Exzitation und für die Synchronisation neuronaler Netzwerke essentiell ist.

Darüber hinaus beeinflusst *Nrg1* auch die Migration exzitatorischer Progenitoren und die Ausbildung exzitatorischer Netzwerke. Der geschichtete Cortex entsteht durch exzitatorische Progenitoren, die in konsekutiven Wellen in der Ventrikulärzone geboren werden und radial in die kortikale Platte migrieren. Die Migration erfolgt entlang den basalen Zellfortsätzen von Radialglia Zellen, die den entstehenden Cortex vom Ventrikel bis zur Pia durchspannen. Radial migrierende Neuronen exprimieren diffusives NRG1, das sowohl die Migration der exzitatorischen Progenitoren, als auch den Auswuchs und die Stabilität der basalen Radialglia Zellfortsätze fördert (Anton et al. 1997). Postnatal erhöhen NRG1 und ERBB4 in exzitatorischen Pyramidenzellen die Ausbildung von synaptischen *spines* und stabilisieren postsynaptische Proteinstrukturen glutamaterger Synapsen (Barros et al. 2009). Nach bisherigem Kenntnisstand kontrollieren *Nrg1* und *ErbB4* demnach embryonale und postnatale Prozesse die für die Entstehung, Reifung und Stabilisierung lokaler inhibitorischer und exzitatorischer Netzwerke essentiell sind.

2.3 Schizophrenie

Schizophrenie ist eine schwerwiegende, psychiatrische Erkrankung die ca. 1% der Weltbevölkerung mindestens einmal im Leben (Lebenszeitprävalenz) betrifft. Die Krankheit manifestiert sich in gestörten kognitiven und emotionalen Prozessen vielfältiger Art. Üblicherweise werden die Symptome in Positivsymptome (Halluzinationen, Wahnvorstellungen), Negativsymptome (Apathie, Antriebslosigkeit, Gefühlsverflachung, Sprachlosigkeit, sozialer Rückzug) sowie kognitiven Störungen (Störungen von Aufmerksamkeit, Konzentration und Arbeitsgedächtnis). Nicht alle Symptome treten bei allen Erkrankten und nicht in allen Phasen der Krankheit auf. Insbesondere in der Frühphase erleben viele schizophrene Patienten und Patientinnen psychotische Phasen mit akustischen Halluzinationen, Wahnvorstellungen und einem gestörten Ich-Empfinden, das zu einem Realitäts- und Identitätsverlust der Erkrankten führt (Kahn et al. 2015; Owen et al. 2016).

Die Punktprävalenz für Schizophrenie liegt bei 4.6 / 1000 Menschen und manifestiert sich in der Regel in der späten Pubertät oder dem frühen Erwachsenenalter. Die Therapie von Patienten und Patientinnen ist rein symptomatisch und beschränkt sich im Wesentlichen auf die Medikation mit antipsychotischen Neuroleptika und psychotherapeutische Maßnahmen. Psychotische Phasen und auftretende Positivsymptome können durch die Einstellung des dopaminergen Transmittersystems mittels der Neuroleptika relativ effektiv behandelt werden, während die Negativsymptome und kognitiven Beeinträchtigungen bis zum jetzigen Zeitpunkt nur schwer zu therapieren sind. Dies führt in der Regel zu einem chronischen Verlauf der Krankheit, der eine lebenslange medizinische und psychologische Betreuung notwendig macht. Die damit einhergehende soziale Isolation, die Unfähigkeit einer selbstständigen Lebensführung und die Erwerbsunfähigkeit beeinträchtigen die Lebensqualität schizophrener Patienten und Patientinnen erheblich. Die beschriebenen Faktoren führen zu einem zwölfmal erhöhten Suizidrisiko und verkürzen die durchschnittliche Lebenszeit von an Schizophrenie Erkrankten um zehn bis zwanzig Jahre (Kahn et al. 2015; Owen et al. 2016). Aufgrund dieser Tatsache ist es von großem humanem und gesellschaftlichem Interesse die Entstehung und Ausbildung der Schizophrenie weiter zu erforschen und dadurch neue, wirkungsvolle therapeutische Maßnahmen zu entwickeln, die die Ursachen der Krankheit rational adressieren.

2.4 Risikofaktoren genetische Einflüsse der Schizophrenie

Schizophrenie ist eine komplexe Erkrankung, deren Entstehung und Manifestation durch genetische und umweltbedingte Risikofaktoren begünstigt werden. Weltweit konstante Prävalenz- und Inzidenzraten und genetische Untersuchungen belegen, dass Schizophrenie eine genetische Krankheit ist, deren Erbllichkeit auf 80-85% geschätzt wird (Cardno und Gottesman 2000; Owen et al. 2016). Zusätzlich existieren umweltbedingte Risikofaktoren, die zur Entwicklung von Schizophrenie führen können. Maternale Infektionen werden im ersten und zweiten Drittel der Schwangerschaft mit einem signifikant erhöhten Schizophrenierisiko assoziiert (Estes und McAllister 2016). Von der Kindheit bis zur Adoleszenz können Cannabiskonsum, traumatische Erlebnisse, psychische und physische Gewalt zum Ausbruch der Krankheit führen (Kahn et al. 2015; Owen et al. 2016). Jedoch müssen die beschriebenen Faktoren eher als modulierende Faktoren verstanden werden, die bei der notwendigen genetischen Prädisposition einen gewissen Einfluss auf die Induktion, den Verlauf und die Ausprägung der Krankheit haben. In der *two hit* Hypothese (Bayer et al. 1999) wird die genetische Veranlagung als *first hit* bezeichnet. Umweltbedingte Risikofaktoren können als *second hit* modulierend und verstärkend auf genetische Defizite wirken und dadurch zur Ausprägung der Krankheit führen.

Die Entstehung von Schizophrenie wird wesentlich durch genetische Faktoren beeinflusst. Trotzdem konnte bis zum jetzigen Zeitpunkt kein Gen oder genetischer Locus mit einem pathophysiologischen Kernprozess assoziiert werden, der alleine hinreichend ist, die Entstehung und Manifestation der Krankheit zu erklären. Diese Aufgabe ist besonders herausfordernd da die Schizophrenie eine polygenetische und heterogenetische Krankheit ist. Durch eine Vielzahl von genetischen Kopplungsstudien (Badner und Gershon 2002; Lewis et al. 2003; Ng et al. 2009), genomweiten Assoziationsstudien (GWAS) und Sequenzierungsstudien (Schizophrenia Working Group of the Psychiatric Genomics Consortium 2014; Genovese et al. 2016; Singh et al. 2016; Li et al. 2017; Pardiñas et al. 2018; Singh et al. 2022; Trubetskoy et al. 2022; Owen et al. 2023) konnten mehrere hundert Schizophrenie Suszeptibilitätsgene identifiziert werden. Diese können jedoch mit wenigen Ausnahmen nur einen kleinen Anteil des genetischen Einflusses und phänotypischen Krankheitsbildes erklären. Neben polygenetischen Einflüssen wird die Suche nach Schizophrenie Suszeptibilitätsgenen zusätzlich durch heterogenetische und pleiotrope Geneffekte erschwert. Das bedeutet, dass verschiedene Kombinationen von genetischen Varianten zur Ausbildung von Schizophrenie führen können, und dass viele dieser Kandidatengene gleichzeitig mit der Ausbildung von bipolaren Störungen, Autismus, ADHS und Epilepsie assoziiert werden (Owen et al. 2016; Owen et al. 2023).

Aufgrund dieser Effekte können die bisher identifizierten Kandidatengene nur circa 40% der Erbllichkeit erklären, wovon nur ein kleiner Teil auf zuverlässig und reproduzierbar detektierte Loci zurückzuführen ist (Owen et al. 2023).

Bioinformatische Untersuchungen der Suszeptibilitätsgene auf ihre funktionellen Zugehörigkeiten legen dar, dass im Gehirn schizophrener Patienten und Patientinnen vor allem die Ausbildung, Funktion und Struktur von Synapsen beeinflusst wird. Darüber hinaus wird die Methylierung von Histonen und eine verstärkte neuronale Inflamationsreaktion mit dem Ausbruch der Krankheit assoziiert (The Network and Pathway Analysis Subgroup of the Psychiatric Genomics Consortium 2015; Trubetskoy et al. 2022; Owen et al. 2023). Die Struktur und Funktionalität von Synapsen sind essentiell für die Balance neuronaler Aktivität und die Ausbildung effizienter Netzwerke. Die verstärkte neuronale Inflamationsreaktion steht im Einklang mit der *overpruning* Hypothese, die besagt, dass im Gehirn schizophrener Patienten und Patientinnen in kritischen Phasen, in denen normalerweise nicht benötigte Synapsen aus neuronalen Netzwerk eliminiert werden, zu viele Synapsen durch Mikroglia Zellen entfernt werden (Sekar et al. 2016). Die Funktionalität von Synapsen und die mikrogliale Aktivität sind plausible Mechanismen, die der Manifestation von Schizophrenie zugrunde liegen könnten. Jedoch liegen der Entstehung der Krankheit neuroentwicklungsbiologische Defizite zugrunde, die von beiden Prozessen nicht erklärt werden können. Um die komplexen genetischen Einflüsse der Krankheit mechanistisch zu verstehen, ist ein besseres Verständnis der neuroentwicklungsbiologischen Grundlagen der Krankheit dringend notwendig. Dies könnte dazu beitragen, pathophysiologische Kernprozesse zu identifizieren, die sowohl die Ausbildung als auch die Manifestation von Schizophrenie erklären können.

2.5 Pathophysiologie der Schizophrenie

In den Gehirnen schizophrener Menschen lassen sich nur geringe und sehr variable pathologische Veränderungen nachweisen. Relativ konsistent, in Bezug auf das gesamte Gehirn, lässt sich eine Reduktion des Gehirnvolumens und eine Vergrößerung der Gehirnentrikel feststellen. Die Reduktion des Gehirnvolumens betrifft die graue Substanz etwas stärker als die weiße Substanz und lässt sich in Strukturen des Thalamus und Hippocampus, vor allem aber in (prä)frontalen und temporalen Arealen des Cortex nachweisen (van Haren et al. 2011; Haijma et al. 2013). Trotz der Volumenreduktionen führt Schizophrenie, im Gegensatz zu neurodegenerativen Krankheiten wie zum Beispiel Alzheimer, nicht zu neurodegenerativen Läsionen, Gliosen oder anderen Schädigungen von neuronalem Gewebe (Harrison 2000). Aufgrund dessen existiert bereits seit langer Zeit die Hypothese, dass Schizophrenie eine neuroentwicklungsbiologische Erkrankung ist (Weinberger 1987).

Neben den fehlenden Anzeichen von Neurodegeneration, wird die Hypothese dadurch gestützt, dass multiple Risikofaktoren während der Schwangerschaft das Risiko einer Schizophrenieerkrankung erhöhen. Zusätzlich legen vereinzelt delokalisierte Neuronen, die reduzierte Anzahl von Neuronen einzelner Zellpopulationen und dysfunktionale neuronale Netzwerke einen entwicklungsbiologischen Ursprung nahe. Einige dieser pathophysiologischen Auffälligkeiten werden im Folgenden näher beschrieben.

Funktionelle, pathologische und physiologische Untersuchungen belegen, dass der dorsolaterale Präfrontalcortex (dlPFC) bei schizophrenen Patienten und Patientinnen am stärksten betroffen ist. Der dlPFC ist bedeutend für höhere kognitive Leistungen und Exekutivfunktionen wie Planung, abstraktes Denken, kognitive Flexibilität und das Arbeitsgedächtnis. Im dlPFC erkrankter Menschen sind vereinzelte Neuronen delokalisiert und in der subkortikalen weißen Substanz angereichert (Akbarian et al. 1996). Die Zellkörper von Pyramidenzellen sind im dlPFC verkleinert. Gleichzeitig ist die Anzahl von Basaldendriten und synaptischen *spines* der exzitatorischen Neuronen reduziert (Weinberger et al. 2011). Neben exzitatorischen Neuronen werden auch Zellpopulationen inhibitorischer Neuronen durch die Krankheit beeinflusst. Parvalbumin (PV) positive Interneuronen sind im dlPFC und medial temporalen Cortex schizophrener Patientinnen und Patienten reduziert (Reynolds et al. 2002). Die Zellpopulation inhibitorischer Neuronen ist notwendig, um oszillatorische Aktivitätsmuster zu generieren und synchronisiert exzitatorische Netzwerke. Funktionale *Neuroimaging* Studien belegen, dass vor allem in den Frontal- und Temporallappen veränderte Aktivitätsmuster auftreten. So kann beispielsweise bei der Beanspruchung des Arbeitsgedächtnisses eine reduzierte Aktivität im dlPFC sowie eine gestörte Konnektivität zwischen dlPFC und Thalamus nachgewiesen werden (Woodward et al. 2012; Kahn et al. 2015). Der dlPFC wird vom Mediodorsalkern des Thalamus innerviert, dessen Neuronenzahl in schizophrenen Patienten und Patientinnen reduziert ist (Young et al. 2000). Die zellulären und funktionellen Defizite im dlPFC und dem Mediodorsalkern des Thalamus legen nahe, dass die intracortikale und thalamocortikale Konnektivität sowie die Synchronisation cortikaler Netzwerke bei Erkrankten beeinflusst wird. Durch Fehl Abläufe in der Neurogenese, Migration und Differenzierung von neuronalen Progenitoren können diese Defizite bereits während der embryonalen Gehirnentwicklung entstehen.

Molekular existiert vor allem Evidenz für den Einfluss verschiedener Neurotransmittersysteme und synaptischer Aktivität auf die Ausbildung von Schizophrenie. Dopamin ist ein modulierender Neurotransmitter, dessen Ungleichgewicht mit den Positivsymptomen von schizophrenen Patienten und Patientinnen assoziiert ist. Der Dopaminrezeptor DRD2 wurde mit genomweiter Signifikanz als Kandidatengen identifiziert (Schizophrenia Working Group of the Psychiatric Genomics Consortium 2014).

Zusätzlich reduziert die Blockade des Rezeptors die psychotischen Zustände von Patienten und Patientinnen, sodass die Betroffenheit des Dopaminsystems weitestgehend unumstritten ist. Die Negativsymptome und Defizite der kognitiven Leistungen können jedoch durch dopaminabhängige Prozesse nicht vollständig erklärt werden (Owen et al. 2016). Ein kausaler Zusammenhang zwischen dem Dopaminsystem und der Entstehung von Schizophrenie scheint deshalb eher unwahrscheinlich. Dopamin codiert sehr wahrscheinlich den *reward prediction error* im Gehirn, der für höhere kognitive Funktionen große Relevanz hat (Costa und Schoenbaum 2022). Es ist sehr plausibel, dass gestörte Netzwerke zu falschen Prädiktionen führen und das Dopaminsystem dadurch sekundär dereguliert wird.

Das glutamaterge System wird vor allem im Zusammenhang mit synaptischer Plastizität mit Schizophrenie assoziiert. NMDA- und AMPA Rezeptoren sind notwendig für die Signaltransduktion und die Detektion gleichzeitiger prä- und postsynaptischer Aktivität an exzitatorischen Synapsen. Langfristig werden ineffiziente Synapsen mit geringer prä- und postsynaptischer Aktivität degradiert. Synapsen mit hoher prä- und postsynaptischer Aktivität werden stabilisiert, wodurch synaptische Plastizität die Effizienz neuronaler Netzwerke entscheidend erhöht. Die NMDA- und AMPA Rezeptoren GRIN2A und GRIA3 erreichen in GWAS genomweite Signifikanz und untermauern eine Betroffenheit des exzitatorischen Transmittersystems in Schizophreniekranken (Owen et al. 2023). Zuletzt wird auch das inhibitorische, GABAerge Transmittersystem durch Schizophrenie beeinflusst. Die reduzierte Expression von GAD1 wurde in schizophrenen Patienten und Patientinnen mehrfach und konsistent nachgewiesen (Mitchell et al. 2015). GAD1 ist das Schlüsselenzym der GABA-Synthese und produziert bis zu 90% des inhibitorischen Transmitters. Entsprechend kann davon ausgegangen werden, dass die Menge von GABA im Gehirn von schizophrenen Menschen reduziert ist. Des Weiteren wird der GABA-Rezeptor GABBR2 mit genomweiter Signifikanz mit Schizophrenie assoziiert (Owen et al. 2023).

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die Anzahl, Lokalisation, Morphologie und Verdrahtung verschiedener inhibitorischer und exzitatorischer Neuronen in schizophrenen Patienten und Patientinnen beeinflusst wird. Diese Defizite können bereits während der Embryonalentwicklung entstehen und manifestieren sich im jungen Erwachsenenalter. Dort zeigt sich, dass Veränderungen der inhibitorischen, exzitatorischen und modulierenden Neurotransmittersysteme zu einem Ungleichgewicht von exzitatorischen und inhibitorischen Signalen führen. Dieses Ungleichgewicht schlägt sich in der fehlerhaften Ausbildung, Feinjustierung und Synchronisation verschiedener neuronaler Netzwerke nieder.

2.6 *Neuregulin 1* und Schizophrenie

Neuregulin 1 ist ein bekanntes Schizophrenie Kandidatengen, dessen Einfluss auf die Ausbildung der Krankheit schon länger erforscht wird. In Assoziationsstudien und Kopplungsstudien isländischer Patienten und Patientinnen, wurde *Nrg1* erstmals als Schizophrenie Suszeptibilitätsgen identifiziert (Stefansson et al. 2002). Der mit Schizophrenie assoziierte Haplotyp (HAP_{ICE}) liegt am 5' Ende des *Nrg1* Gens und verdoppelt das Risiko an Schizophrenie zu erkranken (Abb. 2). Seither wurde *Nrg1* in über 20 Assoziations- und Kopplungsstudien und in sechs Metastudien mit Schizophrenie assoziiert (Harrison und Law 2006; Mostaid et al. 2016). In den Studien sind signifikante Assoziationen für einzelne genetische Marker und Loci nur schwer zu reproduzieren. Jedoch liegt die Mehrheit der mit Schizophrenie assoziierten Marker in der Nähe des HAP_{ICE} Locus (Abb. 2). Diese Beobachtungen implizieren eine hohe Heterogenität von *Nrg1* Risikoallelen, die sich zwischen Individuen und Populationen verschiedener Ethnien unterscheiden und entsprechend inkonsistent detektiert werden. In modernen genomweiten Assoziationsstudien wurde *Nrg1* bis zum jetzigen Zeitpunkt nicht mit einem erhöhten Schizophrenierisiko assoziiert. Dies beruht möglicherweise auf der beschriebenen Allel-Heterogenität von *Nrg1*, wodurch eine hochsignifikante, genomweite Assoziation eines einzelnen genetischen Markers mit der Krankheit erschwert wird. Interessanterweise betrifft dieser Effekt neben *Nrg1* auch weitere, stark evidenzbasierte Schizophrenie Kandidatengene (Brandon et al. 2009) wie *DISC1* (*Disrupted in Schizophrenia 1*). Entsprechend kann davon ausgegangen werden, dass auch die modernen, sehr umfangreichen GWAS Studien bis heute nicht alle Schizophrenie Suszeptibilitätsgene identifizieren. Im Gegensatz zu früheren genetischen Studien werden GWAS Studien nicht mehr durch falsch positive Ergebnisse beeinträchtigt, jedoch können sie zu falsch negativen Ergebnissen führen. Neben den beschriebenen Kopplungs- und Assoziationsstudien, liegen weitere experimentelle und funktionelle Evidenzen vor, die einen Zusammenhang zwischen *Nrg1* und Schizophrenie unterstützen.

Die beschriebenen Funktionen von *Nrg1* (siehe 2.2) sind hypothetisch konsistent mit den pathophysiologischen Auffälligkeiten schizophrener Patientinnen und Patienten (siehe 2.5). Die strukturellen Defizite im Cortex und Thalamus, die reduzierte Anzahl von Parvalbumin positiven Interneuronen, die veränderte Morphologie exzitatorischer Neuronen und vereinzelt delokalisierte Neuronen könnten mit *Nrg1* in Verbindung gebracht werden. Darüber hinaus stehen die Hypofunktion des GABAergen Transmittersystems, gestörte thalamocortikale Projektionen und Dysbalancen der synaptischen Plastizität zumindest theoretisch in Einklang mit den molekularen Wirkungsmechanismen von *Nrg1*.

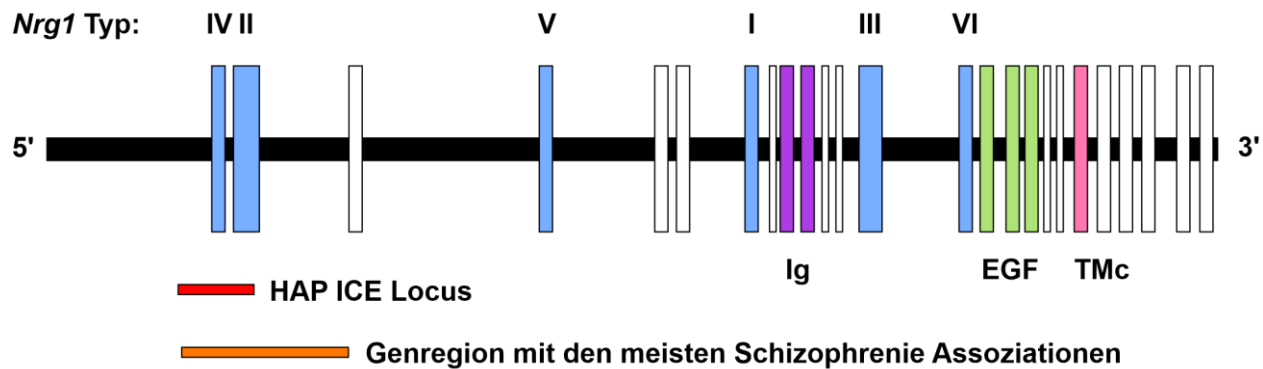


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Nrg1 Genstruktur mit Exons, Introns und Schizophrenie assoziierten Nrg1 Loci. Das humane Nrg1 Gen überspannt ca. 1.2 Megabasen (**schwarz**), besteht aus großen intronischen Regionen und enthält über 20 Exons. Exonische Regionen sind als vertikale Balken dargestellt. **Hellblaue** Exons repräsentieren die Sequenzbereiche, die die N-terminalen, typspezifischen Domänen codieren. **Lila** Exons codieren die Ig Domänen, **hellgrüne** Exons codieren die EGF Domänen und das **rosa** Exon die C-terminale Transmembrandomäne. **Hellgrau** dargestellte Sequenzbereiche codieren weitere, funktionell weniger relevante Proteindomänen. Der mit Schizophrenie assoziierte Haplotyp **HAP_{ICE}** (**rot**) liegt am 5' Ende des Nrg1 Gens und verdoppelt das Risiko an Schizophrenie zu erkranken. In weiteren genetischen Studien wurden viele Nrg1 Varianten identifiziert, die mit der Ausbildung von Schizophrenie assoziiert werden. Die Mehrheit dieser genetischen Marker liegt in einem Bereich am 5' Ende des Nrg1 Gens (**orange**) und überlappt mit dem HAP_{ICE} Locus. Abbildung modifiziert nach Mostaid et al. (2016).

Weitere Evidenz stammt aus *post mortem* Genexpressionsanalysen. Im dIPFC und Hippocampus schizophrener Personen wird Nrg1 Typ I verstärkt exprimiert (Hashimoto et al. 2004; Law et al. 2006), während Nrg1 Typ III im Hippocampus reduziert (Nicodemus et al. 2009) und im dIPFC verstärkt exprimiert wird (Weickert et al. 2012). Diese Deregulationen sind jedoch schwach. Interessanterweise können mehrere SNPs des HAP_{ICE} Locus mit der differentiellen Expression von verschiedenen Nrg1 Isoformen assoziiert werden, sodass eine Deregulation von Nrg1 durch genetische Variationen im HAP_{ICE} Locus wahrscheinlich ist (Mostaid et al. 2016).

Neben den beschriebenen Defiziten der neuronalen Migration, Projektion und Transmission, führt ein Ungleichgewicht der Nrg1 Signaltransduktion in Mäusen auch zu Verhaltensauffälligkeiten die mit Schizophrenie assoziiert werden können. Die Injektion von NRG1 führt zu einem erhöhtem Dopaminspiegel, einer reduzierten Präpulsinhibition und reduziertem sozialem Interesse an anderen Mäusen (Kato et al. 2011). Die Präpulsinhibition dient in Verhaltenstests als Indikator für die Prozessierung sensorischer Reize zu motorischen Antworten und wird mit Positivsymptomen schizophrener Patienten und Patientinnen assoziiert. Das reduzierte soziale Interesse an Artgenossen wird mit den Negativsymptomen schizophrener Personen assoziiert, die sich sozial isolieren. Defizite der Präpulsinhibition und sozialen Interaktion wurden in Nrg1 bzw. Erbb4 defizienten Tieren mehrfach nachgewiesen (O'Tuathaigh et al. 2014). Darüber hinaus ist das Arbeitsgedächtnis der Tiere eingeschränkt, das Erinnerungsvermögen reduziert und das Lernverhalten und die Aneignung neuer Verhaltensweisen beeinträchtigt (Stefansson et al. 2002;

Kato et al. 2011; Del Pino et al. 2013; Yin et al. 2013; Batista-Brito et al. 2017). Interessanterweise können einige der betroffenen Verhaltensweisen durch Clozapin beeinflusst werden. Clozapin ist ein antipsychotisches Medikament (Neuroleptikum), das in der Behandlung von Schizophrenie eingesetzt wird. Sowohl in *Nrg1* defizienten Tieren, als auch in *Nrg1* überexprimierenden Tieren, hat Clozapin einen positiven Effekt auf die soziale Interaktion mit Artgenossen, auf die sensorische Prozessierung und auf das Arbeitsgedächtnis der Tiere (Stefansson et al. 2002; Yin et al. 2013).

Nrg1 Risikoallele erhöhen die Wahrscheinlichkeit an Schizophrenie zu erkranken. Die Symptome von schizophrenen Patienten und Patientinnen lassen sich in Modellorganismen mit gestörtem *Nrg1 signaling* nachbilden. Starke *Nrg1 loss of function* und *gain of function* Mutationen führen zu Defiziten die konsistent sind mit den pathologischen Veränderungen erkrankter Personen. Bei Patienten und Patientinnen sind jedoch nur leichte Veränderungen der *Nrg1* Expression zu beobachten. Es steht deshalb noch aus, einen Kernprozess zu identifizieren, der durch schwache Veränderungen der *Nrg1* Expression verursacht wird und dadurch die Ausbildung und Manifestation von Schizophrenie tatsächlich begünstigt.

2.7 Migration kortikaler Progenitoren und embryonale Cortikogenese

Der cerebrale Cortex ist die größte funktionelle Einheit des menschlichen Gehirns und besteht aus vielen Milliarden Neuronen. Im Cortex bilden inhibitorische (20-30%) und exzitatorische Neuronen (70-80%) hochkomplexe Netzwerke aus. Die Funktionalität dieser Netzwerke hängt kritisch von anatomischen Verbindung und funktionellen Synchronisation einzelner Neuronen und verschiedener neuronaler Teilpopulationen ab, die morphologisch in sechs Cortexschichten angeordnet werden (Hippenmeyer 2014).

Die Entstehung der kortikalen Schichten ist ein strikt zeitabhängiger Prozess und beruht auf der präzisen Migration und Zielfindung neuronaler kortikaler Progenitoren. Inhibitorische Neuronen entstehen in den ganglionischen Eminenzen des ventralen Telencephalon und migrieren tangential in den entstehenden Cortex (Abb. 3A). Dabei migriert der Großteil der inhibitorischen Vorläufer durch die Marginalzone und die Subventrikulärzone, während eine kleine Zellpopulation inhibitorischer Neuronen durch die embryonale *subplate* in den Cortex migriert (Abb. 3B). Nach Abschluss der tangentialen Migration, ändern inhibitorische Neuronen ihr Migrationsverhalten und dringen durch radiale Migration in die kortikale Platte ein, um ihren Zielort zu erreichen (Marín 2013).

Exzitatorische Neuronen werden in der Ventrikulär- und Subventrikulärzone des dorsalen Telencephalons geboren (Abb. 3A) und migrieren radial entlang den Fortsätzen von Radialglia Zellen in die Cortexanlage (Franco und Müller 2013). In Mäusen dauert die Cortikogenese vom zehnten bis zum achtzehnten Embryonaltag (Abb. 3B), die höheren kortikalen Schichten werden

z.B. im Frontalcortex ab Embryonaltag 15.5 gebildet. Die ersten postmitotischen Neuronen migrieren von der Ventrikulärzone zur *Pia mater* und bilden die embryonale *preplate* aus. Die nächste Welle postmitotischer Neuronen migriert radial aus, teilt die *preplate* in die Marginalzone und die embryonale *subplate* und bildet dadurch die erste Zellschicht der cortikalen Platte. Anschließend dehnt sich die cortikale Platte durch konsequente Wellen radial migrierender Neuronen in vertikaler Richtung aus. Dabei folgt die Positionierung der Neuronen einem *inside out* Prinzip. Früh geborene Neuronen sind in den tiefen Schichten der cortikalen Platte lokalisiert, während später geborene Neuronen durch die tiefen Schichten migrieren und sich nach und nach in höheren Schichten positionieren (Abb. 3B). Heterochrone Transplantationsexperimente haben gezeigt, dass sich das Differenzierungspotential der Vorläufer dabei im Laufe der Entwicklungszeit immer weiter einschränkt (McConnell 1988). Aus den Neuronen der cortikalen Platte entstehen letztlich während der Neuritogenese die Cortexschichten II-VI, sodass die cortikalen Schichten von innen nach außen gebildet werden (Hippenmeyer 2014). Die *preplate* bzw. Marginalzone enthält Cajal-Retzius-Zellen und entwickelt sich im adulten Gehirn zu Cortexschicht I. Während der Cortikogenese sekretieren Cajal-Retzius-Zellen Reelin, ein wichtiges Signalmolekül, das die Migration der Zellen und die Ausbildung der Cortexschichten reguliert (Vílchez-Acosta et al. 2022). Neuronen der embryonalen *subplate* sind essenziell für die Lenkung thalamocortikaler Axone und die Ausbildung der ersten thalamocortikalen Netzwerke (Ohtaka-Maruyama 2020). Nach Abschluss der Cortikogenese untergeht ein Teil der *subplate* Neuronen Apoptose. Nicht apoptotische *Subplate* Neuronen entwickeln sich in adulten Gehirnen zu interstitiellen Neuronen der weißen Substanz (*white matter interstitial neurons*, WMINs (Duchatel et al. 2019; Sedmak und Judaš 2021)).

Während der radialen Migration durchlaufen exzitatorische Neuronen verschiedene Migrationssubphasen (Abb. 3C). Die ersten Neuronen werden in der Ventrikulärzone durch die asymmetrische Zellteilung von Radialglia Zellen geboren. Die Zellen lösen sich vom Neuroepithel an der Ventrikulärzone und migrieren entlang dem basalen Fortsatz von Radialglia Zellen in die Subventrikulärzone. Dort angekommen, verlieren die Zellen den Kontakt zu Radialglia Fortsätzen, bilden mehrere Zellfortsätze aus und migrieren ungerichtet, meist in tangentialer Richtung. Aufgrund der multipolaren Zellfortsätze wird diese Migrationsphase als multipolare Migration bezeichnet (Tabata und Nakajima 2003; Noctor et al. 2004; Cooper 2014). Die Zellen migrieren für circa 24h multipolar, bevor sie erneut Kontakt mit den Fortsätzen von Radialglia Zellen aufnehmen und mit einer bipolaren Zellmorphologie weiter entlang den Zellfortsätzen migrieren.

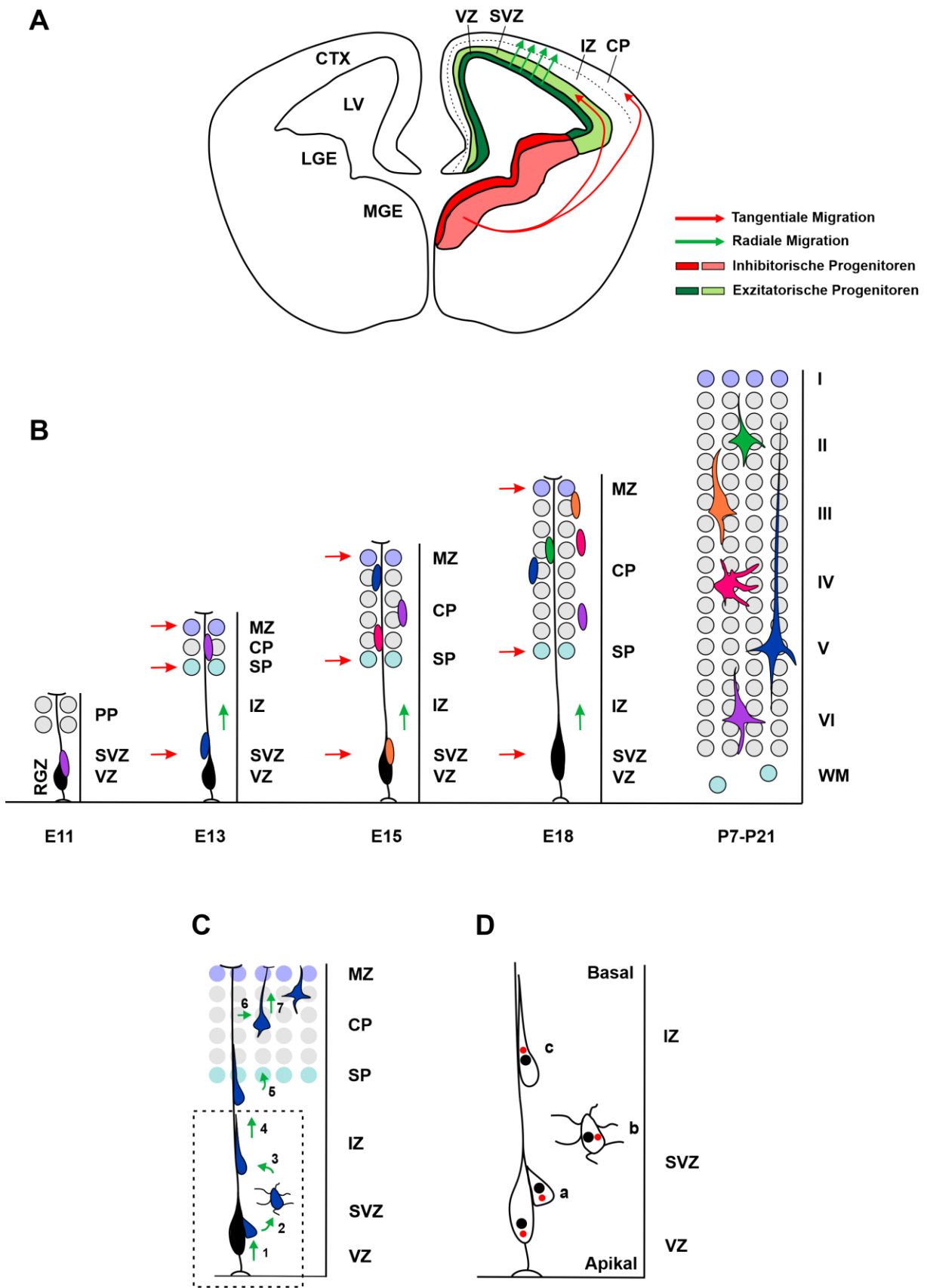


Abbildung 3: A: Entstehung und Migration kortikaler Progenitoren im embryonalen Mausgehirn. Coronaler Schnitt durch ein embryonales Mausgehirn. Exzitatorische Progenitoren werden in der Ventrikulärzone (VZ, dunkelgrün) und Subventrikulärzone (SVZ, hellgrün) geboren und migrieren radial (grüne Pfeile) vom Lateralventrikel (LV) durch die Intermediärzone (IZ) in die kortikale Platte (CP). Inhibitorische Progenitoren werden in der VZ und SVZ der ganglionischen Eminenzen (rot und hellrot) geboren. Aus der medialen ganglionischen Eminenz (MGE; LGE: Laterale ganglionische Eminenz) migrieren die inhibitorischen Progenitoren tangential (rote Pfeile) in den embryonalen Cortex (CTX). **B: Zeitlicher Ablauf der Cortikogenese und Ausbildung der kortikalen Schichten.** Bei Mäusen dauert die Cortikogenese vom zehnten bis zum achtzehnten Embryonaltag. Durch asymmetrische Zellteilung von Radialglia Zellen (RGZ, schwarz) entstehen die ersten postmitotischen Neuronen, die die embryonale Preplate ausbilden (PP, E11). Die nächste Welle postmitotischer Neuronen (lila, E13) bildet die erste Zellschicht der CP aus und trennt die PP in die Marginalzone (MZ) und Subplate (SP). Exzitatorischen Progenitoren werden in der VZ und SVZ in konsekutiven Wellen gebildet (lila, blau, magenta, orange, grün), migrieren radial (grüne Pfeile) durch die IZ und SP und dehnen die CP in vertikaler Richtung aus (E13-E18). Inhibitorische Neuronen migrieren tangential durch die SVZ, SP und MZ in den embryonalen Cortex (rote Pfeile). Die Positionierung der Progenitoren und die Schichtung des Cortex folgt einem inside out Prinzip. Früh geborene Neuronen (lila) sind in tiefen Schichten der CP lokalisiert. Spät geborene Neuronen (grün) migrieren in die hohen Schichten der CP. Aus Neuronen der CP entstehen die **Cortexschichten II-VI (P7-P21)**, die MZ entwickelt sich zu **Cortexschicht I** und ein Teil der SP Neuronen verbleibt in der weißen Substanz (WM). **C: Verschiedene Subphasen der radialen Migration.** Exzitatorische Progenitoren werden geboren und migrieren von der VZ in die SVZ (1). In der SVZ verlieren die Zellen den Kontakt zu RGZ, nehmen eine multipolare Morphologie an und migrieren ungerichtet (2). Nach 24h nehmen die Progenitoren wieder Kontakt mit RGZ auf (3) und migrieren gerichtet, mit bipolarer Zellmorphologie entlang den Zellfortsätzen. Nach dem Eintritt in die CP (5) migrieren die Zellen so lange radial, bis sie mit ihrem apikalen Neurit die Marginalzone erreichen und sich erneut von den RGZ lösen (6). Durch terminale somale Translokation erreichen die Progenitoren ihren endgültigen Zielort in der CP (7). **D: Die Orientierung des Centrosoms ändert sich in verschiedenen Subphasen der radialen Migration.** Nach der asymmetrischen Zellteilung sind die Centrosomen (rote Punkte) von RGZ und Progenitoren apikal orientiert (a). Während der multipolaren Migration ist das Centrosom zufällig ausgerichtet und die Achse zwischen Nukleus und Centrosom nicht polar (b). Bei der gerichteten radialen Migration wird das Centrosom basal, in Migrationsrichtung orientiert und bestimmt dadurch die Persistenz migrierender Progenitoren (c). Die gestrichelte Box in Teilabbildung C wird in Teilabbildung D vergrößert dargestellt. **E: Embryonaltag, P: Postnataltag.** Abbildung modifiziert nach Godin (2014) und Hippenmeyer (2014).

Dabei bildet das Neuron durch Filopodien und Lamellipodien einen *leading edge* Fortsatz aus, der die Zelle in Migrationsrichtung verlängert. Bei der Nukleokinese wird der Zellkern in Migrationsrichtung nachgezogen und schließlich der *trailing process* der Zelle eingezogen, sodass sich die Zelle in Migrationsrichtung verkürzt (Lambert de Rouvroit und Goffinet 2001; Tsai und Gleeson 2005). Nach dem Eintritt in die kortikale Platte migrieren die Zellen so lange, bis ihr apikaler Neurit die Marginalzone erreicht. Danach lösen sich die migrierenden Zellen erneut vom Radialglia Fortsatz und erreichen durch sogenannte terminale somale Translokation ihren Zielort in der kortikalen Platte (Hippenmeyer 2014).

Neben der Morphologie und Polarität ändert sich auch die Orientierung des Centrosoms in den verschiedenen Migrationsphasen der radialen Migration (Abb. 3D). Nach der Zellteilung in der Ventrikulärzone, sind die Centrosomen der Radialglia Zellen und der Progenitoren apikal orientiert. Während der multipolaren Migration ist die Achse zwischen Zellkern und Centrosom nicht polarisiert und das Centrosom zufällig ausgerichtet (Cooper 2014). Während der gerichteten Migration, ist das Centrosom in Migrationsrichtung orientiert und bestimmt dadurch die Direktionalität der Nukleokinese und der Zellmigration (Tsai und Gleeson 2005). Die korrekte Ausrichtung des Centrosoms, die Kopplung des Zellkerns an das Centrosom und die Nukleokinese sind Cytoskelett abhängige Prozesse, die unter anderem von der cytoplasmatischen Dynein Aktivität beeinflusst werden (Shu et al. 2004; Youn et al. 2009).

2.8 Strategie

Neuregulin 1 ist ein Schizophrenie Suszeptibilitätsgen. Starke *loss of function* und *gain of function* Mutationen von *Nrg1* führen zu Defiziten, die mit hypothetischen Pathomechanismen der Schizophrenie korrelieren. In schizophrenen Patienten und Patientinnen werden jedoch nur leichte Veränderungen der *Nrg1* Expression beobachtet, von denen bisher unklar ist wie sie sich auf das Gehirn auswirken. In der vorliegenden Arbeit wurde deshalb der Einfluss eines heterozygoten *Nrg1 knockouts* auf das Gehirntranskriptom von *Nrg1* defizienten Embryos (E15.5) und Mäusen (P28) unvoreingenommen untersucht, um einen potenziellen Schizophrenie Kernprozess zu identifizieren (Abb. 4). Dazu wurden *Microarray* Genexpressionsanalysen vorhergehender Arbeiten verwendet und bioinformatisch neu aufbereitet. Der verwendete Datensatz wurde von Philipp Kaiser angefertigt (Kaiser 2011) und umfasst 48 *Microarrays*, die das Gehirntranskriptom von *Nrg1^{+/+}* und *Nrg1^{+/-}* Tieren in zwei verschiedenen Entwicklungsstadien und vier verschiedenen Gehirnregionen analysieren (je drei biologische Replikate).

Das Gehirntranskriptom der Tiere wurde am Embryonaltag 15.5 (E15.5) und am Postnataltag 28 (P28) untersucht (Abb. 4A). Die ausgewählten Entwicklungsstadien repräsentieren schizophrenierelevante Zeitpunkte der Gehirnentwicklung, in denen Prozesse ablaufen, die für die Ausbildung funktioneller Gehirnstrukturen und neuronaler Netzwerke essentiell sind. Störungen dieser Prozesse können mit den pathophysiologischen und kognitiven Defiziten schizophrener Patientinnen und Patienten assoziiert werden. Am Embryonaltag 15.5 werden in der embryonalen Cortikogenese die supragranulären Schichten des infralimbischen und prälimbischen Cortex gebildet, die unter anderem für höhere kognitive Leistungen, das Arbeitsgedächtnis und die Regulation von Emotionen und Selbstkontrolle notwendig sind. Am Postnataltag 28 werden durch sogenanntes *pruning* ineffiziente synaptische Verbindungen degradiert, um die Effektivität neuronaler Netzwerke zu erhöhen. Bei Menschen wird das *pruning* von Synapsen des Präfrontalcortex in der Adoleszenz abgeschlossen und wird unter anderem in der *over pruning* Hypothese mit der Manifestation von Schizophrenie im jungen Erwachsenenalter assoziiert. Die Entwicklungsstadien E15.5 und P28 korrelieren demnach mit der Entstehung neuroentwicklungsbiologischer Defizite und der Manifestation der psychischen Erkrankung.

In beiden Entwicklungsstadien wurde das Transkriptom von vier Gehirnregionen untersucht (Abb. 4A). Der infralimbische und prälimbische Cortex (zusammengefasst als frontaler Cortex, FC), der Bereich des Mediodorsalkerns des Thalamus (zusammengefasst als anteriorer Thalamus, AT), der somatosensorische Cortex (SC) und der Ventrobasalkomplex des Thalamus (zusammengefasst als posteriorer Thalamus, PT). Der infralimbische und der prälimbische Cortex von Nagetieren gelten als Homolog des dorsolateralen, präfrontalen Cortex (dlPFC) von Primaten und stehen in Verbindung mit dem Mediodorsalkern des Thalamus.

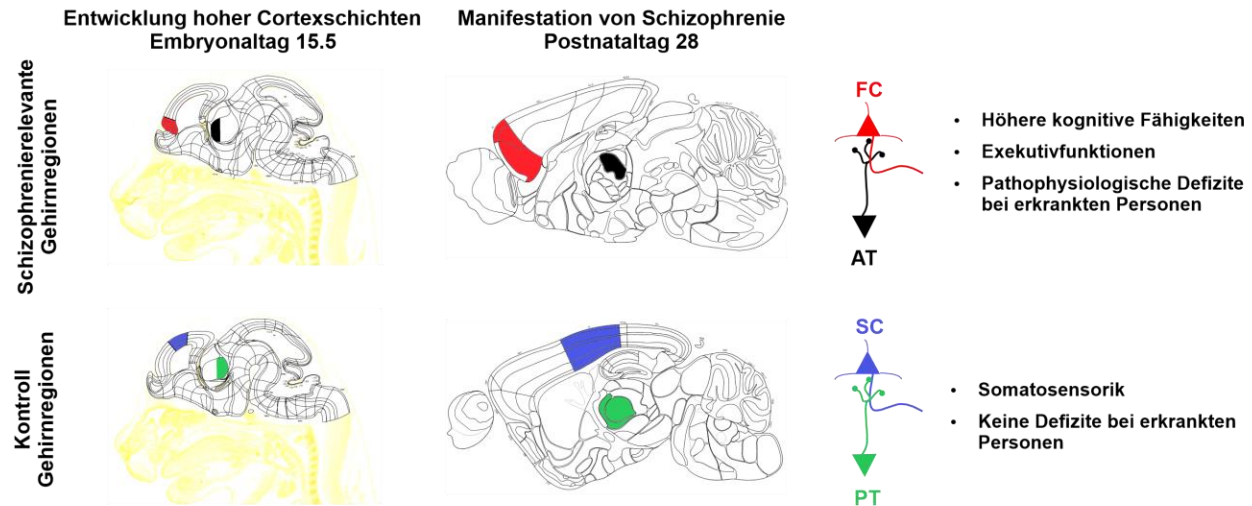
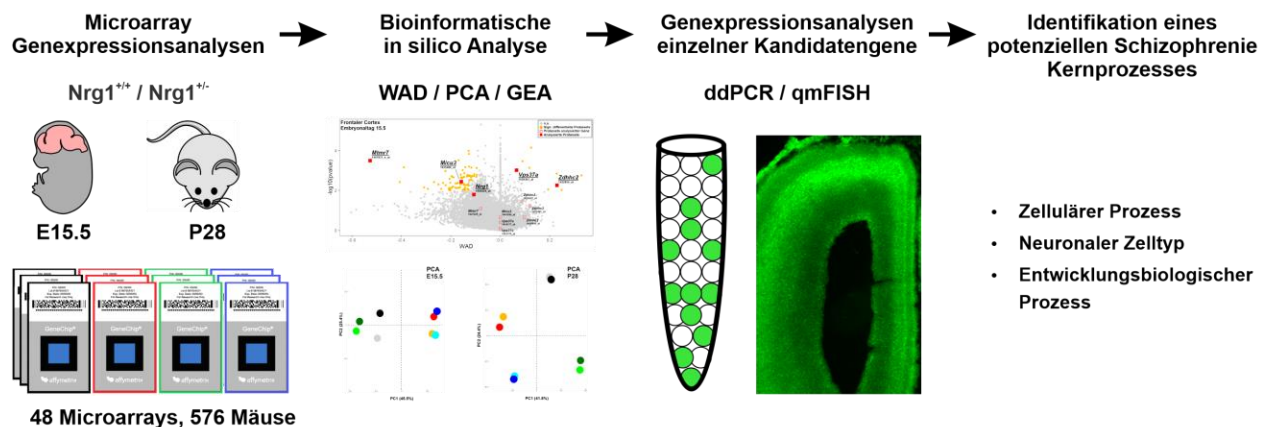
A**B**

Abbildung 4: Identifikation eines Schizophrenie Kernprozesses durch die Verwendung heterozygoter Nrg1 knockout Mäuse. **A: Das schizophreniebezogene Modellsystem der vorliegenden Dissertation.** Der Einfluss des heterozygoten Nrg1 knockouts auf das Gehirntranskriptom von Nrg1 defizienten Mäusen wurde in vier Gehirnregionen und zwei Entwicklungsstadien untersucht. Der frontale Cortex (**FC, rot**) ist mit dem Dorsomedialkern des anterioren Thalamus (**AT, schwarz**) verbunden. Die beiden Gehirnregionen werden im Modell als schizophrenierelevante Gehirnregionen verwendet, da die homologen Gehirnregionen im Menschen pathophysiologisch von der Krankheit betroffen sind. Der somatosensorische Cortex (**SC, blau**) ist mit dem Ventrobasalkomplex des posterioren Thalamus (**PT, grün**) verbunden. Im Menschen sind diese Gehirnregionen nicht von der Krankheit betroffen und dienen deshalb als Kontrollregionen. Embryonaltag 15.5 (**E15.5**) und Postnataltag 28 (**P28**) repräsentieren schizophrenierelevante Zeitpunkte der Gehirnentwicklung. An E15.5 entstehen die supragranulären Schichten des FC. P28 korreliert mit der Manifestation der Krankheit. **B: Strategie der vorliegenden Dissertation.** In vorherigen Arbeiten (Kaiser 2011) wurde eine große Microarray Transkriptomstudie angefertigt, die das Transkriptom von Nrg1^{+/+} und Nrg1^{-/-} Tieren in den Entwicklungsstadien E15.5 und P28 im AT, FC, PT und SC analysiert. Der vorhandene Datensatz wurde durch die Berechnung der weighted average difference (**WAD**), durch Principal Component Analysen (**PCA**) und Gene Enrichment Analysen (**GEA**) bioinformatisch neu aufbereitet und ausgewertet. Die differentielle Expression einzelner Kandidatengene wurde durch digital droplet PCR (**ddPCR**) und quantitative multiplexierte fluoreszente in situ Hybridisierung (**qmFISH**) validiert. Abschließend wurden Interaktionspartner und Proteinsubstrate von differenziell exprimierten Genen untersucht, deren biologische Funktion in Zusammenhang mit neuroentwicklungsbiologischen Prozessen steht. Dadurch sollte ein potenzieller Schizophrenie Kernprozess identifiziert werden, der in schizophrenierelevanten Gehirnregionen Nrg1 defizienter Mäuse einen bestimmten Zellulären Prozess, einen bestimmten neuronalen Zelltyp oder einen bestimmten neuroentwicklungsbiologischen Prozess beeinflusst.

Der somatosensorische Cortex ist mit dem Ventrobasalkomplex im posterioren Thalamus verbunden. Der dlPFC gilt als eine der am stärksten von der Krankheit betroffenen Gehirnregionen. Zusätzlich lassen sich auch in den assoziierten Thalamuskernen des dlPFC pathologische und funktionale Unterschiede nachweisen. Im Gegensatz dazu, treten auffällige Veränderungen der Somatosensorik in schizophrenen Menschen nicht auf, sodass davon ausgegangen werden kann, dass nicht alle Gehirnregionen in gleichem Maße von der Krankheit betroffen sind. Aufgrund dieser Überlegung, werden die vier untersuchten Gehirnregionen in diesem Projekt hypothetisch in ein betroffenes frontales System und ein nicht betroffenes posteriores System unterteilt. Das schizophrenierelevante frontale System aus dem FC und AT und das Kontrollsystem aus dem SC und PT (Abb. 4A).

Um einen potenziellen Schizophrenie Kernprozess in *Nrg1* defizienten Mäusen zu identifizieren, wurden die *Microarray* Datensätze von Philipp Kaiser bioinformatisch neu aufbereitet und prozessiert (Abb. 4B). Durch *Principal Component* Analysen und *Gene Enrichment* Analysen wurden potenzielle Kandidatengene identifiziert, die in *Nrg1*^{+/-} Embryos differenziell exprimiert sind und deren molekulare Funktion mit schizophrenierelevanten Prozessen verknüpft werden kann. Durch *digital droplet* PCR (ddPCR) und quantitative multiplexierte fluoreszente *in situ* Hybridisierung (qmFISH) wurde die differenzielle Genexpression dieser Kandidatengene validiert. Die Palmitoyltransferase *Zdhhc2* wird im frontalen Cortex *Nrg1* defizienter Embryos überexprimiert. In anschließenden biochemischen Acyl-Biotin *Exchange* Assays wurde untersucht, ob die differenzielle Genexpression von *Zdhhc2* die Palmitoylierung von ZDHHC2 Proteinsubstraten beeinflusst. NDEL1 ist ein Dynein Adapterprotein, das die Aktivität von des retrograden Motorproteins fördert und dessen Palmitoylierung die Interaktion zwischen NDEL1 und Dynein inhibiert. Im frontalen Cortex *Nrg1* defizienter Embryos konnte nachgewiesen werden, dass die Überexpression von *Zdhhc2* zu einer Hyperpalmitoylierung von NDEL1 führt. NDEL1 reguliert unter anderem die radiale Migration neuronaler Progentoren. Aufgrund dieser Tatsache wurde die radiale Migration exzitatorischer Neuronen durch qmFISH Experimente histologisch und durch Ventrikulärzonenexplantate *in vitro* im Gewebeverbund und auf Einzelzellniveau untersucht. Dabei zeigt sich, dass die radiale Migration und die Ausrichtung des Centrosoms in radial migrierenden Neuronen durch den heterozygoten *Nrg1* knockout beeinflusst wird. Dieser Effekt wird möglicherweise durch die Überexpression von *Zdhhc2* und Hyperpalmitoylierung von NDEL1 begünstigt. Um zu untersuchen, ob sich das embryonale Migrationsdefizit auf die Ausbildung und Schichtung des cerebralen Cortex auswirkt, wurden in abschließenden Experimenten die kortikalen Schichtdicken postnataler Mäuse analysiert und die Anzahl und Verteilung von interstitiellen Neuronen in der weißen Substanz bestimmt. Dabei werden signifikante und potenziell schizophrenierelevante Veränderungen beschrieben.

3 Material

In den folgenden Unterpunkten werden alle Geräte, Softwareprogramme, Chemikalien, Puffer, Enzyme und Proteine, Nukleotide und Nukleinsäuren sowie weitere Verbrauchsmaterialien aufgelistet, die für die vorliegende Arbeit verwendet wurden. Standardgeräte aus molekularbiologischen Laboren und Grundchemikalien (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) werden nicht aufgelistet. Für alle Lösungen und Puffer wurde deionisiertes Wasser (ddH₂O) verwendet. Einzelne Enzyme, Enzym-Kits und Nukleinsäuren-Kits wurden in der Regel nach Herstellerangaben verwendet. Entsprechend wurden einzelne Arbeitsschritte nur aufgelistet, wenn sie von den Herstellerangaben abweichen.

3.1 Geräte

Tabelle 1: Verwendete Geräte. Standardgeräte aus molekularbiologischen Laboren sind nicht aufgelistet.

Geräte	Hersteller	Firmensitz
Automated Droplet Generator	Bio-Rad	Hercules, USA
C1000 Touch Thermal Cycler	Bio-Rad	Hercules, USA
PX1 PCR Plate Sealer	Bio-Rad	Hercules, USA
QX200 Droplet Reader	Bio-Rad	Hercules, USA
Mini-PROTEAN Tetra Cell	Bio-Rad	Hercules, USA
Binokular Stemi 305	Carl Zeiss	Oberkochen, Deutschland
Fluoreszenzbinokular Lumar.V12	Carl Zeiss	Oberkochen, Deutschland
Fluoreszenzmikroskop Axio ImagerZ1	Carl Zeiss	Oberkochen, Deutschland
Konfokalmikroskop LSM 800	Carl Zeiss	Oberkochen, Deutschland
Kryomikrotom CM3050	Leica	Wetzlar, Deutschland
Vibratom Leica VT1000 S	Leica	Wetzlar, Deutschland
Hybridisierungsinkubator 7601	Gesellschaft für Labortechnik	Burgwedel, Deutschland
Fluorometer Qubit3.0	Thermo Fisher Scientific	Waltham, USA
DynaMag-2 Magnet	Thermo Fisher Scientific	Waltham, USA
Amersham Imager 600	GE Healthcare	Chicago, USA
Spektrophotometer NanoDrop	VWR	Radnor, USA
Thermocycler peqSTAR 2x	VWR	Radnor, USA
Thermocycler primus96	VWR	Radnor, USA
McIlwain Tissue Chopper	Mickle Laboratory Engineering	Guildford, UK
CO ₂ Inkubator CB210	BINDER	Tuttlingen, Deutschland

3.2 Software und Webseiten

Tabelle 2: Verwendete Software und Softwarepakete

Software	Softwareentwickler
Microsoft Office Professional Plus 2019	Microsoft
Origin 2019b	OriginLab Corporation
QuantaSoft 1.7.4	Bio-Rad
AxioVision 4.8.2	Carl Zeiss
Zen lite 2	Carl Zeiss
Fiji is just ImageJ (Fiji)	Schindelin et al. (2012)
R 3.6.0	R Core Team
R Paket farms	Hochreiter et al. (2006)
R Paket ggplot2	Wickham (2016)
R Paket FactoMineR	Lê et al. (2008)
R Paket factoextra	Alboukadel Kassambara, Fabian Mundt (2020)
Webseiten	
https://www.ensembl.org/index.html	
https://toppgene.cchmc.org/	
https://primer3.ut.ee/	
https://www.premierbiosoft.com/netprimer/	

3.3 Chemikalien

Tabelle 3: Verwendete Chemikalien. Grundchemikalien aus molekularbiologischen Laboren sind nicht aufgelistet.

Chemikalien	Hersteller	Firmensitz
Alexa488-Methyldopamid (10 mM)	Interne Herstellung	
Cy3B-Methyldopamid (10 mM)	Interne Herstellung	
DEPC (Diethylpyrocarbonat)	Carl Roth	Karlsruhe, Deutschland
Formamid	Carl Roth	Karlsruhe, Deutschland
Formamid deionisiert	Carl Roth	Karlsruhe, Deutschland
Roti-Safe GelStain	Carl Roth	Karlsruhe, Deutschland
DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindol Dihydrochlorid)	Carl Roth	Karlsruhe, Deutschland
Paraformaldehyd (PFA)	Merck	Darmstadt, Deutschland
Blocking Reagenz	Roche	Basel, Schweiz
Roche cOmplete Mini	Roche	Basel, Schweiz
NBT-Lösung (4-Nitro blue tetrazolium chloride)	Roche	Basel, Schweiz
Acetanhydrid	Sigma-Aldrich	St. Louis, USA
DETAPAC (Diethylentriamin-pentaessigsäure)	Sigma-Aldrich	St. Louis, USA
NEM (N-Ethylmaleinimid)	Sigma-Aldrich	St. Louis, USA
IGEPAL CA-630	Sigma-Aldrich	St. Louis, USA
PMSF (Phenylmethylsulfonylfluorid)	Sigma-Aldrich	St. Louis, USA
Hydroxylamin-Lösung	Sigma-Aldrich	St. Louis, USA
Bolton-Hunter-Reagenz (BHR)	Thermo Fisher Scientific	Waltham, USA
TRizol Reagent	Thermo Fisher Scientific	Waltham, USA
EZ-Link BMCC-Biotin	Thermo Fisher Scientific	Waltham, USA
β-NADPH	Thermo Fisher Scientific	Waltham, USA
PlusOne Repel-Silane ES	GE Healthcare	Chicago, USA

3.4 Puffer und Lösungen

Im Folgenden sind Puffer und Lösungen aufgelistet, die häufiger für verschiedene molekularbiologische Anwendungen verwendet wurden. Spezifische Puffer, Lösungen und Zellkulturmedien, die in einzelnen Experimenten verwendet wurden, sind in den entsprechenden methodischen Unterpunkten aufgeführt.

