
FORSCHUNGSANTRAG

KRAFFT STIFTUNG

ENTSCHLÜSSELUNG DER PATHOPHYSIOLOGIE DER
BIPOLAREN STÖRUNG

DER EINFLUSS SELTENER GENETISCHER
VARIANTEN AUF NEURONALE UND ASTROZYTÄRE
ZELLMODELLE

**PROF. DR. DR.
EVA-CHRISTINA SCHULTE**

ABTEILUNG FÜR PSYCHIATRISCHE GENOMIK
KLINIK & POLIKLINIK FÜR PSYCHIATRIE
RHEINISCHE FRIEDRICH-WILHELMS-UNIVERSITÄT BONN

Kurzzusammenfassung für Nicht-WissenschaftlerInnen

Die **bipolare Störung** ist eine schwere psychische Erkrankung, die Schwankungen zwischen manischen und depressiven Zuständen sowie teilweise auch psychotische Symptome wie z.B. Wahnvorstellungen verursacht. Etwa 1% der Weltbevölkerung sind betroffen, und sie tritt häufig im frühen Erwachsenenalter erstmals auf und bleibt dann lebenslang bestehen. Vererbung spielt in der Entstehung der Erkrankung eine wichtige Rolle, die **Vererbarkeit** ist mit 60 bis 80% eine der höchsten unter den psychischen Erkrankungen des Erwachsenenalters. Jüngst konnten in neuen, sehr groß angelegten Studien **selten genetische Veränderungen identifizieren**, die mit der bipolaren Störung in Zusammenhang stehen. Obwohl diese genetischen Veränderungen insgesamt selten sind, haben sie sehr starke Effekte und können daher **genutzt werden, um die biologischen Grundlagen der Erkrankung zu erforschen**. In dem hier zur Förderung vorgeschlagenen Projekt sollen 33 Gene, die die in der Studie identifizierten Veränderungen tragen, in ihrer Funktion genauer untersucht werden. Hierzu werden wir modernste Methoden verwenden, um **diese Gene in menschlichen Gehirnzellen zu deaktivieren**. In einem zweiten Schritt können wird dann analysiert, wie genau sich diese Deaktivierung, die das Szenario in PatientInnen mit diesen genetischen Veränderungen rekapituliert, **auf die Zellen und ihre Funktionsfähigkeit auswirkt**. Über diesen Forschungsansatz hoffen wir, mehr über die Ursache der bipolaren Störung zu lernen und so den **Weg zu effizienteren und präziseren Therapiemöglichkeiten zu ebnen**.

Executive Summary

Die **bipolare Störung** ist eine schwere psychische Störung, die durch eine Kombination von depressiven, (hypo)manischen und in unterschiedlichem Maße psychotischen Symptomen (z. B. Wahnvorstellungen) gekennzeichnet ist. Weltweit wird die Lebenszeitprävalenz mit etwa 1% angegeben. Da die bipolare Störung in der Regel in der Jugend oder im frühen Erwachsenenalter beginnt und in den meisten Fällen einen chronischen Verlauf nimmt, ist die **daraus resultierende Krankheitslast groß**. Weltweit trägt die bipolare Störung zu etwa 9 Millionen Lebensjahren mit Behinderung bei. Nicht selten sind auch besonders leistungsfähige Personen von dieser Erkrankung betroffen, da diese mit einem steten Wechsel zwischen Phasen großer Energie, Kreativität und Leistungsfähigkeit (i.e. manischen Phasen) und Phasen mit wenig Energie und Antrieb und reduzierter Stimmung (i.e. depressiven Phasen) einhergeht.

Genetische Veranlagung spielt eine wichtige Rolle in der Entstehung der Erkrankung. Die Erbllichkeit von etwa 60 bis 80 % gehört zu den höchsten aller psychischen Störungen des Erwachsenenalters. In den letzten zehn Jahren wurden in sogenannten genomweiten Assoziationsstudien zahlreiche häufige genetische Varianten identifiziert, die mit einem erhöhten Risiko für eine bipolare Störung einhergehen. Kürzlich wurden in einer großen Studie des Bipolar Exome Sequencing Consortium (BipEx) Exom-Sequenzierungsdaten von 13 933 PatientInnen mit einer bipolaren Störung und 14 422 Kontrollen meta-analysiert. Hierbei fand sich **in 33 Genen ein Überschuss an seltenen genetischen Varianten, die mit einem Verlust der Proteinfunktion einhergehen**, bei Menschen mit einer bipolaren Störung im Vergleich zu Kontrollprobanden. In Verbindung mit früheren Arbeiten deutet diese Studie darauf hin, dass (sehr) seltene genetische Varianten einen wichtigen Beitrag zur Entstehung der bipolaren Störung leisten, dass aber ihre Rolle bisher nur unvollständig verstanden ist. Die Bedeutung seltener Varianten liegt dabei nicht nur in einer Vervollständigung unseres Verständnisses der genetischen Architektur der Erkrankung, sondern viel mehr noch im Potenzial, das krankheitsassoziierte seltene Varianten mit starken molekularen Effekten bieten, um die Pathophysiologie der Erkrankung besser zu verstehen.

In dem hier vorgeschlagenen Projekt wollen wir **den Beitrag der 33 identifizierten Gene zur Pathophysiologie der bipolaren Erkrankung verstehen**. Wir werden einen **CRISPR/Cas9-basierten Loss-of-Function-Screening-Ansatz** verwenden, um die **33 Gene in aus menschlichen induzierten pluripotenten Stammzellen (iPSCs) gewonnenen Neuronen und Astrozyten auszuschalten**. Einzelne „Knock-outs“ werden durch lentivirale Transduktion von dualen Guide-RNAs und Cas9 in iPSCs erreicht, in denen eine Differenzierung in Neurone und Astrozyten induzierbar ist. Hieraus können **mittels Einzelzell-RNA-Sequenzierung (scRNAseq) dysregulierte Signalwege identifiziert** werden, die relevant für den Funktionsverlust jedes der 33 Gene und damit für die bipolare Störung sind. Es werden zelltypspezifische Signalweg-Aberrationen identifiziert, und die beiden am stärksten veränderten und wahrscheinlich relevanten Gene und abhängigen Signalwege werden wir **in unabhängigen Einzelgen-Knock-outs in relevanten Zelltypen validiert**, analog zum oben beschriebenen Arbeitsablauf aber auch unter Zuhilfenahme weiterer molekularbiologischer Techniken zur Analyse der **RNA- und Proteinexpressionsmuster**.

Durch das hier beschriebene Projekt werden wir zum Verständnis der Rolle von Genen mit seltenen Varianten mit großen Effektstärken in der Pathophysiologie der bipolaren Störung beitragen. Da diese Pathophysiologie derzeit nur unvollständig verstanden ist, birgt dies ein großes Potenzial für das **Verständnis der Wirkmechanismen bestehender sowie die Erschließung neuer, dringend benötigter Behandlungsansätze**.

1 Fragestellung

Die bipolare Störung, eine schwere psychische Störung, die bei etwa 1 % der Bevölkerung vorkommt (1), weist eine hohe Erblichkeit von etwa 67 % auf (2). Während in den letzten zehn Jahren große Fortschritte im Hinblick auf unser Verständnis des Beitrags häufiger genetischer Varianten, die das individuelle Risiko für schwere psychische Störungen wie die bipolare Störung erhöhen, erzielt wurden, konnten bisher weit weniger seltene genetische Varianten robust mit der Pathogenese der Erkrankung in Verbindung gebracht werden. **Seltene Varianten weisen jedoch meist deutlich größere Effektstärken auf und können daher einen effizienteren Weg zum Verständnis der molekularen Veränderungen**, die bei der Erkrankung eine entscheidende Rolle spielen, bieten, als assoziierte häufige genetische Varianten, die lediglich das Risiko zu erkranken um wenige Prozentpunkte erhöhen.

Induzierte pluripotente Stammzellen (iPSCs) bieten seit einigen Jahren die herausragende Möglichkeit, unterschiedliche, ansonsten schwer beschaffbare Zellen des Zentralnervensystems (ZNS) zu generieren. Zudem können diese genetisch manipuliert werden. In dem hier vorgeschlagenen Projekt werden wir diese eindeutigen Vorteile von **induzierten Zellen (sog. „iCells“) und einen neuartigen genetischen Screening-Ansatz nutzen, um den molekularen Zusammenhang zwischen kürzlich beschriebenen Genen mit seltenen genetischen Varianten, welche im Zusammenhang mit der bipolaren Störung stehen, zu verstehen**. Im Einzelnen werden wir folgende Fragen beantworten: **i)** Welche Expressionsveränderungen verursacht der Funktionsverlust („knock out“) von Risikogenen für die bipolare Störung, **ii)** welche Signalwegaberrationen sind mit den identifizierten Expressionsveränderungen verbunden und **iii)** sind bestimmte Zelltypen wie Neuronen, neuronale Vorläuferzellen, oder Astrozyten von den Veränderungen der Signalwege besonders betroffen. Dabei werden wir die Frage beantworten, welche Veränderungen in der RNA-Expression aus einem Funktionsverlust dieser „bipolaren Gene“ in induzierten Zellen des ZNS resultieren.

2 Stand der Forschung

Bei der bipolaren Störung handelt es sich um eine schwere psychische Störung, die durch eine Kombination aus depressiven, (hypo-)manischen und - in unterschiedlichem Ausmaß - psychotischen Symptomen gekennzeichnet ist. Weltweit wird die Lebenszeitprävalenz mit etwa 1 % angegeben (3). Da die Erkrankung typischerweise in der späten Jugend oder im frühen Erwachsenenalter beginnt und in den meisten Fällen chronisch verläuft, ist die resultierende Krankheitslast groß. Weltweit trägt die bipolare Störung zu mehr als 9 Millionen Lebensjahren mit Behinderungen bei (3). Neben der erhöhten Krankheitslast ist auch die multifaktorielle Sterblichkeit bei Patienten mit einer bipolaren Störung erhöht, wobei die Lebenserwartung im Vergleich zur Allgemeinbevölkerung um etwa 9 Jahre sinkt (4). Zu den derzeitigen klinischen Behandlungsstrategien gehört vor allem die Behandlung mit Stimmungsstabilisatoren und Antipsychotika. Bei etwa 30 % der Menschen mit einer bipolaren Störung ist die Symptomkontrolle jedoch auch unter dieser Therapie unzureichend (5). Die allgemeinen Wirkmechanismen der pharmakologischen Behandlung haben sich seit mehreren Jahrzehnten nicht wesentlich verändert. Darüber hinaus fehlt bei vielen der zur Behandlung der bipolaren Störung eingesetzten Medikamente immer noch ein tiefgreifendes Verständnis des Wirkmechanismus. Einer der Gründe dafür ist die Tatsache, dass unser derzeitiges Verständnis der Pathomechanismen, die der bipolaren Störung an sich zugrunde liegen, immer noch unzureichend ist. Dies ist zum Teil darauf zurückzuführen, dass es an geeigneten menschlichen Modellsystemen, um die molekularen Grundlagen zu erforschen, fehlt. Ein besseres Verständnis der zugrundeliegenden pathophysiologischen Veränderungen bei der bipolaren Störung ist daher für die Verbesserung der Patientenversorgung von entscheidender Bedeutung.

