

University of Groningen

## Neurodevelopment, brain vasculature and schizophrenia

Puvogel Lütjens, Sofía

DOI:  
[10.33612/diss.582204366](https://doi.org/10.33612/diss.582204366)

**IMPORTANT NOTE: You are advised to consult the publisher's version (publisher's PDF) if you wish to cite from it. Please check the document version below.**

*Document Version*  
Publisher's PDF, also known as Version of record

*Publication date:*  
2023

[Link to publication in University of Groningen/UMCG research database](#)

*Citation for published version (APA):*  
Puvogel Lütjens, S. (2023). *Neurodevelopment, brain vasculature and schizophrenia*. [Thesis fully internal (DIV), University of Groningen]. University of Groningen. <https://doi.org/10.33612/diss.582204366>

### Copyright

Other than for strictly personal use, it is not permitted to download or to forward/distribute the text or part of it without the consent of the author(s) and/or copyright holder(s), unless the work is under an open content license (like Creative Commons).

The publication may also be distributed here under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license. More information can be found on the University of Groningen website: <https://www.rug.nl/library/open-access/self-archiving-pure/taverne-amendment>.

### Take-down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

*Downloaded from the University of Groningen/UMCG research database (Pure): <http://www.rug.nl/research/portal>. For technical reasons the number of authors shown on this cover page is limited to 10 maximum.*



## Chapter 7

---

### Appendices

- I Resumen en español
- II Nederlandse samenvatting
- III Acknowledgments
- IV Publications

## Resumen en español

La esquizofrenia es un trastorno mental que se origina durante el neurodesarrollo y que presenta una fisiopatología heterogénea. Diversas líneas de evidencia han sugerido la contribución del sistema nervioso y vascular a la patología cerebral de la esquizofrenia; sin embargo, los mecanismos celulares y moleculares que desencadenan y predicen la progresión de esta enfermedad siguen siendo desconocidos.

El tejido cerebral *post-mortem* de pacientes con esquizofrenia puede albergar información sobre los mecanismos celulares y moleculares involucrados en la progresión de la patología cerebral de la esquizofrenia. Por otro lado, el estudio de etapas tempranas del neurodesarrollo en la esquizofrenia podría ayudar a comprender mejor su etiología. Sin embargo, debido a la arquitectura poligénica de la esquizofrenia y la naturaleza particularmente humana de los rasgos asociados con la enfermedad, no existen modelos animales confiables para estudiar la esquizofrenia. Por lo tanto, el estudio de aspectos del neurodesarrollo relacionados con la esquizofrenia ha sido limitado. Avances recientes en las técnicas de cultivo de células madre han permitido la recapitulación de la neurogénesis humana utilizando células madre pluripotentes inducidas (hiPSC), lo que ha facilitado la investigación del neurodesarrollo humano en condiciones normales y patológicas.

En esta tesis, estudiamos las posibles alteraciones tempranas del neurodesarrollo en la esquizofrenia, utilizando neuronas derivadas de hiPSCs de donantes con esquizofrenia y pacientes control. Para investigar la neurogénesis fisiológica en adultos, y la posible contribución de la vasculatura cerebral a la fisiopatología de la esquizofrenia, se analizaron los perfiles de expresión génica de células individuales de tejidos cerebrales *post-mortem*.

El **capítulo 1** es una introducción a los capítulos siguientes. Aquí, mencionamos y describimos los diferentes tipos de células que forman el sistema nervioso central. Además, se da una breve descripción del desarrollo del sistema nervioso y la vasculatura cerebral en humanos. Luego, introdujimos la esquizofrenia y discutimos una selección de evidencia relevante que indica alteraciones tanto en el sistema nervioso como en la vasculatura cerebral de los pacientes con esquizofrenia. Finalmente, proponemos que la investigación acerca de aspectos del neurodesarrollo

y la heterogeneidad de la vasculatura cerebral asociada con la esquizofrenia podría contribuir a comprender la etiología y la progresión de esta enfermedad.

En el **capítulo 2**, investigamos la potencial neurogénesis que podría ocurrir durante la adultez humana en condiciones fisiológicas, perfilando la composición celular de la zona subependimaria *post-mortem* (SEZ) mediante la secuenciación de ARN de un solo núcleo (snRNAseq). Identificamos diferentes grupos celulares que expresaron genes marcadores de células madre neurales (NSC), pero ninguno de los grupos exhibió una expresión particular de genes relacionados con la proliferación, sugiriendo que las NSC en la SEZ adulta están inactivas.