Tabelle 4: Verwendete Puffer und Lösungen für allgemeine, molekularbiologische Arbeiten. Falls nicht anders angegeben, wurden Puffer und Lösungen mit deionisiertem Wasser angesetzt.

Puffer und Lösungen		Bestandteile	
PBS(T)	pH 7.4	NaCl KCl Na ₂ HPO ₄ 2H ₂ O KH ₂ PO ₄ (Tween20) (Triton X-100)	8g/l 0.2 g/l 1.15 g/l 0.2 g/l (0.05 %) (0.1 %) (v/v) (v/v)
TBS(T)	pH 7.6	Tris NaCl (Triton X-100)	20 mM 150 mM 0.1 % (v/v)
Boratpuffer	pH 8.5	Borsäure NaOH	0.1 M 18.6 mM
Denhardt's Reagenz (50x)		BSA Fraction V Ficoll 400 Polyvinylpyrrolidon	1% 1% 1% (w/v) (w/v) (w/v)
LB-Medium + Ampicillin	pH 7	Trypton NaCl Hefeextrakt Ampicillin	10 g/l 5 g/l 5 g/l 50µg/ml
Mowiol	pH 8.5	Mowiol 4-88 Glycerin n-Propylgallat Tris-HCl In PBS	0.1 g/ml 25 % 0.1 mg/ml 0.1 M (v/v)
MaBS	pH 7.5	Maleinsäure NaCl	0.1 M 0.15 M
SSC (Saline Sodium Citrate) (20x)		NaCl Natriumcitrat	3 M 0,3 M
TAE (50x)		Tris Essigsäure EDTA	2 M 1 M 50 mM
TEA	pH 8	Triethanolamin 32% HCl	0,1 M pH 8
SDS Ladepuffer (2x)	pH 6.8	SDS Glycerol Tris-HCl Bromphenolblau β-Mercaptoethanol	5 % 5 % 125 mM 0.01 % 5 % (w/v) (v/v) (w/v) (v/v)
Laemmli-Puffer	pH 8.3	Tris Glycin SDS	25 mM 0.192 M 0.1 % (w/v)
Western Blot Puffer		Glycin Tris Methanol	146.5 mM 19.8 mM 25 % (v/v)

3.5 Verbrauchsmaterialien, Enzym-Kits und Nukleinsäure-Kits

Tabelle 5: Verwendete Verbrauchsmaterialien. Falls nicht anders angegeben, wurden Enzym-Kits und Nukleinsäure Kits nach Herstellerangaben verwendet.

Materialien	Hersteller	Firmensitz
Agarose NEEO Ultra-Qualität	Carl Roth	Karlsruhe, Deutschland
Agarose Low Melt	Carl Roth	Karlsruhe, Deutschland
Acrylamid/Bis-Lösung 30% (29:1)	Carl Roth	Karlsruhe, Deutschland
Automated Droplet Generation Oil for Probes	Bio-Rad	Hercules, USA
ddPCR 96-Well Plates	Bio-Rad	Hercules, USA
ddPCR Droplet Reader Oil	Bio-Rad	Hercules, USA
DG32 Automated Droplet Generator Cartridges	Bio-Rad	Hercules, USA
Pipet Tips for the AutoDG System	Bio-Rad	Hercules, USA
PCR Plate Heat Seal foil	Bio-Rad	Hercules, USA
MyTaq Extract-PCR Kit	Meridian Bioscience	Cincinnati, USA
DNA Clean & Concentrator- Kit	Zymo	Freiburg, Deutschland
QIAprep Spin Miniprep Kit	QIAGEN	Hilden, Deutschland
RNeasy Micro Kit	QIAGEN	Hilden, Deutschland
QIAquick PCR Purification Kit	QIAGEN	Hilden, Deutschland
Qubit RNA BR Assay Kit	Thermo Fisher Scientific	Waltham, USA
Dynabeads Protein G for Immunoprecipitation	Thermo Fisher Scientific	Waltham, USA
PVDF Membranen 0.2 µm	Thermo Fisher Scientific	Waltham, USA
SuperFrost Plus Objektträger	VWR	Radnor, USA
FSC 22 Blue	Leica	Wetzlar, Deutschland
SuperSignal West Pico PLUS Chemilumineszenz Substrat	Thermo Fisher Scientific	Waltham, USA
Sterilfilter 0.2 µm Porengröße	Whatman	Maidstone, UK
Nitrocellulosemembran/Whatman Filtermembran, Porengröße: 0.45 µm	GE Healthcare	Chicago, USA
L-Glutamin 200 mM	Sigma-Aldrich	St. Louis, USA
Neurobasalmedium	Gibco/ Thermo Fisher Scientific	Waltham, USA
B-27 Plus Supplement (50x)	Gibco/ Thermo Fisher Scientific	Waltham, USA
Penicillin-Streptomycin	Gibco/ Thermo Fisher Scientific	Waltham, USA

3.6 Enzyme, Proteine und Antikörper

Tabelle 6: Verwendete Enzyme, Proteine und Antikörper. Falls nicht anders angegeben, wurden Enzyme nach Herstellerangaben eingesetzt. Für die verwendeten Antikörper sind zusätzlich die Artikelnummern aufgelistet. Die eingesetzten Antikörperkonzentrationen können den entsprechenden Unterpunkten im Methodenteil entnommen werden.

Enzyme/Proteine	Hersteller	Firmensitz
ddPCR Supermix for Probes	Bio-Rad	Hercules, USA
Glucose-Oxidase aus <i>A. niger</i>	Merck	Darmstadt, Deutschland
RiboLock RNase Inhibitor	Thermo Fisher Scientific	Waltham, USA
RNase H	Thermo Fisher Scientific	Waltham, USA
RNase A	Thermo Fisher Scientific	Waltham, USA
SuperScript IV Reverse Transkriptase	Thermo Fisher Scientific	Waltham, USA
T4 DNA Polymerase	Thermo Fisher Scientific	Waltham, USA
Phusion High-Fidelity DNA Polymerase	Thermo Fisher Scientific	Waltham, USA
T4 DNA Ligase	NEB	Ipswich, USA
Shrimp Alkaline Phosphatase	NEB	Ipswich, USA
Restriktionsenzyme	NEB	Ipswich, USA
T7 RNA Polymerase	Roche	Basel, Schweiz
T3 RNA Polymerase	Roche	Basel, Schweiz
Bovines Serumalbumin (BSA)	Sigma-Aldrich	St. Louis, USA
Maus Laminin (3400-010-01)	R&D Systems	Minneapolis, USA
Antikörper	Hersteller	Firmensitz
Anti-Digoxigenin -POD, Fab-Fragmente	Roche	Basel, Schweiz
Anti-Fluoreszein -POD, Fab-Fragmente	Roche	Basel, Schweiz
Anti-NDEL1 (17262-1-AP, Kaninchen)	Proteintech	Rosemont, USA
Anti-Vimentin (ab92547, Kaninchen)	abcam	Cambridge, UK
Anti-γ-Tubulin (T6557, Maus)	Sigma-Aldrich	St. Louis, USA
Anti-NeuN (ab177487, Kaninchen)	abcam	Cambridge, UK
Anti-CNPase (ab6319, Maus)	abcam	Cambridge, UK
Veriblot HRP (ab131366)	abcam	Cambridge, UK
Streptavidin-POD (S5512)	Sigma-Aldrich	St. Louis, USA
A488-Anti-Kaninchen-IgG (A11070, Ziege)	Molecular Probes	Eugene, USA
Cy3-Anti-Maus-IgG (115-165-146, Ziege)	Jackson Immunoresearch	West Grove, USA

3.7 Nukleotide und Nukleinsäuren

Für die *in vitro* Transkription von RNA *antisense* Sonden wurden Hapten-markierte Nukleotide verwendet. Der Fluorescein/ Digoxigenin RNA Labeling Mix enthält je 10 mM ATP, GTP, CTP, 6.5 mM unmarkiertes UTP und je 3.5 mM Fluorescein-12-UTP bzw. 3.5 mM DIG-11-UTP. Während der *in vitro* Transkription, wird laut Herstellerangaben alle 20-25 Nukleotide ein DIG- bzw. FLU-markiertes UTP in das Transkript eingebaut. Die RNA aus *Torula*-Hefe wird mit Proteinase K von RNasen befreit und durch eine Phenol-Chloroform Extraktion und eine Ethanolfällung aufgereinigt und isoliert.

Tabelle 7: Verwendete Nukleotide und Nukleinsäuren.

Nukleotide und Nukleinsäuren	Hersteller	Firmensitz
dNTP-Set, je 100 mM	Carl Roth	Karlsruhe, Deutschland
Fluorescein RNA Labeling Mix	Roche	Basel, Schweiz
Digoxigenin RNA Labeling Mix	Roche	Basel, Schweiz
<i>Torula</i> -RNA (RNase frei)	Merck	Darmstadt, Deutschland
tRNA (<i>S. cerevisiae</i>)	Merck	Darmstadt, Deutschland
Random Hexamer Primer	Thermo Fisher Scientific	Waltham, USA

3.8 Oligonukleotide

Alle verwendeten Primer wurden von Eurofins Scientific bezogen (Luxemburg, Luxemburg). Die TaqMan-Sonden der ddPCR wurden von biomers.net (Ulm, Deutschland) synthetisiert. Alle TaqMan-Sonden sind an ihrem 3' Ende mit *Black Hole Quencher* und an ihrem 5' Ende mit einem Fluorophor modifiziert. TaqMan-Sonden der *housekeeping* Gene tragen einen HEX-Fluorophor, Sonden der *Genes of interest* einen FAM-Fluorophor. Alle verwendeten Oligonukleotide sind in Tabelle 8 gelistet.

Tabelle 8: Namen und Sequenzen der verwendeten Oligonukleotide, die für die ddPCR, Klonierung und Genotypisierung verschiedener Genes of interest verwendet wurden. Zahlen innerhalb der Oligonukleotidnamen beziehen sich auf die Position des Oligonukleotids ausgehend vom Startcodon des Transkripts. Unterstrichene Nukleotide sind nicht komplementär zur Gensequenz und wurden am 5' Ende der Oligonukleotide angehängt, um Schnittstellen für Restriktionsenzyme zu inserieren.

Gen	Verwendung	Name	Sequenz 5'-3'
Eif1	ddPCR	Eif1_fwd_260	GTGACCAGCGCAAGAACATA
		Eif1_rev_349	CAAGCACTTAAAACCCATGAAC
		Eif1_probe_rev_314	TCCTTAGCCAGCCCAATCTCTATCAGGA
	Klonierung	Eif_fwd_KpnI_260	<u>ACAGGTACCGTG</u> ACCAGCGCAAGAACATA
		Eif1_rev_SacI_1268	<u>TAAGAGCTCG</u> AAACTGGAGGGGAAAGAAAAC
Er81	Klonierung	Etv1_1438_KPN1_FWD	<u>GCAGGTACCG</u> AGTAACCCGTCAAGCAAGG
		Etv1_2110_SAC1_REV	<u>TAGGAGCTCA</u> AACGGTGGCCCTCATTTAC
Micu3	ddPCR	Micu3.2_FWD_2175	GGTACTATAAAATACTGCAATGAG
		Micu3.2_REV_2342	ATAACTTAAAGCCAGTGTTTCC
		Micu3_ddPCR_Probe_2258	TAAGAAGCACGTAGTACACACTGCATACACT
	Klonierung	MICU3_FWD_ISH_KpnI	<u>GCCGGTACCT</u> TAGAAGAACCCTGCCAAAG
		MICU3_REV_ISH_SacI	<u>ACCGAGCTCT</u> CAGATGAACAATGTGGAAAGG

Mtmr7	ddPCR	Mtmr7_fwd_2646	TTAAAAGCCCTCCTGGTTTCTC
		Mtmr7_rev_2752	GGTAAAGGCAGAAGGAAATGTCA
		Mtmr7_probe_rev_2711	TGCAACTGGAAGTGAAATCAAAGTCCCAA
	Klonierung	Mtmr7.4_fwd	CAAGGAGAGAGAGTATCTTCACC
		Mtmr7.4_rev	CAGAAAAGGGTACTCTCCATATTTAT
Nrg1	Genotyping	F_Exon7_Nrg1	GGGACCAGCCATCTCATAAA
		R_Intron7-8_Nrg1	AGGAACACCAGGAGGAAAGC
		R_lacZ_Nrg1	GAGGGGACGACGACAGTATC
	ddPCR	fwd668nrg1	CCACATCTACATCCACGAC
		rev779nrg1	GGGTTTGACAGGTCTTCAC
		rev753TaqProbeNrg1+/+	GCACTCGCCTCCATTACACAGA
Pgk1	ddPCR	PGK1_fwd	CATTCTGCACGTTCAAAAG
		PGK1_rev	TGAGGTCGAAAGGCCCG
		fwd98_PGK1	CGCTGTTCTCCTCTTCCTCATCTC
Polr2a	ddPCR	RNApol2_fwd_29	ACGGTTGGAGAAGAAGGTGG
		RNApol2_rev_93	TGAACGGCAGAGGTTACGG
		rev73_RNAPOL2	AGTTTGTCTCTCCCCCTTCCGGGA
Rgs8	Klonierung	Rgs8_3677_KPN1_FWD	<u>TGAGGTACCC</u> GCTGCTCACTAGGCTTACC
		Rgs8_4372_SAC1_REV	<u>TAGGAGCTCT</u> GAGTCACACTGTAGCCTCC
Sstr2	Klonierung	Sstr2_651_KpnI_fwd	CCTGGTACCCCTTACCATCATTTGTCTCTGC
		Sstr2_1075_SacI_rev	<u>TTAGAGCTCCTCT</u> GGGTCTCCGTGGTCTC
Vps37a	ddPCR	Vps37a_FWD_1207	CCATGAACTACCAAGAGAGAAATG
		VPS37a_REV_1314	TACATCGCATCTGGACCTCA
		VPS37a_Probe_1290rev	TGGTTTCAAGTGCCCATCCCTAAGTCATA
	Klonierung	Vps37a_FWD_604_KpnI	<u>TCCGGTACCTGCCATTACCAGTTCC</u> CACA
		VPS37a_REV_1314_SacI	<u>ATTGAGCTCTACATCGCATCTGGACCTCA</u>
Zdhhc2	ddPCR	Zdhhc2.2_fwd_2931	GATTGCTTCCTCGTCTCTCA
		Zdhhc2.2_rev_3010	GAGAGCATCCTTCATCTTCTG
		Zdhhc2_probe_fwd_2955	TGAGCGTTGGATCTGACAATCTACTTCA
	Klonierung	Zdhhc2_S_fwd_2856_SacI	<u>CGTCCGCGGGTGT</u> TTAGGGAGAGCAGACATC
		Zdhhc2_S_rev_3259_KpnI	<u>CGAGGTACCGCATCCTACCAGGGTAA</u> ACCG

3.9 RNA *antisense* Sonden und Plasmidvektor

Für die Klonierung der cDNA Sequenzen der Gentranskripte wurde der Plasmidvektor pBluescript I KS (+) (Agilent, Santa Clara, USA) verwendet. Der zirkuläre Vektor ist 2958 bp lang, wird von *E. coli* repliziert (*ColE1 origin of replication*) und kann durch Ampicillin (*AmpR*) selektiert werden. Die *multiple cloning site* wird von T3- und T7-Promotorsequenzen flankiert, um das klonierte Fragment *in vitro* zu transkribieren. Für alle Klonierungsarbeiten wurde der elektrokompetente *E. coli* Stamm XL-1 Blue verwendet (Agilent, Santa Clara, USA). Für die vorliegende Arbeit wurden RNA *antisense* Sonden für folgende Gentranskripte *in vitro* transkribiert. Die Position der Sonden im Transkript, die Länge der Sonden, ihr GC-Gehalt und die verwendeten Hybridisierungstemperaturen können Tabelle 9 entnommen werden. Die Hybridisierungstemperaturen der RNA Sonden wurden mit folgender Formel berechnet:

$$T_{HYB} (C^{\circ}) = 79.8 + 18.5 \log c_{mc} + 58,54 \cdot GC + 11,8 \cdot GC^2 - 820/L - 0,35 \cdot c_{\%FA} - 20$$

C_{mc}: Zahlenwert der molaren Konzentration einwertiger Kationen

GC: GG-Gehalt des RNA Hybrids als Molenbruch

L: Zahlenwert der Länge des RNA Hybrids in Nukleotiden

c_{%FA}: Zahlenwert des Formamidgehalts in %

- **20**: Thermischer Korrekturfaktor für die Hapten-markierung der RNA Sonde

Tabelle 9: Position, Länge, GC-Gehalt und experimentell verwendete Hybridisierungstemperatur der synthetisierten RNA *antisense* Sonden verschiedener Gentranskripte.

Gen	Position ab Startcodon	Länge [nt]	GC-Gehalt	T _{HYB}
<i>Eif1</i>	260-1023	764	49 %	68 °C
<i>Er81</i>	1438-2110	673	39 %	61 °C
<i>Micu3</i>	1923-2442	520	34 %	57 °C
<i>Nrg1</i>	608-894	287	47 %	65 °C
<i>Rgs8</i>	3677-4372	696	51 %	69 °C
<i>Sstr2</i>	651-1075	425	52 %	69 °C
<i>Vps37a</i>	604-1316	713	40 %	61 °C
<i>Zdhhc2</i>	2628-3031	404	48 %	66 °C

3.10 Versuchstiere

Der verwendete Tierstamm, heterozygoter *Nrg1 knockout* Mäuse (Meyer und Birchmeier 1995) wurde vom Max-Delbrück-Centrum für Molekulare Medizin zur Verfügung gestellt. Der heterozygote *Nrg1 knockout* beruht auf einem Austausch von Gensequenzen durch homologe Rekombination. Dabei wurde der N-terminale Teil der *Nrg1* EGF-like Domäne durch eine lacZ codierende Sequenz aus *E. coli* und eine Neomycin-Resistenzkassette ausgetauscht. Die Sequenz des Insertionsbereichs kann der Dissertation von Philipp Kaiser entnommen werden (Kaiser 2011). Die lacZ Sequenz wurde *in frame* inseriert und wird nachweisbar transkribiert (Meyer und Birchmeier 1995). Da die EGF like Domäne notwendig ist für die Interaktion von NRG1 und ERBB-Rezeptoren, entsteht jedoch kein funktionsfähiges, signalisierendes NRG1 Protein. Entsprechend ist das Gen insertional inaktiviert. Ein homozygoter *Nrg1 knockout* ist letal. Durch eine Herzentwicklungsstörung sterben *Nrg1*^{-/-} Tiere während der Embryonalentwicklung (Meyer und Birchmeier 1995).

Die Insertion der Gensequenz erfolgte in embryonalen Stammzellen des Mausstamms 129/Sv. Die genetisch veränderten Zellen wurden in Blastozysten des Mausstamms C57BL/6 injiziert und *Nrg1*^{+/-} Mäuse mit C57BL/6 Wildtyp Mäusen gekreuzt. Zur Aufrechterhaltung des Stamms werden *Nrg1*^{+/-} Mäuse mit Wildtyptieren des gleichen Stammes (*Nrg1*^{+/+}) verpaart. Die Tiere werden am Karlsruher Institut für Technologie am Institut für Biologische und Chemische Systeme (IBCS-FMS) unter Standardbedingungen gehalten. Dies beinhaltet Standard-Hygienebedingungen ohne spezifizierte Pathogenfreiheit, einen Tagesrhythmus von zwölf Stunden Licht und zwölf Stunden Dunkelheit, sowie frei zugängliches Trinkwasser und Futter.

In den durchgeführten experimentellen Arbeiten, wurden *Nrg1*^{+/+} und *Nrg1*^{+/-} Tiere an zwei unterschiedlichen Entwicklungsstadien analysiert. Embryonen wurden am Embryonaltag 15.5 (E15.5) entnommen, postnatale Tiere wurden am Postnataltag 28 (P28) untersucht.

4 Methoden

4.1 Bioinformatische Prozessierung der *Microarray*-Datensätze

Die Untersuchung des Gehirntranskriptoms *Nrg1* defizienter Mäuse mittels einer großen *Microarray* Studie wurde in der Dissertation von Philipp Kaiser begonnen (Kaiser 2011). Der Einfluss des heterozygoten *Nrg1 knockouts* wurde in vier Gehirnregionen (Mediodorsalkern des Thalamus, vereinfacht anteriorer Thalamus, AT; prälimbischer/infralimbischer Cortex, vereinfacht Frontalcortex, FC; Ventrobasalkomplex des Thalamus, vereinfacht posteriorer Thalamus, PT; und somatosensorischer Cortex, SC), zwei Entwicklungsstadien (E15.5, P28) und zwei Genotypen (*Nrg1*^{+/+}, *Nrg1*^{+/-}) untersucht. Für jede Gehirnregion wurden reproduzierbare Präzisions-Mikrobiopate nach einem eigens entwickelten standardisierten Protokoll (Dahm 2007) präpariert. Für jede Kondition wurden drei biologische Replikate angefertigt, wobei ein biologisches Replikat RNA von zwölf Individuen von mindestens sechs verschiedenen Müttern enthält. Daraus ergeben sich 576 Individuen, deren RNA isoliert, in markierte cDNA konvertiert und mit Mouse Genome 430.2 *Microarrays* (Affymetrix, Santa Clara, USA) auf Expressionsunterschiede untersucht wurde. Die experimentelle Durchführung der Transkriptomstudie kann der Arbeit von Kaiser entnommen werden (Kaiser 2011).

Die Mouse Genome 430.2 *Microarrays* detektieren 45101 *probesets*. Ein *probeset* besteht aus elf *probe* Paaren, 25 bp langen Oligonukleotiden, die innerhalb der 3' UTR eines Gentranskripts angeordnet sind. Für jedes *perfect match* (PM) *probeset* gibt es ein gleich großes *mismatch* (MM) *probeset*, bei dem jedes Oligonukleotid in der mittleren Base von der Zielsequenz abweicht. Die MM *probesets* können zur Korrektur gegen Kreuzhybridisierungen eingesetzt werden. Die 45101 PM *probesets* detektieren das gesamte Maustranskriptom, dabei werden einzelne Transkripte, oder verschiedene Transkripte eines Gens mit mehreren *probesets* detektiert.

Für die vorliegende Arbeit sollten die Datensätze der *Microarray*-Transkriptomstudie neu prozessiert und evaluiert werden. Für die Prozessierung von Affymetrix *Microarray*-Rohdaten existiert eine Vielzahl verschiedener Präprozessierungsalgorithmen (Göhlmann und Talloen 2017). Diese unterscheiden sich im Wesentlichen durch die in den Einzelschritten der Präprozessierung verwendeten Algorithmen. Dies umfasst die Korrektur von unspezifischen Hintergrundsignalen, die Normalisierung der Fluoreszenzintensitäten, den optionalen Einbezug von *perfect match* und *mismatch probes* und die Summierung der einzelnen *probes* eines *probesets* in einen log2 transformierten Expressionswert. In vorherigen Arbeiten wurden die *Microarray*-Daten mit verschiedenen Präprozessierungsalgorithmen aufbereitet. In einer Varianzanalyse der Genexpression ausgewählter *housekeeping* Gene, erzielte der FARMS-Algorithmus die besten Ergebnisse (Lachenmaier 2019).

FARMS (*Factor Analysis for Robust Microarray Summarization*) bezeichnet einen modellbasierten Algorithmus, der für die Summierung der Expressionswerte eine Faktoranalyse mit Bayes-Schätzern nutzt (Hochreiter et al. 2006). Diese nehmen unter anderem an, dass hohe Intensitäten eine starke Genexpression repräsentieren und der Großteil der *probesets* zwischen den verschiedenen Genotypen nicht differenziell exprimiert ist. Der Algorithmus wurde mit einer von RMA adoptierten Hintergrundreduktion, Quantilnormalisierung und ohne Verwendung der MM *probesets* eingesetzt. Für die Präprozessierung der *Microarray*-Rohdaten wurde die Software R (Version 3.6.0, R Core Team) und das R Paket farms (Hochreiter et al. 2006) verwendet. Der Vergleich der verschiedenen Präprozessierungsalgorithmen und die Einstellungen der einzelnen Algorithmus-Parameter können vorhergegangenen Arbeiten entnommen werden (Lachenmaier 2019).

4.2 *Principal Component Analyse*

Für die Durchführung und die Visualisierung der *Principal Component Analyse* wurde die Software R (Version 3.6.0, R Core Team) und die R-Softwarepakete FactoMineR (Lê et al. 2008) und factoextra (Alboukadel Kassambara und Fabian Mundt, 2020) verwendet. Als Input wurden für jede *Microarray*-Kondition die 5000 am stärksten exprimierten Gentranskripte innerhalb eines Entwicklungsstadiums, Genotyps und einer Gehirnregion ausgewählt und in die Analyse implementiert. Daraus ergeben sich für die PCA aller embryonalen Gehirnregionen 6068 Transkripte. Für die PCA aller postnatalen Gehirnregionen wurden 6121 Transkripte implementiert. Ein Transkript wurde in die Gesamtanalyse aufgenommen, sobald es in mindestens einer Kondition unter den 5000 am stärksten exprimierten Transkripten war. In den PCAs der einzelnen embryonalen Gehirnregionen, wurden im anterioren Thalamus 5126, im frontalen Cortex 5129, im posterioren Thalamus 5085 und im somatosensorischen Cortex 5117 Transkripte verwendet. Anhand der visualisierten PCA Ergebnisse, wurde die Dimension identifiziert, die den Beitrag der Varianz zwischen den *Nrg1*^{+/+} und *Nrg1*^{+/-} Genotypen repräsentiert. Abschließend wurde der Beitrag der einzelnen Gentranskripte zur genotypdefinierenden Dimension (*load*) bestimmt. Die 100 Gentranskripte mit dem höchsten genotypspezifischen Einfluss, wurden anschließend mit *Gene Enrichment* Analysen auf Anreicherungen in biologischen Prozessen oder zellulären Kompartimenten untersucht (siehe 4.5).

4.3 Berechnung der *weighted average difference* (WAD)

Zur Bestimmung der Differenzialität einzelner Gentranskripte in heterozygoten *Nrg1 knockout* Mäusen wurde die *weighted average difference* (WAD) berechnet. Die WAD ist ein *fold change* basierter Wert, der zur Auswahl differenziell exprimierter Gentranskripte in Datensätzen mit zwei Klassen verwendet wird (Kadota et al. 2008). Dabei wird angenommen, dass mit zunehmender Expressionsstärke die Verlässlichkeit und Reproduzierbarkeit von Messwerten steigt. Mit abnehmender Expressionsstärke verringert sich hingegen das Verhältnis von Signal zu Hintergrund. Um diesen Effekt zu korrigieren, wird ein Faktor eingeführt (w_i), der die relative Expressionsstärke des Gentranskripts im Verhältnis zu allen analysierten Gentranskripten angibt. Der Faktor w_i wird mit dem *fold change* des Gentranskripts multipliziert. Dadurch wird die Expressionsstärke des einzelnen Gentranskripts innerhalb des gesamten Datensatzes gewichtet. Dies wird in herkömmlichen *fold change* Berechnungen missachtet. Die Berechnung der WAD ist kompatibel mit dem verwendeten Präprozessierungsalgorithmus FARMS und wurde in vorhergehenden Arbeiten detailliert beschrieben (Lachenmaier 2019).

4.4 Identifikation signifikant deregulierter Gentranskripte

Für die Identifikation deregulierter Gentranskripte wurden Grenzen festgelegt, die eine bestimmte Differenzialität der Genexpression zwischen den Genotypen und eine gewisse statistische Signifikanz der Differenzialität voraussetzen. Die differenzielle Expression von Gentranskripten in *Nrg1^{+/-}* Mäusen wurde durch die *weighted average difference* (WAD) bestimmt. Die statistische Signifikanz der differenziellen Genexpression wurde durch zweiseitige T-Tests zwischen den biologischen Replikaten bestimmt. Die verwendeten *Microarray Gene Chips* detektieren die Expression von 45101 Gentranskripten. Bei einem Signifikanzniveau von 0.05, ergeben sich durch multiples Testen und die Kumulierung des α -Fehlers 2255 falsch positive Gentranskripte. Eine Korrektur für multiples Testen konnte für den vorliegenden Datensatz dennoch nicht durchgeführt werden. Aufgrund der geringen Anzahl biologischer Replikate führen sowohl eine Bonferroni-Korrektur, als auch die Verwendung einer *false discovery rate* mit Benjamini-Hochberg Prozedur zu einer zu stringenten Signifikanzgrenze. Dadurch werden zwar falsch positive Datenpunkte verringert, gleichzeitig aber die Anzahl falsch negativer Datenpunkte erhöht. Um den Fehler durch multiples Testen etwas zu korrigieren, wurden die Signifikanzgrenzen von $p < 0.05$ auf $p < 0.01$ bzw. $p < 0.003$ reduziert.

Für die Embryonalen Datensätze wurden folgende Grenzwerte festgelegt:

E15.5: WAD $\pm 2 \sigma$ des mittleren WAD-Werts, $p < 0,003$

WAD $\pm 3 \sigma$ des mittleren WAD-Werts, $p < 0,01$

4.5 Gene Enrichment Analysen

Die *Gene Enrichment* Analysen (GEA) wurden mit der Datenplattform *ToppGene Suite* (Chen et al. 2007) durchgeführt. Für die GEAs der *Principal Component* Analysen wurden je 100 Gene untersucht, die am meisten zur genotypdefinierenden *Principal Component* beitragen. Für die GEAs der signifikant deregulierten Gene wurden alle Gentranskripte verwendet, die in den entsprechenden Gehirnregionen nach den in 4.4. genannten Kriterien signifikant differenziell exprimiert werden. Die *ToppGene Suite* ermöglicht den Abgleich von Gentranskripten mit einer Vielzahl von Datenbanken. Innerhalb der entsprechenden Teilmenge kann durch die Verwendung der *ToppFun* Funktion mittels der hypergeometrischen Verteilung überprüft werden, ob es eine signifikante Anreicherung von Transkripten in folgenden Kategorien gibt: *GO: Molecular Function*, *GO: Biological Process*, *GO: Cellular Component*, *Human Phenotype*, *Mouse Phenotype*, *Domain*, *Pathway*, *Pubmed*, *Interaction*, *Cytoband*, *Transcription Factor Binding Site*, *Gene Family*, *Coexpression*, *Coexpression Atlas*, *ToppCell Atlas*, *Computational*, *MicroRNA*, *Drug*, *Disease*. Für die vorliegende Arbeit wurden die Genlisten der PCAs und der differenziell exprimierten Gene auf alle Kategorien untersucht. Für die Berechnung des p-Werts wurde die Wahrscheinlichkeitsdichtefunktion verwendet. Als p-Wert Korrektur für multiples Testen wurde eine *false discovery rate* < 0.05 vorausgesetzt. Aufgrund der Übersichtlichkeit und der Aussagekraft, sind in den Ergebnissen der GEAs nur die drei signifikantesten Anreicherungen der Kategorien *GO: Biological Process* und *GO: Cellular Component* aufgeführt.

4.6 Genotypisierung der Versuchstiere

Für die Bestimmung des *Nrg1* Genotyps wurde jedem Versuchstier eine Gewebeprobe entnommen. Aus den Gewebeproben wurde genomische DNA extrahiert, 1:10 verdünnt und in einer Genotypisierung-PCR analysiert (MyTaq Extract-PCR Kit, Meridian Bioscience, Cincinnati, USA). Die Primer F_Exon7_Nrg1 und R_Intron7-8_Nrg1 detektieren eine Zielsequenz im intakten *Nrg1* Allel (459 bp). Die Primer F_Exon7_Nrg1 und R_lacZ_Nrg1 detektieren die inserierte lacZ Sequenz des *Nrg1 knockout* Allels (314 bp). Durch anschließende Gelelektrophorese können *Nrg1*^{+/+} und *Nrg1*^{+/-} Individuen anhand des Bandenmusters unterschieden werden. Die einzelnen PCR Komponenten und das Protokoll der Genotypisierungs-PCR können Tabelle 10 entnommen werden.

Tabelle 10: Reaktionskomponenten, eingesetzte Konzentrationen, Volumina und Cycling Programm der *Nrg1* Genotypisierungs PCR

PCR- Komponenten	Endkonzentration
MyTaq HS red mix	1x
F_Exon7_Nrg1	800 nM
R_Intron7-8_Nrg1	400 nM
R_lacZ_Nrg1	400 nM
Genomische DNA (1:10)	2 µl total
ddH ₂ O	Ad 25 µl

PCR-Programm	Temperatur	Zeit	Zyklen
Initiale Denaturierung	95 °C	3 min	1
Denaturierung	95 °C	15 s	35
Annealing	56 °C	15 s	
Elongation	72 °C	20 s	

4.7 Gewebepräparation embryonaler und postnataler Mausgehirne

Für die Extraktion totaler RNA und die Herstellung von Proteinlysaten, wurde embryonales und postnatales Gehirngewebe präpariert. Dazu wurden die Versuchstiere mit CO₂ narkotisiert und dekapitiert. Für die Präparation von embryonalem Gewebe wurde nach der Dekapitation die Bauchhöhle des Muttertiers geöffnet, der Uterus entnommen und die Embryonen aus den Embryonalhäuten isoliert. Das genaue Entwicklungsstadium der Embryos wurde nach den Richtlinien von Theiler bestimmt (Theiler und Westphal 1989).

Die Vorgehensweise für die Präparation embryonaler und postnataler Gehirnregionen wurde in früheren Arbeiten ausführlich beschrieben. Dort kann die Entnahme des anterioren Thalamus, frontalen Cortex, posterioren Thalamus und somatosensorischen Cortex schrittweise, graphisch und textlich nachvollzogen werden (Lachenmaier 2019; Kaiser 2011).

Für *in situ* Hybridisierungen und immunfluoreszente Färbungen wurden mit einem Kryomikrotom embryonale und postnatale, coronale Gehirnschnitte angefertigt. Dazu wurden embryonale Versuchstiere dekapitiert. Postnatalen Versuchstieren wurde die Schädelkapsel geöffnet und das Gehirn entnommen. Die embryonalen Köpfe und postnatalen Gehirne wurden über dem Dampf von flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur Anfertigung der Kryomikrotomschnitte bei -80 °C gelagert.

4.8 Herstellung von Kryomikrotomschnitten

Die embryonalen Köpfe und postnatalen Mausgehirne, wurden mit einem Kryomikrotom (CM 3050, Leica, Wetzlar, Deutschland) in 20 µm dicke, coronale Schnitte geschnitten. Dabei wurden von jedem Präparat vier parallele Schnittserien angefertigt. Die Präparate wurden am caudalen Ende auf dem Objektisch fixiert (FSC 22 Blue, Leica, Wetzlar, Deutschland) und so orientiert, dass die Klinge von dorsal nach ventral durch das Präparat schneidet. Die Temperaturen des Kryomikrotoms wurden auf -16°C Objekttemperatur und -18°C Kammertemperatur eingestellt. Die angefertigten Schnitte wurden auf SuperFrost Plus Adhäsionsobjektträger (VWR, Radnor, USA) aufgenommen, drei Stunden bei 56°C auf einer Heizplatte getrocknet und bei -80°C gelagert.

4.9 Extraktion totaler RNA

Die totale RNA der regionsspezifischen Gewebeproben wurde durch eine TRIzol-Extraktion isoliert. Dazu wurde das Gehirngewebe in 0.8 ml TRIzol Reagent (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) mit einem Potter-Elvehjem-Homogenisator homogenisiert. Durch die Zugabe von 200 µl Chloroform trennt sich das Gemisch in eine wässrige Phase, eine Interphase und eine organische Phase. Die totale RNA des Gewebes befindet sich in der wässrigen Phase. Diese wurde entnommen und mit 240 µl absolutem Ethanol versetzt. Anschließend wurde die totale RNA mit MinElute Säulen und dem RNeasy Micro Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) nach Herstellerangaben aufgereinigt. DNA Kontaminationen wurden durch einen DNase Verdau eliminiert (RNase-Free DNase Set, Qiagen, Hilden, Deutschland). Die Elution der totalen RNA erfolgte in RNase freiem Wasser. Die Konzentration der RNA wurde fluorometrisch gemessen (Qubit 3.0, RNA BR Assay-Kit, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA).

Für die nachfolgenden Genexpressionsanalysen wurden RNA-Proben von mehreren Individuen *gepooled*. Die eigens angefertigten RNA-*pools* beinhalten die regionsspezifische RNA von je zwei Individuen eines Genotyps. Darüber hinaus wurden RNA-Proben verwendet, die bereits von Philipp Kaiser erzeugt und bei -80°C gelagert wurden. Die RNA-*pools* von Kaiser enthalten regionsspezifische RNA von je vier Individuen eines Genotyps von je mindestens zwei Müttern. Die Isolationsprozedur der RNA und deren Qualitätskontrolle kann der Dissertation von Kaiser entnommen werden (Kaiser 2011). In Tabelle 11 sind alle embryonalen RNA-*pools* gelistet, die für die Genexpressionsanalysen der vorliegenden Arbeit verwendet wurden.

Tabelle 11: Embryonale RNA pools, die für die Genexpressionsanalysen der vorliegenden Arbeit verwendet wurden. AT: Anteriorer Thalamus, FC: Frontaler Cortex, PT: Posteriorer Thalamus, SC: Somatosensorischer Cortex. +/+ und +/- entsprechen den *Nrg1* Genotypen. PK: Gewebepreparation und RNA Isolation wurden von Philipp Kaiser durchgeführt. Die pools enthalten RNA von 4 Individuen. LL: Gewebepreparation und RNA Isolation wurden von Lukas Lachenmaier durchgeführt. Die pools enthalten RNA von 2 Individuen.

LL							
AT		FC		PT		SC	
+/+	+/-	+/+	+/-	+/+	+/-	+/+	+/-
201	204	207	210	213	216	219	222
202	205	208	211	214	217	220	223
203	206	209	212	215	218	221	224

PK							
AT		FC		PT		SC	
+/+	+/-	+/+	+/-	+/+	+/-	+/+	+/-
35	31	34	30	36	32	33	29
39	75	38	54	40	56	37	53
88	96	50	58	89	129	49	94
		66	70				
		87	74				

4.10 cDNA Synthese - Reverse Transkription

Für die reverse Transkription der embryonalen RNA-pools wurden 250-750 ng totale RNA eingesetzt. Um die Genexpression multipler Gentranskripte zu analysieren, wurden *random hexamer Primer* verwendet (2.5 µM Endkonzentration). Die Synthese der cDNA wurde mit dem *SuperScript IV Reverse Transcriptase Kit*, entsprechend den Herstellerangaben durchgeführt. Als RNase Inhibitor wurde RiboLock verwendet. Nach Synthese der cDNA wurden RNA-DNA Hybride und die verbliebenen RNA Einzelstränge durch RNase H (0.25 U/µl Endkonzentration, 20 min 37°C) und RNase A (0.5 µg/µl Endkonzentration, 10 min 68 °C) enzymatisch verdaut (alle Reagenzien Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA). Abschließend wurde die cDNA aufgereinigt (*DNA-Clean & Concentrator Kit*, Zymo, Freiburg, Deutschland), in DNase freiem Wasser eluiert und die Konzentration in Dreifachmessungen spektralphotometrisch bestimmt (NanoDrop, VWR, Radnor, USA). Entsprechend der beschriebenen Vorgehensweise, wurden alle in Tabelle 11 aufgelisteten embryonalen RNA-pools revers transkribiert. Die entsprechenden cDNA-pools wurden mit denselben Identifikationsnummern beschrieben. Um Verunreinigungen durch genomische DNA zu identifizieren, wurde für jeden RNA-pool eine *no-RT (no reverse transcriptase)* Kontrolle angefertigt.

4.11 Digital droplet PCR (ddPCR)

Die Transkription der Gene *Nrg1*, *Micu3*, *Mtmr7*, *Vps37a* und *Zdhhc2* (*Genes of interest*, GOIs) wurde im anterioren Thalamus, frontalen Cortex, posterioren Thalamus und somatosensorischen Cortex von *Nrg1*^{+/+} und *Nrg1*^{+/-} Embryos mit quantitativen ddPCR Messungen analysiert. Dazu wurde die Genexpression der Gentranskripte gegen die Expression von drei *housekeeping* Genen (HKG; *Eif1*, *Pgk1*, *Polr2a*) normalisiert. Für maximale Spezifität und Sensitivität wurden TaqMan-Sonden basierte Duplexmessungen durchgeführt. Die verwendeten TaqMan-Sonden tragen am 3' Ende einen *Black Hole Quencher*, der die Fluoreszenz eines Fluorophors am 5' Ende der Sonde unterdrückt. Während der Amplifikation der Zielsequenz, wird die TaqMan-Sonde durch die 5'-3' Exonuklease Aktivität der Polymerase hydrolysiert. Dadurch werden *Black Hole Quencher* und Fluorophor voneinander getrennt und es entsteht ein detektierbares Fluoreszenzsignal. Die TaqMan-Sonden der GOIs wurden am 5' Ende mit HEX-Fluorophoren markiert, die TaqMan-Sonden der HKGs mit FAM-Fluorophoren. Dadurch können in einer Duplexmessung die Transkriptanzahl eines GOIs und eines HKGs gleichzeitig und unabhängig voneinander bestimmt werden.

Zur Bestimmung der relativen Transkriptzahlen, wurden in einer Duplexmessung 2.5 – 5 ng cDNA analysiert. Die Amplifikationsprimer des GOIs und HKGs wurden mit einer Endkonzentration von je 900 nM eingesetzt. Die TaqMan-Sonden des GOIs und HKGs mit einer Endkonzentration von je 250 nM. Für jeden embryonalen cDNA-*pool* wurden drei Duplexmessungen durchgeführt, in denen jeweils das entsprechende GOI und eines der drei HKG analysiert wurde. Als Negativkontrolle wurde für jeden embryonalen cDNA-*pool* eine *no-RT* Messung durchgeführt. Die analysierten embryonalen cDNA-*pools* und die einzelnen ddPCR-Reaktionskomponenten können den Tabellen 12 und 13 entnommen werden. Für die Herstellung der ddPCR-*droplets*, werden die ddPCR-Reaktionskomponenten in eine 96-Well Platte überführt und versiegelt (PCR Plate Heat Seal, PX1 PCR Plate Sealer). Das Generieren der *droplets* erfolgt vollautomatisiert mit dem *Automated Droplet Generator*. Dieser wird mit den benötigten Verbrauchsmaterialien beladen (*Automated Droplet Generator Cartridges*, *Automated Droplet Generation Oil for Probes*, *Pipet Tips for the AutoDG System*) und erstellt eine Emulsion der ddPCR-Reaktionskomponenten. Die Emulsion enthält bis zu 20 000 unabhängige Tröpfchen, wodurch die nachfolgende PCR (ddPCR *Supermix for Probes*, C1000 *Touch Thermal Cycler*) in bis zu 20 000 unabhängige Reaktionen unterteilt wird (alle Geräte und Materialien von Bio-Rad, Hercules, USA).

Tabelle 12: Embryonale cDNA-pools, die für die ddPCR Messungen der jeweiligen Gentranskripte verwendet wurden. AT: Anteriorer Thalamus, FC: Frontaler Cortex, PT: Posteriorer Thalamus, SC: Somatosensorischer Cortex. +/+ und +/- entsprechen den *Nrg1* Genotypen.

<i>Nrg1</i>							
AT		FC		PT		SC	
+/+	+/-	+/+	+/-	+/+	+/-	+/+	+/-
201	204	207	210	213	216	219	222
202	205	208	211	214	217	220	223
203	206	209	212	215	218	221	224
<i>Mtmt7</i>							
AT		FC					
+/+	+/-	+/+	+/-				
201	204	38	30				
202	205	50	58				
203	206	66	70				
<i>Micu3</i>							
AT		FC		PT		SC	
+/+	+/-	+/+	+/-	+/+	+/-	+/+	+/-
35	31	34	30	36	32	33	29
39	75	66	54	40	56	37	53
88	96	87	74	89	129	49	94
<i>Vps37a</i>							
AT		FC		PT		SC	
+/+	+/-	+/+	+/-	+/+	+/-	+/+	+/-
35	31	34	30	36	32	33	29
39	75	50	54	40	56	37	53
88	96	66	58	89	129	49	94
		87	74				
<i>Zdhhc2</i>							
AT		FC		PT		SC	
+/+	+/-	+/+	+/-	+/+	+/-	+/+	+/-
35	31	34	30	36	32	33	29
39	75	38	54	40	56	37	53
88	96	50	58	89	129	49	94
		66	70				
		87	74				

Am Ende der Reaktion werden die *droplets* nur binär, in fluoreszierende und nicht-fluoreszierende Tröpfchen unterteilt. Dadurch sind ddPCR-Analysen unabhängig von Amplifikationseffizienzen und erreichen ohne die Notwendigkeit von Eichkurven eine deutlich höhere Genauigkeit und Sensitivität als herkömmliche qPCR Methoden (Hindson et al. 2011). Die digitale Auswertung der einzelnen *droplets* erfolgt durch den *Droplet Reader QX200* in ddPCR *Droplet Reader Oil* und die zugehörige Software *QuantaSoft* (Version 1.7.4, Bio-Rad, Hercules, USA). Das Gerät misst die Fluoreszenzintensität der einzelnen *droplets* und kategorisiert diese durch die Anwendung eines Grenzwertes als positiv oder negativ. Dadurch ergeben sich zwei Dropletpopulationen, in denen die untersuchte Zielsequenz amplifiziert wurde, oder nicht.

Die Verteilung der Gentranskripte in die *droplets* erfolgt zufällig, sodass einzelne *droplets* kein Gentranskript, ein Gentranskript oder selten mehrere Gentranskripte enthalten können. Durch die zufällige Verteilung der Transkripte, kann die Fluoreszenzintensität der *droplets* nach der ddPCR mit einer Poisson Verteilung abgebildet werden. Über den Anteil der positiven *droplets* mit ihren Fluoreszenzintensitäten (0x, 1x, 2x, ...), kann über die Poisson Verteilung bestimmt werden, wie viele Transkripte zu Beginn der Reaktion vorhanden waren. Dadurch ermöglichen ddPCR Genexpressionsanalysen eine absolute Quantifikation von Gentranskripten und das Detektieren von geringen Genexpressionsunterschieden mit hoher statistischer Sicherheit.

Zur Berechnung der relativen Genexpression wurde das Verhältnis von GOI/HKG-Transkripten bestimmt. Die Verhältnisse der biologischen Replikate wurden geometrisch gemittelt. Die geometrisch gemittelten Verhältnisse des Genotyps *Nrg1*^{+/+} wurden als 100% Expressionswert des entsprechenden GOIs definiert. Die Verhältnisse des Genotyps *Nrg1*^{+/-} wurden auf diesen Wert normalisiert und arithmetisch gemittelt. Zur Überprüfung statischer Signifikanz wurden zweiseitige Einstichproben t-Tests mit Signifikanzniveau $\alpha < 0.05$ durchgeführt.

Tabelle 13: Reaktionskomponenten, eingesetzte Konzentrationen, Volumina und Cycling Programm der digital droplet PCR. Für die Genexpressionsanalyse der verschiedenen Transkripte wurden unterschiedliche Annealing Temperaturen verwendet ($T_{\text{ANNEALING}}$). *Nrg1*: 56 °C, *Zdhhc2*: 59°C, *Vps37a*: 57°C, *Micu3*: 57°C, *Mtmr7*: 59°C.

ddPCR Reaktionskomponenten	Endkonzentration
ddPCR Supermix for Probes	1x
GOI fwd Primer	900 nM
GOI rev Primer	900 nM
HKG fwd Primer	900 nM
HKG rev Primer	900 nM
GOI TaqMan-Sonde	250 nM
HKG TaqMan- Sonde	250 nM
cDNA	2.5 – 5ng total
DNase freies H ₂ O	Ad 22 µl

PCR Programm	Temperatur	Zeit	Zyklen	Ramp Rate
Initiale Denaturierung	95 °C	10 min	1	2 °C / s
Denaturierung	94 °C	30 s	40	
Annealing	T _{ANNEALING}	1 min		
Elongation	61 °C	1 min		
Enzymdeaktivierung	98 °C	10 min	1	

4.13 Template-Klonierung und Transkription Hapten-markierter RNA-Sonden

Für die *in situ* Hybridisierungen der vorliegenden Arbeit wurden gentranskriptspezifische, Hapten-markierte, RNA *antisense* Sonden hergestellt. Dazu wurden die Zielsequenzen der Gentranskripte kloniert (pBluescript I KS (+), Agilent, Santa Clara, USA), in elektrokompetente *E. coli* Bakterien (XL-1 Blue, Agilent, Santa Clara, USA) transformiert und *in vitro* transkribiert.

Für die Klonierung der genspezifischen Zielsequenzen, wurden die Amplifikationsprimer am 5' Ende mit Restriktionsschnittstellen modifiziert. Für maximale Spezifität wurden die Zielsequenzen der cDNA mit einer *Touchdown* PCR amplifiziert. Einzelne Komponenten und das Programm der *Touchdown* PCR können Tabelle 14 entnommen werden. Die PCR-Produkte der Zielsequenzen und der Klonierungsvektor wurden für eine zielgerichtete Insertion mit den gleichen Restriktionsenzymen geschnitten (NEB, Ipswich, USA). Für die Ligation (T4 DNA Ligase, NEB, Ipswich, USA) wurde der Vektor dephosphoryliert (rSAP, NEB, Ipswich, USA), *Insert* und Vektor wurden in einem Verhältnis von 5:1 eingesetzt. Die erfolgreiche Transformation von Zellen wurde durch Ampicillin selektiert. Positive Klone, wurden durch eine *Colony* PCR und Sequenzierung (Eurofins Scientific, Luxemburg, Luxemburg) identifiziert und in Glycerin Dauerkulturen bei -80°C gelagert.

Tabelle 14: Reaktionskomponenten, eingesetzte Konzentrationen, Volumina und Cycling Programm der *Touchdown* PCR. Für die *Touchdown* PCR wurden Klonierungsprimer verwendet, denen am 5' Ende nicht komplementäre Basenpaare angehängt wurden, um eine Restriktionsschnittstelle zu inserieren. $T_{\text{ANNEALING1}}$ entspricht der Schmelztemperatur der komplementären Basenpaare des Primers. $T_{\text{ANNEALING2}}$ entspricht der Schmelztemperatur des gesamten Primers. Nicht komplementäre Basenpaare der Klonierungsprimer sind in Tabelle 8 gekennzeichnet.

Touchdown PCR Reaktionskomponenten	Endkonzentration			
Fwd Primer GOI	500 nM			
Rev Primer GOI	500 nM			
dNTPs	200 µM			
Phusion Polymerase (Thermo Fisher)	1 U total			
5x Phusion HF Buffer (Thermo Fisher)	1x			
cDNA	5 ng total			
H ₂ O	Ad 50 µl			
Touchdown PCR Programm	Temperatur	Zeit	Zyklen	Touchdown
Initiale Denaturierung	98	30 s	1	
Denaturierung	98	10 s	12	$T_{\text{ANNEALING1}}$ – 0.5 °C pro Zyklus
Annealing	$T_{\text{ANNEALING1}}$	30 s		
Elongation	72	30 s		
Denaturierung	98	10 s	30	
Annealing	$T_{\text{ANNEALING2}}$	30 s		
Elongation	72	30 s		
Finale Elongation	72	10 min	1	

Nach diesem Vorgehen wurden Zielsequenzen der Transkripte von *Micu3*, *Vps37a*, *Zdhhc2*, *Eif1*, *Sstr2*, *Er81* und *Rgs8* kloniert. Die verwendeten Amplifikationsprimer können Tabelle 8 entnommen werden. Für die Detektion von *Nrg1* Transkripten klonierte Philipp Kaiser eine *Nrg1* Zielsequenz nach gleichem Vorgehen (Kaiser 2011). Für die vorliegende Arbeit wurde auf dieses Genkonstrukt zurückgegriffen.

Für die *in vitro* Transkription der Hapten-markierten RNA *antisense* Sonden wurden die entsprechenden Plasmide aus *E. coli* Flüssigkulturen isoliert (QIAprep Spin Miniprep Kit, Qiagen, Hilden, Deutschland). Für die Herstellung von *antisense* Sonden, wurden die Plasmide am 5' Ende der inserierten Zielsequenz mit den entsprechenden Restriktionsenzymen linearisiert. 3'-Überhänge der Restriktionsschnittstellen wurden enzymatisch entfernt (T4 DNA Polymerase, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) in Anwesenheit von 100µM jedes dNTPs. Nach Aufreinigung (QIAquick PCR Purification Kit, Qiagen, Hilden, Deutschland), wurden die *antisense* RNA Sonden mit T3- oder T7-RNA Polymerasen (Roche, Basel, Schweiz) *in vitro* transkribiert. Für die Hapten-Markierung der RNA-Sonden wurden Fluorescein (FLU) und Digoxigenin (DIG) markierte UTP-Nukleotide verwendet (DIG RNA-Markierungsmix, FLU RNA-Markierungsmix, Roche, Basel). Nach Synthese wurden die *antisense* RNA-Sonden durch eine Lithiumchlorid-Ethanol Fällung isoliert und aufgereinigt. Die Qualität der Sonden wurde, in denaturiertem Zustand, durch Gelelektrophorese überprüft und die Konzentration fluorometrisch bestimmt (Qubit 3.0, RNA BR Assay-Kit, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA). Die einzelnen Komponenten der *in vitro* Transkription und die Aufreinigung der RNA-Sonden können Tabelle 15 entnommen werden.

Für die vorliegende Arbeit wurden Hapten-markierte *antisense* RNA-Sonden gegen die Gentranskripte von *Nrg1*, *Micu3*, *Vps37a*, *Zdhhc2*, *Eif1*, *Sstr2*, *Er81* und *Rgs8* synthetisiert. Der von den Sonden detektierte Zielbereich, die Länge der Sonden, deren GC-Gehalt und die verwendeten Hybridisierungstemperaturen können Tabelle 9 entnommen werden.

Tabelle 15: *In vitro* Transkription Hapten-markierter RNA *antisense* Sonden.

IVT Reaktionskomponenten	Endkonzentration	Inkubation
Linearisiertes Plasmid	1µg total	
10x DIG/FLU-Markierungsmix (Roche)	1x	
10x Transcription Buffer (Roche)	1x	
T3 / T7 RNA-Polymerase (Roche)	40 U total	
RiboLock (Thermo Fisher)	20 U total	
RNase freies H ₂ O	Ad 20 µl	3h 37 °C

4.14 Quantitative, multiplexierte, fluoreszente *in situ* Hybridisierung (qmFISH)

Die quantitative, multiplexierte fluoreszente *in situ* Hybridisierung (qmFISH) beschreibt ein noch nicht publiziertes Verfahren, das im hiesigen Labor entwickelt wurde. Die Methode beruht auf der Idee der *Tyramide Signal Amplification* Technologie (TSA), erlaubt jedoch durch die Verwendung chemisch modifizierter Fluoreszenzfarbstoffe die bessere Quantifizierung von Gentranskripten. Die TSA Technologie verwendet Fluorophor markierte Tyramide, die enzymatisch radikalisiert werden und mit elektronenreichen Verbindungen im Gewebe reagieren. Zu Beginn der Reaktion, sind dies vor allem Tyrosinreste von Proteinen. Nach der initialen Deposition des ersten Tyramids, dienen die Tyramide selber als elektronenreiche Verbindungen, sodass lange Ketten aus multiplen, Fluorophor gekoppelten Tyramiden entstehen. Diese Polymerisation der Fluorophore kann zu Fluorophor-Crowding und *Quenching* führen. Ist dies der Fall, verhält sich die Fluoreszenzintensität nicht mehr linear zu der Anzahl detektierter Moleküle. Dadurch kann die Anzahl von Gentranskripten nicht verlässlich quantifiziert werden.

Um die Polymerisation von Fluorophoren zu umgehen, werden in der qmFISH Methyldopamid-gekoppelte Fluorophore verwendet (eigene Herstellung aus 3-Methoxytyraminhydrochlorid (Merck, Darmstadt, Deutschland) und N-Hydroxysuccinimidestern der Fluorophore (Thermo Fisher, Waltham, USA) in Gegenwart von 1,1-fachem molarem Überschuss von Triethylamin in trockenem DMSO). Durch die zusätzliche Methoxy-Gruppe im Dopamid wird die Ausbildung von Polymerketten unterbunden, da der Ankerpunkt für das nächste Molekül blockiert wird. Dadurch werden die Fluorophore als Monomere im Gewebe deponiert und die Fluoreszenzintensität steigt linear mit der Anzahl der detektierten Moleküle. Entsprechend kann die Intensität und damit die Anzahl von Gentranskripten linear quantifiziert werden.

Für die Durchführung der qmFISH wurden 20 µm dicke, embryonale und postnatale, coronale Gehirnschnitte verwendet. Alle Materialien wurden zertifiziert RNase frei erworben oder drei Stunden bei 180°C gebacken. Reagenzien wurden mit 0.1% Diethylpyrocarbonat (DEPC) versetzt und autoklaviert oder mit DEPC-behandeltem Wasser und RNase freien Chemikalien angesetzt.

Vor der Hybridisierung der *antisense* RNA-Sonden wurden die Gehirnschnitte mit 4% Paraformaldehyd in PBS chemisch fixiert (10 min) und in 0.2 M Salzsäure permeabilisiert (10 min). Durch 3% H₂O₂ wurden endogene Peroxidasen inaktiviert (25 min), um das unspezifische Umsetzen von Methyldopamiden zu vermeiden. Die Inkubation in 5mM Acetanhydrid in 0.1M Triethanolamin (TEA, pH 8, 10 min) reduziert unspezifische Ionenbindungen der RNA-Sonden durch die Acetylierung von freien Aminogruppen. Zwischen allen Behandlungsschritten wurden die Gehirnschnitte für fünf Minuten in PBS gewaschen. Die Hybridisierung der RNA-Sonden (2 ng/µl Endkonzentration) erfolgte bei der Hybridisierungstemperatur der niedriger schmelzenden Sonde (Tab. 9) in Anwesenheit von Formamid (50%), SSC-Kochsalzlösung (5x), blockierenden

RNAs (400ng/μl RNase freie *Torula* RNA, 100ng/μl tRNA) und Denhardt's Reagenz (5x), das ebenfalls blockierend wirkt. Die Objektträger mit der Hybridisierungslösung wurden mit silanisierten Deckgläsern (PlusOne Repel-Silane ES, GE Healthcare, Chicago, USA) abgedeckt und über Nacht bei der entsprechenden Hybridisierungstemperatur (Hybridisierungsofen, GFL, Burgwedel, Deutschland) in einer feuchten Kammer (50% Formamid, 5x SSC) inkubiert.

