

Aus dem Institut für Neuropathologie  
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf  
Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Guido Reifenberger

**Charakterisierung rekombinant exprimierter Fragmente  
des „*Disrupted in Schizophrenia 1*“ (DISC1) Proteins  
sowie Generierung und Charakterisierung monoklonaler  
Mausantikörper gegen DISC1.**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der  
Medizin

Der Medizinischen Fakultät  
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Philipp Johannes Hendriks

2012

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der  
Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez. Univ.-Prof. Dr. med. Joachim Windolf  
Dekan

Referent: Prof. Dr. med. Carsten Korth  
Korreferent: Priv.-Doz. Dr. med. Axel Methner

Teile der Arbeit wurden bereits veröffentlicht:

Leliveld, S. R., P. Hendriks, et al. (2009). "Oligomer assembly of the C-terminal DISC1 domain (640-854) is controlled by self-association motifs and disease-associated polymorphism S704C." *Biochemistry* 48(32): 7746-55.

Leliveld, S. R., V. Bader, Hendriks, P., Prikulis, I. Sajnani, G. Requena, J. R. Korth, C. (2008). "Insolubility of disrupted-in-schizophrenia 1 disrupts oligomer-dependent interactions with nuclear distribution element 1 and is associated with sporadic mental disease." *Neurosci* 28(15): 3839-45.

# Inhaltsverzeichnis

<b>1.0. Einleitung</b> .....	<b>6</b>
1.1 Schizophrenie im Wandel .....	6
1.2 Schizophrenie - Erkenntnisse zur Pathogenese .....	8
1.3 Disrupted in Schizophrenia 1 (DISC1) als Risikofaktor für Schizophrenie .....	14
1.4 Genetik, Struktur, Expression von DISC1 .....	16
1.5 DISC1 als zentraler Interaktionspartner neuronaler Proteine – das DISC1 „Interaktom“ .....	21
1.6 Monoklonale Antikörper als Werkzeuge in der Proteinforschung .....	26
1.7 Zielsetzung und Hypothesen .....	28
<b>2.0 Material und Methoden</b> .....	<b>29</b>
2.1 Chemikalien .....	29
2.2 Unspezifische Proteinfärbungen .....	30
2.3 Polyacrylamid Gelelektrophorese (PAGE).....	31
2.3.1 SDS-PAGE .....	32
2.3.2 Native PAGE .....	33
2.4 Western-Blot.....	34
2.5 Herstellung von Gewebshomogenaten .....	36
2.6 Expression rekombinanter Proteine in Bakterien .....	37
2.6.1 Expresssion in E.coli Einschlusskörpern .....	38
2.6.2 Aufreinigung mit Nickel-NTA-Agarose .....	40
2.7. Zellkultur .....	41
2.7.1 Generierung monoklonaler Antikörper gegen DISC1 .....	42
2.7.2 Screening und Aufzucht von Klonen .....	44
2.7.3. Subklonierung von Hybridomazellen .....	46
2.7.4. Pflege und Kultur von Hybridomazellen .....	46
2.7.5. Kryokonservierung von Hybridomazellen .....	47
2.8 Expression in eukaryotischen Zellen .....	47
2.8.1 Transiente Transfektion humaner Zellen .....	48
2.8.2 Lyse der Zellen .....	49
2.9 Affinitätsaufreinigung von 3D4 .....	49
2.10 Immunopräzipitation .....	51

## Inhaltsverzeichnis

2.11 Immunochemie .....	52
2.11.1 Immunocytochemie.....	53
2.11.2 Immunohistochemie .....	54
2.12 Größenausschlusschromatographie.....	56
<b>3.0 Ergebnisse .....</b>	<b>58</b>
3.1 Zusammenfassende Übersicht.....	58
3.2 Monoklonaler Antikörper 3D4 im Western-Blot .....	59
3.3 Immunopräzipitation mit 3D4.....	61
3.4 Charakterisierung C-terminaler DISC1 Fragmente .....	61
3.4.1 Laufverhalten von rDISC640 Fragmenten in der PAGE und SEC.....	62
3.4.2 Detektion von rDISC640 durch 19F7 und 2C7 .....	63
3.5 Immunochemische Versuche mit 3D4 .....	66
<b>4.0 Diskussion .....</b>	<b>69</b>
4.1 Monoklonaler Mausantikörper 3D4 .....	69
4.2 Monoklonale DISC1 Antikörper 2C7 und 19F7 .....	70
4.3 C-terminale DISC1 Fragmente und deren Bedeutung .....	71
<b>5.0 Zusammenfassung.....</b>	<b>74</b>
5.1 Kurzversion Deutsch .....	74
5.2 Abstract English.....	75
<b>6.0 Anhang .....</b>	<b>76</b>
6.1 Literaturverzeichnis - Quellenangabe.....	76
6.2 Abbildungsverzeichnis .....	82
6.3 Abkürzungsverzeichnis.....	83
6.4 Kurzlebenslauf - Philipp J. Hendriks.....	85
6.5 Danksagung .....	86
6.6 Erklärung .....	86

### 1.0. Einleitung

#### 1.1 Schizophrenie im Wandel

Das Konzept der Schizophrenie als Krankheitsbild ist seit seiner Beschreibung durch Bleuler und Kraepelin in ständigem Wandel [1,2,3]. Obwohl die Schizophrenie seit dem letzten Jahrhundert als eigenständige Krankheitsentität aufgefasst wird, variieren die Parameter ihrer Definition in diesem Zeitraum ständig, abhängig von zur Verfügung stehenden diagnostischen Werkzeugen, Behandlungsoptionen, Abgrenzungsmöglichkeiten gegenüber anderen psychiatrischen Krankheitsbildern, sowie den zum jeweiligen Zeitpunkt vorherrschenden wissenschaftlichen Paradigmen [4]. Auch heute noch stützt sich die Diagnose der Schizophrenie hauptsächlich auf das klinische Interview. Obwohl über die Relevanz einzelner Kriterien im Hinblick auf die Diagnose "Schizophrenie" teilweise Uneinigkeit besteht, herrscht jedoch breite Zustimmung zu bestimmten klinischen Zeichen welche zur Diagnosestellung herangezogen werden können. Dazu gehören formale Denkstörungen, Halluzinationen, Ich-Störungen, Wahn, Störungen der Affektivität und der Psychomotorik, sowie Störungen des Trieb- und Sozialverhaltens [5].

Die Synthese der ursprünglichen Einteilungen durch Kraepelin, Bleuler und Schneider, hat zur heutigen Kategorisierung der Krankheitssymptome in Positiv- und Negativsymptome beigetragen [5,6]. Beispiele für Positivsymptome sind Wahnvorstellungen, Halluzinationen unterschiedlicher Qualität und Ich-Störungen, wie Gedankeneingebung oder Gedankenausbreitung. Dem gegenüber ordnet man Affektverflachung, Apathie, Anhedonie, Alogie, Asozialität und Aufmerksamkeitsstörungen den Negativsymptomen zu. Aktuelle Diagnosewerkzeuge wie der DSM-IV(-TR) und der ICD-10 berücksichtigen diesen Kriterienkatalog und legen Bedingungen für Auftreten und Dauer bestimmter Symptome fest, deren Erfüllung zur Diagnosestellung erforderlich sind [5,7]. Dabei kann die Ausbildung bestimmter klinischer Symptome bei verschiedenen Individuen sehr heterogen sein und bedingt die Einteilung der Erkrankung in mehrere klinische Subtypen, abhängig von denen zum Diagnosezeitpunkt prädominanten Symptomen.

## Kapitel 1 - Einleitung

Der DSM-IV unterscheidet hier beispielsweise den paranoiden, desorganisierten, katatonen, undifferenzierten und residualen Subtyp der Schizophrenie. Die klinischen Subtypen können hierbei bedeutende Unterschiede im Verlauf und „*Outcome*“ der Erkrankung aufweisen [4,8,9,10].

### Krankheitsverlauf

Der Verlauf der Schizophrenie wird oft sequentiell dargestellt, eingeteilt in mehrere Phasen. Zunächst beginnt häufig bereits im Kindesalter die *prämorbid* Phase mit bereits unspezifischen, kognitiven oder sozialen Einschränkungen. Es folgt die *prodromale* Phase mit einer potentiellen Symptomverstärkung, sowie einem möglichen Auftreten erster Positivsymptome. Der Krankheitsbeginn der Schizophrenie („*Onset*“) wird häufig definiert als der Zeitpunkt, an dem die erste Psychose klinisch manifest wird. Oft geschieht dies im jugendlichen Alter. Es können mehrere psychotische Episoden folgen, welche letztendlich in eine stabile *Plateauphase* münden, in der oft die Negativsymptomatik vorherrschend ist. Eine spontane Verbesserung der Symptomatik ist zu jedem Zeitpunkt der Erkrankung möglich [5,9,11].

Es muss beachtet werden, dass der Krankheitsverlauf in der klinischen Realität oft nicht dem eben genannten, starren Muster entspricht. Übergänge sind häufig fließend und das Erreichen der einen Phase hat nicht zwangsläufig die Progression in die nächste Phase zur Folge. Wie bereits angedeutet, zeigt eine Vielzahl an Patienten eine Verbesserung der Symptomatik im Krankheitsverlauf. Bis zu 25 % der Erkrankten erreichen mit Behandlung eine vollständige, psychopathologische Remission [11,12]. Insgesamt ist die Schizophrenie jedoch eine verheerende Erkrankung mit massiven sozialen und finanziellen Einschränkungen für Betroffene und deren Familien. Es muss daher ein Ziel sein, Ätiologie und Pathogenese der sich sehr heterogen präsentierenden Entität „Schizophrenie“ besser zu verstehen und Risikofaktoren aufzudecken, um eine möglichst frühzeitige Diagnose und Intervention zu ermöglichen.

### **1.2 Schizophrenie - Erkenntnisse zur Pathogenese**

Bis heute sind Ätiologie und Pathogenese der Schizophrenie unklar und teilweise heftig umstritten. Dies liegt vor allem an der Komplexität der Erkrankung und den bisher kaum fassbaren Veränderungen im Zentralnervensystem von Schizophreniepatienten und prämorbidem Probanden. Im Gegensatz zu den klassischen, neurodegenerativen Erkrankungen wie Morbus Alzheimer und Morbus Parkinson, sind die Veränderungen von Anatomie und Zytoarchitektur bei der Schizophrenie viel subtiler [22]. Es gibt jedoch neuroanatomische, funktionelle, genetische und epidemiologische Befunde, welche mit Schizophrenie assoziiert sind und zum Verständnis der Entstehung beitragen könnten. Bereits seit über zwei Dekaden wird eine neue Hypothese zur Entstehung der Schizophrenie diskutiert. Diese „*Neurodevelopmental Hypothesis*“ der Schizophrenie basiert auf Beobachtungen verschiedener, einzeln betrachtet subtiler Veränderungen in Schizophreniepatienten [23,24,25]. Die beobachtbaren Merkmale der Schizophrenie könnten demnach unter anderem Ergebnis einer gestörten, neuronalen Konnektivität und synaptischer Dysfunktionen sein, welche sich in verschiedenen Entwicklungsphasen des ZNS ausbilden und die Empfänglichkeit eine Schizophrenie zu entwickeln erhöhen. Ursächlich dafür sollen zum Einen genetische und zum Anderen Umwelteinflüsse, wie z.B. intrauterine Virusinfektionen sein [26,27].

#### **Neuroanatomische Befunde**

Die beobachtbaren, neuroanatomischen Veränderungen bei Schizophrenie sind allenfalls subtil und nicht immer konsistent. Untersuchungen mit Hilfe der strukturellen Magnetresonanztomographie (sMRI) und postmortem Analysen, ergaben in den letzten zwei Dekaden eine Fülle von neuroanatomischen Befunden unterschiedlicher Relevanz [28]. Nicht eindeutig geklärt ist hierbei der Einfluss der psychiatrisch-pharmakologischen Therapie auf strukturelle Hirnveränderungen und die Frage nach einer etwaigen, lebenslangen Progression der zerebralen Alterationen [29]. Jedoch sind zumindest einige der sMRI Befunde bereits zu Beginn der Krankheit und auch vor Krankheitsausbruch, also therapieunabhängig nachweisbar. Als weitläufig akzeptiert gilt heute eine Volumenreduktion des Hirns insgesamt, sowie eine ventrikuläre Größenzunahme vor allem der Seitenventrikel.

## Kapitel 1 - Einleitung

Betrachtet man die Volumenreduktion des ZNS detaillierter, sind hier die Regionen des Temporallappens, insbesondere Hippocampus, Amygdala und superiorer, temporaler Gyrus (STG), der Thalamus, der präfrontale und orbitofrontale Neokortex, sowie der anteriore, zinguläre Kortex betroffen. Abnorm dicke Kortexregionen, Veränderungen der Gyriifikation sowie verminderte Hirnasymmetrie konnten ebenfalls beobachtet werden. Weiterhin fallen histopathologisch abnormale Neuronenverteilungen im enterorhinalen Kortex, in der weißen Substanz des Neokortex, sowie der parahippocampalen und temporalen Regionen auf. Zusätzlich weisen Neuronen des Hippocampus sowie des Neokortex ein leicht reduziertes Volumen auf. Diese Neuronenpopulationen zeigen ebenfalls weniger dendritische Dornen und eine schwächer ausgeprägte, axonale Verästelung. Auch die Dichte der Parvalbumin-Immunoreaktiven Interneurone und die Zahl an Oligodendrozyten in diesen Regionen ist herabgesetzt [30]. Solche Befunde weisen auf eine Reduktion des Neuropils insgesamt hin [22,25,28]. Man muss jedoch beachten, dass viele dieser recht heterogenen Beobachtungen auf Studien mit relativ kleinen Fallzahlen beruhen.

### **Funktionelle Befunde - Neuroimaging**

Die funktionelle Magnetresonanztomographie (fMRI) ist ein bildgebendes Verfahren zur Messung neuronaler Aktivität anhand der „*Blood Oxygen Level Dependancy*“ Methode (BOLD) [31]. Es dient unter Anderem der Integration neurobiologischer Befunde mit klinisch messbaren Daten zur Hirnfunktion und ist ein hilfreiches Werkzeug zum Verstehen neurologischer und neuropsychiatrischer Erkrankungen [32]. Studien mit diesem Verfahren zeigen bei Schizophreniepatienten verminderte neuronale Aktivität des präfrontalen Kortex, hier insbesondere des dorsolateralen Anteils (DLPFC), sowie des Temporallappens. Abnorme Aktivitätsmuster des zingulären Kortex sind ebenfalls beschrieben worden [28]. Ähnlich Befunde konnten auch bei Patienten im Prodromalstadium der Schizophrenie und bei gesunden Verwandten erhoben werden [28,33].

## Kapitel 1 - Einleitung

In weiteren Untersuchungen mit der „*Diffusion Tensor Imaging*“ Methode (DTI), ein bildgebendes Verfahren zur Analyse von neuronalen Projektionen *in-vivo*, konnte man auch eine verminderte funktionelle Konnektivität zwischen verschiedenen Hirnregionen wie Hippocampus und präfrontalem Kortex aufzeigen [28,34]. Studien mit der H1 Protonen Magnetresonanzspektroskopie (H1MRS), ein *in-vivo* Verfahren zur Konzentrationsmessung von chemischen Metaboliten wie N-Acetylaspartat (NAA), haben eine Verringerung von NAA in Gebieten ausgemacht, welche bereits zuvor mit strukturellen und funktionellen Veränderungen assoziiert wurden [28,35,36]. Dabei gilt NAA, welches fast exklusiv im Gehirn nachzuweisen ist, als putativer Marker für neuronale Integrität [28,37].

### **Funktionelle Befunde - Rezeptorsysteme**

Die Wirkungsweise der zur Therapie der Schizophrenie hauptsächlich genutzten „*Antipsychotika*“, hat zur Entwicklung mehrerer, pharmakologisch begründeter Hypothesen bezüglich der Pathophysiologie der Schizophrenie geführt. Die „*Dopamin Hypothese*“ postuliert eine abnorm hohe, dopaminerge Signaltransduktion in Teilen des striatalen und mesolimbischen Systems, mit zusätzlicher Dopaminverarmung in präfrontalen Hirnarealen [38]. Diese Theorie wird gestützt durch die Beobachtung, dass eine durch einige „*Antipsychotika*“ ausgelöste Dopamin D2 Rezeptorblockade zu einer Reduktion der positiven Symptomatik der Schizophrenie führt, sowie durch die Feststellung, dass Schizophreniepatienten eine erhöhte Dopamin D2 Rezeptordichte in spezifischen Hirnarealen aufweisen [38]. Antagonisten von exzitatorischen, glutamatergen N-methyl D-Aspartat (NMDA) Rezeptoren wie Ketamin oder Phencyclidin (PCP), können psychotische Symptome hervorrufen die analog auch bei der Schizophrenie zu finden sind. Zudem können sie auch eine starke Dopaminausschüttung auslösen [39]. Übereinstimmend damit, postuliert die „*Glutamat Hypothese*“ eine Hypofunktion glutamaterger Projektionen in striatale Gebiete, mit nachfolgender verstärkter, dopaminergem D2 Transduktion im Sinne eines „*geöffneten Tores*“ [38].

## Kapitel 1 - Einleitung

D-Aminosäureoxidaseaktivator (DAOA / G72) gilt als möglicher Suszeptibilitätsfaktor für eine Schizophrenie. DAOA / G72 aktiviert dabei D-Aminosäureoxidase (DAO) welche verschieden D-Aminosäuren, darunter auch D-Glutamat, oxidiert und damit für die Signaltransduktion inaktiviert [40,41]. Es wurde postuliert, dass Schizophreniepatienten vermehrt DAOA / G72 im dorsolateralen, präfrontalen Cortex (DLPFC) exprimieren [38,41]. Post mortem Analysen an Hirngewebe von Schizophreniepatienten zeigten ebenso eine mögliche Involvierung des GABAergen Transmittersystems ( $\gamma$ -Aminobuttersäure / GABA). So wurden dort veränderte Expressionslevel einer 67 kDA GAD Isoform (Glutaminsäuredecarboxylase / GAD) gefunden, dabei ist GAD ein Schlüsselenzym der GABA Synthese [38].

### **Genetische Befunde**

Zwillings und Adoptionsstudien zeigten bereits früh eine Erbllichkeit der Schizophrenie auf [14,15]. Genetische Kopplungsstudien an Familien und Assoziationsstudien an größeren Populationen, haben im Verlauf der letzten Jahre mehrere, interessante Kandidatengene unterschiedlicher Evidenzstärke identifiziert, welche mit einem Risiko für psychiatrischen Erkrankungen wie der Schizophrenie assoziiert sind [42]. Viele der beschriebenen Gene und deren Produkte spielen zentrale Rollen in der neuronalen Regulation, Entwicklung und Signaltransduktion. Beispiele sind Neuregulin 1 (NRG1), Catechol-O-Methyltransferase (COMT), Dysbindin (DTNBP1) und D-Aminosäureoxidaseaktivator (DAOA / G72) [43,44]. Darüber hinaus sind noch eine Vielzahl hier nicht genannter Gene als potentielle Risikofaktoren beschrieben worden [42]. Generell lässt sich aber festhalten, dass eine Assoziation einzelner Gene zur Schizophrenie meist relativ schwach ausfällt. Erst das Zusammenspiel mehrerer Risikofaktoren im Sinne einer multifaktoriellen Genese, würde die Pathogenese der komplexen Erkrankung Schizophrenie erklären können. Ein alternativer, genetischer Ansatz zu klassischen Kopplungsanalysen und Assoziationsstudien, welche in der Vergangenheit oft inkonsistente Ergebnisse bezüglich Risikofaktoren geliefert haben, ist das zytogenetische Screening. Dabei werden Familien in denen häufig z.B. psychiatrische Krankheitsbilder zu sehen sind, systematisch auf Veränderungen des Karyogramms hin untersucht.

## Kapitel 1 - Einleitung

Damit eröffnet sich die Möglichkeit, mikroskopisch sichtbare Chromosomenaberrationen direkt mit klinischen Befunden in Verbindung zu setzen. Im Rahmen der Untersuchung einer großen, schottischen Familie mit einem breiten Spektrum an mentalen Erkrankungen, fand man eine balancierte Translokation (1;11)(q42.1;q14.3), bei Familienmitgliedern mit psychiatrischen Diagnosen [18,45,46,47].

### **Umwelteinflüsse in utero**

Die Bedeutung von in-utero Umwelteinflüssen auf die Entstehung psychiatrischer Erkrankungen wie der Schizophrenie ist weitestgehend unklar. Relevant für die Pathogenese der Schizophrenie könnten Schwangerschaftskomplikationen sein, welche zu einer chronischen Hypoxie, akuten Asphyxie oder Ischämie des Kindes führen [25]. Weiterhin wurde die Rolle intrauteriner Virusinfektionen, beispielsweise durch Influenza diskutiert [26,27]. Als deren Folge könnte es im Rahmen einer abweichenden, maternalen Immunantwort zu einer verstärkten Zytokinausschüttung kommen, insbesondere für Interleukin-8. Dabei weisen Kinder von Müttern welche im zweiten Trimester der Schwangerschaft erhöhte Interleukinspiegel zeigen, ein erhöhtes Risiko für Schizophrenie auf [48]. Rosso et al. beschrieben, dass es durch ischämischen Kindsschaden während der Schwangerschaft zu einem Neuronenverlust im Hippocampus kommen kann [49]. Gilmore et al. wiederum zeigten eine Inhibierung von dendritischem Wachstum durch Zytokinexposition von neuronalen Zellen *in vitro* [50].

### **Zusammenfassung**

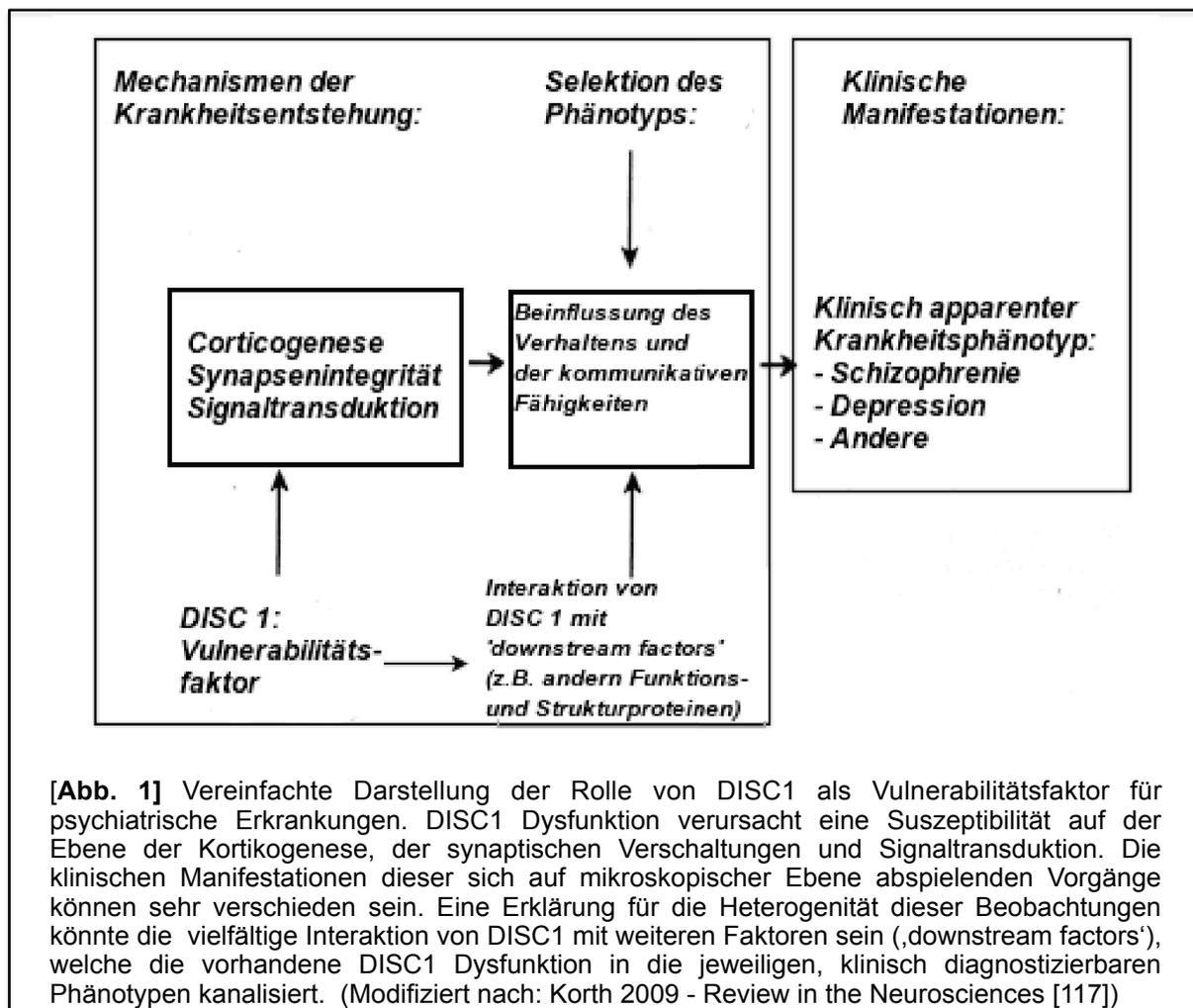
Ätiologie und Pathogenese der Schizophrenie sind überaus komplex und in vielen Zusammenhängen noch unklar. Zusätzlich zu den bereits diskutierten Befunden werden die soziale Herkunft sowie Substanzmissbrauch als Risikofaktoren der Krankheit diskutiert [14,28]. Es stellt sich die Frage, ob die Schizophrenie tatsächlich eine einzelne „*Krankheit*“ repräsentiert oder nur klinische Erscheinung vieler, in der Konsequenz ähnlicher Erkrankungen mit molekularbiologisch überlappenden Ursachen ist [14].

## Kapitel 1 - Einleitung

Die Mehrzahl der Befunde deuten jedoch in eine Richtung. So ist die Schizophrenie mit hoher Wahrscheinlichkeit eine Erkrankung multifaktorieller Genese mit einem sehr hohen Anteil genetischer Ursachen [14]. Viele, im einzelnen Betrachtet vielleicht unbedeutende, neuronale „*Läsionen*“ während der Hirnentwicklung, erhöhen die Wahrscheinlichkeit einer Schizophrenie. Die genetischen Komponenten könnten hier mit den verschiedenen, adversen Umwelteinflüssen interagieren und sich potenzieren. Sie könnten so über 80 % des Risikos für eine Schizophrenie ausmachen [13,14,15,25]. Für eine „*Neurodevelopmental Hypothesis*“ spricht, dass die meisten der besprochenen Befunde mit größter Wahrscheinlichkeit Folge einer gestörten, zerebralen Entwicklung sind und bereits vor dem klinischen Ausbruch der Erkrankung erhoben werden können.