La abundancia relativa de grupos de NSC se mantuvo estable entre la edad adulta temprana y media, lo que indica que el grupo de NSC en SEZ no se reduce durante esta ventana de tiempo. Sin embargo, la expresión de genes relacionados con el desarrollo del sistema nervioso fue mayor en la edad adulta temprana, sugiriendo que el desarrollo del sistema nervioso central podría continuar en la edad adulta temprana, disminuyendo al alcanzar la mediana edad. Además de los cambios transcripcionales asociados con la edad, la abundancia relativa de células progenitoras de oligodendrocitos (OPC) disminuyó junto con la edad, indicando que la composición celular de la SEZ humana cambia entre la edad adulta temprana y media.

Los perfiles transcripcionales de los distintos tipos de células identificados se utilizaron para evaluar si grupos celulares derivados de la neuroglía podrían verse potencialmente afectados por la variación genética asociada a diferentes trastornos del neurodesarrollo. En este contexto, identificamos varios subtipos neuronales enriquecidos en genes asociados con la esquizofrenia, incluyendo neuronas que expresan somatostatina, un grupo de neuronas que co-expresan *DLX6-AS1* con *RELN*, y dos tipos de interneuronas espinosas medianas. Por el contrario, los grupos que expresaron genes marcadores de NSC no exhibieron una expresión enriquecida en genes relacionados con la esquizofrenia. Estos resultados sugirieron que la variación genética relacionada con la esquizofrenia podría afectar negativamente el rendimiento de las neuronas ya diferenciadas, por sobre las células gliales o progenitoras.

En el **capítulo 3**, utilizamos cultivos derivados de hiPSC para modelar la neurogénesis humana y estudiar las posibles bases neuronales de las alteraciones en la

conectividad funcional cerebral asociadas con la esquizofrenia. Cuantificamos la expresión de genes relacionados con la maduración de sinapsis, registramos la actividad neuronal espontánea con imágenes de calcio, y adaptamos un análisis de conectividad funcional, diseñado previamente para estudiar la conectividad funcional de todo el cerebro, para cuantificar la conectividad funcional en estado de reposo a nivel neuronal. A lo largo del proceso de neurodiferenciación, las redes neuronales derivadas de pacientes con esquizofrenia exhibieron una mayor expresión de genes marcadores de sinapsis glutamatérgica, sugiriendo una potencial tendencia a desarrollar hiperexcitabilidad en la esquizofrenia.

Las redes derivadas tanto de pacientes control y con esquizofrenia adoptaron diferentes configuraciones de conectividad funcional, las cuales mostraron recurrencia durante el estado de reposo. Esto se asemeja a lo que se ha observado en el cerebro humano usando resonancia magnética funcional, técnica que presenta una resolución espacial y temporal mucho menor comparado con nuestra metodología *in-vitro*. La presencia de patrones de conectividad funcional dinámicos y recurrentes podría estar contribuyendo a un estado basal de actividad neuronal, proporcionando un punto de partida adecuado para responder de manera eficiente a un entorno cambiante. Sin embargo, las redes neuronales derivadas de pacientes con esquizofrenia exhibieron un repertorio reducido de configuraciones de conectividad funcional, en comparación a las redes control, y se presentaron más lentas para reorganizar diferentes configuraciones de conectividad, reflejando una disminución en el dinamismo y la flexibilidad de la conectividad funcional neuronal en estado de reposo asociada con la esquizofrenia. Es de destacar que las diferencias en la dinámica de conectividad funcional entre las redes neuronales derivadas de controles y pacientes con esquizofrenia siguieron la misma dirección de las diferencias en la dinámica de conectividad a nivel cerebral, previamente descritas, entre controles y pacientes con esquizofrenia. Los hallazgos descritos en este capítulo sugieren que las alteraciones en la dinámica comunicacional a nivel neuronal podrían contribuir a las alteraciones de la conectividad funcional cerebral en pacientes con esquizofrenia, al comprometer la capacidad de las redes neuronales de los pacientes para una reorganización rápida y eficiente a través de diferentes patrones de actividad.