Die genetische Veranlagung spielt eine wichtige Rolle bei der Entwicklung der bipolaren Störung (BPD). Die geschätzte Erbllichkeit von rund 67 % (2) gehört zu den höchsten aller psychischen Störungen im Erwachsenenalter. Die genetische Architektur der bipolaren Störung ist jedoch komplex. Trotz früherer kontroverser Berichte (6-9) ist es wahrscheinlich, dass Varianten, die in das gesamte Häufigkeitsspektrum von häufig (hier definiert als eine Minor-Allel-Frequenz (MAF) von $> 1\%$) bis hin zu extrem seltenen Varianten (MAF $< 0,1\%$) fallen, zur genetischen Architektur beitragen (10). Genomweite Assoziationsstudien (GWAS) sind essentiell darin, den Beitrag häufiger genetischer Varianten zum Risiko für BPD zu entschlüsseln (11-13). In den letzten zehn Jahren waren hier unter anderem die vom weltweit tätigen Psychiatric Genomics Consortium (PGC) durchgeführten Studien wegweisend (11,12), die erfolgreich häufige Varianten mit dem BPD-Risiko in Zusammenhang bringen konnten. So konnten in der jüngsten GWAS, in der 158.036 Fälle und 2,8 Millionen Kontrollen ausgewertet wurden, 298 verschiedene genomische Loci identifiziert werden (12). Die berichteten häufigen genetischen Varianten erklären etwa 5,8 % bis 9,0% des Gesamtrisikos für BPD und rund 22 % der auf Einzelnukleotid-Polymorphismen (SNPs) beruhenden Heritabilität (12). Darüber hinaus wurden häufige genetische Varianten beschrieben, die mit dem Ansprechen auf Lithium, dem wichtigsten Stimmungsstabilisator zur Behandlung der BPD, in Verbindung gebracht wurden, auch wenn diese bis dato meist (noch) nicht repliziert werden konnten (14-17, 54). Die ständig zunehmenden massiven Forschungsanstrengungen im Rahmen von GWAS durch das PGC und andere werden in den nächsten Jahren weitere häufige genetische Varianten identifizieren, die mit BPD oder BPD-Subphänotypen assoziiert sind. Es ist jedoch davon auszugehen, dass auch andere Formen der genetischen Variation, die nicht durch GWAS erfasst werden, zur genetischen Architektur der BPD beitragen. Diese sind durch die stärkeren vermittelten Effekte in einer potenziell noch besseren Position, um zu unserem immer noch fragmentierten Verständnis der zugrunde liegenden molekularen Pathophysiologie der Erkrankung beizutragen.

Seltene genetische Varianten (hier definiert als Varianten mit einer MAF $< 1\%$) beherbergen einen Teil der "fehlenden Heritabilität", die bis heute nicht vollständig durch GWAS erfasst wird (10). Zu den seltenen genetischen Varianten, die für die BPD relevant sind, gehören wahrscheinlich sowohl Einzelnukleotidvarianten (SNVs), die nur eine einzige oder eine geringe Anzahl von DNA-Basen betreffen, als auch Insertions-Deletions-Varianten, die in ihrer Größe von einzelnen Nukleotiden bis hin zu Varianten reichen, die Tausende oder Millionen von Basen betreffen und die als Kopienzahlvarianten (CNVs) bezeichnet werden. In der bisher größten veröffentlichten Studie, die 6.353 Personen mit einer BPD-Spektrum-Diagnose und 8.656 Kontrollpersonen umfasste, wurde ein gehäuftes Auftreten von großen CNVs nur mit dem schizoaffektiven Subtyp der BPD in Verbindung gebracht. Bisher wurden keine spezifischen CNVs identifiziert, die mit BPD assoziiert sind (18). Studien über die Rolle seltener SNVs bei BPD haben vielfach widersprüchliche Ergebnisse erbracht, wobei einige auf spezifische mit BPD assoziierte Varianten oder eine erhöhte Belastung in bestimmten Signalwegen hinweisen, während andere keine Hinweise auf eine Rolle seltener SNVs bei BPD sehen (6-9). Alle diese Studien hatten das Problem, dass sie nur kleine Stichproben umfassten, in der Regel nur Hunderte bis einige Tausend, und in den meisten Fällen fehlte eine unabhängige Replikation.

Kürzlich hat jedoch eine große Assoziationsstudie für seltene Varianten („rare variant association study“ oder RVAS) des Bipolar Exome Sequencing Consortium (BipEx) versucht, diese Diskrepanzen aufzulösen. In dieser Studie wurden Exomsequenzierungsdaten („whole exome sequencing“ oder WES) von 13.933 BPD-Fällen und 14.422 Kontrollen metaanalysiert. Dabei wurde ein Überschuss an extrem seltenen proteintrunkierenden (PTV) Varianten in Genen mit hoher evolutionärer Konservierung festgestellt (10). Angesichts der bekannten genetischen Überschneidungen zwischen BPD und der Schizophrenie (19) überrascht es zudem

nicht, dass auch bei BPD-Patienten eine Anreicherung von ultraseltenen PTVs festzustellen ist, die in einer kürzlich durchgeführten groß angelegten RVAS des SCHEMA-Konsortiums (24.248 Schizophreniefälle und 97.322 Kontrollen) (20) mit der Schizophrenie in Verbindung gebracht werden konnten. Darüber hinaus ergab die Metaanalyse der BipEx WES und der SCHEMA WES auf Genebene, dass seltene Varianten in *AKAP11* ein definitives Risiko für beide Erkrankungen darstellen ($p=2,83 \times 10^{-9}$; Odds Ratio (OR) = 7,06). Neben *AKAP11* erreichten weitere Gene ein suggestives Evidenzniveau für einen Überschuss an sehr seltenen SNVs bei BPD (10). Interessanterweise gab es, anders als bei vielen anderen häufigen und komplexen genetischen Störungen, keine Anreicherung von sehr seltenen SNVs in Genen an bekannten GWAS Loci (10). Dies könnte entweder auf fehlende statistische Power oder auf Unterschiede in den mit seltene bzw. häufige genetische Varianten vergesellschafteten molekularen Veränderungen hinweisen.

Insgesamt deuten diese Ergebnisse darauf hin, dass (sehr) seltene Varianten einen wichtigen Beitrag zur Entstehung der BPD leisten, dass ihre Rolle hierbei aber im Detail noch nicht verstanden ist. Die große Bedeutung von seltene genetischen Varianten liegt jedoch nicht nur in ihrem Beitrag zu einem umfassenderen Bild der genetischen Architektur komplex-genetischer Erkrankungen wie der BPD, sondern viel mehr noch in dem Potenzial, das krankheitsassoziierte seltene Varianten für ein besseres Verständnis der Pathophysiologie der Krankheit bieten. Es konnte vielfach gezeigt werden, dass seltene Varianten aufgrund der negativen Selektion (engl. „purifying selection“) größere Effektstärken und somit größere Auswirkungen auf bestimmte Krankheitsphänotyp haben als häufige Varianten (21-24). Dementsprechend eignen sie sich viel besser für funktionelle Follow-up-Analysen, die darauf abzielen, die der Krankheitsentwicklung zugrunde liegenden molekularen Mechanismen zu untersuchen (25). Für häufige genetische Varianten ist dies oft schwierig, nicht zuletzt da aufgrund der geringen Effektstärken molekulare Auswirkungen oftmals nur gering und daher schwer nachzuweisen sind. Bei psychischen Störungen wie der BPD stellt unser unzureichendes Verständnis der genauen pathophysiologischen Prozesse das größte Hindernis für die Entwicklung neuer und im Idealfall effizienterer Behandlungsstrategien dar. Seltene Varianten könnten eine entscheidende Rolle bei der Überbrückung dieser Lücke spielen.

Humane iCells erlauben ein einzigartiges Fenster in die Pathophysiologie schwerer psychischer Störungen wie BPD, da der Zugang zu menschlichem Hirngewebe ansonsten sehr begrenzt ist. iCells—z.B. iNeurone oder iAstrozyten—werden aus von Einzelpersonen stammenden induzierten pluripotenten Stammzellen gewonnen. Dies geschieht z.B. durch Isolierung mononukleärer Zellen aus dem peripheren Blut (PBMCs) und Reprogrammierung zu iPSC. Diese Zellen können dann zur Differenzierung von diversen Zelltypen des Gehirns aber auch vieler anderer Zellen des menschlichen Körpers von Hepatozyten der Leber bis zu Alveolozyten der Lunge verwendet werden. Auch komplexere gewebeähnliche Strukturen aus verschiedenen Zelltypen mit großer Ähnlichkeit mit menschlichen Organen im Sinne von sog. Organoiden sind möglich, haben jedoch aktuell noch den großen Nachteil sehr heterogen und deutlich schlechter vergleichbar als Monokulturen und für Hochdurchsatzanalysen weniger geeignet zu sein (26).

Daher ist es für Hochdurchsatzverfahren, wie das unten beschriebene, momentan noch zielführender sich die zahlreichen verschiedenen Zelltypen des Zentralnervensystems, die mit Hilfe etablierter Protokolle *in vitro* aus hiPSCs rekapituliert werden können, zu nutzen. Dazu gehören unter anderem glutamaterge, GABA-erge, dopaminerge und serotonerge Neurone sowie Astrozyten, Mikroglia und Oligodendrozyten (26). Zwar werden derzeit große Fortschritte bei der Identifizierung krankheitsrelevanter Zelltypen für psychische Störungen erzielt, z. B. durch die Verwendung von Ansätzen zur Bestimmung von quantitativen Expressionsmerkmalen (eQTLs) und der Einzelzellsequenzierung (scRNASeq) in

Gehirngewebe, doch sind in vielen Fällen die relevantesten Zelltypen und Entwicklungsstadien noch nicht vollständig geklärt (27).

Im Bereich der bipolaren Störung konnten solche induzierten Zellmodelle bereits erfolgreich eingesetzt werden. So konnte z.B. schon früh in iNeuronen von PatientInnen mit BPD gezeigt werden, dass es hinsichtlich der neuronalen Erregbarkeit Unterschiede zwischen iNeuronen von Patienten, die auf eine stimmungsstabilisierende Therapie mit Lithium angesprochen hatten, und solchen ohne Therapieansprechen gab (28, 38). Weitere Studien haben zudem Veränderungen der neuronalen Entwicklungsgeschwindigkeit in iNeurons zwischen PatientInnen mit BPD und gesunden KontrollprobandInnen gezeigt (29). Studien, die induzierte Zellmodelle und genetische Daten integriert haben, wurden bereits für die Schizophrenie (30) publiziert. Für BPD fehlen sie jedoch aktuell noch.