Nach Hybridisierung der RNA-Sonden, wurden überschüssige und unspezifisch gebundene RNA-Sonden durch mehrfaches stringentes Waschen in Formamid- und SSC-Lösungen ausgewaschen (5xSSC, 50% Formamid bei Hybridisierungstemperatur, 30min; 0,2x SSC bei Hybridisierungstemperatur, 60min; 0,2x SSC bei Raumtemperatur, 15min). Die Detektion der Hapten-markierten *antisense* RNA-Sonden erfolgt durch Peroxidase-Konjugate (POD), die an Fab-Fragmente gegen die entsprechenden Haptene gekoppelt sind. In der vorliegenden Arbeit wurden anti-Digoxigenin- und anti-Fluorescein-POD-Konjugate verwendet (Roche, Basel, Schweiz). Um unspezifische Bindungen der POD-Konjugate zu minimieren, wurden die Schnitte eine Stunde in 2% Blocking Reagenz (Roche, Basel, Schweiz) in MaBS Puffer inkubiert. Danach wurden ohne Waschschrift die entsprechenden Peroxidase-Konjugate zugegeben (1:1500 in 2% Blocking Reagenz, Stock: 125 mg/ml). Die Antikörperinkubation erfolgte über Nacht in einer feuchten Kammer (MaBS) bei 4°C.

Überschüssige und nicht gebundene POD-Konjugate wurden ausgewaschen. Danach erfolgte die Färbereaktion durch die Verwendung der beschriebenen Methyldopamide (Alexa488 MD, Cy3B MD, Synthese im hiesigen Labor). Dazu wurden mutarotierte Glucose (300 mM), DETAPAC (15 μM), das entsprechende Methyldopamid (5 μM) und Vanillin (0.64 mg/ml) in Boratpuffer (100 mM, pH=8.5) gelöst. Der Lösung wurden final 5U Glucose-Oxidase (Merck, Darmstadt, Deutschland) zugegeben. Danach wurde die Lösung umgehend auf den Objektträger pipettiert und mit einem Deckglas abgedeckt. Für die Färbereaktion wurden die Objektträger für eine Stunde bei Raumtemperatur in einer abgedunkelten Feuchtekammer (PBS) inkubiert. Die Glucose-Oxidase setzt die in der Lösung enthaltene Glucose mit Luftsauerstoff in Glucuronsäure und Wasserstoffperoxid um. Unter Anwesenheit von Wasserstoffperoxid, radikalisieren die POD-Konjugate die Fluorophor gekoppelten Methyldopamide, die im umliegenden Gewebe deponiert werden. Vanillin dient als Verstärker der Färbereaktion und erhöht das Signal/Hintergrund-Verhältnis wesentlich (Lauter et al. 2011). Vermutlich werden die Vanillin-Moleküle mit höherer Effizienz von den POD-Konjugaten umgesetzt als die Methyldopamide und entreißen wiederum Elektronen von den Methyldopamiden, sodass in der gleichen Zeit mehr Fluorophore deponiert werden können. Nach der Färbereaktion wird überschüssiger Farbstoff ausgewaschen.

Durch die Verwendung von *antisense* RNA-Sonden mit verschiedenen Hapten-Markierungen, können mehrere Gentranskripte multiplexiert untersucht werden. Dazu wurde das erste POD-

Konjugat nach der ersten Färbereaktion durch 0.1 M Glycin (pH 2, 10 min) und 6% H₂O₂ (30 min) inaktiviert. Danach wurden die Gewebeschnitte erneut blockiert und das zweite Peroxidase-Konjugat gegen das zweite Hapten zugegeben. Für die zweite Färbereaktion, wurde das entsprechende, noch nicht verwendete Methyldopamid genutzt. Nach der letzten Färbereaktion wurden die Zellkerne mit DAPI gefärbt, um die allgemeine Zytoarchitektur der Gehirnschnitte zu visualisieren (1:1000 in PBS, Stock: 1mg/ml, Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland). Abschließend wurden die Objektträger mit Mowiol eingedeckt.

4.15 Auswertung und Quantifizierung der verschiedenen FISH Experimente

Die Auswertung der fluoreszenten *in situ* Hybridisierungen erfolgte mit dem Fluoreszenzmikroskop Axio Imager Z1 und dem Konfokalmikroskop LSM 800 (Zeiss, Oberkochen, Deutschland). Für die Verarbeitung und das Ausmessen der Mikroskopaufnahmen wurden die Bildverarbeitungsprogramme Zen 2 lite (Zeiss, Oberkochen, Deutschland) und FIJI (Fiji is just ImageJ (Schindelin et al. 2012)) genutzt.

qmFISH Genexpressionsanalyse differenziell exprimierter Gentranskripte

Die relative Genexpression von *Micu3*, *Vps37a* und *Zdhhc2* wurde in *Nrg1*^{+/+} und *Nrg1*^{+/-} Embryos mit qmFISH Duplexmessungen analysiert. Dazu wurden die Fluoreszenzintensitäten der einzelnen Gentranskripte im anterioren Thalamus, frontalen Cortex, posterioren Thalamus und somatosensorischen Cortex gemessen und mit den Fluoreszenzintensitäten des *housekeeping* Gens *Eif1* normalisiert. Die relative Genexpression der *Nrg1*^{+/-} Embryos wurde auf die Genexpression der Wildtyp Embryos normalisiert. Die Lage und Abgrenzung der einzelnen embryonalen Gehirnregionen können der Dissertation von Philipp Kaiser entnommen werden (Kaiser 2011). Pro Genotyp wurden vier Individuen aus zwei unabhängigen Würfen analysiert. Für jede Gehirnregion wurden die Fluoreszenzintensitäten mehrerer 20µm dicker Schnitte gemessen. Die Genexpression von *Micu3*, *Vps37a* und *Zdhhc2* wurde in parallelen Schnittserien derselben Individuen analysiert. Zur Überprüfung statischer Signifikanz wurden zweiseitige t-Tests durchgeführt.

Für *Nrg1* wurden qualitative FISHs durchgeführt, um eine mögliche Coexpression von *Nrg1* und *Micu3*, *Vps37a* oder *Zdhhc2* anhand von Verteilungsmustern der Expression zu untersuchen. Dazu wurden radiale Intensitätsprofile gemessen, die den frontalen Cortex vom Ventrikel bis zur Pia durchspannen. Vertikal wurden die Linien so ausgerichtet, dass der Startpunkt der Linie das Lumen des Ventrikels in dorsoventraler Richtung halbiert. Um die Verteilung der Genexpression zu vergleichen, wurden die Intensitätsprofile von *Nrg1*, *Micu3*, *Vps37a* und *Zdhhc2* auf ihre Länge und maximale Fluoreszenz normalisiert und gemeinsam graphisch dargestellt.

Quantitative *Zdhhc2* FISH, cortikale Verteilung *Zdhhc2* positiver Neuronen

Die Verteilung von *Zdhhc2* positiven neuronalen Vorläuferzellen wurde im frontalen Cortex von *Nrg1*^{+/+} und *Nrg1*^{+/-} Embryos mit qualitativen *Zdhhc2* FISHs untersucht. In den Experimenten wurden coronale, 20 µm dicke Schnitte des frontalen Cortex verwendet. Insgesamt wurden sechs *Nrg1*^{+/+} Embryos aus zwei unabhängigen Würfen und acht *Nrg1*^{+/-} Embryos aus vier unabhängigen Würfen analysiert. Für die Versuchsdurchführung wurde das qmFISH Protokoll geringfügig modifiziert. Für die Verstärkung der Färbungsreaktion wurde kein Vanillin verwendet. Stattdessen beruht die Amplifikation des Signals auf einer Sensitivierung des Gewebes. Vor der Färbungsreaktion wurden die Schnitte mit Bolton-Hunter-Reagenz (1mM in PBS, 10 min bei RT) behandelt. Durch Bolton-Hunter-Reagenz (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) werden Aminogruppen mit Tyrosylresten derivatisiert, wodurch zusätzliche elektronenreiche Verbindungen im Gewebe entstehen. Dadurch können mehr Methyldopamid gekoppelte Fluorophore im Gewebe deponiert werden. Alle anderen Schritte der FISH wurden identisch durchgeführt.

Um die Verteilung der *Zdhhc2* positiven Zellen zu quantifizieren, wurde der Bereich des frontalen Cortex analysiert, der medial des Ventrikels liegt. Dieser Teil des frontalen Cortex wurde anhand der DAPI-Färbung in die Ventrikulärzone (VZ), Intermediärzone (IZ) und cortikale Platte (CP) unterteilt. Die Fluoreszenzintensitäten der einzelnen Zonen wurden gemessen und deren Anteil an der Gesamtfluoreszenz bestimmt. Statistische Unterschiede der Fluoreszenzverteilung, zwischen den *Nrg1* Genotypen, wurden durch zweiseitige t-Tests überprüft.

Quantitative *Sstr2* FISH, Zellmigration *Sstr2* positiver exzitatorischer Progenitoren

Die radiale Migration von exzitatorischen Vorläuferzellen wurde mit *Sstr2* (Somatostatin Rezeptor 2) FISHs analysiert. *Sstr2* ist ein Marker für früh migrierende, exzitatorische neuronale Vorläuferzellen in der Subventrikulärzone (Loo et al. 2019; La Manno et al. 2021; Ruan et al. 2021). Für die FISHs wurden coronale, 20 µm dicke Schnitte des frontalen und somatosensorischen Cortex angefertigt. Insgesamt wurden Schnitte von sechs *Nrg1*^{+/+} Embryos aus fünf unabhängigen Würfen und sechs *Nrg1*^{+/-} Embryos aus vier unabhängigen Würfen analysiert. Die *Sstr2* FISHs wurden nach dem qmFISH Protokoll durchgeführt.

Um die Zellmigration zu analysieren, wurden radiale Intensitätsprofile von je drei anatomisch definierten Linien gemessen. Im frontalen Cortex teilt die erste Linie das Lumen des Lateralventrikels in der Hälfte seiner dorsoventralen Länge. Die zweite und dritte Linie, teilen die zwei Hälften der dorsoventralen Ventrikellänge in Viertel. Anhand der DAPI Färbung wurden die Linien möglichst senkrecht zu den Zellschichten ausgerichtet und die Intensitätsprofile vom Ventrikel bis zur Pia gemessen.

Im somatosensorischen Cortex wurden die Linien durch das Ausrichten von Winkelschenkeln definiert. Der Winkelscheitel wurde an den ventralsten Punkt der Mittellinie gelegt, die die embryonalen Gehirnhälften trennt. Der erste Winkelschenkel wurde so ausgerichtet, dass er den dorsalsten Punkt des Ventrikels schneidet. Der zweite Winkelschenkel wurde so ausgerichtet, dass er den lateralsten Punkt des Ventrikels schneidet. Der gebildete Winkel wurde anschließend durch das Anlegen von drei Winkelhalbierenden zuerst halbiert und dann geviertelt. Entlang dieser drei Winkelhalbierenden wurden die Intensitätsprofile des somatosensorischen Cortex vom Ventrikel bis zur Pia gemessen. Als Indikator der absoluten *Sstr2* Expression wurden die absoluten Fluoreszenzintensitäten der Profillinien für beide Genotypen bestimmt. Diese wurden innerhalb eines Experiments auf die *Sstr2* Expression von *Nrg1*^{+/+} Embryos normalisiert und durch zweiseitige Einstichproben t-Tests auf statistische Signifikanz überprüft. Um eine differenzielle Verteilung der Fluoreszenzintensität zu überprüfen, wurden alle gemessenen Intensitätsprofile auf ihre Länge und maximale Fluoreszenzintensität normalisiert. Unterschiede der Fluoreszenzintensitätsverteilung zwischen *Nrg1*^{+/+} und *Nrg1*^{+/-} Embryos wurden durch Kolmogorow-Smirnow-Tests auf statistische Signifikanz überprüft.

Quantitative *Er81* & *Rgs8* FISH, Analyse kortikaler Schichten und Zellverteilungen

Um die Schichtdicke verschiedener Cortexschichten zu analysieren, wurden *in situ* Hybridisierungen gegen Markergene kortikaler Schichten durchgeführt. Der Transkriptionsfaktor *Er81* wird spezifisch in Schicht V Neuronen des Cortex exprimiert (Yoneshima et al. 2006). *Rgs8*, ein G-Protein regulierendes Protein, wird am stärksten in Schicht II Neuronen exprimiert (Gold et al. 1997). Für die FISH Experimente wurden coronale, 20µm dicke Schnitte von *Nrg1*^{+/+} und *Nrg1*^{+/-} P28 Mäusen verwendet. Insgesamt wurden fünf *Nrg1*^{+/+} Mäuse aus drei unabhängigen Würfen und fünf *Nrg1*^{+/-} Mäuse aus zwei unabhängigen Würfen analysiert.

Die *Er81* und *Rgs8* Transkripte wurden entsprechend dem qmFISH Protokoll in einzelnen *in situ* Hybridisierungen unabhängig voneinander detektiert. Dazu wurden Schnitte des frontalen und somatosensorischen Cortex aus parallelen Schnittserien derselben Tiere verwendet. Für die Messung der Fluoreszenzverteilungen und die Bestimmung der kortikalen Schichtdicken wurden radiale Intensitätsprofile von einer anatomisch definierten Linie gemessen, die den Cortex von der weißen Substanz bis zur Pia durchspannt. Im frontalen Cortex wurde als Startpunkt der Profillinie der dorsalste Punkt der weißen Substanz definiert. Für den Endpunkt der Profillinie, wurde die dorsoventrale Länge der Mittellinie gemessen, die die zwei Gehirnhälften voneinander trennt. Die Länge der Mittellinie wurde geviertelt und der Endpunkt des ersten Viertels, von dorsaler nach ventraler Richtung, als Endpunkt der Profillinie definiert. Im somatosensorischen Cortex wurde vom dorsalsten Punkt des Striatums eine radiale Linie bis zu Pia gezogen. Dabei wurde besonders darauf geachtet, dass die Linie möglichst orthogonal zu den kortikalen Schichten verläuft.

Abschließend wurde die Linie so gekürzt, dass der Startpunkt der Profillinie am apikalen Ende des Cortex liegt und keine Fluoreszenzintensitäten in der weißen Substanz erfasst werden.

Zur Bestimmung der relativen *Er81* und *Rgs8* Expression in cortikalen Regionen von *Nrg1*^{+/+} und *Nrg1*^{+/-} Mäusen, wurden die absoluten Fluoreszenzintensitäten der Profillinien gemessen, auf die Genexpression des entsprechenden Transkripts in Wildtyp Mäusen normalisiert und durch zweiseitige Einstichproben t-Tests auf statistisch signifikante Differenzialität überprüft. Um die Verteilung der Gentranskripte und die cortikalen Schichtdicken zu erfassen, wurden die Profillinien auf Länge und maximale Fluoreszenzintensität normalisiert. Veränderungen der Intensitätsverteilungen zwischen *Nrg1*^{+/+} und *Nrg1*^{+/-} Mäusen wurden durch Kolmogorow-Smirnow-Tests auf statistische Signifikanz überprüft.

4.16 NDEL1 Immunpräzipitation und Acyl-Biotin Exchange (IP-ABE) von palmitoyliertem NDEL1

Der Immunpräzipitation und *Acyl-Biotin Exchange Assay* (Brigidi und Bamji 2013) beschreibt eine Technik zur Anreicherung, Detektion und Quantifizierung palmitoylierter Proteine. Die Palmitoylierung von Proteinen ist eine reversible, posttranslationale Lipid-Modifikation, bei der ein Palmitinsäurerest (Palmitat) über eine Thioesterbindung an Cysteinreste angehängt wird. Im IP-ABE assay werden palmitoylierte Proteine durch eine Immunpräzipitation angereichert und die Palmitinsäurereste biochemisch durch Biotin-BMCC-Moleküle ausgetauscht. Diese können abschließend durch SDS-PAGE und Western Blots detektiert und quantifiziert werden.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Palmitoylierung von NDEL1 (NudE Neurodevelopment Protein 1 Like 1) im frontalen und somatosensorischen Cortex von *Nrg1*^{+/+} und *Nrg1*^{+/-} Embryos analysiert. Zur Herstellung von Proteinlysaten, wurden die embryonalen Gehirnregionen spezifisch präpariert und Gewebeproben derselben Gehirnregionen mehrerer Individuen eines Genotyps in eine Probe *gepooled*. Für die Analyse des somatosensorischen Cortex, wurden pro Genotyp sieben embryonale Gewebepools aus drei bis fünf Individuen angefertigt. Insgesamt wurden 27 *Nrg1*^{+/+} Embryos aus zwölf unabhängigen Würfen und 27 *Nrg1*^{+/-} Embryos aus 15 unabhängigen Würfen analysiert. Für den frontalen Cortex wurden pro Genotyp fünf embryonale Gewebepools aus vier bis fünf Individuen angefertigt. Insgesamt wurde der frontale Cortex von 21 *Nrg1*^{+/+} Embryos aus acht unabhängigen Würfen und 21 *Nrg1*^{+/-} Embryos aus 13 unabhängigen Würfen untersucht.

Die wesentlichen Schritte des IP-ABE Protokolls und Abweichungen vom Originalprotokoll werden im folgenden Absatz beschrieben und sind in Abbildung 14 graphisch dargestellt. Die detaillierte Handhabung und schrittweise Durchführung des Protokolls kann der Originalpublikation (Brigidi

und Bamji 2013) entnommen werden. Die genaue Zusammensetzung der verwendeten Puffer ist in Tabelle 16 dargestellt.

NDEL1 Immunpräzipitation und Blockade freier Thiolgruppen durch NEM

Das embryonale Gehirngewebe wurde in 150 µl Lysepuffer mit Protease Inhibitoren (LP, enthält 50 mM NEM) durch mehrfaches Aufziehen durch eine 26.5 Gauge-Kanüle mechanisch homogenisiert und für 30 min bei 4°C inkubiert. Zur Klärung, wurden die Homogenate 30 min bei 16 000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde entnommen. Anschließend wurden dem Proteinlysat 1 µg anti-NDEL1 Antikörper (17262-1-AP, Proteintech, Rosemont, USA) zugegeben. Die Inkubation des Antikörpers erfolgte über Nacht, bei leichter Rotation und 4°C. Das im Lysepuffer enthaltene NEM (N-Ethylmaleinimid) blockiert irreversibel freie Thiolgruppen an Cysteinresten. Dadurch werden potenzielle Ankerstellen für die Biotin-BMCC-Moleküle blockiert. Für die NDEL1 Immunpräzipitation wurden mit Protein G beschichtete, magnetische Dynabeads (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) verwendet. Die Protein-Antikörper Komplexe wurden mit 50 µl Dynabeads versetzt und für drei Stunden bei 4°C und leichter Rotation inkubiert. Für die Präzipitation der magnetischen Dynabeads wurde der DynaMag-2 Magnet (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) verwendet. Der Überstand wurde abgenommen und die Dynabeads in 500 µl LP-Puffer resuspendiert und 10 min auf Eis inkubiert.

Tabelle 16: Verwendete Puffer und Lösungen für die Immunpräzipitation von NDEL1 aus Proteinlysaten, den Acyl-Biotin-Exchange von palmitoyliertem NDEL1 und die Detektion von NDEL1 durch SDS-Gelelektrophorese und Western Blots.

Puffer	Chemikalien
Lysepuffer (LP)	Glycerol 10 % (v/v)
	IGEPAL CA-630 1 % (v/v)
	NaCl 150 mM
	Tris-HCl 50 mM
	NEM 50 mM
	PMSF 10 mM
	cOmplete Inhibitoren 1 Tablette/10 ml
	in ddH ₂ O pH 7.5
LP pH 7.2 / 6.2	LP-Puffer pH-Wert einstellen mit HCl
NEM-Lösung	NEM 2 M In EtOH abs.
Stringenter Waschpuffer	NEM 10 mM SDS 0.1 % (w/v) In LP pH 7.5
HAM-Puffer	HAM 1 M In LP pH 7.2
Biotin-BMCC-Lösung	Biotin-BMCC 8 mM In DMSO
Biotin-BMCC-Puffer	Biotin-BMCC 3 µM In LP pH 6.2
Stripping-Puffer	Glycin 0.1 M SDS 0.1 % (w/v) Tween 20 1 % (v/v) In ddH ₂ O pH 2.2

Spaltung von Thioesterbindungen durch Hydroxylamin (HAM)

Hydroxylamin (HAM) ist stark reduzierend und spaltet die Thioesterbindung zwischen Palmitinsäure und Cysteinrest. Dadurch entstehen neue Thiolgruppen an ursprünglich palmitoylierten Cysteinresten. Diese können mit Biotin-BMCC-Molekülen markiert und abschließend detektiert werden. Als Negativkontrolle für den Acyl-Biotin-Austausch, wurden die Proben halbiert. Eine Hälfte wurde mit HAM behandelt (+HAM), die andere Hälfte wurde nicht mit HAM behandelt (-HAM). Die halbierten Proben wurden mit LP-Puffer erneut auf 500 µl aufgefüllt. Die Dynabeads wurden möglichst kurz im stringenten Waschpuffer gewaschen und anschließend 3x 5 min in LP-Puffer pH 7.2 gewaschen. Für alle Waschschrte wurde 500 µl Gesamtvolumen verwendet. Für den Austausch der Flüssigkeiten wurden die Dynabeads mit dem Magneten fixiert, der Überstand abgenommen und die Dynabeads abseits des Magneten im neuen Medium resuspendiert. Den +HAM Proben wurden 500 µl HAM-Puffer zugegeben, den -HAM Proben wurden 500 µl LP-Puffer pH 7.2 zugegeben. Die Proben wurden exakt eine Stunde bei Raumtemperatur und leichter Rotation inkubiert.

Acyl-Biotin-Austausch durch Biotin-BMCC Verankerung

Nach der HAM-Inkubation wurden die Dynabeads in LP-Puffer pH 6.2 gewaschen. Die Biotin-BMCC-Lösung wurde in wasserfreiem DMSO angesetzt und dem Biotin-BMCC-Puffer in einer Endkonzentration von 3 µM zugegeben. Biotin-BMMC ist ein Thiol-reaktives Biotin-Maleimid-Derivat, das kovalent mit der Thiol Gruppe reagiert, die durch die HAM Behandlung an palmitoylierten Cysteinresten entstanden ist. Dadurch wird ein Palmitinsäurerest durch ein Biotin-BMCC-Molekül ausgetauscht. Die Proben wurden eine Stunde bei 4°C und leichter Rotation in Biotin-BMCC-Puffer inkubiert.

Elution biotinylierter Proteine

Nach dem Acyl-Biotin-Austausch, wurden die Dynabeads einmal mit LP-Puffer pH 6.2 und dreimal mit LP-Puffer pH 7.5 gewaschen. Der Überstand wurde abgenommen, die Proben mit 35 µl 2x SDS Ladepuffer versetzt und für 10 min bei 80 °C inkubiert. Danach wurden die Proben bei Raumtemperatur für 10 min abgekühlt und abzentrifugiert. Die magnetischen Dynabeads wurden präzipitiert und das im Überstand befindliche Proteineluat für die SDS-PAGE verwendet.

SDS-PAGE und Western Blot

Für die SDS-PAGE wurden 10% Polyacrylamid Trenngele verwendet. Die Geltaschen wurden mit Laufpuffer und Spritzen gereinigt. Als Laufpuffer wurde 1x Laemmli-Puffer verwendet. Die SDS-PAGE lief für 15 min bei maximaler Stromstärke und 80V-Spannung, danach für eine Stunde bei 180V-Spannung. Die Proteine wurden durch Western Blots auf PVDF-Membranen übertragen. Zur Aktivierung wurden die PVDF-Membranen beidseitig mit Methanol benetzt.

Die Schwämme und das Whatman-Papier wurden in Western Blot Puffer getränkt. Für die vollständige Übertragung der Proteine wurde zwei Stunden bei maximaler Spannung und 200 mA Stromstärke geblottet.

Detektion der NDEL1 Palmitoylierung

Nach dem Western Blot wurde die Membran entnommen und 2x 10 min bei Raumtemperatur in TBS-Puffer gewaschen. Zur Blockierung unspezifischer Protein-Protein Interaktionen wurde die Membran mit Bovinem Serumalbumin (BSA) blockiert. Dazu wurden 3% BSA in 0.1 % TBST-Puffer (TBS-Puffer + 0.1 % Triton X-100) gelöst und die Membran für eine Stunde bei Raumtemperatur und leichter Rotation blockiert. Die Detektion der NDEL1 Palmitoylierung und der absoluten NDEL1 Proteinmenge erfolgte in zwei unabhängigen Detektionsreaktionen. In der ersten Detektionsreaktion wurden die ausgetauschten Biotin Moleküle (NDEL1 Palmitoylierung) mit Streptavidin gekoppelten Peroxidase-Konjugaten detektiert. In der zweiten Detektionsreaktion wurde die totale NDEL1 Menge durch anti-NDEL1 Antikörper detektiert.

Nach dem Blockieren wurde der Membran die Streptavidin gekoppelter Peroxidase (0.3 µg/ml in 3% BSA in 0.1 %TBST, S5512, Sigma Aldrich, St. Louis, USA) zugegeben. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 4°C und leichter Rotation. Danach wurde die Membran 3x 10 min in TBST-Puffer gewaschen. Die Menge der Streptavidin-Peroxidase wurde durch Chemolumineszenz detektiert (SuperSignal West Pico PLUS Chemilumineszenz Substrat, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) und fotografisch visualisiert und dokumentiert (Amersham Imager 600, GE Healthcare, Chicago, USA). Nach der ersten Detektionsreaktion wurde die Streptavidin-Peroxidase durch *Stripping*-Puffer inaktiviert. Dazu wurde die Membran 2x10 min in *Stripping*-Puffer inkubiert, 2x 10 min in TBS gewaschen und 2x 5 min in TBST gewaschen. Danach wurde die Membran für die zweite Detektionsreaktion erneut blockiert (3% BSA in 0.1 % TBST, 1h bei Raumtemperatur und leichter Rotation).

Für die Detektion der totalen NDEL1 Proteinmenge wurde derselbe Antikörper verwendet wie für die Immunpräzipitation von NDEL1. Der anti-NDEL1 Antikörper (17262-1-AP, Proteintech, Rosemont, USA) wurde der Membran zugegeben (1.8 µg/ml, 3% BSA in 0.1% TBST) und über Nacht bei 4°C und leichter Rotation inkubiert. Die Membran wurde 3x 10 min mit TBST-Puffer gewaschen. Danach wurde der sekundäre Antikörper (VeriBlot for IP Detection Reagent (HRP), Abcam, Cambridge, UK) zugegeben (0.04 µg/ml, 3% BSA in 0.1% TBST) und die Membran für zwei Stunden bei Raumtemperatur und leichter Rotation inkubiert. Die Membran wurde erneut 3x 10 min in TBST gewaschen. Zum Abschluss wurde die totale NDEL1 Proteinmenge erneut durch Chemolumineszenz detektiert und fotografisch dokumentiert.

Zur Quantifizierung der relativen NDEL1 Palmitoylierung, wurden die Chemolumineszenz-Intensitäten beider Detektionsreaktionen mit dem Bildverarbeitungsprogramm FIJI (Fiji is just ImageJ (Schindelin et al. 2012)) gemessen. Der Anteil von palmitoyliertem NDEL1 wurde auf die Gesamtmenge von NDEL1 Protein normalisiert. Innerhalb eines Experimentes, wurde die relative Palmitoylierung von *Nrg1*^{+/-} Embryos auf die relative Palmitoylierung von *Nrg1* Wildtyp Embryos normalisiert. Unterschiede der relativen Palmitoylierung zwischen den Genotypen wurden durch zweiseitige Einstichproben t-Tests auf statistische Signifikanz überprüft.

4.17 Anfertigung embryonaler Ventrikulärzonenexplantate des frontalen Cortex

Um die radiale Zellmigration exzitatorischer, neuronaler Vorläuferzellen *in vitro* zu untersuchen, wurden embryonale Ventrikulärzonenexplantate angefertigt, kultiviert und immunfluoreszent gefärbt. Um Kontaminationen zu vermeiden, wurden alle folgenden Schritte möglichst steril durchgeführt. Falls möglich, wurden die Geräte unter Klasse I Sterilbänken verwendet. Das Präparationsbesteck wurde vor Gebrauch autoklaviert, dem Kulturmedium wurde Antibiotika zugesetzt. Für die Präparation des Gehirns und die Anfertigung der Vibratomschnitte und Gewebestreifen wurde steril filtrierte, gekühlte Hanks Medium verwendet. Die Zusammensetzung der verwendeten Puffer und Kulturmedien kann Tabelle 17 entnommen werden.

Präparation und Kultivierung der embryonalen Ventrikulärzonenexplantate

Für die Anfertigung der Explantate wurden die Embryonen am Embryonaltag 14.5 aus dem Mutterleib entnommen. Die Embryonen wurden nach Theiler (Theiler und Westphal 1989) *gestaged*, zur Bestimmung des Genotyps wurden Gewebeproben entnommen und genotypisiert. Das embryonale Gehirn wurde aus dem Schädel entnommen und in 4 % *low melting* Agarose (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) in Hanks Medium eingebettet. Mit einem Vibratom (VT1000 S, Leica, Wetzlar, Deutschland) wurden 250µm dicke, coronale Gehirnschnitte angefertigt. Die Einstellungen des Vibratoms wurden so gewählt, dass die Schnitte mit hoher Frequenz (8) und niedriger Schnittgeschwindigkeit (3.5) angefertigt wurden. Zur anatomischen Abgrenzung des frontalen Cortex, wurden die Lateralventrikel als Landmarke verwendet. Der erste coronale Schnitt, in dem beide Lateralventrikel vollständig zu sehen sind, wurde verworfen. Die zwei darauffolgenden Schnitte beinhalten den frontalen Cortex und wurden zur Herstellung der Ventrikulärzonenexplantate verwendet. Die coronalen Schnitte wurden auf eine Nitrocellulosemembran (Whatman Filtermembran, Porengröße: 0.45 µm, GE Healthcare, Chicago, USA) überführt und durch mehrmaliges Ansaugen mit einer Vakuumpumpe mit Fritte auf der Membran fixiert. War das Gewebe fixiert, konnte die den Schnitt umgebende Agarose mit Pinzetten entfernt werden.

Die coronalen Gehirnschnitte wurden mit einem *Tissue Chopper* (McIlwain Tissue Chopper, Mickle Laboratory Engineering, Guildford, UK) entlang der dorsoventralen Achse in 300 µm breite, parallele Streifen geschnitten. Anschließend wurden die zwei medialsten Streifen ausgewählt, die die Ventrikulärzone des frontalen Cortex beinhalten. Dabei wurde darauf geachtet, dass die Streifen im Bereich der Subventrikulärzone/Intermediärzone geschnitten wurden. Dadurch befinden sich die Zellkörper der Radialglia Zellen in den ausgewählten Gewebestreifen, während die basalen Fortsätze der Radialglia Zellen durchtrennt werden. Diese können in der Explantatkultur neu ausgebildet werden, sodass exzitatorische Vorläuferzellen entlang den neu ausgebildeten Radialglia Fortsätzen aus der Ventrikulärzone migrieren. Die zwei ausgewählten Streifen wurden, mit dem Gewebe nach unten, auf mit Laminin beschichtete (20 µg/ml, R&D Systems, Minneanapolis, USA), gereinigte Deckgläser gelegt und mit kleinen Metallklötzen beschwert. Die Ventrikulärzonenexplantate wurden mit 400 µl supplementiertem Neurobasalmedium überschichtet und für 24h bei 37°C, 4% CO₂ und 98% relativer Luftfeuchtigkeit inkubiert.

Immunfluoreszenz

Um die radiale Migration in den Ventrikulärzonenexplantaten zu analysieren, wurden die Radialglia Fortsätze und Centrosomen der Zellen immunfluoreszent gefärbt. Die Zellkerne wurden durch DAPI Färbungen visualisiert. Nach 24h Kultivierung, wurden die Ventrikulärzonenexplantate mit Zytoskelett Extraktionspuffer behandelt (1 min, RT) und mit Fixierungslösung chemisch fixiert (30 min, RT). Die Explantate wurden mit PBST (0.1% Triton X-100 in PBS) permeabilisiert (3x 5 min, RT). Unspezifische Protein-Protein Interaktionen wurden durch 1% BSA in PBS blockiert (1h, RT). Die Radialglia Fortsätze wurden durch α-Vimentin Antikörper (0.92 µg/ml in 1% BSA in PBS, ab92547, Abcam, Cambridge, UK) detektiert, zur Visualisierung der Centrosomen wurden α-γ-Tubulin (4 µg/ml in 1% BSA in PBS, T6557, Sigma Aldrich, St. Louis, USA) Antikörper verwendet. Die Inkubation der primären Antikörper erfolgte bei 4°C über Nacht in einer feuchten Kammer. Die Explantate wurden in PBS gewaschen (3x 10 min), anschließend wurden die Sekundärantikörper (α-Maus-Cy3, 5 µg/ml in 1% BSA in PBS (115-165-146, Jackson ImmunoResearch, West Grove, USA), α-Kaninchen-A488, 8 µg/ml in 1% BSA in PBS (A11070, Molecular probes, Eugene, USA)) und DAPI (1:1000 in PBS, Stock: 1mg/ml, Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) zugegeben (alles in 1% BSA in PBS) und für zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Abschließend wurden die Explantate erneut in PBS gewaschen (3x 5 min) und in Mowiol eingebettet.

Tabelle 17: Verwendete Puffer und Lösungen für die Herstellung, Kultivierung und immunfluoreszente Färbung von Ventrikulärzonenexplantaten.

Puffer	Chemikalien		
Hanks Medium	NaCl	8 g/l	
	KCl	0.4 g/l	
	Na ₂ HPO ₄	60 mg/l	
	Na ₂ HPO ₄ H ₂ O	60 mg/l	
	NaHCO ₃	0.35 g/l	
	Glucose	1 g/l	
	HEPES	4.8 g/l	
	Phenolrot	10 mg/l	
	In ddH ₂ O	pH 7.4	
Supplementiertes Neurobasalmedium	L-Glutamin	17 mM	
	B-27-Supplement	1x	
	Penicillin	100 U/ml	
	Streptomycin	100 µg/ml	
	In Neurobasalmedium		
Zytoskelett Extraktionspuffer	Triton X-100	5 %	(v/v)
	MgCl ₂	1 M	
	PIPES	0.1 M	
	EGTA	1 mM	
	in ddH ₂ O		
Fixierungslösung	Saccharose	0.33 M	
	PFA	4 %	(w/v)
	Glutaraldehyd	0.1 %	(w/v)
	In PBS	pH 7.4	

Auswertung der Migrationseffizienz radial migrierender exzitatorischer Progenitoren

Die Auswertung der Ventrikulärzonenexplantate erfolgte mit dem konfokalen *laser scanning* Mikroskop LSM 800 (Zeiss, Oberkochen, Deutschland). Für die Verarbeitung und das Ausmessen der Mikroskopaufnahmen wurden die Bildverarbeitungsprogramme Zen 2 lite (Zeiss, Oberkochen, Deutschland) und FIJI (Fiji is just ImageJ (Schindelin et al. 2012)) genutzt.

Als Effizienzindikatoren der radialen Migration wurden die Abstände des Centrosoms zum Zellkern, der Winkel des Centrosoms zum Radialglia Fortsatz und die basale oder apikale Orientierung des Centrosoms ausgewertet. Der Abstand zwischen Centrosom und Zellkern wurde vom Masseschwerpunkt des Zellkerns bis zum Centrosom gemessen. Um den Winkel zwischen Centrosom und Radialglia Fortsatz zu bestimmen, wurde der erste Winkelschenkel durch das Centrosom und den Masseschwerpunkt des Zellkerns bis zum Radialglia Fortsatz gelegt. Der zweite Winkelschenkel wurde in basaler Richtung entlang des Radialglia Fortsatzes orientiert. Anschließend wurden die gebildeten Innenwinkel gemessen.

Mit dem gemessenen Innenwinkel wurde zusätzlich die Orientierung des Centrosoms kategorisiert. Betrug der Innenwinkel zwischen Centrosom und Radialglia Fortsatz weniger als 90°, wurde die Orientierung des Centrosoms als basal gewertet. War der Winkel größer-gleich 90°, wurde die Orientierung des Centrosoms als apikal gewertet. Anhand der Kategorisierung wurde der relative Anteil von Zellen mit basal orientiertem Centrosom berechnet.

Für die Auswertung wurden ausschließlich Zellen verwendet, die mit einem Radialglia Fortsatz in Kontakt waren, die den Gewebestreifen verlassen hatten und denen ein Centrosom eindeutig zugeordnet werden konnte. Insgesamt wurden 884 radial migrierende Zellen aus 14 Ventrikulärzonenexplantaten des frontalen Cortex ausgewertet. Neun Ventrikulärzonenexplantate wurden aus dem frontalen Cortex von neun *Nrg1*^{+/+} Embryos aus zwei unabhängigen Würfen angefertigt. Fünf Ventrikulärzonenexplantate wurden aus fünf *Nrg1*^{+/-} Embryos aus zwei unabhängigen Würfen angefertigt. Für die Quantifizierung der Centrosom Abstände, Winkel und Orientierungen, wurden die Messwerte eines Explantats und eines Individuums arithmetisch gemittelt. Anschließend wurden die Mittelwerte der einzelnen Individuen innerhalb der *Nrg1* Genotypen arithmetisch gemittelt und durch zweiseitige t-Tests auf statistisch signifikante Unterschiede geprüft.

4.18 Histologische und immunfluoreszente Färbungen von interstitiellen Neuronen in der weißen Substanz

Um interstitielle Neuronen der weißen Substanz (*white matter interstitial neurons*, WMINs) zu zählen, wurden verschiedene neuronale Zellpopulationen histologisch und immunfluoreszent gefärbt. Zellen, die die neuronale Stickstoffmonoxid-Synthase (nNOS, auch NADPH-Diaphorase) enthalten, wurden histologisch durch eine NADPH-Diaphorase-Färbung gefärbt (Gonzalez-Zulueta et al. 2001). Das Enzym reduziert in Anwesenheit von NADPH den histologischen Farbstoff Nitroblautetrazoliumchlorid (NBT), der dadurch im Gewebe ausfällt. Durch Immunfluoreszenz wurden NeuN positive Zellen gefärbt, ein Neuron spezifischer *splicing* Faktor und Marker für postmitotische Neuronen, die sich innerhalb und außerhalb der weißen Substanz befinden. Zur Abgrenzung der weißen Substanz wurden Zellkerne mit DAPI visualisiert und das Protein CNPase (2',3'-Cyclic-nucleotide 3'-phosphodiesterase) immunfluoreszent gefärbt. Die CNPase ist ein Myelin assoziiertes Protein, das ausschließlich in Oligodendrozyten synthetisiert wird und dadurch die weiße Substanz markiert. Zur Durchführung der Färbungen wurden 20 µm dicke, coronale Gehirnschnitte von postnatalen *Nrg1*^{+/+} und *Nrg1*^{+/-} Mäusen (P28) verwendet. Die einzelnen Schnitte der histologischen und immunfluoreszenten Färbungen werden im Folgenden kurz beschrieben. Die verwendeten Puffer und Reagenzien können Tabelle 18 entnommen werden.

Die histologische NADPH-Diaphorase-Färbung wurde entsprechend der Anleitung des publizierten Protokolls durchgeführt (Gonzalez-Zulueta et al. 2001). Dazu wurden die Schnitte fixiert (4% PFA in 0.1 M PB, 30 min, 4°C), dreimal gewaschen (TBS, 3x10 min), permeabilisiert (TBST, 0.2% Triton X-100 in TBS, 30 min) und erneut gewaschen (TBS, 10 min). Zur Färbung wurden die Objektträger in eine Feuchtekammer (0.1 M Tris-HCl) überführt und mit 1.5 ml der NADPH-Diaphorase-Färbelösung (frisch angesetzt und filtriert) überschichtet.

Für die Färbereaktion wurden die Objektträger für 2.5 Stunden bei 37 °C (Hybridisierungsöfen, GFL, Burgwedel, Deutschland) inkubiert. Nach Abschluss der Färbereaktion wurde die Färbelösung entfernt und vollständig abgewaschen (TBS, 5 min).

Für die folgenden immunfluoreszenten Färbungen, wurden unspezifische Protein-Protein Interaktionen im Gewebe blockiert (1% BSA in PBS, 1h). Die Primärantikörper gegen NeuN (ab177487, Abcam, Cambridge, UK) und CNPase (ab6319, Abcam, Cambridge, UK) wurden in 1% BSA gelöst (α -NeuN: 1.64 μ g/ml; α -CNPase: 2 μ g/ml) und auf die Schnitte gegeben. Die Objektträger wurden mit einem Deckglas abgedeckt und über Nacht bei 4°C in einer Feuchtekammer (PBS) inkubiert. Die primären Antikörper wurden von den Objektträgern gewaschen (PBS, 3x10 min), anschließend wurden die Sekundärantikörper (α -Maus-Cy3, 5 μ g/ml in 1% BSA in PBS (115-165-146, Jackson Immunoresearch, West Grove, USA), α -Kaninchen-A488, 8 μ g/ml in 1% BSA in PBS (A11070, Molecular probes, Eugene, USA) und DAPI (1:1000 in PBS, Stock: 1mg/ml, Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) in 1% BSA verdünnt und auf die Objektträger gegeben. Die Objektträger wurden mit einem Deckglas abgedeckt und für zwei Stunden bei Raumtemperatur in einer Feuchtekammer (PBS) inkubiert. Abschließend wurden die Sekundärantikörper von den Objektträgern gewaschen (PBS, 3x10 min) und diese mit Mowiol eingedeckt.

Tabelle 18: Verwendete Puffer und Lösungen für die histologischen und immunfluoreszenten Färbungen von NOS-positiven und NeuN positiven interstitiellen Neuronen der weißen Substanz.

Puffer	Chemikalien
Natriumphosphat Puffer (Stock 1)	NaH ₂ PO ₄ 0.2 M
Dinatriumphosphat Puffer (Stock 2)	Na ₂ HPO ₄ 0.2 M
Natriumphosphat Puffer PB 0.2 M pH 7.4	Stock 1 1 Teil (v/v) Stock 2 4 Teile (v/v)
Fixierungslösung	PFA 4% (w/v) PB Puffer 0.1 M In ddH ₂ O
Reaktionspuffer	Tris-HCl 0.1 M pH 7.2 Triton X-100 0.2 % (v/v) NaN ₃ 0.02 % (w/v)
β -NADPH Lösung	β -NADPH 2 mM in Reaktionspuffer
NBT-Lösung	NBT 0.4 mM In Reaktionspuffer
NADPH-NBT-Färbelösung	β -NADPH Lösung 1 Teil (v/v) NBT-Lösung 1 Teil (v/v)

Quantifizierung und Zählung interstitieller Neuronen der weißen Substanz

Um die gefärbten WMINs auszuzählen, wurden die Gehirnschnitte mit dem Fluoreszenzmikroskop Axio Imager Z1 (Zeiss, Oberkochen, Deutschland) mikroskopiert und fotografiert. Für die Verarbeitung der Mikroskopaufnahmen und das Auszählen der Zellen wurde das Bildverarbeitungsprogramm FIJI (Fiji is just ImageJ (Schindelin et al. 2012)) genutzt. Zur Auszählung der WMINs wurden von jedem Versuchstier fünf anatomisch vergleichbare, coronale Gehirnschnitte verwendet. In den coronalen Schnittserien des jeweiligen Gehirns, wurde der am meisten anterior liegende Schnitt bestimmt, bei dem die weiße Substanz der beiden Gehirnhälften durch das *Corpus callosum* vollständig verbunden war. Dieser Schnitt, sowie die zwei anterior und posterior liegenden Schnitte wurden für die Analyse der WMINs verwendet.

Zur Abgrenzung der weißen Substanz wurden die immunfluoreszenten Färbungen gegen NeuN und CNPase genutzt. NeuN markiert die graue Substanz, CNPase die weiße Substanz. Der Übergang zwischen den beiden Immunfärbungen wurde entsprechend als Grenze der weißen Substanz definiert und manuell markiert. Lateral wurde die weiße Substanz in beiden Gehirnhemisphären durch eine parasagittale Linie abgegrenzt, die den lateralsten Punkt des *Striatums* schneidet. Entsprechend der beschriebenen Vorgehensweise wurde die weiße Substanz jedes analysierten Schnittes abgegrenzt und als *region of interest* (ROI) gespeichert.

Um die NeuN und NOS positiven Zellen in der abgegrenzten weißen Substanz zu zählen, wurden die entsprechenden Bildkanäle separiert und unter der Verwendung eines Intensitätsgrenzwertes binarisiert, um gefärbte Einzelzellen möglichst hintergrundfrei zu separieren. Anschließend wurden die Zellen innerhalb der ROI automatisiert gezählt. Dazu wurde die FIJI-Funktion *Analyze Particles* verwendet. Für NeuN positive Zellen wurde eine Partikelgröße von mindestens 40 μm^2 vorausgesetzt. NOS positive Zellen wurden ab einer Partikelgröße von 80 μm^2 gezählt. Um eine Vergleichbarkeit der Zellzahlen zwischen einzelnen Versuchstieren zu gewährleisten, wurden die Zellzahlen der WMINs in jedem Schnitt auf die Fläche der weißen Substanz normalisiert.

Anhand der normalisierten Zellzahlen wurde analysiert, ob der heterozygote *knockout* von *Nrg1* die Anzahl NeuN positiver oder NOS positiver WMINs beeinflusst. Zusätzlich wurde überprüft, ob sich das Verhältnis von NOS positiven zu NeuN positiven WMINs ändert. Dazu wurden die Messwerte der einzelnen Tiere arithmetisch gemittelt. Danach wurden die Messwerte der Tiere eines Genotyps arithmetisch gemittelt. Insgesamt wurden neun *Nrg1*^{+/+} Mäuse aus vier unabhängigen Würfen und neun *Nrg1*^{+/-} Mäuse aus mindestens drei unabhängigen Würfen analysiert. Unterschiede zwischen den Genotypen wurden durch zweiseitige t-Tests auf statistische Signifikanz überprüft.

5 Ergebnisse

5.1 *In silico* Analyse der *Microarray*-Datensätze

Neuregulin 1 (*Nrg1*) ist ein mehrfach durch Kopplungs- und Assoziationsstudien bestätigtes Schizophrenie Suszeptibilitätsgen und reguliert bedeutende Prozesse in embryonalen und adulten Gehirnen. Während der Embryonalentwicklung beeinflusst *Nrg1* unter anderem die radiale und tangentielle Migration exzitatorischer und inhibitorischer neuronaler Vorläuferzellen. In adulten Gehirnen stabilisiert *Nrg1* exzitatorische Synapsen, reguliert die GABAerge Transmission und die synaptische Plastizität. Bei schizophrenen Patienten und Patientinnen konnte die veränderte Expression verschiedener *Nrg1* Transkriptisoformen nachgewiesen werden.

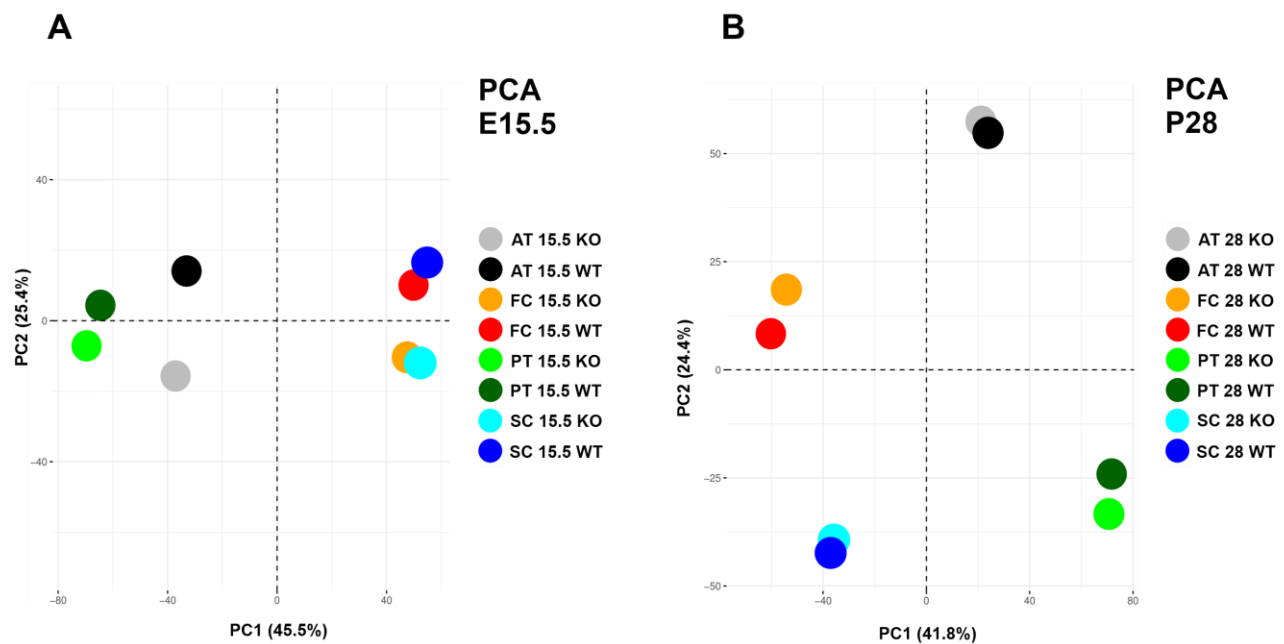
Um den effektiven Einfluss von *Nrg1* Defizienz auf das Gehirn zu erforschen, analysierte Philipp Kaiser in seiner Dissertation (Kaiser 2011) das Gehirntranskriptom heterozygoter *Nrg1 knockout* (*Nrg1*^{+/-}) und *Nrg1* Wildtyp (*Nrg1*^{+/+}) Mäuse. In einer großen *Microarray*-Studie wurde das Transkriptom der zwei Genotypen in vier verschiedenen Gehirnregionen und zwei Entwicklungsstadien analysiert. Dabei wurden der anteriore Thalamus (AT) und der frontale Cortex (FC) als schizophrenierelevante Gehirnregionen angesehen. Der posteriore Thalamus (PT) und der somatosensorische Cortex (SC) dienten als mutmaßliche Kontrollregionen, die von der Krankheit weniger oder nicht betroffen sind. Die zwei untersuchten Entwicklungsstadien Embryonaltag 15.5 (E15.5) und Postnataltag 28 (P28) korrespondieren mit der Entwicklung der supragranulären kortikalen Schichten, die als betroffen gelten und der Manifestation der Krankheit in der frühen Adoleszenz. Für jede der Konditionen wurden drei biologische Replikate angefertigt (Insgesamt 48 *Microarrays*). Dabei enthält jedes biologische Replikat RNA von zwölf Individuen von mindestens sechs verschiedenen Müttern, sodass die Studie die RNA von 576 Tieren analysierte.

In der vorliegenden Arbeit wurde dieser Datensatz mit verschiedenen bioinformatischen Methoden neu evaluiert. Die Präprozessierung der *Microarray*-Rohdaten wurde optimiert (siehe auch Lachenmaier 2019). Mit Hilfe von *Principal Component*- und *Gene Enrichment* Analysen sollte identifiziert werden, welches Entwicklungsstadium und welche Gehirnregionen durch den heterozygoten *Nrg1 knockout* am stärksten betroffen sind. Auf dieser Basis sollten schizophrenierelevante biologische Prozesse identifiziert werden, die durch den heterozygoten *Nrg1 knockout* und die differenzielle Transkription einzelner Kandidatengene gestört werden. Die Ergebnisse dieser *in silico* Analyse dienen als Ausgangspunkt für experimentelle Arbeiten, in denen versucht wurde, die Resultate der Transkriptomstudie zu validieren.

5.1.1 *Principal Component Analyse*

Zur bioinformatischen Analyse der *Microarray*-Datensätze wurden nach der Präprozessierung zunächst mehrere *Principal Component* Analysen (PCA) durchgeführt, um den Einfluss der Entwicklungsstadien, Gehirnregionen und Genotypen auf die Varianz des Gehirntranskriptoms zu bestimmen. Insbesondere wurde analysiert, ob sich *Principal Components* (PC) bzw. Dimensionen im multidimensionalen Raum identifizieren lassen, die den transkriptionellen Unterschied zwischen *Nrg1*^{+/-} und *Nrg1*^{+/+} Genotypen repräsentieren. Um die PCA möglichst unvoreingenommen durchzuführen, wurden die Gentranskripte für die einzelnen Analysen anhand ihrer Expressionsstärke ausgewählt. Dabei wurde angenommen, dass besonders stark exprimierte Transkripte auf den *Microarrays* verlässlicher detektiert werden und robustere Messwerte repräsentieren. Aufgrund dessen wurden die jeweils 5000 Gentranskripte mit der stärksten Genexpression innerhalb eines Entwicklungsstadiums, Genotyps und einer Gehirnregion, ausgewählt. In die Analyse wurden schließlich alle Transkripte implementiert die in mindestens einer Kondition unter den 5000 am stärksten exprimierten Gentranskripten waren.

In gemeinsamen PCAs der embryonalen und postnatalen Gehirnregionen zeigt sich, dass die verschiedenen Entwicklungsstadien die größte Varianz in den *Microarray*-Datensätzen repräsentieren (PC1: 65.6%, Anhang, Abb.23). Aufgrund dieser Tatsache wurden die embryonalen und postnatalen Datensätze in anschließenden PCAs getrennt analysiert. In den getrennten PCAs der embryonalen und postnatalen *Microarrays* zeigt sich, dass die Transkriptionsunterschiede zwischen Thalamus und Cortex die größten Varianzen in den Datensätzen repräsentieren (Abb. 5). Embryonal beträgt dieser Beitrag zur Varianz 45.5% (Abb. 5A), postnatal 41.8% (Abb. 5B). PC2 repräsentiert die Dimension mit der zweitgrößten Varianz innerhalb der Datensätze. Embryonal trennt diese Achse die *Microarrays* nach Genotypen und repräsentiert 25.4% der Transkriptomvarianz (Abb. 5A). Postnatal trennt PC2 die *Microarrays* des frontalen Systems (AT, FC) gegen die *Microarrays* des posterioren Systems (PT, SC) und repräsentiert 24.4% der Transkriptomvarianz. Postnatal sind die Transkriptionsunterschiede zwischen Thalamus und Cortex und anteriorem und posteriorem thalamocortikalem System demnach größer als die Transkriptionsunterschiede zwischen den Genotypen (Abb. 5B). Die *Nrg1* Genotypen werden in der postnatalen PCA erst näherungsweise durch PC5 getrennt und repräsentieren lediglich 5% der transkriptomischen Varianz (Daten nicht gezeigt). Embryonal scheint der heterozygote *Nrg1 knockout* also einen stärkeren Einfluss auf das Gehirntranskriptom zu haben als postnatal. Aufgrund dieser Tatsache wurde der Fokus für weitere PCAs und bioinformatische Analysen auf die embryonalen Datensätze gelegt. Um die genotypische Differenzialität regionsspezifisch zu analysieren, wurden PCAs der einzelnen embryonalen Gehirnregionen getrennt durchgeführt (Abb. 6&7).



C

E15.5 - GEA Ergebnisse der PC2		
ID	Biologischer Prozess	p-Wert
GO:0009060	aerobic respiration	1.3 E-12
GO:0045333	cellular respiration	3.3 E-11
GO:0006119	oxidative phosphorylation	3.1 E-10
ID	Zelluläres Kompartiment	p-Wert
GO:1902494	catalytic complex	1.5 E-20
GO:0140535	intracellular protein-containing complex	6.8 E-11
GO:0098803	respiratory chain complex	4.8 E-10

D

P28 - GEA Ergebnisse der PC5		
ID	Biologischer Prozess	p-Wert
GO:0022613	ribonucleoprotein complex biogenesis	8.5 E-08
GO:0043604	amide biosynthetic process	1.1 E-07
GO:0008380	RNA splicing	4.5 E-07
ID	Zelluläres Kompartiment	p-Wert
GO:0098794	postsynapse	2.4 E-07
GO:0000502	proteasome complex	2.9 E-07
GO:0045202	synapse	5.3 E-07

Abbildung 5: Principal Component Analyses (PCA) embryonaler (E15.5) und postnataler (P28) Gehirnregionen (A, B) und Ergebnisse der zugehörigen Gene Enrichment Analyses (GEA) (C, D). Der heterozygote *Nrg1* knockout beeinflusst das embryonale Gehirntranskriptom stärker als das postnatale Gehirntranskriptom. Durch die höhere transkriptomische Varianz, werden die embryonalen *Nrg1* Genotypen bereits entlang Principal Component (PC2) getrennt. **A: PCA embryonaler (E15.5) Gehirnregionen.** **B: PCA postnataler (P28) Gehirnregionen.** Für die PCA wurden die je 5000 am stärksten exprimierten Gentranskripte des anterioren Thalamus (AT), frontalen Cortex (FC), posterioren Thalamus (PT) und somatosensorischen Cortex (SC) verwendet. Die dargestellten Punkte repräsentieren den Mittelwert dreier biologischer Replikate einer Gehirnregion und eines Genotyps. Die Farbcodierung der Gehirnregionen und *Nrg1* Genotypen kann den Legenden in den Teilabbildungen A&B entnommen werden. **C: Ergebnisse der GEA der embryonalen PCA.** **D: Ergebnisse der GEA der postnatalen PCA.** Für die GEA wurden 100 Gene verwendet, die am stärksten zur *Nrg1* genotypdefinierenden Principal Component (PC) beitragen. Dargestellt sind 3 biologische Prozesse und zelluläre Kompartimente aus der Gene Ontology Datenbank (GO), die am stärksten und hochsignifikant mit den genotypdefinierenden Gentranskripten assoziiert werden. Embryonal beeinflusst der heterozygote *Nrg1* knockout am stärksten die Energiegewinnung der mitochondrialen Atmungskette (C). Postnatal sind Synapsen und RNA-assoziierte Prozesse betroffen (D).