En el **capítulo 4**, revisamos hallazgos recientes que reflejan la estructura y función de la vasculatura cerebral en la esquizofrenia. Discutimos evidencia derivada de diversas

metodologías, como análisis *post-mortem*, *in-vitro*, análisis de sangre y líquido cefalorraquídeo, técnicas de imagen, estudios genómicos y transcriptómicos. De acuerdo con la literatura revisada, en promedio, el 17% de los pacientes con esquizofrenia exhibe un aumento de la permeabilidad de la barrera hematoencefálica (BBB), reflejado por niveles más altos de albúmina en el líquido cefalorraquídeo. Los pacientes con esquizofrenia que también exhibieron elevados marcadores proinflamatorios, exhibieron alteraciones en la vasculatura cerebral y la permeabilidad de la BBB de manera más consistente que la población general con esquizofrenia. Sin embargo, no está claro si alteraciones intrínsecas en la vasculatura cerebral de los pacientes con esquizofrenia estaría conduciendo a la neuroinflamación, al facilitar la entrada de toxinas y células inmunitarias en el parénquima cerebral, o si un previo estado neuroinflamatorio estaría afectando negativamente el desempeño de la vasculatura cerebral y el funcionamiento de la BBB en la esquizofrenia.

En el **capítulo 5**, investigamos posibles alteraciones de las células que comprenden la BBB en tejido del cerebro medio *post-mortem* de pacientes con esquizofrenia, mediante análisis snRNAseq. La abundancia relativa de los diferentes tipos y subpoblaciones de células de la BBB fue similar entre el tejido derivado de pacientes con esquizofrenia y el tejido cerebral control, sugiriendo una conservación general de las proporciones celulares y los fenotipos de las células de la BBB en la esquizofrenia. Además, las diferencias transcripcionales entre el tejido control y el derivado de pacientes con esquizofrenia fueron limitadas y específicas a las células endoteliales y los pericitos, lo que sugiere que los distintos tipos de células de la BBB no se ven ampliamente afectados en el cerebro adulto de pacientes con esquizofrenia.

## Nederlandse samenvatting

Schizofrenie is een psychiatrische stoornis met een neurologische oorsprong en een heterogene pathofysiologie. Meerdere studies hebben gesuggereerd dat het zenuw- en vaatstelsel bijdragen aan de hersenpathologie van schizofrenie. Desalniettemin blijven de cellulaire en moleculaire mechanismen die de ontwikkeling van schizofrenie veroorzaken en voorspellen onbekend.

*Post-mortem* hersenweefsel van patiënten met schizofrenie kan informatie bevatten over de cellulaire en moleculaire mechanismen die betrokken zijn bij de ontwikkeling van de schizofrenie-hersenpathologie. Aan de andere kant kan het bestuderen van neurologische ontwikkeling bij schizofrenie helpen om de etiologie beter te begrijpen. Vanwege de polygene architectuur van schizofrenie en de mensspecifieke aard van de kenmerken die met de ziekte zijn geassocieerd, zijn er geen betrouwbare diermodellen voor schizofrenie. Daarom zijn studies die onderzoek doen naar de neurologische ontwikkelingen in schizofrenie schaars. Recente vorderingen in de technieken van het kweken van stamcellen maken het mogelijk om menselijke neurogenese te recapitulieren door middel van humaan geïnduceerde pluripotente stamcellen (hiPSC's). Deze ontwikkelingen maken het mogelijk om onderzoek te doen naar de neurologische ontwikkeling in mensen onder normale en pathologische omstandigheden.

In dit proefschrift hebben we onderzoek gedaan naar neurologische ontwikkelingen in mensen met schizofrenie en gezonde controles door gebruik te maken van uit hiPSC's ontwikkelde neuronen. Om de fysiologische volwassen neurogenese en de mogelijke bijdrage van het hersenvasculatuur aan de pathofysiologie van schizofrenie te onderzoeken, werd een eencellige genexpressieprofiel van *post-mortem* hersenweefsel uitgevoerd.

**Hoofdstuk 1** is een introductie voor de volgende hoofdstukken. Hierin worden de verschillende celsoorten die het brein vormen beschreven. Daarnaast wordt een korte beschrijving van de ontwikkeling van het zenuwstelsel en de vasculatuur van de hersenen gegeven. Verder wordt schizofrenie geïntroduceerd en wordt het relevante bewijs voor veranderingen in het zenuwstelsel en in de cerebrale vasculatuur in deze patiëntgroep besproken. Als laatste leggen we uit dat onderzoek naar de met schizofrenie geassocieerde neurologische ontwikkeling en heterogeniteit van

cerebrale vasculatuur kan bijdragen aan het begrijpen van de etiologie en progressie van deze ziekte.