Dies soll sich mit dem hier vorgeschlagenen Projekt ändern. Wir werden in iNeuronen und iAstrozyten, 33 Genen, deren Funktionsverlust bekanntermaßen mit BPD assoziiert ist (10), in einen CRISPR/Cas9-basierten Hochdurchsatz-Screen ausschalten, um so transkriptomische Veränderungen zu verstehen und BPD-relevante molekulare Signalwege zu identifizieren. Loss-of-function (LOF)-Screens sind ein potenter Ansatz, um zentrale Regulatoren in biologischen Proben aufzufindig zu machen. LOF-Screens in Zellmodellen haben gezeigt, dass sie enormes Potenzial haben, um eine große Anzahl von Kandidatengenen parallel zu testen. So wurden z. B. 173 Mikrozephalie-Kandidaten in menschlichem zerebralen Organoidgewebe untersucht und es konnten Gene identifiziert werden, die die Funktion des endoplasmatischen Retikulums und die Sekretion extrazellulärer Matrixproteine regulieren, deren Dysregulation Mikrozephalie verursacht (35). Das hier dargestellte Projekt zielt darauf ab, einen BPD-LOF-iCell-Ansatz mit transkriptomischen Analysen auf Einzelzellebene (scRNASeq) zu kombinieren. So sollen zelltypspezifische Veränderungen identifiziert werden, die durch den Knock-out einzelner BPD Gene verursacht werden. Es überbrückt somit die Lücke zwischen dem Wissen um genetische Risikofaktoren für BPD und dem Verständnis, wie diese die zugrundeliegende Pathophysiologie der Erkrankung beeinflussen. Es ist genau dieses Verständnis der Pathophysiologie das aktuell noch fehlt, um genetisches Wissen im Bereich aller psychischen Erkrankungen zum Benefit der Betroffenen in der Klinik anwendbar zu machen, z.B. über die Weiterentwicklung hin zu präziseren und somit von Beginn an effizienteren Therapien. Dieser Ansatz stützt sich auf Vorarbeiten der Antragstellerin, die im Folgenden beschrieben werden.

3 Eigene Vorarbeiten

In den letzten zehn Jahren drehte sich die Forschungsarbeit der Antragstellerin (ECS) maßgeblich darum, den Beitrag häufiger und seltener genetischer Varianten im Rahmen von häufigen, komplex-genetischen neuropsychiatrischen Erkrankungen zu verstehen. Durch GWAS- und WES-Studien, in kleineren Forschergruppen oder als Teil großer globaler Forschungskonsortien wie dem PGC, war ECS an der Identifizierung zahlreicher neuer häufiger und seltener genetischer Varianten im Rahmen neuropsychiatrischer Erkrankungen einschließlich BPD beteiligt (z. B. 11, 12, 19, 31, 32, 39-41, 55). Innerhalb dieser, galt ihr besonderes Augenmerk immer der Rolle seltener genetischer Varianten, die einen bedeutenden, aber manchmal vergessenen Beitrag zur genetischen Architektur komplex-genetischer Erkrankungen leisten und—möglicherweise noch wichtiger—einen Schlüssel zum Verständnis der Pathophysiologie dieser Erkrankungen darstellen. Analog zu dem hier skizzierten Projekt haben zahlreiche dieser Studien wichtige Verbindungen zwischen einem Gen oder einer genetischen Variante aufgezeigt oder eine funktionelle Validierung für ein Gen oder eine genetische Variante geliefert (z. B. 31, 42-47). In einer solchen Studie untersuchte ECS beispielsweise Gene, die bekanntermaßen für das Restless-Legs-Syndrom relevant sind, bei mehr als 7.000 Personen. Durch funktionelle Hochdurchsatzuntersuchen in Zebrafischen

konnte ECS zeigen, dass funktionell relevante Varianten in einer spezifischen Isoform von *MEIS1* sowie in benachbarten, nicht kodierenden 5'- und 3'-Regionen in Fällen im Vergleich zu Kontrollen stark angereichert waren (48). Damit identifizierte sie den wichtigsten bekannten genetischen Risikofaktor für das Restless-Legs-Syndrom und untermauerte die Rolle neuronaler Entwicklungsprozesse in der Pathophysiologie der Erkrankung. In jüngerer Zeit war ECS als Mitglied des PGC auch an mehreren Studien beteiligt, in denen neue genetische Risikofaktoren für schwere psychische Erkrankungen gefunden werden konnten (z. B. 11, 12, 19, 32, 55). Zudem nutzt sie auch Daten anderer biologischer Ebenen ("omics"), um die funktionellen Folgen genetischer Varianten zu verstehen, die mit häufigen, komplexen neuropsychiatrischen Merkmalen in Verbindung stehen (z. B. 33). In diesem Zusammenhang sind auch der Aufbau und das Management großer, tiefgehend phäno- und biotypisierter klinischer Kohorten (z.B. die PsyCourse Studie (www.psycourse.de)) (34, 36, 37, 49, 50) und die Einrichtung von krankenhausbasierten Biobanken wie der Munich Mental Health Biobank

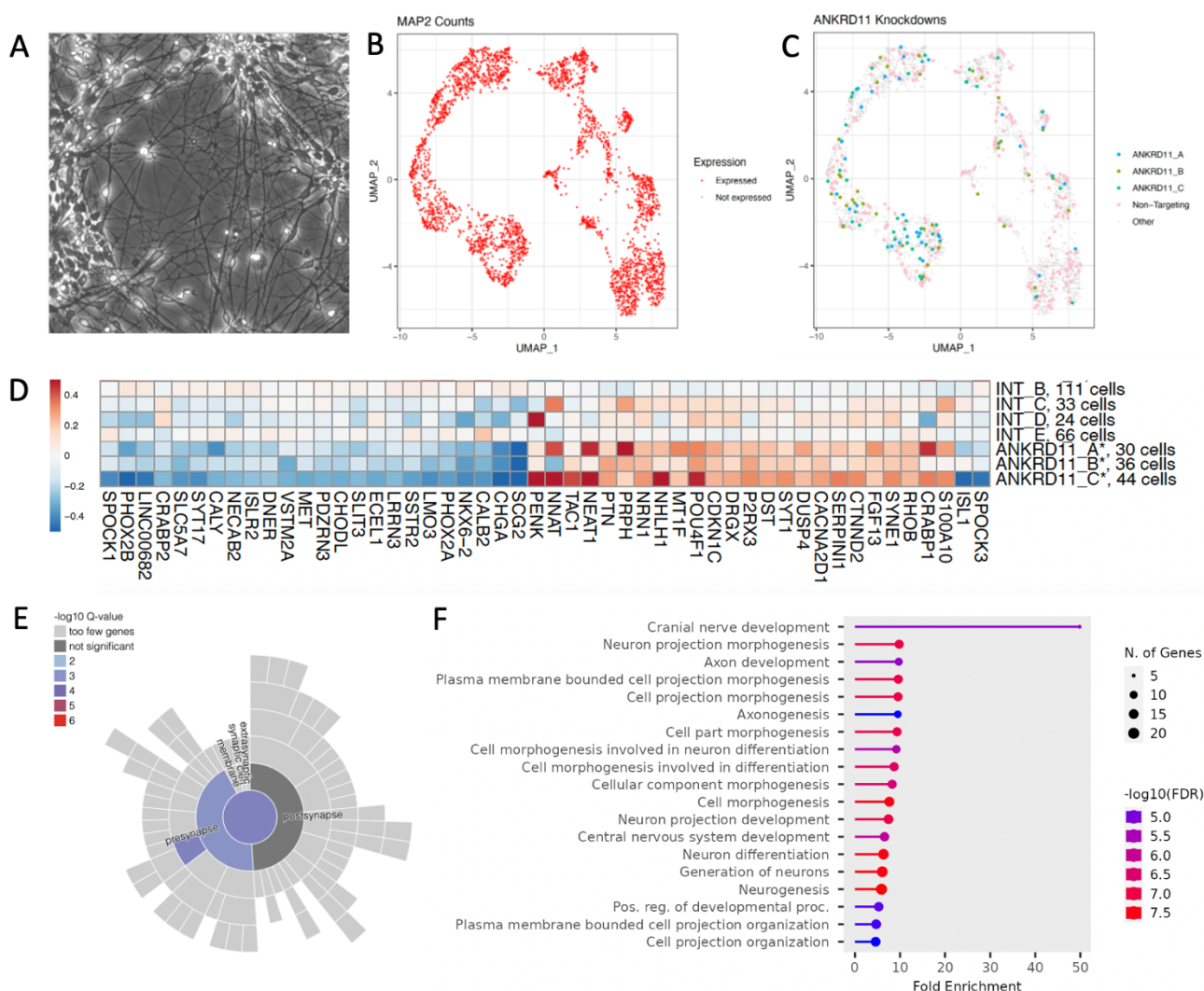


Abb. 1: CRISPR/Cas9-basiertes Knock-out von Schizophrenie-assoziierten-Genen: Daten aus einem Pilot-Screening. (A) *NGN2* getriebene iNeurons differenziert aus iPSCs (KOLF2.1S). (B) Homogene Expression des pan-neuronalen Markerw MAP2 in iNeuronen mittels scRNAseq. (C) Homogene Verteilung der guideRNAs Distribution of guide RNAs für das Schizophrenie-assoziierte Gen *ANKRD11*. (D) Heatmap mit differenziell exprimierten Genen (DEGs) (x-Achse) zwischen vier verschiedenen intergenen Kontrollen (INT_B bis INT_E) und dem Schizophrenie-Gen *ANKRD11*. (E & F) Anreicherung von *ANKRD11*-KO-assoziierten DEGs unter Genen mit einer synaptischen Funktion (gemäß SynGO) und unter biologischen Prozessen allgemein (gemäß KEGG-GO-Terms).

(51) ein wesentlicher Bestandteil gewesen. Seit 2023 leitet ECS die Spezialambulanzen für BPD und Genetische Diagnostik in der Psychiatrie an der Klinik für Psychiatrie und Psychotherapie am Universitätsklinikum Bonn, wo sie auch neue, innovative Biobanking- und Kohortenrekrutierungsstrategien etabliert.

Bevor sie im April 2023 als Professorin für Psychiatrische Genomik an die Universität Bonn kam, verbrachte sie sieben Monate im Cell Editing Team (Prof. Andrew Bassett) am Wellcome Sanger Institute in Hinxton, Cambridgeshire, Großbritannien, wo sie Pilotarbeiten für diesen Antrag durchführte. Der Pilot-Knock-out-Screen erfolgte für 10 Gene, die—analog zu dem für BPD in diesem Antrag Beschriebenen—LOF-Varianten für die Schizophrenie (aus (20)) aufweisen, in induzierten Neuronen (iNeurons) (das Protokoll ist nicht final veröffentlicht, aber gut etabliert und wird für sehr groß angelegte Screens und in Industriekooperationen von der Abteilung Cell Editing am Wellcome Sanger Institute verwendet und steht der Antragstellerin über ein bestehendes DTA/MTA rechtlich uneingeschränkt zur Verfügung). Anschließend setzte sie scRNAseq ein, um differenziell exprimierte Gene und Signalwege zu identifizieren (unveröffentlicht) (Abb. 1).

Im aktuellen Projekt wird sie ihre klinische Expertise und ihre langjährige Erfahrung in der Genetik häufiger komplexer neuropsychiatrischer Störungen mit einer besonderen Expertise in der funktionellen Bewertung seltener genetischer Varianten im Kontext häufiger komplexer genetischer Erkrankungen kombinieren.

4 Ziele und Methodologie

BPD ist eine häufige, komplexe genetische Erkrankung, von der bis zu 1 % der Weltbevölkerung betroffen ist und die ganz oben auf der Liste der Ursachen für die meisten mit Behinderung gelebten Jahre (disability adjusted life years (DALY)) in der Weltbevölkerung steht (3). Obwohl die Heritabilität hoch ist, ist die genetische Architektur der Erkrankung derzeit nur unvollständig bekannt. Dies gilt insbesondere im Hinblick auf den Beitrag seltener Varianten. Vor kurzem konnten Gene mit seltenen kodierenden genetischen Varianten identifiziert werden, die mit BPD in Verbindung stehen (10). Diese Varianten und Gene sind jedoch noch nicht funktionell validiert.