Viele der bisher beschriebenen *in-vivo* Befunde, stellen „*intermediäre Phänotypen*“ (Endophänotypen) der Schizophrenie dar. Endophänotypen sind vererbliche, meist quantitativ messbare Eigenschaften, welche in klinischen Routineuntersuchungen oft nicht erkannt werden können und mit etablierten, klinisch fassbaren Merkmalen der Erkrankung wie z.B. kognitiver Dysfunktion oder Beeinträchtigung des Arbeitsgedächtnisses korrelieren [14,22,33]. Somit kann die komplexe „*Entität*“ Schizophrenie mit messbaren Merkmalen verknüpft werden, die jeweils objektiv fassbare Teilaspekte der Erkrankung darstellen, die sich einfacher untersuchen lassen. In neuerer Zeit wurde die Schizophrenie als „*Erkrankung der Synapse*“ bezeichnet [44,51,52]. Wie bereits dargelegt, sind synaptische Dysfunktionen und veränderte Konnektivität wichtige Auffälligkeiten, so dass diese Bezeichnung in gewissem Maße gerechtfertigt ist. Das sich die molekulare Pathologie jedoch nur an den Synapsen abspielt ist unwahrscheinlich (Siehe Abb.1 Seite 14).

Die Identifikation molekularer Protagonisten bei der Ätiologie und Pathogenese der Schizophrenie ist eines der wichtigsten Ziele der aktuellen Forschung. Der genetische Ansatz hat dabei zuletzt die Aufmerksamkeit auf verschiedene Kandidatengene und deren Genprodukte gelenkt. Viele dieser Produkte sind wichtige Interaktionspartner in der neuronalen Entwicklung und Signaltransduktion und lassen auf bedeutende Einblicke in die molekularen Vorgänge der Krankheitsentstehung hoffen.



### 1.3 Disrupted in Schizophrenia 1 (DISC1) als Risikofaktor für Schizophrenie

Langzeitbeobachtungen einer großen schottischen Familie in der häufig psychiatrische Erkrankungen wie Schizophrenie, Bipolare Erkrankungen und Depressionen vorkommen, zeigten einen Zusammenhang zwischen einer balancierten Translokation (1;11)(q42.1;q14.3) und der Entwicklung solcher Krankheitsbilder. Achtzehn von 29 der Translokationsträger entwickelten im Laufe der Zeit eine psychiatrische Erkrankung, wohin gegen keines der Familienmitglieder ohne Translokation eine solche Diagnose erhielt [45,46,53]. Auch Translokationsträger ohne klinische Diagnose einer psychiatrischen Erkrankung sind in einem Endophänotypen auffällig. Das *P-300 Ereignisbezogene Potential* („*P-300 event-related potential*“, P-300 ERP) ist ein elektroenzephalographisches Verfahren, das zur Messung von Aufmerksamkeit und Arbeitsgedächtnis verwendet werden kann.

## Kapitel 1 - Einleitung

Die Latenzzeit dieses elektrophysiologischen Potentials ist in Schizophreniepatienten, ebenso in einem gewissen Anteil der klinisch gesunden Verwandten verzögert [28,47]. Genetische Kopplungsstudien an finnischen, taiwanesischen, britischen und isländischen Populationen, zeigten unabhängig positive Ergebnisse bezüglich Schizophrenie für verschiedene Loci, inklusive des von der schottischen Translokation betroffenen Locus auf Chromosom 1 [54-61].

Nachfolgend wurden in genetischen Assoziationsstudien mehrere Singuläre Nukleotidpolymorphismen beschrieben („*Single Nucleotide Polymorphisms*“ - SNPs), welche mit Schizophrenie und anderen psychiatrischen Erkrankungen in Verbindung stehen [18]. Einer der am besten untersuchten ist der S704C SNP in Exon 11 des DISC1 Gens. Japanische Träger der C704 Variante dieses Polymorphismus wiesen im Gegensatz zu S704 Homozygoten, anatomische Veränderungen des cingulären Kortex und abnorme weiße Substanz im präfrontalen Kortex auf [62]. Eine schottische Studie von Thomson et al. zeigte eine geschlechtsspezifische Korrelation der C704 Variante in Bezug auf kognitive Fähigkeiten im Alter. Gesunde, 79 Jahre alte, homozygote Trägerinnen dieser Variante wiesen insgesamt signifikant schlechtere kognitive Leistungen auf als die gleichaltrigen, männlichen Träger [63].

Eine Untersuchung nordamerikanischer Probanden durch Callicott et al., ergab kognitive Einbußen und verminderte graue Substanz bei homozygoten Patienten und gesunden Trägern einer S704 Variante [64]. Erst kürzlich demonstrierten Di Giorgio et al. einen Zusammenhang des S704C SNPs mit hippocampaler Funktion [65]. Monozygote, gesunde Probanden zeigten in der funktionellen Magnetresonanztomographie (fMRI) vermehrte Aktivität, sowie ein vergrößertes Volumen des Hippocampus. DeRosse et al. konnten darüber hinaus Hinweise für einen Zusammenhang des S704C SNPs mit dem Risiko für positive Symptome in Schizophreniepatienten herstellen [66].

### 1.4 Genetik, Struktur, Expression von DISC1

#### Genetik von „Disrupted in Schizophrenia 1“

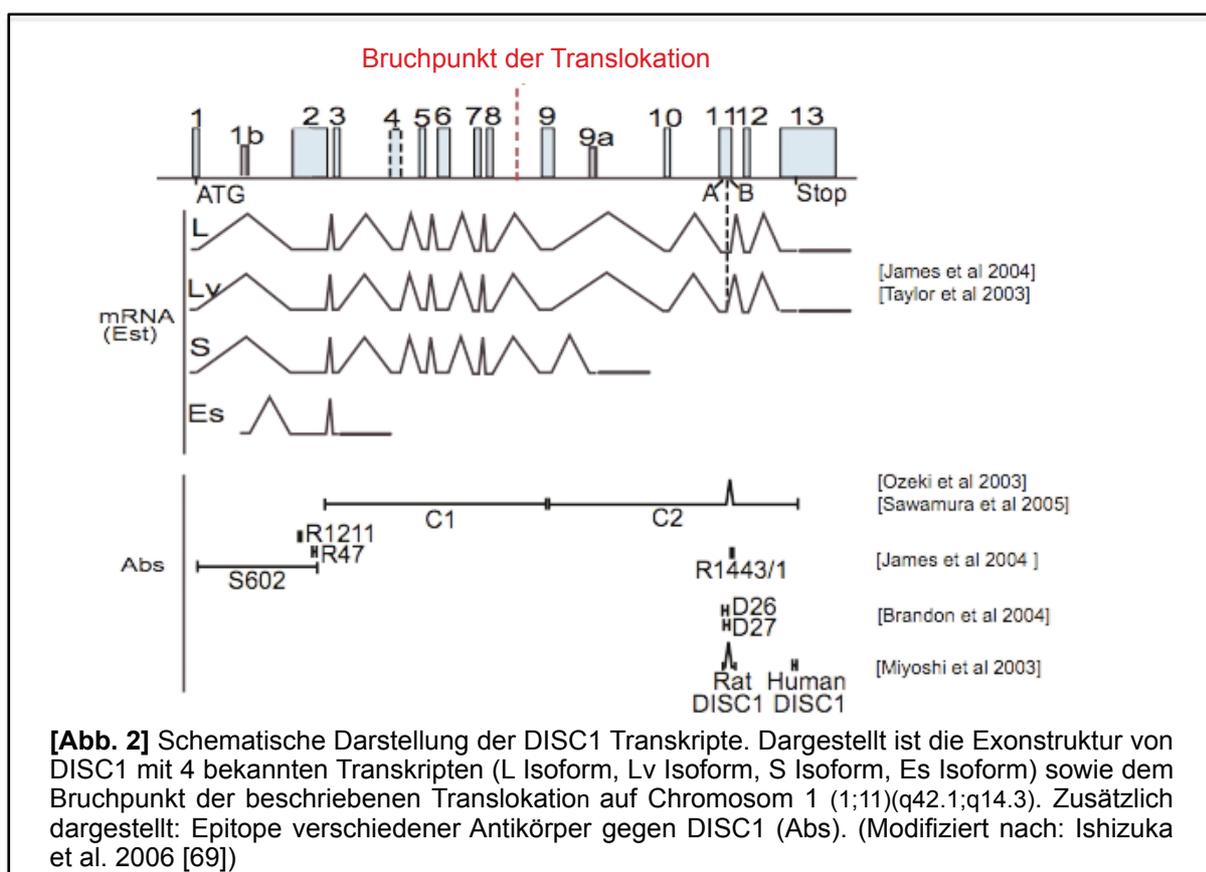
Nach zytogenetischen Untersuchungen einer großen, schottischen Familie wurden auf dem langen Arm von Chromosom 1 (1q42), am Bruchpunkt einer balancierten Translokation (1;11)(q42.1;q14.3) 2 Gene sequenziert, welche als DISC1 und DISC2 bezeichnet wurden, wobei DISC2 auf dem zu DISC1 komplementären DNA-Strang zu finden ist und DISC1 innerhalb dessen Exon 9 überlappt [18,53,67]. DISC1 umfasst insgesamt etwa 415 kb genomischer DNA und beinhaltet 13 Exons. Das komplette Transkript umfasst etwa 7,5 kb. Die genomische Sequenz von DISC1 scheint in allen untersuchten Spezies zumindest teilweise konserviert zu sein, jedoch wurden auch Interspeziesunterschiede beschrieben [18,68]. Insgesamt ist die genomische Prozessierung von DISC1 überaus komplex. Spleißmechanismen und posttranslationale Modifikationen sind weitestgehend unbekannt. Es sind jedoch vier, durch alternatives Spleißen entstehende Isoformen des humanen DISC1 beschrieben. Diese werden als „Long“ (L Isoform), „Long Variant“ (Lv Isoform), „Short“ (S Isoform) und „Extremely Short“ (Es Isoform) bezeichnet [18,69] (Siehe Abb. 2 Seite 17). Im Gegensatz zu DISC1 konnte bisher kein entsprechendes Proteinprodukt für DISC2 gefunden werden. Es wurde vorgeschlagen, dass DISC2 als nichtkodierendes RNA Molekül in der Genregulation von DISC1 im Sinne eines „*Antisense-RNA Mechanismus*“ eine Rolle spielen könnte [53,67,70]. Im Gegensatz zu Chromosom 1, wurden am Bruchpunkt des Chromosoms 11 (11q14.3) bisher keine betroffenen Gene beschrieben. Zhou et al. zeigten jedoch jüngst die Möglichkeit der Entstehung neuartiger Fusionstranskripte von DISC1 und „*CK000409*“. Die Funktionen dieses Gens sind bisher unbekannt. Es wurde jedoch bereits mit erhöhtem Risiko für Depressionen („*Major Depression*“) assoziiert [71].

#### DISC1 Proteinstruktur

Die vier bekannten, humanen DISC1 Transkripte lassen vier Proteinisoformen (L = 845 AS / ~100 kDa; Lv = 823 AS / ~98 kDa; S = 678 AS / ~75 kDa; Es = 369 AS / ~39 kDa) vermuten.

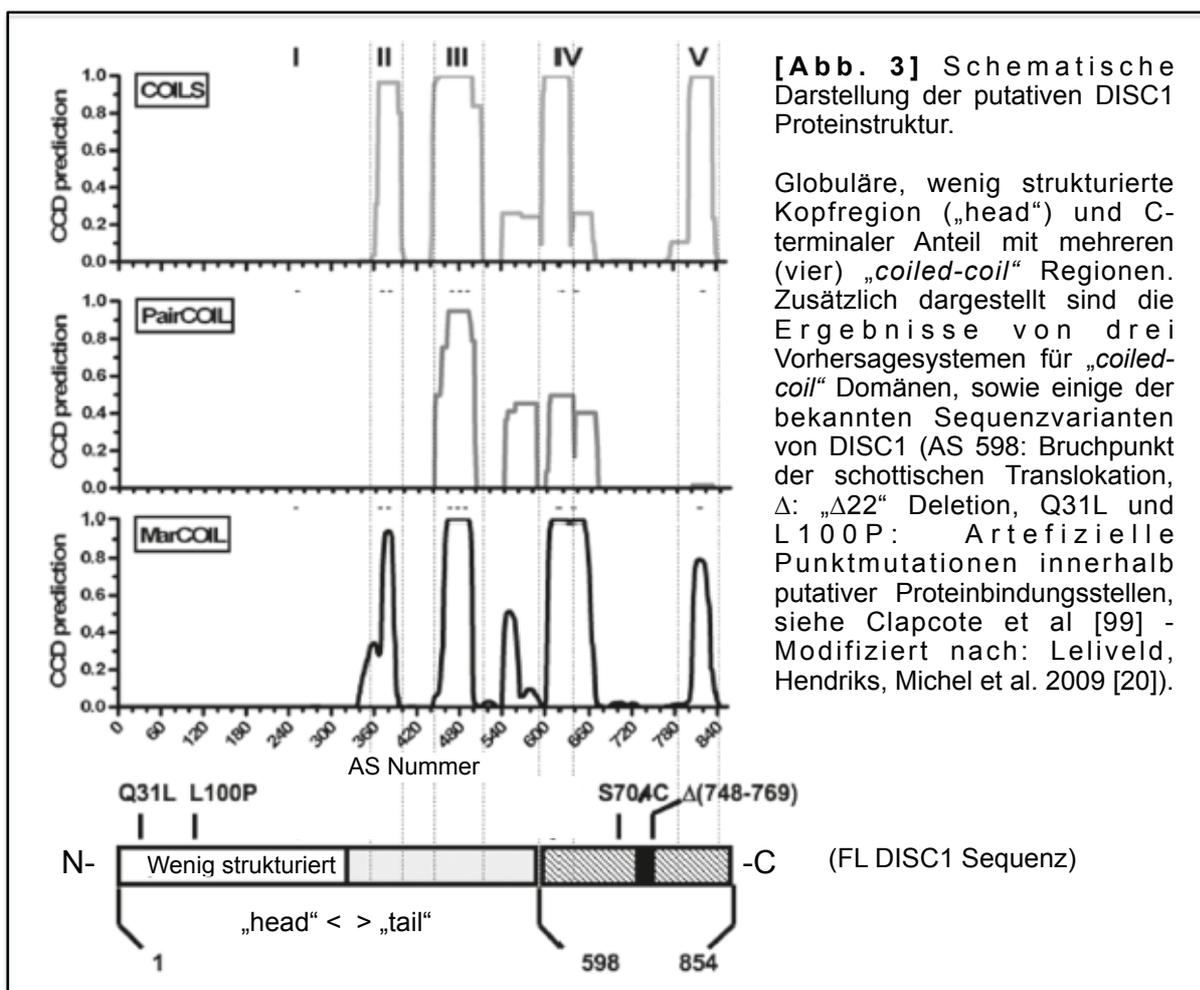
## Kapitel 1 - Einleitung

In der Tat konnten mit polyklonalen Antikörpern gegen humanes DISC1, mehrere Isoformen in Zellkultur und menschlichen Geweben nachgewiesen werden, welche in etwa den vorhergesagten Molekularmassen entsprechen. Hochmolekulare Isoformen (größer 150 kDa) entsprechen wahrscheinlich Oligo-/Multimeren von DISC1 Isoformen [69]. Die tatsächliche Anzahl an existierenden DISC1 Isoformen, besonders im Hinblick auf unterschiedliche, posttranslationale Modifikationen ist jedoch noch unklar. Mittlerweile sind einige, polyklonale DISC1 Antikörper beschrieben, welche mehr als die ursprünglich 4 vorausgesagten Isoformen aufgezeigt haben [69]. Das DISC1 Protein voller Länge (Full-Length DISC1, FL DISC1 – entspricht der L Isoform) besteht aus einer globulären, N-terminalen Region und dem C-Terminus, mit vier vorhergesagten „*coiled-coil*“ Domänen. Dabei ist die N-terminale Region weniger gut strukturiert als die C-terminale [18,19,20,68].



## Kapitel 1 - Einleitung

Das Protein weist zudem verschiedene, potentielle Bindungsstellen für putative Interaktionspartner auf, wobei die C-terminalen „coiled-coil“ Domänen und eine SH3 Domäne („Src of Homology 3“) eine besondere Rolle in Hinsicht auf eventuelle Funktionen spielen könnten [18]. Ähnliche Strukturen wurden in anderen Proteinen bereits als wichtige Elemente der Proteininteraktion und Signaltransduktion identifiziert [72,73] (Siehe Abb. 3 Seite 18).



### DISC1 Expression

DISC1 Expression auf RNA- und Proteinlevel konnte in mehreren Geweben, darunter Herz, Gehirn, Plazenta, Niere, Leber, Hoden und Pankreas nachgewiesen werden [18]. Durch RNA in-situ Hybridisierung und Northern-Blot Analysen, zeigte sich eine ubiquitäre Expression von DISC1 Transkripten in großen Teilen des Zentralnervensystems. Besonders ausgeprägt ist hierbei die Expression im Hippocampus, genauer im Gyrus Dentatus [74,75].

## Kapitel 1 - Einleitung

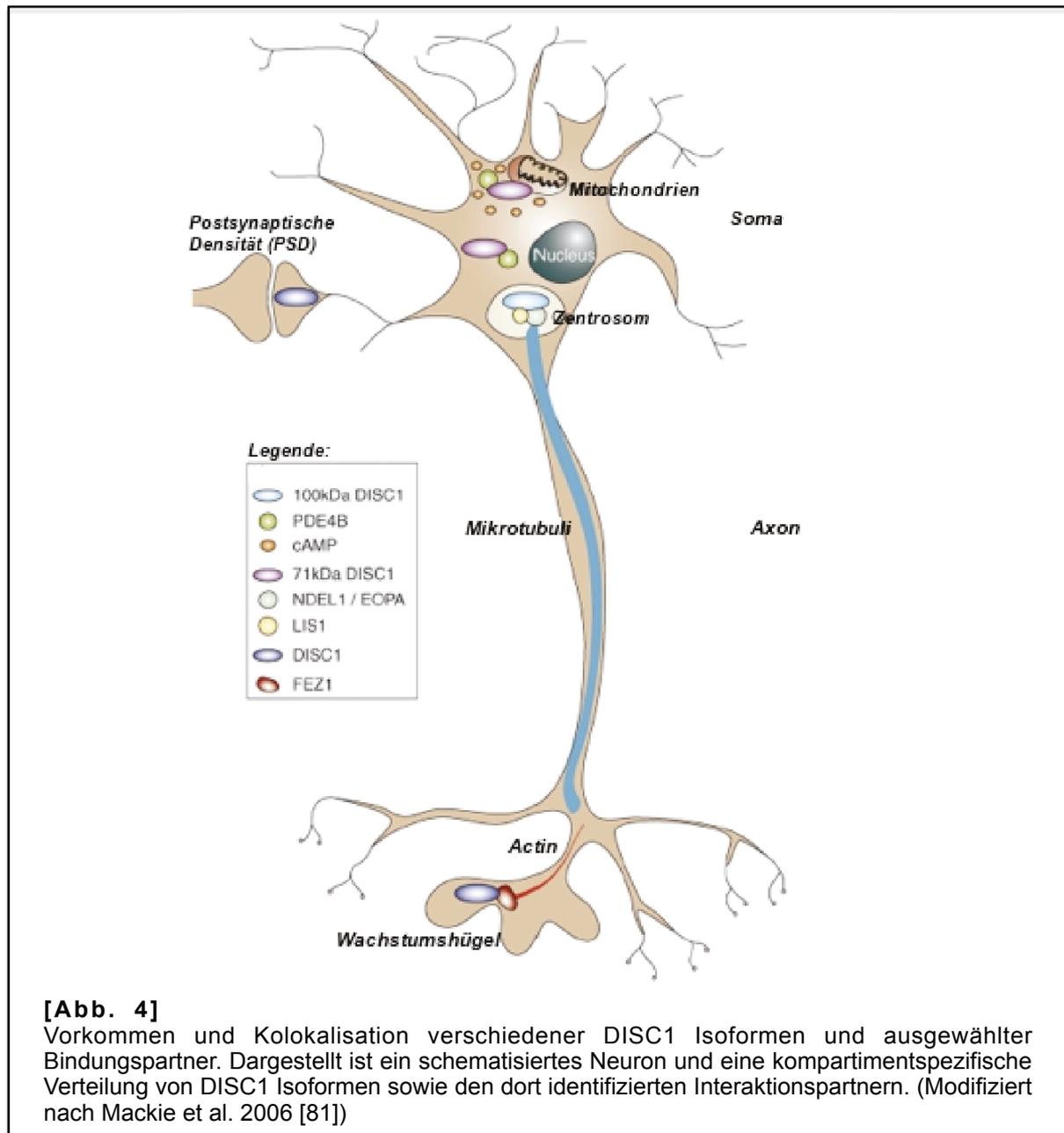
Kirkpatrick et al. zeigten auf Proteinlevel ein nahezu ubiquitäres Immunostaining in allen Schichten der grauen Substanz verschiedener, untersuchter Brodman Areale des humanen, frontalen und parietalen Kortex [76]. Dabei ergab sich ein diffuses Staining des Neuropils, sowie ein stärkeres Signal in Somata von pyramidalen und nicht-pyramidalen Neuronen. Des Weiteren wurden dort auch einige Gliazellen inkonsistent angefärbt.

Andere Studien zeigen bereits eine DISC1 Expression in neuronalen Stammzellen [19,77]. Ultrastrukturelle Beobachtungen legen ein DISC1 Vorkommen in verschiedenen, subzellulären Kompartimenten dar. Dabei wurde Immunoreaktivität im Zytoplasma, an Mitochondrien, Axonterminalen (Axs), dendritischen Dornen und postsynaptischen Verdichtungen (PSDs) sowie Nukleus, Zentrosom, Endoplasmatischem Retikulum und Ribosomen ausgemacht [18,76,78] (Siehe Abb. 4 Seite 20). Co-Immunolabeling legt weiterhin eine Assoziation von DISC1 zu Teilen des Zytoskelettes nahe [18]. Es zeigen hier Antikörper gegen verschiedene Epitope von DISC1 ein isoformspezifisches Reaktivitätsmuster in der Immunhistochemie. Dabei konnte eine 71 kDa Isoform bisher ausschließlich in Mitochondrien nachgewiesen werden, während größere (100 kDa) Isoformen beispielsweise am Zentrosom, im Zytoplasma, dem Nukleus und an Teilen des Zytoskelettes vorkommen (für eine Übersicht siehe Abb. 4 Seite 20).

Es bildet sich hier also eine komplexe, isoformabhängige Kompartimentalisierung des DISC1 Proteins ab, welche auf ortsgebundene Funktionsunterschiede hinweisen könnte [18,78]. Zusätzlich zur Kompartimentabhängigkeit scheint es auch eine zeitliche Expressionskomponente zu geben. So konnten Schurov et al. anhand von Mausmodellen zeigen, dass die DISC1 Expression im Gehirn zu verschiedenen Entwicklungsphasen wie dem Embryonalstadium besonders hoch ist, im Vergleich zu anderen Beobachtungszeitpunkten. Es fanden sich Spitzen der Expression einer 100 kDa DISC1 Isoform am embryonalen Tag 13.5 (E13.5), sowie dem postnatalen Tag 35 (P35), beides wichtige Zeitpunkte der neuronalen Entwicklung und Neuromigration im Maushirn [79]. Austin et al. legten auf RNA Ebene ebenfalls eine zeitlich regulierte DISC1 Expression in der Maus dar.

## Kapitel 1 - Einleitung

Die Expression im Gyrus Dentatus des Hippocampus ist jedoch robust von der frühesten Entwicklung bis in das adulte Alter nachzuweisen [80]. Meyer et al. zeigten aber auch hier Veränderungen in der Organisation der Expressionsmuster einzelner Areale des Gyrus Dentatus im Sinne einer zunehmenden Spezialisierung auf [74]. Die DISC1 Expression scheint insgesamt somit einer überaus komplexen, Entwicklungs- und Kompartimentabhängigen Regulation zu unterliegen.



### **1.5 DISC1 als zentraler Interaktionspartner neuronaler Proteine – das DISC1 „Interaktom“**

Es wurde bereits diskutiert, dass Schizophrenie als eine Erkrankung der Synapse bezeichnet werden kann. Krankheitsprozesse auf molekularem Niveau zu verstehen ist daher von überragender Wichtigkeit. Eine zunehmende Anzahl an Studien stützt DISC1 als genetischen Risikofaktor für psychiatrische Erkrankungen. Zelluläre Funktionen des DISC1 Proteins und dessen Rolle in der Pathogenese der Schizophrenie zu ergründen, stellt eine Herausforderung an die aktuelle Forschung dar. Expressionsmuster und vorhergesagte Strukturelemente von DISC1, legen eine Interaktionsfähigkeit mit zellulären Funktions- und Strukturproteinen nahe. Camargo et al. zeigten mit Hilfe eines „*Yeast-Two-Hybrid*“ Systems (Y2H) eine Vielzahl potentieller DISC1 Interaktionspartner auf und taufte dieses Netzwerk „*The DISC1 Interactome*“ [51].

Y2H Systeme untersuchen unter Anderem Proteininteraktionen in eukaryontischen Organismen. Dabei können die verwendeten Hefen spezielle Reportergene nur exprimieren, wenn es zu einer Interaktion von zwei Fusionsproteinen kommt, die jeweils ein Domäne des benötigten Transkriptionsfaktors für das Reportergen tragen. Die korrekte Assemblierung des Transkriptionsfaktors kommt also nur bei Interaktion der zwei untersuchten Proteine zustande [82]. Camargo et al. beschrieben unter den vielen, potentiellen DISC1 Bindungspartnern auch für die neuronale Entwicklung und Signaltransduktion, sowie den intrazellulären Transport wichtige Proteine. Hervorzuheben ist hierbei die Bindung von DISC1 an NDEL1 (Nuclear Distribution Gene E Homologue-Like; entspricht der Endo-Oligopeptidase A – EOPA), dessen Homolog NudE (Nuclear Distribution Gene E Homologue), PDE4B (Phosphodiesterase 4B) und FEZ1 (Fasciculation and Elongation Protein 1) [81,83].

NDEL1 und NudE wurden zunächst durch ihre Bindung an Lis1 (Lissencephaly 1) identifiziert [84]. NudE ist am Zentrosom (MTOC – Microtubule Organizing Center) lokalisiert und soll eine Rolle bei der Mikrotubuliorganisation spielen. NDEL1 wiederum soll an der Regulation mikrotubuliassoziierter Motormoleküle wie Dynein beteiligt sein [84,85].