In **hoofdstuk 2** wordt de fysiologische neurogenese in volwassenen onderzocht door de cellulaire compositie van *post-mortem* humane subependymale zone (SEZ) te profileren met single-nucleus RNA-sequencing (snRNAseq). Hiervoor hebben we verschillende cellulaire clusters geïdentificeerd die neurale stamcel (NSC) marker genen uiten. Echter vertoonde geen van de clusters specifieke expressie van profielatiegerelateerde genen, wat suggereert dat NSCs in de volwassen SEZ in rust zijn.

De relatieve aantallen van NSC-clusters waren stabiel tussen vroege en middelbare volwassenheid, wat wijst op het niet afnemen van de pool van SEZ NSC's gedurende dit tijdsbestek. Desalniettemin was de expressie van aan het zenuwstelsel gerelateerde genen verhoogd in de vroege volwassenheid, dit suggereert dat het zenuwstelsel doorontwikkeld in de vroege volwassenheid en dat deze ontwikkeling langzamer wordt in de middelbare volwassenheid. Naast de transcriptionele veranderingen geassocieerd met leeftijd nam ook de relatieve hoeveelheid van oligodendrocyte progenitor cellen (OPCs) af met leeftijd. Deze bevindingen wijzen op het veranderen van de cellulaire samenstelling van menselijke SEZ tussen vroege en middelbare volwassenheid.

Om te evalueren of sommige celtypen van de neuroglia-afstamming kunnen worden beïnvloed door genetische variatie geassocieerd met verschillende neurologische ontwikkelingsstoornissen werden de transcriptionele profielen van de geïdentificeerde celtypen gebruikt. In deze context hebben we verschillende neuronale subtypen geïdentificeerd die zijn verrijkt met genen die geassocieerd zijn met schizofrenie, waaronder somatostatine-neuronen, een cluster van neuronenvan die DLX6-AS1 samen met RELN tot expressie brengen, en twee soorten middelgrote stekelige interneuronen. Omgekeerd vertoonden de clusters die NSC-markergenen tot expressie brachten geen verrijkte expressie van aan schizofrenie gerelateerde genen. Deze resultaten suggereren dat genetische variatie gerelateerd aan schizofrenie eerder het functioneren van de al gedifferentieerde neuronenvan dan van glia- of progenitorcellen negatief zou kunnen beïnvloeden.



In **hoofdstuk 3** hebben we hiPSCs-afgeleide culturen gebruikt om neurogenese te modelleren en om de mogelijk neuronale basis van hersenfunctionele connectiviteitsstoornissen geassocieerd met schizofrenie te bestuderen. We hebben de expressie van genen die gerelateerd zijn aan synapsmaturatie gekwantificeerd, de neuronale activiteit met calcium beeldvorming geregistreerd en we hebben een functionele connectiviteitsanalyse aangepast om de functionele connectiviteit in rusttoestand op neuronaal niveau te kwantificeren. Deze laatste analyse was al eerder ontworpen om de functionele connectiviteit van de hele hersenen te bestuderen [1].

Tijdens het neurodifferentiatieproces vertoonden neuronale netwerken van schizofreniepatiënten een hogere expressie van glutamaterge synaps-markergenen. Dit suggereert dat het mogelijk zou kunnen zijn om hyper-exciteerbaarheid te ontwikkelen in schizofrenie.

Schizofrenie- en controlenetwerken namen verschillende en terugkerende functionele connectiviteitsconfiguraties aan tijdens de rusttoestand. Dit was te vergelijken met wat er was waargenomen in de beelden van het menselijk brein gemaakt met behulp van de functionele magnetische resonantiebeeldvorming (fMRI), wat wordt gekarakteriseerd door een veel lagere ruimtelijke en temporele resolutie dan onze in vitro methodologie. De aanwezigheid van de dynamische en terugkerende neuronale functionele connectiviteitsconfiguraties zou kunnen bijdragen aan een basale staat van neuronale activiteit, wat een geschikt startpunt biedt om efficiënt te reageren op een veranderende omgeving. Neuronale netwerken van patiënten met schizofrenie vertoonden echter een verminderd repertoire van functionele connectiviteitsconfiguraties en waren langzamer in het herschikken tussen verschillende connectiviteitsinstellingen, wat een verminderde dynamiek en flexibiliteit weerspiegelt van neuronale functionele connectiviteit in rusttoestand geassocieerd met schizofrenie. Van belang is dat de verschillen in functionele connectiviteitsdynamiek tussen de neuronale netwerken van patiënten met schizofrenie en gezonde controles dezelfde trend volgden als de eerder beschreven verschillen in connectiviteitsdynamiek in de rusttoestand van het hele brein tussen controles en patiënten met schizofrenie [1]. De bevindingen beschreven in dit hoofdstuk suggereren dat veranderingen in de communicatieve dynamiek op neuronaal niveau zouden kunnen bijdragen aan veranderingen in de functionele connectiviteit van de hersenen bij patiënten met schizofrenie. Dit doordat het