Wir werden diese Validierung durch den Einsatz eines Hochdurchsatz-Screening-Systems auf dem neusten Stand der Technik in iCells aus iPSCs durchführen. Gene mit einem bekannten Überschuss an ultra-seltenen Varianten, von denen man annimmt, dass sie bei Personen mit BPD zu einem trunkierten Protein führen (Abb. 2), werden zu bestimmten Zeitpunkten der Zelldifferenzierung von iPSCs in iNeurone und iAstrozyten ausgeschaltet („knock-out“). Die daraus resultierenden Veränderungen in den molekularen Signalwegen werden auf Einzelzellebene identifiziert und validiert.

Im Einzelnen umfasst unser Vorschlag die folgenden drei Ziele (Abb. 3). Dieses Projekt soll sich auf BPD und nicht auf Schizophrenie-assoziierte Gene mit einem LOF fokussieren, weil die Antragstellerin sowohl klinisch als auch wissenschaftlich über mehr Erfahrung mit der Genetik der BPD verfügt und weil die Ergebnisse der BPD weniger wahrscheinlich durch funktionelles Screening im Hochdurchsatzverfahren weiterverfolgt werden als die Ergebnisse der viel größeren und populäreren Schizophrenie-RVAS des SCHEMA-Konsortiums (20), was eine Wissenslücke hinterlässt, die aber, um das vorhandene genetische Wissen irgendwann in die Klinik bringen zu können, zwingend gefüllt werden muss. Insbesondere im Sinne des Zwecks der Krafft-Stiftung ist zudem zu benennen, dass in der klinischen Versorgung BPD auch im Kreise von hochproduktiven und leistungsstarken Menschen—wie Unternehmerfamilien—nicht selten anzutreffen ist.

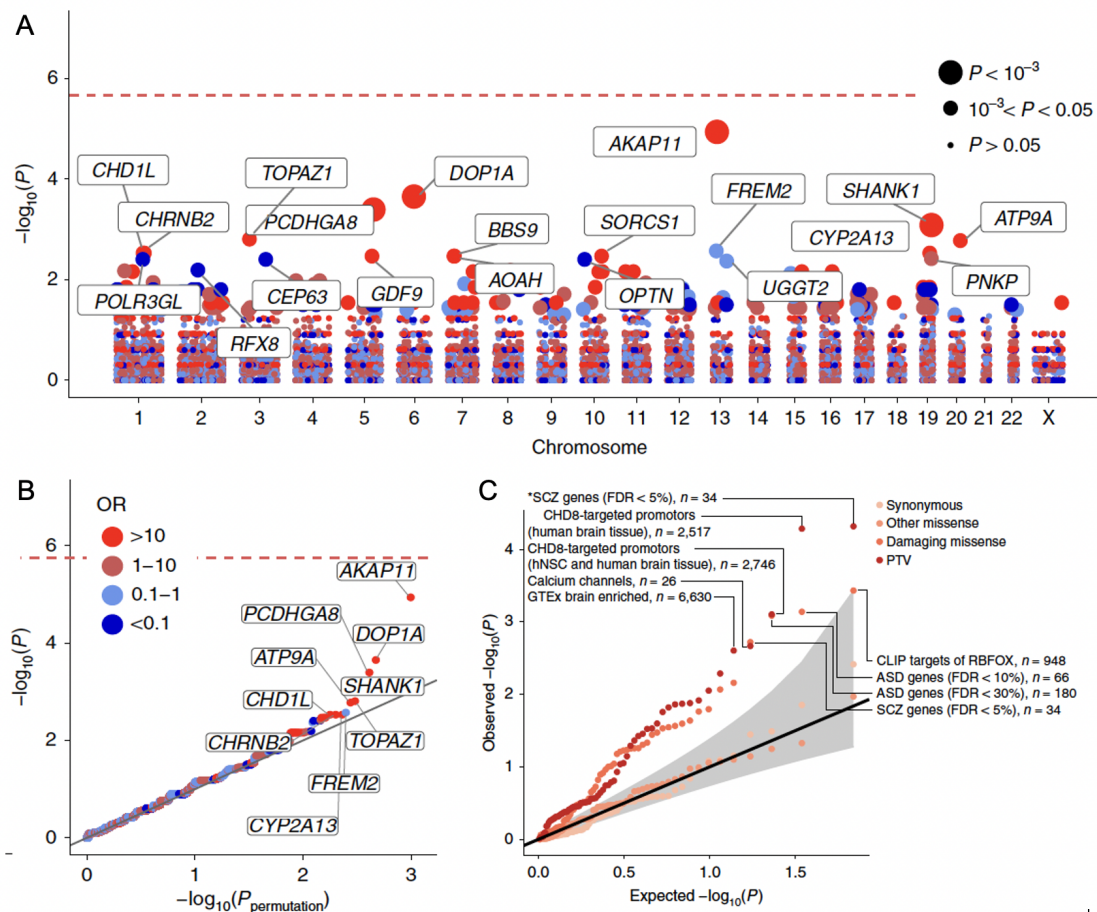


Abb. 2: Ergebnisse der neuesten und größten RVAS für BPD (entnommen aus (10)). (A) Manhattan-Plot der RVAS, in der Individuen mit BPD mit gesunden KontrollprobandenInnen verglichen wurden; die 20 nach p-Wert signifikantesten Genen sind beschriftet. (B) Q-Q-Plot der logarithmischen p-Werte mit Hervorhebung der 10 am stärksten von der Erwartung abweichenden Gene aus der BPD RVAS, farbcodiert nach Odds-Ratios. (C) Q-Q-Plot logarithmischer p-Werte, der die Anreicherung vordefinierter Gen-Sets unter den Genen zeigt, die in der BPD-RVAS für verschiedene Klassen von Varianten identifiziert wurden. In dem hier beschriebenen Projekt werden wir die 33 Gene untersuchen, die einen Überschuss an ultra-seltenen, präzidiert protein-trunkierenden Varianten in der BPD-RVAS (und der Metaanalyse mit der Schizophrenie-RVAS) (nominaler p-Wert $<0,01$) aufweisen. 20 hiervon sind auch unter den oben (A) dargestellten signifikantesten BPD-RVAS Genen zu finden.

Zielsetzung 1—BPD-Gen-Knock-out in iCells

Der erste Schritt des Vorhabens zielt darauf ab, menschliche iNeurone und iAstrozyten als Zellmodell zu nutzen bzw. zu etablieren, um die 33 oben genannten BPD-assoziierten Gene mit einer Anreicherung seltener genetischer Varianten mit großen Effektstärken (Abb. 2) (10), in ihrer Funktion zu analysieren. Um die Funktion der 33 Gene einzeln auszuschalten, wird eine gepoolten CRISPR/Cas9 Library generiert. Darüber hinaus sind die Charakterisierung der iCells und die Validierung des Knock-out-Ansatzes Teil dieser Zielsetzung.

Zielsetzung 2—Lentiviraler CRISPR/Cas9-LOF Screen für BPD-Gene aus der RVAS

Die Veränderungen in der Genexpression und in molekularen Signalwegen, die durch individuelle BPD-Gen-Knock-outs verursacht werden, werden mittels scRNAseq-Analysen in den in Arbeitspaket (AP) 1 generierten Zellen untersucht. Das Ziel hierbei ist, BPD-Gen-Knock-out-abhängige, zelltypspezifische Veränderungen zu identifizieren und zu testen, ob ein Funktionsverlust dieser Gene z.B. tatsächlich zu einer Dysregulation von synaptischen Signalwegen und Kalziumkanalgenen oder Interaktionspartnern von *GSK3b* führt, wie Genset-Enrichment-Analysen suggerieren (10-12).

Zielsetzung 3—Validierung in Einzel-Gen-Knock-outs

Um die Ergebnisse aus AP2 zu bestätigen und zu verfeinern, werden in AP3 die zwei interessantesten Gene aus AP2 in iNeuronen und iAstrozyten einzeln ausgeschaltet und die Effekte analysiert: Zum einen auf RNA Expressionsebene mittels scRNASeq aber auch auf Ebene der Proteinexpression mittels Western Blot und Immunzytochemie sowie, wenn möglich, auf phänotypischer Ebene.

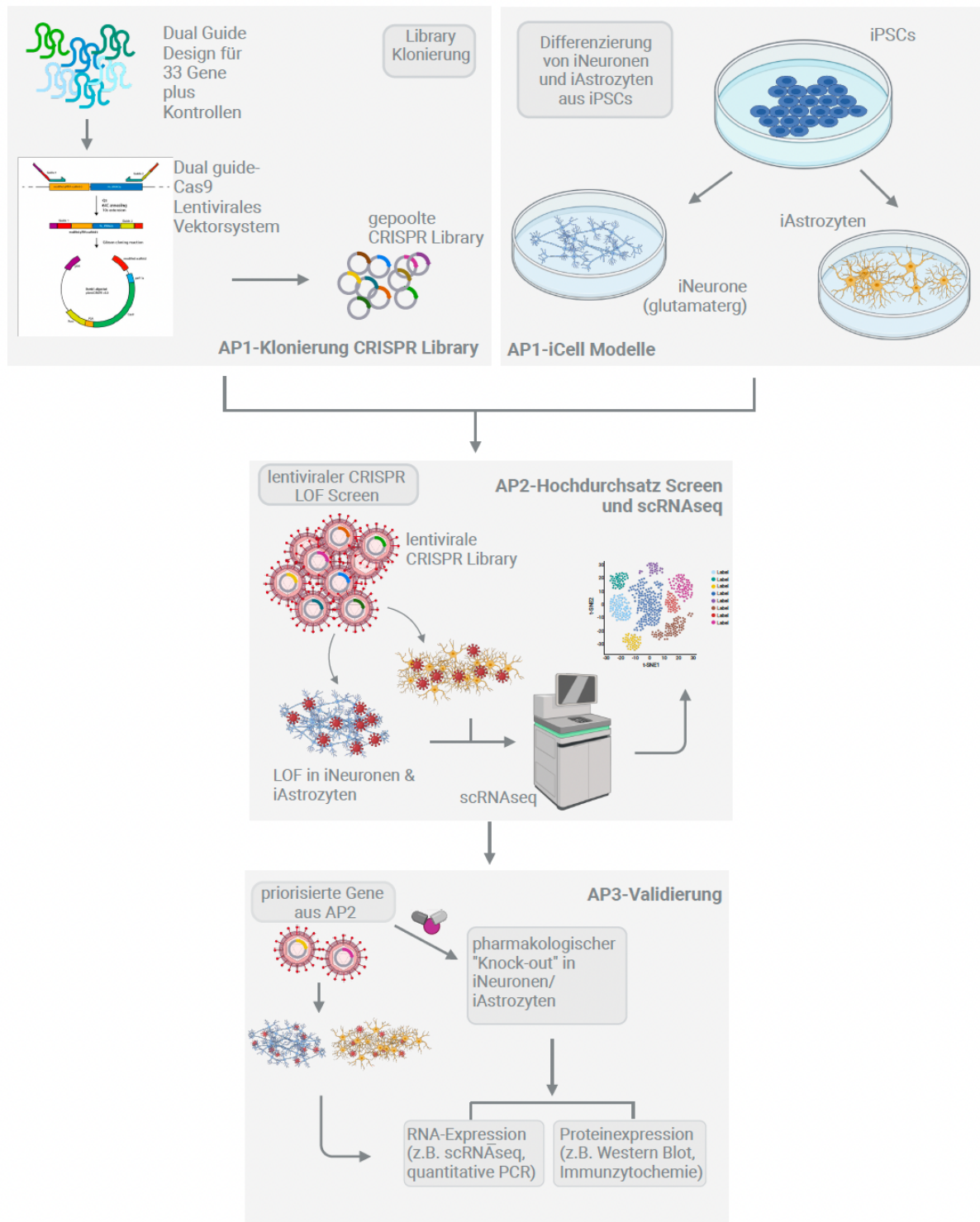


Abb 3: Graphische Zusammenfassung der drei Arbeitspakete. iPSC=induzierte pluripotente Stammzellen, LOF=loss of function, scRNAseq=single-cell RNA sequencing (Einzelzell-RNA-Sequenzierung); AP=Arbeitspaket

5 Arbeitsplan & Zeitleiste

Dieses Forschungsvorhaben besteht aus drei Arbeitspaketen (AP) in Analogie zu den oben genannten Zielsetzungen.