## Kapitel 1 - Einleitung

Mutationen des humanen Lis1 Gens, welche zur Lissenzephalopathie führen, einer Erkrankung bei der es durch fehlregulierte Neuronenmigration während der Hirnentwicklung zu einer Fehlbildung der normalen Kortexschichtung kommt, resultieren in der Aufhebung der sonst beobachtbaren Bindung an NDEL1 / NudE [85]. Shu et al. postulierten einen Mechanismus, bei dem NDEL1 gemeinsam mit Lis1 in Interaktion mit Dynein, unter Anderem die Nukleokinese bei der neuronalen Migration gewährleistet [85]. DISC1 soll auch direkt die Mikrotubuliorganisation beeinflussen. Kamiya et al. zeigten, dass DISC1 eine Rolle bei der Akkumulation von Dynein am MTOC und damit bei der regelrechten Assemblierung des Mikrotubulsystems spielt [58]. Durch eine Reihe von in-utero DISC1 Knockdowns durch RNA-Interferenz (RNAi) anhand Einbringen von „*short hairpin*“ RNA (shRNA) mit Elektroporation, wiesen Sie auch eine Störung der physiologischen Neuronenmigration während der Embryonalentwicklung der Maus nach.

RNAi ist ein molekularbiologisches Verfahren zum „*Silencing*“ spezifischer Gene. Dabei wird z.B. in die Zellen eingebrachte shRNA, durch das zelleigene Enzym „Dicer“, in „small interfering“ RNA (siRNA) geschnitten und anschließend an den „*RNA-induced silencing complex*“ (RISC) gebunden. Dieser kann nun komplementäre „*messenger*“ RNA (mRNA) erkennen und abbauen. Somit kommt es nicht mehr zur Translation entsprechender Proteinprodukte [86,87]. In der selben Arbeit wurde auf eine Beeinflussung der normalen DISC1 Funktion durch ein in-utero zusätzlich exprimiertes, abgeschnittenes DISC1 Genprodukt („*mutDISC1*“) hingewiesen, welches homolog zum vermuteten trunkierten Protein der bereits diskutierten, schottischen Translokation ist [88]. Taya et al. beschrieben DISC1 als Adaptermolekül für einen Proteinkomplex aus NDEL1, 14-3-3epsilon und Lis1 an Kinesin1, einem mikrotubuliassoziiertem Transportmolekül [89]. Dabei könnte 14-3-3epsilon, ein Mitglied der ubiquitär exprimierten, in diversen Proteinregulationsmechanismen involvierten 14-3-3 Proteinfamilie, durch die Kinase Cdk5 phosphoryliertes NDEL1 vor der Dephosphorylierung schützen [89,90]. Die Phosphorylierung von NDEL1 ist wahrscheinlich notwendig für dessen Bindung an Lis1 [89].

## Kapitel 1 - Einleitung

Die Interaktion von DISC1 und dem genannten Proteinkomplex ist wichtig im Transport der beteiligten Proteine zur axonalen Wachstumszone in neuronalen Zellen. Störungen dieses Zusammenspiels können eine verminderte Axonelongation zur Folge haben [89]. Burdick et al. untersuchten Einflüsse einiger DISC1 SNPs auf die Interaktion mit NDEL1 [91]. Darunter beschrieben sie im Hinblick auf den natürlichen Polymorphismus eine unterschiedliche Bindung von NDEL1 an DISC1 S704 und DISC1 C704. Kamiya et al. zeigten eine signifikant schlechtere Bindung von NDEL1 an die Lv als an die L Variante von DISC1. Sie postulierten daher eine mögliche Bindungsstelle um die beim Spleißen deletierte Region „ $\Delta 22$ “ (AS 748-769) [92]. Zuletzt zeigten Duan et al. eine Bedeutung von DISC1, in der Migration und Integration von hippocampalen Neuronen adulter Individuen auf. Eine Verminderung der DISC1 Expression durch retrovirale RNAi hatte ein vermehrtes Dendritenwachstum, sowie eine überschüssigen Migrationsdauer mit resultierender Mispositionierung der betreffenden Neurone zur Folge [93].

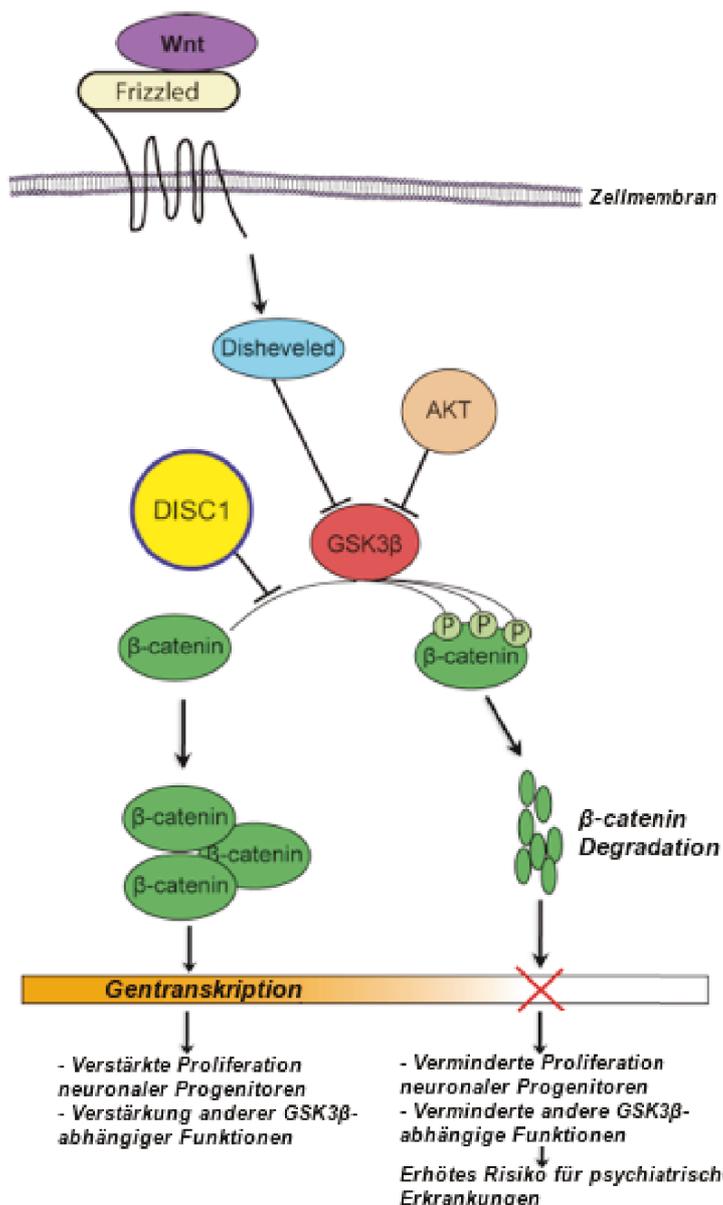
Ein weiterer, gut untersuchter Interaktionspartner von DISC1 ist FEZ1, das humane Homolog von *UNC-76* in *Caenorhabditis elegans*. *UNC-76* wurde dort als Regulator von axonalem Wachstum und Faszikulation beschrieben [81,94]. Miyoshi et al. zeigten eine Kollokalisierung von DISC1 und FEZ1 mit Aktin an axonalen Wachstumszonen, sowie eine Interaktion im Y2H Assay. Eine verstärkte Axonelongation bei DISC1 Überexpression, sowie eine verminderte Elongation bei Störung der Proteininteraktion *in vitro* wurde beschrieben [95]. Weitere, putative Interaktionspartner von DISC1 sind die PDE4 Isoproteine, Protagonisten der intrazellulären Signaltransduktion [81,96]. PDE4B wurde bereits unabhängig von DISC1 als Risikofaktor für psychiatrische Erkrankungen identifiziert [96,97]. Die mögliche Interaktion dieser Proteine mit DISC1 eröffnet interessante Ansätze für Funktionstheorien. So wäre über PDE4B eine Verbindung von DISC1 zur intrazellulären Signaltransduktion mittels cAMP (zyklisches Adenosinmonophosphat), einem wichtigen „*Second Messenger*“ geschaffen [81,96,98]. In der Tat zeigten Clapcote et al. mit Mausmodellen, dass artifizielle Punktmutationen putativer, N-terminaler PDE4B Bindungsregionen des DISC1 Proteins (Glutamin zu Leuzin an AS 31 – Q31L / Leuzin zu Prolin an AS 100 – L100P), zu einer Ausbildung von „*schizophrenieähnlichen*“ oder „*depressiven*“ Phänotypen der Versuchstiere führen.

## Kapitel 1 - Einleitung

Des Weiteren zeigte die Studie mit dem sMRI Verfahren eine Reduktion des totalen Hirngewichtes, sowie geringe, neuroanatomische Veränderungen wie sie analog bei Schizophreniepatienten zu finden sind [99]. Brandon et al. formulierten ein stark vereinfachtes Modell der Interaktion von DISC1, NDEL1 und PDE4B. Dabei soll DISC1 cAMP-Spiegel abhängig, entweder NDEL1 (bei erhöhten, intrazellulären cAMP Konzentrationen) oder PDE4B (bei niedrigen cAMP Konzentrationen) binden und deren enzymatische Aktivität hemmen [98]. Mit GSK3 $\beta$ / $\beta$ -Catenin wurde ein weiterer Mechanismus möglicher DISC1 Funktionen vorgeschlagen. Mao et al. zeigten eine DISC1 abhängige Proliferation neuronaler Stammzellen *in vivo*. Dabei führte ein DISC1 Knockdown in Mäusen mittels *shRNA*, zu einer verfrühten Differenzierung neuronaler Stammzellen und zum Abort der normalen Zellmigration.

DISC1 reguliert in positiver Weise die  $\beta$ -Catenin Konzentration durch Inhibition von GSK3 $\beta$  und führt zu einer vermehrten Transduktion des „*Wnt*“ Signalweges.  $\beta$ -Catenin ist ein Effektormolekül dieses für Verhalten und Differenzierung neuronaler Stammzellen wichtigen Signalweges und wird durch die Kinase GSK3 $\beta$  phosphoryliert, dem Abbau im Proteasom zugeführt. Dieser Regulationsmechanismus ist hierbei nicht auf embryonale Systeme beschränkt, sondern konnte auch in adulten Mäusen nachgewiesen werden [19,77,100] (Siehe Abb. 5 Seite 25).

Zusammengefasst stellt sich hier also ein überaus komplexes Proteininteraktionsmuster dar, bei dem DISC1 eine zentrale Rolle als „*Hub-Protein*“ oder „*Regulator*“ spielen könnte. Im Hinblick auf eine mögliche DISC1 Selbstassoziation wurden auch bereits Unterschiede im Bindungsverhalten von diversen DISC1 Spezies (Monomere, Dimere, Oligomere, Multimere) an bekannte Interaktionspartner beschrieben [21]. Obwohl also bereits einige Details der zahlreichen, möglichen Interaktionen untersucht sind, stehen wir heute erst am Beginn der Aufklärung der Zusammenhänge dieses „*Interaktoms*“.



**[Abb. 5]** Vereinfachtes Schema des Wnt Signalweges mit DISC1 als Stabilisator der  $\beta$ -Catenin Konzentration. DISC1 inhibiert die Phosphorylierung von  $\beta$ -Catenin über direkte Bindung von GSK3 $\beta$  über den DISC1 N-Terminus, somit wird  $\beta$ -Catenin Protein vermindert Degradiert und wirkt verstärkt an der Genexpression mit. DISC1 wirkt somit als Verstärker der Signaltransduktion von Wnt-abhängiger Genexpression. Ebenso gezeigt hier ein Querverweis zum Akt/GSK3 Signaltransduktionsweg. Akt (auch Proteinkinase B genannt) ist eine Serin/Threonin-Kinase welche in mehreren bekannten Signaltransduktionswegen von Säugetierzellen als Effektormolekül fungiert. Die Abbildung zeigt die Möglichkeit einer Inhibition (= Phosphorylierung) von GSK3 $\beta$  und somit die positive Modulation des Wnt Signalweges [119] (Modifiziert nach Brandon et al. 2009 [19]).

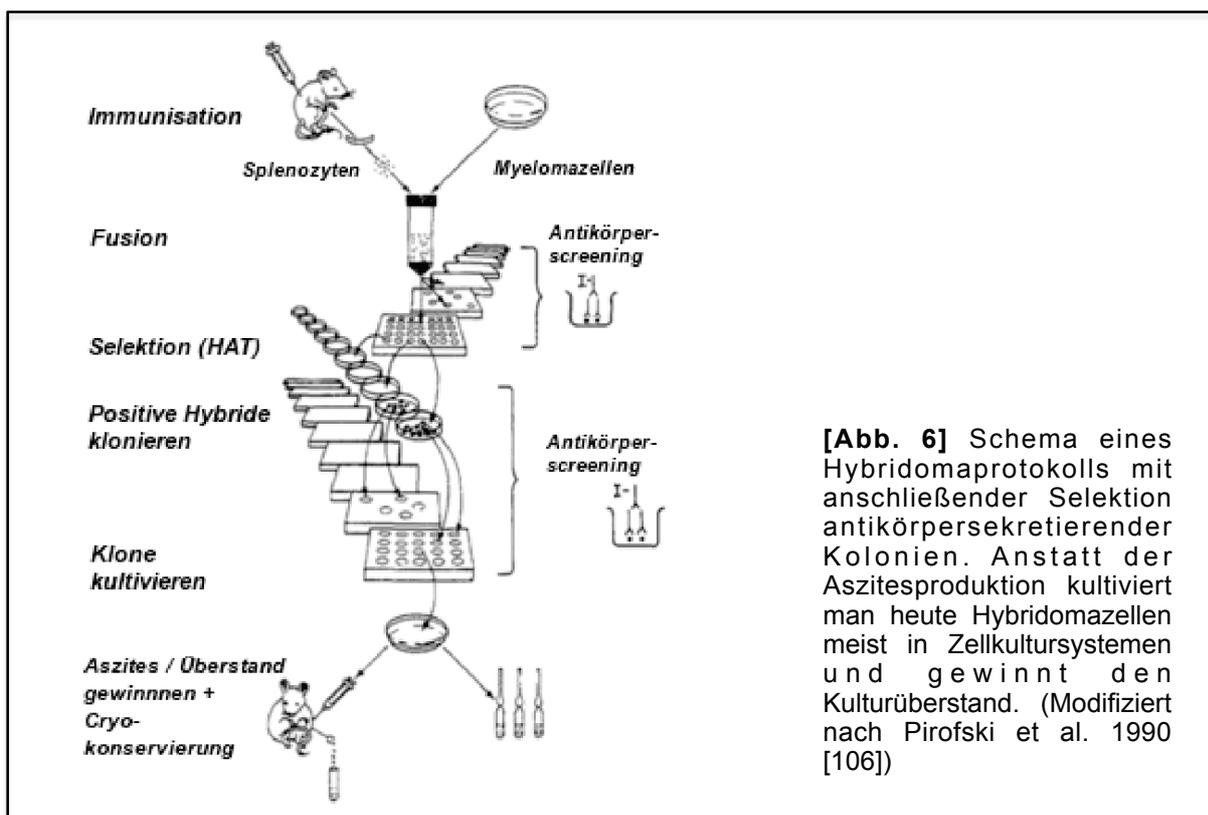
## 1.6 Monoklonale Antikörper als Werkzeuge in der Proteinforschung

Als molekularbiologische Sonden sind spezifische Antikörper gegen interessierende Proteine (Antigene) heute nicht mehr wegzudenken. Dabei sind insbesondere monoklonale Antikörper, wegen ihrer theoretisch besonders hohen Spezifität interessant, denn im Gegensatz zu polyklonalen Antikörpern erkennen diese zumeist nur ein Epitop eines bestimmten Antigens [101]. Die 1975 von Köhler und Milstein etablierte Methode der Herstellung solcher Moleküle ist die Generierung von Hybridomazellen, einem Fusionsprodukt aus antikörpersekretierenden B-Lymphozyten („Splenozyten“) und „endlos“ kultivierbaren Myelomazellen [102,103]. Dabei werden zunächst entsprechende Spendertiere, z.B. Mäuse, mit dem zu untersuchenden Protein (Antigen) immunisiert. Dieses wird zuvor beispielsweise rekombinant in Bakteriensystemen exprimiert und anschließend aufgereinigt [104,105].

Nach abgeschlossener Immunisierung werden die Splenozyten der Spendertiere mit kompatiblen Myelomazellen in einem entsprechenden Protokoll fusioniert, ‚immortalisiert‘ und anschließend selektiert. Dies geschieht zumeist in Selektionsmedien welche Hypoxanthin, Aminopterin und Thymin enthalten (HAT). Aminopterin ist ein potenter Inhibitor der Dihydrofolatreduktase, einem Schlüsselenzym der *de novo* Purinnukleotidsynthese. Da verwendete Myelomazellen die Enzyme des ‚Salvage Pathways‘ wie die Thymidinkinase (TK) und die Hypoxanthin-Guanin Phosphoribosyltransferase (HGPRT) nicht exprimieren, können sie nicht in Aminopterin enthaltenden Medien überleben. Mit TK und HGPRT ausgestattete Zellen können aus dem im Selektionsmedium enthaltenden Hypoxanthin bzw. Thymin entsprechende Triphosphate für die DNA Synthese herstellen und somit ihr Überleben sichern. B-Lymphozyten und erfolgreich fusionierte Hybridomazellen enthalten die benötigten Enzyme. Da B-Lymphozyten aber nicht ‚unsterblich‘ sind, überleben mit der Zeit nur die Fusionszellen. Selektierte Zellklone werden anschließend mit verschiedenen Assays wie dem ELISA („Enzyme Linked Immunosorbent Assay“) auf Antikörperproduktion getestet und positive Kolonien werden weiter subkloniert, um möglichst eine Monoklonalität der Zellkultur zu gewährleisten.

## Kapitel 1 - Einleitung

Mehrfach subklonierte Hybridomalinien sind relativ stabil in Kultur und geben Antikörper in das Zellkulturmedium ab, sie können dann auch Kryokonserviert werden. Zu Anfang kultivierte man die Hybridomazellen hauptsächlich intraperitoneal in Mäusen (Siehe Abb. 6 Seite 27). Vorteil dieser Methode ist die relativ hohe Konzentration von Antikörpern im Aszites der entsprechenden Tiere. Nachteilig ist vor allem die Schmerzhaftigkeit dieses Verfahrens für die Versuchstiere und der relativ hohe Aufwand der Tierhaltung [106,107]. Die Kultivierung *in vitro*, also in standardisierten Zellkulturgefäßen, ist wesentlich unkomplizierter. Die Antikörperkonzentration ist zwar hier deutlich geringer (unter 0,1 mg/ml Überstand), jedoch genügt sie den meisten wissenschaftlichen Anwendungsgebieten, so dass sich diese Form der Kultivierung heute durchgesetzt hat. Zusätzlich gibt es noch kommerzielle Bioreaktoren, mit denen die Antikörperkonzentration im Gegensatz zu herkömmlichen Kultursystemen deutlich gesteigert werden kann und in etwa der erreichbaren Proteinkonzentration in Aszitesflüssigkeit entspricht (ca. 1-5 mg/ml Überstand) [108]. Der gewonnene Zellkulturüberstand kann nachfolgend direkt in der Detektion des entsprechenden Antigens eingesetzt, oder in weiteren Schritten aufkonzentriert und gereinigt werden.



**[Abb. 6]** Schema eines Hybridomaprotokolls mit anschließender Selektion antikörpersekretierender Kolonien. Anstatt der Aszitesproduktion kultiviert man heute Hybridomazellen meist in Zellcultursystemen und gewinnt den Kulturüberstand. (Modifiziert nach Pirofski et al. 1990 [106])

### 1.7 Zielsetzung und Hypothesen

Das Lebenszeitrisko für Schizophrenie beträgt etwa 0,3 bis 2 % weltweit [13,14]. Adoptions- und Zwillingsstudien haben gezeigt, dass das Morbiditätsrisiko Verwandter von Schizophreniepatienten bis zu 17 % beträgt, bei monozygoten Zwillingen sogar durchschnittlich 50-70 % [15,16]. Genetische Kopplungsanalysen und Assoziationsstudien stützen die Annahme einer genetischen Komponente der Schizophrenie. So hat man bis heute bereits mehrere, vielversprechende Kandidatengene als Risikofaktoren für die Entstehung psychiatrischer Erkrankungen wie der Schizophrenie identifizieren können [16,17]. Als besonders interessant hat sich dabei unter Anderem „*Disrupted in Schizophrenia 1*“ (DISC1) herausgestellt [18]. Die Identifikation solcher Gene und deren Genprodukte ermöglicht nun erstmalig einen Einblick in die molekulare Ätiologie und Pathogenese von psychiatrischen Erkrankungen, ein Meilenstein der modernen, neuropsychiatrischen Forschung. Zielsetzung dieser Arbeit war es daher, das Proteinprodukt eines der interessantesten Kandidatengene zu untersuchen.

- 1.) Es erfolgte die Expression und Aufreinigung C-terminaler Fragmente des DISC1 Proteins. Gründe für die Wahl solcher Konstrukte waren zum Einen, dass diese *in vitro* stabil gefaltete, funktionelle Produkte bilden. Diese enthalten putative Domänen für Proteininteraktionen und Selbstassoziation, sowie einige der natürlichen Polymorphismen von DISC1 [18,19,20,21].
- 2.) Wichtige, molekulare Werkzeuge der Proteinforschung sind Antikörper gegen das interessierende Molekül. In dieser Arbeit wurden deshalb neue, monoklonale Mausantikörper gegen humanes DISC1 in einem murinen Standard-hybridomafusionsprotokoll generiert, selektiert und anschließend charakterisiert.
- 3.) Rekombinant exprimierte DISC1 Fragmente wurden charakterisiert. Zum Einen geschah dies mit biophysikalischen Methoden in zellfreien Systemen und zum Anderen erfolgte eine weitere Charakterisierung mit Immunochemischen Methoden in Zellen und Gewebsschnitten.

## 2.0 Material und Methoden

### 2.1 Chemikalien

Nachfolgend werden alle in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien alphabetisch aufgelistet. Spezielle Kits, Pufferlösungen und andere Materialien werden in den jeweiligen Kapiteln erwähnt.

Produkt	Hersteller *
3-((3-Cholamidopropyl)dimethylammonium)-1-propansulfonat (CHAPS)	Duchefa (C1374.0005)
3-Hydroxy-4-((2-sulfo-4-((4-sulfophenyl)azo)phenyl)azo)-2,7-naphthalindisulfonsäure Tetranatriumsalz (Ponceau S)	Sigma (P-3504)
3',3'',5',5''Tetrabromophenolsulfonephthalein (Bromphenol Blau)	Sigma (B5525)
4-(2-Hydroxyethyl)piperazin-1-ethansulfonsäure (HEPES)	Sigma # H3375
Acrylamid Rotiphorese 30	Roth (3029.1)
Agar	Fluka (05040)
Aminopterin	Sigma (A3411)
Ammoniumchlorid	Sigma (A9434)
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma (A3678)
Beta-Mercaptoethanol ( $\beta$ -ME)	Sigma (M3148)
Blue Dextran	Sigma (D5751)
Bovines Serumalbumin (BSA)	Sigma (A7906)
Brilliant Blau R-250	Roth (3862.1)
Carbenicillin-dinatrium	Duchefa (C0109.0025)
Chloramphenicol	Duchefa (C0113.0025)
Desoxycholsäure (DOC)	Sigma (D2510)
Dimethyl Sulfoxid (DMSO)	Sigma (D5879)
Dinatriumhydrogenphosphat (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	Fluka (71644)
Dithiothreitol (DTT)	Sigma (D9163)
DNase I (bovin)	Sigma (D5319)
Eisessig	Sigma (A9967)
Essigsäure	Riedel 27264
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Appllichem (A3553)
Glutathion-Sepharose 4B „fast flow“	GE Healthcare (52-2303-00)
Glycerol	Sigma (G-5516)
Glycin	Sigma (G8898-1kg)
Hefeextrakt (YE)	Fluka (70167)
Imidazol	Fluka (56750)
Isopropyl-b-Thiogalactosid (IPTG)	Duchefa (I1401.0025)
Kaliumchlorid (KCl)	Roth (6781.3)
Kaliumdihydrogenphosphat (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	Sigma ( P0662-500g)

## Kapitel 2 - Material und Methoden

L-Arginin	Roth (3144.1)
Lysozym	Fluka (62971)
Magermilchpulver	Oxoid (LP0031)
Magnesiumchlorid (MgCl <sub>2</sub> )	Normapur (25108.295)
Methanol	Merck (1.06009.2500)
n-Butanol	Sigma (B7906)
N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Sigma (T-9281)
Natrium-dodecylsulfat (SDS)	Roth (CN30.3)
Natriumazid (NaN <sub>3</sub> )	Sigma (S8032)
Natriumchlorid (NaCl)	Riedel de Haen (13423)
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Roth (CN30.3)
NHS-Sepharose	GE-Healthcare (17-0906-01)
Nickel-NTA-Agarose	Quiagen /30210)
Phenolsulfonphthalein (Phenolrot)	Sigma (P3532)
Phenylmethanesulfon (PMSF)	Sigma (P7626-5G)
Polyethylenglykol (PEG)	Fluka (81150)
Protein-G-Sepharose 4B fast flow	Sigma (P-3296)
Saponin	Riedel (16109)
Sucrose (D(+)-Saccharose)	Sigma (S9378)
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan	Merck (1.08382.2500)
Triton X100	Sigma (T8787-100ml)
Trypton	Fluka (95039)
Tween20	Sigma (P5927-500ml)
Urea	Sigma (U5378)

\*) Herstellernamen abgekürzt: Sigma-Aldrich (Sigma), Riedel-de Haën (Riedel), Carl-Roth (Roth). Zur Herstellung von wässrigen Lösungen (außer in der Zellkultur) wurde deionisiertes Wasser aus einer Millipore Anlage benutzt (Milli-Q, 0,22 µm Filtersystem).

## 2.2 Unspezifische Proteinfärbungen

### Puffer und Lösungen

Bezeichnung	Zusammensetzung
Coomassielösung	2 g Brilliant Blau in 500 ml Methanol lösen, 75 g Eisessig hinzugeben und auf 1 Liter mit H <sub>2</sub> O auffüllen.
Entfärbelösung für Coomassie	5 % v/v Methanol, 7 % v/v Essigsäure in H <sub>2</sub> O.
Ponceaulösung	0,2 % w/v Ponceau S, 5 % v/v Essigsäure.

### Färbung von Polyacrylamidgelen mit Coomassie

In saurer Lösung bindet Coomassie Brilliant Blau R-250 unspezifisch an basische und aromatische Aminosäuren. So können nach Auftrennung in der PAGE Proteine bis zu einer Konzentration von ~ 0,1 - 0,05 µg nachgewiesen werden [109].