vermogen van hun neuronale netwerken om snelle en efficiënte reorganisatie door verschillende activiteitenpatronen wordt gecomprimeerd.

In **hoofdstuk 4** bespreken we recente bevindingen die de structuur en functie van de hersenvasculatuur in schizofrenie beschrijven. Hierin worden bewijzen afkomstig van diverse methodologieën, zoals *post-mortem*, *in-vitro*, bloed- en cerebrospinale vloeistofanalyses, beeldvormende technieken, genomische en transcriptomische studies besproken. Volgens de gereviewde literatuur vertoont gemiddeld 17% van de patiënten met schizofrenie een verhoogde permeabiliteit van de bloed-hersenbarrière (BBB), weerspiegeld door hogere niveaus van albumine in het hersenvocht. Patiënten met schizofrenie met een verhoogde pro-inflammatoire signatuur vertoonden veranderingen in het hersenvasculatuur en de doorlaatbaarheid van de BBB met meer consistentie dan de algemene schizofreniepopulatie. Het blijft echter onduidelijk of intrinsieke veranderingen in de hersenvasculatuur van patiënten met schizofrenie kunnen leiden tot neuro-inflammatie. Dit zou mogelijk kunnen komen doordat toxines en immuuncellen het hersenparenchym makkelijker kunnen binnen dringen, of doordat de voorafgaande neuro-inflammatie de hersenvasculatuur en het functioneren van de BBB in schizofrenie beïnvloed.

In **hoofdstuk 5** onderzochten we mogelijke veranderingen van de cellen waaruit de BBB bestaat in *post-mortem* middenhersenweefsel van schizofrenie met behulp van snRNAseq-analyse. De relatieve hoeveelheid van de verschillende BBB-celtypen en subpopulaties was vergelijkbaar tussen het weefsel van de patiënten met schizofrenie en de gezonde controles, wat suggereert dat de cellulaire verhoudingen en fenotypes van BBB-cellen bij schizofrenie over het algemeen behouden blijven. Daarnaast waren transcriptionele verschillen tussen de BBB van patiënten met schizofrenie en gezonde controles beperkt en specifiek voor ependymale cellen en pericyten, wat suggereert dat de celtypen van de BBB niet breed worden beïnvloed door schizofrenie.

## Acknowledgments

I want to thank the people who made this thesis possible, who helped me grow both personally and professionally during my PhD.

Because this work is part of a collaboration between the University of Groningen and the University of Chile, I had the privilege of being guided by four supervisors. Thanks **prof. dr. Iris E.C Sommer** and **prof. dr Bart. J.L Eggen**, for receiving me at the University of Groningen, for trusting and giving me time to adapt. Thanks both of you for your guidance, support and help. **Prof. dr. Verónica Palma** and **prof. dr. Magdalena Sanhueza**, thanks for your guidance, your dedication, for helping me to always be better, for enjoying each achievement. Thanks for doing science and educating with love.

Dear **Iris**, I admire your enthusiasm and charisma. Thanks for your trust and for making me a space in your group. You lead a wonderful group of scientists. **Bart**, thanks for your trust, your sense of humor and for welcoming me into your group. Thank you both for supporting and helping me to continue working here in the Netherlands.

**Vero**, thanks for your time and your love. Thanks for trusting me, for giving me a space in your lab and a welcome to science. I deeply appreciate your empathy and strength, your devotion to science and to education. Dear **Magda**, thank you for so many discussions, your advice and your commitment. I love your sincere and authentic personality. I deeply admire both of you, intelligent, sensitive and brave women.