AP1—BPD-LOF-Gen Knock-outs in iNeuronen und iAstrozyten

AP1 konzentriert sich auf **33 Gene, die in der bisher größten Assoziationsstudie von WES-Daten von BPD PatientInnen und KontrollprobandInnen** des BipEx-Konsortiums (RVAS; <https://bipex.broadinstitute.org/results> (10)) mit BPD in Zusammenhang gebracht werden konnten. Diese Gene weisen einen exomweit signifikanten oder knapp unterschwelligen (nominaler p-Wert < 0,01) Überschuss an seltenen genetischen Varianten auf (Abb. 2), welche bioinformatisch als wahrscheinlich proteintrunkierend vorhergesagt werden und somit sehr wahrscheinlich mit einem Funktionsverlust des Proteins einhergehen. Zunächst werden wir die Expressionsmuster dieser 33 Gene in unseren iNeuronen und iAstrozyten zu zwei unterschiedlichen Entwicklungszeitpunkten (Tag 7 und Tag 14 der Differenzierung) mittels scRNAseq analysieren und mit vorliegenden Daten aus bestehender Kooperation mit dem Wellcome Sanger Institute, Hinxton, UK, vergleichen. Dies dient dazu zu verstehen, welche Gene im physiologischen Zustand (also vor dem Verlust der Genfunktion durch den Knock-out) wann und wie robust exprimiert werden und welcher Zeitpunkt sich für unseren Hochdurchsatzscreen am besten eignet.

Für das **Abschalten der Gene** werden wir eine modifizierte Version des weitverbreiteten **CRISPR/Cas9 Systems** verwenden. In einem am Sanger Institute **neu entwickelten dualen Guide-Ansatz** (56), der einen besonders effizienten Knock-out der Gene erlaubt, werden für jedes der Kandidatengene auf der Basis einer publizierter Minimal Library („MinLib“ (52)) zwei im Abstand von ca. 70 bis 100 Basenpaaren (bp) bindende Guide-RNAs designt (Abb. 4). Hierbei werden die drei besten, nicht überlappenden Guides aus der Library als „Anker-Guides“ selektiert und dann mit Hilfe des WGE CRISPR Design Tools (<https://www.sanger.ac.uk/tool/wge-crispr-design-tool/>) unter Abwägung von Qualitätsmerkmalen wie Off-Target Effekten, der Nähe zu Splicesites oder den Doench (53) und JACKS Scores jeweils ein zweiter Guide designt. Dieser duale Ansatz führt zu einer erhöhten Effizienz an Knock-outs, dadurch dass es durch die beiden nahe beieinander

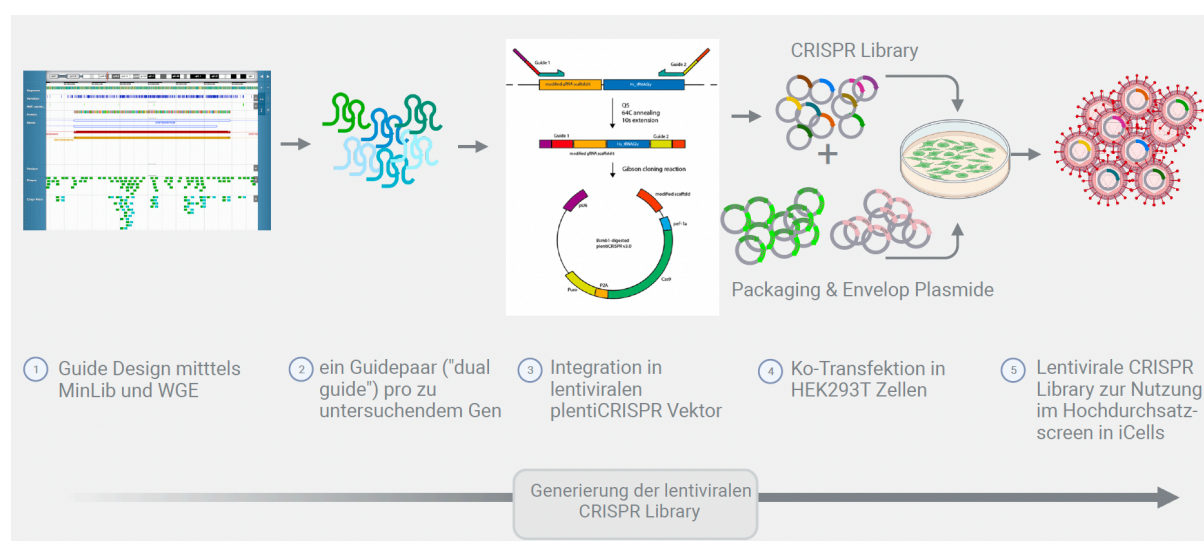


Abb. 4: Vereinfachte Darstellung der Generierung der lentiviralen CRISPR Library für die BPD-relevanten Gene sowie Kontrollgene. MinLib=Minimal Library nach Ref Goncalves; WGE=WTSE Genome Editing Data Base

liegenden CRISPR/Cas9 Schnittstellen häufig zu Deletionen kommt. Dieses Modell rekapituliert daher die LOF-Varianten in den BPD-relevanten Genen aus der RVAS sehr gut. Für jedes der 33 Kandidatengene werden drei Guidepaare designt, um drei unabhängige Knock-out Szenarien zu generieren und in der Analyse vergleichen zu können. Die Guidepaare werden **in einen lentiviralen Vektor** (plenti CRISPR v3.0 (Addgene)), der Cas9 exprimiert, kloniert (Abb. 4). Äquimolare Mengen der Vektoren werden schließlich **zu einer Library**, die dann jeweils drei Guidepaare für die 33 BPD-relevanten Gene sowie diverse Kontrollen (z.B. intergenisch bindende Kontrollen, Kontrollen, in denen die Sequenz der Guides durcheinandergebracht wurde, Gene, die nicht in iNeuronen bzw. iAstrozyten exprimiert werden und für andere neuropsychiatrische Erkrankungen (Schizophrenie und Alzheimer Erkrankung) aber nicht die BPD-relevante Gene) beinhaltet, zusammengefügt (Abb. 4). Mittels Ko-Transfektion mit Packaging und Envelop Plasmiden in HEK293T Zellen werden die CRISPR Library in Lentiviren überführt. Durch Transduktion mit diesen Lentiviren ist dann ein **Ausschalten der BPD-relevanten Gene in den Zielzellen (iNeurone und iAstrozyten)** im Rahmen des Hochdurchsatzscreens (AP2) möglich.

Neben der Generierung der CRISPR Library beinhaltet AP1 auch die Differenzierung der Zellen, in denen der Screen durchgeführt werden soll: iNeurone und iAstrozyten. Bei den iPSCs, von denen beide Zelltypen differenziert werden, handelt es sich um eine etablierte Zelllinie (KOLF2.1S). In diese wurden vom Cell Editing Team am Wellcome Sanger Institute Genkassetten, die durch Doxycyclin induzierbar *NGN2* (für iNeurone) bzw. *NF1A-SOX9* (für iAstrozyten) exprimieren, eingefügt. Beide iPSC-Zelllinien sind im Labor der Antragstellerin in Bonn vorhanden, jedoch wurde von ihr bis dato nur die *NGN2*-Zelllinie für ähnliche Hochdurchsatzuntersuchungen verwendet. Aus beiden iPSC-Linien können mittels etablierter Protokolle unter Kultivierung mit Doxycyclin und dem damit verbundenen Anschalten der Expression der zelltypen-spezifischen Transkriptionsfaktoren (*NGN2* bzw. *NF1A* & *SOX9*) innerhalb von 14 bis 21 Tagen iNeurone bzw. iAstrozyten generiert werden. Die iCell-Populationen werden mittels der Analyse von Expressionsprofilen aus der scRNAseq (siehe auch Abb. 1B als Beispiel) hinsichtlich ihrer Homogenität und ordnungsgemäßen Differenzierung (z.B. iNeuron- und als iAstrozyten-Marker) charakterisiert. Sollte es widererwarten nicht möglich sein, iAstrozyten zu generieren oder sich die Transduktion schwieriger als erwartet gestalten, werden im Projekt primäre die bereits im Rahmen eines Hochdurchsatzscreens etablierten iNeurone (Abb. 1) zum Einsatz kommen.

Die in AP1 generierte lentivirale CRISPR Library und die iNeurone und iAstrozyten ermöglichen die selektive und induzierbare Erzeugung eines genetischen LOFs an endogenen, BPD-relevanten Zielgenen in menschlichen Gehirnzellen im Rahmen des Hochdurchsatzscreens in AP2.

AP2—Funktionelle Annotation mittels Hochdurchsatzscreen und scRNAseq

In AP2 wird die **lentivirale CRISPR Library aus AP1** genutzt, **um in iNeuronen und iAstrozyten die Funktion der 33 oben beschriebenen BPD-relevanten Gene abzuschalten**. Hierzu werden die in AP1 generierten Lentiviren (Abb. 4) aus dem Überstand der HEK293T Kulturen nach Titration verwendet, um iPSCs—entweder KOLF2.1S mit induzierbarem *NGN2* (iNeurone) oder *NF1A-SOX9* (iAstrozyten)—zu transduzieren. Hierbei wird die höchstmögliche Infektionsmultiplizität (eng. „multiplicity of infection“ (MOI)) vorab im Titrationsassay bestimmt, sodass möglichst viele Zellen eine einzige Kopie (aber nicht mehr) des Targeting Vektors (i.e. plentiCRISPR) bekommen. Zumeist liegt diese zwischen 0,1 und 0,3. Im eigentlichen Screen wird dann am zweiten oder dritten Tag nach der Transduktion und damit der Integration der lentiviralen Vektoren in das Genom der Zielzellen mittels Puromycin eine Selektion vorgenommen: nur Zellen bei denen eine genomische Integration des

lentiviralen Vektors erfolgt ist, sind durch den ebenfalls auf dem lentiviralen Vektor vorhandenen Selektionsmarker Puromycin-resistent und überleben.