## Kapitel 2 - Material und Methoden

1. Gel 30 Minuten bei Raumtemperatur in Coomassie Lösung unter Agitation inkubieren.
2. Mindestens 2 Stunden oder über Nacht entfärben, Entfärbelösung 2-3 mal wechseln bis das Gel vollständig klar ist.
3. Mit H<sub>2</sub>O abwaschen und in Folie einschweißen.

### **Färbung von Nitrocellulosemembranen mit Ponceau**

Ponceau S bindet reversibel an positiv geladene Aminosäuren und lässt sich leicht wieder auswaschen. Es dient der unspezifischen Darstellung von Proteinen auf z.B. Nitrozellulosemembranen und wird beim Western-Blot als Kontrolle für eine erfolgreiche Proteinübertragung auf die Membran benutzt [109].

1. Membran nach dem Blotten aus der Elektrophoresekammer nehmen und einmal in Western-Blot Waschpuffer spülen.
2. 5 Minuten bei Raumtemperatur mit Ponceaulösung unter Agitation inkubieren und anschließend ausgiebig mit H<sub>2</sub>O spülen.
3. Die Färbung wäscht sich beim anschließenden Blocken in z.B. Magermilch rasch aus.

### **2.3 Polyacrylamid Gelelektrophorese (PAGE)**

In der Polyacrylamid Gelelektrophorese (PAGE) laufen Proteine in einem Trenngel im elektrischem Feld und können in der denaturierenden Natrium-dodecylsulfat-PAGE (SDS-PAGE) nach konstantem Ladungs- zu Masseverhältnis aufgetrennt werden. SDS zerstört die Quarternärstruktur von Proteinen, daher unterscheiden sich viele Moleküle in der SDS-PAGE nur noch anhand ihrer Molekularmassen im Laufverhalten durch die Polyacrylamid Gelmatrix, welche hier als „*Molekularsieb*“ fungiert [109]. Man unterscheidet eine „*native*“ PAGE, bei der auf Grund des fehlenden SDS auch die Quaternärstruktur und Eigenladung des zu untersuchenden Proteins eine Rolle beim Laufverhalten der Proben spielen.

## Spezielle Geräte und Verbrauchsmaterialien

Produkt	Hersteller
Crierion Cell für die Gelelektrophorese von pre-cast Gelen + Zubehör	Biorad (165-6001)
Criterion pre-cast Gel 4-20% Tris-HCl	Biorad (345-0033)
Mini-PROTEAN® Cell für die Gelelektrophorese von selbst gegossenen Gelen + Zubehör	Biorad (165-8000)
Referenz für Molekularmassen - Page Ruler prestained protein ladder	Fermentas (SM0671)

## Puffer und Lösungen

Bezeichnung	Zusammensetzung
Gel Ansatz 10 ml 10 % SDS	4,0 ml H <sub>2</sub> O, 3,3ml Acrylamid 30:08, 2,5 ml 1,5 M Tris pH 8,8, 100 µl, 10 % SDS w/v, 100 µl 10 % APS w/v, 4 µl TEMED
Gel Ansatz 10 ml 11 % nativ	380 mM Tris-HCl pH 8,0, 7,3 ml Acrylamid 30:8, 200 µl 10 % APS v/v, 20 µl TEMED, mit H <sub>2</sub> O auf 10 ml auffüllen.
Gelelektrophoresepuffer nativ 50-fach	1,25 M Tris Base, 4,8 M Glycin, pH 8,3
Gelelektrophoresepuffer SDS 10-fach	250 mM Tris Base, 2,5 M Glycin, 1 % w/v SDS
Probenpuffer nativ 3-fach	3,0 ml Glycerol, 0,6 ml 50 x Gelelektrophoresepuffer, 6,4 ml H <sub>2</sub> O, 2,5 mg Bromphenol Blau
Probenpuffer SDS 4-fach	100 mM Tris-HCl pH 6,8, 6 % SDS 40% Glycerol v/v, 4% β-Mercaptoethanol v/v, 0,1 % Bromphenolblau w/v
Sammelgel Ansatz 4 ml SDS	2,7 ml H <sub>2</sub> O, 670 µl Acrylamid 30:08, 500 µl 1,5 M Tris pH 8,8, 40 µl 10 % SDS w/v, 40 µl 10 % APS w/v, 4 µl TEMED
Sammelgel Ansatz 5 ml nativ	70 mM Tris-HCl pH 8,0, 0,6 ml Acrylamid 30:08, 25 µl 10 % APS v/v, 5 µl TEMED, mit H <sub>2</sub> O auf 5 ml auffüllen.

### 2.3.1 SDS-PAGE

Die diskontinuierliche, denaturierende SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese wurde 1970 von Laemmli et al. beschrieben [110].

Gele für die Biorad Mini-Protean 3 wurden gegossen oder es wurden kommerzielle Criterion® *Gradientengele* der Firma Biorad verwendet. Ein nach Sambrook et al. (2001) modifiziertes Protokoll wurde verwendet [104].

1. Gekauftes „pre-cast“ Gel benutzen oder ein selber hergestelltes Gel vorbereiten.
2. Falls das Gel selbst gegossen werden soll, entsprechende Lösungen vorbereiten und in den angegebenen Verhältnissen mischen.
3. Dabei zuerst die noch nicht polymerisierte Lösung des Trenngeles (z.B. 10 % Polyacrylamid) in eine Mini Protean 3 Haltevorrichtung gießen und etwa 20 Minuten polymerisieren lassen. Etwas Butanol auf das Gel geben, um eine glatte Oberfläche zu erhalten.
4. Anschließend das Sammelgel, nach abgießen des Butanols, auf das gehärtete Trenngel geben und ebenfalls polymerisieren lassen. Einen Kamm mit gewünschter Spurenzahl einfügen.
5. Gewünschte Menge Protein in SDS-Probenpuffer aufnehmen.
6. Das Gemisch 5-10 Minuten im Heizblock bei 99°C erhitzen und danach 2 Minuten auf Eis abkühlen. Bei Raumtemperatur lagern.
7. Gelspuren mit den Proben beladen und bei 150 Volt konstant in der Elektrophoresekammer laufen lassen (bei Raumtemperatur).
8. Proteinfärbung oder Western-Blot anschließen.

### **2.3.2 Native PAGE**

Bei der nativen PAGE können Proteine in ihrem funktionellen, nativen Zustand im Gel aufgetrennt werden. Dabei spielt jedoch mangels Detergenz auch die Eigenladung eine Rolle, sodass es nicht möglich ist hier eine direkte Zuordnung von Laufstrecke und Molekularmasse zu machen wie bei der SDS-PAGE. Es ist darauf zu achten, dass die verwendeten Puffer einen pH haben der über dem isoelektrischen Punkt der untersuchten Proteine liegt, damit diese in der Summe negativ geladen sind und im elektrischen Feld zur Anode laufen. In dieser Arbeit wurden lediglich selbstgegossene, 11 %ige Gele für die PAGE benutzt (Biorad Mini-PROTEAN® System).

## Kapitel 2 - Material und Methoden

Die Gele liefen bei 120 Volt konstant im Kaltraum bei 4°C für etwa 3 Stunden und wurden anschließend entweder in der Coomassiefärbung oder im Western-Blot benutzt. Die Vorgehensweise ist im Prinzip identisch mit der bereits bei der SDS-PAGE beschriebenen. Lediglich die nativen Gelansätze für Lauf- und Sammelgel sowie der PAGE Laufpuffer unterscheiden sich hier und sind den obigen Tabellen zu entnehmen. Des Weiteren erfolgte natürlich kein aufkochen der Proben und es wurde ein „*nativer*“ Probenpuffer ohne SDS zum laden des Gels benutzt.

### 2.4 Western-Blot

Der Western-Blot ist in dieser Arbeit ein standard Assay um die Bindung von Antikörpern in Gewebehomogenaten oder Lysaten, sowie rekombinanten Proteinen nachzuweisen. Dabei werden zunächst die Proben (Proteingemische) in einer Polyacrylamid Gel-Elektrophorese (PAGE) aufgetrennt und danach in einer Transferkammer auf eine Membran übertragen.

#### Spezielle Geräte, Kits, Antikörper und Verbrauchsmaterialien

Produkt	Hersteller
Amersham ECL Western-Blotting detection reagents RPN2106, Reagenz A und B	GE Healthcare (1059243 und 1059250)
Amersham Hyperfilm ECL	GE Healthcare (28906838)
Sekundärantikörper Goat anti Mouse HRP gekoppelt	Pierce (31444)
Sekundärantikörper Goat anti Rabbit HRP gekoppelt	Pierce (31460)
Trans Blot Cell für Western-Blots + Zubehör	Biorad (170-3946)
Whatman 0,45 µm Nitrocellulosemembran PROTRAN BA85	Whatman (10401196)
Whatman Blottingpapier GB0003	Whatman (10426890)

## Puffer und Lösungen

Bezeichnung	Zusammensetzung
10 x Transferpuffer	24 mM Tris, 192 mM Glycin, vor Gebrauch dem 1x Puffer 20 % Methanol v/v hinzufügen
Phosphat gepufferte Salzlösung + Tween20 (PBS-T)	137 mM NaCl, 10 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 2 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 2,7 mM KCl auf pH 7,5 einstellen + 0,05 % v/v Tween20

## Western-Blot Protokoll

Als ein standard Assay dieser Arbeit wurden Western-Blots häufig durchgeführt, um Gewebshomogenate und anderen Proteingemische zu untersuchen [104].

1. Erreicht die Lauffront in einer PAGE das untere Gelende, werden die Gele aus der Haltevorrichtung präpariert und als ‚Sandwich‘ auf einem Stück Membran (Nitrocellulose, Whattman) zwischen zwei Stücken Blottingpapier in eine Transferkassette verbracht.
2. In der Transferkammer wird dann bei 160 mA über Nacht oder bei 200 mA über 3 Stunden geblottet. Immer bei 4 °C Umgebungstemperatur.
3. Es folgt nun das "Blocken" der Membran. Dabei wird 5 % Magermilchpulver in PBS-T verwendet um unspezifisch freie Proteinbindungsstellen auf der Membran zu besetzen. Dies verringert später das Hintergrundsignal bei der Detektion durch unspezifische Sekundärantikörperbindung.
4. Nun kann im Immersionsverfahren mit Primärantikörper, verdünnt in PBS-T, für 3 Stunden bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C inkubiert werden.
5. Die Membran anschließend 3 mal 10 Minuten in PBS-T waschen.
6. Sekundärantikörper gegen die entsprechende Spezies des Primärantikörpers in einer 1:20.000 Verdünnung in PBS-T hinzugeben und 45 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren.
7. Noch 3 mal 10 Minuten die Membran in PBS-T waschen.

## Kapitel 2 - Material und Methoden

Nun ist der Blot bereit für die Detektion der gebundenen Antikörper. Dazu ist der Sekundärantikörper mit einer Meerrettichperoxidase (HRP) gekoppelt, welche Luminol in alkalischem Medium oxidieren kann. Dabei wird Licht mit einer maximalen Intensität bei ~430 nm emittiert und kann so entsprechendes Filmmaterial belichten [111].

1. Die Membran in einen Folienschlauch geben und etwa 500 µl eines 1:1 Gemisches der Amersham Enhanced Chemiluminescence (ECL) Reagenzien hinzugeben .
2. Etwa 1 Minute inkubieren und überschüssiges Reagenz abgießen.
3. Die Membran in Folie einschweissen und in einer Lichtdichten Filmkassette belichten und danach den Film entwickeln und fixieren.

### 2.5 Herstellung von Gewebshomogenaten

#### Puffer und Gebrauchslösungen

Bezeichnung	Zusammensetzung
Homogenisierungspuffer	0,25 M Sucrose, 20 mM HEPES pH7,4, 15 mM EDTA, 3 mM DTT, 1 mM PMSF
Proteinaseinhibitorlösung 25 x aus „cOmplete“ Tabletten	Roche (11873580001)

Gewebshomogenate von humanem oder Nagetiergehirnen wurden für eine spätere Analyse als 5 oder 10 %ige Homogenate zur Lagerung bei -80 °C hergestellt und kurz vor Gebrauch im gewünschten Verhältniss verdünnt (z.B. in SDS-Probenpuffer). Alle Arbeitsschritte wurden mit auf Eis gekühlten, sterilen Materialien durchgeführt.

Hirngewebe stets auf Eis in sterilen Gefäßen lagern. Hirne von Mäusen des Stammes SVEV129 (aus der Tierversuchsanstalt der Universität Düsseldorf), wurden von Prof. Dr. Carsten Korth freundlicher Weise zur Verfügung gestellt.

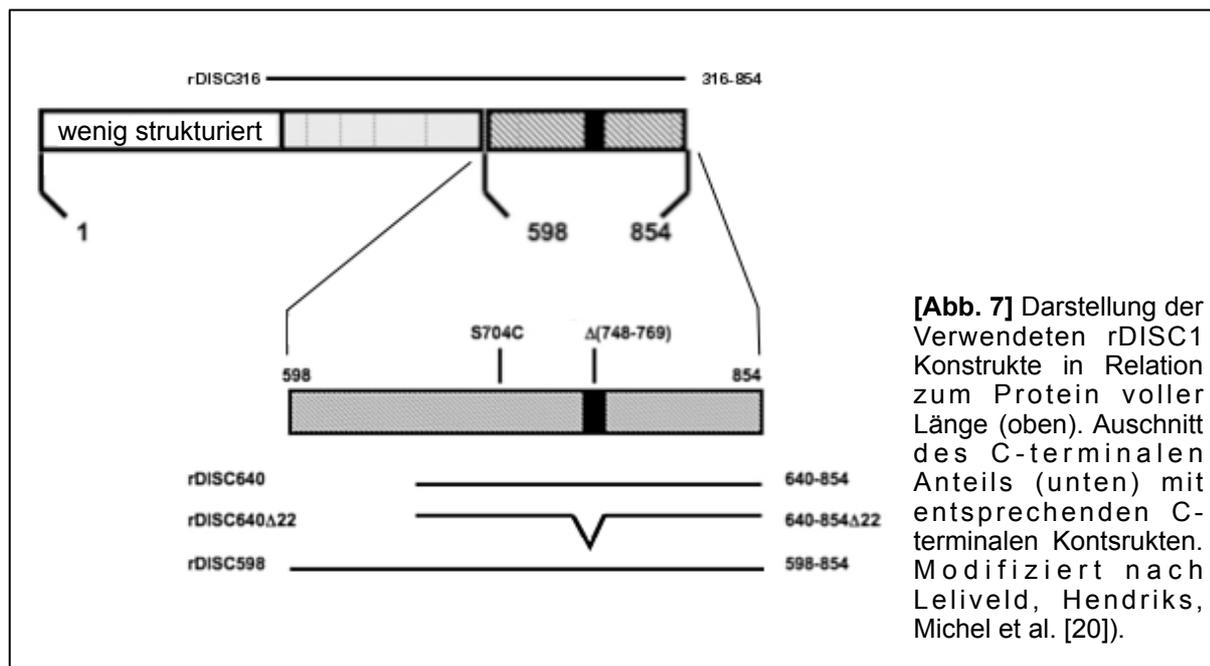
Humane Hirngewebsproben stammten aus der Sammlung der Stanley Medical Foundation - SMRI (Studie zuvor von der Ethikkommission der Heinrich Heine Universität genehmigt) [20,21].

## Kapitel 2 - Material und Methoden

1. Hirngewebe (Teil- oder Ganzhirn) im korrekten Gewichtsverhältniss in Homogenisierungspuffer aufnehmen.
2. In geeignetem (manuellen) Glashomogenisator langsam etwa 5 Minuten homogenisieren und darauf achten, dass sich das Material nicht erwärmt.
3. Proteinaseinhibitoren hinzugeben und im flüssigen Stickstoff „schockgefrieren“.
4. Nach Bedarf bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  oder im Stickstofftank lagern.

### 2.6 Expression rekombinanter Proteine in Bakterien

Es wurden 5 unterschiedliche DISC1 Fragmente rekombinant in *E. coli*, exprimiert. Die Bezeichnung der Fragmente bezieht sich, falls nicht anders beschrieben, auf die N-terminale Aminosäure bis zum C-Terminus des volle Länge Proteins (z.B. rDISC316 entspricht AS 316 bis 845).



Die Fragmente rDISC316 S704 (nachfolgend rDISC316 genannt), rDISC640 S704 und rDISC640 C704 (Austausch an Aminosäure 704, entspricht dem natürlich vorkommenden DISC1 Polymorphismus) sowie die Fragmente rDISC640 S704  $\Delta$ 22 sowie rDISC640 C704  $\Delta$ 22, wurden unlöslich in Einschlusskörpern exprimiert. *Delta-22* („ $\Delta$ 22“) entspricht dabei einer der natürlichen Spleißformen, Lv (Long variant) von DISC1.

## Kapitel 2 - Material und Methoden

Hier fehlen 22 Aminosäuren (AS 748-769) innerhalb einer putativen Bindungsstelle für NDEL [19,20,21,69,88]. Alle DISC1 Fragmente tragen N-terminal ein „His-Tag“ (6x Histidin-Sequenz) [105]. Die Plasmid-DNA wurde freundlicher Weise von den Drs. Bader und Leliveld zur Verfügung gestellt [20].

### Puffer und Gebrauchslösungen

Bezeichnung	Zusammensetzung
Elutionspuffer, Nickel-NTA Agarose	50 mM Tris-HCl, 500 mM NaCl, 200 mM Imidazol, pH 8,0
Extraktionspuffer, denaturierend	50 mM Tris-HCl, 2mM Imidazol, 500mM NaCl, 8M Urea, 1% CHAPS w/v, 20mM $\beta$ -ME, pH8,0
Hefeextrakt Tryptone Medium 2-fach (DYT)	9,0 g Hefeextrakt, 18,0 g Trypton, 9,0 g NaCl auf 900 ml H <sub>2</sub> O – auf pH 7,0 einstellen und autoklavieren
Luria-Bertani-Agar (LB)	800 ml H <sub>2</sub> O, 10 g Trypton, 5 g Yeast Extract, 10 g NaCl, pH auf 7.5 einstellen (NaOH), 15 g Agar hinzugeben. Endvolumen 1000 ml. Nach Autoklavieren die Platten gießen.
Phosphat gepufferte Salzlösung (PBS)	140 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 1,8 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , pH 7,5
Tris-EDTA Puffer (TE)	50 mM Tris-HCl, 5 mM EDTA, 2 mM PMSF, pH 8,0
Waschpuffer 1, denaturierend	50 mM Tris-HCl, 2 mM Imidazol, 500 mM NaCl, 8 M Ureal, 20 mM $\beta$ -ME, pH 8,0
Waschpuffer 2, nicht denaturierend	50 mM Tris-HCl, 2mM Imidazol, 500mM NaCl, 20mM $\beta$ -ME, pH 8,0

### 2.6.1 Expression in E.coli Einschlusskörpern

E. coli Bakterien vom Typ BL21(IDE3) Rosetta™ (Novagen) wurden nach der „Inoue Method for Preparation and Transformation of Competent E. coli: ‚Ultra Competent‘ Cells“ (modifiziert nach Joseph Sambrook et al. 2001) für die Plasmidvektoraufnahme vorbereitet. 100  $\mu$ l dieser Suspension wurden nach folgendem Protokoll transformiert [104,112].

1. 1  $\mu$ g des Vektors zu den Bakterien pipettieren.
2. 30 Minuten auf Eis stehen lassen.
3. Danach 45 Sekunden in ein auf 42 °C vorgewärmtes Wasserbad stellen.
4. Anschließend mindestens 3 Minuten auf Eis abkühlen lassen.

## Kapitel 2 - Material und Methoden

Die transformierten Bakterien wurden auf einer Agar Platte ( LB + 100 µg/ml Carbenicillin + 35 µg/ml Chloramphenicol) ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C im Wärmeschrank inkubiert. Am nächsten Morgen wurden dann 2 solitäre Kolonien gepickt und in 10 ml DYT Medium (+ 5 mM L-Arginin + 5 mM MgCl<sub>2</sub> + 200 µg/ml Carbenicillin + 35 µg/ml Chloramphenicol) als Vorkulturen übertragen. Diese wuchsen bei 37 °C unter Agitation über Nacht.

1. Je eine Vorkultur von 10 ml in einen 2 Liter Kolben mit 450 ml DYT Medium geben (+ 5mM L-Arginin + 5mM MgCl<sub>2</sub> + 100µg/ml Carbenicillin + 35µg/ml Chloramphenicol).
2. Bakterien bis zu einer optischen Dichte (OD<sub>600</sub>) von etwa 0,8 bei 37°C hochwachsen lassen.
3. Dann mit 1 mM IPTG induzieren und für etwa 4 Stunden bei 37°C exprimieren.

Die Bakterien wurden danach durch Zentrifugation vom Medium getrennt und nach folgendem Protokoll lysiert und die Einschlusskörper gelöst.

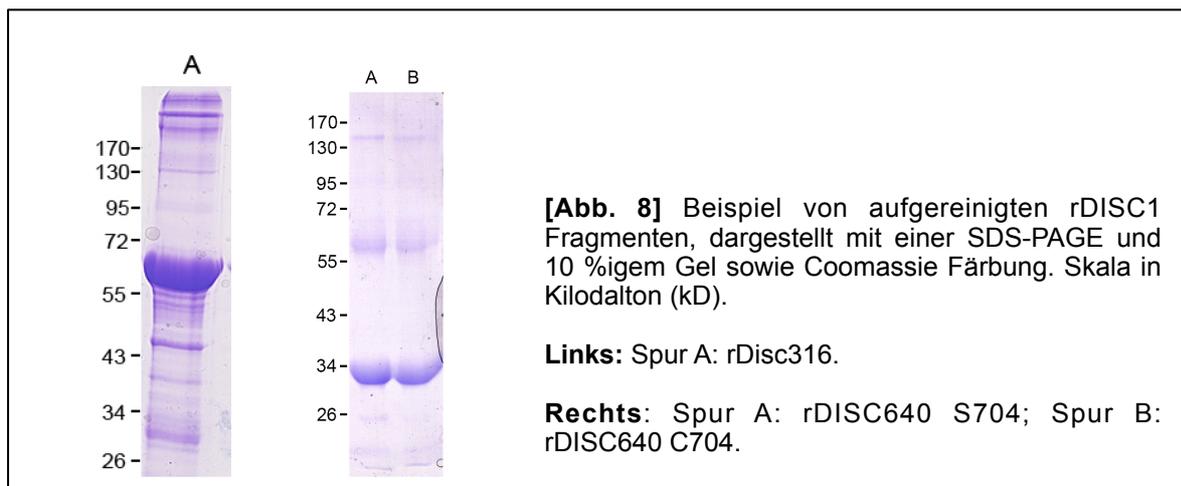
1. Die Bakteriensuspensionen bei 3000 g und 4 °C 20 Minuten abzentrifugieren.
2. Beide Pellets zusammen in 35-40 ml TE + 2 mM PMSF aufnehmen. Es wird am Ende ein Gesamtvolumen von 50 ml angestrebt.
3. 1 % Triton X100 hinzugeben sowie 0,25 mg/ml Lysozym.
4. Für etwa 30 Minuten bei Raumtemperatur rotierend inkubieren.
5. Dann ~300 U DNase I und 20 mM MgCl<sub>2</sub> als Kofaktor hinzugeben und für 20-30 Minuten bei 37 °C in Bewegung inkubieren.
6. Wenn eine vollständige Lyse erreicht ist, 500 mM NaCl hinzugeben und Endvolumen mit Tris-HCl pH 8,0 auf 50 ml einstellen.
7. Die Suspension bei 17500 g für ~20 Minuten pelletieren und das Pellet in 10 mM Tris-HCl pH 8,0, 150 mM NaCl resuspendieren.
8. Zentrifugation wiederholen und Pellet in 50 mM Tris-HCl pH 8,0, 2 mM Imidazol, 500 mM NaCl, 8 M Urea, 1% w/v CHAPS, 20 mM β-ME aufnehmen.

9. Kräftig resuspendieren und über Nacht die Einschlusskörper bei 4°C, unter Rotation auflösen.
10. Am nächsten Tag noch Zelltrümmer ein mal kurz abzentrifugieren und den Überstand mit 5 mM MgCl<sub>2</sub> versetzen um verbliebenes EDTA zu binden.

### 2.6.2 Aufreinigung mit Nickel-NTA-Agarose

Nach der Extraktion der Einschlusskörper folgte die Aufreinigung des exprimierten, einen 6-His-Tag tragenden Proteins, an einer Nickel-Nitrilotriessigsäure (Nickel-NTA) Agarosematrix (Quiagen). Dabei bindet das His-Tag der DISC1 Fragmente reversibel an die Nickelionen der Säulenmatrix. Das Protein kann später, nach mehreren Waschschritten, wieder in möglichst reiner Form eluiert werden [105]. Lagerung zunächst bei 4°C unter Zugaben von PMSF, später Dialyse in gewünschten Puffer.

1. 10 ml Suspension der Nickel-NTA Agarose 2 mal in Extraktionspuffer (ohne  $\beta$ -ME) waschen (nach jedem Waschschriff Beads bei 500 g 5 Minuten abzentrifugieren).
2. 2 Stunden mit 50 ml Bakterienextrakt bei 4 °C inkubieren (Drehrad).
3. Die Beads in einem Säulenaufbau sammeln, Extrakt abfließen lassen und mit 2 CVs Extraktionspuffer waschen.
4. Mit mindestens 20 CVs denaturierendem Waschpuffer 1 das Detergenz CHAPS auswaschen.
5. Die Säule für 1-2 Stunden im Kaltraum auf 4 °C äquilibrieren. Noch einmal mit 5 CVs des Puffers aus dem vorherigen Schritt waschen.
6. Jetzt die chaotropische Urea mit mindestens 10 CVs nicht denaturierendem Waschpuffer 2 auswaschen und Protein auf der Säule falten. Noch für etwa 30 Minuten im Kaltraum belassen.
7. Etwa 5-10ml Elutionspuffer auf die Säule geben.
8. Langsam in 1ml Fraktionen eluieren.



## 2.7. Zellkultur

Zellkultur beinhaltet die Fusion, Selektion und Pflege von Hybridomazellen zur Antikörperproduktion. Alle Arbeiten wurden unter einer Sicherheitswerkbank mit laminarem Luftstrom („*Laminar Flow Hood*“) durchgeführt. Zellen wurden in einer 5 % Kohlendioxid enthaltenden Atmosphäre, bei 37,5°C im Inkubator kultiviert.