Im embryonalen anterioren und posterioren Thalamus werden die Genotypen annähernd entlang PC3 getrennt. Dabei repräsentiert PC3 9.9 bzw. 7.2% der transkriptomischen Varianz (Abb. 6A, B). In den embryonalen kortikalen Regionen werden die Genotypen bereits entlang PC2 getrennt. Im frontalen Cortex klar, im somatosensorischen Cortex nur annähernd. Dabei werden im frontalen und im somatosensorischen Cortex 25.4% der transkriptomischen Varianz durch den heterozygoten *Nrg1 knockout* verursacht (Abb. 7A, B). PC1 trennt in PCAs der einzelnen embryonalen Gehirnregionen in allen Fällen die biologischen Replikate der einzelnen *Microarray*-Konditionen. Der Unterschied der transkriptomischen Varianz der Replikate ist demnach größer als der Unterschied zwischen *Nrg1^{+/-}* und *Nrg1^{+/+}* Genotypen. Dennoch lässt sich ein eindeutiger Einfluss des heterozygoten *Nrg1 knockouts* auf alle embryonalen Gehirnregionen nachweisen. Vergleicht man diesen zwischen kortikalen und thalamischen Regionen, wird die transkriptomische Varianz des frontalen und somatosensorischen Cortex stärker durch den heterozygoten *Nrg1 knockout* beeinflusst als die des anterioren und posterioren Thalamus (Vgl. Abb. 6A, B & 7A, B).

Die PCAs der *Microarray*-Datensätze zeigen also insgesamt, dass der heterozygote *Nrg1 knockout* das Gehirntranskriptom von *Nrg1^{+/-}* Embryos und postnatalen Mäusen subtil, aber nachweislich beeinflusst. Das embryonale Transkriptom wird dabei stärker beeinflusst als das postnatale Transkriptom. Zudem werden embryonale kortikale Regionen stärker beeinflusst, als embryonale thalamische Regionen.

5.1.2 Gene Enrichment Analyse der Principal Components

Um biologische Prozesse oder zelluläre Kompartimente zu bestimmen, die durch den heterozygoten *Nrg1 knockout* beeinflusst werden, wurden mit den Ergebnissen der PCAs *Gene Enrichment* Analysen (GEAs) durchgeführt. Mit Hilfe von GEAs kann überprüft werden, ob innerhalb einer Menge von Genen eine signifikante Anreicherung von Genen eines bestimmten Prozesses oder Kompartiments existiert. Für die GEAs der einzelnen PCAs wurden je 100 Gentranskripte analysiert, die am stärksten zu der genotypdefinierenden PC beitragen. Für die embryonalen und postnatalen PCAs entspricht dies PC2 bzw. PC5. In den einzelnen embryonalen, kortikalen und thalamischen Regionen PC2 und PC3. Die Ergebnisse der GEAs sind in den Abbildungen 5, 6 und 7 (je C, D) zusammengefasst.

Betrachtet man das gesamte embryonale Gehirntranskriptom, scheint der heterozygote *Nrg1 knockout* vor allem die Respiration und die Energiegewinnung der mitochondrialen Atmungskette zu beeinflussen. Dies zeigen sowohl die betroffenen biologischen Prozesse, als auch die betroffenen zellulären Kompartimente. Postnatal ist die Ausbildung von Ribonukleoproteinen, die Synthese von Amiden und das RNA *splicing* betroffen. Als betroffene zelluläre Kompartimente können Synapsen, Postsynapsen und Proteasomen bestimmt werden (Abb. 5C, D).

Die GEAs zu den embryonalen und postnatalen PCAs definieren betroffene biologische Prozesse und zelluläre Kompartimente mit hohen Signifikanzen. Jedoch werden eher globale Prozesse und große subzelluläre Kompartimente bestimmt, die durch eine Vielzahl von Gentranskripten, Proteinen und Nukleinsäuren beeinflusst werden. Eine feinere Auflösung betroffener Prozesse und zellulärer Kompartimente, lässt sich in den GEAs der einzelnen embryonalen Gehirnregionen feststellen (Abb. 6C, D & 7C, D). Im embryonalen anterioren Thalamus beeinflusst der heterozygote *Nrg1 knockout* die Projektion thalamischer Axone, nukleare Substrukturen, sowie das distale Axon (Abb. 6C). Im embryonalen posterioren Thalamus wird die Membranlokalisation von Proteinen im Axon bzw. der Synapse gestört (Abb. 6D). Vergleicht man die betroffenen Prozesse im embryonalen Cortex, lässt sich ein deutlicher Unterschied zwischen dem frontalen und somatosensorischen Cortex feststellen. Im frontalen Cortex wird die Organisation des Cytoskeletts gestört, die Polymerisierung von Aktinfilamenten inhibiert und die Ausbildung von Proteinkomplexen beeinflusst (Abb. 7C). Im somatosensorischen Cortex lässt sich kein betroffener Prozess nachweisen (Abb. 7D). Der Einfluss des heterozygoten *Nrg1 knockouts* auf zelluläre Kompartimente ist hingegen ähnlich. In beiden Cortexregionen werden katalytische Komplexe und Komponenten der mitochondrialen Atmungskette beeinflusst (Abb. 7), was auch für das gesamte embryonale Gehirntranskriptom (aerobe Respiration) nachgewiesen werden konnte (Abb. 5C).

Die GEAs verdeutlichen, dass der heterozygote *Nrg1 knockout*, bei der Betrachtung des gesamten Gehirntranskriptoms, sehr globale Prozesse beeinflusst. Diese stehen nicht eindeutig im Einklang mit den anatomischen und physiologischen Auffälligkeiten schizophrener Patienten und Patientinnen. Bei der Analyse der einzelnen embryonalen Gehirnregionen wird deutlich, dass das Gehirntranskriptom regionsspezifisch verändert ist. Dabei scheinen die schizophrenierelevanten Gehirnregionen (AT, FC) stärker betroffen zu sein als die Kontrollregionen (PT, SC). Im anterioren Thalamus und frontalen Cortex wird die Projektion von Neuronen und die Organisation des Cytoskeletts gestört. Im somatosensorischen Cortex sind keine Prozesse betroffen. Im posterioren Thalamus sind Protein-Protein und Protein-Membran Interaktionen gestört. Die Auswahl der Gentranskripte für die PCAs beruhte ausschließlich auf starker Genexpression. Entsprechend befinden sich in der Menge der analysierten Transkripte viele Gene die in *Nrg1^{+/-}* Mäusen stark, aber nicht zwangsläufig differenziell exprimiert sind. Aufgrund dieser Tatsache wurden in einem nächsten Schritt ausschließlich differenziell exprimierte Gentranskripte der einzelnen Gehirnregionen mit GEAs untersucht. Aufgrund der PCA-Ergebnisse wurde der Fokus für diese Analysen auf die embryonalen Gehirnregionen gelegt.

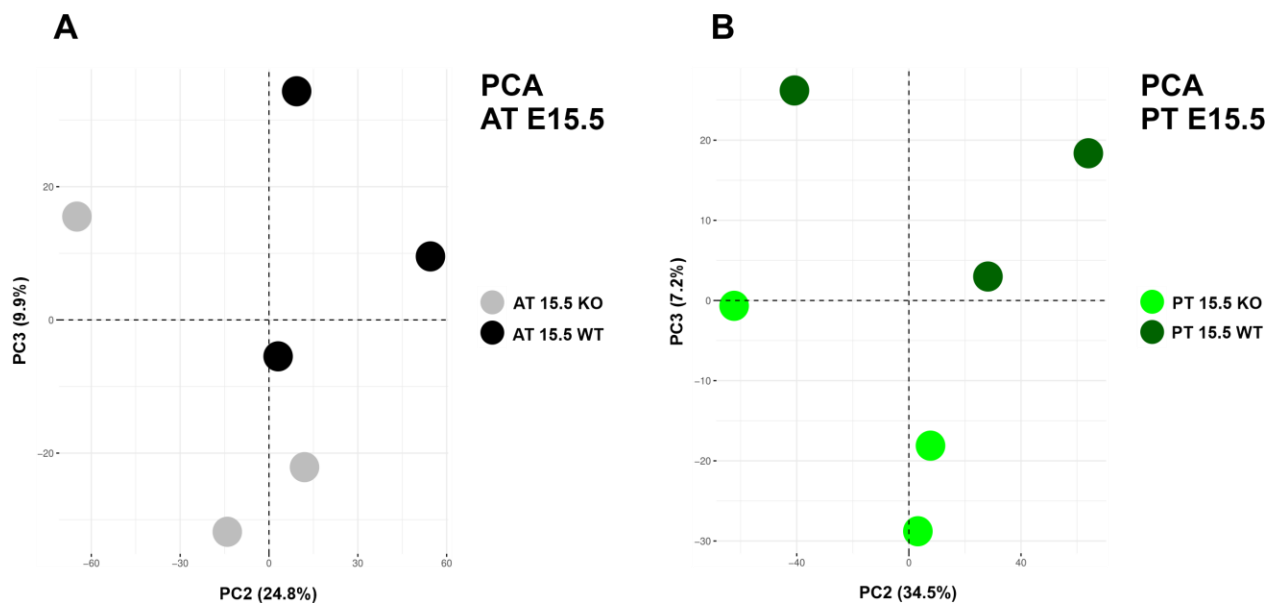


Abbildung 6: Principal Component Analysen (PCA) embryonaler (E15.5) thalamischer Gehirnregionen (A, B) und Ergebnisse der zugehörigen Gene Enrichment Analysen (GEA) (C, D). Der heterozygote *Nrg1* knockout beeinflusst das Gehirnskriptom des embryonalen, anterioren (AT) und posterioren (PT) Thalamus nur subtil. Aufgrund der geringen transkriptomischen Varianz werden die *Nrg1* Genotypen erst entlang **PC3** getrennt. Zwischen dem anterioren und posterioren Thalamus lässt sich in der PCA kein Unterschied feststellen **A: PCA des embryonalen anterioren Thalamus. B: PCA des embryonalen posterioren Thalamus.** Für die PCA wurden die je 5000 am stärksten exprimierten Gentranskripte des AT und PT verwendet. Die dargestellten Punkte repräsentieren je ein biologisches Replikat einer thalamischen Gehirnregion und eines Genotyps. Die Farbcodierung der Gehirnregionen und *Nrg1* Genotypen kann den Legenden in den Teilabbildungen A&B entnommen werden. Für die GEA wurden 100 Gene verwendet, die am stärksten zur *Nrg1* genotypdefinierenden Principal Component beitragen. Dargestellt sind 3 bzw. 2 biologische Prozesse und zelluläre Kompartimente aus der Gene Ontology Datenbank (GO), die am stärksten und hochsignifikant mit den *Nrg1* genotypdefinierenden Gentranskripten assoziiert werden. Im embryonalen anterioren Thalamus beeinflusst der heterozygote *Nrg1* knockout am stärksten die Projektion thalamischer Axone (C). Im embryonalen posterioren Thalamus wird die Membranlokalisierung von Proteinen im Axon bzw. der Synapse gestört (D). NA: Not available.

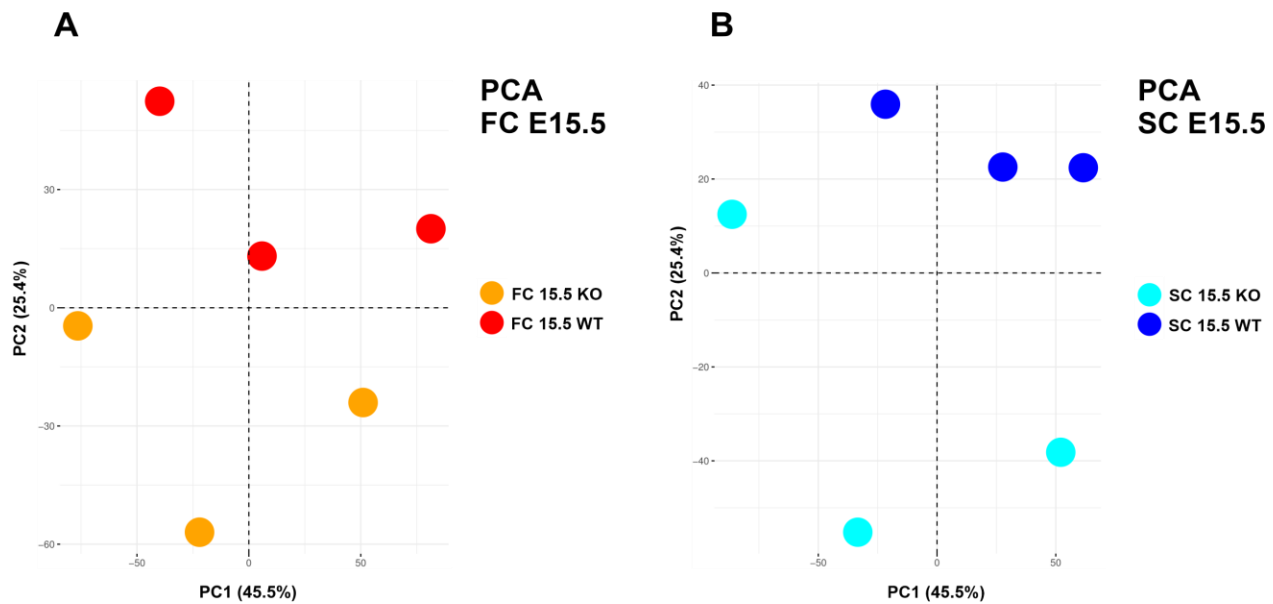


Abbildung 7: Principal Component Analysen (PCA) embryonaler (E15.5) kortikaler Gehirnregionen (A, B) und Ergebnisse der zugehörigen Gene Enrichment Analysen (GEA) (C, D). Der heterozygote *Nrg1* knockout beeinflusst das Gehirntranskriptom des embryonalen, frontalen (FC) und somatosensorischen Cortex (SC) stärker als die embryonalen thalamischen Regionen. Durch die höhere transkriptomische Varianz werden die *Nrg1* Genotypen entlang PC2 getrennt. Zwischen dem frontalen und somatosensorischen Cortex lässt sich in der PCA kein Unterschied feststellen. **A: PCA des embryonalen frontalen Cortex. B: PCA des embryonalen somatosensorischen Cortex.** Für die PCA wurden die je 5000 am stärksten exprimierten Gentranskripte des FC und SC verwendet. Die dargestellten Punkte repräsentieren je ein biologisches Replikat einer kortikalen Gehirnregion und eines Genotyps. Die Farbcodierung der Gehirnregionen und *Nrg1* Genotypen kann den Legenden in den Teilabbildungen A&B entnommen werden. Für die GEA wurden 100 Gene verwendet, die am stärksten zur *Nrg1* genotypdefinierenden Principal Component beitragen. Dargestellt sind biologische Prozesse und zelluläre Kompartimente aus der Gene Ontology Datenbank (GO), die am stärksten und hochsignifikant mit den *Nrg1* genotypdefinierenden Gentranskripten assoziiert werden. Im frontalen Cortex beeinträchtigt der heterozygote *Nrg1* knockout am stärksten die Organisation des Cytoskeletts und die Polymerisierung von Aktinfilamenten (C). Im somatosensorischen Cortex kann kein biologischer Prozess identifiziert werden, der durch den heterozygoten *Nrg1* knockout beeinflusst wird (D). NA: Not available.

5.1.3 *Gene Enrichment* Analyse differenziell exprimierter Gentranskripte

Für die Identifikation einzelner deregulierter Gentranskripte wurden Grenzen festgelegt, ab denen ein Gentranskript als differenziell exprimiert gewertet wird. Dies bezieht sich auf das Erreichen einer gewissen Differenzialität der Genexpression zwischen den Genotypen, sowie einer gewissen statistischen Signifikanz der Differenzialität.

Die differenzielle Expression von Gentranskripten wurde durch die *weighted average difference* (WAD) bestimmt. Die WAD ist ein Fold-Change basierter Wert, der die relative Expressionsstärke von Gentranskripten gewichtet. Die statistische Signifikanz der differenziellen Genexpression wurde durch zweiseitige T-Tests, ohne Korrektur für multiple Vergleiche bestimmt.

Um die Auswahl falsch positiver und falsch negativer Gentranskripte möglichst zu minimieren, wurde für die Definition signifikant deregulierter Gentranskripte eine Kombination aus einem gewissen WAD- und p-Wert vorausgesetzt. Dabei wurden für Gentranskripte mit mittlerer Differenzialität hohe Signifikanzen gefordert. Gentranskripte mit sehr starker Differenzialität wurden dagegen auch mit geringeren Signifikanzen als dereguliert gewertet.

Für die Embryonalen Datensätze wurden folgende Grenzwerte festgelegt:

E15.5: WAD $\pm 2 \sigma$ des mittleren WAD-Werts, $p < 0,003$

WAD $\pm 3 \sigma$ des mittleren WAD-Werts, $p < 0,01$

Unter Annahme der festgelegten Signifikanzgrenzen, sind in den analysierten Gehirnregionen von *Nrg1*^{+/-} Embryos insgesamt 292 Gentranskripte differenziell exprimiert. Im anterioren Thalamus sind 91, im frontalen Cortex 85, im posterioren Thalamus 20 und im somatosensorischen Cortex 96 Gentranskripte dereguliert. Vergleicht man das schizophrenierelevante frontale System (FS) mit dem posterioren Kontrollsystem (PS), scheint der heterozygote *Nrg1 knockout* das frontale System stärker zu beeinflussen. Im frontalen System sind 176 Gentranskripte dereguliert, im posterioren System 116 (Abb. 8A). Mit den deregulierten Gentranskripten der einzelnen embryonalen Gehirnregionen wurden erneut *Gene Enrichment* Analysen durchgeführt.

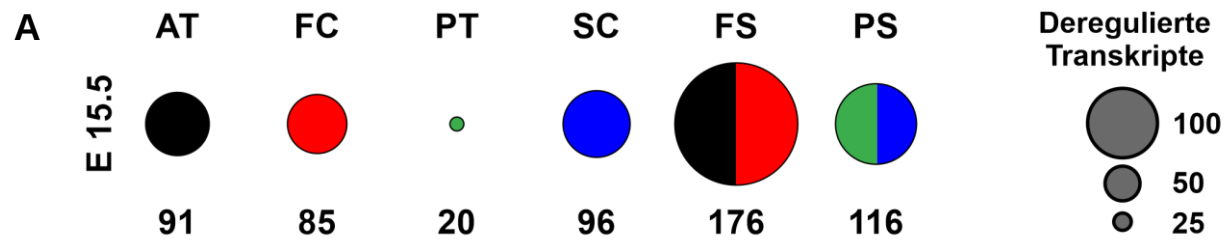
Wie für die Ergebnisse der PCAs, wurden die deregulierten Transkripte auf signifikante Anreicherungen von einzelnen Genen in biologischen Prozessen und zellulären Kompartimenten untersucht. Im anterioren Thalamus werden die differenziell exprimierten Gene mit der Axogenese, Lokalisierung von Organellen und der Migration von Neuronen assoziiert. Betroffene zelluläre Kompartimente sind Synapsen, Chromatin-Substrukturen und die Projektionen der Neuronen (Abb. 8B). Im embryonalen frontalen Cortex, beeinflusst der heterozygote *Nrg1 knockout* den intrazellulären (Protein)Transport. Für zelluläre Kompartimente gibt es eine Anreicherung von synaptischen und membranassoziierten Gentranskripten (Abb. 8C).

Die GEA des embryonalen posterioren Thalamus, assoziiert deregulierte Gentranskripte mit der Morphogenese von Herzmuskelgewebe und mit Geweberegeneration. Betroffene zelluläre Kompartimente können nicht ausgemacht werden (Abb. 8D). Im embryonalen somatosensorischen Cortex werden die differenziell exprimierten Gentranskripte weder mit einem biologischen Prozess, noch mit einem zellulären Kompartiment assoziiert (Abb. 8E).

Vergleicht man die GEAs deregulierter Transkripte mit den GEAs zu den PCAs, bestätigt sich, dass das schizophrenierelevante frontale System stärker vom heterozygoten *Nrg1 knockout* betroffen ist als das posteriore System, das als Negativkontrolle betrachtet werden kann. Im embryonalen anterioren Thalamus werden die analysierten Transkripte in beiden GEAs hochsignifikant mit der Projektion und Axogenese von Neuronen assoziiert (Abb. 6C, 8B). Im posterioren Thalamus sind die Ergebnisse der GEAs weniger konsistent (Abb. 6D, 8D). Darüber hinaus werden die deregulierten Gentranskripte mit der Herzentwicklung assoziiert. Für die Analyse des Gehirntranskriptom kann diesen Ergebnissen eine entsprechend geringe Relevanz zugesprochen werden. Im frontalen Cortex wird die Organisation des Cytoskeletts und der intrazelluläre (Protein)Transport gestört (Abb. 7C, 8C). Diese Ergebnisse scheinen zunächst inkonsistent, jedoch erfolgt der Transport von Proteinen, Organellen und weiteren Makro- und Mikromolekülen oft entlang des Cytoskeletts. Entsprechend könnte der Transport durch die fehlerhafte Organisation des Cytoskeletts und seiner assoziierten Proteine beeinträchtigt werden. Im embryonalen somatosensorischen Cortex wird kein biologischer Prozess mit den deregulierten Transkripten und den Ergebnissen der PCA assoziiert (Abb. 7D, 8E).

Die GEAs der PCAs und der deregulierten Gentranskripte wurden unabhängig voneinander unter der Verwendung verschiedener Kriterien und mit verschiedenen Teilmengen der *Microarray*-Datensätze durchgeführt. Entsprechend kann davon ausgegangen werden, dass sich die konsistenten Ergebnisse der unabhängigen GEAs gegenseitig stützen, und dass die gewählten Signifikanzgrenzen falsch positive und falsch negative Datenpunkte hinreichend ausschließen.

Als Kernaussage der bioinformatischen Evaluation der *Microarray*-Datensätze, lässt sich zusammenfassen, dass der heterozygoten *Nrg1 knockout* das embryonale Gehirntranskriptom stärker beeinflusst als das postnatale Gehirntranskriptom. Die embryonalen, kortikalen Gehirnregionen werden stärker beeinflusst als die embryonalen thalamischen Gehirnregionen. Und die schizophrenierelevanten Regionen des anterioren Thalamus und frontalen Cortex werden in der embryonalen Gehirnentwicklung stärker vom heterozygoten *Nrg1 knockout* beeinflusst als die Kontrollregionen des posterioren Thalamus und somatosensorischen Cortex. Besonders betroffen ist der embryonale frontale Cortex, in dem die Organisation des Cytoskeletts und der intrazelluläre (Protein)Transport durch den heterozygoten *Nrg1 knockout* gestört wird.



B

AT E15.5		
ID	Biologischer Prozess	p-Wert
GO:0021952	central nervous system projection neuron axonogenesis	2.3 E-05
GO:0140056	organelle localization by membrane tethering	2.7 E-05
GO:0097477	lateral motor column neuron migration	4.0 E-05
ID	Zelluläres Kompartiment	p-Wert
GO:0045202	synapse	5.6 E-06
GO:0070603	SWI/SNF superfamily-type complex	2.9 E-05
GO:0043005	neuron projection	1.6 E-04

C

FC E15.5		
ID	Biologischer Prozess	p-Wert
GO:0046907	intracellular transport	2.5 E-05
GO:0015031	protein transport	3.0 E-05
GO:0006886	intracellular protein transport	5.4 E-05
ID	Zelluläres Kompartiment	p-Wert
GO:0045202	synapse	2.6 E-04
GO:0010008	endosome membrane	3.3 E-04
GO:0030659	cytoplasmic vesicle membrane	3.9 E-04

D

PT E15.5		
ID	Biologischer Prozess	p-Wert
GO:0061384	heart trabecula morphogenesis	7.7 E-06
GO:0061383	trabecula morphogenesis	2.4 E-05
GO:0042246	tissue regeneration	2.4 E-05
ID	Zelluläres Kompartiment	p-Wert
NA	NA	NA

E

SC E15.5		
ID	Biologischer Prozess	p-Wert
NA	NA	NA
ID	Zelluläres Kompartiment	p-Wert
NA	NA	NA

Abbildung 8: Deregulierte Einzelgene im embryonalen thalmo-cortikalen System und zugehörige Gene Enrichment Analysen. Das schizophrenierelevante frontale System ist vom heterozygoten *Nrg1* knockout stärker betroffen als das posteriore Kontrollsystem. **A:** Anzahl der differenziell exprimierten Gentranskripte im anterioren Thalamus (AT), frontalen Cortex (FC), posterioren Thalamus (PT) und somatosensorischen Cortex (SC) heterozygoter *Nrg1* knockout Embryos (E15.5). Das schizophrenierelevante frontale System (FS) besteht aus AT+FC. Das posteriore Kontrollsystem (PS) besteht aus PT+SC. Die Größe der dargestellten Kreise repräsentiert die Anzahl differenziell exprimierter Gentranskripte. **B-E:** Zugehörige Ergebnisse der Gene Enrichment Analysen (GEA). Für die GEA wurden alle differenziellen Gentranskripte der entsprechenden Gehirnregionen verwendet. Dargestellt sind je drei biologische Prozesse und zelluläre Kompartimente aus der Gene Ontology Datenbank (GO), die am stärksten und hochsignifikant mit den regionsspezifisch differenziell exprimierten Gentranskripten *Nrg1* defizienter Embryos assoziiert werden. Das schizophrenierelevante frontale System (FS) scheint vom heterozygoten *Nrg1* knockout stärker betroffen zu sein als das posteriore Kontrollsystem (PS). Im anterioren Thalamus und frontalen Cortex wird die Axogenese, Migration von Neuronen und der intrazelluläre (Protein)-Transport beeinflusst. Im posterioren Thalamus und somatosensorischen Cortex werden neuroentwicklungsbiologisch irrelevante bzw. keine biologischen Prozesse und zellulären Kompartimente mit den differenziell exprimierten Gentranskripten assoziiert. NA: Not available.

Zur Visualisierung der embryonale *Microarray*-Daten wurden *Volcanoplots* generiert. Dabei wird die Differenzialität sowie die Signifikanz der Differenzialität jedes Gentranskripts einem Punkt zugewiesen. Auf der X-Achse wird der Unterschied der Expression zwischen den Genotypen *Nrg1*^{+/+} und *Nrg1*^{+/-} durch den berechneten WAD-Wert angegeben. Die Y-Achse gibt die Signifikanz des Expressionsunterschieds als negativen dekadischen Logarithmus des p-Werts an. Nach den obigen Kriterien nicht differenzielle Gentranskripte sind in den *Volcanoplots* in hellgrau dargestellt. Signifikant differenziell exprimierte Gentranskripte sind in Farbe dargestellt und entsprechend dem eingeführten Farbcode coloriert.

In allen *Volcanoplots* zeigt der Großteil der untersuchten Gentranskripte geringe Expressionsunterschiede mit hohen p-Werten und akkumuliert daher im Zentrum des *Volcanoplots*. Viele Gentranskripte zeigen keine Deregulation, erreichen jedoch sehr geringe p-Werte und akkumulieren als vertikale Linie bei WAD=0. Der heterozygote *Nrg1 knockout* führt in allen embryonalen Gehirnregionen zu mehr negativ differenziellen Gentranskripten als positiv differenziellen Gentranskripten. *Nrg1* scheint demnach die Expression des Gehirntranskriptoms mehrheitlich positiv zu regulieren. Des Weiteren zeigen sich in allen *Volcanoplots* vereinzelt stark differenzielle Gentranskripte, die die gesetzte Signifikanzgrenze des p-Werts jedoch nicht überschreiten. Durch die farbliche Kennzeichnung signifikant differenzieller Gentranskripte lassen sich die gesetzten Signifikanzgrenzen nachvollziehen (Abb. 9, 10).

Die Genexpression von *Nrg1* wird durch das *probeset* 1456524_at detektiert. Durch den heterozygoten *Nrg1 knockout* kann einfachsten Falles erwartet werden, dass *Nrg1* in allen Gehirnregionen reduziert exprimiert wird. Entsprechend den eingeführten Signifikanzgrenzen wird die Genexpression von *Nrg1* nur im embryonalen posterioren Thalamus als signifikant differenziell annotiert (Abb. 9B). Das lässt vermuten, dass die Wahl der Signifikanzgrenzen potenziell zu stringent ist und zu vielen falsch negativen Datenpunkten führt. In der Historie des vorliegenden Projekts, wurden vermehrt Annahmen getroffen, die letztlich auf falsch positiven Datenpunkten beruhten. Um dieses Problem zu umgehen, wurde in der neuen Evaluation der Datensätze eine gewisse Anzahl falsch negativer Datenpunkte akzeptiert. Falsch positive Datenpunkte können dadurch mit höherer Wahrscheinlichkeit ausgeschlossen werden. Unabhängig von den gewählten Signifikanzgrenzen, detektiert das *Nrg1 probeset* 1456524_at einen weit 3' gelegenen Bereich des *Nrg1* Transkripts. Dadurch werden in den *Microarray*-Messungen nicht alle *Nrg1* Transkriptisoformen detektiert, wodurch der tatsächliche Einfluss des heterozygoten *Nrg1 knockouts* möglicherweise nicht vollständig erfasst wird (Abb. 9A, 10A, B).

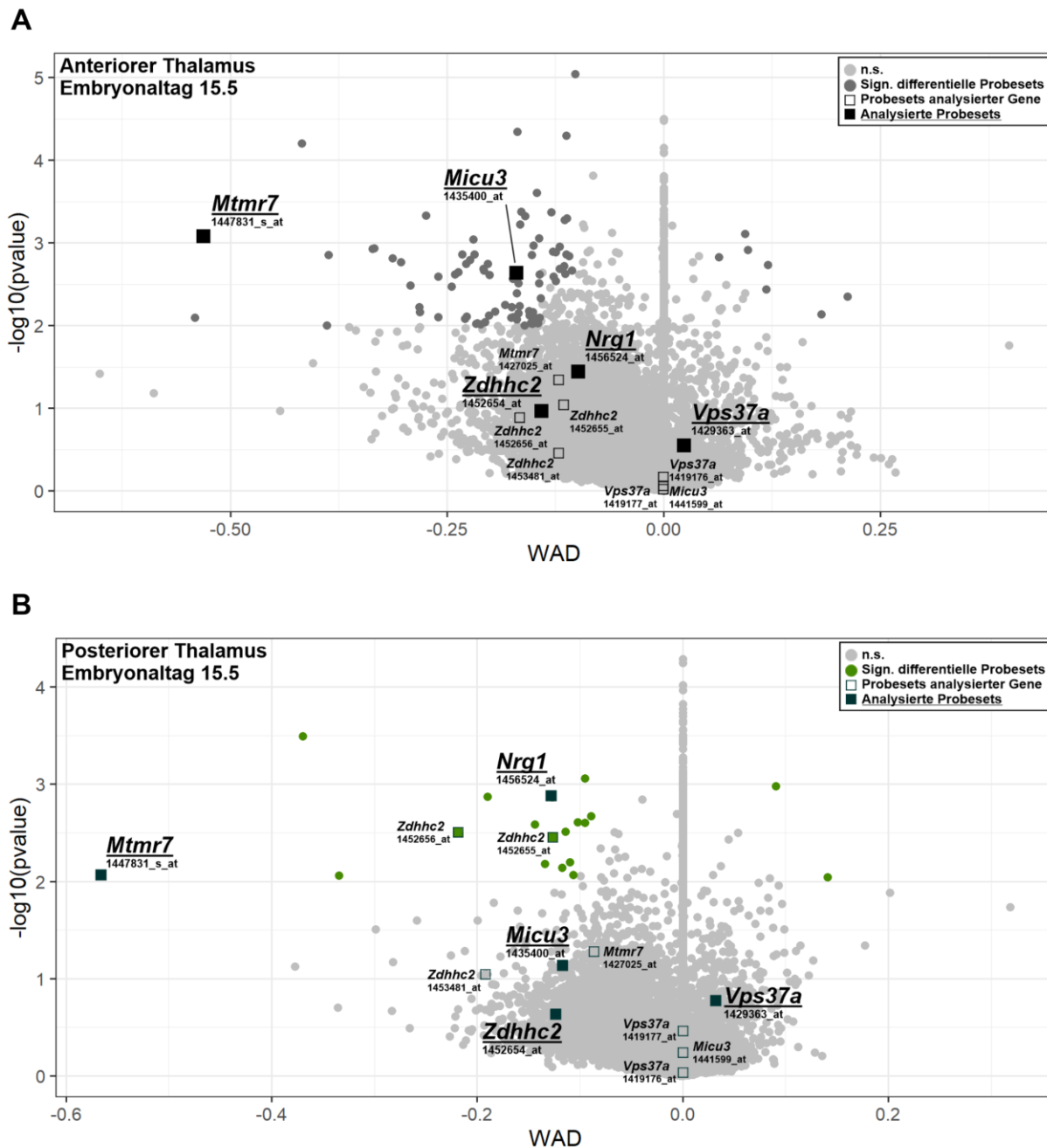


Abbildung 9: Einfluss des heterozygoten *Nrg1* knockouts auf die Expression einzelner Gentranskripte in embryonalen thalamischen Gehirnregionen. A: Differenziell exprimierte Gentranskripte im anterioren Thalamus (AT) *Nrg1* defizienter Embryos. B: Differenziell exprimierte Gentranskripte im posterioren Thalamus (PT) *Nrg1* defizienter Embryos. Dargestellt sind Volcanoplots der Microarray Transkriptomstudien. In den Volcanoplots entspricht jeder Punkt einem Affymetrix probeset, das ein Transkript detektiert. Die weighted average difference (WAD) repräsentiert die Differenzialität eines probesets zwischen den *Nrg1* Genotypen. Negative WAD-Werte entsprechen einer negativen Differenzialität, positive WAD-Werte einer positiven Differenzialität der Genexpression in *Nrg1* defizienten Embryos. Die statistische Signifikanz der differenziellen Genexpression zwischen den *Nrg1* Genotypen wird durch den negativen dekadischen Logarithmus des p-Werts angegeben. Grau dargestellte Gentranskripte sind nicht signifikant (n.s.) differenziell exprimiert. Die Farb- und Textcodierungen der signifikant differenziellen und untersuchten probesets können den Legenden der Teilabbildungen entnommen werden.

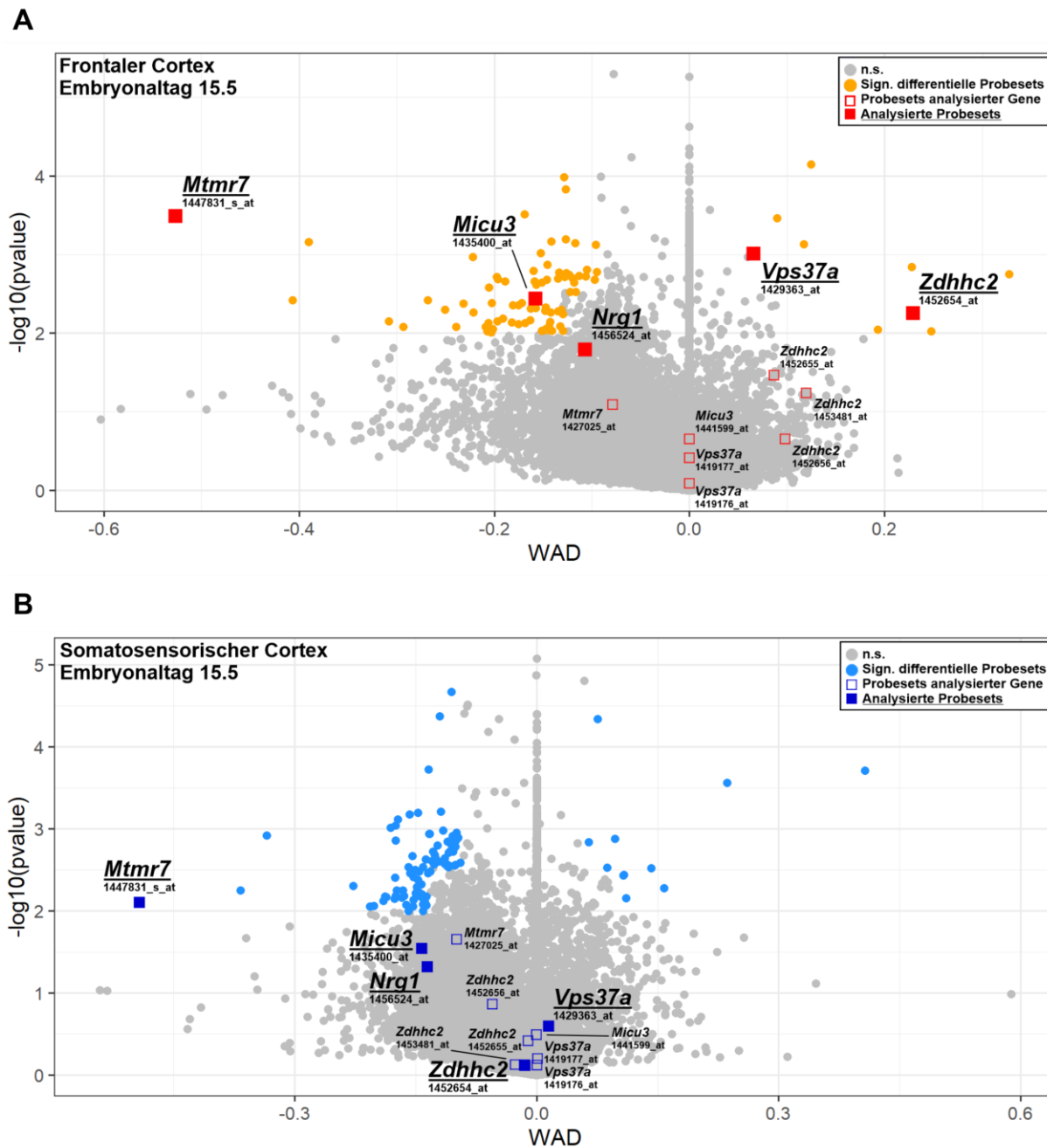


Abbildung 10: Einfluss des heterozygoten *Nrg1* knockouts auf die Expression einzelner Gentranskripte in embryonalen kortikalen Gehirnregionen. A: Differenziell exprimierte Gentranskripte im frontalen Cortex (FC) *Nrg1* defizienter Embryos. B: Differenziell exprimierte Gentranskripte im somatosensorischen Cortex *Nrg1* defizienter Embryos. Dargestellt sind Volcanoplots der Microarray Transkriptomstudien. In den Volcanoplots entspricht jeder Punkt einem Affymetrix probeset, das ein Transkript detektiert. Die weighted average difference (WAD) repräsentiert die Differenzialität eines probesets zwischen den *Nrg1* Genotypen. Negative WAD-Werte entsprechen einer negativen Differenzialität, positive WAD-Werte einer positiven Differenzialität der Genexpression in *Nrg1* defizienten Embryos. Die statistische Signifikanz der differenziellen Genexpression zwischen den *Nrg1* Genotypen wird durch den negativen dekadischen Logarithmus des p-Werts angegeben. Grau dargestellte Gentranskripte sind nicht signifikant (n.s.) differenziell exprimiert. Die Farb- und Textcodierungen der signifikant differenziellen und untersuchten probesets können den Legenden der Teilabbildungen entnommen werden. Im frontalen Cortex *Nrg1* defizienter Embryos werden unter anderem vier Gentranskripte (*Micu3*, *Mtmr7*, *Zdhhc2*, *Vps37a*) differenziell exprimiert, die auf einem Gencluster auf Chromosom 8 liegen. *Micu3*, *Vps37a* und *Zdhhc2* werden ausschließlich im schizophrenierelevanten frontalen Cortex *Nrg1* defizienter Embryos differenziell exprimiert.

Auffällig ist, dass im embryonalen frontalen Cortex von *Nrg1*^{+/-} Embryos, die Transkripte der Gene *Micu3*, *Mtmr7*, *Vps37a* und *Zdhhc2* differenziell exprimiert sind (Abb. 10A). *Micu3* und *Mtmr7* sind negativ dereguliert, *Vps37a* und *Zdhhc2* werden verstärkt exprimiert. Interessanterweise liegen diese vier Gene innerhalb eines Genclusters auf Chromosom 8, in relativer Nähe zu *Nrg1* (Abb. 11A). Die Transkription der einzelnen Gene wird auf den *Microarrays* durch mehrere Affymetrix *probesets* erfasst. Da die verschiedenen *probesets* unterschiedliche Sequenzbereiche der Transkripte mit unterschiedlicher Effizienz detektieren, ist es möglich, dass nicht alle *probesets* die Deregulation der entsprechenden Transkripte ermitteln. In den *Microarray*-Daten wird die Expression von *Mtmr7* in allen embryonalen Gehirnregionen durch den heterozygoten *Nrg1* *knockout* stark inhibiert (Abb. 9, 10). *Micu3* wird in den schizophrenierelevanten Gehirnregionen des anterioren Thalamus und frontalen Cortex differenziell exprimiert (Abb. 9A, 10A). *Vps37a* und *Zdhhc2* sind ausschließlich im frontalen embryonalen Cortex dereguliert (Abb. 10A).

Mtmr7 ist eine Phosphatidylinositol-Phosphatase und reguliert den Proteintransport und die Endo- und Exozytose von Vesikeln (Laporte et al. 2003). *Micu3* ein Ca²⁺-bindendes Protein und kontrolliert durch die Calciumaufnahme in axonalen Mitochondrien die ATP-Synthese und Homöostase in Axonen (Ashrafi et al. 2020). *Vps37a* ist notwendig für die Ausbildung von Autophagosomen und ist Teil des ESCRT I-Komplexes (*endosomal sorting complexes required for transport I*), der den vesikulären Transports reguliert und ubiquitinierte Proteine in multivesikuläre Körperchen sortiert (Takahashi et al. 2019). *Zdhhc2* ist eine Palmitoyltransferase, die multiple Proteinsubstrate palmitoyliert. Dadurch kontrolliert *Zdhhc2* unter anderem die Migration von Zellen, den Proteintransport und die Lokalisierung von Proteinen, sowie die strukturelle und funktionelle Plastizität von exzitatorischen Synapsen (Shmueli et al. 2010; Fukata et al. 2013; Woolfrey et al. 2015).

Mit den Genen *Micu3*, *Mtmr7*, *Vps37a* und *Zdhhc2* konnten somit vier Gene eines Genclusters identifiziert werden, die mit Ausnahme von *Mtmr7*, ausschließlich in schizophrenierelevanten Gehirnregionen differenziell exprimiert werden. Die molekularen Funktionen der einzelnen Proteine stehen im Einklang mit den Ergebnissen der GEAs des embryonalen frontalen Cortex und sind konsistent mit Effekten auf den intrazellulären Transport entlang des Cytoskeletts und die ATP-Synthese in axonalen Mitochondrien. Aufgrund dieser Ergebnisse wurde im nächsten Schritt versucht die differenzielle Genexpression von *Micu3*, *Mtmr7*, *Vps37a* und *Zdhhc2* im embryonalen frontalen Cortex experimentell zu bestätigen. Dazu wurden ddPCR Messungen und quantitative multiplexierte fluoreszente *in situ* Hybridisierungen durchgeführt. Die relativen *Microarray*-Expressionswerte von *Nrg1* und den vier Kandidatengenen sind abschließend in Abbildung 11 (B-F) zusammengefasst.

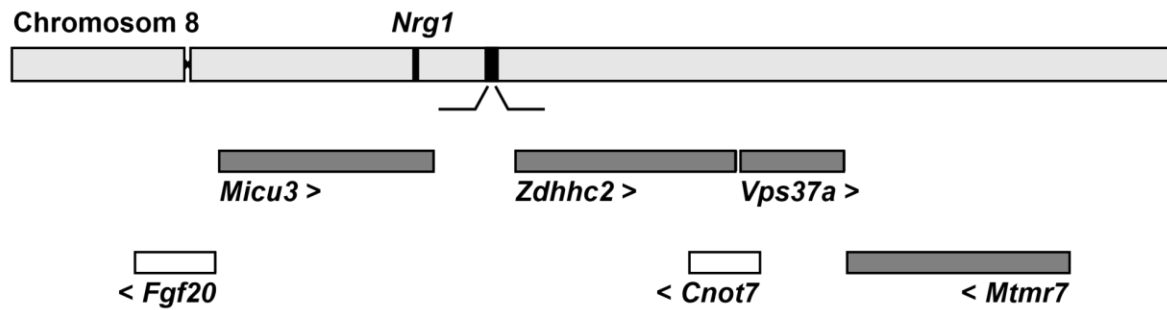
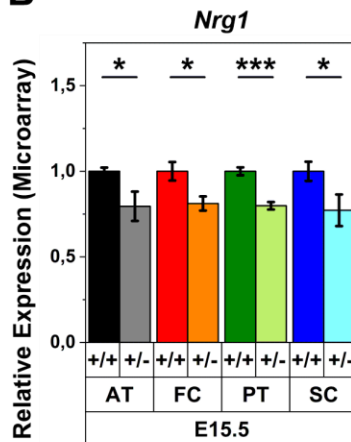
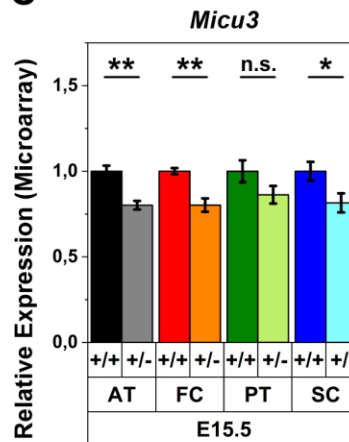
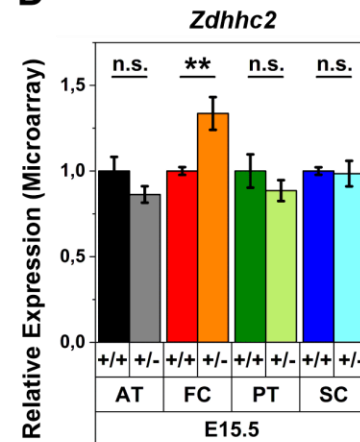
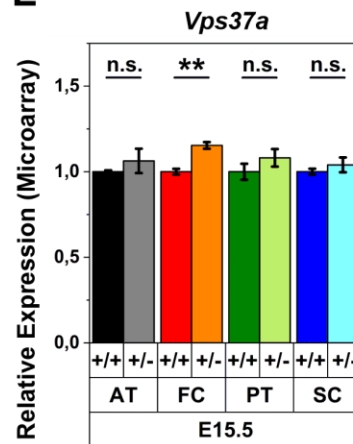
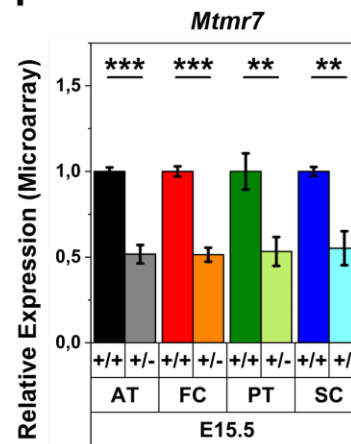
A**B****C****D****E****F**

Abbildung 11: In der Embryonalentwicklung, beeinflusst der heterozygote *Nrg1* knockout die Transkription eines Genclusters auf Chromosom 8 (Microarray -Daten). A: *Micu3*, *Vps37a*, *Zdhhc2* und *Mtmr7* liegen innerhalb eines Genclusters auf Chromosom 8, in relativer Nähe zu *Nrg1*. B-F: Ergebnisse der Microarray Genexpressionsanalyse embryonaler (E15.5) Gehirnregionen. Relative Expressionswerte von B: *Nrg1* (1456524_at), C: *Micu3* (1435400_at), D: *Zdhhc2* (1452654_at), E: *Vps37a* (1429363_at) und F: *Mtmr7* (1447831_s_at). Mittelwerte der relativen Genexpression (normalisiert auf die Expression in Wildtyp Embryos) $\pm$ SD der mittleren Genexpression drei biologischer Replikate einer Kondition. Signifikanzniveau: *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, ***: $p < 0.001$. n.s.: nicht signifikant. AT: anteriorer Thalamus, FC: frontaler Cortex, PT: Posteriorer Thalamus, SC: Somatosensorischer Cortex. E15.5: Embryonaltag 15.5. *Nrg1* Genotypen: +/+, +/-.

5.2 Genexpressionsanalysen auffällig deregulierter Gentranskripte

5.2.1 Digital droplet PCR Genexpressionsanalysen embryonaler Gehirnregionen

Um die von den *Microarrays* detektierte differenzielle Genexpression von *Nrg1*, *Micu3*, *Mtmr7*, *Vps37a* und *Zdhhc2* zu validieren, wurden ddPCR Messungen durchgeführt. Die relative Expression der Gentranskripte wurde in TaqMan-Sonden basierten Assays bestimmt und auf die Genexpression von drei *Housekeeping* Genen (*Eif1*, *Pgk1*, *Polr2a*) normalisiert. Um die Expressionsdaten der ddPCR mit den *Microarray*-Daten zu vergleichen, wurde die Genexpression der Kandidatengene im embryonalen anterioren Thalamus, frontalen Cortex, posterioren Thalamus und somatosensorischen Cortex analysiert (Abb. 12). Darüber hinaus wurden in den Messungen der ddPCR, mit Ausnahme der *Nrg1* Messungen, die gleichen Sequenzabschnitte der Gentranskripte detektiert, wie durch die *probesets* in den *Microarrays*. In den *Microarrays* wird *Nrg1* von einem *probeset* erfasst, das weit in der 3' UTR von *Nrg1* Transkripten liegt. Aufgrund der Vielzahl von *Nrg1* Isoformen erfasst das *probeset* 1456524_at mit großer Wahrscheinlichkeit nicht alle *Nrg1* Transkripte. Für die ddPCR Messungen der *Nrg1* Expression wurde der Amplifikationsbereich deshalb so gewählt, dass dieser innerhalb des Sequenzabschnitts der EGF-*like* Domäne liegt. Der einzige Sequenzbereich, den alle *Nrg1* Transkriptisoformen teilen.

Durch den heterozygoten *Nrg1 knockout* wird die Expression von *Nrg1* in allen embryonalen Gehirnregionen um circa 50% reduziert (Abb. 12A). Die Expression von *Micu3* ist im frontalen Cortex von *Nrg1*^{+/-} Embryos schwach reduziert (92%). Im anterioren Thalamus lässt sich entgegen den *Microarrays* keine *Micu3* Deregulation nachweisen (Abb. 12B).

Die Expression von *Mtmr7* ist in allen *Nrg1*^{+/-} *Microarrays* hochsignifikant reduziert (Abb. 11F). Mit Hilfe der ddPCR Messungen kann dieses Ergebnis jedoch nicht bestätigt werden. Im embryonalen anterioren Thalamus und frontalen Cortex lässt sich keine differenzielle *Mtmr7* Expression nachweisen (Abb. 12C). Die Genexpression von *Mtmr7* wurde bereits in der Dissertation von Philipp Kaiser mit qPCR und colorimetrischer *in situ* Hybridisierung untersucht. Auch hier konnte keine Deregulation von *Mtmr7* in *Nrg1*^{+/-} Mäusen nachgewiesen werden (Kaiser 2011). Die in den *Microarrays* konsistent gemessene, starke Deregulation von *Mtmr7* legt nahe, dass das *probeset* 1447831_s_at ein genotypspezifisches Artefakt misst. Durch Klonierungsarbeiten und Sequenzierung der ddPCR Amplifikationsprodukte konnte gezeigt werden, dass der verwendete *Nrg1*^{+/-} Mausstamm zwei verschiedene *Mtmr7* Allele hat. Die unterschiedlichen Allele können im isogenen Mausstamm vermutlich nur dadurch existieren, dass der *Mtmr7* Locus in unmittelbarer Nachbarschaft zum veränderten *Nrg1* Locus liegt (Abb. 11A).

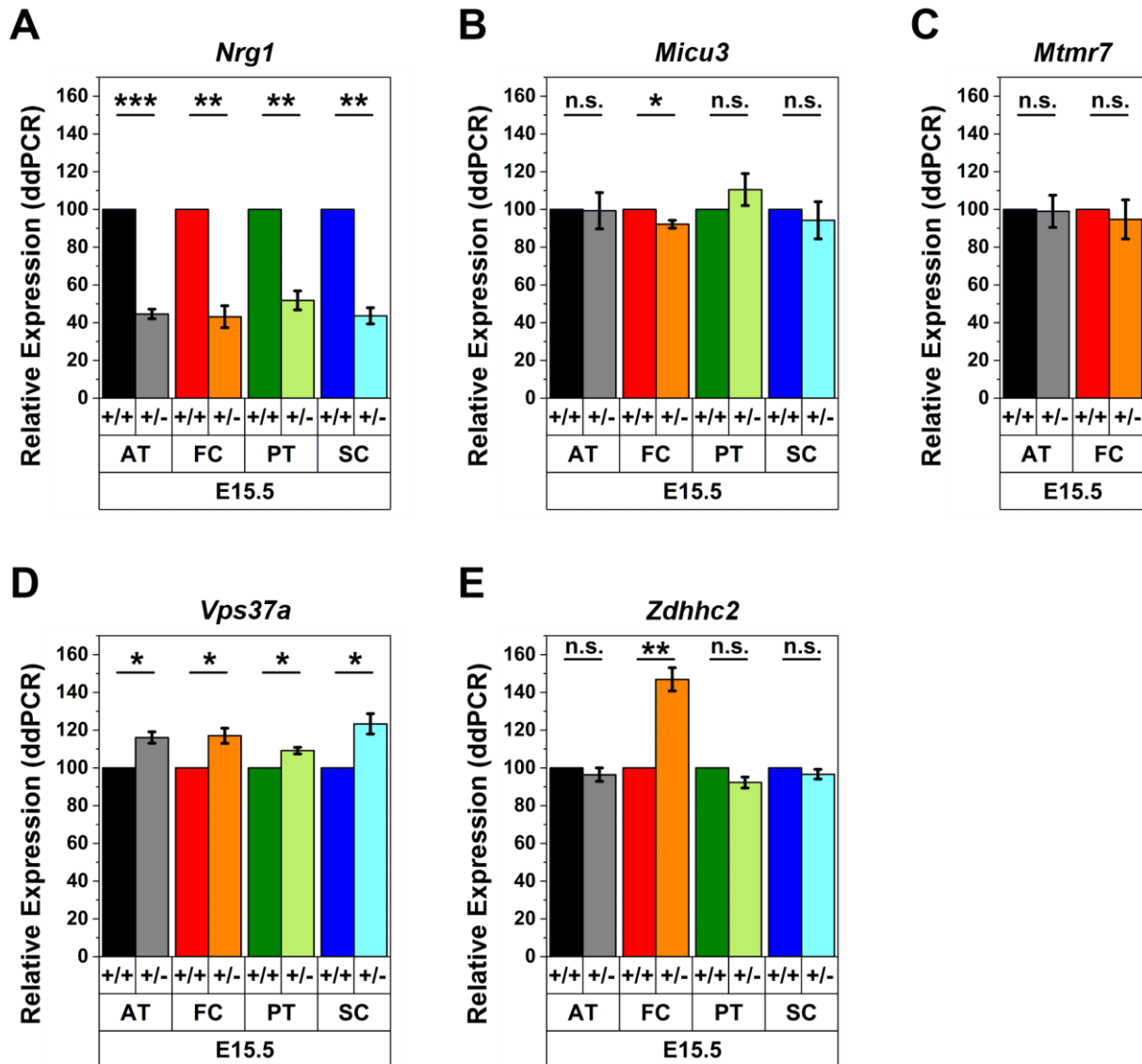


Abbildung 12: Ergebnisse der ddPCR Genexpressionsanalysen embryonaler Gehirnregionen. Relative Expressionswerte von **A: Nrg1**, **B: Micu3**, **C: Mtmr7**, **D: Vps37a** und **E: Zdhhc2**. Die in den Microarrays gemessene, differenzielle Expression von Mtmr7 kann in den ddPCR Genexpressionsanalysen nicht bestätigt werden (**C**). Nrg1 (**A**), Micu3 (**B**), Vps37a (**D**) und Zdhhc2 (**E**) werden in Nrg1 defizienten Embryos differenziell exprimiert. Die Expression von Micu3 (**B**) und Zdhhc2 (**E**) wird durch den heterozygoten Nrg1 knockout regionsspezifisch beeinflusst. Beide Transkripte werden ausschließlich im schizophorenrelevanten, embryonalen frontalen Cortex differenziell exprimiert. Die Expression von Micu3 wird reduziert, Zdhhc2 wird überexprimiert. Die relativen Expressionswerte wurden auf die Expression von drei housekeeping Genen (Eif1, Pgk1, Polr2a) normalisiert. Mittelwerte der relativen Genexpression $\pm$ SD der mittleren Genexpression von mindestens drei embryonalen pools. Ein embryonaler pool enthält Gewebeproben von 2-4 embryonalen Individuen. Signifikanzniveau: *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, ***: $p < 0.001$. n.s.: nicht signifikant. AT: Anteriorer Thalamus, FC: Frontaler Cortex, PT: Posteriorer Thalamus, SC: Somatosensorischer Cortex. E15.5: Embryonaltag 15.5. Nrg1 Genotypen: +/+, +/-.

Durch die räumliche Nähe und die dadurch bedingte geringe genetische Rekombination bleibt der Locus stabil und wird durch die Zucht *Nrg1* defizienter Tiere mitselektiert. Das *Nrg1*^{+/-} Allel unterscheidet sich durch den Austausch von Einzelnukleotiden (SNPs) vom Wildtyp Allel (Daten nicht gezeigt). Die SNPs liegen innerhalb des detektierten Sequenzbereiches und führen dort zu einem ineffizienteren Anlagern der *Microarray probes*, wodurch die Expression des *Nrg1*^{+/-} Allels weniger sensitiv detektiert wird. Die differenzielle Genexpression von *Mtmt7* in *Nrg1*^{+/-} Mäusen kann demnach endgültig ausgeschlossen werden.

Vps37a wird in den *Microarray*-Messungen ausschließlich im frontalen Cortex von *Nrg1*^{+/-} Embryos differenziell exprimiert (Abb. 10A, 11E). In der ddPCR Analyse zeigt sich, dass der heterozygote *Nrg1 knockout* die *Vps37a* Expression im gesamten embryonalen Gehirn beeinflusst und die Genexpression in allen untersuchten Gehirnregionen leicht erhöht ist (AT: 116%, FC: 117%, PT: 109%, SC: 123%, Abb. 12D). *Vps37a* wird demnach nicht regionsspezifisch differenziell exprimiert.

Zdhhc2 scheint im frontalen Cortex *Nrg1* defizienter Embryos überexprimiert zu sein (Abb. 10A, 11D). Die Ergebnisse der *Microarrays* können durch ddPCR Genexpressionsanalysen bestätigt werden. *Zdhhc2* wird im frontalen Cortex von *Nrg1*^{+/-} Embryos circa 1.5 fach überexprimiert (Abb. 12E). Im anterioren Thalamus, posterioren Thalamus und somatosensorischen Cortex *Nrg1* defizienter Embryos, wird *Zdhhc2*, wie in den *Microarrays*, nicht differenziell exprimiert.