Weitere zwei bis drei Tage später beginnt die Differenzierung in iNeurone und iAstrozyten durch Zugabe von Doxycylin zum Zellkulturmedium. Dies führt über die induzierte Expression der Transkriptionsfaktoren *NGN2* und *NF1A-SOX9* zur Differenzierung von iPSCs in iNeurone bzw. iAstrozyten. **Nach 14 bis 21 Tagen** ist diese abgeschlossen. Dann erfolgt die **Einzelzell-RNA-Sequenzierung**. Die scRNAseq-Analyse wird am NGS-Kompetenzzentrum Tübingen (NCCT) im Rahmen einer langjährigen Zusammenarbeit zwischen den Antragstellern und dem NCCT durchgeführt.

Es sollen in **zwei unabhängigen Differenzierungen insgesamt etwa 50,000 Zellen mit >50,000 Reads/Zelle für jeden der beiden iCell-Typen (iNeurone und iAstrozyten)** untersucht werden. Da der Zeitraum der neuronalen Entwicklung ein für die Entstehung der BPD wichtiges Stadium darstellt, sollen zudem jeweils zwei Zeitpunkte analysiert werden: Tag 7 und Tag 14 der Differenzierung. Zusammen bedeutet dies, dass 8 unabhängige scRNAseq Analysen durchgeführt werden. Alle Sequenzierungen laufen als sog. „short read sequencing“ auf der Illumina Plattform.

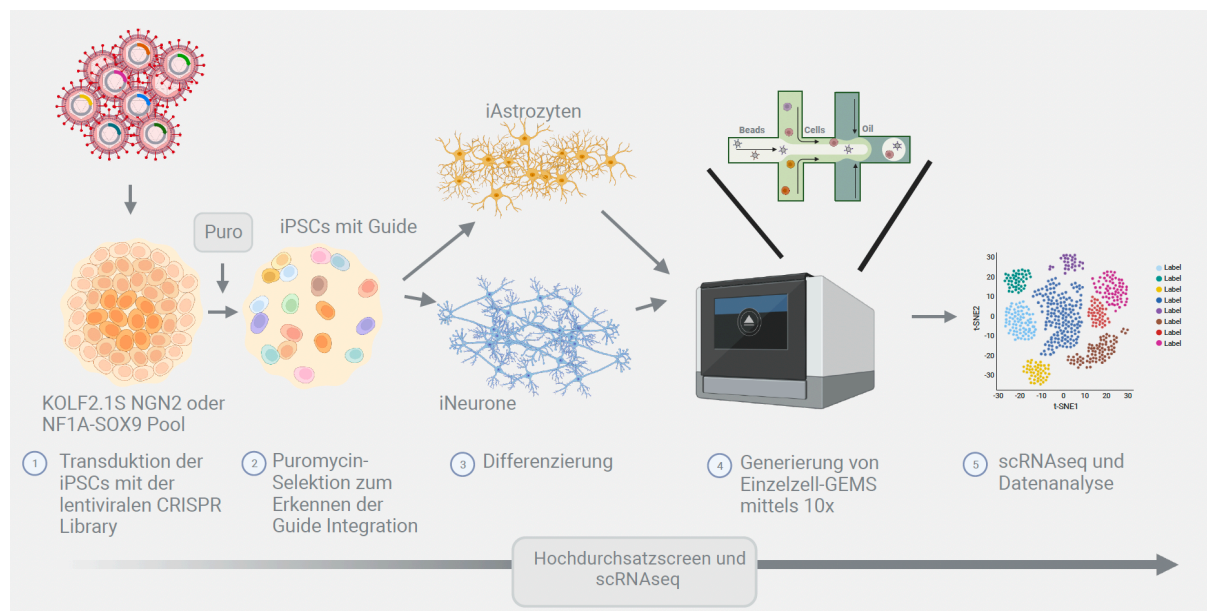


Abb. 5: Schematische Darstellung des Hochdurchsatzscreens sowie der scRNAseq.

Die initialen bioinformatischen Analysen (z.B. Deconvolution, Alignment) werden von der Bioinformatik-Core-Facility am NCCT (QBit) durchgeführt werden. Die Analyse differentiell exprimierter Gene (DEGs) sowie der **Anreicherung von DEGs in bestimmten molekularen Netzwerken mittels CellRanger und Seurat** erfolgt analog zu dem in Abb.1 dargestellten gemeinsam mit dem ehemaligen Team der Antragstellerin am Wellcome Sanger Institute und ist im Labor der Antragstellerin in Bonn bereits etabliert. Über das oben gezeigte hinaus, sollen ggf. auch kontext-spezifische Analysen zum Einsatz kommen, die jedoch gerade noch vom Kooperationspartner entwickelt werden und nicht zwingend für den Erfolg des Projektes notwendig sind.

AP3—Validierung der Ergebnisse des Hochdurchsatzscreens

Die Ergebnisse von Hochdurchsatzscreens (wie dem in AP2) sind weitestgehend robust. Diese Robustheit wird durch die Generierung von drei unabhängigen Knock-outs (durch drei verschiedene Guidepaare) pro Gene auch noch einmal deutlich erhöht. Dennoch bedeutet die

Anwendung eines Hochdurchsatzverfahrens auch immer, dass dieses eine geringere Genauigkeit und Zuverlässigkeit hat als Verfahren, die mehr in die Tiefe als in die Breite analysieren. Daher bedarf jedes Ergebnis aus einem Hochdurchsatzscreen einer weiteren Validierung. Diese erfolgt für das hier dargestellte Projekt in AP3.

Wir werden **die zwei wichtigsten BPD-LOF-Gene aus AP2**, die mit tiefgreifenden Veränderungen molekularer Signalwege einhergehen und am zugänglichsten für eine weitere funktionelle Charakterisierung sind, auf verschiedene Arten validieren. Zum einen, wird der in AP2 angewandte Versuchsaufbau (Abb. 5) verwendet werden, um anders als dort nicht viele verschiedene Gene gemeinsam auszuschalten, sondern pro Ansatz lediglich eines der beiden interessantesten Gene (sowie relevante Kontrollen), wieder mit drei verschiedenen Guidepaaren. Je nach den Ergebnissen aus AP2 werden wir zudem den relevantesten Differenzierungs- bzw. Entwicklungszeitpunkt auswählen (Tag 7 versus Tag 14 versus Tag 21). Analog zu AP2 wird scRNAseq verwendet, um zelltypspezifische Expressionsänderungen zu identifizieren (und so zu validieren). **Weitere Validierungsschritte sind ohne das Wissen, um genau welche Gene es sich handelt, noch nicht klar zu präzisieren.** Sie umfassen jedoch klassische Methoden der Molekularbiologie wie Proteinexpressionsanalysen mittels Western Blot und Immunzytochemie oder RNA-Expression mittels quantitativer PCR in den LOF-iCells oder—falls es sich bei den hier zu untersuchenden Genen um bekannte Ansatzpunkte pharmakologischer Wirkstoffe (sog. „drug targets“) handelt—auch die pharmakologische Induktion eines LOFs in denselben Zellmodellen gefolgt von Analysen der Expressionsveränderung auf RNA- und Proteinebene. Auch phänotypische Analysen wie z.B. eine Evaluation des Aufbaus und der Funktion von Synapsen oder des zellulären Lipidstoffwechsels können zum Einsatz kommen, sind aber nicht Teil des hier beantragten.

Ausblick

Ziel dieses Forschungsvorhabens ist die Identifikation fundamentaler, zelltyp-spezifischer molekularer Veränderungen, die auf einen Funktionsverlust von BPD-relevanten Genen zurückzuführen sind. Hierdurch rekapituliert das Projekt die Situation in einem Teil der PatientInnen mit BPD, bei denen der prädierte Funktionsverlust dieser Gene mit der Erkrankung assoziiert ist. Dadurch vermag es eine **Brücke zwischen den identifizierten genetischen Veränderungen und den pathophysiologischen Grundlagen** der Erkrankung zu schlagen.

Jedoch ist Identifikation von Veränderungen bestimmter molekularer Netzwerke nur ein erster—wenn auch essenzieller—Schritt auf dem Weg zur klinischen Translation. Die Ergebnisse aus den hier dargestellten Untersuchungen stellen einen einzigartigen Grundstein für detailliertere phänotypische Untersuchungen basierend auf dem LOF der BPD-relevanten Gene dar. So könnten z.B. in weiteren Schritten auch spezifischere Aspekte der Formierung, Struktur und Funktion von Synapsen untersucht und die hier BPD-relevanten Aspekte identifiziert und Hypothesen zu Wirkmechanismen bekannter (z.B. Lithium) oder neuer Behandlungsstrategien formuliert und getestet werden. Auch eine Ausweitung der zellulären Modelle von stimulierten Zellformen und Co-Kulturen bis hin zu anderen Gehirnzelltypen oder—wenn in Zukunft weniger variabel—Organoiden ist, aufbauend auf im Rahmen dieses Projektes erzielten Ergebnissen leicht möglich und nicht weniger spannend und erfolgsversprechend.

Zeitachse und Meilensteine

	Jahr 1				Jahr 2			
AP1: LOF in iCells			M1	M2				
AP2: Hochdurchsatzscreen und scRNAseq				M3		M4		
AP3: Validierung							M5	M6

Meilensteine:

M1: Guide Design, Klonierungen, CRISPR Library, Produktion der Lentiviren; M2: Differenzierung und Charakterisierung iNeurone und iAstrozyten; M3: Lentivirale Transduktion, Differenzierung der iNeurone und iAstrozyten im Rahmen des Hochdurchsatzscreens; M4: scRNAseq und primäre Datenanalyse (in Kollaboration mit NCCT); M5: Einzel-Gen LOF in iNeuronen und iAstrozyten plus scRNAseq; M6: Molekularbiologische Validierung der Ergebnisse aus AP2 je nach identifiziertem Gen (z.B. Proteinexpression in Western Blot und Immunocytochemie, RNA-Expression in der quantitativen PCR, pharmakologischer LOF)

6 Involviertes Personal

- Lea Fischer, PhD Studentin, Grundausrüstung, Klinik für Psychiatrie & Institut für Humangenetik, Universität Bonn, Bonn, Deutschland
- Fatima Mohammedelmugadam, PhD Studentin, Promotionsstipendium des DAADs, Klinik für Psychiatrie & Institut für Humangenetik, Universität Bonn, Bonn, Deutschland
- Dr. Mahesh Gouda, Postdoktorand, Grundausrüstung, Klinik für Psychiatrie & Institut für Humangenetik, Universität Bonn, Bonn, Deutschland

7 Kooperationspartner

- Dr. Andrew Bassett, Dr. Caia Dominicus, Melissa Salazar, Cell Editing Team und Department of Human Genetics, Wellcome Sanger Institute, Hinxton, Cambridgeshire, England
- Prof. Olaf Riess & Dr. Nicholas Casadei, Institute for Human Genetics and NGS Competence Center Tübingen (NCCT), University of Tübingen, Tübingen, Germany

8 Lebenslauf

Lebenslauf—Eva-Christina Schulte, Univ.-Prof. Dr. Dr.