### Fertige Gebrauchslösungen und Nährmedien

Produkt	Hersteller
Hypoxanthin Thymidin (HT) Supplement 50x Konzentrat	Gibco (41065)
L-Glutamin 100x Konzentrat	Gibco (25030)
Penicillin / Streptomycin (P/S) 100x Konzentrat	PAA (P11-010)
Fötales Kälberserum (FCS)	PAA (A15-151)
Minimal Essential Medium (MEM)	Gibco (21090)
Hybridoma Cloning Factor (HCF)	PAA (F05-009)

### Spezielle Geräte, Verbrauchsmaterialien und Antikörper

Produkt	Hersteller
Neubauer Improved Zählkammer	Hausser (3520)
Nitrocellulose 0,2µm Porendurchmesser	Whatman (10401396)
Easy-Titer® ELIFA System	Pierce (77000)
BD OptEIA™ Kit	GE Healthcare (555214)
Sekundärantikörper Goat anti Mouse HRP gekoppelt	Pierce (31444)
Amersham ECL Wester blotting detection reagents RPN2106, Reagenz A und B	GE Healthcare (1059243 und 1059250)
CryoTubes™	Nunc (366656)

### Puffer und Gebrauchslösungen

Bezeichnung	Zusammensetzung
GKN-Lösung	24 g NaCl, 1,2 g KCl, 4,26 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 1,8 g NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 6 g Glucose, 0,03 g Phenolrot auf 300 ml H <sub>2</sub> O, steril filtrieren.

#### 2.7.1 Generierung monoklonaler Antikörper gegen DISC1

Mit humanem, rekombinantem FL DISC1 (S704) immunisierte Mäuse des Stammes SVEV129 (Tierversuchsanstalt der Universität Düsseldorf), sowie murine Myelomazellen (P3U-Zellen) wurden von Prof. Dr. Carsten Korth freundlicher Weise zur Verfügung gestellt. Das Immunisierungsprotokoll sah eine subkutane Injektion des DISC1 Proteins mit je 100 µg eines Adjuvanz (ABM-ZK, Linaris, Deutschland) vor, sowie 3 Boosterinjektionen im Abstand von je 3 Wochen (Protokoll aus Korth et al 1999 [118]).

### Entnahme der Splenozyten

Die Tiere wurden durch zervikale Dislokation getötet und augenblicklich unter eine Sterilbank („*Laminar Flow Hood*“) gebracht. Das Fell wurde ausgiebig mit 70% Ethanol getränkt und mit sterilen Instrumenten die Milz entnommen. Die Splenozyten wurden gewonnen und mit murinen P3U- Myelomazellen fusioniert.

1. Die Milz mit 10 ml warmer GKN Lösung (37 °C) auf einem Metallsieb (200 µm Porendurchmesser) zerstoßen.
2. Die 10 ml Suspension auf zwei 15 ml Tubes („*Falcons*“) verteilen und das Sieb noch einmal mit 10 ml GKN nachgespülen. Die Spüllösung wiederum zu gleichen Teilen auf die zwei Falcons aufteilen.
3. Die Suspensionen bei 1300 g 5 Minuten zentrifugieren und auf Eis stellen. Überstand verwerfen.
4. Erythrozyten durch Zugabe von 6 ml eiskalter Ammoniumchloridlösung (150 mM Ammoniumchlorid, 10 mM Natriumbikarbonat, 0,1 mM EDTA, filtern durch 0.45 µm Membran) etwa 5 Minuten lysieren.
5. Mit GKN Lösung auffüllen und erneut zentrifugieren.
6. Beide Pellets zusammen in 50 ml frischer GKN Lösung resuspendieren.
7. Parallel P3U-Zellen in 50 ml GKN aufnehmen und 1 mal 5 Minuten bei 1300 g abzentrifugieren. Anschließend wieder in GKN resuspendieren.
8. P3U-Zellen und Splenozyten noch 2 mal zentrifugieren und resuspendieren. Zuletzt ist jedes Pellet in 10 ml GKN Lösung in Suspension.

### Zellfusion

Die Suspensionen von Splenozyten und P3U-Zellen wurden nun zusammengegeben. Ein weiterer Zentrifugationsschritt der Zellsuspension in 50 ml GKN (1800 g, 5 Minuten) vor der eigentlichen Fusion wurde durchgeführt und nach Absaugen des Zellüberstandes begann die Fusion.

## Kapitel 2 - Material und Methoden

1. Falcon in 37 °C Wasserbad stellen.
2. 900 µl 50 % PEG zum Pellet pipettieren und langsam resuspendieren. 3 Minuten stehen lassen.
3. Bei 400 g im vorgewärmten Zentrifugeneinsatz 4 Minuten abzentrifugieren.
4. Langsam, tropfenweise in warmer GKN Lösung resuspendieren und auf 50 ml auffüllen.
5. Bei 1300 g für 5 Minuten zentrifugieren.
6. In 50 ml MEM + 10 % FCS aufnehmen und in einer Zellkulturflasche etwa 24 Stunden im Brutschrank belassen.
7. Zellen am nächsten Tag sammeln und pelletieren.
8. Zellzahl bestimmen und entsprechend einer Zahl von theoretisch 0,5 Zellen pro 100 µl in Selektionsmedium (MEM + 10 % HCF v/v, 1 % L-Glutamin v/v, 1 % P/S v/v, 10 % HT v/v, 1 µM Aminopterin) verdünnen.
9. Eine entsprechende Anzahl von 96-Well Platten vorbereiten und die Zellsuspension mit 100 µl pro Well ausplattieren.

### 2.7.2 Screening und Aufzucht von Klonen

Fünf Tage nach der Zellfusion wurden die Zellen ein mal mit 100 µl MEM + 10 % FCS v/v, 1 % P/S v/v, 1 % L-Glutamin v/v, 10 % HT v/v gegossen. 9 Tage nach der Fusion waren die ersten Kolonien bereit zum Screening. Die Klolonien wurden zum Screening ausgewählt, nachdem sich das Medium in ihrem Well orange-gelb verfärbt hatte, ein Hinweis auf ausreichendes Wachstum. Das eigentliche Screening wurde mit dem ELIFA (Enzyme Linked Immunoflow Assay) Verfahren durchgeführt, welches im Grunde genommen einen Dot-Blot mit anschließender Immunodetektion darstellt. Es wurde parallel gegen 2 Versionen des humanen, rekombinanten DISC1 Proteins gescreent. Ein mal gegen das Protein voller Länge (FL rDISC, 854 Aminosäuren) und gegen die kürzere Version rDISC316.

## Kapitel 2 - Material und Methoden

1. Zwei nasse Nitrozellulosemembranen (in H<sub>2</sub>O inkubiert) in das ELIFA Gerät spannen.
2. Wells mit H<sub>2</sub>O füllen und Unterdruck anlegen, zum spülen der Membran und des Gerätes.
3. Nitrozellulosemembranen (0,2 µm Whattman) mit Antigen beladen (FL rDISC und rDISC316). Dazu 50 µl pro Well Antigen in 8 M Urea (200 ng Protein pro Well) auftragen und Unterdruck anlegen bis die Lösung komplett durch die Membran gezogen ist.
4. Membran aus dem Gerät entfernen und 1 Stunde in 5 % w/v Magermilchpulver in PBS-T bei Raumtemperatur blocken, um unspezifisch freie Proteinbindungsstellen zu blockieren.
5. Membranen wieder in das Gerät spannen und noch einmal mit H<sub>2</sub>O spülen.
6. In der Zellkultur von zu screenenden Wells 150 µl Überstand auf eine mit 5 % w/v BSA in PBS beschichtete 96-Well Platte (Nunc) übertragen.
7. Je 50µl auf eine der beiden Membranen pipettieren und abgedeckt im Gerät für 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubieren.
8. Membranen 3 x 10 Minuten in PBS-T waschen.
9. Sekundärantikörper (Goat anti Mouse, Pierce) 1:20.000 in PBS-T für etwa 45 Minuten auf die Membranen geben .
10. Die aufbewahrte BSA Platte ebenfalls waschen und mit 50 µl 1:5000 Sekundärantikörper inkubieren.
11. Noch einmal Alles 3 x 10 Minuten mit PBS-T waschen.
12. Membranen wie einen Western-Blot auswerten und Ergebnisse auf Film fixieren.
13. Die BSA Platte im ELISA Verfahren mit BD OptEIA™ (Amersham - GE) nach Herstellerprotokoll behandeln und nach 10 Minuten mit Schwefelsäure die Reaktion stoppen (BSA-positive Klone verwerfen).

## Kapitel 2 - Material und Methoden

Die BSA Platten wurden als „Kontrolle“ für BSA-positive Klone verwandt. Nach Auswertung von BSA Platte und den Filmen ("Dot-Blot") wurden vielversprechende Klone von den ursprünglichen 96-Well Platten auf 24-Well Platten übertragen. Bei ausreichender Zellzahl wurden die Zellen einem re-Screening nach der oben beschriebenen Prozedur unterzogen. Positiv getestete Kolonien wurden dann weiter expandiert, subkloniert und kryokonserviert. Als besonders vielversprechend hat sich bei diesem Vorgang der Antikörper "3D4" herausgestellt. Dieser wird in späteren Kapiteln weiter charakterisiert.

### 2.7.3. Subklonierung von Hybridomazellen

Um die Möglichkeit einer Polyklonalität des selektierten Klones möglichst auszuschließen, wurde mehrfach subkloniert.

1. Zellsuspension aus Zellkulturflasche sammeln und 5 Min bei 1800 g abzentrifugieren.
2. Pellet in frischem Medium resuspendieren und entsprechend 0,5 Zellen pro 100 µl ausverdünnen.
3. 10 % HCF hinzugeben und auf eine 96-Well Platte pipettieren.
4. Nach 5 Tagen mit 100 µl Medium ohne HCF nachgießen.
5. Nach 10-14 Tagen makroskopisch sichtbare (solitäre) Kolonien picken, expandieren und im Western-Blot testen.

### 2.7.4. Pflege und Kultur von Hybridomazellen

Zellen wurden in Suspension in etwa 50 ml Medium (MEM + 10 % FCS v/v, 1 % P/S v/v, 1 % L-Glutamin v/v) in Zellkulturflaschen kultiviert. Im Abstand von 3-4 Tagen wurden Zellen und der Überstand gesammelt, zentrifugiert (5 Minuten bei 1800 g) und gepoolt. 1 mM Natriumazid als Präservativ wurde hinzugegeben. In der Zellkulturflasche verbleibende Zellen wurden wieder mit 50 ml frischem Medium versorgt.

### 2.7.5. Kryokonservierung von Hybridomazellen

Nach Pelletierung aus einer Zellkulturflasche (etwa 50 ml Zellsuspension pro Pellet), die Zellen in 1 ml FCS + 10 % v/v PEG resuspendieren und in CryoTubes™ pipettieren. Anschließend zunächst auf Eis stellen und danach in einer Styropor®Box in den Tiefkühler bei -80 °C geben. Anschließend (nach 1 Tag) eventuell in flüssigem Stickstoff einlagern.

### 2.8 Expression in eukaryotischen Zellen

Rekombinantes FL DISC1 wurde mit transienter Transfektion durch Lipofektion, in humanen, neuronalen Zellen exprimiert (humane Neuroblastomzellen „NLF“ - Children's Hospital of Philadelphia, Philadelphia, PA). Nach Expression wurde das Lysat der NLF Zellen für weiterführende Experimente verwendet. Zellkulturbedingungen und steriles Vorgehen entsprechen denen aus Kapitel 2.6. Ab einer Wachstumsdichte von ~ 80 - 90 %, wurden die in RPMI Medium (+ 1 % v/v L-Glutamin + 10 % v/v FBS) adhärent wachsenden NLF Zellen subkultiviert. Hierzu wurden sie mit PBS gewaschen und durch Zugabe von Trypsin-EDTA gelöst. Anschließend wurden die Zellen in frischem Zellkulturmedium resuspendiert und zur weiteren Kultivierung in einer Verdünnung von 1 : 10 in eine neue Zellkulturflasche überführt.

#### Fertige Gebrauchslösungen und Nährmedien

Produkt	Hersteller
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (1x D-PBS)	Invitrogen (14040)
Metafectene™ - Transfektionsreagenz	Biontex (T020)
Proteinaseinhibitorlösung 25 x aus „cOmplete“ Tabletten	Roche (11873580001)
RPMI 1640 - NLF Kulturmedium	Invitrogen (31870)
Trypsin-EDTA (0,05% Trypsin)	Invitrogen (25300)

## Pufferlösungen

Bezeichnung	Zusammensetzung
Lysepuffer	50 mM Tris-HCl pH 8,0 150 mM NaCl, 0,5% v/v TX-100 0,5% w/v DOC, 1 x Proteinaseinhibitor

### 2.8.1 Transiente Transfektion humaner Zellen

Um Proteine in Zellkultur zu exprimieren, wurden die verwendeten Zellen mit der entsprechenden DISC1 Plasmid-DNA transfiziert. In dieser Arbeit erfolgte eine transiente Transfektion. Dabei wird kurzzeitig fremd-DNA (Plasmid-DNA) in eukaryontische Zellen eingebracht, welche zu Proteinen translatiert werden kann. Eine der Methoden zur DNA Einbringung ist die Lipofektion. Als Transfektionsreagenz dienen hier synthetisch hergestellte Phospholipid-Partikel oder kationische Lipide, welche mit der gewünschten Plasmid-DNA einen Komplex eingehen. Die Lipid-Partikel-DNA-Komplexe fusionieren mit der Zellmembran und werden so im Inneren der Zelle aufgenommen [104]. FL DISC1 cDNA (Geschenk von Akira Sawa et al.), kloniert in einen pET-16b Vektor (Novagen) an den Vektorschnittstellen NdeI/BamHI, inklusive N-terminal Dekahistidin-Tag, wurde für die Transfektion verwendet.

1. Zellen am Tag vor der Transfektion in eine 6-Well Kulturplatte aussähen (Zieldichte am Tag der Transfektion etwa 90 %).
2. Ein - 2 µg des Plasmidvektors nach Herstellerprotokoll mit Metafectene™ (Biontex) in 100 µl RPMI (ohne Zusätze) für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren (Komplexbildung).
3. Das Transfektionsgemisch zu den NLF Zellen pipettieren.
4. Nach 12 oder 24 Stunden einen Mediumwechsel durchführen.
5. Vierundzwanzig oder 48 Stunden später die Zellen lysieren und den Transfektionserfolg in der PAGE überprüfen.

## 2.8.2 Lyse der Zellen

Nach Entfernung des Kulturmediums und waschen der Zellen in PBS, wurden die Zellen mit Lysepuffer im Kulturgefäß lysiert. Das so gewonnene Lysat (10 %iges Basislysate) wurde dann bei -20 oder -80 °C gelagert.

## 2.9 Affinitätsaufreinigung von 3D4

### Pufferlösungen

Bezeichnung	Zusammensetzung
Äquilibrierungspuffer	20 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, auf pH 8,0 einstellen (NaOH)
Blockungspuffer	100 mM Tris-HCl, pH 8,5
Elutionspuffer	100 mM Glycin-HCl pH 2,5
Kopplungspuffer	200 mM NaHCO <sub>3</sub> , 500 mM NaCl, pH 8,3
Waschpuffer 1	100 mM Azetat, 500 mM NaCl, pH 4,5
Waschpuffer 2	100 mM Tris-HCl pH 8,5

### Geräte

Produkt	Hersteller
Biologic™ LP Anlage	Biorad (731-8300 und 731-8301)
Biofrac™ Fraktionenkollektor	Biorad (41-0002)

## Kapitel 2 - Material und Methoden

Um eine möglichst hohe Reinheit des monoklonalen anti DISC1 Antikörpers 3D4 zu erreichen, wurde nach Subklonierung an einer NHS-Sepharose-Affinitätsmatrix aufgereinigt. NHS (N-Hydroxysuccinimid) geht eine chemisch stabile Verbindung mit primären Aminogruppen von Liganden ein. Ein aus einer Kohlenstoffkette bestehender Abstandshalter sorgt laut Hersteller für optimale Bindungsbedingungen von Peptidliganden an die Sepharosematrix [113]. Die Matrix wurde mit rDISC316 als Ligand hergestellt. Vorexperimente zeigten, dass 3D4 und sein Subklon 3D4N.IIE2, rDISC316 im Western-Blot reproduzierbar binden und solide Signale bei Proteinkonzentrationen von 100 ng oder mehr Protein produzierten.

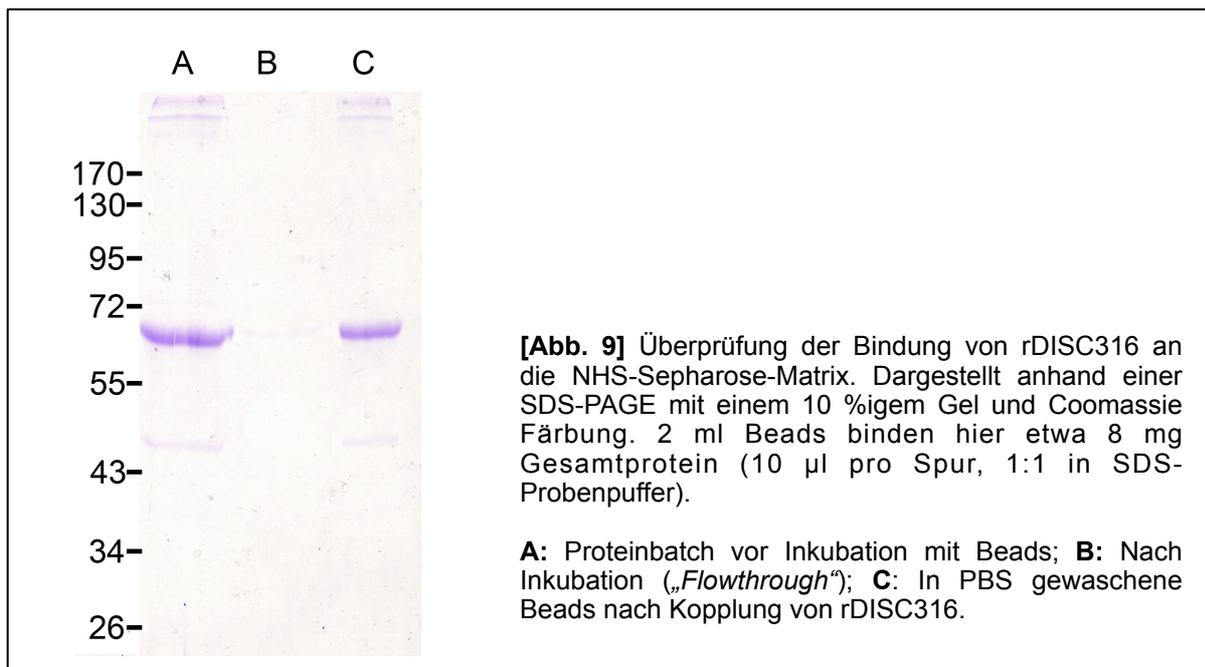
1. Zwei ml NHS-Sepharosebeads (Amersham / GE Healthcare) nach Herstellerprotokoll für die Antigenkopplung vorbereiten.
2. Etwa 8 mg Protein bei RT gegen den Kopplungspuffer dialysieren (3 mal mindestens 500-faches Volumen, jeweils mindestens 3 Stunden) und 2 Stunden bei Raumtemperatur an eine voraktivierte NHS-Sepharosematrix kovalent koppeln.
3. Es folgen Blockungs- und Waschschriffe mit Tris- und Azetatapuffer nach Herstellerprotokoll (GE Instructions 71-5000-14, Pre-activated media).
4. Die Affinitätssäule dann in 20 % Ethanol bei 4 °C bis zum Gebrauch lagern.

Die Kopplungseffizienz wurde in der SDS-PAGE, mit anschließender Coomassie Färbung überprüft. Die Aufreinigung erfolgte mit Hilfe eines Biologic™ LP (Low Pressure) Systems der Firma Biorad bei Raumtemperatur. Die Rollerpumpe des Systems sorgte für eine Flussrate von 1 ml pro Minute während der Antikörperbindung und 0,5 ml pro Minute bei der Elution.

1. Die Säule wurde zunächst mit ~40 CVs Äquilibriumspuffer beschickt.
2. Pro Lauf wurden ~250 ml gefilterter Zellkulturüberstand (Millipore, 0,22µm) des 3D4 Subklones 3D4N.IIE2 mit 1 ml pro Minute über die Säule gegeben.

## Kapitel 2 - Material und Methoden

3. Anschließend folgte ein Waschlauf mit ~40 CVs Milli-Q H<sub>2</sub>O.
4. Eluiert wurde anschließend in 500 µl Fraktionen mit Hilfe eines Fraktionenkollektors von Biorad.



## 2.10 Immunopräzipitation

### Puffer und Gebrauchslösungen

Bezeichnung	Zusammensetzung
Bindungs-/Waschpuffer	20 mM Natriumphosphat, pH 7,0

Die Immunopräzipitation ist ein Verfahren zur spezifischen Isolation von Antigenen aus einem Proteingemisch, mit Hilfe von an eine Matrix gebundener Antikörper. Das Verfahren ist auch hilfreich bei der Etablierung neuer Antikörper, um deren Erkennung eines bestimmten Antigens nachzuweisen. Dabei muss zunächst der Isotyp des Antikörpers bestimmt und eine entsprechende Matrix ausgewählt werden (z.B. Protein-G-Agarose für IgG1 Antikörper).

## Kapitel 2 - Material und Methoden

Protein-G ist ursprünglich ein Zellwandprotein aus Streptokokkenspezies, welches den Fc-Teil (konstantes Fragment) von Immunoglobulinen (Typ IgG) binden kann. Protein-G bindet dabei an seinem Aminoterminus sowie über epsilon-Aminogruppen von Lysin an die Argarosematrix ("Beads"). Nach Präzitation des Antigens durch den immobilisierten Antikörper, kann dieses eluiert und mit einem bereits etablierten Zweitantikörper gegen das gesuchte Antigen detektiert werden [113]. Eine direkte Analyse in der SDS-PAGE und im Western-Blot ist ebenso möglich.

1. 30 µl Beads (entspricht etwa 60 µl Suspension bei Protein-G-Agarose) 3 x in 1 ml Waschpuffer waschen und jeweils bei 1800 g für 5 Minuten abzentrifugieren.
2. Antikörper im Bindungspuffer hinzugeben (1 ml Gesamtvolumen, gefilterter Zellkulturüberstand 1 zu 1 verdünnt).
3. 1 Stunde bei RT auf dem Drehrad inkubieren.
4. Waschvorgang noch 3 x wiederholen.
5. Nun etwa 250 ng rDISC316 in Bindungspuffer hinzugeben (Gesamtvolumen 500µl).
6. 1-2 Stunden bei 4°C inkubieren (in Rotation).
7. Die Beads noch mindestens 3 x waschen und dann in 30 µl SDS-Probenpuffer für die PAGE aufnehmen.
8. 5 Minuten bei 99 °C erhitzen und auf Eis abkühlen.
9. Nach Zentrifugation kann der Überstand zur PAGE auf ein Gel geladen werden, anschließend Western-Blot.

### 2.11 Immunochemie

Die Immunochemie wurde durchgeführt, um eine Detektion von rekombinantem DISC1 in Zellen sowie endogenem DISC1 in Geweben durch affinitätsgereinigten Antikörper 3D4 nachzuweisen.

## Fertige Gebrauchslösungen, Kits und Antikörper

Produkt	Hersteller
ICC Eindeckmedium Eukitt®	Fluka (03989)
ProLong® Gold Eindeckmedium mit DAPI	Invitrogen (P-36931)
Alexa Fluor® 594 goat anti mouse Sekundärantikörper	Invitrogen (A31623)
Goat anti mouse biotynlierter Sekundärantikörper	Vector (BA-9200)
Streptavidin-Meerrettichperoxidasekomplex (SA-HRP)	Invitrogen (SA100-01)
DAB Substratkit für Peroxidase (HRP)	Vector (SK-4100)

### 2.11.1 Immunocytochemie

Die verwendeten, humanen NLF-Zellen wurden mit FL rDISC1 C704 oder FL rDISC1 S704 per Lipofektion 48h transient transfiziert. Zur Immunodetektion wurden zwei unabhängige Verfahren durchgeführt. Zum einen die klassische Immunocytochemie (ICC) mit Diaminobenzidin (DAB) als Chromogen und zum anderen die Fluoreszenzimmunocytochemie (FICC). Für die klassische ICC wurde ein System mit biotynliertem Sekundärantikörper sowie einem Streptavidin-Meerrettichperoxidasekomplex (SA-HRP) als Signalverstärker verwendet. Nach Bindung des Sekundärantikörpers an den Fc-Teil von 3D4, kommt es zur Bindung des Streptavidinkomplexes an den biotynlierten Antikörper. Anschließend oxidiert die gebundene HRP das zugegebene DAB zu einem unlöslichen, braunen Präzipitat, welches im herkömmlichen Lichtmikroskop gesehen werden kann. Bei der FICC hingegen werden im normalen Mikroskop unsichtbare Chromophore, welche z.B. an Sekundärantikörper konjugiert wurden, durch Licht bestimmter Wellenlängen bestrahlt. Absorbierte Lichtenergie regt eine Emission von längerwelligem Fluoreszenzlicht an, welches durch einen monochromatischen Filter betrachtet werden kann. Das FICC Eindeckmedium enthält auch 4',6-Diamidin-2'-phenylindoldihydrochlorid (DAPI) zur spezifischen DNA-Bindung in Zellkernen [104,114].

## Kapitel 2 - Material und Methoden

DAPI hat sein Emissionsmaximum bei einer Wellenlänge von 488 nm. Es dient hier als „Gegenfärbung“ für Kernstrukturen. Beide Verfahren sind bis nach Permeabilisierung der NLF Zellen mit 0,5 % w/v Saponin in PBS (für 30 Minuten bei Raumtemperatur) identisch.

1. Nach Permeabilisierung 3 mal in PBS waschen.
2. Primärantikörper in PBST + 0,5 % Saponin + 2 % BSA aufnehmen.
3. 250 µl pro Well Primärantikörper hinzugeben und über Nacht bei 4 °C inkubieren.
4. 3 mal in PBS waschen.
5. Für 30 Minuten bei RT, 250 µl des entsprechenden Sekundärantikörpers (nach Herstellerempfehlungen verdünnt) in PBS + 0,5 % Saponin + 2% BSA hinzugeben und Zellen 3 mal in PBS waschen.
6. FICC: Die Rundgläschen mit Zellen der entsprechenden Wells herausnehmen und mit FICC Eindeckmedium auf Objektträgern fixieren. Mit Nagellack versiegeln, bei 4 °C unter Lichtabschluss lagern.
7. ICC: 30-minütige Inkubation mit Streptavidin-Meerrettichperoxidasekomplexen.
8. 3 mal in PBS waschen.
9. 250 µl der nach Herstellerprotokoll angesetzten DAB-Substratlösung pro Well auf die Zellen geben und etwa 2 Minuten färben lassen.
10. Mit H<sub>2</sub>O waschen und die Reaktion stoppen.
11. Nach aufsteigender Alkoholreihe können die in Xylol gebrachten Rundgläschen mit anhaftenden Zellen, auf Objektträgern fixiert werden.