Eine regionsspezifische Differenzialität der Gentranskripte kann also nur für *Micu3* und *Zdhhc2* bestätigt werden. Beide Transkripte sind im schizophrenierelevanten, frontalen Cortex *Nrg1* defizienter Embryos dereguliert. *Mtmt7* wird nicht differenziell exprimiert, *Vps37a* wird durch den heterozygoten *Nrg1 knockout* dereguliert, zeigt jedoch keine regionsspezifische Differenzialität. Die Deregulation der *Zdhhc2* Expression ist wesentlich stärker als die Deregulation von *Micu3*. Darüber hinaus reguliert *Zdhhc2* embryonale und postnatale Prozesse wie die Migration neuronaler Vorläuferzellen und die Verankerung synaptischer, strukturgebender Proteine. Diese Prozesse könnten in der Gehirnentwicklung zur Ausbildung und in postnatalen Entwicklungsstadien zur Manifestation und Symptomatik von Schizophrenie beitragen. Aufgrund dessen, wurde für die weiterführende experimentelle Arbeit der Fokus auf die Wirkungsweise und den molekularen Einfluss von *Zdhhc2* gelegt.

5.2.2 Quantitative multiplexierte fluoreszente *in situ* Hybridisierung (qmFISH)

Die ddPCR-Genexpressionsanalysen sind hochsensitiv und ermöglichen die Detektion geringer Expressionsunterschiede zwischen den *Nrg1* Genotypen. Eine Aussage über das Expressionsmuster eines Gentranskripts kann jedoch nicht getroffen werden. Um die Gentranskripte zusätzlich auf zelltypspezifische oder gehirnstrukturspezifische Expressionsmuster zu untersuchen, wurden qmFISH-Analysen durchgeführt. Es wurden Sondentemplates kloniert, Hapten-markierte Sonden generiert und die relative Genexpression von *Micu3*, *Vps37a* und *Zdhhc2* wurde in coronalen Schnitten des anterioren Thalamus, frontalen Cortex, posterioren Thalamus und somatosensorischen Cortex von *Nrg1*^{+/+} und *Nrg1*^{+/-} Embryos bestimmt (Abb. 13A-F). Da die Deregulation von *Mtmt7* ausgeschlossen werden konnte, wurden für *Mtmt7* keine qmFISH-Experimente durchgeführt. Für *Nrg1* wurden qualitative FISHs durchgeführt, um eine mögliche Coexpression von *Nrg1* und *Micu3*, *Vps37a* oder *Zdhhc2* zu untersuchen (Abb. 13G, H).

Für die Gentranskripte von *Micu3*, *Vps37a* und *Zdhhc2* kann mit Hilfe von qmFISH in keiner embryonalen Gehirnregion eine Deregulation der Genexpression nachgewiesen werden (Abb. 13D-F). Die *Vps37a* qmFISH Daten zeigen einen Trend der *Vps37a* Überexpression im frontalen Cortex, posterioren Thalamus und somatosensorischen Cortex von *Nrg1*^{+/-} Embryos (Abb. 13E). Jedoch erreichen die Messwerte keine statistische Signifikanz. In den Intensitätsmessungen der *Zdhhc2* Expression, maskiert ein potenzieller Ausreißer der Wildtyp Embryos die mögliche Überexpression von *Zdhhc2* im frontalen Cortex von *Nrg1*^{+/-} Embryos (Abb. 13F).

Die Boxplots verdeutlichen, dass die Intensitätsmessungen der Genexpressionen in den einzelnen Individuen stark streuen. Dies ist vor allem in den Messungen der *Zdhhc2* Expression im somatosensorischen Cortex ersichtlich (Abb. 13F). Für die Quantifizierung der Genexpression wurden coronale Hirnschnitte von je vier *Nrg1*^{+/+} und *Nrg1*^{+/-} Embryos analysiert. Aufgrund der großen Varianz der Messwerte, kann davon ausgegangen werden, dass eine größere Anzahl von Embryos analysiert werden müsste, um die differenzielle Genexpression der analysierten Transkripte durch qmFISH nachweisen zu können. Die große Varianz der Fluoreszenzintensitätswerte beruht auf der inkonsistenten Effizienz der Färbereaktion und der davon abhängigen Bildung unspezifischer Hintergrundfluoreszenz. Wird diese zu hoch, verkleinert sich der relative Anteil der spezifischen Fluoreszenzintensität, sodass geringe Unterschiede der Genexpression durch große Schwankungen unspezifischer Hintergrundfluoreszenz maskiert werden. Dies betrifft vor allem Transkripte mit schwacher bis mäßiger Expressionsstärke, wie die Gentranskripte von *Micu3*, *Vps37a* und *Zdhhc2*.

Mit Hilfe der qmFISH Genexpressionsanalysen, kann die differenzielle Genexpression von *Micu3*, *Vps37a* und *Zdhhc2* also nicht bestätigt werden. Aufgrund der Messdaten kann jedoch angenommen werden, dass die Methode im Hinblick auf die Anzahl der analysierten Individuen nicht hinreichend sensitiv ist, um die vergleichsweise geringen Unterschiede der Genexpression in *Nrg1*^{+/-} Embryos zu detektieren. In den ddPCR Expressionsanalysen wurden Gewebeproben von bis zu 20 Embryos eines Genotyps analysiert. Aufgrund der größeren Individuenzahl, der höheren Sensitivität der Methode und der Reproduktion der *Microarray*-Ergebnisse kann davon ausgegangen werden, dass die ddPCR Analysen die Differenzialität der Genexpression verlässlicher erfassen als die qmFISH Analysen.

Neben der quantitativen Bestimmung der Expressionsstärke in bestimmten Gehirnregionen, ermöglichen die qmFISH Experimente auch eine qualitative Analyse der Expressionsmuster. Im embryonalen, sich entwickelnden Cortex, sind *Micu3*, *Vps37a* und *Zdhhc2* coexprimiert (Abb. 13A-C, H). Die Transkripte werden im apikalsten Bereich der Ventrikulärzone (VZ) und im Übergang der Subventrikulärzone (SVZ) zur Intermediärzone (IZ) exprimiert. Außerdem werden die Transkripte in der *Subplate* (SP) und der Marginalzone (MZ) exprimiert. Dies lässt sich im Bereich des frontalen Cortex am besten erkennen, in dem die *Subplate* und Marginalzone aufgrund ihrer geringen Schichtdicken als dünne Linien erscheinen (Abb. 13A-C).

Nrg1 wird am stärksten in der Ventrikulärzone und der kortikalen Platte (CP) exprimiert (Abb. 13G). Daraus ergibt sich ein komplementäres Expressionsmuster von *Nrg1* und *Micu3*, *Vps37a* und *Zdhhc2*. Um das Expressionsmuster im frontalen Cortex genauer zu analysieren, wurden Intensitätsprofile entlang radialer Linien vom Ventrikel bis zur Pia gemessen. Die maximale Fluoreszenzintensität und die Länge der einzelnen Intensitätsprofile wurden normalisiert und das Expressionsmuster der einzelnen Gentranskripte in Intensitätsprofilen dargestellt. Die Intensitätsprofile verdeutlichen, dass *Micu3*, *Vps37a* und *Zdhhc2* im Cortex embryonaler Mäuse in den gleichen kortikalen Schichten coexprimiert sind. *Nrg1* wird in komplementären Cortexschichten exprimiert und ist weder mit *Micu3* noch mit *Vps37a* oder *Zdhhc2* coexprimiert (Abb. 13H). Die komplementären Expressionsmuster legen nahe, dass *Nrg1* die Expression von *Micu3*, *Vps37a* und *Zdhhc2* inhibieren könnte.

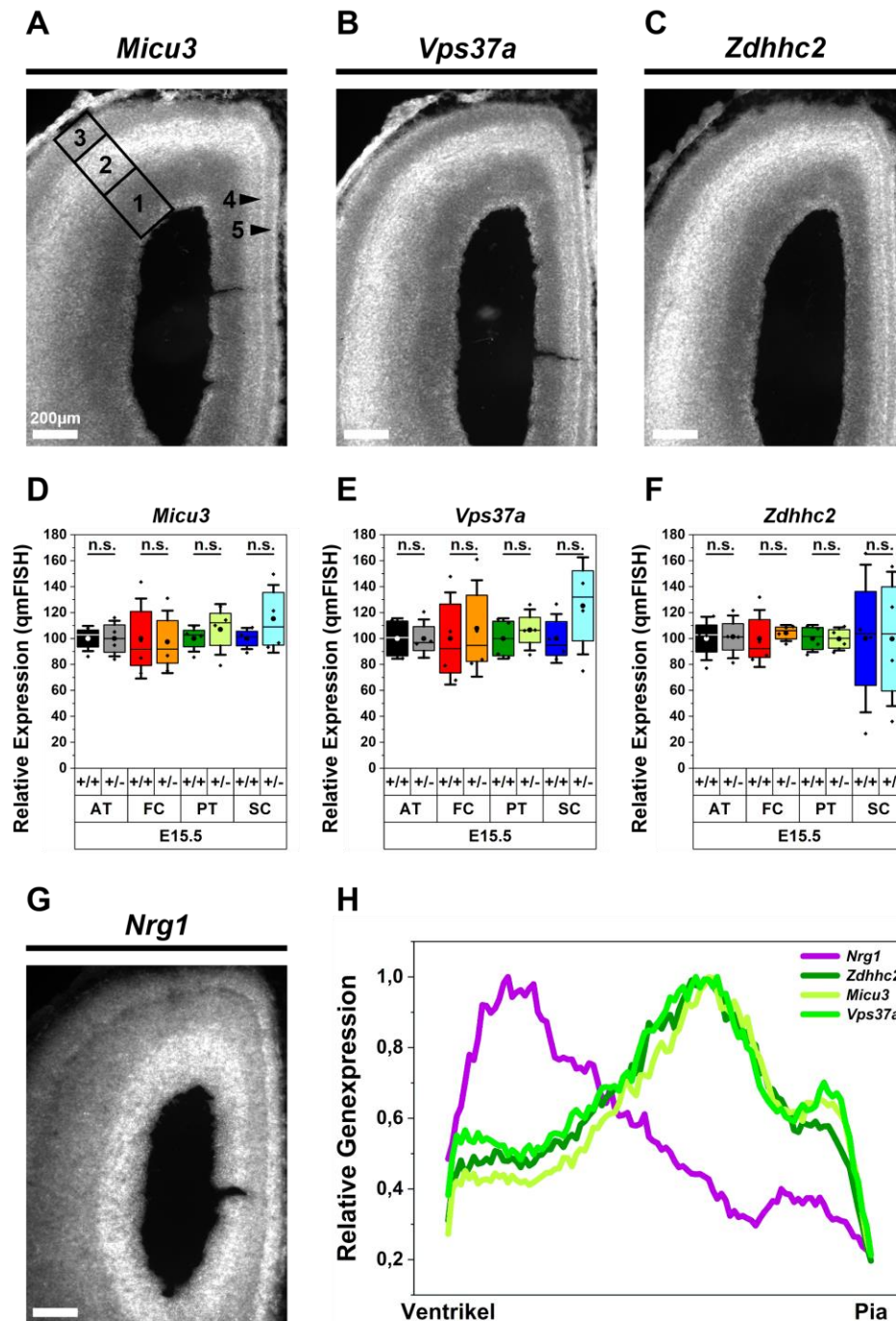


Abbildung 13: Ergebnisse der qmFISH Genexpressionsanalyse embryonaler Gehirnregionen. Mit Hilfe von qmFISH Analysen kann in keiner embryonalen Gehirnregion eine Deregulation der *Micu3*- *Vps37a*- und *Zdhhc2*-Genexpression bestätigt werden. Expressionsmuster von **A: *Micu3***, **B: *Vps37a***, **C: *Zdhhc2*** und **G: *Nrg1*** im frontalen Cortex, coronal geschnittener, embryonaler Gehirne (rechte Hemisphäre, dorsal oben, **1:** VZ/SVZ, **2:** IZ, **3:** SP/CP/MZ, **4:** SP, **5:** MZ). **Quantifizierung der relativen Expressionswerte von D: *Micu3***, **E: *Vps37a*** und **F: *Zdhhc2*** im embryonalen anterioren Thalamus (AT), frontalen Cortex (FC), posterioren Thalamus (PT) und somatosensorischen Cortex (SC). Die relativen Expressionswerte wurden auf die Expression eines housekeeping Gens normalisiert. Boxplots (Q25-Q75) mit Median (Linie) und Mittelwert (Punkt) der relativen Genexpression von vier Individuen pro Genotyp. Die kleinen Punkte repräsentieren Messwerte der einzelnen Individuen. Whiskers: $\pm$ SD des Mittelwerts. **H: Quantifizierung der kortikalen Expressionsmuster von *Nrg1*, *Micu3*, *Vps37a* und *Zdhhc2*.** *Micu3*, *Vps37a* und *Zdhhc2* werden im frontalen Cortex coexprimiert. *Nrg1* wird in dazu komplementären Cortexschichten exprimiert. Die Verteilung der relativen Genexpression wurde im frontalen Cortex entlang radialer Profillinien vom Ventrikel bis zur Pia gemessen. Profillinien wurden auf ihre Länge und maximale Fluoreszenzintensität normalisiert. n.s.: nicht signifikant. AT: Anteriorer Thalamus, FC: Frontaler Cortex, PT: Posteriorer Thalamus, SC: Somatosensorischer Cortex. **E15.5:** Embryonaltag 15.5. *Nrg1* Genotypen: +/+, +/- . Maßstabsbalken: 200 μ m.

5.3 NDEL1 ist im frontalen Cortex *Nrg1* defizienter Embryos hyperpalmitoyliert

Zdhhc2 wird im frontalen Cortex von heterozygoten *Nrg1 knockout* Embryos überexprimiert. ZDHHC2 gehört zur Familie der Palmitoyl-Acyl-Transferasen (PATs). In Säugetieren beinhaltet die Proteinfamilie 23 ZDHHC Proteine, die eine Vielzahl von verschiedenen Proteinsubstraten durch das reversible Anheften eines Palmitinsäurerests chemisch modifizieren (Globa und Bamji 2017). Die Palmitoylierung erhöht die Hydrophobizität der Proteine und reguliert dadurch ihre Verankerung in Membranen und deren subzelluläre Lokalisation. Darüber hinaus kann die Palmitoylierung die Stabilität und enzymatische Aktivität der Substrate beeinflussen. In Neuronen ist die Palmitoylierung eine der häufigsten Lipidmodifikationen. Über 40% der synaptischen Proteine werden palmitoyliert und palmitoylierte Proteine werden hochsignifikant mit Schizophrenie assoziiert (Sanders et al. 2015; Globa und Bamji 2017).

ZDHHC2 palmitoyliert überwiegend prä- und postsynaptische Proteine (SNAP23, SNAP25, GAP-43, PSD95, AKAP79/150 (Fukata et al. 2013; Woolfrey et al. 2015; Globa und Bamji 2017)). Da am Embryonaltag 15.5 nur wenige synaptische Strukturen bereits ausgebildet sind, wurde in weiterführenden Experimenten ein ZDHHC2 Substrat mit neuroentwicklungsbiologischer Relevanz untersucht. NDEL1 (NudE Neurodevelopment Protein 1 Like 1) ist ein Dynein-Adapter Protein, das in Komplexen mit LIS1 (Lissencephaly-1), NDE1 (Nuclear Distribution Protein NudE Homolog 1) und Dynactin die Dynein Aktivität reguliert (Hippenmeyer 2014; Bradshaw und Hayashi 2017). Die NDEL1/Dynein Interaktion erhöht die Aktivität des cytoplasmatischen Dyneins und ist notwendig für den subzellulären Transport, die Migration von kortikalen Neuronen, die Ausrichtung des Centrosoms und die Nukleokinese in centrosomaler Richtung (Shu et al. 2004; Youn et al. 2009; Shmueli et al. 2010; Cellular and Molecular Control of Neuronal Migration 2014; Hippenmeyer 2014). NDEL1 kann von ZDHHC2, ZDHHC3 und ZDHHC7 palmitoyliert werden. Die Palmitoylierung von NDEL1 verhindert die Ausbildung des Proteinkomplexes und reduziert die Dynein Aktivität kritisch (Shmueli et al. 2010). Um zu überprüfen, ob der heterozygote *Nrg1 knockout* die Palmitoylierung von NDEL1 im frontalen embryonalen Cortex durch die Überexpression von *Zdhhc2* beeinflusst, wurde der Grad der NDEL1 Palmitoylierung durch ABE assays (Brigidi und Bamji 2013) bestimmt.

Im ABE wurden Proteinlysate aus dem frontalen und somatosensorischen Cortex von *Nrg1^{+/+}* und *Nrg1^{+/-}* Embryos verwendet. NDEL1 wurde in der Anwesenheit von NEM (N-Ethylmaleinimid) immunpräzipitiert. NEM blockiert freie Thiolgruppen an Cysteinresten, die als potenzielle Ankerstellen für die Biotin-BMCC-Moleküle dienen könnten (Abb. 14A, 1). Durch die Zugabe von HAM (Hydroxylamin) wird die Thioesterbindung zwischen Palmitinsäure und Cysteinrest gespalten. Dadurch entstehen neue Thiolgruppen an den ursprünglich palmitoylierten Cysteinresten (Abb. 14A, 2).

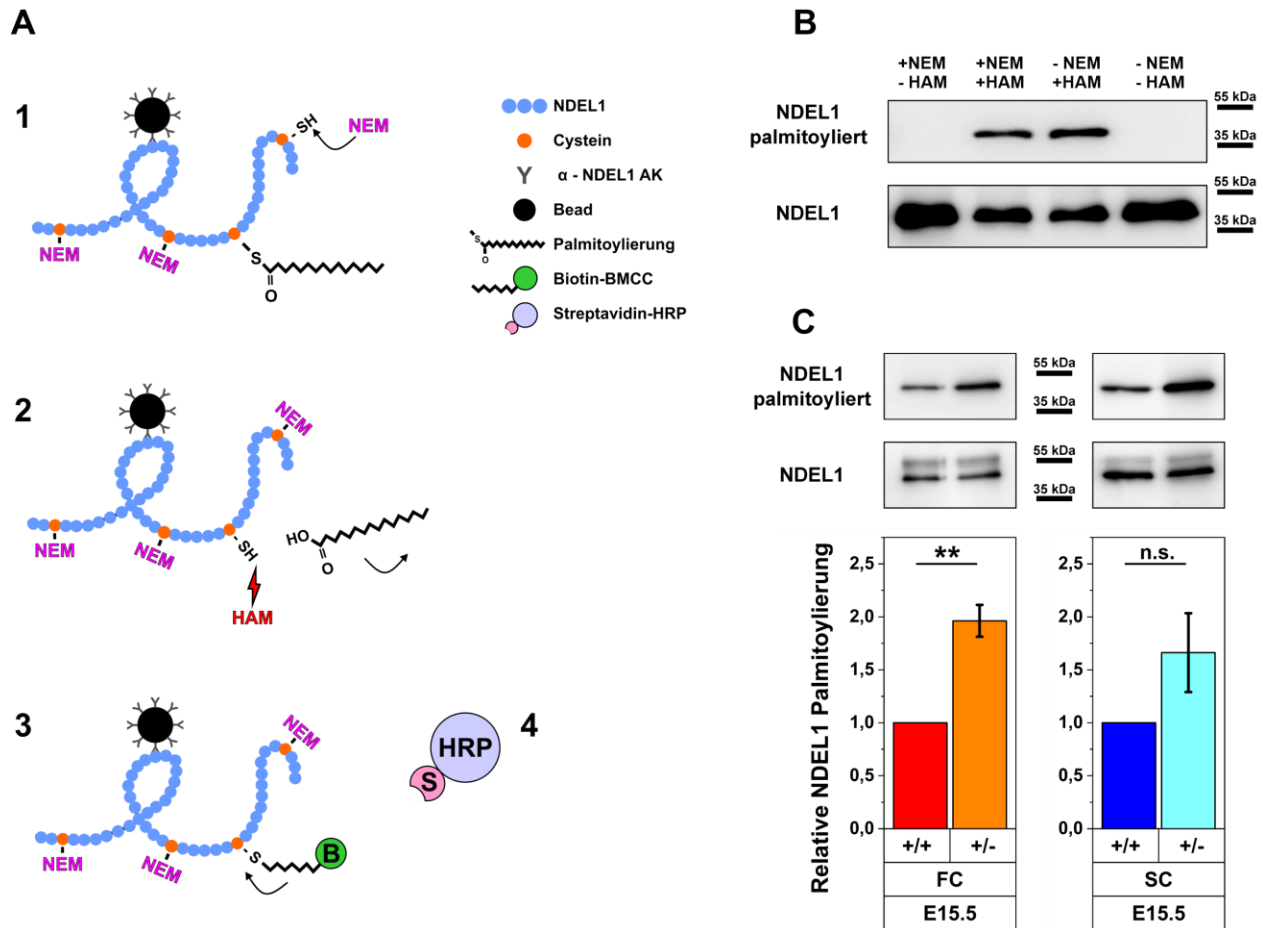


Abbildung 14: NDEL1 ist im frontalen Cortex *Nrg1* defizienter Embryonen hyperpalmitoyliert.
A: Schematischer Ablauf des Acyl-Biotin Exchange Assays. (1) Immunpräzipitation von NDEL1 mit Protein G beschichteten, magnetischen Beads in Anwesenheit von **NEM** (N-Ethylmaleinimid). NEM blockiert freie Thiolgruppen (**SH**) an nicht modifizierten Cysteinresten (**Orange**), die als mögliche Ankerstellen für **Biotin-BMCC** Moleküle dienen könnten. (2) Abspaltung der NDEL1 Palmitoylierung durch **HAM** (Hydroxylamin). HAM spaltet die Thioesterbindung zwischen Palmitinsäure und Cysteinrest, wodurch am ehemals palmitoylierten Cysteinrest eine freie Thiolgruppe (**SH**) entsteht. (3) Durch die Zugabe von Thiol-reaktivem Biotin-BMCC wird der ursprünglich palmitoylierte Cysteinrest spezifisch biotinyliert. (4) Der ausgetauschte Biotin-Marker kann durch Streptavidin gekoppelte Peroxidasen detektiert werden, sodass durch SDS-Gelelektrophorese und Western Blots die NDEL1 Gesamtmenge sowie der Anteil an palmitoyliertem NDEL1 bestimmt werden können. **B: Western Blot mit Positiv- und Negativkontrollen des ABE-Assays.** Wird NDEL1 nicht mit HAM behandelt, kann die Palmitoylierung nicht gegen eine Biotinylierung ausgetauscht und nicht detektiert werden. **C: Quantifizierung der relativen NDEL1 Palmitoylierung im frontalen und somatosensorischen Cortex *Nrg1* defizienter Embryos.** Western Blots zur Detektion der totalen und der palmitoylierten NDEL1 (38-42 kDa) Menge. Der Anteil von palmitoyliertem NDEL1 wurde auf die NDEL1 Gesamtmenge normalisiert. Die relative NDEL1 Palmitoylierung in *Nrg1* defizienten Individuen wurde auf die relative NDEL1 Palmitoylierung in *Nrg1* Wildtyp Individuen normalisiert. Die Balkendiagramme repräsentieren den Mittelwert der relativen NDEL1 Palmitoylierung $\pm$ SEM von 5 (FC) bzw. 7 (SC) embryonalen pools. Ein embryonaler pool enthält Gewebeproben von 3-5 Individuen. Signifikanzniveau: *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, ***: $p < 0.001$. **n.s.:** nicht signifikant. **FC:** Frontaler Cortex, **SC:** Somatosensorischer Cortex. **E15.5:** Embryonalaltag 15.5. *Nrg1* Genotypen: +/+, +/-. Teilabbildung A modifiziert nach Brigidi and Bamji (2013).

Die neu verfügbaren Thiolgruppen werden mit thiolreaktiven Biotin-BMCC-Molekülen markiert, sodass jeder Palmitinsäurerest durch ein Biotin-BMCC-Molekül ausgetauscht wird (Abb. 14A, 3). Die Biotin-BMCC-Moleküle, die der NDEL1 Palmitoylierung entsprechen, sowie die gesamte NDEL1 Proteinmenge, können abschließend durch Western Blots mit Streptavidin und anti-NDEL1 Antikörpern detektiert und quantifiziert werden (Abb. 14A,4).

NDEL1 und palmitoyliertes NDEL1 konnten in der Immunpräzipitation spezifisch isoliert und in Western Blots, mit einem Molekulargewicht von 38-42 kDa, spezifisch detektiert werden (Abb. 14B, C). Wird dem Proteinlysate kein HAM zugegeben, findet kein Acyl-Biotin-Austausch statt. Palmitoyliertes NDEL1 kann ohne die Zugabe von HAM im Western Blot nicht nachgewiesen werden, während die Gesamtmenge des NDEL1 Proteins detektiert wird (Abb. 14B). HAM ist ein starkes Reduktionsmittel, das neben den Thioesterbindungen der Palmitoylierung auch einen gewissen Anteil des Zielproteins degradiert (Abb. 14B). Eine totale Quantifizierung der NDEL1 Menge ist dementsprechend nicht möglich. Da alle Proben mit der gleichen Menge und für die gleiche Dauer mit HAM behandelt wurden, kann jedoch davon ausgegangen werden, dass die Proteindegradation zwischen den Proben vergleichbar ist und die relative NDEL1 Palmitoylierung durch die Normalisierung auf die gesamte NDEL1 Proteinmenge bestimmt werden kann.

Im frontalen Cortex von heterozygoten *Nrg1 knockout* Embryos wird NDEL1 hyperpalmitoyliert (Abb. 14C). Der relative Anteil von palmitoyliertem NDEL1 ist signifikant erhöht und nahezu verdoppelt (1:1.97, $p=0.005$). Im somatosensorischen Cortex von *Nrg1^{+/-}* Embryos zeigt sich ein Trend der NDEL1 Hyperpalmitoylierung. Jedoch erreicht der Unterschied keine statistische Signifikanz (1:1.66, $p=0.15$). Die Hyperpalmitoylierung von NDEL1 scheint innerhalb des embryonalen Cortex regionsspezifisch zu sein und korreliert mit der regionsspezifischen Überexpression von *Zdhhc2* im frontalen Cortex *Nrg1* defizienter Embryos. Dies bestätigt die Ergebnisse der Microarray und ddPCR-Daten. Die Palmitoylierung von NDEL1 inhibiert die Interaktion von NDEL1 und Dynein und reduziert die Dynein Aktivität. Entsprechend kann davon ausgegangen werden, dass die Regulation und Aktivität des minus-End-gerichteten Motorproteins im frontalen Cortex von *Nrg1^{+/-}* Embryos beeinträchtigt ist. Die Auswirkungen der NDEL1 Hyperpalmitoylierung auf die radiale Migration exzitatorischer Vorläuferzellen und auf die Ausrichtung des Centrosoms wurde deshalb in den folgenden Experimenten untersucht.

5.4 Im frontalen Cortex *Nrg1* defizienter Embryos ist die Verteilung *Zdhhc2* positiver Zellen verändert

NDEL1 wird von den Palmitoyltransferasen ZDHHC2, ZDHHC3 und ZDHHC7 palmitoyliert. Durch den Grad der NDEL1 Palmitoylierung kann die Aktivität des minus-End-gerichteten Motorproteins Dynein reguliert werden. *Gain of function* und *loss of function* Experimente der einzelnen Komponenten belegen, dass die Effizienz der radialen Migration exzitatorischer Vorläuferzellen von einem optimalen Dynein Aktivitätsniveau abhängt. Die Überexpression von *Ndel1*, dauerhaft aktiviertem *Ndel1* und *Zdhhc7* führt zu einer Anreicherung von exzitatorischen Vorläuferzellen in der Ventrikulärzone und Intermediärzone. Der gleiche Effekt lässt sich für *knockdown* Experimente von *Zdhhc2*, *Zdhhc3* und *Zdhhc7* beobachten (Shmueli et al. 2010). Entsprechend stört sowohl die Hyper- als auch Hypoaktivität von Dynein die radiale Migration exzitatorischer, neuronaler Vorläuferzellen.

Im frontalen Cortex *Nrg1* defizienter Embryos wird *Zdhhc2* überexprimiert und NDEL1 hyperpalmitoyliert. Entsprechend kann davon ausgegangen werden, dass das Dynein Aktivitätsniveau reduziert ist und die radiale Migration exzitatorischer Vorläuferzellen gestört wird. Um diese Hypothese zu überprüfen, wurden *Zdhhc2* positive Zellen im frontalen Cortex von *Nrg1*^{+/+} und *Nrg1*^{+/-} Embryos mit fluoreszenten, quantitativen *in situ* Hybridisierungen markiert und deren intracortikale Verteilung analysiert. Dazu wurden coronale Schnitte von embryonalen Gehirnen (E15.5) verwendet und im Bereich des frontalen Cortex (FC) die relative *Zdhhc2* Expression in der Ventrikulärzone (VZ), Intermediärzone (IZ) und cortikalen Platte (CP) gemessen (Abb. 15A, B, C). Im frontalen Cortex von *Nrg1*^{+/-} Embryos ist die relative *Zdhhc2* Expression in der Ventrikulärzone signifikant erhöht und in der cortikalen Platte signifikant reduziert. In der Intermediärzone lässt sich kein Unterschied der relativen *Zdhhc2* Expression feststellen (Abb. 15D). Die Verteilungen der *Zdhhc2* positiven Zellen verdeutlichen, dass im frontalen Cortex *Nrg1* defizienter Embryos mehr *Zdhhc2* positive Zellen im Bereich der Ventrikulärzone angereichert sind, während weniger *Zdhhc2* positive Zellen die cortikale Platte erreichen. Diese Verteilung könnte ein mögliches Migrationsdefizit radial migrierender Vorläuferzellen repräsentieren, das auf der Überexpression von *Zdhhc2* und Hyperpalmitoylierung von NDEL1 beruhen könnte. Wäre dies der Fall, würden *Zdhhc2* positive Zellen aufgrund der reduzierten Dynein Aktivität ineffizienter migrieren, sodass sich exzitatorische Vorläuferzellen im Bereich der Ventrikulärzone anreichern und weniger Zellen die cortikale Platte erreichen.

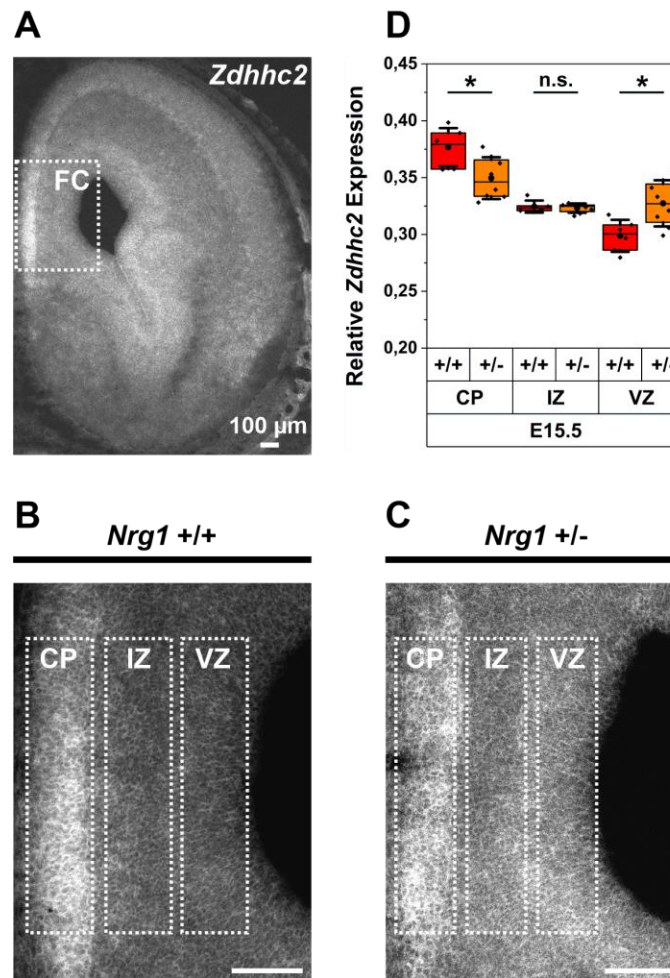


Abbildung 15: Die Verteilung Zdhhc2 positiver Zellen ist im frontalen Cortex Nrg1 defizienter Embryos signifikant verändert. In der Ventrikulärzone sind Zdhhc2 positive Neuronen angereichert, in der kortikalen Platte signifikant reduziert. **A: Zdhhc2 qmFISH in coronalen Gehirnschnitten des embryonalen frontalen Cortex (FC; linke Hemisphäre, dorsal oben).** **B: Zdhhc2 qmFISH in Nrg1+/+ Embryos.** Vergrößerung des embryonalen frontalen Cortex. **C: Zdhhc2 qmFISH in Nrg1+/- Embryos.** Vergrößerung des embryonalen frontalen Cortex. Zur Analyse der Verteilung Zdhhc2 positiver Zellen, wurden Fluoreszenzintensitäten in der Ventrikulärzone (VZ), Intermediärzone (IZ) und kortikalen Platte (CP) gemessen. **D: Quantifizierung der relativen Zdhhc2 Expression in der Ventrikulärzone, Intermediärzone und kortikalen Platte.** Die Fluoreszenzintensitäten der einzelnen kortikalen Schichten wurden auf die gesamte Fluoreszenzintensität des frontalen Cortex normalisiert. Boxplots (Q25-Q75) mit Median (Linie) und Mittelwert (Punkt) der relativen Zdhhc2 Expression von 6 Nrg1 Wildtyp Embryos und 8 Nrg1 defizienten Embryos. Pro Embryo wurden mehrere, coronale Schnitte einer Schnittserie analysiert. Die kleinen Punkte repräsentieren Messwerte der einzelnen Individuen. Whiskers: $\pm$ SD des Mittelwerts. Signifikanzniveau: *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, ***: $p < 0.001$. n.s.: nicht signifikant. FC: Frontaler Cortex, E15.5: Embryonaltag 15.5. Nrg1 Genotypen: Nrg1 +/+, Nrg1 +/- . Maßstabsbalken: 100 μ m.

5.5 Radial migrierende, exzitatorische Progenitoren akkumulieren in der SVZ des frontalen Cortex *Nrg1* defizienter Embryos

Die intracortikale Verteilung *Zdhhc2* positiver Zellen legt nahe, dass die radiale Migration neuronaler Vorläuferzellen im frontalen Cortex *Nrg1* defizienter Embryos gestört ist. *Zdhhc2* wird nicht ausschließlich in exzitatorischen Vorläuferzellen exprimiert. Entsprechend könnte der beobachtete Effekt auf anderen Zellpopulationen beruhen, die nicht radial durch den sich entwickelnden Cortex migrieren. Um mögliche Defizite der radialen Migration spezifisch zu analysieren, wurden quantitative fluoreszente *in situ* Hybridisierungen (qFISH) gegen *Sstr2* (Somatostatin Rezeptor 2) durchgeführt. *Sstr2* ist ein Markergen für radial migrierende Progenitoren einer frühen Phase der Migration (Loo et al. 2019; La Manno et al. 2021; Ruan et al. 2021), das an Embryonaltag 15.5 ausschließlich in dieser Zellpopulation exprimiert wird.

Für die *Sstr2* qFISH wurden coronale Schnitte des frontalen und somatosensorischen Cortex von *Nrg1*^{+/+} und *Nrg1*^{+/-} Embryos verwendet (Abb. 16A). Entlang anatomisch definierter Linien (s. 4.14) wurden Intensitätsprofile der *Sstr2* Expression vom Ventrikel bis zur Pia gemessen (Abb. 16B, C). Anhand dieser Profillinien wurde die relative *Sstr2* Expression (Abb. 16D) sowie die Verteilung *Sstr2* positiver Zellen (Abb. 16E-H) im FC und SC von *Nrg1*^{+/+} und *Nrg1*^{+/-} Embryos bestimmt.

Die relative *Sstr2* Expression wird durch den heterozygoten *Nrg1 knockout* nicht beeinflusst (Abb. 16D). Bei der Verteilung *Sstr2* positiver Zellen kann im frontalen Cortex *Nrg1* defizienter Embryos erneut eine Akkumulation von radial migrierenden, *Sstr2* positiven Zellen nachgewiesen werden. Im Bereich der äußeren Subventrikulärzone, sind die Zellen entlang der Migrationsfront signifikant angereichert, während im Bereich der Intermediärzone und der cortikalen Platte weniger Zellen detektiert werden (Abb. 16E, G). Im somatosensorischen Cortex lässt sich zwischen den Genotypen kein Unterschied in der Verteilung der radial migrierenden Neuronen nachweisen (Abb. 16F, H).

Der heterozygote *Nrg1 knockout* beeinflusst also die radiale Migration neuronaler Vorläuferzellen von der Ventrikulärzone in die cortikale Platte. Der Einfluss ist regionsspezifisch und betrifft den frontalen Cortex, in dem *Zdhhc2* überexprimiert, NDEL1 hyperpalmitoyliert und die Dynein Aktivität potenziell reduziert ist. Die radiale Migration scheint nicht grundlegend beeinträchtigt zu sein, da die neugeborenen Zellen die Ventrikulärzone verlassen und entlang den Radialglia Fortsätzen in Richtung der cortikalen Platte migrieren können. Die Anreicherung von *Sstr2* positiven Zellen im Bereich der Subventrikulärzone lässt jedoch darauf schließen, dass die *Nrg1 knockout* Zellen weniger effizient, weniger zielgerichtet oder mit geringerer Geschwindigkeit radial migrieren. Um diese Hypothese zu überprüfen, wurden embryonale Ventrikulärzonenexplantate etabliert, um die radiale Migration exzitatorischer, neuronaler Vorläuferzellen auf Einzelzellniveau zu analysieren.

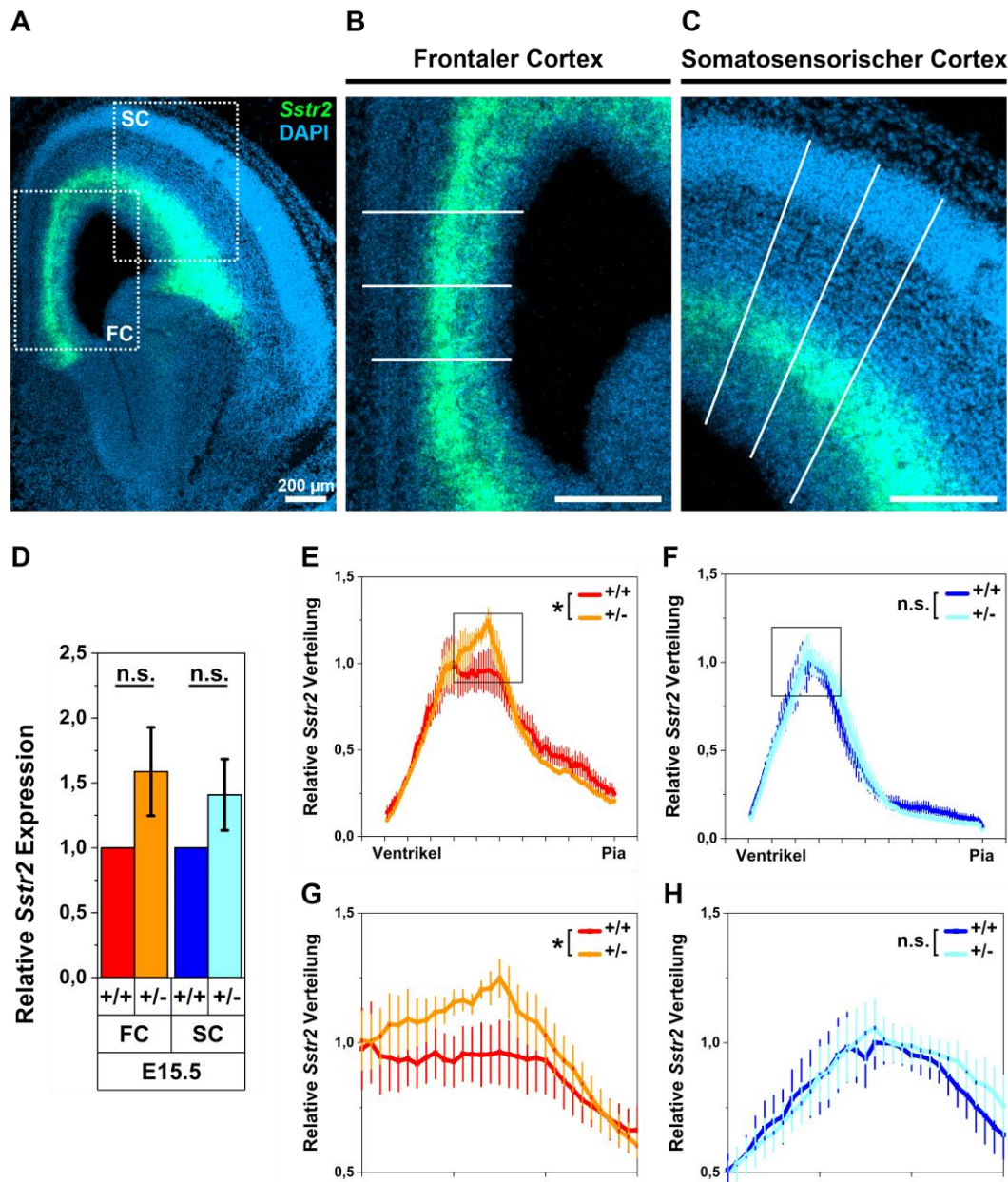


Abbildung 16: Der heterozygote *Nrg1* knockout beeinflusst die radiale Migration neuronaler, exzitatorischer Progenitoren im frontalen Cortex und führt zu einer Akkumulation von *Sstr2* positiven Zellen im Bereich der Subventrikulärzone/Intermediärzone. **A:** *Sstr2* qmFISH in coronalen Gehirnschnitten des embryonalen frontalen und somatosensorischen Cortex (FC, SC, jeweils linke Hemisphäre, dorsal oben). **B:** *Sstr2* qmFISH, Vergrößerung des embryonalen frontalen Cortex. **C:** *Sstr2* qmFISH, Vergrößerung des embryonalen somatosensorischen Cortex. Die weißen Linien repräsentieren anatomisch definiert positionierte, radiale Profillinien die den embryonalen Cortex vom Ventrikel bis zur Pia durchspannen. Entlang dieser Profillinien wurde die relative *SSTR2* Expression und die Verteilung *Sstr2* positiver Zellen gemessen. **D:** Relative *SSTR2* Expression im frontalen und somatosensorischen Cortex von *Nrg1* Wildtyp und *Nrg1* defizienten Embryos. Die relative *SSTR2* Expression wurde auf *Nrg1* Wildtyp Embryos normalisiert und durch zweiseitige Einstichproben t-Tests auf statistische Signifikanz überprüft. Balkendiagramme repräsentieren die mittlere relative *SSTR2* Expression $\pm$ SEM von 6 Individuen pro Genotyp. **E, F, G, H:** Relative *SSTR2* Verteilung im frontalen und somatosensorischen Cortex von *Nrg1* Wildtyp und *Nrg1* defizienten Embryos. Die Intensitätsprofile wurden auf ihre Länge und maximale Fluoreszenzintensität normalisiert. Unterschiede der Fluoreszenzintensitätsverteilung zwischen *Nrg1*+/+ und *Nrg1*+/- Embryos wurden durch Kolmogorow-Smirnow-Tests auf statistische Signifikanz überprüft. Die Intensitätsprofile repräsentieren die mittlere relative *SSTR2* Verteilung $\pm$ SEM von 6 Individuen pro Genotyp. **G, H:** Vergrößerung der Profillinien der relativen *SSTR2* Verteilung in der Subventrikulärzone/Intermediärzone. In diesem Bereich akkumulieren exzitatorische, *Sstr2* positive Progenitoren im frontalen (**G**), nicht aber im somatosensorischen Cortex *Nrg1*+/+ Embryos (**H**). Signifikanzniveau: *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, ***: $p < 0.001$. n.s.: nicht signifikant. FC: Frontaler Cortex, SC: Somatosensorischer Cortex. E15.5: Embryonaltag 15.5. *Nrg1* Genotypen: *Nrg1* +/+, *Nrg1* +/- . Maßstabsbalken: 200 μ m.

5.6 Zelluläre Untersuchung der kortikalen radialen Migration in Explantatkulturen

5.6.1 Etablierung embryonaler Ventrikulärzonenexplantate des frontalen Cortex

Durch den heterozygoten *Nrg1 knockout* werden *Zdhhc2* und NDEL1 im embryonalen frontalen Cortex überexprimiert und hyperpalmitoyliert. Dies könnte durch eine Reduktion der Dynein Aktivität zu dem beobachteten Migrationsdefizit von exzitatorischen neuronalen Vorläuferzellen führen, die sich im Bereich der Ventrikulärzone (*Zdhhc2*⁺ Zellen) und Subventrikulärzone (*Sstr2*⁺ Zellen) signifikant anreichern. Um das Migrationsverhalten von *Nrg1*^{+/+} und *Nrg1*^{+/-} Zellen auf Einzelzellniveau zu analysieren, wurden eigens *in vitro* Ventrikulärzonenexplantate des embryonalen, frontalen Cortex etabliert. In diesen migrieren Einzelzellen entlang regenerierten Radialglia Zellfortsätzen aus dem Gewebeverbund der Ventrikulärzone (Abb. 17).

Zur Analyse verschiedener Migrationsparameter, wurden die Explantatkulturen immunfluoreszent gefärbt. Die Zellkörper und Fortsätze der Radialglia Zellen wurden mit α -Vimentin Antikörpern visualisiert. Die Centrosomen der explantierten Zellen wurden durch α - γ -Tubulin Antikörper markiert und die Zellkerne mit DAPI gefärbt (Abb. 17, 18). Vimentin ist ein Intermediärfilament und Markerprotein für Radialglia Zellen. γ -Tubulin ist notwendig für die Ausbildung des Gamma-Tubulin-Ring-Komplexes (γ TURC) am Centrosom. Dies ist eine Proteinstruktur, die die Polymerisation und Ausbildung von Mikrotubuli fördert und die ausgebildeten Tubulin-Protofilamente mit ihrem Minusende am Centrosom verankert.

Zur Anfertigung der Explantate wurden parasagittale Gewebestreifen aus coronalen Schnitten des embryonalen (E14.5) Gehirns entnommen (Abb. 17D). Die Streifen enthalten die Ventrikulärzone des frontalen Cortex, in dem die Zellkörper der Radialglia Zellen lokalisiert sind. Bei der Anfertigung der Gewebestreifen wurden die Fortsätze der Radialglia Zellen im Bereich der Subventrikulärzone/Intermediärzone durchtrennt. Nach 24 Stunden Kultivierung konnte beobachtet werden, dass viele Radialglia Zellen ihre basalen Fortsätze regenerieren und diese aus dem Ventrikulärzonenexplantat auswachsen (Abb. 17A). Entlang der Fortsätze, verlassen einzelne Zellen das Ventrikulärzonenexplantat und migrieren in die Peripherie. Da die Zellen Vimentin negativ sind und entlang der Fortsätze radial migrieren, kann davon ausgegangen werden, dass es sich um radial migrierende exzitatorische Progenitoren handelt (Abb. 17B, C).

Durch das Auswachsen der Radialglia Fortsätze und die Migration der einzelnen exzitatorischen Progenitoren, werden die zellulären Strukturen hinreichend vereinzelt, sodass die einzelnen Zellen sowie deren subzelluläre Strukturen einfacher separiert und eindeutig identifiziert werden können. Entsprechend eignen sich die etablierten Ventrikulärzonenexplantate hervorragend, um die radiale Migration exzitatorischer, neuronaler Progenitoren auf Einzelzellniveau zu untersuchen.

In der Anzahl der ausgewachsenen Radialglia Fortsätze und der Anzahl der ausmigrierten exzitatorischen Progenitoren lässt sich zwischen *Nrg1*^{+/+} und *Nrg1*^{+/-} Explantaten kein Unterschied feststellen (Vgl. Abb. 17B, C, Daten nicht gezeigt). Diese Beobachtung steht mit der Hypothese im Einklang, dass die radiale Migration in *Nrg1*^{+/-} Embryos nicht grundlegend gestört ist und die Zellen die Ventrikulärzone entlang der Radialglia Fortsätze verlassen können. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass das beobachtete Migrationsdefizit auf subtileren Mechanismen beruhen muss, die die Migrationseffizienz der *Nrg1*^{+/-} Neuronen beeinflussen.

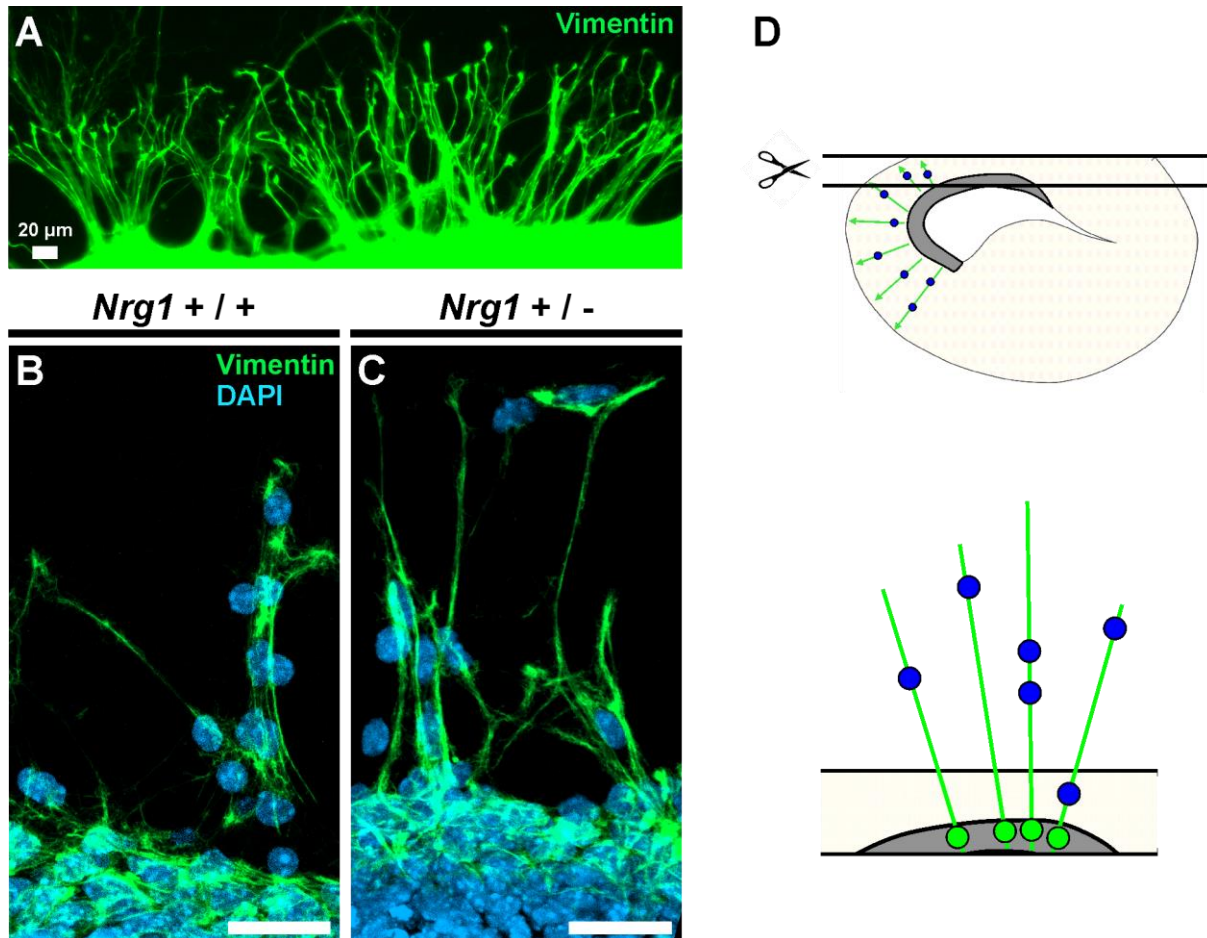


Abbildung 17: Ventrikulärzonenexplantate aus dem embryonalen frontalen Cortex. Um die radiale Migration exzitatorischer, neuronaler Progenitoren auf Einzelzellniveau zu analysieren, wurde Gewebe aus der Ventrikulärzone des embryonalen frontalen Cortex entnommen, explantiert und kultiviert. **A: Die Zellkörper der Radialglia Zellen sind in der Ventrikulärzone (Gewebestreifen, unterer Rand) lokalisiert.** Die bei der Entnahme des Gewebes durchtrennten Fortsätze der Radialglia Zellen regenerieren nach 24h Kultivierung und wachsen auf Laminin beschichteten Deckgläsern aus dem Ventrikulärzonenexplantat aus. Immunfluoreszente Färbung gegen Vimentin, ein Intermediärfilament und Markerprotein von Radialglia Zellen. **B, C: Exzitatorische Progenitoren migrieren entlang der Fortsätze von Radialglia Zellen radial aus dem Ventrikulärzonenexplantat.** Die Zellkerne migrierender Zellen und Zellkerne des Ventrikulärzonenexplantats sind mit DAPI gefärbt. In der Anzahl der ausgewachsenen Radialglia Fortsätze und der Anzahl der ausmigrierten exzitatorischen Progenitoren lässt sich zwischen *Nrg1*^{+/+} (**B**) und *Nrg1*^{+/-} (**C**) Explantaten kein Unterschied feststellen (Daten nicht gezeigt). **D: Schematische Darstellung der Herstellung von Ventrikulärzonenexplantaten.** Zur Anfertigung der Explantate wurden coronale Gehirnschnitte (rechte Hemisphäre, dorsal links) in parasagittale Streifen geschnitten. Die ausgewählten Gewebestreifen enthalten die Zellkörper von Vimentin positiven Radialglia Zellen (**grün**), die in der Ventrikulärzone (**grau**) lokalisiert sind. Maßstabsbalken: 20 μ m.

5.6.2 Der heterozygote *Nrg1 knockout* beeinflusst die Orientierung des Centrosoms in radial migrierenden, exzitatorischen Progenitoren

Während der radialen Migration durchlaufen die exzitatorischen Progenitoren verschiedene Migrationsphasen, in denen sich die Orientierung des Centrosoms und die Polarität der Zellen ändert. Während der multipolaren Migration in der Subventrikulärzone, migrieren die Zellen ungerichtet und nehmen eine multipolare Morphologie mit zufälliger Centrosomorientierung an (Cooper 2014). Von der Subventrikulärzone bis in die cortikale Platte migrieren die Zellen gerichtet, entlang den Fortsätzen von Radialglia Zellen. Dabei nehmen sie eine bipolare Form an, bei der das Centrosom basal, in Migrationsrichtung orientiert ist und die Direktionalität der Nukleokinese bestimmt (Tsai und Gleeson 2005).

Es ist bekannt, dass die korrekte Ausrichtung des Centrosoms und die Nukleokinese während der radialen Migration von cytoplasmatischem Dynein und Mikrotubuli assoziierten Proteinen abhängig sind. Diese sind notwendig, um das Centrosom vor dem Zellkern zu positionieren, den Zellkern über Mikrotubuli an das Centrosom zu koppeln und den Zellkern in Richtung des Centrosoms zu ziehen (Tsai und Gleeson 2005). *Loss of function* Experimente für NDEL1 und LIS1 belegen, dass die Komplexbildung aus NDEL1, LIS1 und Dynein für diese Prozesse dringend notwendig ist. Das Ausschalten einzelner Interaktionspartner, oder des gesamten Komplexes, führt zur Entkopplung des Zellkerns von Mikrotubuli, zu Defiziten der Nukleokinese, der centrosomalen Ausrichtung, der Orientierung von migrierenden Neuronen und letztendlich zu einer Akkumulation von Neuronen in der Subventrikulärzone und Intermediärzone (Shu et al. 2004; Sasaki et al. 2005; Youn et al. 2009; Shmueli et al. 2010).

Um zu überprüfen, ob die *Nrg1* Defizienz die Nukleokinese oder die Ausrichtung des Centrosoms in radial migrierenden Progenitoren beeinflusst, wurden Ventrikulärzonenexplantate des frontalen Cortex von *Nrg1^{+/+}* und *Nrg1^{+/-}* Embryonen angefertigt und immunfluoreszent gefärbt (Abb. 18A-H). In den radial migrierenden Zellen wurde die Distanz zwischen Centrosom und Zellkern gemessen, um die Stärke der Kern-Centrosom-Kopplung zu bestimmen. Die Orientierung des Centrosoms wurde über den mittleren Winkel zwischen Centrosom und Radialglia Fortsatz bestimmt und dient als Indikator für persistente und zielgerichtete Migration exzitatorischer Progenitoren (Abb. 18 I).

In radial migrierenden exzitatorischen Progenitoren wird der Abstand zwischen Centrosom und Zellkern durch den heterozygoten *Nrg1 knockout* nicht beeinflusst. Der mittlere Abstand beträgt in Ventrikulärzonenexplantaten aus *Nrg1^{+/-}* Embryos 3.54 μm , in Ventrikulärzonenexplantaten aus *Nrg1^{+/-}* Embryos 3.56 μm (Abb. 18J). Die Kopplung des Nucleus an Mikrotubuli und die Nukleokinese scheinen demnach durch die Hyperpalmitoylierung von NDEL1 nicht beeinträchtigt zu werden.

Im Gegensatz hierzu, wird die mittlere Orientierung des Centrosoms durch den heterozygoten *Nrg1 knockout* gestört. In radial migrierenden, *Nrg1* defizienten Progenitoren, vergrößert sich der mittlere Winkel zwischen Centrosom und Radialglia Fortsatz von 61° auf 78° (Abb. 18K, $p=0.0005$), was einer apikaleren Orientierung des Centrosoms entspricht. Kategorisiert man die Orientierung der Centrosomen in apikale ($\geq 90^\circ$) und basale Polaritäten ($< 90^\circ$) zeigt sich, dass durch den heterozygoten *Nrg1 knockout* der Anteil an radial migrierenden Zellen mit basaler Centrosomorientierung signifikant reduziert wird (Abb. 18L, $p=0.005$). In Ventrikulärzonenexplantaten aus *Nrg1^{+/-}* Embryos haben 72% der radial migrierenden Zellen ein basal orientiertes Centrosom. In Ventrikulärzonenexplantaten aus *Nrg1^{+/-}* Embryos sind 57% der Centrosomen basal orientiert.

Die Orientierung der Centrosomen in radial migrierenden, *Nrg1* defizienten Progenitoren wird möglicherweise durch die Überexpression von *Zdhhc2* und die Hyperpalmitoylierung von NDEL1 beeinflusst. Die daraus resultierende, reduzierte Aktivität von cytoplasmatischem Dynein scheint nicht hinreichend zu sein, um die basale Ausrichtung der Centrosomen normal zu regulieren. Da die Centrosomen während der radialen Migration die Richtung der Nukleokinese vorgeben, kann davon ausgegangen werden, dass die betroffenen Neuronen während der strikt radialen Migrationsphasen weniger zielgerichtet migrieren und aufgrund ihrer mangelnden Persistenz im Bereich der Subventrikulärzone akkumulieren. Alternativ könnte die veränderte Orientierung des Centrosoms auch indizieren, dass *Nrg1* defiziente Neuronen länger in der multipolaren Migrationsphase verharren. Während der multipolaren Migration sind die Centrosomen nicht einheitlich, sondern zufällig angeordnet. Jedoch verlassen die exzitatorischen Progenitoren für diese Migrationsphase den Radialglia Fortsatz und stehen nicht bzw. kaum in Kontakt mit den neuronalen Stammzellen (Tabata und Nakajima 2003; Cooper 2014). Da für die Auswertung der centrosomalen Orientierung nur Zellen verwendet wurden, die mit Radialglia Fortsätzen Kontakt hatten, kann nicht davon ausgegangen werden, dass multipolar migrierende Neuronen ausreichend erfasst wurden.