Univ.-Prof. Dr. Dr. Eva-Christina Schulte

Professorin für Psychiatrische Genomik (W2)
 Leiterin der Sektion für Psychiatrische Genomik
 Klinik und Poliklinik für Psychiatrie & Psychotherapie
 Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn
<https://www.ukbonn.de/psychiatrie-und-psychotherapie/forschung/sektionen/sektion-genomik-und-epigenomik/>

Arbeitsgruppenleiterin
 Institut für Psychiatrische Phänomik oder Genomik (IPPG)
 Ludwig-Maximilians Universität München
http://www.klinikum.uni-muenchen.de/Institut-fuer-psychiatrische-Phaenomik-und-Genomik/en/IPPG-Team/Schulte_en.html

Tel.: +49-(0)151 18803830

Email: eschulte@uni-bonn.de, eva.schulte@med.uni-muenchen.de

*15/08/1981 in Aachen

AUSBILDUNG

INSTITUTION/ORT	ABSCHLUSS	JAHR	BEREICH
The Cranbrook Kingswood School, Bloomfield Hills, MI, USA	High School Diploma (GPA 4,37), Hochschulzugangsberechtigung (1,0) & Zulassung zum Studium an Harvard, Stanford & Yale	2000	
Albert-Ludwigs Universität Freiburg (mit Auslandsaufenthalten u.a. in Oxford, Hongkong und Lausanne)	Humanmedizin (Staatsexamen, 1,0)	2008	Humanmedizin
Albert-Ludwigs Universität Freiburg	Dr. med. (summa cum laude)	2010	Molekulare Neurowissenschaften
Technische Universität München	Ph.D. (summa cum laude)	2013	Humangenetik, Neurogenetik
Bayerische Landesärztekammer	Facharztprüfung Neurologie	2019	Neurologie

Bayerische Landesärztekammer	Facharztprüfung Psychiatrie	2022	Psychiatrie & Psychotherapie
Ludwig Maximilians Universität München	Habilitation	2022	Experimentelle Psychiatrie und Neuropsychiatrische Genetik
BERUFLICHER WERDEGANG UND FORSCHUNGSaufenthalte			
2006	Visiting Graduate Student, Center for Neurologic Diseases, Brigham and Women's Hospital und Harvard Medical School, Boston, MA, USA (7 Monate)		
2009-2014	Assistenzärztin, Klinik für Neurologie, Technische Universität München		
2012-2013	Visiting PhD Student, Center for Disease Modelling, Duke University, Durham, NC, USA (8 Monate)		
2014-2015	Visiting Postdoctoral Research Fellow, Department of Sleep and Behavioral Sciences, Stanford University, Palo Alto, CA, USA (5 Monate)		
2016-2019	Assistenzärztin, Klinik für Psychiatrie und Klinik für Neurologie, Ludwig-Maximilians Universität München		
2019-	Fachärztin für Neurologie & Psychiatrie (ab 2022), Klinik für Psychiatrie und Psychotherapie, Ludwig-Maximilians Universität München		
2016-2019	Postdoktorandin, Institut für Psychiatrische Phänomik oder Genomik, Ludwig-Maximilians Universität München		
2020-	Arbeitsgruppenleiterin, Institut für Psychiatrische Phänomik oder Genomik, Ludwig-Maximilians Universität München		
2022-2024	Visiting Research Fellow, Wellcome Sanger Institute, Hinxton, Großbritannien		
2023-	W2 Professur und Sektionsleitung „Psychiatrische Genomik“, Oberärztin, Klinik für Psychiatrie & Institut für Humangenetik, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn		
GREMIENARBEIT			
2024 -	Subzentrum für Seltene Psychische Erkrankungen, Zentrum für Seltene Erkrankungen Bonn (ZSEB), Leiterin		
2024 -	Referat für Genetische, molekulare und zelluläre Neurowissenschaften der Deutschen Gesellschaft für Psychiatrie, Psychotherapie und Nervenheilkunde (DGPPN), Leiterin		
2023 -	BONFOR Kommission (intramurale Forschungsförderung, Medizinische Fakultät, Universität Bonn)		

2023-	Bonn Center for Neuroscience (BCN), Mitglied
2021-2023	Munich Clinician Scientist Program, Sprecherin
2021-	Munich Mental Health Biobank, Ko-Geschäftsführerin
2021-2024	FOSA Humangenetik, Nationales Pandemiekohorten Netz (NAPKON), Sprecherin
PREISE	
2014	Graduate Student Award für die beste Promotion, Helmholtz Zentrum München
2013	Charles J. Epstein Award for Excellence in Human Genetics Research, American Society for Human Genetics, Halbfinalistin
2013	Posterpreis "Neurogenetik", Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Neurologie (DGN)
DRITTMITTELPROJEKT (der letzten 5 Jahre)	
<ul style="list-style-type: none"> • „Exome sequencing in the National Pandemic Cohort Network (NAPKON) to decipher COVID-19 host genetics“; Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG; SCHU 2419/4-1); PI, 2023-2026, 656.251 € • „Functional Screen of Genetic Variation in Bipolar Disorder“, Bavaria-California-Technology-Center (BaCaTeC; 15(2022-2)); 2023-2024, PI, 6.500 € • “The Dynamics of Lipid Quantitative Trait Loci—From Brain to Blood and across the Lifespan“; Boehringer Ingelheim Stiftung; PI, 2025-2028, 599.713 € • „Identification of host genetic variation predisposing to severe COVID-19 by genetics, transcriptomics and functional analyses“; Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG; SCHU 2419/2-1); 2021-2024, PI, 179.200 € • „Lipidomics and Multiomics in Severe Psychiatric Disorders“; Munich Clinician Scientist Program, Ludwig Maximilians Universität München; 2021- 2023, PI, 115.031 € 	
EDITOR & REVIEWER AKTIVITÄTEN	
Reviewer	JAMA Psychiatry, American Journal of Psychiatry, Molecular Psychiatry, Translational Psychiatry, Sleep Medicine, Frontiers in Genetics, Schizophrenia Bulletin
Editor	BMC Psychiatry (Associate Editor), Frontiers in Neuroscience (Guest Editor)
10 RELEVANTESTE PUBLIKATIONEN (der letzten 10 Jahre) (selektiert aus 109; komplette Liste auf Google Scholar: https://scholar.google.com/citations?user=cfLL5VUAAAAJ&hl=en)	

1. Tkachev A*, Stekolshchikova E*, Vanyushkina A, ..., **Schulte EC***, Khaitovich P*. Lipid Alteration Signature in the Blood Plasma of Individuals With Schizophrenia, Depression, and Bipolar Disorder. *JAMA Psychiatry* 2023, 80(3):250-259. (IF 2022: 25.9)
2. Mullins N, Forstner AJ, O'Connell KS ..., **Schulte EC**, et al. Genome-wide association study of over 40,000 bipolar disorder cases provides new insights into the underlying biology. *Nat Genet* 2021, 53(6):817-829. PMID:34002096. (IF 2020: 26.7)
3. Kalman JL, Burkhardt G, Adorjan K, ..., **Schulte EC**. Biobanking in everyday clinical practice in psychiatry-The Munich Mental Health Biobank. *Front Psychiatry* 2022, 13:934640. PMID: 35935431. (IF 2021: 4.9)
4. Kalman JL, Olde Loohuis LM, Vreeker A, ... , **Schulte EC**, et al. Characterisation of age and polarity at onset in bipolar disorder. *Br J Psychiatry*. 2021, 219:659-669. PMID: 35048876 (IF 2021: 9.3)
5. Adams M, Awashiti S, Streit F, ..., **Schulte EC**, et al. Trans-ancestry genome-wide study of depression identifies 697 associations implicating cell types and pharmacotherapies. *Cell* 2025. 188:640-652. doi: 10.1016/j.cell.2024.12.002. PMID: 39814019 (IF 2023: 45.5)
6. **COVID-19 Host Genetics Initiative** (Niemi MEK, Karjalainen J, Liao RG, ..., **Schulte EC**, et al.). Mapping the human genetic architecture of COVID-19. *Nature* 2021, 600(7889):472-477. PMID:34237774. (IF 2021: 69.5)
7. **Cross-Disorder Group of the Psychiatric Genomics Consortium**. Genomic Relationships, Novel Loci, and Pleiotropic Mechanisms across Eight Psychiatric Disorders. *Cell* 2019, 179:1469-1482. PMID: 31835028 (IF 2019: 38.6)
8. **Schulte EC**, Kondofersky I, Budde M, et al. A novel longitudinal clustering approach to psychopathology across diagnostic entities in the hospital-based PsyCourse study. *Schizophr Res*. 2022, 244:29-38. PMID: 35567871 (IF 2021: 4.9)
9. **Schulte EC***, Kousi M*, Tan PL, ..., Katsanis N, Winkelmann J. Targeted resequencing and systematic in vivo functional testing identifies rare variants in *MEIS1* as significant contributors to restless legs syndrome. *Am J Hum Genet* 2014, 95:85-95. PMID: 24995868 (IF 2014: 10.9)
10. O'Connell KS, Koromina M, van der Veen T, Boltz T, David FS, ..., **Schulte EC**, et al. Genomics yields biological and phenotypic insights into bipolar disorder. *Nature* 2025. 639:968-975. doi: 10.1038/s41586-024-08468-9. PMID: 39843750 (IF 2023: 50.5)

9 Bibliographie (eigene Publikationen fettgedruckt)

- 1 Perälä J, Suvisaari J, Saarni SI, et al. Lifetime prevalence of psychotic and bipolar disorders in a general population. *Arch Gen Psychiatry*, 2007, 64:19-28.
- 2 Polderman TJC, Benyamin B, de Leeuw CA, et al. Meta-analysis of the heritability of human traits based on fifty years of twin studies. *Nat Genet*, 2015, 47:702-709.
- 3 He H, Hu C, Ren Z, et al. Trends in the incidence and DALYs of bipolar disorder at global, regional, and national levels: Results from the global burden of Disease Study 2017. *J Psychiatr Res*, 2020, 125:96-105.
- 4 Chan JKN, Wong CSM, Yung NCL, et al. Excess mortality and life-years lost in people with bipolar disorder: an 11-year population-based cohort study. *Epidemiol Pschiatr Sci*, 2021, 30:e39.
- 5 Geddes JR and Miklowitz DJ. Treatment of bipolar disorder. *Lancet*, 2013, 381:1672-1682.