### 2.11.2 Immunohistochemie

Immunohistochemische Versuche wurden mit formaldehydfixierten, humanen Hirnschnitten (Sammlung der Stanley Medical Foundation - SMRI, Studie zuvor von der Ethikkommission der Heinrich Heine Universität genehmigt) oder fixierten, nicht-perfundierten Nagetierhirnpräparaten durchgeführt (Wistar Rattenhirne formaldehydfixiert oder SVEV129 Mäusehirne formaldehydfixiert, Herkunft: TVU Universität Düsseldorf).

## Kapitel 2 - Material und Methoden

Die Präparate wurden freundlicher Weise zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. Carsten Korth). Die Inkubationen erfolgten in einer befeuchteten Kammer, um eine Austrocknung der Schnitte zu vermeiden [20,21].

Falls nicht anders angegeben, erfolgten alle Schritte bei Raumtemperatur. Die Trägerlösung für Antikörper und Streptavidinkomplex bestand in 2 % w/v PBS-A (~300 µl pro Schnitt). Folgendes Protokoll wurde während der Versuche entwickelt und optimiert.

1. Objektträger mit Hirnschnitten für 10 Minuten bei 80 °C inkubieren, um eine bessere Adhäsion zu gewährleisten.
2. Zwei mal 10 Minuten in 250 ml Xylol entparaffinieren.
3. Für 30 Minuten endogene Peroxidasen mit 0,3 % v/v Wasserstoffperoxid in Methanol inaktivieren.
4. Rehydration in absteigender Alkoholreihe 2 mal für je 1 Minute pro Schritt (250 ml Ethanol 99,5 % → 96 % → 70 % → Aqua dest.)
5. Schnitte mit Primärantikörper über Nacht bei 4 °C inkubieren.
6. Drei mal in PBS waschen.
7. Schnitte mit biotinyliertem Sekundärantikörper Goat anti Mouse IgG (Vector) 1:500 für 1 Stunde inkubieren.
8. Drei mal in PBS waschen.
9. Anschließend mit Streptavidin-Meerrettichperoxidasekomplexen für 1 Stunde inkubieren.
10. Erneut waschen und in Aqua dest. bringen.
11. Mit Vector DAB Kit nach Herstellerprotokoll färben.
12. Eventuelle Gegenfärbungen (mit Hämalaun) anschließen.
13. Dehydration in aufsteigender Alkoholreihe (invers zu Punkt 4) und Überführung in Xylol.
14. Eindeckeln mit Eukitt® und trocknen unter der Abzugshaube.

## 2.12 Größenausschlusschromatographie

### Puffer und Lösungen

Bezeichnung	Zusammensetzung
Laufpuffer	10 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl pH 8,0, 10 mM $\beta$ -ME

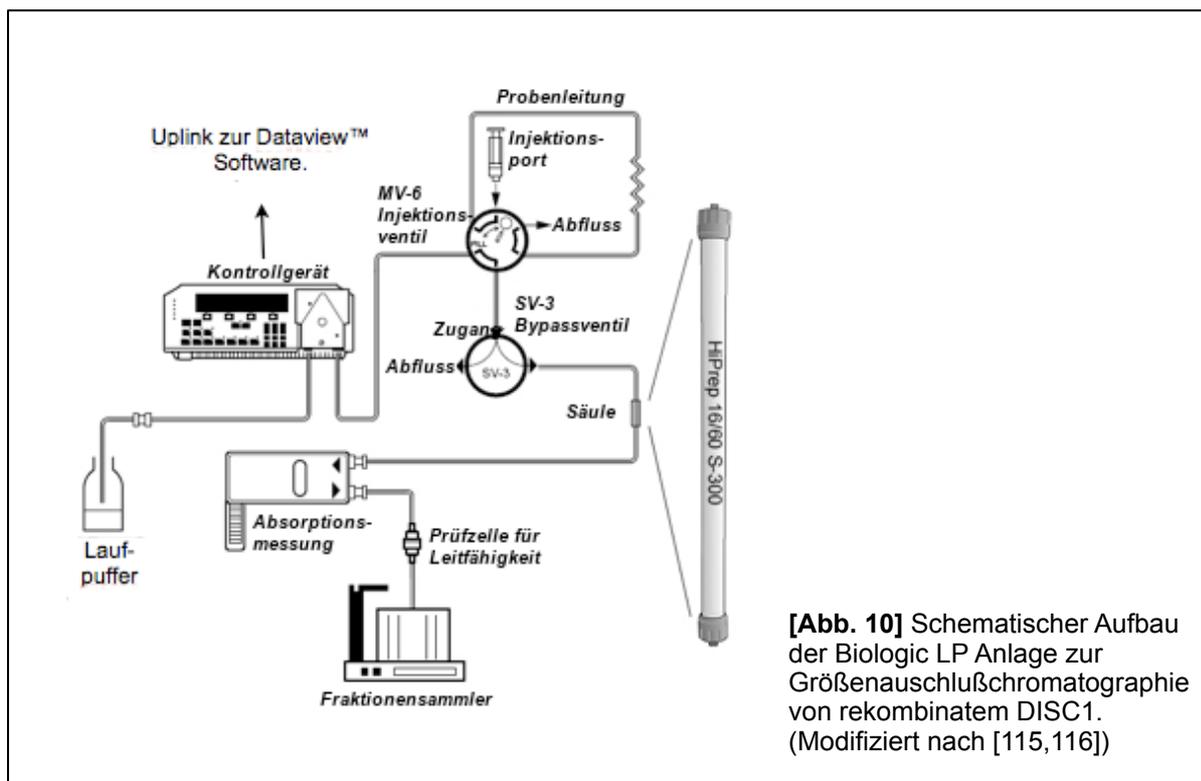
### Spezielle Geräte, Kits und Verbrauchsmaterialien

Produkt	Hersteller
Biologic™ LP Anlage	Biorad (731-8300 und 731-8301)
Biologic™ DataView™ Software	Biorad (731-8365)
HiPrep 16/60 Sephacryl S-300 High Resolution Säule	GE Healthcare (17-1167-01)
Gel Filtration Standard	Biorad (151-1901)

Die Größenausschlusschromatographie (SEC) ist ein Gelfiltrationsverfahren zur Proteinauftrennung nach hydrodynamischem Volumen. Dabei wird ein Proteingemisch durch eine stationäre Phase geleitet, welche Poren eines definierten, mittleren Durchmessers besitzt. Zu große Moleküle können die Poren nicht passieren und fließen durch Kurzschlusskanäle daran vorbei. Moleküle mit großem hydrodynamischen Volumen eluieren also zuerst, während kleinere Moleküle zunächst in die Matrix eintreten und später eluieren. Die Matrix ist ein kreuzvernetztes Kopolymer des Allyl-Dextran und N,N'-Methylen-Bisarcylamid. Die Kreuzvernetzung verleiht dem Gel laut Hersteller eine hohe mechanische Festigkeit und chemische Stabilität [116]. Es wurde eine HiPrep 16/60 Sephacryl S-300 High Resolution Säule von GE Healthcare benutzt. Nach Kalibrierung der Rollerpumpe des Biologic LP Gerätes (Siehe Abb. 10 Seite 57) wurde die in 20 % Ethanol gelagerte Sephacryl-Säule zunächst mit 2 CVs Laufpuffer orthograd gespült und äquilibriert.

## Kapitel 2 - Material und Methoden

Die Flussrate betrug 1 ml pro Minute bei Raumtemperatur. Vor der eigentlichen SEC wurde das Leervolumen („Void Volume“) der Säule mit 1 mg „Blue Dextran“ bestimmt (Probenvolumen 1 ml) und ein Probelauf (0,5 ml pro Minute) mit einem Biorad Proteinstandard durchgeführt. Dieser wurde laut Herstellerprotokoll angesetzt und auf 1 ml Volumen mit Laufpuffer aufgefüllt. Die UV Absorption bei 280 nm wurde rechnergestützt mit der BioLogic™ LP Data View™ Software aufgezeichnet. Alle verwendeten Lösungen wurden durch einen 0,22 µm Filter (Millipore) gefiltert.



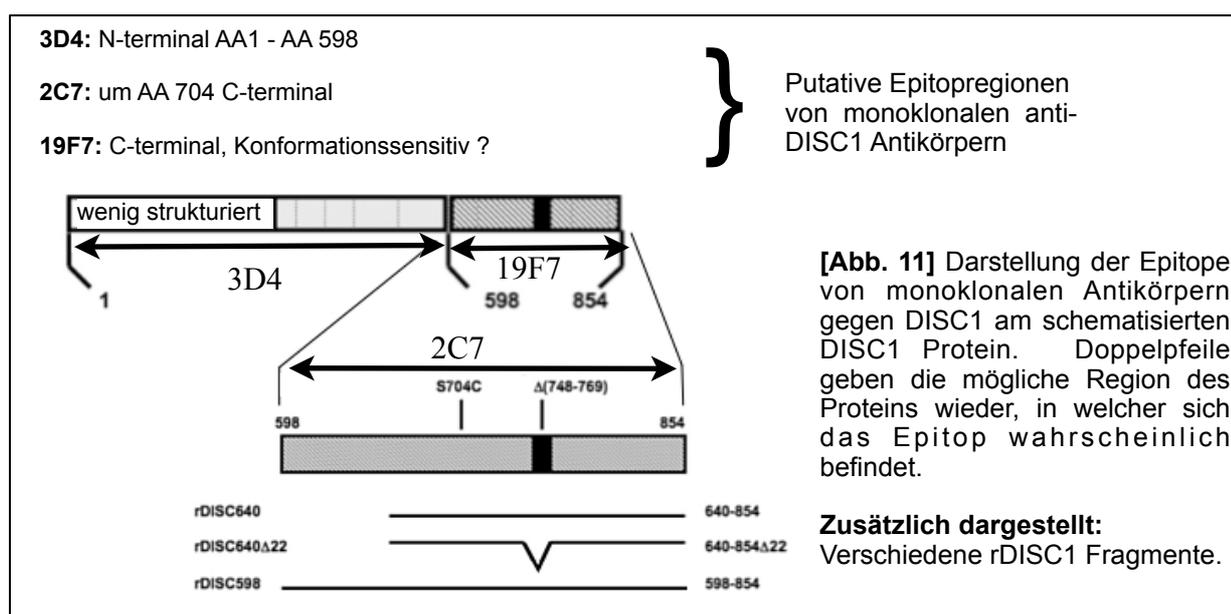
### 3.0 Ergebnisse

#### 3.1 Zusammenfassende Übersicht

Dieses Kapitel soll zusammenfassend die hier generierten und charakterisierten Antikörper und ihre Eigenschaften darstellen.

#### Monoklonale Mausantikörper in dieser Arbeit

Name	Immunisiert mit	Epitop	Immunhistologie	Iso- typ	Western-Blot
<b>3D4</b>	FL DISC1 (S704) in SVEV129 Mäusen (TVA HHU)	Zwischen AS1 und AS 598 am N-Terminus	prädominant cytosolisches Staining in Hirnschnitten, erkennt rekombinantes DISC1 S704 in NLF-Zellen	IgG1	Affinitätsaugereinigt Immunopräzipitation durchgeführt rDISC316 (ca. 60 kDa) sowie FL DISC1 S704 aus NLF-Zellen (ca. 100 kDa). Möglicherweise DISC1 assoziierte Banden in Maushirn-homogenat (ca 100 kDa)
<b>2C7</b>	C-terminales Fragment rDISC598 (AS 598-854) (S704) in SVEV129 (TVA HHU)	Epitop wahrscheinlich C-terminal um AS 704 herum	keine Daten	?	Bevorzugt S704 Varianten von C-terminalen rDISC1 Fragmenten
<b>19F7</b>	C-terminales Fragment rDISC598 (AS 598-854) (S704) in SVEV129 (TVA HHU)	Epitop wahrscheinlich C-terminal und Konformations-spezifisch	keine Daten	IgG2a	Affinitätsaufgereinigt Bevorzugt C704 Varianten von hochmolekularen DISC1 Spezies Signalverstärkung durch KOH Behandlung von ungeblockten Membranen



### 3.2 Monoklonaler Antikörper 3D4 im Western-Blot

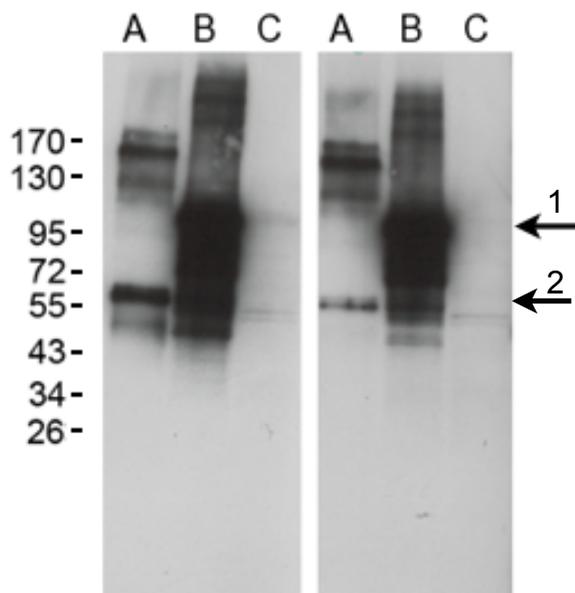
Zellkulturüberstand von 3D4, sowie affinitätsaufgereinigter Antikörper liefern solide Signale auf rekombinantem DISC1 Protein im Western-Blot. Der Antikörper ist aufgereinigt (z.B. in PBS) mehrere Wochen problemlos im Kühlschrank aufzubewahren. Für eine Langzeitlagerung kann er bei -20 bis -80 °C eingefroren werden. Eine Schnellbestimmung mittels Teststreifensystem ergab einen IgG1 Isotyp für den Mausantikörper 3D4 mit Leichtketten vom Typ  $\kappa$  (Roche Isostrip #11493027001). Es zeigte sich, dass nach Affinitätsaufreinigung die Proteinkonzentration um  $\sim 30 \mu\text{g}$  pro ml im aufgereinigten Batch betrug (Proteinbestimmung nach Herstellerprotokoll, mit einem Biorad Proteinassay #500-0006 und anschließender Absorptionsmessung bei 595 nm). Es konnten verschiedene, gepoolte Batches des affinitätsgereinigten Antikörpers in Verdünnungen von bis zu 1:500 erfolgreich im Western-Blot eingesetzt werden, wobei zumeist Konzentrationen von 1:100 benutzt wurden.

#### Detektion von rekombinantem Protein

3D4 erkennt rekombinantes rDISC316 (Monomer bei  $\sim 60 \text{ kDa}$ ) und FL rDISC1 aus Lysat, von mit FL rDISC1 transfizierten NLF Zellen ( $\sim 100 - 110 \text{ kDa}$ ), in der Immunodetektion nach Western-Blot (alle verwendeten Fragmente entsprechen der S704 Variante). Kleinere rDISC1 Fragmente (rDISC640 und rDISC589) werden nicht mehr erkannt. Daher liegt zumindest ein Epitop von 3D4 zwischen Aminosäure 1 und 598 von DISC1, also N-terminal.

Polyklonale Kaninchenantikörper FFD5 und FFC6, sowie ein gepooltes, affinitätsgereinigtes Batch aus diesen beiden Antikörpern wurden als „*Kontrollserum*“ bei der Detektion nach Western-Blot eingesetzt, da diese reproduzierbar alle verwendeten rDISC1 Fragmente darstellten (Abb. 12).

I.

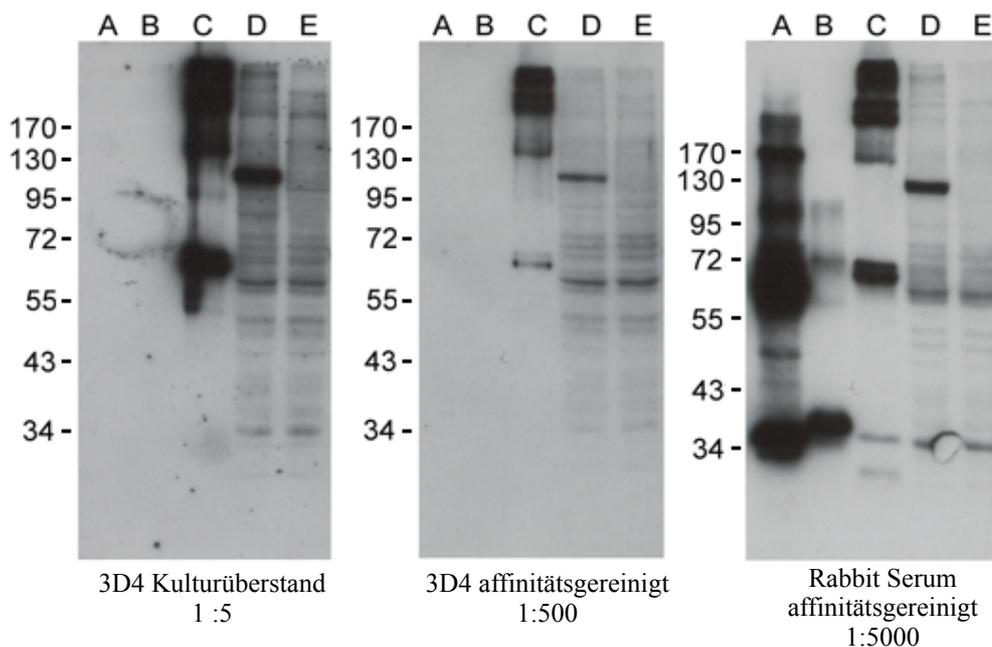


**[Abb. 12] I:** Western-Blot, Detektion mit 3D4, Subklon N.IIE2. (**A:** rDisc316 100 ng (Pfeil 2); **B:** Lysat von humanen, neuronalen NLF Zellen, welche humanes FL DISC1 überexprimierten; **C:** Lysat von NLF-Zellen, untransfizierte Kontrolle). Man erkennt DISC1 assoziierte Banden oberhalb 95 kDa im Lysat transfizierter Zellen (Pfeil 1).

**Links:** Detektiert mit 3D4 Zellkulturüberstand 1:5 in PBS-T.

**Rechts:** Detektiert mit affinitätsaufgereinigtem 3D4 Antikörper 1:100 in PBS-T.

II.

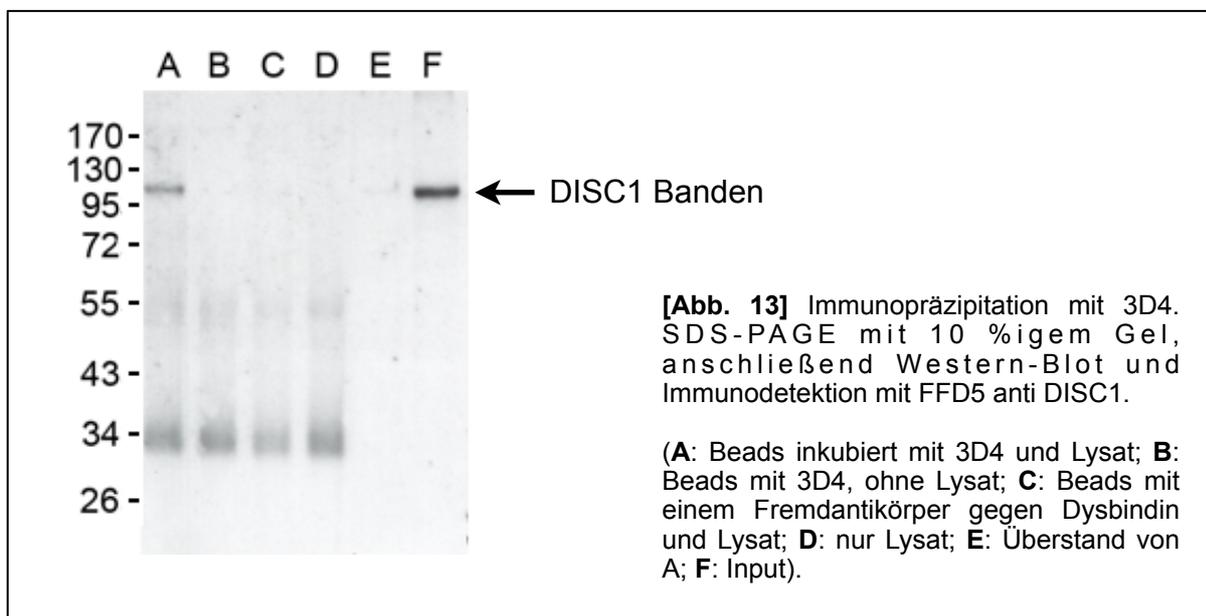


**II:** 3D4 Zellkulturüberstand und affinitätsgereinigter Antikörper, im Vergleich mit aufgereinigtem anti DISC1 Rabbit Serum (Pool aus FFD5 und FFC6) . (**A:** rDISC640 100 ng; **B:** rDISC598 100 ng; **C:** rDISC316 100 ng; **D:** Lysat von NLF Zellen, FL DISC1 Überexpression; **E:** Lysat nicht-transfizierter NLF Zellen). SDS-PAGE mit anschließendem Western-Blot und Immunodetektion. Das Epitop von 3D4 liegt demnach N-terminal zwischen AS 1 und AS 589 von DISC1.

Das polyklonale „Kontrollserum“ erkennt hier wie erwartet rDISC1 in allen Spuren: rDISC640 und rDISC598 oberhalb 34 kDa (rDisc 640 Dimere zwischen der 55 und 72 kDa Markierung), rDISC316 knapp unterhalb 72 kDa, transfiziertes FL rDISC1 oberhalb 95 kDa..

### 3.3 Immunopräzitation mit 3D4

Eine Immunopräzitation mit 3D4 (Zellkulturüberstand) und 5% Lysat von mit FL DISC1 überexprimierenden Zellen NLF Zellen wurde durchgeführt. 3D4 präzipitierte aus Lysat sein rekombinantes Antigen (deutliche Bande bei ~100 - 110 kDa). Das gleiche Experiment mit 2 %igem, humanem Hirnhomogenat (SMRI) konnte hier keine Anreicherung von DISC1 durch 3D4 im Western-Blot nachweisen (Daten nicht gezeigt). Detektiert nach Western-Blot wurde in diesem Fall mit FFD5 (rabbit anti DISC1) Serum 1:2500 in PBST (Abb. 13).

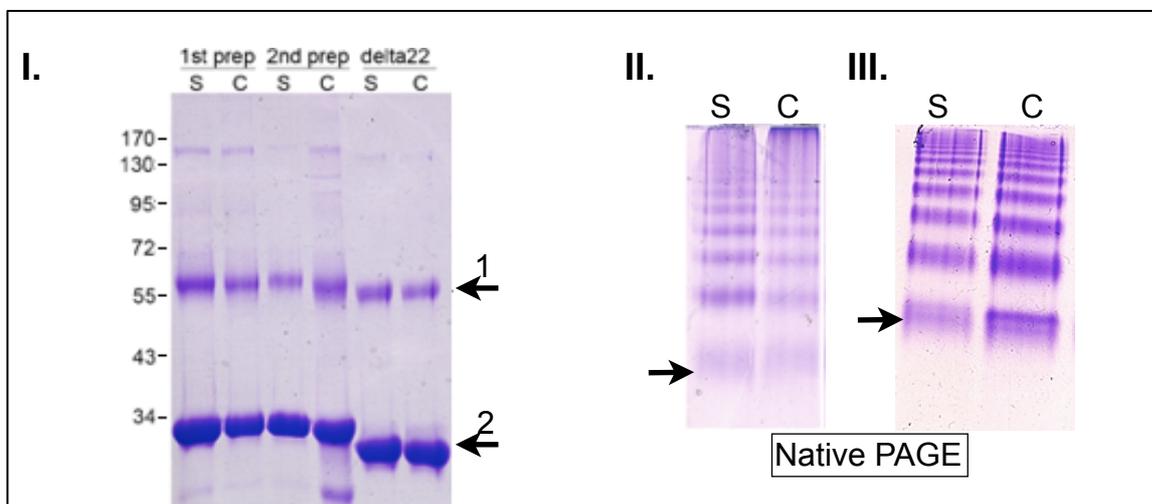


### 3.4 Charakterisierung C-terminaler DISC1 Fragmente

Im Verlauf dieser Arbeit wurden verschiedene Antikörper benutzt, um eine Charakterisierung rekombinanter DISC1 Fragmente durchzuführen. Monoklonaler Mausantikörper 19F7, immunisiert gegen eine heterogene Mischung von rDISC598 (S704) Dimeren und Oligomeren, sowie monoklonaler Mausantikörper 2C7, immunisiert gegen rDISC598 (S704), wurden mit einem standard Hybridomprotokoll (Korth et al. 1999) generiert und selektiert [20]. Antikörper 19F7 wurde zudem affinitätsgereinigt verwendet, bei 2C7 erfolgte die Blotinkubation mit Zellkulturüberstand in PBS-T. Ein affinitätsaufgereinigtes Batch von 19F7 wurde freundlicher Weise von Prof. Dr. Korth zur Verfügung gestellt.

### 3.4.1 Laufverhalten von rDISC640 Fragmenten in der PAGE und SEC

In der SDS-PAGE zeigen sich in der Coomassiefärbung mehrere Proteinspezies in den untersuchten Präparationen von rDISC640. Es waren keine eindeutigen Unterschiede im Laufverhalten der S704 und C707 Varianten von rDISC640 festzustellen. Wie erwartet zeigten die deletären (rDISC640  $\Delta$ 22) Fragmente etwas niedrigere Molekularmassen in der SDS-PAGE. Die hauptsächlich auszumachenden Spezies waren in allen Proben Monomere bei ~30 kDa, sowie SDS-resistente Dimere bei ~57 kDa (bzw. ~55 kDa den Deletionsvarianten). In der nativen PAGE (nicht denaturierend) sah man eine leiterförmige Aufspaltung der in den Proben enthaltenen Proteinspezies, wobei das unterste Signal wahrscheinlich dimerem rDISC640 entspricht (Abb. 14). Diese Annahme entspringt den Beobachtungen der parallel durchgeführten SEC-Vorversuche, mit denen im gleichen Proteinbatch unter reduzierenden Bedingungen keine monomeren Spezies nachgewiesen werden konnten. Parallelversuche durch Gustavo Sajnani (University of Santiago de Compostela, Santiago de Compostela, Spain) mit einer Äkta™-HPLC-Säule (Amersham) bestätigten die Ergebnisse (siehe Kapitel 4).



**[Abb. 14]** Coomassiefärbungen verschiedener DISC1 Fragmente nach PAGE mit 10 % Gel (rDISC640 S704 (S), rDISC640 C704 (C), rDISC640  $\Delta$ 22 Varianten).