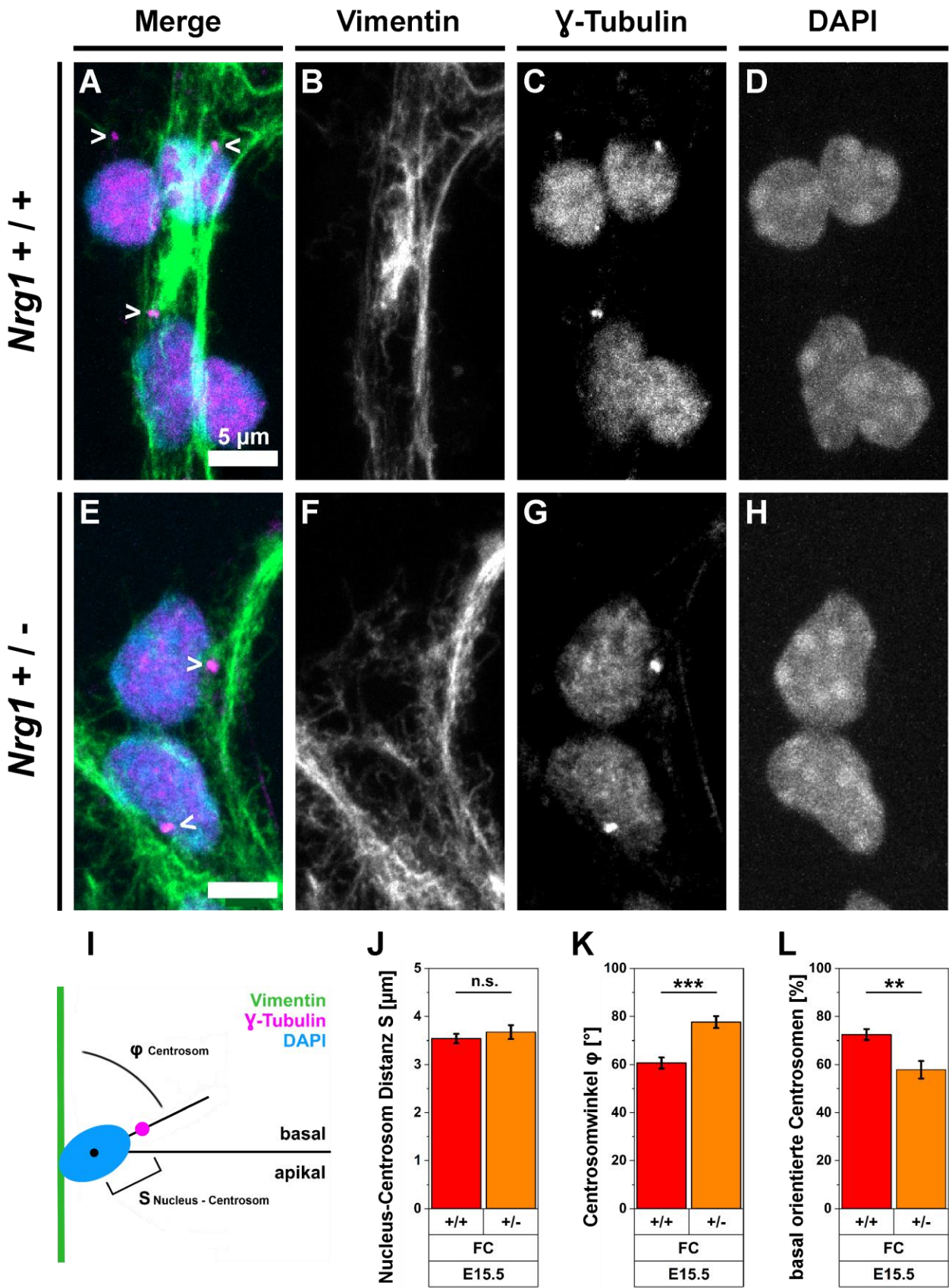


Abbildung 18: Der heterozygote *Nrg1* knockout beeinflusst die Orientierung des Centrosoms in radial migrierenden exzitatorischen Progenitoren des embryonalen frontalen Cortex. A-H: Exzitatorische Progenitoren aus *Nrg1* $+/+$ (A-D) und *Nrg1* $+/-$ (E-H) Ventrikulärzonenexplantaten, migrieren entlang Radialglia Zellfortsätzen. **Die Fortsätze der Radialglia Zellen (B, F), die Centrosomen der migrierenden Zellen (C, G) und die Zellkerne der migrierenden Zellen (D, H)** wurden immunfluoreszent gefärbt. Vimentin ist ein Intermediärfilament und Markerprotein von Radialglia Zellen, γ -Tubulin ist Teil des Gamma-Tubulin-Ring-Complexes (γ TURC) und ankert Mikrotubuli am Centrosom. Pfeilspitzen ($\triangleright$) verdeutlichen die Lage der Centrosomen im **Merge-Kanal (A, E).** **I: Schematische Darstellung der quantifizierten Parameter.** Die Distanz zwischen Nucleus und Centrosom wurde vom Massenschwerpunkt des Zellkerns bis zum immunfluoreszent gefärbten Centrosom (**γ -Tubulin**) gemessen. Zur Bestimmung des Centrosomwinkel (ϕ) wurde ein Winkelschenkel durch das Centrosom und den Massenschwerpunkt des Zellkerns gelegt. Der zweite Winkelschenkel wurde in basaler Richtung entlang des Radialglia Fortsatzes orientiert. Anschließend wurden die gebildeten Innenwinkel gemessen. Anhand des gemessenen Innenwinkels wurde die Polarität der Centrosomen kategorisiert. Winkel $<90^\circ$ entsprechen einer basalen Orientierung, Winkel $\geq 90^\circ$ wurden als apikal orientiert gewertet. **J, K, L: Quantifizierungen der Centrosom-Nucleus Distanz (J), Centrosomwinkel (K) und Centrosomorientierung (L) in exzitatorischen Progenitoren aus *Nrg1* $+/+$ und *Nrg1* $+/-$ Ventrikulärzonenexplantaten.** Die Balkendiagramme repräsentieren die Mittelwerte der quantifizierten Parameter $\pm$ SEM der Mittelwerte von exzitatorischen Progenitoren aus 9 *Nrg1* $+/+$ und 5 *Nrg1* $+/-$ Ventrikulärzonenexplantaten. Unterschiede zwischen den *Nrg1* Genotypen wurden durch zweiseitige t-Tests auf statistische Signifikanz überprüft. Signifikanzniveau: *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, ***: $p < 0.001$. **n.s.:** nicht signifikant. **FC:** Frontaler Cortex, **E15.5:** Embryonaltag 15.5. *Nrg1* Genotypen: ***Nrg1* $+/+$, *Nrg1* $+/-$.** Maßstabsbalken: **5 μ m.**

Entsprechend können für den Einfluss des heterozygoten *Nrg1* knockouts auf die embryonale Gehirnentwicklung nun bis hierher folgende Ergebnisse zusammengefasst werden. Im Gehirn *Nrg1* defizienter Embryos werden mehrere Gene eines Genclusters differenziell exprimiert. Im embryonalen, frontalen Cortex wird die Palmitoyltransferase *Zdhhc2* regionsspezifisch überexprimiert. Die Überexpression von *Zdhhc2* führt zur Hyperpalmitoylierung von NDEL1, ein Dynein Adapterprotein, das die Aktivität des minus-End-gerichteten Motorproteins reguliert. Wie die Überexpression von *Zdhhc2*, ist die Hyperpalmitoylierung von NDEL1 regionsspezifisch und auf den schizophrenierelevanten frontalen Cortex beschränkt. Während der radialen Migration von exzitatorischen neuronalen Progenitoren, beeinflusst der heterozygote *Nrg1* knockout die basale Ausrichtung der Centrosomen in Migrationsrichtung. Dieser Effekt wird möglicherweise durch die Hyperpalmitoylierung von NDEL1 ausgelöst und repräsentiert einen subzellulären Mechanismus, der die Persistenz der radialen Migration neuronaler Progenitoren reduziert. Eine Beeinträchtigung, die letztendlich zur Akkumulation von migrierenden Zellen und zum beobachteten Migrationsdefizit radial migrierender Neuronen im frontalen Cortex *Nrg1* defizienter Embryos führen könnte.

Die Entwicklung des Cortex und die Ausbildung der kortikalen Schichten sind strikt zeitabhängige Prozesse. Entsprechend könnte das Migrationsdefizit radial migrierender Neuronen die Cortikogenese in *Nrg1*^{+/-} defizienten Mäusen beeinflussen. Um zu überprüfen, ob die embryonalen Defizite zu nachweisbaren Beeinträchtigungen in postnatalen Gehirnen führen, wurden in den abschließenden experimentellen Arbeiten die kortikalen Schichten und die Verteilung von Neuronen in der weißen Substanz postnataler Gehirne analysiert.

5.7 Analyse kortikaler Schichtdicken in *Nrg1* defizienten P28 Mäusen

Der cerebrale Isocortex in adulten Säugetieren besteht aus sechs Zellschichten. Cortexschicht I entsteht aus der embryonalen Marginalzone. Die Cortexschichten II-VI entstehen hauptsächlich durch Neuronen, die in der Ventrikulär- und Subventrikulärzone geboren werden und in konsekutiven Wellen radial durch die Intermediärzone in die kortikale Platte migrieren. Dabei werden die Zellen der einzelnen Cortexschichten in absteigender Reihenfolge gebildet. Zellen der Cortexschicht VI erreichen die kortikale Platte zuerst. Danach folgen die Zellen der Schicht V, IV, III und II, die die kortikale Platte vergrößern und sukzessive in vertikaler Richtung ausdehnen. Nach Abschluss der Gehirnentwicklung entsprechen die Zellen der kortikalen Platte den kortikalen Neuronen der Schichten II-VI. Früh in die kortikale Platte einwandernde Vorläufer bilden also tiefe Schichten, während spät einwandernde Progenitoren hohe Schichten bilden.

Im frontalen Cortex *Nrg1* defizienter Embryos werden neuronale Progenitoren im Bereich der Subventrikulärzone aufgehalten und akkumulieren dort. Um zu analysieren, ob das Migrationsdefizit der radial migrierenden Zellen die Schichtdicke einzelner Cortexschichten und die zelluläre Verteilung schichtspezifischer Neuronen beeinflusst, wurden *in situ* Hybridisierungen gegen Markergene hoher und tiefer kortikaler Schichten durchgeführt. *Rgs8* codiert ein G-Protein regulierendes Protein und ist ein Markergen für Neuronen der Cortexschicht II. Der Transkriptionsfaktor *Er81* ist ein Markergen für Neuronen in Cortexschicht V.

Für die *Rgs8* und *Er81* qFISH Experimente wurden coronale Schnitte des frontalen und somatosensorischen Cortex von *Nrg1*^{+/+} und *Nrg1*^{+/-} Mäusen (P28) verwendet (Abb. 19, 20). Entlang anatomisch definiert positionierter Linien wurden Intensitätsprofile der *Rgs8* und *Er81* Expression von der weißen Substanz bis zur Pia gemessen (Abb. 19A-D, Abb. 20A-D). Anhand der Profillinien, wurde die relative Expression von *Rgs8* und *Er81* (Abb. 19F, H, Abb. 20F, H) im frontalen und somatosensorischen Cortex bestimmt. Durch die Verteilung der *Rgs8* und *Er81* positiven Zellen, wurde die Schichtdicke der Cortexschichten II und V (Abb. 19E, G, Abb. 20E, G) im frontalen und somatosensorischen Cortex von *Nrg1*^{+/+} und *Nrg1*^{+/-} Mäusen bestimmt. Die relativen Expressionsstärken der Markergene erfassen möglicherweise Veränderungen der relativen Zellanzahl in der entsprechenden Cortexschicht. Durch die relative Verteilung der Markergene kann erfasst werden, ob Neuronen einer bestimmten Cortexschicht in anderen Cortexschichten delokalisiert sind.

Die relative Expression von *Rgs8* wird durch den heterozygoten *Nrg1 knockout* nicht beeinflusst (Abb. 19F, H). Im frontalen und somatosensorischen Cortex lässt sich kein Unterschied der *Rgs8* Genexpression in den beiden Genotypen feststellen. Auch die relative Verteilung *Rgs8* positiver Zellen unterscheidet sich im frontalen und somatosensorischen Cortex nicht zwischen *Nrg1^{+/+}* und *Nrg1^{+/-}* Mäusen (Abb. 19E, G). Die relative *Er81* Expression ist im frontalen Cortex *Nrg1* defizienter Mäuse signifikant reduziert (Abb. 20F, $p=0.015$). Im Verhältnis wird der Transkriptionsfaktor von Schicht V Neuronen ca. 20% weniger exprimiert. Im somatosensorischen Cortex *Nrg1* defizienter Mäuse wird *Er81* nicht differenziell exprimiert (Abb. 20H). Die Verteilung von *Er81* positiven Zellen, in *Nrg1^{+/+}* Mäusen, ist im frontalen und somatosensorischen Cortex unverändert (Abb. 20E, G).

Das Migrationsdefizit radial migrierender exzitatorischer Vorläufer im frontalen Cortex *Nrg1* defizienter Embryos hat keinen Einfluss auf die Ausbildung hoher kortikaler Schichten in adulten Tieren. In den tiefen Schichten lässt sich eine Reduktion der *Er81* Genexpression nachweisen, die Verteilung von Neuronen tiefer kortikaler Schichten ist jedoch unverändert. Das Migrationsdefizit scheint also nicht zu einer Umdifferenzierung von infragranulären zu supragranulären Zellschicksalen zu führen, möglicherweise nehmen aber *Er81* positive Neuronen der Schicht V ein anderes Schicht V Schicksal an, sodass die Anzahl von Zellen einer spezifischen Zellpopulation in Schicht V reduziert ist.

Rgs8

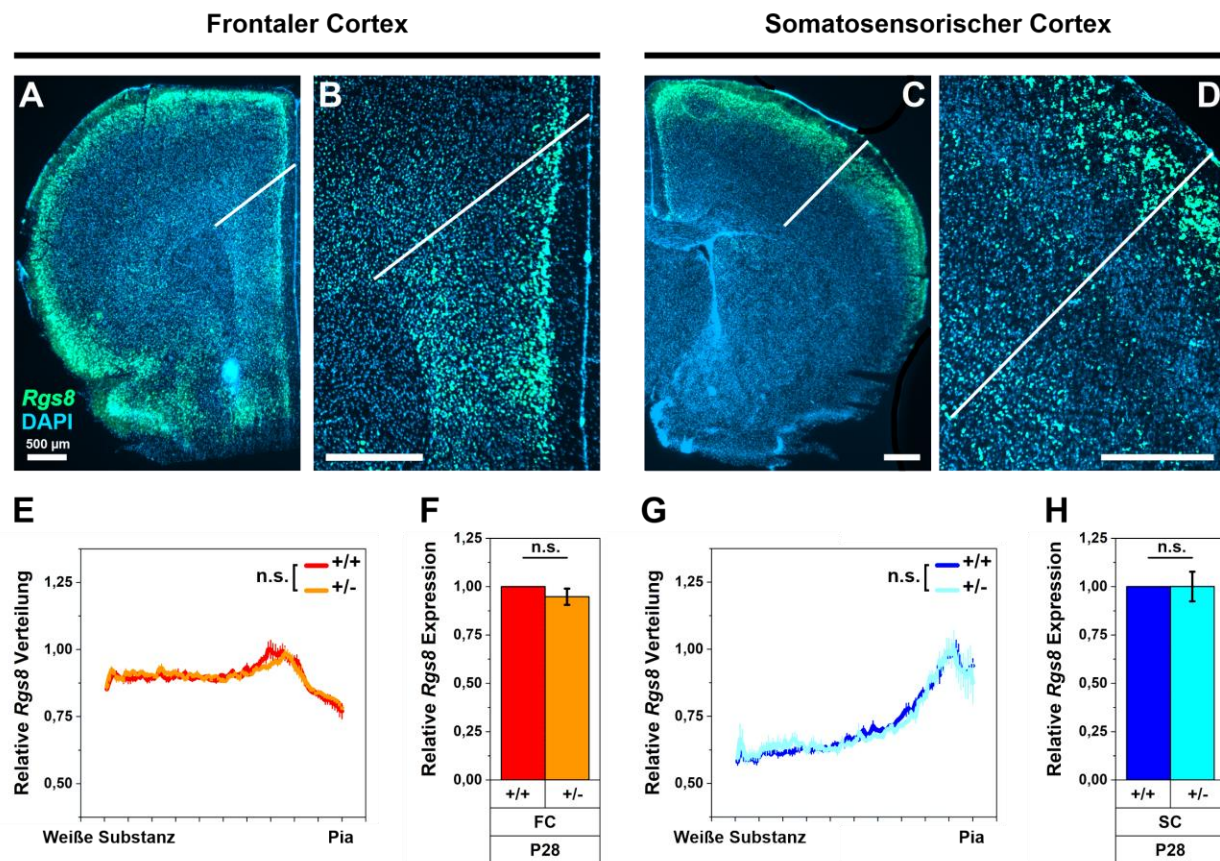


Abbildung 19: Der heterozygote *Nrg1* knockout hat keinen Einfluss auf die Ausbildung hoher kortikaler Schichten. Die relative Rgs8 Expression und die relative kortikale Verteilung des Markergens für Cortexschicht II sind im frontalen Cortex und somatosensorischen Cortex von P28 Mäusen unverändert. **A, B: Rgs8 qmFISH in coronalen Gehirnschnitten des postnatalen (P28) frontalen Cortex (FC, rechte Hemisphäre, dorsal oben).** **C, D: Rgs8 qmFISH in coronalen Gehirnschnitten des postnatalen (P28) somatosensorischen Cortex (SC, linke Hemisphäre, dorsal oben).** Die weißen Linien repräsentieren anatomisch definiert positionierte, radiale Profillinien die den Cortex von der weißen Substanz bis zur Pia durchspannen. Entlang dieser Profillinien wurde die relative Rgs8 Expression und die Verteilung Rgs8 positiver Zellen gemessen. **E, G: Relative Rgs8 Verteilung im frontalen (E) und somatosensorischen Cortex (G) von *Nrg1* +/+ und *Nrg1* +/- Mäusen.** Die Intensitätsprofile wurden auf ihre Länge und maximale Fluoreszenzintensität normalisiert. Unterschiede der Fluoreszenzintensitätsverteilung zwischen *Nrg1*+/+ und *Nrg1*+/- Mäusen wurden durch Kolmogorow-Smirnow-Tests auf statistische Signifikanz überprüft. Die Intensitätsprofile repräsentieren die mittlere relative Rgs8 Verteilung $\pm$ SEM von 5 Individuen pro Genotyp. **F, H: Relative Rgs8 Expression im frontalen (F) und somatosensorischen Cortex (H) von *Nrg1* +/+ und *Nrg1* +/- Mäusen.** Die relative Rgs8 Expression wurde auf *Nrg1* +/+ Mäuse normalisiert und durch zweiseitige Einstichproben *t*-Tests auf statistische Signifikanz überprüft. Balkendiagramme repräsentieren die mittlere relative Rgs8 Expression $\pm$ SEM von 5 Individuen pro Genotyp. **n.s.:** nicht signifikant. **FC:** Frontaler Cortex, **SC:** Somatosensorischer Cortex. **P28:** Postnataltag 28. *Nrg1* Genotypen: ***Nrg1* +/+**, ***Nrg1* +/-**. Maßstabsbalken: 500 μ m.

Er81

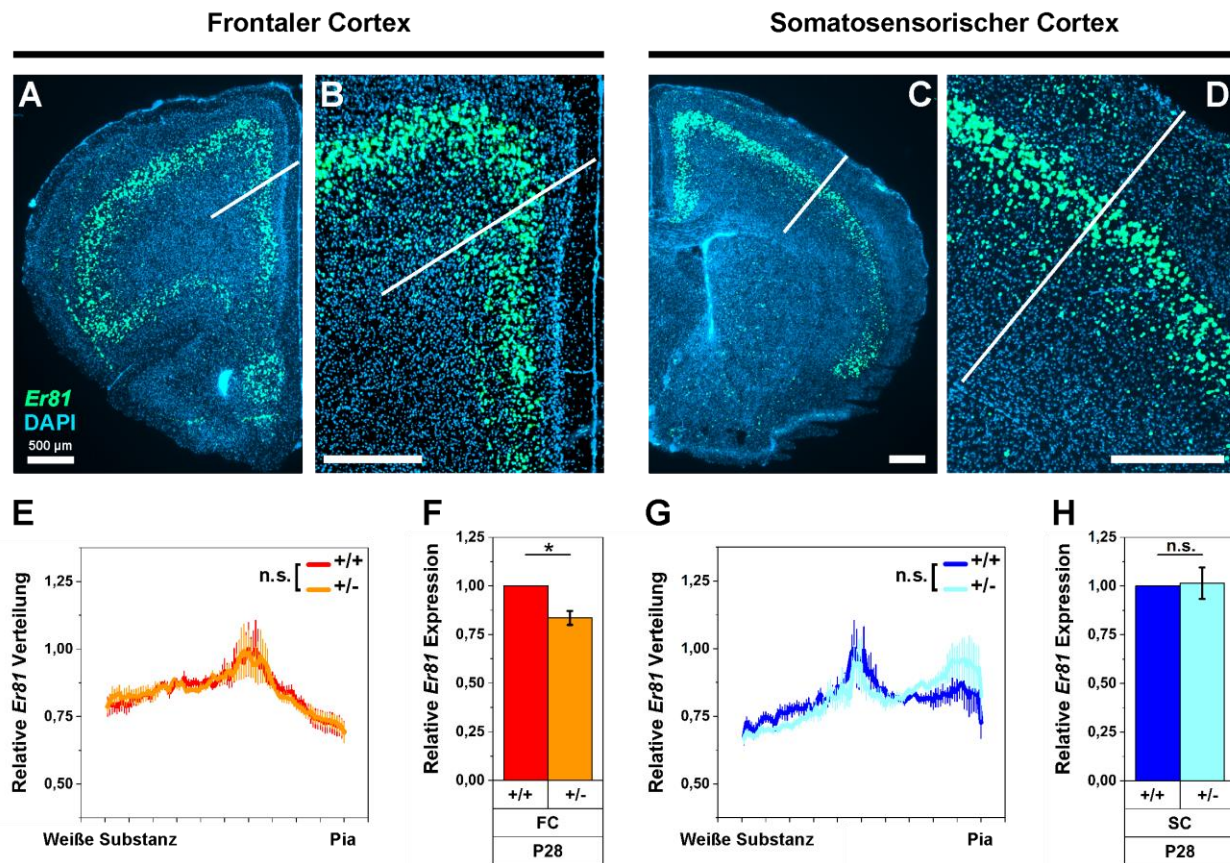


Abbildung 20: Der heterozygote *Nrg1* knockout hat möglicherweise einen Einfluss auf die Ausbildung tiefer kortikaler Schichten. Die relative Er81 Expression ist im frontalen Cortex *Nrg1* defizienter Mäuse signifikant reduziert. Die relative cortikale Verteilung des Markergens für Cortexschicht V ist im frontalen Cortex und somatosensorischen Cortex von P28 Mäusen unverändert. **A, B: Er81 qmFISH in coronalen Gehirnschnitten des postnatalen (P28) frontalen Cortex (FC, rechte Hemisphäre, dorsal oben).** **C, D: Er81 qmFISH in coronalen Gehirnschnitten des postnatalen (P28) somatosensorischen Cortex (SC, linke Hemisphäre, dorsal oben).** Die weißen Linien repräsentieren anatomisch definiert positionierte, radiale Profillinien die den Cortex von der weißen Substanz bis zur Pia durchspannen. Entlang dieser Profillinien wurde die relative Er81 Expression und die Verteilung Er81 positiver Zellen gemessen. **E, G: Relative Er81 Verteilung im frontalen (E) und somatosensorischen Cortex (G) von *Nrg1* +/+ und *Nrg1* +/- Mäusen.** Die Intensitätsprofile wurden auf ihre Länge und maximale Fluoreszenzintensität normalisiert. Unterschiede der Fluoreszenzintensitätsverteilung zwischen *Nrg1* +/+ und *Nrg1* +/- Mäusen wurden durch Kolmogorow-Smirnow-Tests auf statistische Signifikanz überprüft. Die Intensitätsprofile repräsentieren die mittlere relative Er81 Verteilung $\pm$ SEM von 5 Individuen pro Genotyp. **F, H: Relative Er81 Expression im frontalen (F) und somatosensorischen Cortex (H) von *Nrg1* +/+ und *Nrg1* +/- Mäusen.** Die relative Er81 Expression wurde auf *Nrg1* +/+ Mäuse normalisiert und durch zweiseitige Einstichproben t-Tests auf statistische Signifikanz überprüft. Balkendiagramme repräsentieren die mittlere relative Er81 Expression $\pm$ SEM von 5 Individuen pro Genotyp. Signifikanzniveau: *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, ***: $p < 0.001$. n.s.: nicht signifikant. FC: Frontaler Cortex, SC: Somatosensorischer Cortex. P28: Postnataltag 28. *Nrg1* Genotypen: *Nrg1* +/+, *Nrg1* +/- . Maßstabsbalken: 500 µm.

5.8 Analyse der Zellzahl von interstitiellen Neuronen in der weißen Substanz *Nrg1* defizienter Mäuse

In der Cortikogenese migrieren exzitatorische Progenitoren radial durch die Intermediärzone in die cortikale Platte. Inhibitorische Neuronen entstammen dem ventralen Telencephalon, migrieren tangential durch die Subventrikulärzone, Marginalzone und *subplate* und treten radial in die cortikale Platte ein. Nach Abschluss der Cortikogenese, entstehen aus der corticalen Platte die corticalen Schichten. Die weiße Substanz des Gehirns geht aus der embryonalen Intermediärzone hervor und umfasst die Gesamtheit aller myelinisierten Axone. In der weißen Substanz sind jedoch auch vereinzelt Neuronen lokalisiert, die als interstitielle Neuronen der weißen Substanz (*white matter interstitial neurons*, WMINs) bezeichnet werden. Die Zellpopulation der WMINs ist morphologisch und neurochemisch divers und beinhaltet exzitatorische und inhibitorische Neuronen, die mit verschiedenen neuronalen Markergenen nachgewiesen werden können (Connor et al. 2011; Duchatel et al. 2019). Der neuroentwicklungsbiologische Ursprung von WMINs ist nicht vollständig aufgeklärt, jedoch scheint ein Anteil der WMINs aus embryonalen Subplateneuronen hervorzugehen, die keine Apoptose untergehen sondern sich in der weißen Substanz anreichern (Luhmann et al. 2018).

Durch den heterozygoten *Nrg1 knockout* akkumulieren exzitatorische Progenitoren im Übergangsbereich der Subventrikulärzone und Intermediärzone des embryonalen frontalen Cortex. Darüber hinaus ist bekannt, dass die Aktivität von NDEL1 nicht nur für die radiale und tangential Migration (Shu et al. 2004; Youn et al. 2009; Shmueli et al. 2010), sondern auch für den Eintritt der neuronalen Progenitoren von der Intermediärzone in die cortikale Platte notwendig ist (Hippenmeyer et al. 2010). Um zu überprüfen, ob das beobachtete Migrationsdefizit exzitatorischer Vorläufer oder die durch die Hyperpalmitoylierung reduzierte NDEL1 Aktivität zu einer erhöhten Anzahl von WMINs führen, wurde die relative Zellzahl verschiedener WMIN Teilpopulationen im Gehirn von *Nrg1*^{+/+} und *Nrg1*^{+/-} Mäusen bestimmt. Dazu wurden in coronalen Gehirnschnitten von P28 Mäusen die weiße Substanz, NeuN-positive und NOS-positive WMINs immunfluoreszent und histologisch gefärbt (Abb. 21, 22). CNPase, ein Myelin assoziiertes Protein wurde genutzt, um die weiße Substanz zu färben (Abb. 21B, Abb. 22C, D). NeuN (RBFOX3 (RNA Binding Fox-1 Homolog 3)) ist ein Neuron spezifischer *splicing* Faktor, globaler Marker für Neuronen und färbt alle Neuronen in der grauen und weißen Substanz (Abb. 21C, Abb. 22E, F).

NOS (Stickstoffmonoxid Synthase; NADPH-Diaphorase) positive Zellen sind inhibitorische Neuronen und können durch die Reduktion von Nitroblau-Tetrazoliumchlorid (NBT) histologisch gefärbt werden (Abb. 21D, Abb. 22G, H). Mit Hilfe der DAPI Färbungen (Abb. 21E, Abb. 22I, J), der immunfluoreszenten und histologischen Färbungen, wurde die weiße Substanz abgegrenzt und die Anzahl der WMINs in anatomisch definierten Schnitten, in Abhängigkeit ihrer Größe automatisiert gezählt.

Die Anzahl von NeuN positiven WMINs ist in der weißen Substanz *Nrg1* defizienter Mäuse leicht erniedrigt. In Wildtyp Tieren befinden sich durchschnittlich 58 NeuN positive WMINs in einem mm² weißer Substanz. In heterozygoten *Nrg1 knockout* Tieren befinden sich 49 NeuN positive WMINs in einem mm² weißer Substanz (Abb. 22E, F, K). Der Unterschied erreicht jedoch keine statistische Signifikanz. Die Anzahl NOS positiver WMINs ist in der weißen Substanz *Nrg1* defizienter Mäuse leicht erhöht. In einem mm² weißer Substanz befinden sich in *Nrg1*^{+/-} Mäusen durchschnittlich 6.2 NOS positive WMINs, in *Nrg1*^{+/-} Mäusen durchschnittlich 6.8 NOS positive WMINs (Abb. 22G, H, L). Jedoch erreicht auch dieser Unterschied keine statistische Signifikanz.

Das Verhältnis von verschiedenen WMIN Teilpopulationen in *Nrg1* defizienten Mäusen ist dagegen signifikant verändert. Der heterozygote *Nrg1 knockout* führt zu einem signifikant erhöhten Verhältnis von NOS positiven zu NeuN positiven WMINs. In *Nrg1*^{+/-} Tieren steigt das Verhältnis von 0.11 auf 0.14 (p=0.01, Abb. 22M). Betrachtet man NeuN als Marker, der die Gesamtpopulation adulter WMINs identifiziert, steigt durch den heterozygoten *Nrg1 knockout* der Anteil der NOS positiven Teilpopulation innerhalb der gesamten WMIN Population um fast 30%.

NOS positive Neuronen sind inhibitorische Neuronen, die tangential in den Cortex und radial in die cortikale Platte einwandern. In *Nrg1* defizienten Embryos könnte durch die Überexpression von *Zdhc2* und Hyperpalmitoylierung von NDEL1 das Eintreten NOS positiver Zellen in die cortikale Platte beeinflusst werden. Dadurch würden sich NOS positive Zellen in der Intermediärzone anreichern und in adulten Tieren zu einem erhöhten Anteil NOS positiver WMINs führen.

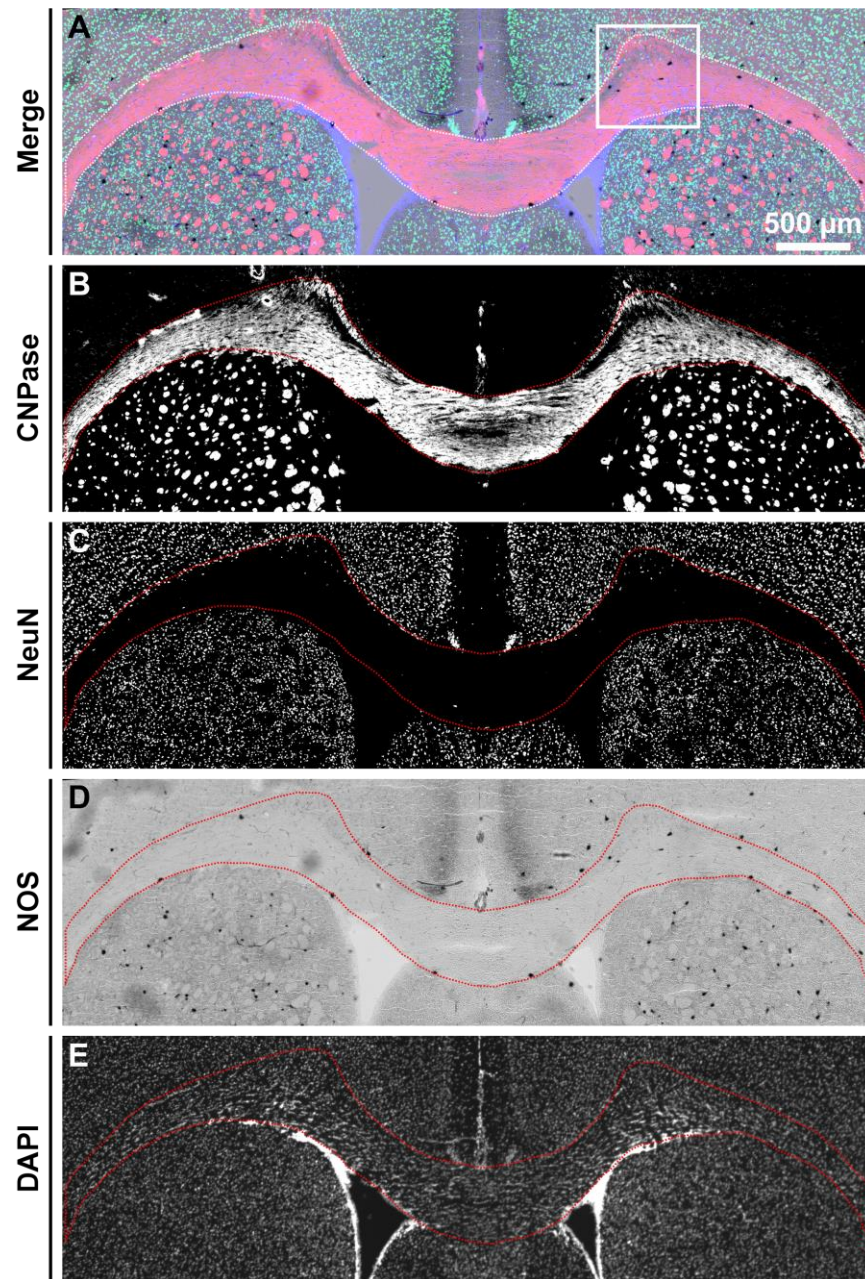


Abbildung 21: Analyse der Zellzahl von interstitiellen Neuronen (WMINs) in der weißen Substanz in coronalen Gehirnschnitten *Nrg1* defizienter Mäuse. Dargestellt ist die Region um das Corpus callosum (dorsal oben) in der verschiedene, histologische und immunfluoreszente Färbungen zur Markierung verschiedener WMIN-Zellpopulationen und zur Abgrenzung der weißen Substanz verwendet wurden. **A: Zusammengefügte Bildkanäle der einzelnen Färbungen.** Die weiße Substanz (CNPase positiv) ist in Magenta dargestellt, Neuronen (NeuN) in Grün, NOS- positive Neuronen in Schwarz und Zellkerne (DAPI) in Blau. Der Bereich des weiß umrandeten Quadrats wird in Abbildung 22 detailliert dargestellt. **B: Immunfluoreszente Färbung gegen CNPase**, ein Myelin assoziiertes Protein, zur Visualisierung und Abgrenzung der weißen Substanz. **C: Immunfluoreszente Färbung gegen NeuN**, ein neuronales Markerprotein, das Neuronen in der grauen und weißen Substanz markiert. **D: Histologische NADPH-Diaphorase Färbung**, die NOS-positive Neuronen in der grauen und weißen Substanz markiert. **E: DAPI-Färbung der Zellkerne.** Die weiße (A) bzw. rote (B-E), gestrichelte Linie repräsentiert den Bereich der weißen Substanz, der für die Zählung von WMINs abgegrenzt wurde. **CNPase:** 2',3'-Cyclic-Nucleotide 3'-Phosphodiesterase, **NOS:** Stickstoffmonoxid Synthase, **NeuN:** RBFOX3 (RNA Binding Fox-1 Homolog 3). Maßstabsbalken: 500 µm.

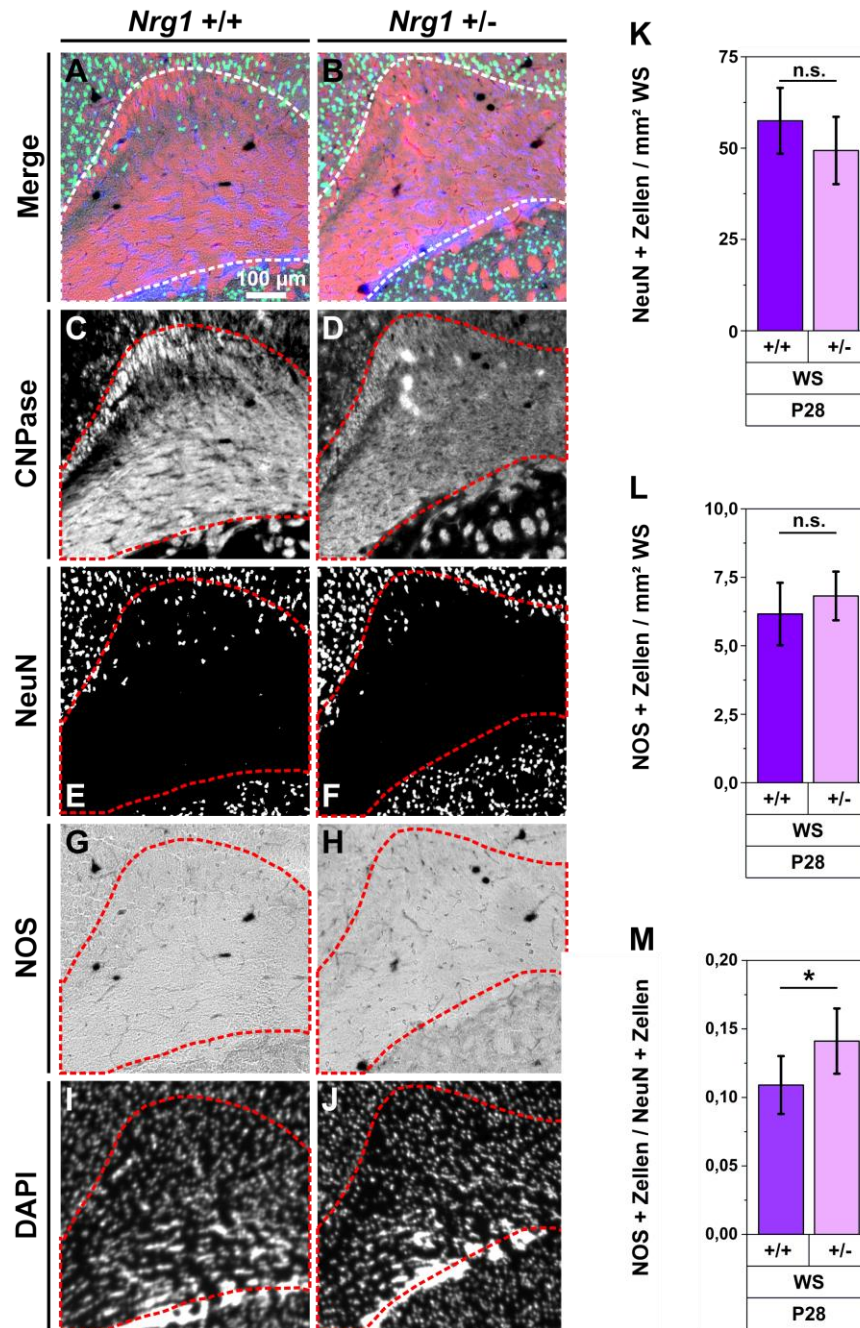


Abbildung 22: Der heterozygote *Nrg1* knockout beeinflusst das Verhältnis von NOS-positiven und NeuN-positiven interstitiellen Neuronen (WMINs) in der weißen Substanz von postnatalen (P28) Mäusen. Der dargestellte Bereich der weißen Substanz entspricht dem weißen Quadrat in Abbildung 21A. **A, B: Zusammengefügte Bildkanäle der einzelnen Färbungen.** Die weiße Substanz (CNPase positiv) ist in Magenta dargestellt, Neuronen (NeuN) in Grün, NOS-positive Neuronen in Schwarz und Zellkerne (DAPI) in Blau. **C, D: Immunfluoreszente Färbung gegen CNPase**, zur Visualisierung und Abgrenzung der weißen Substanz. **E, F: Immunfluoreszente Färbung gegen NeuN**, zur Markierung von Neuronen in der grauen und weißen Substanz. **G, H: Histologische NADPH-Diaphorase Färbung**, zur Markierung NOS-positiver Neuronen in der grauen und weißen Substanz. **I, J: DAPI-Färbung der Zellkerne.** Die weißen (A, B) bzw. roten (C-J), gestrichelten Linien repräsentieren den Bereich der weißen Substanz, der für die Zählung von WMINs abgegrenzt wurde. **A, C, E, G, I: WMINs und weiße Substanz in coronalen Gehirnschnitten von *Nrg1* +/+ Mäusen. B, D, F, H, J: WMINs und weiße Substanz in coronalen Gehirnschnitten von *Nrg1* +/- Mäusen. K, L, M: Quantifizierungen der Anzahl von NeuN-positiven WMINs (K), NOS-positiven WMINs und dem Verhältnis von NeuN-positiven WMINs zu NOS-positiven WMINs (M), normalisiert auf die Fläche der weißen Substanz in *Nrg1* +/+ und *Nrg1* +/- Mäusen.** Die Balkendiagramme repräsentieren die Mittelwerte der quantifizierten Parameter $\pm$ SD der Mittelwerte von 9 Individuen pro *Nrg1* Genotyp. Unterschiede zwischen den *Nrg1* Genotypen wurden durch zweiseitige t-Tests auf statistische Signifikanz überprüft. Signifikanzniveau: *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, ***: $p < 0.001$. n.s.: nicht signifikant. **WS:** Weiße Substanz. **P28:** Postnataltag 28. *Nrg1* Genotypen: *Nrg1* +/+, *Nrg1* +/- . Maßstabsbalken: 100 μ m. **CNPase:** 2',3'-Cyclic-Nucleotide 3'-Phosphodiesterase, **NOS:** Stickstoffmonoxid Synthase, **NeuN:** RBFOX3 (RNA Binding Fox-1 Homolog 3).

6 Diskussion

Neuregulin1 ist ein seit 2002 bekanntes Schizophrenie Kandidatengen (Stefansson et al. 2002). Veränderungen des *Nrg1* Gens (Mostaid et al. 2016), der *Nrg1* RNA-Expression (Law et al. 2006; Nicodemus et al. 2009; Weickert et al. 2012) und der NRG1 Proteinmenge (Chong et al. 2008; Barakat et al. 2010; Marballi et al. 2012) wurden mehrfach mit der Ausbildung von Schizophrenie assoziiert. Bis zum heutigen Zeitpunkt konnte jedoch kein *Nrg1* abhängiger, pathophysiologischer Kernprozess identifiziert werden, der tatsächlich zur Ausbildung und Manifestation der neuroentwicklungsbiologischen Krankheit beitragen könnte. Um einen solchen Schizophrenie Kernprozess zu identifizieren, wurde in der vorliegenden Arbeit das embryonale und postnatale Gehirntranskriptom heterozygoter *Nrg1 knockout* Mäuse in schizophrenierelevanten Regionen und in schizophrenierelevanten Entwicklungsstadien untersucht. Anhand der Ergebnisse der globalen Transkriptomanalyse wurde die Genexpression einzelner Kandidatengene und die Aktivität ihrer Genprodukte näher untersucht, um deren Einfluss auf die Entwicklung und den zellulären Aufbau des Frontalcortex zu analysieren. Die vorliegenden Ergebnisse können dazu beitragen, die *Nrg1* abhängigen molekular- und zellbiologischen Grundlagen der Schizophrenie besser zu verstehen und werden im Folgenden rekapituliert, diskutiert und in den Kontext des aktuellen Forschungsstands gesetzt.

6.1 Einfluss des heterozygoten *Nrg1 knockouts* auf das Transkriptom schizophrenierelevanter Gehirnregionen und Entwicklungsstadien

Der Einfluss des heterozygoten *Nrg1 knockouts* auf das Gehirntranskriptom von Mäusen wurde durch eine große *Microarray*-Transkriptomstudie analysiert, die von Philipp Kaiser begonnen wurde (Kaiser 2011). Dabei wurde das Transkriptom von *Nrg1^{+/+}* und *Nrg1^{+/-}* Mäusen in vier Gehirnregionen und zwei krankheitsrelevanten Altersstadien untersucht. Der frontale Cortex (prälimbischer- und infralimbischer Cortex, definiert als FC) und seine thalamische *input*-Struktur, der dorsomediale Thalamus (wegen seiner anterioren Lokalisation hier definiert als AT), wurden als Homologe humaner, mutmaßlich schizophreniebetroffener Gehirnregionen ausgewählt. Der somatosensorische Cortex (SC) und dessen thalamische *input*-Struktur, der posteriore Thalamus (Ventrobasalkomplex des Thalamus, definiert als PT), dienten in der Transkriptomstudie als Kontrollregionen, die bei schizophrenerkrankten Menschen weitestgehend unbeeinflusst sind. Das Transkriptom dieser Gehirnregionen wurde am Embryonaltag 15.5 (E15.5) und Postnataltag 28 (P28) untersucht. An Embryonaltag 15.5 entstehen höhere cortikale Schichten im Frontalcortex (Dahm, 2007), Postnataltag 28 entspricht der Adoleszenz und korrespondiert mit der Manifestation der Krankheit.

Von jeder Kondition (ein Genotyp, eine Gehirnregion, ein Entwicklungsstadium) wurden drei biologische Replikate mit RNA von je zwölf Individuen von mindestens sechs verschiedenen Müttern angefertigt, sodass der gesamte *Microarray*-Datensatz aus 48 *Microarrays* mit RNA-Proben aus 576 Individuen besteht.

Für die vorliegende Arbeit wurden dieser Datensatz bioinformatisch neu aufbereitet. Um die Anzahl falsch positiver Datenpunkte zu reduzieren, wurden einzelne Parameter der bioinformatischen Auswertung verändert. Zur Präprozessierung der Rohdaten wurde anstelle des GCRMA Algorithmus (*GC Robust Multiarray Average*, (Wu et al. 2004)) der FARMS Algorithmus (*Factor Analysis for Robust Microarray Summarization*, (Hochreiter et al., 2006)) verwendet. Die Differenzialität der Gentranskripte wurde durch die Berechnung der WAD (*weighted average difference*, (Kadota et al., 2008)) bestimmt, die im Gegensatz zu klassischen *fold change* Berechnungen von Kaiser die Expressionsstärke von Gentranskripten gewichtet. Als Signifikanzgrenzen wurden stringenter p-Werte als $p < 0.05$ vorausgesetzt und für die Definition deregulierter Gentranskripte folgende Grenzwerte etabliert: $WAD \pm 2 \sigma$ des mittleren WAD-Werts, $p < 0,003$, oder $WAD \pm 3 \sigma$ des mittleren WAD-Werts, $p < 0,01$.

Philipp Kaiser untersuchte die Genexpression von elf ausgewählten Gentranskripten mittels qPCR und colorimetrischer ISH weiter und konnte dabei lediglich die differenzielle Genexpression von *Nrg1* nachweisen (Kaiser 2011). In der vorliegenden Arbeit wurde nach der neuen Präprozessierung die Genexpression von fünf Gentranskripten mittels ddPCR und qmFISH weiter untersucht. Für vier Transkripte konnte die differenzielle Genexpression in *Nrg1* defizienten Embryos bestätigt werden. Durch die Verwendung eines neuen Präprozessierungsalgorithmus, die Berechnung der WAD, stringenter Signifikanzgrenzen, und die Verwendung verbesserter experimenteller Validierungsmethoden konnte die Anzahl falsch positiver Datenpunkte deutlich reduziert werden, ohne gleichzeitig zu viele falsch negative Datenpunkte in den Datensatz einzuführen. Entsprechend kann davon ausgegangen werden, dass der neu aufbereitete Datensatz eine aussagekräftige, belastbare und qualitativ hochwertige Grundlage für weitere bioinformatische Analysen darstellt.

6.1.1 *Principal Component Analysen und Gene Enrichment Analysen der Principal Components*

Der globale Einfluss des heterozygoten *Nrg1 knockouts* auf das Gehirntranskriptom verschiedener Gehirnregionen in verschiedenen Entwicklungsstadien wurde durch *Principal Component Analysen* (PCA) untersucht. Für die PCA wurden die je 5000 am stärksten exprimierten Gentranskripte jeder Kondition verwendet. Dabei zeigt sich, dass der heterozygote *Nrg1 knockout* das Gehirntranskriptom subtil, aber nachweislich beeinflusst. Die PCAs trennen die *Microarray*-Datensätze der einzelnen Konditionen eindeutig nach Altersstadium, Gehirnregionen und *Nrg1* Genotypen. Biologische Replikate derselben *Microarray*-Konditionen *clustern* in großer Nähe zueinander. Da jedes Replikat Proben aus 12 sorgfältig *gestagten* und präzise mikropräparierten Individuen von mindestens sechs verschiedenen Müttern enthielt, war hohe Reproduzierbarkeit zu erwarten. Die verbleibende Variation dürfte eher technischer als biologischer Natur sein. Die Separation und Gruppierung der entsprechenden *Microarrays* spricht demnach für eine hohe Qualität des von Philipp Kaiser angefertigten Datensatzes und für eine fundierte bioinformatische Präprozessierung der Daten.

Innerhalb des gesamten Datensatzes, wird die größte transkriptomische Varianz durch die beiden Entwicklungsstadien verursacht (Daten nicht gezeigt). Trennt man die embryonalen und postnatalen Datensätze, repräsentieren die Transkriptomunterschiede zwischen den kortikalen und thalamischen Gehirnregionen die größte Varianz (Abb. 5). Der heterozygote *Nrg1 knockout* beeinflusst das Gehirntranskriptom stärker als das postnatale Gehirntranskriptom (PC2 im Vergleich zu PC5). Entweder spielt *Nrg1* im postnatalen Gehirn eine geringere Rolle oder der heterozygote *Nrg1 knockout* kann nach Abschluss der Gehirnentwicklung besser kompensiert werden, sodass sich der Einfluss auf das Gehirntranskriptom mit zunehmendem Alter und zunehmender Plastizität des Gehirns verringert. Embryonal sind die kortikalen Gehirnregionen etwas stärker vom heterozygoten *Nrg1 knockout* betroffen als die thalamischen Regionen (Abb. 6, 7). Im Cortex wird die transkriptomische Varianz zwischen den *Nrg1* Genotypen durch PC2 repräsentiert, im Thalamus durch PC3. Analysiert man, wie viel einzelne Gentranskripte zur genotypdefinierenden PC beitragen, zeigt sich, dass sehr viele Gentranskripte einen sehr geringen Einfluss auf die genotypdefinierende transkriptomische Varianz haben. Im embryonalen Cortex liegt der Einfluss von einzelnen Gentranskripten unter 0.1%, im embryonalen Thalamus unter 0.3 %. Dieses Ergebnis steht im Einklang mit großen genomweiten Assoziationsstudien schizophrener Patienten und Patientinnen (Law et al. 2006; Schizophrenia Working Group of the Psychiatric Genomics Consortium 2014, 2014; Li et al. 2017; Marshall et al. 2017; Huckins et al. 2019; Wang et al. 2019; Singh et al. 2022; Trubetskoy et al. 2022). Die beschriebenen Studien konnten mehrere Hundert *single nucleotide polymorphisms* (SNPs), *copy number variations*

(CNVs), Genorte (loci), *rare coding variants* und Gentranskripte identifizieren, die mit genomweiter Signifikanz mit Schizophrenie assoziiert werden. Dabei erhöhen einzelne SNPs das Risiko an Schizophrenie zu erkranken nur um Bruchteile eines Prozents bis wenige Prozent. Entsprechend kann davon ausgegangen werden, dass das *Nrg1* Schizophreniemodell der vorliegenden Arbeit dazu geeignet ist die molekularen und zellbiologischen Grundlagen der Schizophrenie zu erforschen. Die vielen, aber subtilen Veränderungen des Gehirntranskriptoms von *Nrg1*^{+/-} Mäusen können die multigenen genetischen Einflüsse der Schizophrenie gut abbilden.

Für die *Gene Enrichment* Analysen (GEAs) zu den einzelnen PCAs wurden je 100 Gentranskripte analysiert, die am stärksten zu der genotypdefinierenden PC beitragen. Im embryonalen anterioren Thalamus beeinflusst der heterozygote *Nrg1 knockout* die Projektion thalamischer Axone (Abb. 6C). Für die Ausbildung der thalamocortikalen Projektion sind verschiedene NRG1 Isoformen notwendig, die während der Embryonalentwicklung den Auswuchs und die Lenkung thalamocortikaler Axone vom ventralen Telencephalon in den Cortex regulieren (López-Bendito et al. 2006). Darüber hinaus zeigt sich, dass bei schizophrenen Patienten und Patientinnen die thalamocortikale Verbindung zwischen dem dorsomedialen und anterioren Thalamuskern und dem präfrontalen Cortex gestört ist (Sprooten et al. 2009).

Im embryonalen frontalen Cortex, wird besonders die Regulation des Cytoskeletts durch die GEA mit dem heterozygoten *Nrg1 knockout* assoziiert (Abb. 7C). Für die vorliegende Arbeit bildete diese Beobachtung die Grundlage für die Auswahl zu untersuchender Gene. Mit Hilfe dieser Untersuchungen konnte ein Effekt auf zytoskelettale Prozesse (Dynein-Aktivität, Zellmigration) bestätigt werden. DISC1 (Disrupted in Schizophrenia 1) ist ein weiteres bedeutendes Schizophrenie Kandidatengen und ebenfalls ein entscheidender Regulator des Cytoskeletts. DISC1 ist notwendig, um den Proteinkomplex aus NDEL1, LIS1 und Dynein am Centrosom zu ankern (Wang und Brandon 2011). Darüber hinaus werden mehrere Tubulin Isoformen (TUBA1, TUBA2, TUBA6, TUBB5, β -tubulin, β I-tubulin, β III-tubulin) sowie Mikrotubuli assoziierte Proteine (ULK4, DISC1, MAP2, MAP6) mit Schizophrenie assoziiert (Marchisella et al. 2016).

Die GEAs zu den einzelnen PCAs offenbaren, dass der heterozygote *Nrg1 knockout* in den schizophrenierelevanten embryonalen Gehirnregionen des anterioren Thalamus und frontalen Cortex biologische Prozesse beeinflusst. Diese stimmen mit den bekannten molekularen Funktionen von *Nrg1*, den experimentellen Beobachtungen dieser Arbeit und pathophysiologischen Beeinträchtigungen schizophrener Patienten und Patientinnen überein. Ähnliche Prozesse lassen sich in den Kontrollregionen des embryonalen posterioren Thalamus und somatosensorischen Cortex nicht identifizieren. Dort werden keine bzw. weniger spezifische biologische Prozesse mit deutlich geringerer Signifikanz mit dem heterozygoten *Nrg1 knockout* assoziiert (Abb. 6D, Abb. 7D).

6.1.2 *Gene Enrichment* Analysen signifikant deregulierter Gentranskripte

In den embryonalen Gehirnregionen werden durch den heterozygoten *Nrg1 knockout* 292 Gentranskripte signifikant differenziell exprimiert. Davon 91 im anterioren Thalamus, 85 im frontalen Cortex, 20 im posterioren Thalamus und 96 im somatosensorischen Cortex. Daraus ergeben sich 176 differenziell exprimierte Gentranskripte im schizophrenierelevanten frontalen System und 116 deregulierte Gentranskripte im posterioren Kontrollsystem (Abb. 8A).

Mit den differenziell exprimierten Gentranskripten der einzelnen embryonalen Gehirnregionen wurden ebenfalls GEAs durchgeführt. Die deregulierten Transkripte des embryonalen anterioren Thalamus werden hierbei wieder mit der Axogenese und Projektion thalamischer Neuronen assoziiert (Abb. 8B). Die differenziell exprimierten Gentranskripte des embryonalen frontalen Cortex mit dem intrazellulären (Protein-)Transport (Abb. 8C). Versteht man den intrazellulären (Protein)Transport als Prozess, der von der effizienten Ausbildung und Ausrichtung des Cytoskeletts und von Cytoskelett Motorproteinen abhängig ist, führen die *Gene Enrichment* Analysen der *Principal Components* und der differenziell exprimierten Gentranskripte zu sehr vergleichbaren Ergebnissen. Die Ausbildung thalamocortikaler Axone und das Cytoskelett bzw. der intrazelluläre Transport entlang des Cytoskeletts wird im frontalen System *Nrg1* defizienter Embryos beeinträchtigt. In den Kontrollregionen des embryonalen posterioren Thalamus und somatosensorischen Cortex können auch in diesen GEAs keine bzw. nur neuroentwicklungsbiologisch irrelevante Prozesse mit dem heterozygoten *Nrg1 knockout* assoziiert werden (Abb. 8D, E). Dabei ist besonders bemerkenswert, dass die vergleichbaren Ergebnisse der GEAs auf Gentranskripten aus verschiedenen Teilmengen der *Microarray*-Datensätze beruhen. Die Teilmenge der differenziell exprimierten Gentranskripte wurde durch eine gewisse Differenzialität der Genexpression und eine gewisse Signifikanz der Differenzialität aus dem Gesamtdatensatz entnommen. Für die *Principal Component* Analysen wurden die Gentranskripte ausschließlich anhand ihrer Expressionsstärke ausgewählt. Anschließend wurden aus dieser Teilmenge 100 Gentranskripte isoliert, die am stärksten zu genotypdefinierenden *Principal Component* beitragen.

Entsprechend kann davon ausgegangen werden, dass die vergleichbaren Ergebnisse der unabhängigen GEAs sich gegenseitig stärken und die Ergebnisse der bioinformatischen Analysen auch für die zukünftige Ausrichtung des Projekts und die Planung und Durchführung experimenteller Arbeiten von großem Nutzen sein kann. Dabei wären die Untersuchungen der thalamocortikalen Projektion, vom anterioren Thalamus in den frontalen Cortex und weitere, Cytoskelett bezogene experimentelle Arbeiten in *Nrg1* defizienten Embryos von besonderem Interesse.