- 6 Goes FS, Pirooznia M, Parla JS, et al. Exome Sequencing of Familial Bipolar Disorder. *JAMA Psychiatry*, 2016, 73:590-597.
- 7 Sul JH, Service SK, Huang AY, et al. Contribution of common and rare variants to bipolar disorder susceptibility in extended pedigrees from population isolates. *Transl Psychiatry*, 2020, 10:74.
- 8 Jia X, Goes FS, Locke AE, et al. Investigating rare pathogenic/likely pathogenic exonic variation in bipolar disorder. *Mol Psychiatry*, 2021, 26:5239–5250.
- 9 Cruceanu C, Schmouth JF, Torres-Platas SG, et al. Rare susceptibility variants for bipolar disorder suggest a role for G protein-coupled receptors. *Mol Psychiatry*, 2018, 23:2050–2056.
- 10 Palmer DS, Howrigan DP, Chapman SB, et al. Exome sequencing in bipolar disorder identifies AKAP11 as a risk gene shared with schizophrenia. *Nat Genet*, 2022, 54:541-547.
- 11 **Mullins N, Forstner AJ, O’Connell KS ..., Schulte EC, et al. Genome-wide association study of over 40,000 bipolar disorder cases provides new insights into the underlying biology. *Nat Genet*, 2021, 53:817-829.**
- 12 **O’Connell KS, Koromina M, van der Veen T, ..., Schulte EC, et al. Genomics yields biological and phenotypic insights into bipolar disorder *Nature*, 2025, 639:968-975.**
- 13 Psychiatric GWAS Consortium Bipolar Disorder Working Group, Large-scale genome-wide association analysis of bipolar disorder identifies a new susceptibility locus near ODZ4. *Nat Genet*, 2011, 43:977-983.
- 14 Chen, CH, Lee CS, Lee MTM, et al. Variant GADL1 and Response to Lithium Therapy in Bipolar I Disorder. *The New England Journal of Medicine*, 2014, 370:119–128.
- 15 Squassina A, Manchia M, Borg J, et al. Evidence for Association of an ACCN1 Gene Variant with Response to Lithium Treatment in Sardinian Patients with Bipolar Disorder. *Pharmacogenomics*, 2011, 12:1559–1569.
- 16 Song J, Bergen SE, Di Florio A, et al. Genome-Wide Association Study Identifies SESTD1 as a Novel Risk Gene for Lithium-Responsive Bipolar Disorder. *Molecular Psychiatry*, 2016, 21:1290–1297.
- 17 Hou L, Heilbronner U, Degenhardt F, et al. Genetic Variants Associated with Response to Lithium Treatment in Bipolar Disorder: A Genome-Wide Association Study. *Lancet*, 2016, 387:1085–1093.
- 18 Charney AW, Stahl EA, Green EK, et al. Contribution of Rare Copy Number Variants to Bipolar Disorder Risk Is Limited to Schizoaffective Cases. *Biol Psychiatry*, 2019, 86:110-119.
- 19 **Cross-Disorder Group of the Psychiatric Genomics Consortium. Genomic Relationships, Novel Loci, and Pleiotropic Mechanisms across Eight Psychiatric Disorders. *Cell*, 2019, 179:1469-1482.**
- 20 Singh T, Neale B, Daley M. Rare coding variants in ten genes confer substantial risk for schizophrenia, *Nature*, 2022, 604:509-516.
- 21 Kiezun A, et al. Exome sequencing and the genetic basis of complex traits. *Nat Genet*, 2012, 44:623-630.
- 22 Nelson MR, et al. An abundance of rare functional variants in 202 drug target genes sequenced in 14,002 people. *Science*, 2012, 337:100-104.
- 23 Bodmer W & Bonilla C. Common and rare variants in multifactorial susceptibility to common disease. *Nat Genet*, 2008, 40:695-701.
- 24 Gibson G. Rare and common variants: twenty arguments. *Nat Rev Genet*, 2012, 13:135-145.
- 25 Momozawa Y & Mizukami K. Unique roles of rare variants in the genetics of complex diseases in humans. *J Hum Genet*, 2021, 66:11-23.
- 26 Yin Y, Liu PY, Shi Y, Li P. Single-Cell Sequencing and Organoids: A Powerful Combination for Modelling Organ Development and Diseases. *Rev Physiol Biochem Pharmacol*. 2021, 179:189-210.
- 27 Skene NG, Bryois J, Bakken TE, ..., Hjerling-Leffler J. Genetic identification of brain cell types underlying schizophrenia. *Nat Genet*, 2018, 50:825-833.
- 28 Stern S, Santos R, Marchetto MC, ..., Gage FH. Neurons derived from patients with bipolar disorder divide into intrinsically different sub-populations of neurons, predicting the patients’ responsiveness to lithium. *Mol Psychiatry*, 2018, 23:1453-1465.

- 29 Hewitt T, Alural B, Tilak M, ..., Lalonde J. Bipolar disorder-iPSC derived neural progenitor cells exhibit dysregulation of store-operated Ca^{2+} entry and accelerated differentiation. *Mol Psychiatry*, 2023, online ahead of print.
- 30 Sawada T, Charter TE, Sasagawa Y, et al. Developmental excitation-inhibition imbalance underlying psychoses revealed by single-cell analyses of discordant twins-derived cerebral organoids. *Mol Psychiatry*, 2020, 25:2695-2711.
- 31 **Zimprich A, Benet-Pages A, Struhala W, ..., Schulte EC, et al. A mutation in VPS35, encoding a subunit of the retromer complex, causes late-onset Parkinson disease. *Am J Hum Genet*, 2011, 89:168-175.**
- 32 **Wray NR, Ripke S, Mattheisen M, ..., Schulte EC, et al. Genome-wide association analyses identify 44 risk variants and refine the genetic architecture of major depression. *Nat Genet*, 2018, 50:668-681.**
- 33 **Tkachev A*, Stekolshchikova E*, Vanyushkina A, ..., Schulte EC*, Khaitovich P*. Lipid Alteration Signature in the Blood Plasma of Individuals With Schizophrenia, Depression, and Bipolar Disorder. *JAMA Psychiatry* 2023, 80:250-259.**
- 34 **Budde M, Anderson-Schmidt H, Gade K, ..., Schulte EC, et al. A longitudinal approach to biological psychiatric research: The PsyCourse study. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*, 2019, 180:89-102.**
- 35 Esk C, Lindenhof D, Haendeler S, et al. A human tissue screen identifies a regulator of ER secretion as a brain-size determinant. *Science*, 2020, 370:935-941. (35)
- 36 **Dwyer DB, Kalman JL, Budde M, ..., Schulte EC, et al. An Investigation of Psychosis Subgroups With Prognostic Validation and Exploration of Genetic Underpinnings: The PsyCourse Study. *JAMA Psychiatry*, 2020, 77:523-533.**
- 37 **Comes AL, Senner F, Budde M, ..., Schulte EC, et al. The genetic relationship between educational attainment and cognitive performance in major psychiatric disorders. *Transl Psychiatry* 2019, 9:210.**
- 38 Mertens T, Wang QW, Kim Y, ..., Yao J. Differential responses to lithium in hyperexcitable neurons from patients with bipolar disorder. *Nature*, 2015, 527:95-99. (38)
- 39 **COVID-19 Host Genetics Initiative (Niemi MEK, Karjalainen J, Liao RG, ..., Schulte EC, et al.). Mapping the human genetic architecture of COVID-19. *Nature* 2021, 600:472-477.**
- 40 **Winkelmann J, Schormair B, Czamara D, Knauf F, Schulte EC, et al. Genome-wide association study identifies novel Restless Legs Syndrome susceptibility loci on 2p14 and 16q12.1. *PLoS Genetics*, 2011, 7:e1002171.**
- 41 Long-COVID oder zweite COVID GWAS
- 42 **Schulte EC, Knauf F, Kemlink D, Schormair B, Lichtner P, Gieger C, et al. Variant screening of the coding regions of *MEIS1* in patients with restless legs syndrome. *Neurology*, 2011, 76:1106-1108.**
- 43 **Schulte EC, Fukumori A, Mollenhauer B, et al. Rare variants in beta-Amyloid precursor protein (APP) and Parkinson's disease. *Eur J Hum Genet*, 2015, 23:1328-33.**
- 44 **Schulte EC, Mollenhauer B, Zimprich A, et al. Variants in eukaryotic translation initiation factor 4G1 in sporadic Parkinson's disease. *Neurogenetics*, 2012, 13: 281-285.**
- 45 **Hopfner F, Schulte EC, Mollenhauer B, et al. The role of SCARB2 as susceptibility factor in Parkinson's disease. *Mov Disord*, 2013, 28:538-540.**
- 46 **Schulte EC, Ellwanger DC, Dihanich S, et al. Rare variants in LRRK1 in Parkinson's disease. *Neurogenetics*, 2014, 15:49-57.**
- 47 **Schulte EC, Stahl I, Czamara D, et al. Rare variants in PLXNA4 and Parkinson's disease. *PLoS One*, 2013, 8:e79145.**
- 48 **Schulte EC, Kousi M, Tan PL, Tilch E, Knauf F, Lichtner P, et al. Targeted resequencing and systematic in vivo functional testing identifies rare variants in *MEIS1* as significant contributors to restless legs syndrome. *Am J Hum Genet*, 2014, 95:85-95.**
- 49 **Kalman JL, Papiol S, Forstner AJ, ..., Schulte EC, et al. Investigating polygenic burden in age at disease onset in bipolar disorder: Findings from an international multicentric study. *Bipolar Disord* 2019, 21:68-75.**

- 50 Schulte EC, Kondofersky I, Budde M, et al. A novel longitudinal clustering approach to psychopathology across diagnostic entities in the hospital-based PsyCourse study. *Schizophr Res*, 2022, 244:29-38.
- 51 Kalman JL, Burkhardt G, Adorjan K, ..., Schulte EC. Biobanking in everyday clinical practice in psychiatry—The Munich Mental Health Biobank. *Front Psychiatry*, 2022, 13:934640.
- 52 Goncalves E, Thomas M, Behan, FM, ..., Garnett MJ. Minimal genome-wide human CRISPR-Cas9 library. *Genome Biology*, 2021, 22:40.
- 53 Doench JG, Hartenian E, Graham DB, et al. Rational design of highly active sgRNAs for CRISPR-Cas9-mediated gene inactivation. *Nat Biotechnol*, 2014, 32:1262-1267.
- 54 Consortium on Lithium Genetics. Variant GADL1 and Response to Lithium in Bipolar I Disorder. *The New England Journal of Medicine*, 2014, 370: 1857–1859.
- 55 Adams M, Ashwati S, Streit F, ..., Schulte EC, et al. Trans-ancestry genome-wide study of depression identifies 697 associations implicating cell types and pharmacotherapies. *Cell*, 2025, 188:640-652.
- 56 Burgold T, Karakoc E, Goncalves E, ..., Bassett A. Genetic interaction library screening with next-generation dual guide CRISPR system. *BioRxiv* 2024, doi: <https://doi.org/10.1101/2024.03.28.587052>.

10 Finanzplan

Jahr 1	
Verbrauchsmaterial (Stammzellmedien, Differenzierung von iCells, Klonierung, Viruspräparation)	15,000 €
scRNASeq zur Primärcharakterisierung und Qualitätskontrolle der iNeurone und iAstrozyten (3 Proben x 3,500 €; AP1)	7,000 €
Jahr 1 Summe	22,000 €
Jahr 2	
Verbrauchsmaterial (Stammzellmedien, Differenzierung von iCells, Klonierung, Viruspräparation, Antikörper, Reagenzien für molekularbiologische Validierung)	15,000 €
scRNAseq im Rahmen des Hochdurchsatzscreens sowie der Validierung (10 Proben x 3,500 €; AP2 & AP3)*	35,000 €
Jahr 2 Summe	50,000 €
Gesamtsumme	72,000 €

Über diesen Antrag sollen anteilig Verbrauchsmaterialien sowie Sequenzierungskosten für die hier dargestellten Arbeiten, welche von Lea Fischer und Fatima Mohammedalmugadam im Rahmen ihrer PhD Promotionen in der Arbeitsgruppe der Antragstellerin durchgeführt werden, finanziert werden. Beide Promotionsstellen sind über die Grundausstattung der Antragstellerin bzw. ein Promotionsstipendium des Deutschen Akademischen Austauschdienstes (DAAD) abgedeckt, jedoch stehen in beiden Fällen keine Gelder, die die eigentliche Laborarbeit abdecken, zur Verfügung. Eine Doppelförderung ist somit ausgeschlossen.