**I:** Hier sind insgesamt 6 sequentielle Expressionen („preps“) in der SDS-PAGE dargestellt. Aufgetragen sind jeweils identische Mengen von rDISC640 S704 bzw. C704, in den letzten 2 Spuren jeweils mit der  $\Delta$ 22 Deletion (**Pfeil1** markiert Dimere, **Pfeil2** Monomere).

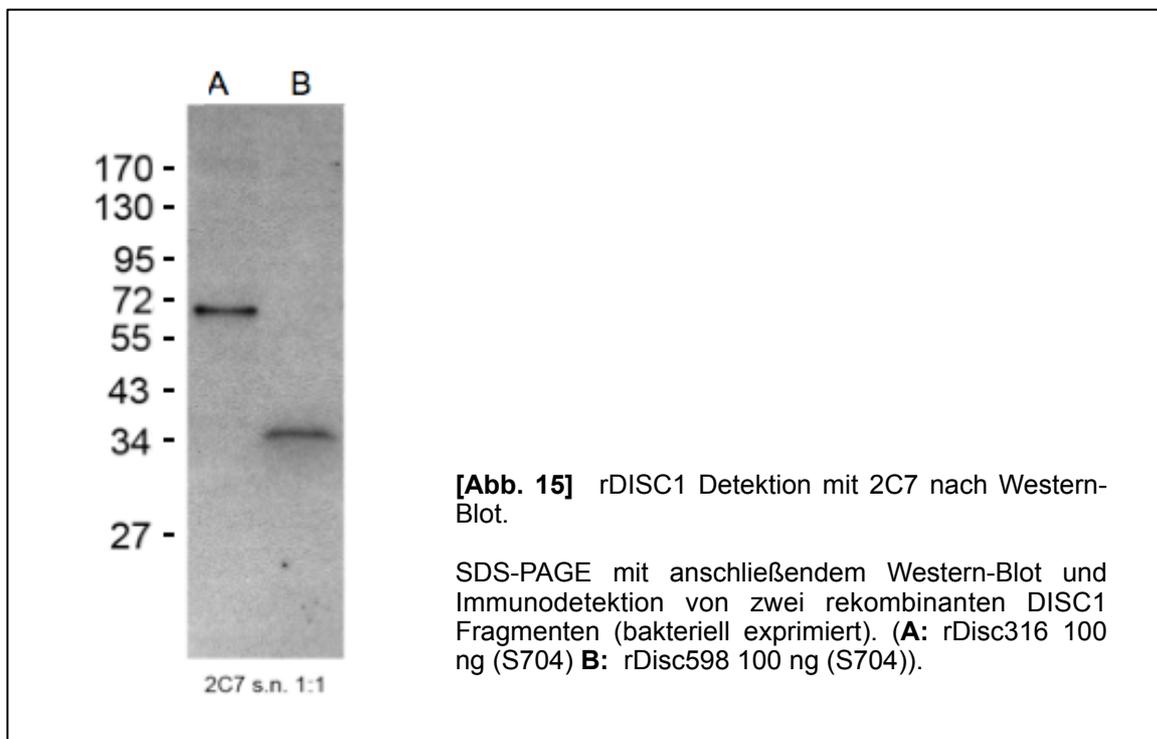
**II + III:** Native PAGE je einer Präparation verschiedener rDISC640 Fragmente. Links Fragmente ohne die  $\Delta$ 22 Deletion (B), rechts die  $\Delta$ 22 Varianten von S704 und C704. **Pfeile** markieren die dimeren Spezies der jeweiligen Fragmente.

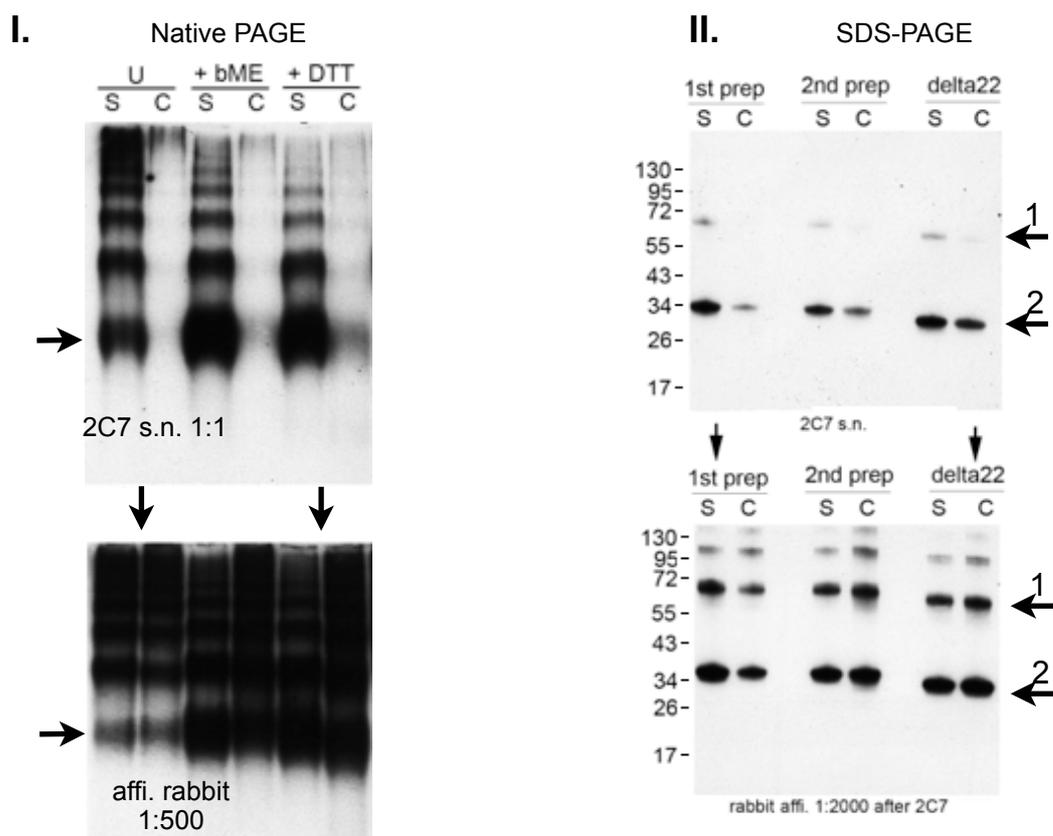
### 3.4.2 Detektion von rDISC640 durch 19F7 und 2C7

Mehrere, rekombinante DISC1 Fragmente (S704 und C704) wurden mit den Antikörpern 19F7 und 2C7 im Western-Blot nach SDS-PAGE und nativer PAGE detektiert. Anschließend folgte eine sequentielle Nachdetektion der gleichen Blots mit polyklonalen Kaninchenantikörpern als Kontrolle. Bereits selektierte Klone von 2C7 wurden freundlicher Weise für die weitere Kultivierung und Charakterisierung von Prof. Dr. Carsten Korth zur Verfügung gestellt.

#### Detektion mit 2C7 anti DISC1

2C7 bindet an rDISC316 und rDISC598 (S704). Auch rDISC640 Fragmente werden in der SDS-PAGE detektiert (S704 sowie C704). Dabei zeigt sich jedoch eine deutliche Präferenz von 2C7 für die Serinvarianten (S704) von rDISC640 (mit und ohne  $\Delta 22$  Deletion) in der denaturierenden SDS-PAGE. In der nativen PAGE jedoch konnte kein sicheres Signal bei rDISC640 C704 mit 2C7 erzeugt werden, S704 wird jedoch detektiert (Abb. 15 und 16).





**[Abb. 16]** Ergebnisse der rDISC640 Detektion mit 2C7 nach Western-Blot

**I:** Native Page (11% Gel) mit anschließendem Blot und Immunodetektion. **Oben** dargestellt, die Signale einer 2C7 Detektion verschieden behandelter rDISC640 S704 (S) und rDISC640 C704 (C) Fragmente (Unbehandelt (U) oder vor laden des Gels reduziert mit 2 mM  $\beta$ -ME oder 2 mM DTT). Seitliche **Pfeile** markieren dimeres DISC1. Man erkennt eine Präferenz von 2C7 für die S704 Variante der rDISC640 Fragmente. In der C704 Spur kein sicheres Signal. **Unten:** Sequentielle Kontrollinkubation des Blots mit affinitätsgereinigtem, polyklonalem anti DISC1 Kaninchenserum. Man erkennt ebenso das vermehrte Auftreten dimerer Spezies unter reduzierenden Bedingungen (Vergleiche U mit  $\beta$ -ME oder DTT).

**II:** SDS-PAGE mit anschließendem Western-Blot und Immunodetektion verschiedener Proteinpräparationen von rDISC640 (verschiedene Batches exprimierter, aufgereinigter Proteine, *1st* und *2nd prep* entsprechen rDISC640; *delta22* entspricht der  $\Delta 22$  Deletionsvariante von rDISC640).

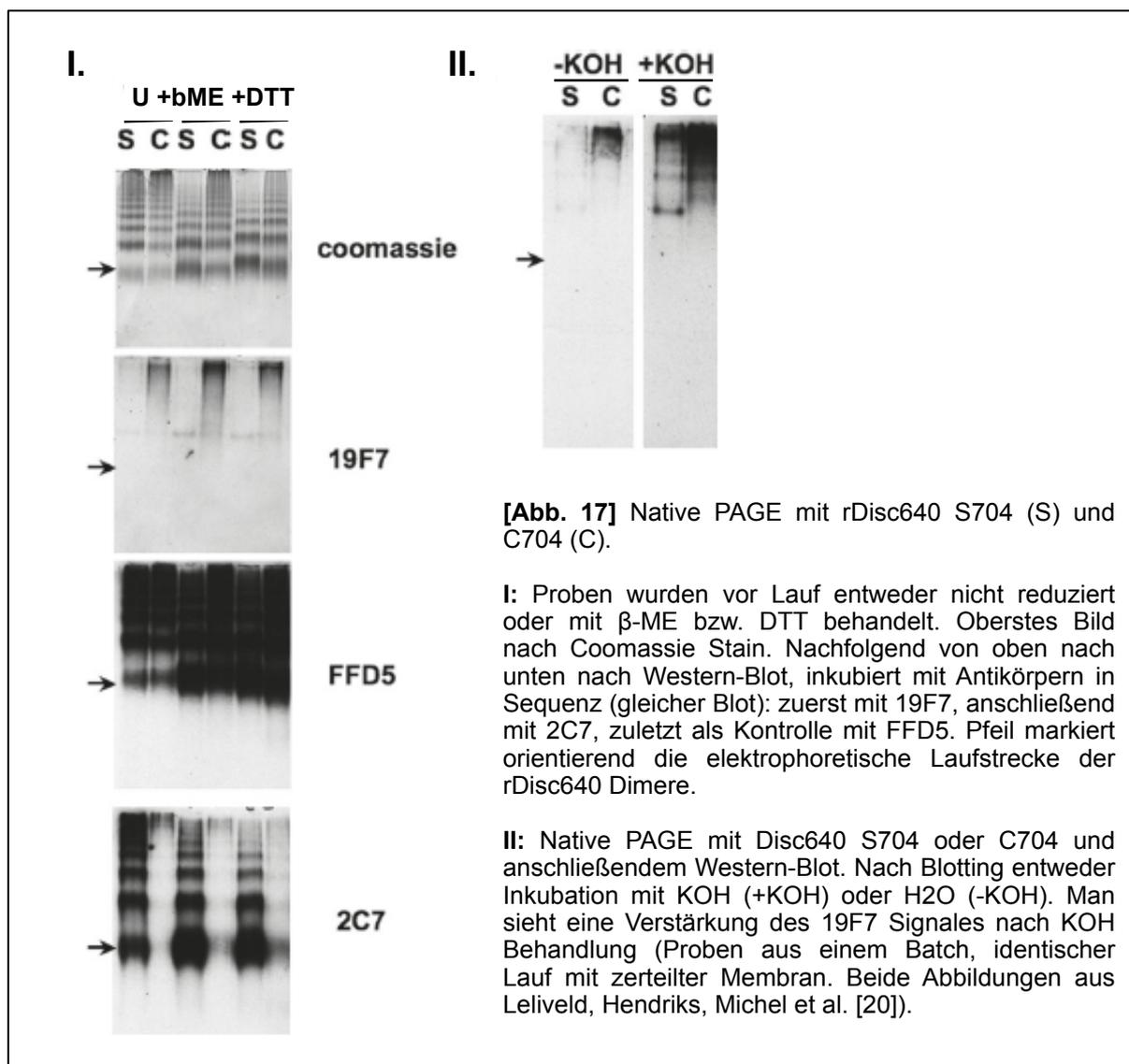
**Oben:** Detektion mit 2C7 Zellkulturüberstand. Monomeres und dimeres rDISC640 werden detektiert. Hier zeigen sich stärkere Signale bei rDISC640 S704.

**Unten:** Nachinkubation mit polyklonalem Kaninchenantikörper zur Ladekontrolle.

**Pfeile:** 1 markiert Dimere, 2 markiert Monomere.

**Detektion mit 19F7 anti DISC1**

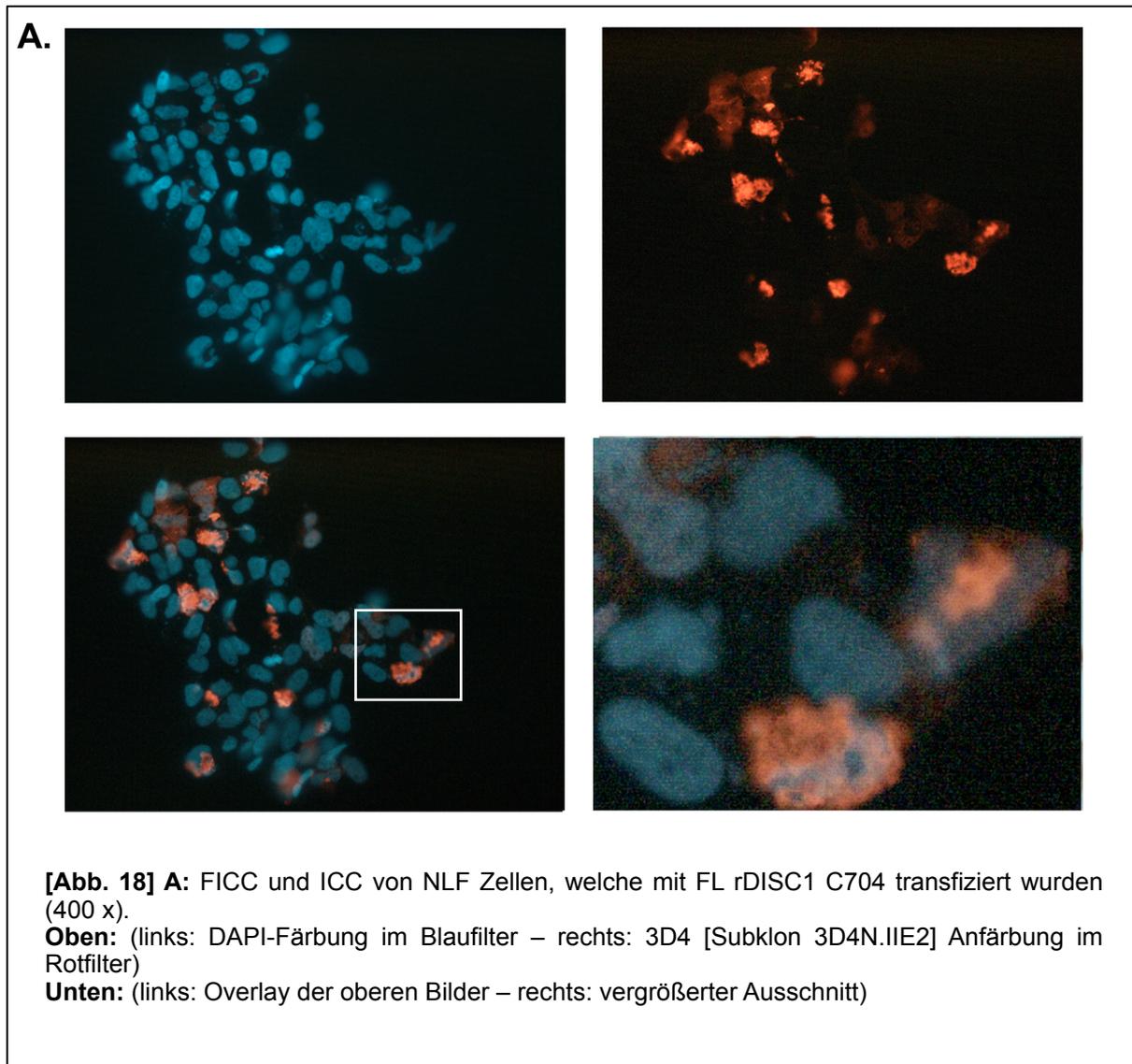
19F7 erkennt bevorzugt hochmolekulare Spezies der rDISC640 C704 Fragmente. Die Serinvariante wurde hier lediglich sehr schwach detektiert. Nach denaturierender Behandlung der Blots mit 0,1 M KOH vor Blocken der Membran, konnte die Signalintensität für niedermolekulare Spezies von rDISC640 verbessert werden und zwar für S704 und C704.

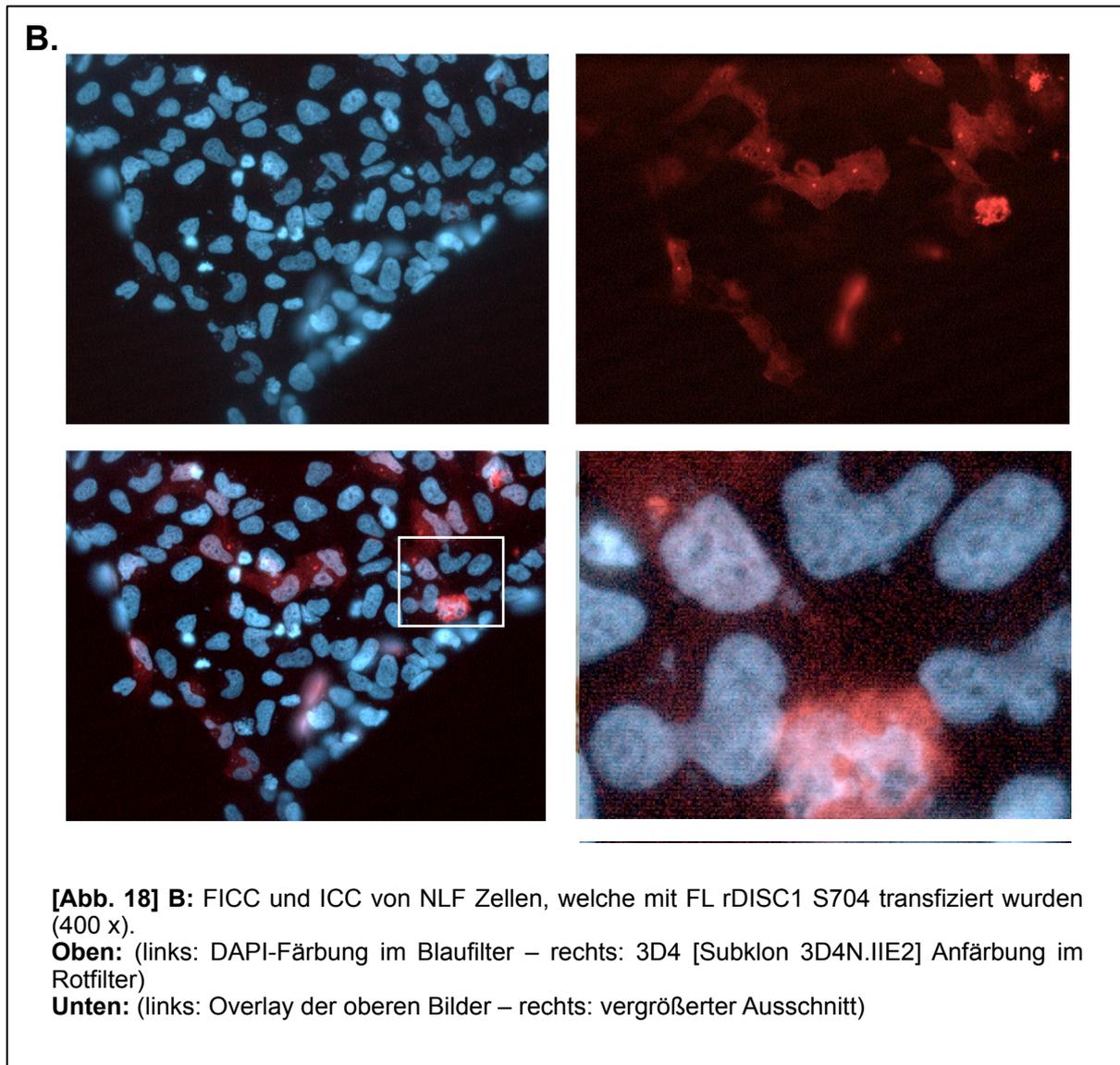


### 3.5 Immunochemische Versuche mit 3D4

#### Immunocytologie

3D4 färbte in der Immunocytochemie mit FL transient DISC1 S704 oder C704, 48 Stunden lang transfizierte NLF Zellen an. Dabei konnte mit zwei unabhängigen Methoden die Bindung nachgewiesen werden. Das Stainingmuster zeigte sich hier besonders bei dem C704 Beispiel als prädominant zytosolisch mit vereinzelt auftretenden „punktförmigen“ bis „scholligen“ Strukturen. Auch in einer mit DAB angefärbten Präparation konnte man trotz mangelnder Gegenfärbung Kernaussparungen erkennen (Daten nicht gezeigt). Substantielle Unterschiede in den beiden transfizierten rDISC1 Konstrukten konnten jedoch nicht beobachtet werden.



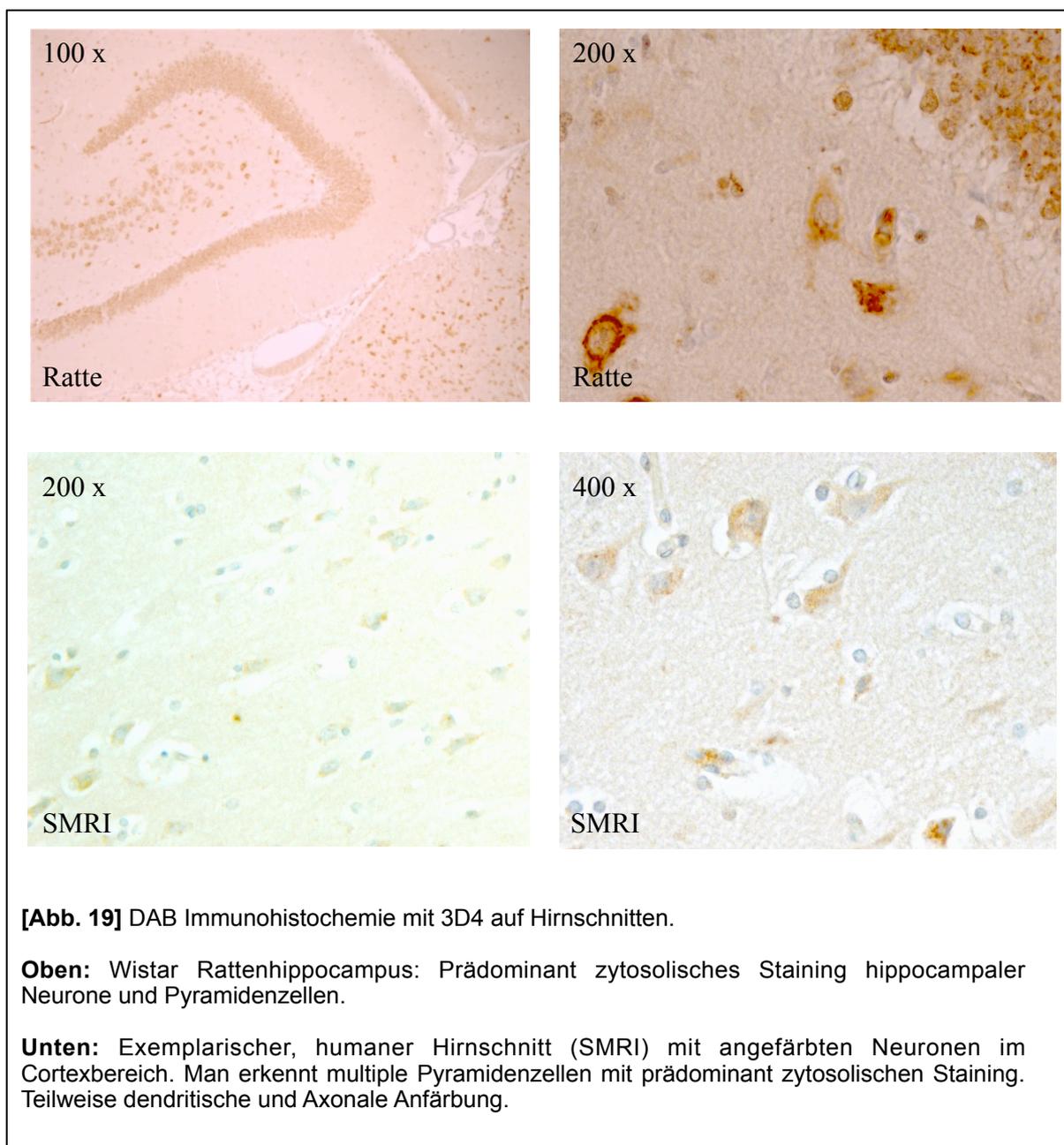


## Immunohistologie

3D4 färbt in humanem, Maus- und Rattenhirngewebe reproduzierbar neuronale Zellen an. Dabei wird regelmäßig auch das Staining von dendritischen sowie axonalen Fortsätzen beobachtet (diffuses Anfärben des Neuropils). Es wurden Färbeprotokolle mit und ohne hitzeinduziertem „*antigen-retrieval*“ (AR) in saurem Milieu erprobt und beide Verfahren sind prinzipiell möglich. Dabei bietet sich insbesondere bei älteren und empfindlichen Schnitten ein Verzicht auf des AR durch starkes Erhitzen an. Die stärksten Signale fand man in kortikalen, pyramidalen und nicht-pyramidalen Neuronen, sowie hippocampal bevorzugt zytoplasmatisch mit Kernaussparung.

### Kapitel 3 - Ergebnisse

Mitunter zeigten sich in vereinzelt Neuronen „punktförmige“ bis „schollige“ Strukturen im Zytoplasma mit besonders starkem Signal. Die gemachten Beobachtungen entsprachen damit denen von Kirkpatrick et al. veröffentlichten [76]. Es bleibt jedoch zu beachten, dass zum jetzigen Zeitpunkt eine genauere Analyse der 3D4 Stainingmuster, insbesondere im Hinblick auf die verschiedenen, kortikalen Schichten des Kortex und der verschiedenen Hirnregionen noch aussteht.