6.1.3 *Nrg1* beeinflusst die Expression eines Genclusters auf Chromosom 8

Bei der detaillierten Betrachtung der differenziell exprimierten Gene, offenbaren die *Microarrays* des embryonalen frontalen Cortex, dass *Nrg1* insbesondere die Expression eines Genclusters auf Chromosom 8 beeinflusst. Eine Deregulation von Genen desselben Locus erscheint besonders plausibel, da ein Locus gemeinsame Kontrollelemente enthalten kann. Der Locus liegt in relativer Nähe zum *Nrg1* Gen (ca. 9 MBp) und enthält die Gene *Micu3*, *Vps37a*, *Zdhhc2* und *Mtmr7*. In den *Microarrays* werden *Micu3*, *Vps37a* und *Zdhhc2* ausschließlich im embryonalen frontalen Cortex differenziell exprimiert, *Mtmr7* in allen untersuchten Gehirnregionen (Abb. 10A). *Mtmr7* reguliert den Proteintransport und die Endo- und Exozytose endosomaler Vesikel (Laporte et al. 2003). *Micu3* moduliert die ATP-Synthese und Homöostase in Axonen (Ashrafi et al. 2020). *Vps37a* ist notwendig für die Ausbildung von Autophagosomen (Takahashi et al. 2019) und *Zdhhc2* beeinflusst unter anderem die Migration von Zellen, den Proteintransport und die Lokalisierung von Proteinen (Shmueli et al. 2010; Fukata et al. 2013; Woolfrey et al. 2015). Damit sind die Funktionen der einzelnen Proteine mit den biologischen Prozessen und den zellulären Kompartimenten konsistent, die im embryonalen frontalen Cortex mit dem heterozygoten *Nrg1* *knockout* assoziiert werden (Abb. 8C, intrazellulärer Proteintransport, Regulation des Cytoskeletts, mitochondrielle Atmungskette, endosomale und vesikuläre Membranen).

Die differenzielle Expression von *Micu3*, *Vps37a* und *Zdhhc2* konnte durch ddPCR Genexpressionsanalysen bestätigt werden. *Micu3* und *Zdhhc2* werden danach ausschließlich im frontalen Cortex *Nrg1* defizienter Embryos differenziell exprimiert, *Vps37a* wird in allen untersuchten Gehirnregionen *Nrg1* defizienter Embryos differenziell exprimiert. Eine Deregulation der *Mtmr7* Expression konnte hingegen durch die ddPCR nicht bestätigt werden (Abb. 12). Vermutlich wird das *Mtmr7* *Microarray probeset* (1447831_s_at) in *Nrg1*^{+/-} Tieren durch SNPs im *Nrg1*^{+/-} Allel ineffizienter detektiert und repräsentiert somit ein genotypspezifisches Messartefakt. Die Gene *Micu3*, *Vps37a* und *Zdhhc2* liegen hintereinander auf dem Vorwärtsstrang der DNA, *Mtmr7* liegt auf dem Rückwärtsstrang der DNA (Abb. 11A). Es wäre demnach denkbar, dass der heterozygote *Nrg1* *knockout* die Genexpression des Chromosom 8 Locus auf dem Vorwärtsstrang, nicht aber auf dem Rückwärtsstrang der DNA beeinflusst.

Die qmFISH Genexpressionsanalysen von *Micu3*, *Vps37a* und *Zdhhc2* zeigen, dass die drei Gene in den gleichen kortikalen Schichten und wahrscheinlich in den gleichen Zelltypen coexprimiert werden. Die Transkripte werden im apikalsten Bereich der Ventrikulärzone, im Übergang der Subventrikulärzone zur Intermediärzone, in der *Subplate* und der Marginalzone exprimiert. *Nrg1* wird am stärksten in der Ventrikulärzone und der kortikalen Platte exprimiert (Abb. 13). Daraus ergibt sich ein komplementäres Expressionsmuster von *Nrg1*, *Micu3*, *Vps37a* und *Zdhhc2*, die in verschiedenen kortikalen Schichten exprimiert werden und nicht coexprimiert sind.

Das komplementäre Expressionsmuster legt nahe, dass *Nrg1* die Expression von *Micu3*, *Vps37a* und *Zdhhc2* inhibiert. Das Expressionsmuster des *Nrg1* Rezeptors *ErbB4* wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht analysiert. Der Literatur kann entnommen werden, dass ERBB4 positive Zellen am Embryonaltag 16 im Übergangsbereich der Ventrikulärzone zur Intermediärzone und in der Marginalzone lokalisiert sind (Yau et al. 2003). Entsprechend kann davon ausgegangen werden, dass *ErbB4* zumindest in gewissen Zellpopulationen mit *Micu3*, *Vps37a* und *Zdhhc2* coexprimiert ist und NRG1 durch die Interaktion mit ERBB4 die Genexpression von *Micu3*, *Vps37a* und *Zdhhc2* durch ein gemeinsames regulatorisches Element kontrolliert. *Nrg1* wird in Radialglia Zellen in der Ventrikulärzone exprimiert. Die neuronalen Stammzellen durchspannen mit ihrem basalen Zellfortsatz das gesamte Neuroepithel, sodass *Nrg1* in allen kortikalen Schichten als membranständige oder sezernierte Isoform in trans oder cis inhibitorisch auf die Genexpression von *Micu3*, *Vps37a* und *Zdhhc2* wirken könnte.

6.1.4 *Zdhhc2* ist in *Nrg1* defizienten Tieren dereguliert und wird von genomweiten Assoziationsstudien hochsignifikant mit Schizophrenie assoziiert

Bemerkenswerterweise wird das *Zdhhc2* Gencluster auf Chromosom 8 in genomweiten Assoziationsstudien (GWAS) mit genomweiter Signifikanz mit der Ausbildung von Schizophrenie assoziiert (Li et al. 2017). In einer Metaanalyse untersuchte die betreffende Studie das Genom von 43175 schizophrenen Patienten und Patientinnen und 65166 Kontrollen. Dabei wurden 5618 *single nucleotide polymorphisms* (SNPs) mit genomweiter Signifikanz ($p < 5 \times 10^{-8}$) mit der Ausbildung von Schizophrenie assoziiert. Die 5618 SNPs verteilen sich auf 104 genomische Loci, was die genetische Komplexität und genetische Heterogenität schizophrener Patienten und Patientinnen unterstreicht. Durch weitere Assoziationsstudien verschiedener Teilpopulationen, identifiziert die GWAS insgesamt 113 Loci, die durch 124 Index-SNPs repräsentiert werden. Von den 113 Genorten wurden 30 Loci erstmals mit genomweiter Signifikanz mit der Ausbildung von Schizophrenie assoziiert. Einer dieser Loci wird durch den Index-SNP rs17687067 definiert. Der SNP rs17687067 liegt auf Chromosom 8, an Position 17036201 des Vorwärtsstrangs, in einer intronischen Sequenz des humanen *ZDHC2* Gens. Der SNP wird hochsignifikant mit einem p Wert von 3.39×10^{-12} mit Schizophrenie assoziiert und überlappt drei humane *ZDHC2* Transkripte. *ZDHC2* ist demnach das Gen, welches dem SNP rs17687067 physikalisch am nächsten liegt. Darüber hinaus identifizieren statistische Analysen (DEPICT) *ZDHC2* als wahrscheinlichstes Kandidatengen für den assoziierten Schizophrenielocus. eQTL-Analysen (*expression quantitative trait loci*) bestätigen, dass der SNP rs17687067 mit der Genexpression von *ZDHC2*, *VPS37A* und *MTMR7* in cis genetisch gekoppelt ist.

Die Expression von *MICU3* scheint durch genetische Variationen des SNPs nicht beeinflusst zu werden, zumindest wird eine genetische Kopplung von *MICU3* und dem SNP in den Ergebnissen der GWAS nicht beschrieben (Li et al. 2017).

Die differenzielle Genexpression von *Mtmr7* konnte in *Nrg1* defizienten Embryos nicht nachgewiesen werden. Jedoch wird die Genexpression von *Vps37a* und *Zdhhc2* im schizophrenierelevanten embryonalen, frontalen Cortex durch den heterozygoten *Nrg1 knockout* beeinflusst (Abb. 12D, E). Dass Veränderungen in der *Nrg1* Genexpression die Transkription mehrerer Gentranskripte eines Locus beeinflussen, der bei schizophrenen Patienten und Patientinnen mit genomweiter Signifikanz mit Schizophrenie assoziiert wird, ist besonders bemerkenswert und kann möglicherweise erklären, wie *Nrg1* Gendefekte zur Ausbildung von Schizophrenie führen können. Gleichzeitig offenbart sich damit ein Beispiel des heterogenen und multigenen Einflusses auf die Entwicklung von Schizophrenie. Zwei verschiedene genetische Veränderungen in verschiedenen Genorten (*Nrg1*, *Zdhhc2*) führen zur Deregulation derselben Genprodukte und begünstigen möglicherweise die Ausbildung schizophrener Phänotypen. Die molekulare Wirkungsweise von ZDHHC2 und mögliche daraus resultierende Defizite, wurden in der vorliegenden Arbeit intensiv untersucht und werden im Folgenden diskutiert. Für VPS37A wurden vergleichbare experimentelle Arbeiten noch nicht durchgeführt. Da die Expression von *VPS37A* ebenfalls mit dem SNP rs17687067 gekoppelt ist, könnten weitere funktionelle Untersuchungen über *Vps37a* in heterozygoten *Nrg1 knockout* Mäusen von großem Interesse sein.

6.2 NDEL1 ist ein Substrat von ZDHHC2 und ist ein Schlüsselement eines Schizophrenie-assoziierten molekularen Mechanismus

ZDHHC2 palmitoyliert Proteine mit hoher neuroentwicklungsbiologischer Relevanz. NDE1 (Nude Neurodevelopment Protein 1) und NDEL1 (*Nude Neurodevelopment Protein 1 Like 1*) sind Paraloge der NUDE (nuclear distribution E) Proteinfamilie, die durch die Regulation der Dynein Aktivität den zum minus-Ende der Mikrotubuli gerichteten intrazellulären Transport, die Mitose und Migration neuronaler Progenitoren beeinflussen (Shmueli et al. 2010; Garrott et al. 2022). NDE1 und NDEL1 interagieren beide mit multiplen centrosomalen Proteinen, LIS1 (*Lissencephaly 1*) und Dynein. Bei der Interaktion mit Dynein unterscheiden sich die Paraloge durch die Bindung verschiedener Dynein Untereinheiten. NDE1 interagiert mit den leichten und intermediären Dynein Ketten. NDEL1 interagiert mit den intermediären und schweren Dynein Ketten, in denen sich die ATP hydrolysierende Motordomäne befindet (Bradshaw et al. 2013). Beide Paraloge werden von ZDHHC2 am Cysteinrest C273 palmitoyliert. Jedoch führt die Palmitoylierung von NDEL1 zu einer Reduktion der NDEL1 Dynein Interaktion, während die Palmitoylierung von NDE1 die Dynein Bindung nicht beeinflusst (Shmueli et al. 2010).

Entgegen der Erwartung, wird die Reduktion der NDEL1-Dynein Interaktion nicht durch eine Zunahme der NDEL1 Verankerung in der Membran verursacht. C273 liegt in einer α -Helix im C-Terminalen Teil der Protein Paraloge. Im NDEL1 Protein ist diese Domäne notwendig, um mit den schweren Dynein Ketten zu interagieren. Die Domänen für die Bindung der leichten und intermediären Dynein Ketten liegen N-Terminal von der Palmitoylierung, sodass die Bindung von NDEL1 und Dynein durch das Anheften der Palmitinsäure vermutlich nicht sterisch beeinflusst wird (Bradshaw et al. 2013). Zusätzlich repräsentiert C273 den Aminosäurerest, der notwendig für die enzymatische Oligopeptidase Aktivität von NDEL1 ist (Hayashi et al. 2005), sodass die Palmitoylierung von NDEL1 sowohl die Interaktion mit Dynein als auch die allgemeine enzymatische NDEL1 Aktivität beeinflussen kann. Die unterschiedlichen Effekte der Palmitoylierung belegen, dass die Paraloge funktionell verschieden sind und dass die Funktionalität von NDEL1 durch die Palmitoylierung stärker beeinflusst wird als die Funktionalität von NDEL1.

Die Interaktion zwischen NDEL1 und Dynein steht in direktem Zusammenhang mit dem Aktivitätsniveau von Dynein und erhöht dessen cytoplasmatische Aktivität. Durch die Palmitoylierung von NDEL1 wird die cytoplasmatische Dynein Aktivität reduziert. In Fibroblasten führt die Palmitoylierung von NDEL1 zum Verlust der perinukleären Organisation des Golgi-Apparats und zu Defiziten des vesikulären Transports zwischen endoplasmatischem Retikulum und Golgi-Apparat (Shmueli et al. 2010). In kultivierten Neuronen beeinflusst die Palmitoylierung von NDEL1 die Prozessivität des retrograden Transports und erhöht durch die Reduktion retrograder Aktivität den Anteil von NDEL1 und LIS1 in peripheren Zellregionen (Shmueli et al. 2010). Dies entspricht intrazellulären Transportprozessen, die im embryonalen frontalen Cortex ebenfalls mit dem heterozygoten *Nrg1 knockout* assoziiert wurden (Abb. 8C).

Im frontalen Cortex *Nrg1* defizienter Embryos wird *Zdhhc2* überexprimiert und NDEL1 hyperpalmitoyliert (Abb. 14C). Neben ZDHHC2 wird NDEL1 auch von ZDHHC3 und ZDHHC7 palmitoyliert (Shmueli et al. 2010). In den *Microarray*-Genexpressionsanalysen gibt es keine Anzeichen für eine differenzielle Genexpression von *Zdhhc3* oder *Zdhhc7*. *Zdhhc2* wird ausschließlich im frontalen Cortex *Nrg1* defizienter Embryos überexprimiert und die Hyperpalmitoylierung von NDEL1 beschränkt sich ebenfalls auf den embryonalen frontalen Cortex. Entsprechend kann davon ausgegangen werden, dass die Hyperpalmitoylierung von NDEL1 auf der Überexpression von *Zdhhc2* beruht und dass die cytoplasmatische Dynein Aktivität im frontalen Cortex *Nrg1* defizienter Embryos durch die Hyperpalmitoylierung von NDEL1 reduziert ist.

Im Blutplasma chronisch schizophrener Patienten und Patientinnen konnte nachgewiesen werden, dass die enzymatische NDEL1 Aktivität reduziert ist (Dal Mas et al. 2019). Darüber hinaus existieren vereinzelte genetische Studien, die *NDEL1* SNPs mit Schizophrenie assoziieren, jedoch keine genomweite Signifikanz erreichen (Tomppo et al. 2009; Nicodemus et al. 2010).

Besonders interessant ist, dass NDEL1 mit dem bedeutenden Schizophrenie Kandidatengen *DISC1* (*Disrupted In Schizophrenia 1*, (Millar et al. 2000)) interagiert. *DISC1* wirkt als strukturgebendes Gerüstprotein für über 200 Interaktionspartner und reguliert durch entsprechende Interaktionen die Proliferation, Migration und Differenzierung neuronaler Progenitoren. Durch die Diversität des Interaktoms ist *DISC1* in verschiedenen Zellkompartimenten lokalisiert, zeigt jedoch Anreicherungen in Cytoskelett assoziierten bzw. Cytoskelett reichen Strukturen. Am Centrosom und entlang Mikrotubuli kann *DISC1* durch die Rekrutierung und Komplexbildung mit NDEL1 und LIS1 die Dynein Aktivität regulieren (Ishizuka et al. 2006; Soares et al. 2011).

DISC1 wurde erstmals durch Kopplungsstudien in einer schottischen Familie mit gehäuft auftretenden psychiatrischen Erkrankungen mit Schizophrenie assoziiert (St Clair et al. 1990; Millar et al. 2000). Bei erkrankten Familienmitgliedern, wurde vermehrt eine chromosomale Translokation festgestellt, die die *DISC1* Genstruktur zerstört und sich dominant negativ auf die Proteinfunktion auswirkt. Die Translokation entfernt die C-Terminale *coiled coil* Domäne des Proteins, die für die Interaktion mit NDEL1 notwendig ist. (Brandon et al. 2004). Darüber hinaus liegt der Cysteinrest (C273) an dem NDEL1 palmitoyliert wird, sehr nah an der NDEL1/*DISC1* Interaktionsdomäne, sodass die NDEL1 Palmitoylierung die Interaktion von NDEL1 und *DISC1* inhibieren könnte, die für die Regulation der enzymatischen NDEL1 Aktivität notwendig ist (Hayashi et al. 2005). Wie *NRG1*, wurde *DISC1* in großen genomweiten Assoziationsstudien bis zum jetzigen Zeitpunkt nicht mit Schizophrenie assoziiert. Möglicherweise repräsentiert NDEL1 einen Kreuzungspunkt von *NRG1*- und *DISC1*-Pathways deren Deregulation die Ausbildung von Schizophrenie begünstigt.

6.3 NDEL1 und die Migration neuronaler Progenitoren

Es ist bekannt, dass NDEL1 und die Palmitoylierung von NDEL1 die Migration von neuronalen Progenitoren beeinflusst (Shu et al. 2004; Youn et al. 2009; Hippenmeyer et al. 2010; Shmueli et al. 2010). NDEL1 wird durch die Palmitoyl Acyltransferasen (PATs) ZDHHC2, ZDHHC3 und ZDHHC7 palmitoyliert. Der *knockdown* der einzelnen PATs sowie der gemeinsame *knockdown* von *Zdhhc2*, *Zdhhc3* und *Zdhhc7* inhibiert die radiale Migration von neuronalen Progenitoren. Im Bereich der Ventrikulär- und Subventrikulärzone führt der *knockdown* der ZDHHC Proteine zu einer Akkumulation von Neuronen, während der Anteil von Neuronen in den höheren Schichten der kortikalen Platte reduziert wird. Zwischen den einzelnen *knockdown* Experimenten lassen sich nur geringfügige Unterschiede feststellen. Beim *knockdown* von *Zdhhc2* erreichen weniger Neuronen die hohen Schichten der kortikalen Platte als beim *knockdown* von *Zdhhc3* und *Zdhhc7*, während der *knockdown* von *Zdhhc7* zu einem höheren Anteil von Neuronen an der Ventrikulär- und Subventrikulärzone führt als der *knockdown* von *Zdhhc2* und *Zdhhc3* (Shmueli et al. 2010).

Interessanterweise führt sowohl der *knockout* der enzymatischen *Zdhhc7* Aktivität als auch die Überexpression von *Zdhhc7* zur Ausbildung desselben Phänotyps wie der *knockdown* von *Zdhhc7*. Die Überexpression von *Ndel1* und die Expression einer nicht palmitoylierbaren *Ndel1* Mutante führt zur Akkumulation von neuronalen Progenitoren im Bereich der Ventrikulär- und Subventrikulärzone und einer Reduktion von neuronalen Progenitoren in den hohen Schichten der kortikalen Platte (Shmueli et al. 2010). Der *knockdown* und *knockout* von *Ndel1* führt ebenfalls zur Anreicherung migrierender Neuronen in der Ventrikulär-, Subventrikulär- und Intermediärzone (Shu et al. 2004; Hippenmeyer et al. 2010), während die Anzahl von Neuronen in der kortikalen Platte reduziert wird (Hippenmeyer et al. 2010).

Die Neuronen akkumulieren möglicherweise aufgrund ihrer Migrationsgeschwindigkeit bzw. Migrationseffizienz im Bereich der Ventrikulärzone-Intermediärzone. Der *knockout* von *Ndel1* reduziert die Migrationsgeschwindigkeit radial und tangential migrierender Neuronen (Youn et al. 2009). Darüber hinaus führt der *knockout* von *Ndel1* zu einer Reduktion der direktionalen Persistenz der Migration. Die *Ndel1* defizienten, migrierenden Neuronen bilden mehrere *leading edges* und multipolare Zellfortsätze aus, ändern häufiger ihre Migrationsrichtung und navigieren dadurch in einer Art Zick-Zack-Muster durch die Analgen des Cortex (Youn et al. 2009). Dies impliziert, dass die migrierenden Zellen länger in der multipolaren Migrationsphase verweilen. Oder dass die Reduktion der Migrationsgeschwindigkeit bzw. die Reduktion der zurückgelegten Migrationsstrecke durch die verminderte direktionale Persistenz der Zellmigration verursacht wird.

Wird *Ndel1* nur in einzelnen Neuronen ausgeschaltet, während die umliegenden Wildtyp Neuronen *Ndel1* exprimieren, zeigt sich ein etwas anderer Phänotyp. Die einzelnen *Ndel1 knockout* Neuronen bilden ebenfalls mehrere und längere Neuriten aus, haben jedoch keine Defizite in der Migrationsgeschwindigkeit und migrieren effizient von der Ventrikulärzone in die Intermediärzone (Hippenmeyer et al. 2010). Dort angekommen, zeigt sich, dass einzelne *Ndel1 knockout* Neuronen nicht in die cortikale Platte eindringen können und an der Grenze zwischen Intermediärzone und cortikaler Platte stehen bleiben (Hippenmeyer et al. 2010). Die Anreicherung der Zellen in der Intermediärzone beruht demnach nicht auf defizitärer Bewegungsfähigkeit, sondern auf der Unfähigkeit der Neuronen in die Gewebestrukturen ihrer Zielregion einzudringen. Die Zellmigration an sich scheint demnach keine zellautonome Funktion von NDEL1 zu sein und kann von umliegenden Wildtyp Zellen beeinflusst werden (Hippenmeyer et al. 2010). Dass einzelne *knockout* Zellen von physiologisch intakten Wildtyp Zellen umgeben sind, entspricht jedoch einer eher artifiziellen Situation, die in der Gehirnentwicklung genetisch homogener Organismen nicht vorkommt. Dennoch lässt sich festhalten, dass die korrekte Ausbildung von Neuriten und multipolaren Zellfortsätzen und der Eintritt von Neuronen in die cortikale Platte zellautonom von NDEL1 reguliert werden.

Die Ergebnisse der *gain of function* und *loss of function* Experimente von ZDHHC Proteinen und NDEL1 belegen, dass die exakte Balance der cytoplasmatischen Dynein Aktivität für die effiziente, radiale Migration neuronaler Progenitoren notwendig ist. Für die Aufrechterhaltung dieser Balance sind die Proteinmengen der Palmitoyltransferasen ZDHHC2, ZDHHC3 und ZDHHC7, die Proteinmenge von NDEL1, sowie der Grad der NDEL1 Palmitoylierung kritisch. Werden einzelne dieser Komponenten verändert, entsteht ein Ungleichgewicht das die radiale Migration neuronaler Progenitoren stört.

Im frontalen Cortex heterozygoter *Nrg1 knockout* Embryos konnte in dieser Arbeit ein solches Migrationsdefizit nachgewiesen werden. *Zdhhc2* positive Zellen sind am Embryonaltag 15.5 in der Ventrikulärzone angereichert und in der corticalen Platte reduziert (Abb. 15D). *Sstr2* positive Zellen, einer spezifischen, früh radial migrierenden Zellpopulation akkumulieren in der äußeren Subventrikulärzone, bzw. im Übergangsbereich zwischen Subventrikulärzone und Intermediärzone (Abb. 16E, G). *Zdhhc2* wird im frontalen Cortex *Nrg1* defizienter Embryos überexprimiert. Die Auswirkungen der Überexpression von *Zdhhc2* auf die radiale Migration wurden in der Studie von Shmueli (Shmueli et al. 2010) nicht untersucht. Jedoch führen die *loss of function* und *gain of function* der verschiedenen Palmitoyltransferasen und NDEL1 zur Ausbildung identischer Phänotypen, sodass davon ausgegangen werden kann, dass auch die Überexpression von *Zdhhc2* zu einer Dysbalance der NDEL1 Palmitoylierung und cytoplasmatischen Dynein Aktivität führt.

Das Migrationsdefizit *Sstr2* positiver Zellen beschränkt sich auf den frontalen Cortex und lässt sich im somatosensorischen Cortex *Nrg1* defizienter Embryos nicht nachweisen. Es liegt daher nahe, dass die *Nrg1* abhängige Überexpression von *Zdhhc2* im frontalen Cortex das Migrationsdefizit durch die Hyperpalmitoylierung von NDEL1 begünstigt, während *Zdhhc2* im somatosensorischen Cortex nicht überexprimiert und NDEL1 nicht hyperpalmitoyliert wird.

Anhand der durchgeführten *in situ* Experimente, konnte nicht geklärt werden, welcher subzelluläre Mechanismus die geänderte Verteilung von Neuronen und die Akkumulation migrierender Zellen im frontalen Cortex *Nrg1* defizienter Embryos verursacht. Mögliche Auswirkungen der belegten NDEL1 Hyperpalmitoylierung wären die Reduktion der Migrationsgeschwindigkeit, oder die Reduktion der direktionalen Persistenz. Um diese Fragestellung zu adressieren, wurden embryonale Ventrikulärzonenexplantate etabliert, die die Analyse von migrierenden Zellen auf Einzelzellniveau ermöglichen.

In den *Sstr2 in situ* Migrationsanalysen wurde ausschließlich die radiale Migration exzitatorischer Progenitoren analysiert. Die tangentielle Migration inhibitorischer Vorläufer wurde bis zum jetzigen Zeitpunkt nicht untersucht. Es ist bekannt, dass *Nrg1* die tangentielle Migration von inhibitorischen Progenitoren reguliert (López-Bendito et al. 2006) und NDEL1 die Geschwindigkeit und den Anteil tangential migrierender Neuronen beeinflusst (Youn et al. 2009). Am Embryonaltag 14.5 ist *Zdhhc2* auch in der medialen ganglionischen Eminenz, dem Ursprungsort von GABAergen Neuronen exprimiert (genepaint (<https://gp3.mpg.de/>)). Entsprechend sollte ein möglicher Einfluss der NDEL1 Hyperpalmitoylierung auf die tangentielle Migration inhibitorischer Progenitoren in zukünftigen experimentellen Arbeiten untersucht werden.

6.4 Einfluss der NDEL1 Palmitoylierung auf die Kopplung und Ausrichtung des Centrosoms zum Nucleus

Für die Migration neuronaler Progenitoren ist nicht nur die Komplexbildung von NDEL1 und Dynein, sondern auch die Komplexbildung mit LIS1 von besonderer Bedeutung. *Lis1* (*Lissencephaly 1*) wurde ursprünglich mit der Ausbildung von Lissenzephalie (*smooth brain disorder*) assoziiert (Reiner et al. 1993), einer schwerwiegenden Fehlbildung des Gehirns, bei der die Ausbildung von Gehirnwindungen (*Gyri*) vollständig ausbleibt oder reduziert ist. Die Reduktion der Cortex-Gyrierung, sowie die typische Ausbildung eines verdickten Cortex mit vier anstatt sechs Cortexschichten beruht auf einem massiven Migrationsdefizit neuronaler Progenitoren. Wie NDEL1, kann LIS1 Dynein direkt binden und interagiert mit den schweren Ketten der Dynein Motordomäne. Die Bindung von LIS1 und Dynein wird durch NDEL1 unterstützt (Shu et al. 2004) und hält das minus-End-gerichtete Motorprotein in seiner geöffneten Konformation. Die offene Konformation erhöht die Dynein Affinität für Dynactin und fördert dadurch die Ausbildung eines Transportkomplexes aus Dynein, Dynactin und der zu transportierenden Fracht (Canty und Yildiz 2020). Darüber hinaus ermöglicht die offene Dynein Konformation die Rekrutierung eines zweiten Dyneinpaars und die parallele Ausrichtung der Motordomänen. Durch die erhöhte Anzahl der Motorproteine, wird sowohl die Geschwindigkeit der Transportkomplexe, als auch die generierte Kraft der Transportkomplexe erhöht (Canty und Yildiz 2020). Dies ist insbesondere für den Transport schwerer Lasten notwendig, zum Beispiel beim Transport von Zellorganellen.

Der Zellkern repräsentiert die schwerste zu transportierende Last, die während der Migration von Zellen bewegt werden muss. Um direktional gerichtet zu migrieren, durchlaufen Neuronen im Wesentlichen drei Schritte. Durch Filopodien und Lamellipodien, bildet die Zelle einen *leading edge* Fortsatz aus, der sie in Migrationsrichtung verlängert. Im zweiten Schritt erfolgt die Nukleokinese, bei der der Zellkern in Migrationsrichtung nachgezogen wird. Abschließend wird der *trailing process* der Zelle eingezogen, sodass sich die Zelle in Migrationsrichtung verkürzt (Lambert de Rouvroit und Goffinet 2001). Das Centrosom befindet sich dabei in der Regel in Migrationsrichtung vor dem Zellkern, sodass der Zellkern während der Nukleokinese entlang Mikrotubuli zum Centrosom gezogen wird. Dabei bestimmt das Centrosom gleichzeitig die Direktionalität der Nukleokinese und der neuronalen Migration (Tsai und Gleeson 2005).

Es ist bekannt, dass der Proteinkomplex aus NDEL1, LIS1 und Dynein notwendig ist, um das Centrosom auszurichten, an den Zellkern zu koppeln und in Richtung des Centrosoms zu ziehen (Shu et al. 2004; Tanaka et al. 2004; Tsai und Gleeson 2005; Youn et al. 2009). Der *knockdown* von *Ndel1*, *Lis1* und Dynein führt jeweils zu einer Reduktion der nuklearen Migration, zerstört das Zellkern umgebende Mikrotubuli Netzwerk und entkoppelt den Nukleus vom Centrosom (Shu et al. 2004).

Der *knockout* von *Lis1* und *Ndel1* erhöht die Distanz zwischen Zellkern und Centrosom, d.h. er reduziert die Kopplung, und führt zu einem Verlust der Polarität der Centrosom-Zellkern-Achse in migrierenden neuronalen Progenitoren (Youn et al. 2009). Dabei scheint LIS1 den Abstand zwischen Zellkern und Centrosom stärker zu beeinflussen als NDEL1, während NDEL1 die Polarität stärker beeinflusst als LIS1.

In der vorliegenden Arbeit konnte nachgewiesen werden, dass der heterozygote *knockout* von *Nrg1* die Ausrichtung von Centrosomen in radial migrierenden neuronalen Progenitoren beeinflusst. In Ventrikulärzonenexplantaten aus dem frontalen Cortex *Nrg1* defizienter Embryos, vergrößert sich der mittlere Winkel zwischen den Fortsätzen von Radialglia Zellen und Centrosomen migrierender Neuronen. Gleichzeitig verringert sich die Anzahl von Neuronen, in denen das Centrosom basal, in Migrationsrichtung orientiert ist (Abb. 18K, L). Die Ergebnisse verdeutlichen, dass die direktionale Persistenz der radialen Migration in *Nrg1* defizienten Neuronen durch die Reduktion der Polarität der Centrosom-Zellkern-Achse eingeschränkt wird. Eine Entkopplung von Centrosom und Nukleus d.h. eine Verlängerung des Centrosom-Kern-Abstandes konnte in radial migrierenden, *Nrg1* defizienten Neuronen nicht nachgewiesen werden (Abb. 18J). Somit kann davon ausgegangen werden, dass die Ausrichtung der Centrosomen durch die Hyperpalmitoylierung von NDEL1 beeinflusst wird, die aus der Überexpression von *Zdhhc2* im embryonalen Frontalen Cortex *Nrg1* defizienter Embryos resultiert. Der Verlust der Polarität und die damit einhergehende Reduktion der direktionalen Persistenz, repräsentieren einen subzellulären Mechanismus, der die Akkumulation von radial migrierenden neuronalen Progenitoren im Bereich der Ventrikulär- Subventrikulär und Intermediärzone im frontalen Cortex *Nrg1* defizienter Embryos erklären kann.

Möglicherweise indiziert die Reduktion der basalen Centrosomorientierung, dass *Nrg1* defiziente Neuronen länger multipolar migrieren. Die multipolare Migration von Neuronen findet in der Subventrikulärzone und unteren Intermediärzone statt (Tabata und Nakajima 2003). In diesem Bereich sind *Sstr2* positive Zellen im frontalen Cortex *Nrg1* defizienter Embryos angereichert. Während der multipolaren Migration, sind die Centrosomen zufällig angeordnet und nicht basal in Migrationsrichtung orientiert (Tabata und Nakajima 2003; Cooper 2014). Der *knockout* von *Ndel1* fördert durch die Ausbildung mehrerer und längerer Zellfortsätze einen multipolaren Phänotyp der migrierenden Neuronen. Der Effekt tritt zellautonom in einzelnen Zellen (Hippenmeyer et al. 2010) und im Gewebeverbund (Youn et al. 2009) auf und repräsentiert dadurch einen weiteren molekularen Wirkungsmechanismus, der die gesamte radiale Migration durch eine verlängerte multipolare Migrationsphase verzögern könnte. Die Morphologie radial migrierender Neuronen wurde in den Ventrikulärzonenexplantaten nicht analysiert.

Durch die Analyse von Zellfortsätzen könnte in zukünftigen experimentellen Arbeiten bestimmt werden, ob die Hyperpalmitoylierung von NDEL1 die multipolare Migrationsphase *Nrg1* defizienter Neuronen verlängert und dadurch zur Akkumulation neuronaler Progenitoren im Bereich der Subventrikulär- und Intermediärzone führt. Für die Auswertung der Centrosomorientierung, wurden ausschließlich Zellen ausgewählt, die in räumlicher Nähe zu Radialglia Fortsätzen lokalisiert waren. Während der multipolaren Migration verlassen die migrierenden Neuronen den Radialglia-Fortsatz und stehen nicht bzw. kaum in Kontakt mit dem basalen Zellfortsatz. Entsprechend ist es möglich, dass die Auswertung der Ventrikulärzonenexplantate multipolar migrierende Neuronen nicht ausreichend erfasst.

Nrg1 wird von radial migrierenden Neuronen exprimiert und fördert sowohl die radiale Migration als auch das Wachstum und die Aufrechterhaltung der basalen Fortsätze von Radialglia Zellen (Anton et al. 1997). Entsprechend kann nicht ausgeschlossen werden, dass das beobachtete Migrationsdefizit und der Verlust der Polarität der Centrosom-Zellkern-Achse, von *Nrg1* direkt beeinflusst wird und nicht in Zusammenhang mit der Überexpression von *Zdhhc2* und der Hyperpalmitoylierung von NDEL1 steht. Zum jetzigen Zeitpunkt spricht gegen diese Hypothese, dass das Migrationsdefizit von *Sstr2* positiven Zellen nur im frontalen Cortex und nicht im somatosensorischen Cortex von *Nrg1* defizienten Embryos nachgewiesen werden konnte (Abb. 16E, F), obwohl *Nrg1* in beiden Regionen reduziert ist. Zusätzlich lässt sich in den Ventrikulärzonenexplantaten kein Unterschied in der Anzahl und Länge der Radialglia Fortsätze und dem Auswuchs bzw. dem Ausmigrieren von Neuronen feststellen (Abb. 17B, C). Entsprechend kann davon ausgegangen werden, dass die Menge von vorhandenem NRG1 Protein auch in heterozygoten *Nrg1 knockout* Zellen hinreichend ist, um Radialglia Fortsätze auszubilden und radial zu migrieren. Um diese Fragestellung final zu klären sind experimentelle Arbeiten, mit erst seit Kurzem verfügbaren, spezifischen ZDHHC2 Inhibitoren (Salaun et al. 2022) geplant. Beruht die Veränderung der Centrosomorientierung auf der Hyperpalmitoylierung von NDEL1, sollte der Effekt in den Ventrikulärzonenexplantaten durch die Inhibition von ZDHHC2 gerettet werden.

Entgegen mancher Literatur, scheint die Hyperpalmitoylierung von NDEL1 die Kopplung von Centrosom und Zellkern in den Ventrikulärzonenexplantaten nicht zu beeinflussen. Es ist möglich, dass die Funktionalität von LIS1 bei dem vorliegenden Grad der NDEL1 Palmitoylierung ausreichend ist, um den Zellkern effizient mit dem Centrosom zu koppeln und dieser Effekt deshalb hier nicht beobachtet wird.

6.5 Einfluss des embryonalen Migrationsdefizits auf die Ausbildung kortikaler Schichten in *Nrg1* defizienten Mäusen

Die anatomischen Veränderungen im Gehirn schizophrener Patienten und Patientinnen sind sehr vielfältig, vergleichsweise subtil und in der Literatur inkonsistent beschrieben (Harrison 1999; Harrison et al. 2011). Relativ konsistent zeigt sich jedoch, dass die supragranulären Cortexschichten (Schicht I, II und III) des dorsolateralen Präfrontalcortex (dlPFC) in schizophrenen Patienten und Patientinnen am stärksten betroffen sind. Die exzitatorischen Pyramidenzellen in Schicht II und vor allem in Schicht III haben kleinere Zellkörper, weniger Dendriten und weniger synaptische *spines* (Harrison 1999; Jaaro-Peled et al. 2010; Harrison et al. 2011), wodurch die supragranulären Cortexschichten in schizophrenen Patienten und Patientinnen dünner und zelldichter sind (Selemon et al. 1998; Wagstyl et al. 2016). In Bezug auf die absolute Zellzahl von Neuronen wurde lange angenommen, dass die Anzahl der Zellen mit inhibitorischem Phänotyp im Cortex schizophrener Patienten und Patientinnen reduziert ist, während die Anzahl von exzitatorischen Neuronen unverändert ist. (Harrison 1999; Jaaro-Peled et al. 2010; Harrison et al. 2011). Neueste, *RNA-sequencing* basierte Untersuchungen belegen jedoch, dass sowohl die Anzahl inhibitorischer als auch die Anzahl exzitatorischer Neuronen im dlPFC schizophrener Patienten und Patientinnen verändert ist (Batiuk et al. 2022). Subpopulationen von exzitatorischen Neuronen (L2_3_CUX2, L5_6_FEZF2, L4_5_FEZF2_LRRK1) sind signifikant angereichert, während mehrere Subpopulationen von inhibitorischen Neuronen (PVALB, SST, VIP) reduziert sind (Batiuk et al. 2022). Eine Reduktion der Zahl supragranulärer Pyramidenzellen wurde bisher nicht beschrieben.

In Gehirnen schizophrener Patienten und Patientinnen lassen sich also Abnormalitäten in der kortikalen Schichtdicke und der neuronalen Zellzahl nachweisen. Der *knockout* von *Ndel1* führt im Gehirn von Mäusen zu einem dünneren Cortex (Youn et al. 2009) und zu einer reduzierten Anzahl von Neuronen in den Schichten II-VI (Youn et al. 2009; Hippenmeyer et al. 2010). Um zu identifizieren, ob die Hyperpalmitoylierung von NDEL1 und das embryonale Migrationsdefizit im frontalen Cortex *Nrg1* defizienter Embryos die Ausbildung kortikaler Schichten beeinflusst, wurden qFISH Experimente gegen spezifische Markergene hoher und tiefer kortikaler Schichten durchgeführt. *Rgs8* markiert Neuronen der Cortexschicht II, *Er81* ist ein Markergen für kortikale Neuronen der Schicht V. Anhand anatomisch definiert lokalisierter Intensitätsprofilen (siehe 4.14), wurde die relative Expression der Markergene und die intracortikale Verteilung der markierten Zellen bestimmt. Die relative Expression der Markergene, erfasst möglicherweise Veränderungen der relativen Zellanzahl in der entsprechenden Cortexschicht. Durch die Verteilung der Markergene kann erfasst werden, ob die Schichtdicken des Cortex verändert sind, oder Neuronen einer bestimmten Cortexschicht in anderen Cortexschichten delokalisiert sind.

Die relative Expression von *Rgs8* und die Verteilung *Rgs8* positiver Neuronen wird durch den heterozygoten *Nrg1 knockout* nicht beeinflusst (Abb. 19). Entsprechend scheint das Migrationsdefizit radial migrierender, exzitatorischer Neuronen die Ausbildung hoher kortikaler Schichten im frontalen Cortex adulter *Nrg1^{+/-}* Tiere nicht zu beeinflussen. Die relative Expressionsstärke und die Verteilung der *Rgs8* Expression lassen den Schluss zu, dass weder die relative Anzahl, noch die Lokalisierung von Schicht II Neuronen im frontalen Cortex *Nrg1* defizienter Mäuse verändert ist. *Rgs8* ist ein etablierter Marker für Neuronen der Cortexschicht II (Gold et al. 1997; Wagener et al. 2010). *RNA-sequencing* Daten (Allen Institute for Brain Science, Whole Cortex & Hippocampus - 10x genomics; (Yao et al. 2021)) verdeutlichen jedoch, dass *Rgs8* überwiegend in GABAergen Interneuronen exprimiert wird, die tangential aus den ganglionischen Eminenzen und nicht radial aus der Ventrikulärzone des dorsalen Telencephalon in den Cortex migrieren. Da das beobachtete Migrationsdefizit radial migrierende, exzitatorische, *Sstr2* positive Zellen betrifft, repräsentiert *Rgs8* möglicherweise einen ungeeigneten Marker, um Effekte auf exzitatorische Neuronen in Schicht II zu detektieren. Zwar wird *Rgs8* auch in exzitatorischen Neuronen exprimiert, jedoch ist es möglich, dass ein vorhandener Einfluss auf exzitatorische Neuronen durch die Expression von *Rgs8* in inhibitorischen Neuronen kaschiert wird. Ein Einfluss auf supragranuläre exzitatorische Neuronen kann deshalb noch nicht vollständig ausgeschlossen werden.

In Bezug auf die tiefen Cortexschichten zeigt sich, dass die relative *Er81* Expression im frontalen Cortex *Nrg1* defizienter Mäuse signifikant reduziert ist (Abb. 20F), während die Verteilung von *Er81* positiven Zellen im frontalen und somatosensorischen Cortex von *Nrg1^{+/-}* Mäusen unverändert ist (Abb. 20E, G). Geht man davon aus, dass der heterozygote *Nrg1 knockout* die Expression von *Er81* nicht beeinflusst (laut *Microarrays* wird *Er81* nicht differenziell exprimiert), dient die relative *Er81* Expression als Indikator der Zellanzahl von Schicht V Neuronen. Diese wird durch den heterozygoten *Nrg1 knockout* im frontalen Cortex signifikant reduziert. Da der Effekt nur im frontalen, nicht aber im somatosensorischen Cortex zu beobachten ist, ist es möglich, dass das Migrationsdefizit exzitatorischer Progenitoren zu einer reduzierten Anzahl von Neuronen in Schicht V des frontalen Cortex führt.

Die Differenzierung der kortikalen Schichten ist ein strikt zeitabhängiger Prozess, bei dem die einzelnen Cortexschichten in zeitlicher Abfolge von innen nach außen gebildet werden. Führt das Migrationsdefizit zu einer zeitlichen Verzögerung, würden Schicht V Neuronen ihren Zielort zu spät erreichen und möglicherweise ihr neuronales Schicksal zu Gunsten höherer kortikaler Schichten ändern (McConnell 1988).

Diese Möglichkeit wird durch die reduzierte *Er81* Expression im frontalen Cortex unterstützt. Ist dies der Fall, sollte gleichzeitig eine Zunahme von Neuronen in höheren Cortexschichten zu beobachten sein.

Da *Rgs8* in GABAergen Neuronen stärker exprimiert wird als in exzitatorischen Neuronen, ist es möglich, dass die potenzielle Zunahme von exzitatorischen Neuronen in Schicht II nicht detektiert werden konnte. Aufgrund dieser Tatsache sollten die höheren Cortexschichten mit einem weiteren Markergen untersucht werden, dass wie *Er81* überwiegend in exzitatorischen Neuronen exprimiert wird. Eine Möglichkeit wäre die Analyse der Expression und Verteilung von *Cux2* (*Cut Like Homeobox 2*) positiven Zellen durch qFISH Experimente. *Cux2* ist ein Transkriptionsfaktor und Markergen für die Cortexschichten II und III, der stärker in exzitatorischen Neuronen exprimiert wird als *Rgs8*. Alternativ könnten die eigentlich *Er81* positive Population von Schicht V Neuronen ein anderes Schicht V Schicksal einnehmen, was mit den Patientendaten (s.o.) besser vereinbar wäre. Entsprechend sollte auch die Expression der Marker *Fefz2* und *Lrrk1* weiter untersucht werden.

Bemerkenswert ist, dass die *Er81* positiven Schicht V Neuronen, die in den *Nrg1*-defizienten Tieren reduziert sind, hauptsächlich langreichweitige corticocortikale Verbindungen ausbilden.

6.6 Einfluss des heterozygoten *Nrg1* knockouts auf interstitielle Neuronen der weißen Substanz

Neben den subtilen Veränderungen im Cortex wurden in schizophrenen Patienten und Patientinnen häufig und vergleichsweise konsistent Veränderungen in der Zellzahl und der Verteilung von interstitiellen Neuronen in der weißen Substanz festgestellt (Connor et al. 2011; Duchatel et al. 2019). Interstitielle Neuronen der weißen Substanz (*white matter interstitial neurons*, WMINs) sind eine morphologisch und neurochemisch diverse Zellpopulation, deren Funktionsweise und neuroentwicklungsbiologischer Ursprung nicht vollständig aufgeklärt ist. Ein Anteil der WMINs scheint aus nicht apoptotischen *Subplate* Neuronen hervorzugehen. Das Verhältnis von inhibitorischen und exzitatorischen Neuronen ähnelt der cortikalen Zusammensetzung von Neuronen, sodass bis zu 25% der WMINs GABAerg sind (Duchatel et al. 2019). Es ist bekannt, dass WMINs in die weiße Substanz und den darüberliegenden Cortex projizieren und gleichzeitig synaptischen *input* von exzitatorischen cortikalen und interstitiellen Neuronen erhalten (Duchatel et al. 2019; Sedmak und Judaš 2021). Entsprechend kann davon ausgegangen werden, dass WMINs in funktionelle neuronale Netzwerke integriert sind und durch ihre anatomische Lage den Informationsfluss in den Cortex, innerhalb des Cortex und aus dem Cortex heraus regulieren können, auch wenn die exakten elektrophysiologischen Eigenschaften weiterhin ungeklärt sind.

Durch verschiedene Marker lassen sich unterschiedliche Subtypen von WMINs identifizieren. Der neuronale Marker NeuN markiert alle Neuronen und WMINs, während MAP2 (*Microtubule Associated Protein 2*) überwiegend exzitatorische WMINs markiert und NOS/NADPH-Diaphorase als Marker für inhibitorische Neuronen verwendet wird. NeuN, MAP2 und NOS/NADPH-Diaphorase repräsentieren die Marker, die in Schizophrenie bezogenen Studien am häufigsten untersucht wurden (Connor et al. 2011; Duchatel et al. 2019). Dabei zeigt sich, mit gewissen Variationen, dass in schizophrenen Patienten und Patientinnen die Anzahl NeuN (Eastwood und Harrison 2003, 2005; Connor et al. 2009) und MAP2 (Anderson et al. 1996; Kirkpatrick et al. 2003) positiver WMINs in den cortextnahen Regionen der weißen Substanz erhöht ist. Inhibitorische, NOS/NADPH-Diaphorase positive WMINs sind im hohen Bereich der weißen Substanz reduziert, während sie in den tiefen Schichten der weißen Substanz angereichert sind (Akbarian et al. 1993).

Es existiert Evidenz, dass die erhöhte Anzahl von WMINs in schizophrenen Patienten und Patientinnen auf embryonale Migrationsdefizite zurückzuführen ist. Die Reduktion von Reelin, einem Regulator der neuronalen Migration, der auch in schizophrenen Patienten und Patientinnen unterexprimiert wird (Impagnatiello et al. 1998), führt zu einer erhöhten Anzahl von NOS positiven WMINs (Tueting et al. 1999). Gleichzeitig exprimieren WMINs schizophrener Patienten und Patientinnen weniger Reelin (Eastwood und Harrison 2003). Darüber hinaus wurde beschrieben, dass WMINs *doublecortin* exprimieren, einen Marker für unreife migrierende Neuronen, dessen Expression im dIPFC schizophrener Patienten und Patientinnen negativ mit der Anzahl von WMINs korreliert. (Fung et al. 2011). Während der neuronalen Migration ist die Komplexbildung von Doublecortin, LIS1 und Dynein notwendig, um den Zellkern an das Centrosom zu koppeln (Tanaka et al. 2004). Im gleichen Proteinkomplex befindet sich NDEL1, das im frontalen Cortex *Nrg1* defizienter Embryos hyperpalmitoyliert ist (Abb. 14C). Der *knockout* von *Ndel1* in einzelnen Neuronen führt zu einer massiven Akkumulation von Neuronen in der weißen Substanz (Hippenmeyer et al. 2010). Somit erhöhen Defizite verschiedener Regulatoren der neuronalen Migration die Anzahl von interstitiellen Neuronen in der weißen Substanz.

Um zu untersuchen, ob die Hyperpalmitoylierung von NDEL1 und das Migrationsdefizit im frontalen Cortex *Nrg1* defizienter Embryos die Anzahl von WMINs in postnatalen Tieren ebenfalls beeinflusst, wurden NeuN positive und NOS positive WMINs gefärbt und gezählt. Die Ergebnisse belegen, dass die absoluten Zellzahlen von WMINs durch den heterozygoten *knockout* von *Nrg1* nur insignifikant beeinflusst werden (Abb. 22K, L). Jedoch wird das Verhältnis von NOS positiven zu NeuN positiven WMINs signifikant erhöht (Abb. 22M). Durch den heterozygoten *Nrg1 knockout* steigt der Anteil der NOS positiven Teilpopulation um fast 30%. NOS positive Neuronen sind eine Teilpopulation SST positiver, inhibitorischer Neuronen, die in der medialen ganglionischen Eminenz geboren werden und tangential vom ventralen Telencephalon in den Cortex migrieren

(Tamamaki und Tomioka 2010; Yao et al. 2021). Das hier gezeigte Migrationsdefizit im frontalen Cortex *Nrg1* defizienter Embryos betrifft exzitatorische Progenitoren, die radial in die cortikale Platte migrieren.

Die Migration inhibitorischer Neuronen wurde in der vorliegenden Arbeit nicht untersucht, sodass zum jetzigen Zeitpunkt nicht bestimmt werden kann, ob die Anreicherung von NOS positiven Neuronen in der weißen Substanz *Nrg1* defizienter Mäuse auf einem Migrationsdefizit tangential migrierender Neuronen beruht. Die Auswirkung der NDEL1 Hyperpalmitoylierung auf die Ausrichtung des Centrosoms wurde in Ventrikulärzonenexplantaten untersucht, sodass diese Analysen ebenfalls keine inhibitorischen Neuronen erfasst. *Zdhhc2* ist zum richtigen Entwicklungszeitpunkt in der medialen ganglionischen Eminenz exprimiert, sodass auch eine Auswirkung auf die tangentielle Migration inhibitorischer Progenitoren plausibel erscheint. Dies könnte durch quantitative fluoreszente *in situ* Hybridisierungen gegen verschiedene Markergene weiter untersucht werden. NOS positive Neuronen werden in der medialen ganglionischen Eminenz geboren, entsprechend könnten die Gene *Nkx2.1*, *Dlx1*, *Dlx5* und *Lhx6* geeignete Marker repräsentieren. *Nkx2.1*, *Dlx1* und *Dlx5* markieren inhibitorische Progenitoren aus der medialen ganglionischen Eminenz und der embryonalen *preoptic area*. *Lhx6* wird ausschließlich von Progenitoren der medialen ganglionischen Eminenz exprimiert (Taniguchi et al. 2011). Um zu ermitteln, ob die Hyperpalmitoylierung von NDEL1 die Ausrichtung des Centrosoms auch in tangential migrierenden Neuronen beeinflusst, könnten außerdem Explantatkulturen der medialen ganglionischen Eminenz angefertigt werden. Gelingt dies, könnte neben der radialen Migration auch die tangentielle Migration neuronaler Progenitoren auf Einzelzellniveau untersucht werden. Mögliche Einflüsse der NDEL1 Hyperpalmitoylierung könnten auch in Explantatkulturen der medialen ganglionischen Eminenz durch die Verwendung spezifischer ZDHHC2 Inhibitoren (Salaun et al. 2022) validiert werden.

Die tangentielle Migration inhibitorischer Progenitoren wurde in der vorliegenden Arbeit nicht untersucht. Jedoch müssen auch inhibitorische Neuronen, nach Abschluss der tangentialen Migrationsphase, durch radiale Migration in die cortikale Platte eindringen. Es wäre möglich, dass die Überexpression von *Zdhhc2* und die Hyperpalmitoylierung von NDEL1 in *Nrg1* defizienten Embryos nicht die tangentielle Migration NOS positiver Neuronen beeinflusst, sondern ihr Eintreten in die cortikale Platte stört. Der Eintritt von Neuronen in die cortikale Platte hängt wesentlich von NDEL1 ab (Hippenmeyer et al. 2010), jedoch wurde ein solcher Effekt bisher nur für radial migrierende exzitatorische Progenitoren nachgewiesen. Gilt dieser Wirkungsmechanismus auch für inhibitorische Progenitoren, würden sich NOS positive Zellen in der Intermediärzone anreichern und in *Nrg1* defizienten Mäusen zu einem erhöhten Anteil NOS positiver WMINS führen.

Zellkörper und Axone von NOS positiven Neuronen befinden sich häufig in der Nähe von Blutgefäßen und sind entlang von Gehirnkapillaren ausgerichtet. Da Stickstoffmonoxid (NO) ein potenter Vasodilator ist, existiert die Hypothese, dass NOS positive Neuronen durch die Synthese und Abgabe von NO den Blutfluss im Gehirn in Abhängigkeit der neuronalen Aktivität regulieren (Regidor et al. 1993). Darüber hinaus ist bekannt, dass NO bei der synaptischen Plastizität als retrograder Messenger fungieren kann. Koinzidente prä- und postsynaptische Aktivität führt zur Öffnung der NMDA-Rezeptorkanäle und zu Calcium Einstrom. Auf der postsynaptischen Seite führt das Calcium zu einer Verstärkung der Synapse und aktiviert die Calcium-abhängige NOS. Das gebildete NO kann zur präsynaptischen Seite diffundieren und dort auch die Präsynapse verstärken (Hardingham et al. 2013). Über die Rolle der hohen konstitutiven Expression von NOS in NOS positiven GABAergen Neuronen ist weniger bekannt. Aufgrund seiner Gasform, ist die Reichweite des retrograden *messengers* auf weniger als einen Mikrometer begrenzt (Hardingham et al. 2013). Die deutlich höhere Menge von NOS1 im Cytoplasma von GABAergen Neuronen und die begrenzte Reichweite von Stickstoffmonoxid als Signalmolekül legen nahe, dass die Synthese von Stickstoffmonoxid weitere, intrazelluläre Prozesse beeinflusst, die nicht in direktem Zusammenhang mit synaptischer Plastizität stehen.

NOS positive Neuronen mit hoher cytoplasmatischer NOS Verteilung sind eine Teilpopulation SST positiver, inhibitorischer Neuronen (Tamamaki und Tomioka 2010; Yao et al. 2021). Die Zellen repräsentieren eine sehr ungewöhnliche Teilpopulation GABAerger Neuronen, die lange, ipsi- und kontralaterale Projektionen innerhalb des Cortex und in subcortikale Regionen ausbilden (Taniguchi et al. 2011). Dies stellt insofern eine Besonderheit dar, da inhibitorische Neuronen in der Regel keine langen Projektionen ausbilden, sondern in neuronalen Netzwerken lokal, auf benachbarte Zellen wirken. Besonders interessant ist, dass die große Mehrheit von weit-projizierenden GABAergen Neuronen NOS positiv ist (Tamamaki und Tomioka 2010; Gouwens et al. 2020) und über 80% der kortikalen NOS positiven Zellen in der weißen Substanz lokalisiert sind (Sedmak und Judaš 2021). Dies argumentiert stark gegen eine rein lokale Funktion bei der Regulation der Durchblutung.

Die geringe Anzahl und die langen Projektionen der NOS positiven Neuronen legen nahe, dass GABAerge Projektionsneuronen eher cortikale Netzwerke als einzelne Neuronen regulieren. Es ist bekannt, dass NOS positive Interneuronen in langsamwelligen Schlafphasen aktiviert werden, um die Aktivität neuronaler Netzwerke über weite Strecken hinweg zu regulieren und zu synchronisieren (Kilduff et al. 2011). Innerhalb des Cortex wurde gezeigt, dass NOS positive Neuronen benachbarte cortikale Kolumnen lateral inhibieren und dadurch die räumliche und zeitliche Aktivität von kortikalen Netzwerken modulieren (Shlosberg et al. 2012).

Aufgrund ihrer Anreicherung in der weißen Substanz und dem Nachweis kontralateraler Projektionen, kann davon ausgegangen werden, dass GABAerge Projektionsneuronen die interhemisphärische Kommunikation von cortikalen Netzwerken beeinflussen (Tamamaki und Tomioka 2010). Das Durchtrennen des *Corpus callosums* führt zur Desynchronisation von Gamma Oszillationen, ein Muster von neuronalen Schwingungen, das mit hohen kognitiven Leistungen assoziiert wird und in schizophrenen Patienten und Patientinnen gestört ist (Uhlhaas und Singer 2010).

NOS positive, GABAerge Projektionsneuronen können demnach verschiedene neuronale Netzwerke regulieren, inhibieren und synchronisieren. Dies bestärkt die Hypothese, dass interstitielle Neuronen der weißen Substanz (WMINs) durch ihre anatomische Lage den cortikalen *input*, die intercortikale Kommunikation und den cortikalen *output* regulieren und dadurch den Informationsfluss im Gehirn wesentlich beeinflussen. Der heterozygote *knockout* von *Nrg1* führt in postnatalen Mäusen zu einer Anreicherung von NOS positiven Neuronen in der weißen Substanz. Dieses Ergebnis ist besonders bemerkenswert, da der heterozygote *Nrg1 knockout* eine sehr spezielle Zellpopulation mit untypischen morphologischen und elektrophysiologischen Eigenschaften sehr spezifisch beeinflusst.

Bemerkenswert ist auch, dass durch das *Nrg1* Defizit gleichzeitig *Er81* positive Neuronen abgereichert werden. Die exzitatorischen Neuronen sind in Cortexschicht V lokalisiert und bilden ebenfalls langreichweitige intracortikale Verbindungen aus. Somit ist eine Imbalance langreichweitiger inhibitorischer und exzitatorischer intracortikaler Verbindungen zu erwarten. Die langreichweitigen intracortikalen Verbindungen vermitteln Assoziationen verteilter Repräsentationen während kognitiver Prozesse. Wenngleich derzeit noch spekulativ, erscheint es sehr plausibel, dass dies mit den Positivsymptomen schizophrener Patientinnen und Patienten (Halluzinationen, Wahn, Denkstörungen) in Zusammenhang stehen könnte.

Für zukünftige experimentelle Arbeiten, wäre eine weitere Charakterisierung insbesondere der NOS positiven Zellpopulation von besonderem Interesse, um die Entstehung, die Migration und Zielfindung und letztendlich den elektrophysiologischen Einfluss dieser Zellen und ihre Rolle in der Pathophysiologie der Schizophrenie besser zu verstehen.