In addition, I would like to thank **prof. dr. Maree Webster** and **prof. dr. Cynthia Weickert-Shannon** who also supervised much of the work presented in this thesis. It was very valuable for me to collaborate with you, thanks for your dedication and enthusiasm in doing science.

I want to thank all the members of the Chilean Thesis Committee, integrated by **prof. dr. Elías Utreras**, **prof. dr. Alexia Núñez**, **prof. dr. Juan Carlos Letelier** and **prof. dr. Francisco Abotiz**. They supervised and evaluated the part of this thesis that was carried out at Universidad de Chile. Thanks for your helpful thoughts and suggestions, and for always providing criticism in a very constructive way. I would also like to thank the members of the assessment committee, **prof. dr. Dineke Verbeek** and **prof. dr. Steven Kushner**, who critically read and approved my thesis.

I would like to thank the “**Agenica Nacional de Investigación y Desarrollo**”, “**Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile**”, the **University Medical Center Groningen**, the **Graduate School of Medical Sciences**, the **Research School of Behavioral and Cognitive Neurosciences**, the **Cock-Hadders Foundation** and the **Stanley medical research institute** for financial and administrative support.

The first two years of my PhD were lived at the laboratory of prof. dr. Verónica Palma and prof. dr. Magdalena Sanhueza, at the Faculty of Science of Universidad de Chile. I would like to thank all the members of both laboratories. Wonderful, welcoming, friendly and committed groups of people. I was very lucky to be part of the two laboratories and I treasure all the beautiful moments lived together. Thank you very much **Susi** for your care, dedication and for helping us maintain a harmonious and nice environment to work. Thanks **dr. Kris Blanchard**, I had a great time working with you. Thanks for everything you taught me about electrophysiology, calcium imaging and optics. I admire your entrepreneurship, your desire to learn and solve problems. Thanks **dr. Daniela Carrillo** and **dr. Bárbara Casas**, for your friendship, your advice and all the nice moments we shared. I have missed you girls. You are brave, committed, intelligent and wonderful women. I wish the best for you and your loved ones. Thanks **Pablo Lois** for your dedication and your patience. You supported and helped to take my first steps in the laboratory. I had a lot of fun with you and with your lovely daughter **Amandita**. Thanks **Ignacio Casanova** for being my friend, for always provide me with coffee, sugar, spoons and fun talks. Thanks to **Tomás Monteverde**, **Isaac Peña**, **Fabiola Raihuanque**, **David Arancibia**, **Ximena Vásquez**, **Nathaly Edwards**, **Edel Fernández**, **Delia Garrido**, **Andrea Villanueva**, **Sebastián Arizabalos** and all my colleagues at both laboratories for the helpful discussions and fun moments.

During the first year of the PhD I carried out a research unit at the Immunolab of the Faculty of Sciences, University of Chile. I would like to thank all its members, particularly to **prof. dr. Daniela Sauma** who supervised and taught me to work with mice, to use the cytometer and to analyze the data. Dear **Dani**, thank you very much for your guidance and for being so welcoming. I learnt and had a lot of fun at your lab. Thanks **Prof. dr. Maria Rosa Bono**, **Pamela Palma** and **Leonardo Vargas** for your support, guidance and many fun lunches. I would also like to thank **prof. dr.**

**Francisco Chávez** who guided me for the qualification exam. Thanks for your dedication, helpful discussions and for all the time you gave me.

During the last two years of the PhD, I was part of the group of prof. dr. Iris Sommer, at the section of Cognitive Neuroscience, and the laboratory of prof. dr. Bart Eggen, at the department of molecular neurobiology, University of Groningen. I am grateful of meeting goodwill and friendly people at both groups, who helped me to adapt and learn. I would like to specially thank **dr. Jan-Bernard Marsman, prof. dr. Branislava Curcic-Blake, dr. Marieke Begemann, dr. Sanne Brederoo, dr. Jeroen Jeneson, dr. Sanne Schuite-Koops, Hedwig Oosten, Bote Smid, Ramon, Trix van der Sluis-Rozema, Nieske Brower, Evelyn Wesseling, dr. Susanne Kooistra, dr. Inge Holtman, dr. Marina Trombetta, dr. Hilmar van Weering, dr. Michel Meijer, Astrid Alsema, Tiago Medeiros, dr. Laura Kracht, Takuya Oshima, Mirjam Koster, Anneke Miedema, dr. Chairi Misrielal, Wendy Oost, Marion Wijering, Sharon Brouwer, Sharon Eskandar, Jody de Jong, Jenny Borkent, Emile d'Angremont, Hugo Corona, Theresa Marschall, Sophie van Zonneveld, Franciska de Beer, Yinzhao Liu, Lan Zhou, Moni Germann, Bodyl Brand, Jesca de Jager, Zhihao Wang** and all my colleagues, superiors, administration and cleaning staff. All of you contribute creating a comfortable and efficient working environment.

**Astrid** and **Laura**, thank you for the helpful discussions, advices, support and nice moments shared together. I learnt a lot from you. I am grateful to you for helping me build the tools that later allowed me to function more independently in the laboratory. **Astrid**, I wish you a lot of fun traveling through South-America and in all the next professional and personal adventures. **Laura**, I wish the best for you and your family on the coming adventures in Vienna, enjoy your new job and living in such beautiful city. **Marina**, I am grateful of our friendship, it was so nice to meet you and share with you. I am going to miss you and I hope we will see each other soon. I wish the best for you, professionally and in your personal life. Thanks **Nieske** for all your support and for teaching me the nuclei isolation. I wish the best for you and your loved ones. **Takuya**, thanks for being so kind and offering me your help in the laboratory. I wish you the best in your PhD and in your life. Thanks **Susanne** and **Inge** for the good advices and helpful discussions during the moments I had to present at Tuesday's mornings. I admire your authentic and direct way. Dear **Trix**, thank you very much for

helping me solve many doubts, for organizing the meetings and always being so friendly and kind.

Dear **JB**, thanks for guiding me in the use of the server, for helping me install the programs and for answering my thousands of desperate emails. I wish the best for you, your family and its little members. **Brani**, thanks for the nice and fun talks. I like your personality, your authenticity and joy. Dear **Bote**, it was very nice shearing room with you. Thanks for guiding and helping me to improve the English of my manuscripts. Dear **Ramon** thanks for being so welcome, for your good advices, for teaching me about the Dutch culture and for your super tasty cheesecakes. **Theresa** and **Sophie**, I wish you the best in your professional and personal projects. It was always nice and fun to talk with you. **Dear Jenny, Emile, Hugo, Franciska, Sanne, Liu and Lan**, I am grateful to had shared room with you. I had a lot of fun and felt very welcome. **Jenny**, thank you very much for your friendship and for being my beautiful paranymp. I deeply admire your social skills. You are joyful and fun, thanks for the daily coffees and talks. I wish you the best finishing your PhD and in your personal life. Thank you so much for translating the summary of this thesis to Dutch. Dear **Emile**, I admire your relaxed and kind way of being. Thank you very much for continue visiting me after we moved to different offices. I hope we remain in contact. **Franciska**, you are very sweet and fun. I always enjoy sharing with you. Thanks for your advices, nice talks and shared coffees. Dear **Hugo**, I am grateful of meeting you and your family. Thanks for your friendship, advices, for all the candied peanuts and goduchi oil, which helped me survive the moments of greatest fatigue during the PhD. Many thanks for being my charming paranymp. My warmest wishes to you, **Andrea** and **Elisa**. I hope we continue visiting each other. **Liu**, thank you very much for your kindness and for all the food you provided me during the PhD. You always had some delicious things to share. I deeply appreciate it. Dear **Lan**, I enjoyed sharing with you, learning about China, and trying various delicious teas. I wish you success and joy during your PhD project. Thank you all for organizing a secret goodbye party for me, I felt loved and happy. Also, I would like to thanks **Zhihao**. We met at the end of our PhDs and you were very kind, helping me with the layout of the thesis. I wish you the best in your career and in your personal life.

Dear **Sanne** and **Marieke**, you are very fun and intelligent women and scientists. I would have liked to share more time with you. I wish the best to you and your families.

I would also like to thank my student **Wietse Reitsma**. Dear **Wietse**, thanks for trusting me and teaching me how to teach. I enjoyed working with you. I wish you the best in your new job and in all aspects of your life.

In addition, I thank my new supervisor, **prof. dr. Nael Nadif Kasri**, for receiving me in his laboratory as a postdoctoral researcher. I am excited and proud to work with you and your incredible group of people. Furthermore, during this new adventure we have been lucky to meet our dear Chilean friends, who have welcomed us in Nijmegen, **Ceci, Felix, Little Felix, Rafita, Coti, Benito** and **Carla**. It is beautiful that life brings us together in a land so far away.