7 Anhang

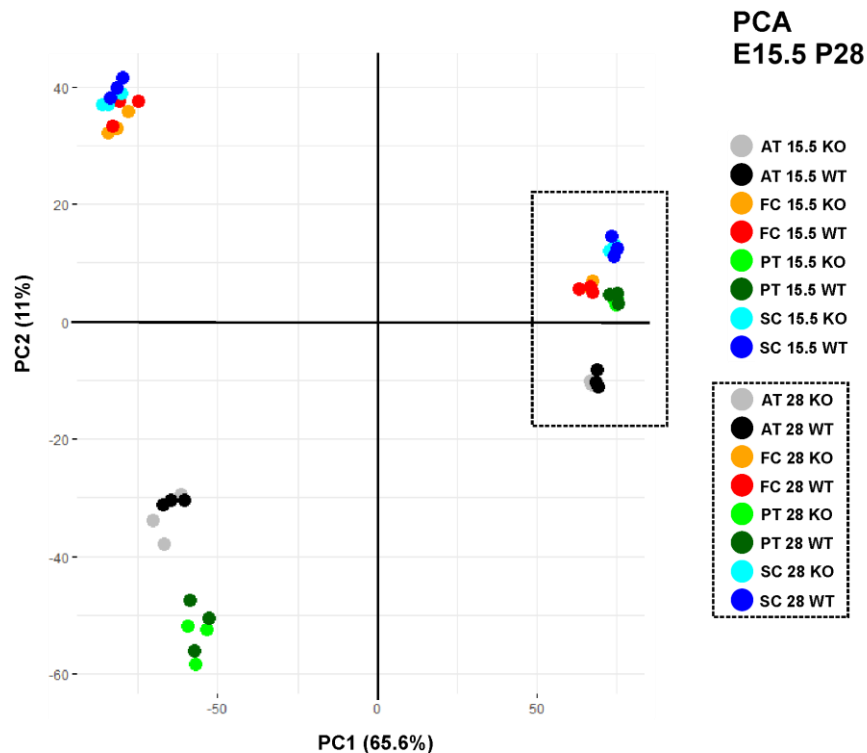


Abbildung 23: Gemeinsame Principal Component Analyse (PCA) embryonaler (E15.5) und postnataler (P28) Gehirnregionen. Die unterschiedlichen Entwicklungsstadien verursachen die größte Transkriptomische Varianz in den Microarray-Datensätzen (**PC1**). Thalamische und cortikale Gehirnregionen werden entlang **PC2** getrennt. Für die PCA wurden die je 5000 am stärksten exprimierten Gentranskripte jeder Microarray-Kondition verwendet. Die dargestellten Punkte repräsentieren je ein biologisches Replikate eines Entwicklungsstadiums, einer Gehirnregion und eines Genotyps. Die Farbcodierung der Gehirnregionen und Nrg1 Genotypen kann den Legenden entnommen werden. Das gestrichelte Rechteck umschließt die Datenpunkte der postnatalen Microarrays. **AT**: Anteriorer Thalamus, **FC**: Frontaler Cortex, **PT**: Posteriorer Thalamus, **SC**: Somatosensorischer Cortex. **E15.5**: Embryonaltag 15.5, **P28**: Postnataltag 28. **KO**: Nrg1^{+/-}, **WT**: Nrg1^{+/+}

8 Verzeichnisse

8.1 Abkürzungsverzeichnis

ABE	<i>Acyl-Biotin-Exchange</i>
AMPA	α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid receptor
AT	Anteriorer Thalamus
CNPase	<i>2',3'-Cyclic Nucleotide 3' Phosphodiesterase</i>
CNV	<i>Copy number variation</i>
CP	Cortikale Platte
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
ddPCR	<i>digital droplet PCR</i>
dIPFC	dorsolateraler Präfrontalcortex
E15.5	Embryonaltag 15.5
EGF	<i>Epidermal growth factor</i>
ErbB4	<i>Erb-B2 Receptor Tyrosine Kinase 4</i>
Er81	<i>ETS Variant Transcription Factor 1</i>
FARMS	<i>Factor analysis for robust microarray summarization</i>
FC	Frontaler Cortex
GABA	<i>Gamma-Aminobutyric acid</i>
GCRMA	<i>GeneChip robust multi array average</i>
GEA	<i>Gene Enrichment Analyse</i>
GOI	<i>Gene of interest</i>
GWAS	Genomweite Assoziationsstudie
HAM	Hydroxylamin
HKG	<i>Housekeeping Gen</i>
IZ	Intermediärzone
KO	<i>Knockout</i>
Micu3	<i>Mitochondrial Calcium Uptake Family Member 3</i>
Mttnr7	<i>Myotubularin Related Protein7</i>
MZ	Marginalzone
NBT	Nitroblau-Tetrazoliumchlorid
Ndel1	<i>NudE Neurodevelopment Protein 1 Like 1</i>
NEM	N-Ethylmaleinimid
NeuN	<i>RNA Binding Fox-1 Homolog3</i>
NMDAR	N-methyl-D-aspartate receptor
NOS	Stickstoffmonoxid Synthase

<i>Nrg1</i>	<i>Neuregulin 1</i>
P28	Postnatahtag 28
PAT	Palmitoyl Acyltransferase
PCA	<i>Principal Component Analyse</i>
PC	<i>Principal Component</i>
PSD95	<i>Postsynaptic Density Protein95</i>
PVALB	Parvalbumin
qmFISH	Quantitative multiplexierte fluoreszente <i>in situ</i> Hybridisierung
<i>Rgs8</i>	<i>Regulator of G Protein Signaling 8</i>
RGZ	Radialglia Zelle
SC	Somatosensorischer Cortex
SD	Standardabweichung
SEM	Standardfehler des Mittelwertes
SNP	<i>Single nucleotide polymorphism</i>
<i>Sstr2</i>	<i>Somatostatin Receptor 2</i>
SVZ	Subventrikulärzone
<i>Vps37a</i>	<i>Vacuolar Protein Sorting Associated Protein 37A</i>
VZ	Ventrikulärzone
WAD	<i>weighted average difference</i>
WMINs	<i>White matter interstitial neurons</i>
WT	Wildtyp
<i>Zdhhc2</i>	<i>Zinc Finger DHHC-Type Palmitoyltransferase 2</i>

8.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Proteinstruktur und Zusammensetzung von NRG1	15
Abbildung 2: Schematische Darstellung der Nrg1 Genstruktur.....	23
Abbildung 3: Entstehung und Migration kortikaler Progenitoren im embryonalen Mausgehirn	27
Abbildung 4: Strategie und Modellsystem der vorliegenden Arbeit	29
Abbildung 5: Principal Component Analysen embryonaler und postnataler Gehirnregionen	69
Abbildung 6: Principal Component Analysen embryonaler thalamischer Gehirnregionen	72
Abbildung 7: Principal Component Analysen embryonaler kortikaler Gehirnregionen	73
Abbildung 8: Deregulierte Gene im embryonalen thalmocortikalen System	76
Abbildung 9: Microarray Volcanoplots embryonaler thalamischer Gehirnregionen.	78
Abbildung 10: Microarray Volcanoplots embryonaler kortikaler Gehirnregionen.....	79
Abbildung 11: Ergebnisse der Microarray Genexpressionsanalyse embryonaler Gehirnregionen.	81
Abbildung 12: Ergebnisse der ddPCR Genexpressionsanalysen embryonaler Gehirnregionen.	83
Abbildung 13: Ergebnisse der qmFISH Genexpressionsanalyse embryonaler Gehirnregionen.	87
Abbildung 14: NDEL1 ist im frontalen Cortex Nrg1 defizienter Embryonen hyperpalmitoyliert.	89
Abbildung 15: Die Verteilung Zdhhc2 positiver Zellen ist im frontalen Cortex Nrg1 defizienter Embryos signifikant verändert	93
Abbildung 16: Der heterozygote Nrg1 knockout führt zu einer Akkumulation von Sstr2 positiven Zellen im Bereich der Subventrikulärzone/Intermediärzone	95
Abbildung 17: Etablierung von Ventrikulärzonenexplantate aus dem embryonalen frontalen Cortex.	97
Abbildung 18: Der heterozygote Nrg1 knockout beeinflusst die Orientierung des Centrosoms in radial migrierenden exzitatorischen Progenitoren des embryonalen frontalen Cortex	101
Abbildung 19: Der heterozygote Nrg1 knockout hat keinen Einfluss auf die Ausbildung hoher kortikaler Schichten	104
Abbildung 20: Der heterozygote Nrg1 knockout hat möglicherweise einen Einfluss auf die Ausbildung tiefer kortikaler Schichten	105
Abbildung 21: Analyse der Zellzahl von WMINs in der weißen Substanz Nrg1 defizienter Mäuse.	108
Abbildung 22: Der heterozygote Nrg1 knockout beeinflusst das Verhältnis von NOS-positiven und NeuN- positiven WMINs in der weißen Substanz von postnatalen Mäusen.....	109
Abbildung 23: Gemeinsame PCA embryonaler und postnataler Gehirnregionen.....	133

8.3 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verwendete Geräte.....	31
Tabelle 2: Verwendete Software und Softwarepakete	32
Tabelle 3: Verwendete Chemikalien.....	32
Tabelle 4: Verwendete Puffer und Lösungen	33
Tabelle 5: Verwendete Verbrauchsmaterialien.....	34
Tabelle 6: Verwendete Enzyme, Proteine und Antikörper.....	35
Tabelle 7: Verwendete Nukleotide und Nukleinsäuren.	36
Tabelle 8: Namen und Sequenzen der verwendeten Oligonukleotide	36
Tabelle 9: RNA antisense Sonden verschiedener Gentranskripte.	38
Tabelle 10: Nrg1 Genotypisierungs PCR	44
Tabelle 11: Embryonale RNA pools	46
Tabelle 12: Embryonale cDNA pools.....	48
Tabelle 13: digital droplet PCR.....	49
Tabelle 14: Touchdown PCR.....	50
Tabelle 15: In vitro Transkription Hapten-markierter RNA antisense Sonden.	51
Tabelle 16: NDEL1 IP und ABE assay, Puffer und Lösungen.....	58
Tabelle 17: Herstellung und Kultivierung von Ventrikulärzonenexplantaten, Puffer und Lösungen.	63
Tabelle 18: Immunfärbungen interstitieller Neuronen der weißen Substanz, Puffer und Lösungen.....	65

8.4 Literaturverzeichnis

- Akbarian, S.; Bunney, W. E.; Potkin, S. G.; Wigal, S. B.; Hagman, J. O.; Sandman, C. A.; Jones, E. G. (1993): Altered distribution of nicotinamide-adenine dinucleotide phosphate-diaphorase cells in frontal lobe of schizophrenics implies disturbances of cortical development. *Archives of general psychiatry* 50 (3), S. 169–177. DOI: 10.1001/archpsyc.1993.01820150007001.
- Akbarian, S.; Kim, J. J.; Potkin, S. G.; Hetrick, W. P.; Bunney, W. E.; Jones, E. G. (1996): Maldistribution of interstitial neurons in prefrontal white matter of the brains of schizophrenic patients. *Arch Gen Psychiatry* 53 (5), S. 425–436. DOI: 10.1001/archpsyc.1996.01830050061010.
- Anderson, S. A.; Volk, D. W.; Lewis, D. A. (1996): Increased density of microtubule associated protein 2-immunoreactive neurons in the prefrontal white matter of schizophrenic subjects. *Schizophrenia Research* 19 (2-3), S. 111–119. DOI: 10.1016/0920-9964(96)88521-5.
- Anton, E. S.; Marchionni, M. A.; Lee, K. F.; Rakic, P. (1997): Role of GGF/neuregulin signaling in interactions between migrating neurons and radial glia in the developing cerebral cortex. *Development (Cambridge, England)* 124 (18), S. 3501–3510. DOI: 10.1242/dev.124.18.3501.
- Ashrafi, G.; Juan-Sanz, J. de; Farrell, R. J.; Ryan, T. A. (2020): Molecular Tuning of the Axonal Mitochondrial Ca²⁺ Uniporter Ensures Metabolic Flexibility of Neurotransmission. *Neuron* 105 (4), 678-687.e5. DOI: 10.1016/j.neuron.2019.11.020.
- Badner, J. A.; Gershon, E. S. (2002): Meta-analysis of whole-genome linkage scans of bipolar disorder and schizophrenia. *Mol Psychiatry* 7 (4), S. 405–411. DOI: 10.1038/sj.mp.4001012.
- Barakat, A.; Dean, B.; Scarr, E.; Evin, G. (2010): Decreased Neuregulin 1 C-terminal fragment in Brodmann's area 6 of patients with schizophrenia. *Schizophrenia Research* 124 (1-3), S. 200–207. DOI: 10.1016/j.schres.2010.09.001.
- Barros, C. S.; Calabrese, B.; Chamero, P.; Roberts, A. J.; Korzus, E.; Lloyd, K.; Stowers, L.; Mayford, M.; Halpain, S.; Müller, U. (2009): Impaired maturation of dendritic spines without disorganization of cortical cell layers in mice lacking NRG1/ErbB signaling in the central nervous system. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106 (11), S. 4507–4512. DOI: 10.1073/pnas.0900355106.
- Batista-Brito, R.; Vinck, M.; Ferguson, K. A.; Chang, J. T.; Laubender, D.; Lur, G.; Mossner, J. M.; Hernandez, V. G.; Ramakrishnan, C.; Deisseroth, K. et al. (2017): Developmental Dysfunction of VIP Interneurons Impairs Cortical Circuits. *Neuron* 95 (4), 884-895.e9. DOI: 10.1016/j.neuron.2017.07.034.
- Batiuk, M. Y.; Tyler, T.; Dragicevic, K.; Mei, S.; Rydbirk, R.; Petukhov, V.; Deviatiiarov, R.; Sedmak, D.; Frank, E.; Feher, V. et al. (2022): Upper cortical layer-driven network impairment in schizophrenia. *Science advances* 8 (41), eabn8367. DOI: 10.1126/sciadv.abn8367.

- Bayer, T. A.; Falkai, P.; Maier, W. (1999): Genetic and non-genetic vulnerability factors in schizophrenia: the basis of the "two hit hypothesis". *Journal of Psychiatric Research* 33 (6), S. 543–548. DOI: 10.1016/S0022-3956(99)00039-4.
- Bradshaw, N. J.; Hayashi, M. A. F. (2017): NDE1 and NDEL1 from genes to (mal)functions: parallel but distinct roles impacting on neurodevelopmental disorders and psychiatric illness. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 74 (7), S. 1191–1210. DOI: 10.1007/s00018-016-2395-7.
- Bradshaw, N. J.; Hennah, W.; Soares, D. C. (2013): NDE1 and NDEL1: twin neurodevelopmental proteins with similar 'nature' but different 'nurture'. *Biomolecular concepts* 4 (5), S. 447–464. DOI: 10.1515/bmc-2013-0023.
- Brandon, N. J.; Handford, E. J.; Schurov, I.; Rain, J.-C.; Pelling, M.; Duran-Jimeniz, B.; Camargo, L. M.; Oliver, K. R.; Beher, D.; Shearman, M. S. et al. (2004): Disrupted in Schizophrenia 1 and Nudel form a neurodevelopmentally regulated protein complex: implications for schizophrenia and other major neurological disorders. *Molecular and Cellular Neuroscience* 25 (1), S. 42–55. DOI: 10.1016/j.mcn.2003.09.009.
- Brandon, N. J.; Millar, J. Kirsty; Korth, C.; Sive, H.; Singh, K. K.; Sawa, A. (2009): Understanding the role of DISC1 in psychiatric disease and during normal development. *J. Neurosci.* 29 (41), S. 12768–12775. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.3355-09.2009.
- Brigidi, G. Stefano; Bamji, S. X. (2013): Detection of protein palmitoylation in cultured hippocampal neurons by immunoprecipitation and acyl-biotin exchange (ABE). *JoVE (Journal of Visualized Experiments)* (72), e50031. DOI: 10.3791/50031.
- Canty, J. T.; Yildiz, A. (2020): Activation and Regulation of Cytoplasmic Dynein. *Trends in biochemical sciences* 45 (5), S. 440–453. DOI: 10.1016/j.tibs.2020.02.002.
- Cardno, A. G.; Gottesman, I. I. (2000): Twin studies of schizophrenia: From bow-and-arrow concordances to Star Wars Mx and functional genomics. *American Journal of Medical Genetics* 97 (1), S. 12–17. DOI: 10.1002/(SICI)1096-8628(200021)97:1<12::AID-AJMG3>3.0.CO;2-U.
- Cellular and Molecular Control of Neuronal Migration (2014): Springer, Dordrecht.
- Chen, J.; Xu, H.; Aronow, B. J.; Jegga, A. G. (2007): Improved human disease candidate gene prioritization using mouse phenotype. *BMC bioinformatics* 8, S. 392. DOI: 10.1186/1471-2105-8-392.
- Chong, V. Z.; Thompson, M.; Beltaifa, S.; Webster, M. J.; Law, A. J.; Weickert, C. Shannon (2008): Elevated neuregulin-1 and ErbB4 protein in the prefrontal cortex of schizophrenic patients. *Schizophrenia Research* 100 (1-3), S. 270–280. DOI: 10.1016/j.schres.2007.12.474.
- Connor, C. M.; Crawford, B. C.; Akbarian, S. (2011): White matter neuron alterations in schizophrenia and related disorders. *International journal of developmental neuroscience : the official journal of the International Society for Developmental Neuroscience* 29 (3), S. 325–334. DOI: 10.1016/j.ijdevneu.2010.07.236.

- Connor, C. M.; Guo, Y.; Akbarian, S. (2009): Cingulate white matter neurons in schizophrenia and bipolar disorder. *Biological Psychiatry* 66 (5), S. 486–493. DOI: 10.1016/j.biopsych.2009.04.032.
- Cooper, J. A. (2014): Molecules and mechanisms that regulate multipolar migration in the intermediate zone. *Frontiers in cellular neuroscience* 8, S. 386. DOI: 10.3389/fncel.2014.00386.
- Costa, K. Machado; Schoenbaum, G. (2022): Dopamine. *Current biology : CB* 32 (15), R817-R824. DOI: 10.1016/j.cub.2022.06.060.
- Dahm, Liane (2007): Protokollentwicklung für die Microarray-gestützte Transkriptomanalyse der Neuregulin-1 hypomorphen Maus als Schizophreniemodell. Diplomarbeit, Universität Jena.
- Dal Mas, C.; Nani, J. V.; Noto, C.; Yonamine, C. M.; Da Cunha, G. Rodrigues; Mansur, R. B.; Ota, V. K.; Belangero, S. Iole; Cordeiro, Q.; Kapczinski, F. et al. (2019): Ndel1 oligopeptidase activity as a potential biomarker of early stages of schizophrenia. *Schizophrenia Research* 208, S. 202–208. DOI: 10.1016/j.schres.2019.02.021.
- Del Pino, I.; García-Frigola, C.; Dehorter, N.; Brotons-Mas, J. R.; Alvarez-Salvado, E.; Martínez de Lagrán, M.; Ciceri, G.; Gabaldón, M. Victoria; Moratal, D.; Dierssen, M. et al. (2013): Erbb4 deletion from fast-spiking interneurons causes schizophrenia-like phenotypes. *Neuron* 79 (6), S. 1152–1168. DOI: 10.1016/j.neuron.2013.07.010.
- Duchatel, R. J.; Shannon Weickert, C.; Tooney, P. A. (2019): White matter neuron biology and neuropathology in schizophrenia. *npj Schizophr* 5 (1), S. 10. DOI: 10.1038/s41537-019-0078-8.
- Eastwood, S. L.; Harrison, P. J. (2003): Interstitial white matter neurons express less reelin and are abnormally distributed in schizophrenia: towards an integration of molecular and morphologic aspects of the neurodevelopmental hypothesis. *Mol Psychiatry* 8 (9), S. 821–831. DOI: 10.1038/sj.mp.4001371.
- Eastwood, S. L.; Harrison, P. J. (2005): Interstitial white matter neuron density in the dorsolateral prefrontal cortex and parahippocampal gyrus in schizophrenia. *Schizophrenia Research* 79 (2-3), S. 181–188. DOI: 10.1016/j.schres.2005.07.001.
- Estes, M. L.; McAllister, A. Kimberley (2016): Maternal immune activation: Implications for neuropsychiatric disorders. *Science (New York, N.Y.)* 353 (6301), S. 772–777. DOI: 10.1126/science.aag3194.
- Falls, D. L. (2003): Neuregulins: functions, forms, and signaling strategies. *Experimental Cell Research* 284 (1), S. 14–30. DOI: 10.1016/S0014-4827(02)00102-7.
- Fazzari, P.; Paternain, A. V.; Valiente, M.; Pla, R.; Luján, R.; Lloyd, K.; Lerma, J.; Marín, O.; Rico, B. (2010): Control of cortical GABA circuitry development by Nrg1 and ErbB4 signalling. *Nature* 464 (7293), S. 1376–1380. DOI: 10.1038/nature08928.
- Flames, N.; Long, J. E.; Garratt, A. N.; Fischer, T. M.; Gassmann, M.; Birchmeier, C.; Lai, C.; Rubenstein, J. L. R.; Marín, O. (2004): Short- and long-range attraction of cortical GABAergic interneurons by neuregulin-1. *Neuron* 44 (2), S. 251–261. DOI: 10.1016/j.neuron.2004.09.028.

- Franco, S. J.; Müller, U. (2013): Shaping our minds: stem and progenitor cell diversity in the mammalian neocortex. *Neuron* 77 (1), S. 19–34. DOI: 10.1016/j.neuron.2012.12.022.
- Fukata, Y.; Dimitrov, A.; Boncompain, G.; Vielemeyer, O.; Perez, F.; Fukata, M. (2013): Local palmitoylation cycles define activity-regulated postsynaptic subdomains. *The Journal of cell biology* 202 (1), S. 145–161. DOI: 10.1083/jcb.201302071.
- Fung, S. J.; Joshi, D.; Allen, K. M.; Sivagnanasundaram, S.; Rothmond, D. A.; Saunders, R.; Noble, P. L.; Webster, M. J.; Weickert, C. Shannon (2011): Developmental patterns of doublecortin expression and white matter neuron density in the postnatal primate prefrontal cortex and schizophrenia. *PLOS ONE* 6 (9), e25194. DOI: 10.1371/journal.pone.0025194.
- Garrott, S. R.; Gillies, J. P.; DeSantis, M. E. (2022): Nde1 and Ndel1: Outstanding Mysteries in Dynein-Mediated Transport. *Frontiers in cell and developmental biology* 10, S. 871935. DOI: 10.3389/fcell.2022.871935.
- Genovese, G.; Fromer, M.; Stahl, E. A.; Ruderfer, D. M.; Chambert, K.; Landén, M.; Moran, J. L.; Purcell, S. M.; Sklar, P.; Sullivan, P. F. et al. (2016): Increased burden of ultra-rare protein-altering variants among 4,877 individuals with schizophrenia. *Nat Neurosci* 19 (11), S. 1433–1441. DOI: 10.1038/nn.4402.
- Globa, A. K.; Bamji, S. X. (2017): Protein palmitoylation in the development and plasticity of neuronal connections. *Current opinion in neurobiology* 45, S. 210–220. DOI: 10.1016/j.conb.2017.02.016.
- Göhlmann, Hinrich; Talloen, Willem (2017): Gene expression studies using affymetrix microarrays. Boca Raton, FL, London, New York, NY: CRC Press (Chapman & Hall/CRC mathematical and computational biology series).
- Gold, S. J.; Ni, Y. G.; Dohman, H. G.; Nestler, E. J. (1997): Regulators of G-protein signaling (RGS) proteins: region-specific expression of nine subtypes in rat brain. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 17 (20), S. 8024–8037. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.17-20-08024.1997.
- Gonzalez-Zulueta, M.; Dawson, V. L.; Dawson, T. M. (2001): Histochemical analysis of nitric oxide synthase by NADPH diaphorase staining. *Current protocols in toxicology* Chapter 10, Unit 10.6. DOI: 10.1002/0471140856.tx1006s01.
- Gouwens, N. W.; Sorensen, S. A.; Baftizadeh, F.; Budzillo, A.; Lee, B. R.; Jarsky, T.; Alfiler, L.; Baker, K.; Barkan, E.; Berry, K. et al. (2020): Integrated Morphoelectric and Transcriptomic Classification of Cortical GABAergic Cells. *Cell* 183 (4), 935-953.e19. DOI: 10.1016/j.cell.2020.09.057.
- Haijma, S. V.; van Haren, N.; Cahn, W.; Koolschijn, P. Cédric M. P.; Hulshoff Pol, H. E.; Kahn, R. S. (2013): Brain volumes in schizophrenia: a meta-analysis in over 18 000 subjects. *Schizophrenia Bulletin* 39 (5), S. 1129–1138. DOI: 10.1093/schbul/sbs118.

- Hardingham, N.; Dachtler, J.; Fox, K. (2013): The role of nitric oxide in pre-synaptic plasticity and homeostasis. *Frontiers in cellular neuroscience* 7, S. 190. DOI: 10.3389/fncel.2013.00190.
- Harrison, P. J. (1999): The neuropathology of schizophrenia. A critical review of the data and their interpretation. *Brain* 122 (Pt 4) (4), S. 593–624. DOI: 10.1093/brain/122.4.593.
- Harrison, P. J. (2000): Postmortem studies in schizophrenia. *Dialogues in Clinical Neuroscience* 2 (4), S. 349–357. DOI: 10.31887/DCNS.2000.2.4/pharrison.
- Harrison, P. J.; Law, A. J. (2006): Neuregulin 1 and schizophrenia: genetics, gene expression, and neurobiology. *Biological Psychiatry* 60 (2), S. 132–140. DOI: 10.1016/j.biopsych.2005.11.002.
- Harrison, P. J.; Lewis, D. A.; Kleinman, J. E. (2011): Neuropathology of Schizophrenia. In: Daniel R. Weinberger, Paul J. Harrison, Daniel Roy Weinberger und P. J. Harrison (Hg.): Schizophrenia. 3. ed. Chichester: Wiley-Blackwell, S. 372–392.
- Hashimoto, R.; Straub, R. E.; Weickert, C. S.; Hyde, T. M.; Kleinman, J. E.; Weinberger, D. R. (2004): Expression analysis of neuregulin-1 in the dorsolateral prefrontal cortex in schizophrenia. *Mol Psychiatry* 9 (3), S. 299–307. DOI: 10.1038/sj.mp.4001434.
- Hayashi, M. A. F.; Portaro, F. C. V.; Bastos, M. F.; Guerreiro, J. R.; Oliveira, V.; Gorrao, S. S.; Tambourgi, D. V.; Sant'Anna, O. A.; Whiting, P. J.; Camargo, L. Miguel et al. (2005): Inhibition of NUDEL (nuclear distribution element-like)-oligopeptidase activity by disrupted-in-schizophrenia 1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102 (10), S. 3828–3833. DOI: 10.1073/pnas.0500330102.
- Hindson, B. J.; Ness, K. D.; Masquelier, D. A.; Belgrader, P.; Heredia, N. J.; Makarewicz, A. J.; Bright, I. J.; Lucero, M. Y.; Hiddessen, A. L.; Legler, T. C. et al. (2011): High-throughput droplet digital PCR system for absolute quantitation of DNA copy number. *Analytical chemistry* 83 (22), S. 8604–8610. DOI: 10.1021/ac202028g.
- Hippenmeyer, S. (2014): Molecular Pathways Controlling the Sequential Steps of Cortical Projection Neuron Migration. In: Cellular and Molecular Control of Neuronal Migration: Springer, Dordrecht, S. 1–24. Online verfügbar unter https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-94-007-7687-6_1#Sec3.
- Hippenmeyer, S.; Youn, Y. Ha; Moon, H. Mi; Miyamichi, K.; Zong, H.; Wynshaw-Boris, A.; Luo, L. (2010): Genetic mosaic dissection of Lis1 and Ndel1 in neuronal migration. *Neuron* 68 (4), S. 695–709. DOI: 10.1016/j.neuron.2010.09.027.
- Hochreiter, S.; Clevert, D.-A.; Obermayer, K. (2006): A new summarization method for Affymetrix probe level data. *Bioinformatics (Oxford, England)* 22 (8), S. 943–949. DOI: 10.1093/bioinformatics/btl033.
- Huckins, L. M.; Dobbyn, A.; Ruderfer, D. M.; Hoffman, G.; Wang, W.; Pardiñas, A. F.; Rajagopal, V. M.; Als, T. D.; T Nguyen, H.; Girdhar, K. et al. (2019): Gene expression imputation across multiple brain regions provides insights into schizophrenia risk. *Nat Genet* 51 (4), S. 659–674. DOI: 10.1038/s41588-019-0364-4.

- Impagnatiello, F.; Guidotti, A. R.; Pesold, C.; Dwivedi, Y.; Caruncho, H.; Pisu, M. G.; Uzunov, D. P.; Smalheiser, N. R.; Davis, J. M.; Pandey, G. N. et al. (1998): A decrease of reelin expression as a putative vulnerability factor in schizophrenia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95 (26), S. 15718–15723. DOI: 10.1073/pnas.95.26.15718.
- Ishizuka, K.; Paek, M.; Kamiya, A.; Sawa, A. (2006): A review of Disrupted-In-Schizophrenia-1 (DISC1): neurodevelopment, cognition, and mental conditions. *Biological Psychiatry* 59 (12), S. 1189–1197. DOI: 10.1016/j.biopsych.2006.03.065.
- Jaaro-Peled, H.; Ayhan, Y.; Pletnikov, M. V.; Sawa, A. (2010): Review of pathological hallmarks of schizophrenia: comparison of genetic models with patients and nongenetic models. *Schizophrenia Bulletin* 36 (2), S. 301–313. DOI: 10.1093/schbul/sbp133.
- Kadota, K.; Nakai, Y.; Shimizu, K. (2008): A weighted average difference method for detecting differentially expressed genes from microarray data. *Algorithms Mol Biol* 3 (1), S. 8. DOI: 10.1186/1748-7188-3-8.
- Kahn, R. S.; Sommer, I. E.; Murray, R. M.; Meyer-Lindenberg, A.; Weinberger, D. R.; Cannon, T. D.; O'Donovan, M.; Correll, C. U.; Kane, J. M.; van Os, J. et al. (2015): Schizophrenia. *Nat Rev Dis Primers* 1 (1), S. 15067. DOI: 10.1038/nrdp.2015.67.
- Kaiser, Philipp (2011): Transkriptomanalyse Schizophrenie relevanter Hirnregionen Neuregulin-1 defizienter Mäuse. Dissertationsarbeit, Karlsruher Institut für Technologie.
- Kato, T.; Abe, Y.; Sotoyama, H.; Kakita, A.; Kominami, R.; Hirokawa, S.; Ozaki, M.; Takahashi, H.; Nawa, H. (2011): Transient exposure of neonatal mice to neuregulin-1 results in hyperdopaminergic states in adulthood: implication in neurodevelopmental hypothesis for schizophrenia. *Mol Psychiatry* 16 (3), S. 307–320. DOI: 10.1038/mp.2010.10.
- Kilduff, T. S.; Cauli, B.; Gerashchenko, D. (2011): Activation of cortical interneurons during sleep: an anatomical link to homeostatic sleep regulation? *Trends in Neurosciences* 34 (1), S. 10–19. DOI: 10.1016/j.tins.2010.09.005.
- Kirkpatrick, B.; Messias, N. C.; Conley, R. R.; Roberts, R. C. (2003): Interstitial cells of the white matter in the dorsolateral prefrontal cortex in deficit and nondeficit schizophrenia. *The Journal of nervous and mental disease* 191 (9), S. 563–567. DOI: 10.1097/01.nmd.0000087181.61164.e1.
- La Manno, G.; Siletti, K.; Furlan, A.; Gyllborg, D.; Vinsland, E.; Mossi Albiach, A.; Mattsson Langseth, C.; Khven, I.; Lederer, A. R.; Dratva, L. M. et al. (2021): Molecular architecture of the developing mouse brain. *Nature* 596 (7870), S. 92–96. DOI: 10.1038/s41586-021-03775-x.
- Lachenmaier, Lukas (2019): Veränderungen des Gehirntranskriptoms der Maus infolge der heterozygoten Ausschaltung des Schizophrenie-Suszeptibilitätsgens Neuregulin-1. Masterthesis, Karlsruher Institut für Technologie.

- Lambert de Rouvroit, C.; Goffinet, A. M. (2001): Neuronal migration. *Mechanisms of Development* 105 (1-2), S. 47–56. DOI: 10.1016/S0925-4773(01)00396-3.
- Laporte, J.; Bedez, F.; Bolino, A.; Mandel, J.-L. (2003): Myotubularins, a large disease-associated family of cooperating catalytically active and inactive phosphoinositides phosphatases. *Hum Mol Genet* 12 Spec No 2 (suppl_2), R285-92. DOI: 10.1093/hmg/ddg273.
- Lauter, G.; Söll, I.; Hauptmann, G. (2011): Multicolor fluorescent in situ hybridization to define abutting and overlapping gene expression in the embryonic zebrafish brain. *Neural development* 6, S. 10. DOI: 10.1186/1749-8104-6-10.
- Law, A. J.; Lipska, B. K.; Weickert, C. Shannon; Hyde, T. M.; Straub, R. E.; Hashimoto, R.; Harrison, P. J.; Kleinman, J. E.; Weinberger, D. R. (2006): Neuregulin 1 transcripts are differentially expressed in schizophrenia and regulated by 5' SNPs associated with the disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103 (17), S. 6747–6752. DOI: 10.1073/pnas.0602002103.
- Lê, S.; Josse, J.; Husson, F. (2008): FactoMineR : An R Package for Multivariate Analysis. *J. Stat. Soft.* 25 (1). DOI: 10.18637/jss.v025.i01.
- Lewis, C. M.; Levinson, D. F.; Wise, L. H.; DeLisi, L. E.; Straub, R. E.; Hovatta, I.; Williams, N. M.; Schwab, S. G.; Pulver, A. E.; Faraone, S. V. et al. (2003): Genome scan meta-analysis of schizophrenia and bipolar disorder, part II: Schizophrenia. *American journal of human genetics* 73 (1), S. 34–48. DOI: 10.1086/376549.
- Li, Z.; Chen, J.; Yu, H.; He, L.; Xu, Y.; Zhang, D.; Yi, Q.; Li, C.; Li, X.; Shen, J. et al. (2017): Genome-wide association analysis identifies 30 new susceptibility loci for schizophrenia. *Nature genetics* 49 (11), S. 1576–1583. DOI: 10.1038/ng.3973.
- Loo, L.; Simon, J. M.; Xing, L.; McCoy, E. S.; Niehaus, J. K.; Guo, J.; Anton, E. S.; Zylka, M. J. (2019): Single-cell transcriptomic analysis of mouse neocortical development. *Nat Commun* 10 (1), S. 134. DOI: 10.1038/s41467-018-08079-9.
- López-Bendito, G.; Cautinat, A.; Sánchez, J. Antonio; Bielle, F.; Flames, N.; Garratt, A. N.; Talmage, D. A.; Role, L. W.; Charnay, P.; Marín, O. et al. (2006): Tangential neuronal migration controls axon guidance: a role for neuregulin-1 in thalamocortical axon navigation. *Cell* 125 (1), S. 127–142. DOI: 10.1016/j.cell.2006.01.042.
- Luhmann, H. J.; Kirischuk, S.; Kilb, W. (2018): The Superior Function of the Subplate in Early Neocortical Development. *Frontiers in Neuroanatomy* 12, S. 97. DOI: 10.3389/fnana.2018.00097.
- Marballi, K.; Cruz, D.; Thompson, P.; Walss-Bass, C. (2012): Differential Neuregulin 1 Cleavage in the Prefrontal Cortex and Hippocampus in Schizophrenia and Bipolar Disorder: Preliminary Findings. *PLoS ONE* 7 (5), e36431. DOI: 10.1371/journal.pone.0036431.

- Marchisella, F.; Coffey, E. T.; Hollos, P. (2016): Microtubule and microtubule associated protein anomalies in psychiatric disease. *Cytoskeleton (Hoboken, N.J.)* 73 (10), S. 596–611. DOI: 10.1002/cm.21300.
- Marín, O. (2013): Cellular and molecular mechanisms controlling the migration of neocortical interneurons. *European Journal of Neuroscience* 38 (1), S. 2019–2029. DOI: 10.1111/ejn.12225.
- Marshall, C. R.; Howrigan, D. P.; Merico, D.; Thiruvahindrapuram, B.; Wu, W.; Greer, D. S.; Antaki, D.; Shetty, A.; Holmans, P. A.; Pinto, D. et al. (2017): Contribution of copy number variants to schizophrenia from a genome-wide study of 41,321 subjects. *Nat Genet* 49 (1), S. 27–35. DOI: 10.1038/ng.3725.
- McConnell, S. K. (1988): Fates of visual cortical neurons in the ferret after isochronic and heterochronic transplantation. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 8 (3), S. 945–974. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.08-03-00945.1988.
- Mei, L.; Nave, K.-A. (2014): Neuregulin-ERBB signaling in the nervous system and neuropsychiatric diseases. *Neuron* 83 (1), S. 27–49. DOI: 10.1016/j.neuron.2014.06.007.
- Mei, L.; Xiong, W.-C. (2008): Neuregulin 1 in neural development, synaptic plasticity and schizophrenia. *Nat Rev Neurosci* 9 (6), S. 437–452. DOI: 10.1038/nrn2392.
- Meyer, D.; Birchmeier, C. (1995): Multiple essential functions of neuregulin in development. *Nature* 378 (6555), S. 386–390. DOI: 10.1038/378386a0.
- Millar, J. K.; Wilson-Annan, J. C.; Anderson, S.; Christie, S.; Taylor, M. S.; Semple, C. A.; Devon, R. S.; St Clair, D. M.; Muir, W. J.; Blackwood, D. H. et al. (2000): Disruption of two novel genes by a translocation co-segregating with schizophrenia. *Hum Mol Genet* 9 (9), S. 1415–1423. DOI: 10.1093/hmg/9.9.1415.
- Mitchell, A. C.; Jiang, Y.; Peter, C.; Akbarian, S. (2015): Transcriptional regulation of GAD1 GABA synthesis gene in the prefrontal cortex of subjects with schizophrenia. *Schizophrenia Research* 167 (1-3), S. 28–34. DOI: 10.1016/j.schres.2014.10.020.
- Mostaid, M. Shaki; Lloyd, D.; Liberg, B.; Sundram, S.; Pereira, A.; Pantelis, C.; Karl, T.; Weickert, C. Shannon; Everall, I. P.; Bousman, C. A. (2016): Neuregulin-1 and schizophrenia in the genome-wide association study era. *Neuroscience and biobehavioral reviews* 68, S. 387–409. DOI: 10.1016/j.neubiorev.2016.06.001.
- Ng, M. Y. M.; Levinson, D. F.; Faraone, S. V.; Suarez, B. K.; DeLisi, L. E.; Arinami, T.; Riley, B.; Paunio, T.; Pulver, A. E.; Irmansyah et al. (2009): Meta-analysis of 32 genome-wide linkage studies of schizophrenia. *Mol Psychiatry* 14 (8), S. 774–785. DOI: 10.1038/mp.2008.135.
- Nicodemus, K. K.; Callicott, J. H.; Higier, R. G.; Luna, A.; Nixon, D. C.; Lipska, B. K.; Vakkalanka, R.; Giegling, I.; Rujescu, D.; St Clair, D. et al. (2010): Evidence of statistical epistasis between DISC1, CIT and NDEL1 impacting risk for schizophrenia: biological validation with functional neuroimaging. *Hum Genet* 127 (4), S. 441–452. DOI: 10.1007/s00439-009-0782-y.

- Nicodemus, K. K.; Law, A. J.; Luna, A.; Vakkalanka, R.; Straub, R. E.; Kleinman, J. E.; Weinberger, D. R. (2009): A 5' promoter region SNP in NRG1 is associated with schizophrenia risk and type III isoform expression. *Molecular psychiatry* 14 (8), S. 741–743. DOI: 10.1038/mp.2008.150.
- Noctor, S. C.; Martínez-Cerdeño, V.; Ivic, L.; Kriegstein, A. R. (2004): Cortical neurons arise in symmetric and asymmetric division zones and migrate through specific phases. *Nat Neurosci* 7 (2), S. 136–144. DOI: 10.1038/nn1172.
- Ohtaka-Maruyama, C. (2020): Subplate Neurons as an Organizer of Mammalian Neocortical Development. *Front. Neuroanat.* 14, S. 8. DOI: 10.3389/fnana.2020.00008.
- O'Tuathaigh, C. M. P.; Desbonnet, L.; Waddington, J. L. (2014): Genetically modified mice related to schizophrenia and other psychoses: seeking phenotypic insights into the pathobiology and treatment of negative symptoms. *European neuropsychopharmacology : the journal of the European College of Neuropsychopharmacology* 24 (5), S. 800–821. DOI: 10.1016/j.euroneuro.2013.08.009.
- Owen, M. J.; Legge, S. E.; Rees, E.; Walters, J. T. R.; O'Donovan, M. C. (2023): Genomic findings in schizophrenia and their implications. *Mol Psychiatry*, S. 1–10. DOI: 10.1038/s41380-023-02293-8.
- Owen, M. J.; Sawa, A.; Mortensen, P. B. (2016): Schizophrenia. *The Lancet* 388 (10039), S. 86–97. DOI: 10.1016/S0140-6736(15)01121-6.
- Pardiñas, A. F.; Holmans, P.; Pocklington, A. J.; Escott-Price, V.; Ripke, S.; Carrera, N.; Legge, S. E.; Bishop, S.; Cameron, D.; Hamshere, M. L. et al. (2018): Common schizophrenia alleles are enriched in mutation-intolerant genes and in regions under strong background selection. *Nat Genet* 50 (3), S. 381–389. DOI: 10.1038/s41588-018-0059-2.
- Regidor, J.; Edvinsson, L.; Divac, I. (1993): NOS neurones lie near branchings of cortical arterioles. *Neuroreport* 4 (1), S. 112–114. DOI: 10.1097/00001756-199301000-00030.
- Reiner, O.; Carrozzo, R.; Shen, Y.; Wehnert, M.; Faustinella, F.; Dobyns, W. B.; Caskey, C. T.; Ledbetter, D. H. (1993): Isolation of a Miller-Dieker lissencephaly gene containing G protein beta-subunit-like repeats. *Nature* 364 (6439), S. 717–721. DOI: 10.1038/364717a0.
- Reynolds, G. P.; Beasley, C. L.; Zhang, Z. J. (2002): Understanding the neurotransmitter pathology of schizophrenia: selective deficits of subtypes of cortical GABAergic neurons. *Journal of neural transmission (Vienna, Austria : 1996)* 109 (5-6), S. 881–889. DOI: 10.1007/s007020200072.
- Ruan, X.; Kang, B.; Qi, C.; Lin, W.; Wang, J.; Zhang, X. (2021): Progenitor cell diversity in the developing mouse neocortex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 118 (10). DOI: 10.1073/pnas.2018866118.
- Salaun, C.; Takizawa, H.; Galindo, A.; Munro, K. R.; McLellan, J.; Sugimoto, I.; Okino, T.; Tomkinson, N. C. O.; Chamberlain, L. H. (2022): Development of a novel high-throughput screen for the identification of new inhibitors of protein S-acylation. *The Journal of Biological Chemistry* 298 (10), S. 102469. DOI: 10.1016/j.jbc.2022.102469.

- Sanders, S. S.; Martin, D. D. O.; Butland, S. L.; Lavallée-Adam, M.; Calzolari, D.; Kay, C.; Yates, J. R.; Hayden, M. R. (2015): Curation of the Mammalian Palmitoylome Indicates a Pivotal Role for Palmitoylation in Diseases and Disorders of the Nervous System and Cancers. *PLoS computational biology* 11 (8), e1004405. DOI: 10.1371/journal.pcbi.1004405.
- Sasaki, S.; Mori, D.; Toyo-oka, K.; Chen, A.; Garrett-Beal, L.; Muramatsu, M.; Miyagawa, S.; Hiraiwa, N.; Yoshiki, A.; Wynshaw-Boris, A. et al. (2005): Complete loss of Ndel1 results in neuronal migration defects and early embryonic lethality. *Molecular and Cellular Biology* 25 (17), S. 7812–7827. DOI: 10.1128/MCB.25.17.7812-7827.2005.
- Schindelin, J.; Arganda-Carreras, I.; Frise, E.; Kaynig, V.; Longair, M.; Pietzsch, T.; Preibisch, S.; Rueden, C.; Saalfeld, S.; Schmid, B. et al. (2012): Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nature methods* 9 (7), S. 676–682. DOI: 10.1038/nmeth.2019.
- Schizophrenia Working Group of the Psychiatric Genomics Consortium (2014): Biological insights from 108 schizophrenia-associated genetic loci. *Nature* 511 (7510), S. 421–427. DOI: 10.1038/nature13595.
- Sedmak, G.; Judaš, M. (2021): White Matter Interstitial Neurons in the Adult Human Brain: 3% of Cortical Neurons in Quest for Recognition. *Cells* 10 (1). DOI: 10.3390/cells10010190.
- Sekar, A.; Bialas, A. R.; Rivera, H. de; Davis, A.; Hammond, T. R.; Kamitaki, N.; Tooley, K.; Presumey, J.; Baum, M.; van Doren, V. et al. (2016): Schizophrenia risk from complex variation of complement component 4. *Nature* 530 (7589), S. 177–183. DOI: 10.1038/nature16549.
- Selemon, L. D.; Rajkowska, G.; Goldman-Rakic, P. S. (1998): Elevated neuronal density in prefrontal area 46 in brains from schizophrenic patients: Application of a three-dimensional, stereologic counting method. *Journal of Comparative Neurology* 392 (3), S. 402–412. DOI: 10.1002/(SICI)1096-9861(19980316)392:3<402::AID-CNE9>3.0.CO;2-5.
- Shlosberg, D.; Buskila, Y.; Abu-Ghanem, Y.; Amitai, Y. (2012): Spatiotemporal alterations of cortical network activity by selective loss of NOS-expressing interneurons. *Frontiers in neural circuits* 6, S. 3. DOI: 10.3389/fncir.2012.00003.
- Shmueli, A.; Segal, M.; Sapir, T.; Tsutsumi, R.; Noritake, J.; Bar, A.; Sapoznik, S.; Fukata, Y.; Orr, I.; Fukata, M. et al. (2010): Ndel1 palmitoylation: a new mean to regulate cytoplasmic dynein activity. *The EMBO journal* 29 (1), S. 107–119. DOI: 10.1038/emboj.2009.325.
- Shu, T.; Ayala, R.; Nguyen, M.-D.; Xie, Z.; Gleeson, J. G.; Tsai, L.-H. (2004): Ndel1 operates in a common pathway with LIS1 and cytoplasmic dynein to regulate cortical neuronal positioning. *Neuron* 44 (2), S. 263–277. DOI: 10.1016/j.neuron.2004.09.030.
- Singh, T.; Kurki, M. I.; Curtis, D.; Purcell, S. M.; Crooks, L.; McRae, J.; Suvisaari, J.; Chheda, H.; Blackwood, D.; Breen, G. et al. (2016): Rare loss-of-function variants in SETD1A are associated with schizophrenia and developmental disorders. *Nat Neurosci* 19 (4), S. 571–577. DOI: 10.1038/nn.4267.

- Singh, T.; Poterba, T.; Curtis, D.; Akil, H.; Al Eissa, M.; Barchas, J. D.; Bass, N.; Bigdeli, T. B.; Breen, G.; Bromet, E. J. et al. (2022): Rare coding variants in ten genes confer substantial risk for schizophrenia. *Nature* 604 (7906), S. 509–516. DOI: 10.1038/s41586-022-04556-w.
- Soares, D. C.; Carlyle, B. C.; Bradshaw, N. J.; Porteous, D. J. (2011): DISC1: Structure, Function, and Therapeutic Potential for Major Mental Illness. *ACS Chemical Neuroscience* 2 (11), S. 609–632. DOI: 10.1021/cn200062k.
- Sprooten, E.; Lymer, G. K. S.; Muñoz Maniega, S.; McKirdy, J.; Clayden, J. D.; Bastin, M. E.; Porteous, D.; Johnstone, E. C.; Lawrie, S. M.; Hall, J. et al. (2009): The relationship of anterior thalamic radiation integrity to psychosis risk associated neuregulin-1 variants. *Molecular psychiatry* 14 (3), 237-8, 233. DOI: 10.1038/mp.2008.136.
- St Clair, D.; Blackwood, D.; Muir, W.; Carothers, A.; Walker, M.; Spowart, G.; Gosden, C.; Evans, H. J. (1990): Association within a family of a balanced autosomal translocation with major mental illness. *The Lancet* 336 (8706), S. 13–16. DOI: 10.1016/0140-6736(90)91520-K.
- Stefansson, H.; Sigurdsson, E.; Steinthorsdottir, V.; Bjornsdottir, S.; Sigmundsson, T.; Ghosh, S.; Brynjolfsson, J.; Gunnarsdottir, S.; Ivarsson, O.; Chou, T. T. et al. (2002): Neuregulin 1 and susceptibility to schizophrenia. *American journal of human genetics* 71 (4), S. 877–892. DOI: 10.1086/342734.
- Tabata, H.; Nakajima, K. (2003): Multipolar migration: the third mode of radial neuronal migration in the developing cerebral cortex. *J. Neurosci.* 23 (31), S. 9996–10001. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.23-31-09996.2003.
- Takahashi, Y.; Liang, X.; Hattori, T.; Tang, Z.; He, H.; Chen, H.; Liu, X.; Abraham, T.; Imamura-Kawasawa, Y.; Buchkovich, N. J. et al. (2019): VPS37A directs ESCRT recruitment for phagophore closure. *The Journal of cell biology* 218 (10), S. 3336–3354. DOI: 10.1083/jcb.201902170.
- Tamamaki, N.; Tomioka, R. (2010): Long-Range GABAergic Connections Distributed throughout the Neocortex and their Possible Function. *Front. Neurosci.* 4, S. 202. DOI: 10.3389/fnins.2010.00202.
- Tanaka, T.; Serneo, F. F.; Higgins, C.; Gambello, M. J.; Wynshaw-Boris, A.; Gleeson, J. G. (2004): Lis1 and doublecortin function with dynein to mediate coupling of the nucleus to the centrosome in neuronal migration. *The Journal of cell biology* 165 (5), S. 709–721. DOI: 10.1083/jcb.200309025.
- Taniguchi, H.; He, M.; Wu, P.; Kim, S.; Paik, R.; Sugino, K.; Kvitsiani, D.; Fu, Y.; Lu, J.; Lin, Y. et al. (2011): A resource of Cre driver lines for genetic targeting of GABAergic neurons in cerebral cortex. *Neuron* 71 (6), S. 995–1013. DOI: 10.1016/j.neuron.2011.07.026.
- The Network and Pathway Analysis Subgroup of the Psychiatric Genomics Consortium (2015): Psychiatric genome-wide association study analyses implicate neuronal, immune and histone pathways. *Nat Neurosci* 18 (2), S. 199–209. DOI: 10.1038/nn.3922.

- Theiler, Karl; Westphal, Heiner (1989): The house mouse. Atlas of embryonic development. 1st ed. 1989. New York, New York: Springer Science+Business Media, LLC.
- Tomppo, L.; Hennah, W.; Lahermo, P.; Loukola, A.; Tuulio-Henriksson, A.; Suvisaari, J.; Partonen, T.; Ekelund, J.; Lönnqvist, J.; Peltonen, L. (2009): Association between genes of Disrupted in schizophrenia 1 (DISC1) interactors and schizophrenia supports the role of the DISC1 pathway in the etiology of major mental illnesses. *Biological Psychiatry* 65 (12), S. 1055–1062. DOI: 10.1016/j.biopsych.2009.01.014.
- Trubetskoy, V.; Pardiñas, A. F.; Qi, T.; Panagiotaropoulou, G.; Awasthi, S.; Bigdeli, T. B.; Bryois, J.; Chen, C.-Y.; Dennison, C. A.; Hall, L. S. et al. (2022): Mapping genomic loci implicates genes and synaptic biology in schizophrenia. *Nature* 604 (7906), S. 502–508. DOI: 10.1038/s41586-022-04434-5.
- Tsai, L.-H.; Gleeson, J. G. (2005): Nucleokinesis in neuronal migration. *Neuron* 46 (3), S. 383–388. DOI: 10.1016/j.neuron.2005.04.013.
- Tueting, P.; Costa, E.; Dwivedi, Y.; Guidotti, A.; Impagnatiello, F.; Manev, R.; Pesold, C. (1999): The phenotypic characteristics of heterozygous reeler mouse. *Neuroreport* 10 (6), S. 1329–1334. DOI: 10.1097/00001756-199904260-00032.
- Uhlhaas, P. J.; Singer, W. (2010): Abnormal neural oscillations and synchrony in schizophrenia. *Nat Rev Neurosci* 11 (2), S. 100–113. DOI: 10.1038/nrn2774.
- van Haren, N. E. M.; Schnack, H. G.; Cahn, W.; van den Heuvel, M. P.; Lepage, C.; Collins, L.; Evans, A. C.; Hulshoff Pol, H. E.; Kahn, R. S. (2011): Changes in cortical thickness during the course of illness in schizophrenia. *Archives of general psychiatry* 68 (9), S. 871–880. DOI: 10.1001/archgenpsychiatry.2011.88.
- Vílchez-Acosta, A.; Manso, Y.; Cárdenas, A.; Elias-Tersa, A.; Martínez-Losa, M.; Pascual, M.; Álvarez-Dolado, M.; Nairn, A. C.; Borrell, V.; Soriano, E. (2022): Specific contribution of Reelin expressed by Cajal-Retzius cells or GABAergic interneurons to cortical lamination. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 119 (37), e2120079119. DOI: 10.1073/pnas.2120079119.
- Wagener, R. J.; Dávid, C.; Zhao, S.; Haas, C. A.; Staiger, J. F. (2010): The somatosensory cortex of reeler mutant mice shows absent layering but intact formation and behavioral activation of columnar somatotopic maps. *J. Neurosci.* 30 (46), S. 15700–15709. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.3707-10.2010.
- Wagstyl, K.; Ronan, L.; Whitaker, K. J.; Goodyer, I. M.; Roberts, N.; Crow, T. J.; Fletcher, P. C. (2016): Multiple markers of cortical morphology reveal evidence of supragranular thinning in schizophrenia. *Transl Psychiatry* 6 (4), e780. DOI: 10.1038/tp.2016.43.
- Wang, Q.; Brandon, N. J. (2011): Regulation of the cytoskeleton by Disrupted-in-schizophrenia 1 (DISC1). *Molecular and cellular neurosciences* 48 (4), S. 359–364. DOI: 10.1016/j.mcn.2011.06.004.

- Wang, Q.; Chen, R.; Cheng, F.; Wei, Q.; Ji, Y.; Yang, H.; Zhong, X.; Tao, R.; Wen, Z.; Sutcliffe, J. S. et al. (2019): A Bayesian framework that integrates multi-omics data and gene networks predicts risk genes from schizophrenia GWAS data. *Nat Neurosci* 22 (5), S. 691–699. DOI: 10.1038/s41593-019-0382-7.
- Weickert, C. S.; Tiwari, Y.; Schofield, P. R.; Mowry, B. J.; Fullerton, J. M. (2012): Schizophrenia-associated HapICE haplotype is associated with increased NRG1 type III expression and high nucleotide diversity. *Translational psychiatry* 2 (4), e104. DOI: 10.1038/tp.2012.25.
- Weinberger, D. R. (1987): Implications of normal brain development for the pathogenesis of schizophrenia. *Archives of general psychiatry* 44 (7), S. 660–669. DOI: 10.1001/archpsyc.1987.01800190080012.
- Weinberger, Daniel R.; Harrison, Paul J.; Weinberger, Daniel Roy; Harrison, P. J. (Hg.) (2011): Schizophrenia. 3. ed. Chichester: Wiley-Blackwell.
- Wickham, Hadley (2016): ggplot2. Elegant graphics for data analysis. Unter Mitarbeit von Carson Sievert. Second edition. Cham: Springer international publishing (Use R!). Online verfügbar unter <https://ebookcentral.proquest.com/lib/kxp/detail.action?docID=4546676>.
- Woodward, N. D.; Karbasforoushan, H.; Heckers, S. (2012): Thalamocortical dysconnectivity in schizophrenia. *The American journal of psychiatry* 169 (10), S. 1092–1099. DOI: 10.1176/appi.ajp.2012.12010056.
- Woolfrey, K. M.; Sanderson, J. L.; Dell'Acqua, M. L. (2015): The palmitoyl acyltransferase DHHC2 regulates recycling endosome exocytosis and synaptic potentiation through palmitoylation of AKAP79/150. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 35 (2), S. 442–456. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.2243-14.2015.
- Wu, Z.; Irizarry, R. A.; Gentleman, R.; Martinez-Murillo, F.; Spencer, F. (2004): A Model-Based Background Adjustment for Oligonucleotide Expression Arrays. *Journal of the American Statistical Association* 99 (468), S. 909–917. DOI: 10.1198/016214504000000683.
- Yao, Z.; van Velthoven, C. T. J.; Nguyen, T. Nghi; Goldy, J.; Seden-Cortes, A. E.; Baftizadeh, F.; Bertagnolli, D.; Casper, T.; Chiang, M.; Crichton, K. et al. (2021): A taxonomy of transcriptomic cell types across the isocortex and hippocampal formation. *Cell* 184 (12), 3222–3241.e26. DOI: 10.1016/j.cell.2021.04.021.
- Yau, H.-J.; Wang, H.-F.; Lai, C.; Liu, F.-C. (2003): Neural development of the neuregulin receptor ErbB4 in the cerebral cortex and the hippocampus: preferential expression by interneurons tangentially migrating from the ganglionic eminences. *Cereb Cortex* 13 (3), S. 252–264. DOI: 10.1093/cercor/13.3.252.
- Yin, D.-M.; Chen, Y.-J.; Lu, Y.-S.; Bean, J. C.; Sathyamurthy, A.; Shen, C.; Liu, X.; Lin, T. W.; Smith, C. A.; Xiong, W.-C. et al. (2013): Reversal of behavioral deficits and synaptic dysfunction in mice overexpressing neuregulin 1. *Neuron* 78 (4), S. 644–657. DOI: 10.1016/j.neuron.2013.03.028.

- Yoneshima, H.; Yamasaki, S.; Voelker, C. C. J.; Molnár, Z.; Christophe, E.; Audinat, E.; Takemoto, M.; Nishiwaki, M.; Tsuji, S.; Fujita, I. et al. (2006): Er81 is expressed in a subpopulation of layer 5 neurons in rodent and primate neocortices. *Neuroscience* 137 (2), S. 401–412. DOI: 10.1016/j.neuroscience.2005.08.075.
- Youn, Y. Ha; Pramparo, T.; Hirotsune, S.; Wynshaw-Boris, A. (2009): Distinct dose-dependent cortical neuronal migration and neurite extension defects in Lis1 and Ndel1 mutant mice. *J. Neurosci.* 29 (49), S. 15520–15530. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.4630-09.2009.
- Young, K. A.; Manaye, K. F.; Liang, C.; Hicks, P. B.; German, D. C. (2000): Reduced number of mediodorsal and anterior thalamic neurons in schizophrenia. *Biological Psychiatry* 47 (11), S. 944–953. DOI: 10.1016/s0006-3223(00)00826-x.