Beyond my work environment, I also met beautiful people here in Groningen who have been very special during this journey and have made me feel at home. Dear **Fran** and **Ale**, thank you for welcoming us to the Netherlands, for being the Chilean embassy in Groningen. I deeply admire your energy and joy. Thanks **Lente, Vincenzo, Sole, Efrim** and **Lena** for your friendship. Thanks for your welcome, your love and your trust. Thanks for sharing and opening your hearts with us. **Marita**, thanks for your sweetness and affection. I am grateful of being your friend. Thanks for all the love you gave Lorenzo. I treasure many beautiful moments lived together and with the children. A big kiss for **Maconi** and **Alim**, and a hug for **Baubeck**. Thanks **Johana** and **Fabián**. I enjoyed singing, hearing music, eating Colombian food and drinking a lot of coffee with you. Best luck finishing the PhD and fulfilling your dreams. A big hug for **Juanjo** and my best wishes to all your loved ones.

Finally, and mainly, I want to thank my family, my mother **Bernardita**, my sister **Maje**, my husband **Daniel**, our son **Lorenzo**, and my aunts **Anita** and **Nena**. Dear **Anita** and **Nena**, I am infinitely grateful for the love you send us, especially to Lorenzo by keeping him warm with wool and vests during the cold winters in the Netherlands. I am also grateful for the love received from my family in law. Thanks **Xime** for your talented and warm hands that make precious woolen vests and scarves. They make me feel warm and look beautiful. Thanks **Eugenio** for having privileged relationship with Lorenzo's favorite superheroes, and for making his imagination fly. **Mom** and **Maje**, you have always loved and supported me, in the different paths I have taken in my life. I am deeply grateful for the efforts you make to visit us, for all the love you give to me, to Lorenzo and Daniel. Physically, we are very far away but our love is so strong that I see you present every day. Beautiful **sister**, thank you so much for the effort, time, and

enthusiasm you had while designing and drawing for this thesis. It looks marvelous, and it was super fun working together. From you I learn empathy, a precious skill. **Mamá**, thank you for giving and teaching us the purest and unconditional love. That boundless love gave me a beautiful childhood, self-confidence and a strong character to overcome difficulties, as well as to enjoy simplicity. I am so proud looking you empowered, strong and sensitive. I love how you are and I try to be as good mother as you. **Daniel**, we are partners, covering all possible meanings of this word. I love you, and I am in love with the life we decided to build. I am proud about how you are always growing, how you face the new challenges with optimism and enthusiasm. I deeply thank you the enormous amount of energy and dedication you give us every day, in each detail. Thanks for your love, your unconditional support and your joy. I feel happy and confident if it is by your side. The days and life feel warm with you. **Lorenzo**, gatito hermoso, thanks for arriving in the middle of this PhD. Actually, you were already there as from the beginning of this journey. I love you and I learn from you every day. You always make me move forward to be a better person. Thanks for the infinite love and joy that you give me, every day, every moment. Thanks for the toys that you share with me so I don't get "bored" at work, for your tight hugs and family kisses. You are in every of my thoughts and moves. Yo soy para ti.



## Publications

Puvogel S\*, Alsema A\*, Kracht L\*, et al. Single-nucleus RNA sequencing of midbrain blood-brain barrier cells in schizophrenia reveals subtle transcriptional changes with overall preservation of cellular proportions and phenotypes. *Mol Psychiatry*. 2022.

Puvogel S\*, Blanchard K\*, Casas B.S, et al. Altered resting-state functional connectivity in hi-PSCs-derived neuronal networks from schizophrenia patients. *Front Cell Dev Biol*. 2022 Aug.

Puvogel S, Palma V, Sommer I.E.C. Brain vasculature disturbance in schizophrenia. *Curr Opin Psychiatry*. 2022 May.

Puvogel S\*, Villanueva AA\*, Lois P, et al. The Netrin-4/Laminin  $\gamma$ 1/Neogenin-1 complex mediates migration in SK-N-SH neuroblastoma cells. *Cell Adh Migr*. 2019 Dec.

Villanueva AA, Sanchez-Gomez P, Muñoz-Palma E, Puvogel S, et al. The Netrin-1-Neogenin-1 signaling axis controls neuroblastoma cell migration via integrin- $\beta$ 1 and focal adhesion kinase activation. *Cell Adh Migr*. 2021 Dec.