**[Abb. 19]** DAB Immunohistochemie mit 3D4 auf Hirnschnitten.

**Oben:** Wistar Rattenhippocampus: Prädominant zytosolisches Staining hippocampaler Neurone und Pyramidenzellen.

**Unten:** Exemplarischer, humaner Hirnschnitt (SMRI) mit angefärbten Neuronen im Cortexbereich. Man erkennt multiple Pyramidenzellen mit prädominant zytosolischem Staining. Teilweise dendritische und Axonale Anfärbung.

### 4.0 Diskussion

In dieser Arbeit wurde zunächst erfolgreich ein vollkommen neuartiger, monoklonaler Antikörper gegen DISC1 generiert und mit verschiedenen Methoden charakterisiert. Weiterhin wurden erfolgreich C-terminale Fragmente von DISC1 in E.coli exprimiert und aufgereinigt. Diese wurden aufgetrennt und analysiert. Bereits selektierte, monoklonale Mausantikörper gegen DISC1 wurden mit Hilfe der rekombinanten Proteinfragmente weiter charakterisiert. Dabei zeigten sich relevante Unterschiede im Bindungsverhalten der Antikörper in Bezug auf den S704C Polymorphismus von DISC1.

#### 4.1 Monoklonaler Mausantikörper 3D4

Antikörper gegen verschiedene Epitope eines Proteins oder seiner Isoformen, bzw. gegen verschiedenen Konformere eines Proteins, lassen wichtige Einblicke auf Expressionsmuster in Zielgeweben zu und geben Anstoss zu Funktionshypthesen. Monoklonale Antikörper sind hierbei auf Grund ihrer höheren Spezifität im Vergleich zu polyklonalen Antikörpern besonders relevant. 3D4 erkennt als erster, monoklonaler Mausantikörper reproduzierbar rekombinantes FL rDISC1 sowie das C-terminale Fragment rDISC316. Er präzipitiert sein rekombinantes Antigen FL rDISC1 aus Zellysat und lässt sich sowohl im Western-Blot als auch in der Immunchemie verwenden. 3D4 erzeugt DISC1 assoziierte Signale in verschiedenen Spezies (z.B. Ratte, Maus, Mensch), dabei erscheinen die Immunhistochemischen Stainingmuster konsistent mit bereits in der Literatur beschriebenen (polyklonalen) DISC1 Antikörpern [74,76]. Es ist hier jedoch zu beachten, dass eine genauere Analyse der Stainingmuster von 3D4 im ZNS noch aussteht.

## 4.2 Monoklonale DISC1 Antikörper 2C7 und 19F7

Es existieren bis dato nur wenige neuroanatomische, immunhistochemische Studien zur DISC1 Expression auf Proteinlevel. Im Gegensatz zu „klassischen“, neurodegenerativen Erkrankungen wie M. Alzheimer oder M. Parkinson ließen sich bisher keine eindeutigen, histologischen Veränderungen im ZNS von Schizophreniepatienten darstellen. Zwar herrscht heute bei einigen Befunden Konsens, jedoch sind erhebliche Veränderungen oft recht subtil, besonders in lichtmikroskopischen Studien. Mittlerweile gibt es eine Vielzahl polyklonaler, auch kommerzieller DISC1 Antikörper unterschiedlicher Spezifität. Im Hinblick auf die Komplexität der Expression und größtenteils unbekanntem Prozessierung von DISC1, ist eine möglichst breite Palette an unterschiedlichen molekularen Sonden für diverse Isoformen und Konformationen des Proteins bedeutsam.

Mit den Mausantikörpern 19F7 und 2C7 stehen monoklonale Antikörper zur Verfügung, welche unterschiedliche Präferenzen für den S704C Polymorphismus in C-terminalen Fragmenten aufweisen. Da jüngere Studien, wie bereits erwähnt, auf eine Rolle des Oligomerisierungs- / Multimerisierungszustandes von DISC1 in der Proteininteraktion hindeuten, wäre 19F7 eventuell ein interessantes Werkzeug zur spezifischen Detektierung höhermolekularer DISC1 Spezies in Blots und auch Gewebsschnitten, da die Ergebnisse auf eine mögliche Konformationsspezifität des Antikörpers hindeuten. Im Hinblick auf etwaige klinische Relevanz des natürlichen Polymorphismus S704C ergeben sich auch für 2C7 interessante Optionen, z.B. in immunhistochemischen Studien, da auf Grund der gezeigten Ergebnisse der Blottingexperimente vermutet werden kann, dass sich das Epitop dieses Mausantikörpers innerhalb der von dem S704 / C704 Polymorphismus betroffenen Region befindet. Es ist jedoch zu beachten, dass die meisten bisherigen Experimente mit diesen neuen Antikörper auf rekombinant exprimierten Proteinfragmenten beruhen.

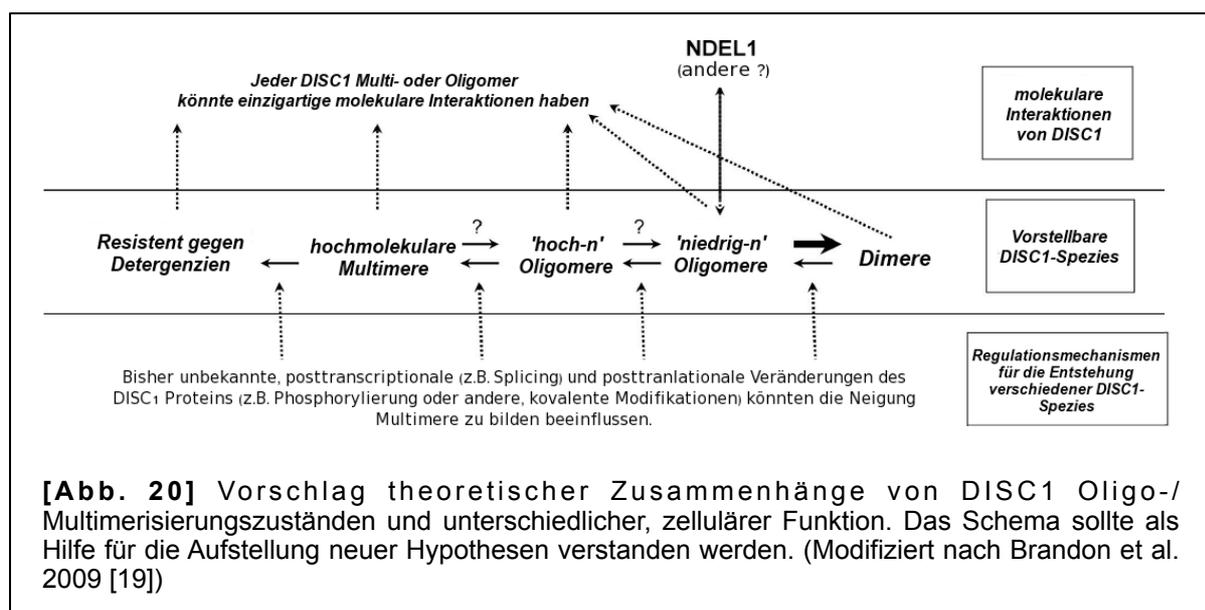
### 4.3 C-terminale DISC1 Fragmente und deren Bedeutung

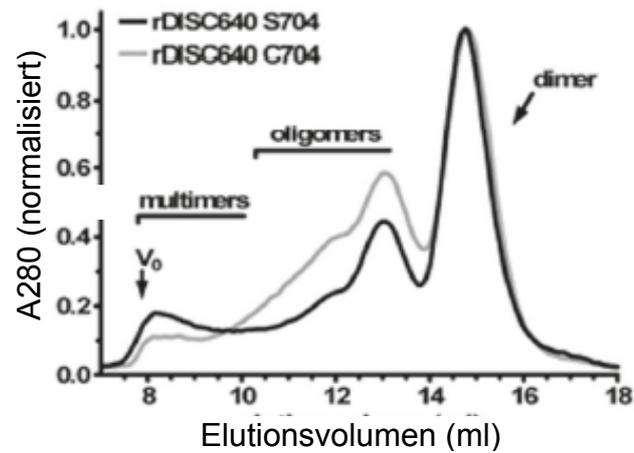
Die Rolle des DISC1 Gens und dessen Produkten in der Entstehung von psychiatrischen Krankheitsbildern wie der Schizophrenie wird auf Grund von Erkenntnissen der aktuellen Forschung immer apparenter. Dabei wurden der Struktur und Funktion der Proteinprodukte von DISC1 bisher jedoch nicht so viel Aufmerksamkeit geschenkt wie dem eigentlichen Gen. Daher ist es nun von großer Wichtigkeit, die Eigenschaften und potentielle, molekularbiologische Funktionen des Proteins zu beschreiben. Im Hinblick auf die bereits erwähnte, ursprüngliche Mutation der schottischen Familie, in der zuerst eine relevante Translokation innerhalb des DISC1 Gens beobachtet wurde, stellt sich besonders die Frage nach der Bedeutung des C-terminalen Anteils des DISC1 Proteins, dessen Verlust mit dem gehäuften Auftreten von psychiatrischen Krankheitsbildern assoziiert ist. Wie bereits dargestellt führt die Expression eines solchen trunkierten Proteins in Mäusen, zu Verhaltensauffälligkeiten der Tiere analog zu psychiatrischen Krankheitsbildern im Menschen [88].

Der Nachweis einer *in vivo* existierenden Form dieses Konstruktes steht jedoch noch aus. Leliveld et al. konnten jedoch zuletzt die Existenz C-terminaler Fragmente von DISC1 *in vivo* nachweisen. Dies gibt molekularbiologischen Experimenten mit hypothetischen DISC1 Fragmenten eine ganz neue Relevanz [86]. Das solche Konstrukte tatsächlich stabil gefaltete Fragmente bilden können, wurde bereits beschrieben [20]. Zudem enthalten die untersuchten Moleküle den Krankheitsassoziierten S704C Polymorphismus des DISC1 Proteins. Weiterhin sind C-terminal am DISC1 Protein mehrere, für die Proteininteraktion möglicher Weise wichtige Regionen beschrieben. Unter Anderem eine Selbstassoziationsdomäne (bei AS 403-504), eine Multimerisierungsdomäne (bei AS 668-747), sowie eine Dimerisierungsdomäne (bei AS 765-854) [19,20,21,88]. Zusätzlich werden immer mehr potentielle Bindungspartner des DISC1 Proteins aufgedeckt, welche über verschiedene, teilweise noch zu definierende Bindungsstellen mit DISC1 interagieren könnten.

## Kapitel 4 - Diskussion

Dabei zeichnet sich immer mehr eine Rolle des Oligo-/Multimerisierungszustandes, also der Quartenärstruktur des DISC1 Proteins, bei solchen Interaktionsprozessen ab. In dieser Arbeit wurde zudem gezeigt, dass rekombinant exprimierte Fragmente von DISC1 in Lösung verschiedene, distinkte Proteinspezies ausbilden. Unter nicht-denaturierenden Bedingungen hauptsächlich Dimere und Oligomere, unter denaturierenden Bedingungen hauptsächlich Monomere mit SDS-resistenten Dimeren (in der SDS-PAGE). Parallel durchgeführte SEC Experimente stützen diese Ergebnisse. Die Befunde bezüglich der Bedeutung des S704C Polymorphismus *in vivo* sind inkonsistent. Es zeigten sich jedoch in der jüngsten Studie von Leliveld et al. proteinbiochemische Unterschiede im Multimerisierung- und Oligomerisierungsverhalten von rDISC Fragmenten mit dem genannten Polymorphismus [20,21] (Siehe Abb. 21 Seite 73). Dabei neigt rDISC640 C704 vermehrt zur Oligomerisierung. Dies ist insofern erwähnenswert, da bereits gezeigt werden konnte, dass Variationen in der Bindung von NDEL1 an DISC1 Fragmente in Abhängigkeit von dessen Oligomerisierungszustand bestehen. Rekombinantes NDEL1 interagiert in einer anderen Studie von Leliveld et al. hierbei selektiv mit einem Oktamer eines rekombinanten DISC1 Fragments. Eine Bindung an dimeres rDISC1 oder höhermolekulare Proteinspezies fand nicht statt. Dies spricht für ein Oligomerisierungs- bzw. Multimerisierungsoptimum von DISC1 und damit für eine spezifische Quartenärstruktur für die intermolekulare Interaktion mit z.B. NDEL1 [20,21].





**[Abb. 21]** Overlay der *normalisierten* Ergebnisse der SEC mit rDISC640 S704 (schwarz) und C704 (grau) in sequentiellen Läufen *unter reduzierenden Bedingungen*. Die Verteilung der verschiedenen Proteinspezies ist bei beiden Fragmenten ähnlich, jedoch zeigt rDISC640 C704 eine höhere Neigung, Oligomere zu bilden. Die hier gezeigten Kurven entstammen Daten eines unabhängigen Versuchslaufes mit einem Äkta™-HPLC System (Amersham) und einer Superdex S200 10/300 GL SEC Säule (1 ml Probevolumen, 0,5 ml / min in TBSE plus 10 mM  $\beta$ -ME) - (modifiziert nach Leliveld, Hendriks, Michel et al. 2009 [20]).

## 5.0 Zusammenfassung

### 5.1 Kurzversion Deutsch

„*Disrupted-in-Schizophrenia-1*“ (DISC1) ist eines der interessantesten Risikogene für Schizophrenie, Depression und bipolare Erkrankungen. Seine Genprodukte bestehen aus einer Reihe von Spleißvarianten und putativen Fragmenten, welche einer ausgesprochen komplexen zeitlichen und kompartimentären Expression unterliegen. Die DISC1 Proteine fungieren wahrscheinlich als zentrale Adapter und Regulatoren in neuronalen Entwicklungs- und Funktionsabläufen. Da strukturelle Eigenschaften des DISC1 Proteins relativ schlecht erforscht sind, war es Ziel dieser Arbeit rekombinante, C-terminale Fragmente von DISC1 zu exprimieren und zu charakterisieren. Diese wurden ausgewählt, da der Verlust des C-terminalen Anteils des DISC1 Proteins mit einem erhöhten Risiko für psychiatrische Erkrankungen assoziiert ist und die Funktionen und Struktur, speziell des C-terminalen Proteinanteils hier von besonderer Bedeutung sein könnten. Dabei wurden als wertvolle, molekulare Werkzeuge auch monoklonale Antikörper gegen DISC1 charakterisiert. Diese zeigten Unterschiede im Bindungsverhalten von Fragmenten mit dem natürlich vorkommenden Polymorphismus S704C des DISC1 Gens. Dieser Polymorphismus (SNP) wurde in mehreren Studien unter Anderem mit einem erhöhten Risiko für Schizophrenie assoziiert. Des Weiteren wurde ein völlig neuartiger anti-DISC1 Antikörper namens „3D4“ in einem standard Hybridomafusionsprotokoll generiert. In *E.coli* exprimierte DISC1 Fragmente zeigten in PAGE und SEC eine Aufspaltung in verschiedene Proteinspezies bestehend aus Dimeren, Oligomeren und hochmolekularen Multimeren. Unter denaturierenden Bedingungen in der SDS-PAGE lösten sich die hochmolekularen Spezies zu Gunsten von Monomeren und SDS-resistenten Dimeren auf.

## 5.2 Abstract English

„*Disrupted-in-Schizophrenia-1*“ (DISC1) is one of the most interesting risk-genes for developing schizophrenia, major depression and bipolar disorder. Its gene products consist of several splicing variants and putative protein fragments with highly complex patterns of expression. Presumably the DISC1 proteins act as important adapter and regulative molecules, involved in neuronal development and function. DISC1 protein structure is relatively poorly understood. Therefore in this thesis, several C-terminal fragments of DISC1 have been expressed recombinantly in *E. coli* and characterized afterwards. The fragments were chosen, because the loss of a C-terminal portion of the protein has been associated with high risk of developing psychiatric disorders and therefore C-terminal functions and structure could be of special interest. Monoclonal antibodies were important molecular tools in this task. Several antibodies against DISC1 have been characterized. They showed differences in binding to fragments containing the natural polymorphism S704C of the DISC1 gene. This polymorphism (SNP) has been associated with elevated risk for developing schizophrenia in several studies. Additionally, a new anti-DISC1 antibody named „3D4“ has been generated using a standard hybridoma fusion protocol. Recombinantly expressed fragments of DISC1 showed forming of several, distinct protein species including dimers, oligomers and high molecular weight multimers in PAGE and SEC. Under denaturizing conditions during SDS-PAGE, the number of high molecular weight species was reduced in favour of monomers and SDS-resistant dimers.

## 6.0 Anhang

### 6.1 Literaturverzeichnis - Quellenangabe

1	Kraepelin E. (1909). "Psychiatrie. 8 Auflage". Leipzig, Germany. English translation and adaptation by Barclay RM, Robertson GM. "Dementia Praecox and Paraphrenia". Krieger Publishing, Huntington, New York.
2	Kraepelin E. (1899). "Psychiatrie. 6 Auflage". Leipzig, Germany. English translation by Metoui H, Ayed S. "Psychiatry, A Textbook for Students and Physicians". Science History Publications, Canton, Massachusetts.
3	Bleuler, E. (1911). "Dementia Praecox, or the group of Schizophrenias". Translated by J Zinkin. International University Press, New York, New York, 1950.
4	Tandon, R., H. A. Nasrallah, et al., (2009). "Schizophrenia, "just the facts" 4. Clinical features and conceptualization." Schizophr Res 110(1-3): 1-23.
5	American Psychiatric Association (2000). "Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, 4th edition". American Psychiatric Association, Washington D.C., Text Revision (DSM-IV-TR).
6	Schneider K. (1950). "Klinische Psychopathologie, 8th edition". Thieme, Stuttgart, Germany. English translation by Hamilton MW, Anderson EW. "Clinical Psychopathology". Grune and Stratton, New York, New York, 1959.
7	World Health Organization, (1992). "The International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems, Tenth Revision. (ICD-10) Section V. Mental and Behavioral Disorders". World Health Organization, Geneva, Switzerland.
8	Stahl, S. M. and P. F. Buckley (2007). "Negative symptoms of schizophrenia: a problem that will not go away." Acta Psychiatr Scand 115(1): 4-11.
9	Harding, C. M., G. W. Brooks, et al. (1987). "The Vermont longitudinal study of persons with severe mental illness, II: Long-term outcome of subjects who retrospectively met DSM-III criteria for schizophrenia." Am J Psychiatry 144(6): 727-35.
10	Fenton, W. S. and T. H. McGlashan (1991). "Natural history of schizophrenia subtypes. I. Longitudinal study of paranoid, hebephrenic, and undifferentiated schizophrenia." Arch Gen Psychiatry 48(11): 969-77.
11	Harrison, G., K. Hopper, et al. (2001). "Recovery from psychotic illness: a 15- and 25-year international follow-up study." Br J Psychiatry 178: 506-17.
12	Riecher-Rossler, A. and W. Rossler (1998). "The course of schizophrenic psychoses: what do we really know? A selective review from an epidemiological perspective." Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci 248(4): 189-202.
13	Freedman, R. (2003). "Schizophrenia." N Engl J Med 349(18): 1738-49.
14	Tandon, R., M. S. Keshavan, et al., (2008). "Schizophrenia, "just the facts" what we know in 2008. 2. Epidemiology and etiology." Schizophr Res 102(1-3): 1-18.
15	Tsuang, M. (2000). "Schizophrenia: genes and environment." Biol Psychiatry 47(3): 210-20
16	Williams, H. J., M. J. Owen, et al. (2009). "New findings from genetic association studies of schizophrenia." J Hum Genet 54(1): 9-14.
17	Ross, C. A., R. L. Margolis, et al. (2006). "Neurobiology of schizophrenia." Neuron 52(1): 139-53.

## Anhang

18	Chubb, J. E., N. J. Bradshaw, et al. (2008). "The DISC locus in psychiatric illness." <i>Mol Psychiatry</i> 13(1): 36-64.
19	Brandon, N. J., J. K. Millar, et al. (2009). "Understanding the role of DISC1 in psychiatric disease and during normal development." <i>J Neurosci</i> 29(41): 12768-75.
20	Leliveld, S. R., P. Hendriks, et al. (2009). "Oligomer assembly of the C-terminal DISC1 domain (640-854) is controlled by self-association motifs and disease-associated polymorphism S704C." <i>Biochemistry</i> 48(32): 7746-55.
21	Leliveld, S. R., V. Bader, et al. (2008). "Insolubility of disrupted-in-schizophrenia 1 disrupts oligomer-dependent interactions with nuclear distribution element 1 and is associated with sporadic mental disease." <i>J Neurosci</i> 28(15): 3839-45.
22	Ross, C. A., R. L. Margolis, et al. (2006). "Neurobiology of schizophrenia." <i>Neuron</i> 52(1): 139-53.
23	Weinberger, D. R. (1987). "Implications of normal brain development for the pathogenesis of schizophrenia." <i>Arch Gen Psychiatry</i> 44(7): 660-9.
24	Lillrank, S. M., B. K. Lipska, et al. (1995). "Neurodevelopmental animal models of schizophrenia." <i>Clin Neurosci</i> 3(2): 98-104.
25	Rapoport, J. L., A. M. Addington, et al. (2005). "The neurodevelopmental model of schizophrenia: update 2005." <i>Mol Psychiatry</i> 10(5): 434-49.
26	Brown, A. S. (2008). "The risk for schizophrenia from childhood and adult infections." <i>Am J Psychiatry</i> 165(1): 7-10.
27	Brown, A. S., M. D. Begg, et al. (2004). "Serologic evidence of prenatal influenza in the etiology of schizophrenia." <i>Arch Gen Psychiatry</i> 61(8): 774-80.
28	Keshavan, M. S., R. Tandon, et al. (2008). "Schizophrenia, "just the facts": what we know in 2008 Part 3: neurobiology." <i>Schizophr Res</i> 106(2-3): 89-107.
29	DeLisi, L. E. (2008). "The concept of progressive brain change in schizophrenia: implications for understanding schizophrenia." <i>Schizophr Bull</i> 34(2): 312-21.
30	Lewis, D. A., T. Hashimoto, et al. (2005). "Cortical inhibitory neurons and schizophrenia." <i>Nat Rev Neurosci</i> 6(4): 312-24.
31	Ogawa, S., T. M. Lee, et al. (1990). "Brain magnetic resonance imaging with contrast dependent on blood oxygenation." <i>Proc Natl Acad Sci U S A</i> 87(24): 9868-72
32	Weiller, C., A. May, et al. (2006). "Role of functional imaging in neurological disorders." <i>J Magn Reson Imaging</i> 23(6): 840-50.
33	Allen, A. J., M. E. Griss, et al. (2009). "Endophenotypes in schizophrenia: a selective review." <i>Schizophr Res</i> 109(1-3): 24-37.
34	Le Bihan, D., J. F. Mangin, et al. (2001). "Diffusion tensor imaging: concepts and applications." <i>Magn Reson Imaging</i> 13(4): 534-46.
35	Jansen, J. F., W. H. Backes, et al. (2006). "1H MR spectroscopy of the brain: absolute quantification of metabolites." <i>Radiology</i> 240(2): 318-32.
36	Steen, R. G., R. M. Hamer, et al. (2005). "Measurement of brain metabolites by 1H magnetic resonance spectroscopy in patients with schizophrenia: a systematic review and meta-analysis." <i>Neuropsychopharmacology</i> 30(11): 1949-62.
37	Giroud, M., P. Walker, et al. (1996). "Reduced brain N-acetyl-aspartate in frontal lobes suggests neuronal loss in patients with amyotrophic lateral sclerosis." <i>Neurol Res</i> 18(3): 241-3.

## Anhang

38	Lang, U. E., I. Puls, et al. (2007). "Molecular mechanisms of schizophrenia." <i>Cell Physiol Biochem</i> 20(6): 687-702.
39	Krystal, J. H., S. Madonick, et al. (2006). "Potentiation of low dose ketamine effects by naltrexone: potential implications for the pharmacotherapy of alcoholism." <i>Neuropsychopharmacology</i> 31(8): 1793-800.
40	Chumakov, I., M. Blumenfeld, et al. (2002). "Genetic and physiological data implicating the new human gene G72 and the gene for D-amino acid oxidase in schizophrenia." <i>Proc Natl Acad Sci U S A</i> 99(21): 13675-80.
41	Boks, M. P., T. Rietkerk, et al. (2007). "Reviewing the role of the genes G72 and DAAO in glutamate neurotransmission in schizophrenia." <i>Eur Neuropsychopharmacol</i> 17(9): 567-72.
42	Sun, J., P. H. Kuo, et al. (2008). "Candidate genes for schizophrenia: a survey of association studies and gene ranking." <i>Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet</i> 147B(7): 1173-81.
43	Norton, N., H. J. Williams, et al. (2006). "An update on the genetics of schizophrenia." <i>Curr Opin Psychiatry</i> 19(2): 158-64.
44	Harrison, P. J. and D. R. Weinberger (2005). "Schizophrenia genes, gene expression, and neuropathology: on the matter of their convergence." <i>Mol Psychiatry</i> 10(1): 40-68.
45	Jacobs PA, Brunton M, Frackiewicz A, Newton M, Cook PJL, Robson EB (1970). "Studies on a family with three cytogenetic markers." <i>Ann Hum Genet (Lond)</i> 33:325-336.
46	St Clair D, Blackwood D, Muir W, Carothers A, Walker M, Spowart G, Gosden C, Evans HJ; 1990, <i>Lancet</i> 336:13-16
47	Blackwood, D. H., A. Fordyce, et al. (2001). "Schizophrenia and affective disorders-- cosegregation with a translocation at chromosome 1q42 that directly disrupts brain-expressed genes: clinical and P300 findings in a family." <i>Am J Hum Genet</i> 69(2): 428-33.
48	Brown, A. S., J. Hooton, et al. (2004). "Elevated maternal interleukin-8 levels and risk of schizophrenia in adult offspring." <i>Am J Psychiatry</i> 161(5): 889-95.
49	Rosso, I. M., T. D. Cannon, et al. (2000). "Obstetric risk factors for early-onset schizophrenia in a Finnish birth cohort." <i>Am J Psychiatry</i> 157(5): 801-7.
50	Gilmore, J. H., L. Fredrik Jarskog, et al. (2004). "Prenatal infection and risk for schizophrenia: IL-1beta, IL-6, and TNFalpha inhibit cortical neuron dendrite development." <i>Neuropsychopharmacology</i> 29(7): 1221-9.
51	Camargo, L. M., V. Collura, et al. (2007). "Disrupted in Schizophrenia 1 Interactome: evidence for the close connectivity of risk genes and a potential synaptic basis for schizophrenia." <i>Mol Psychiatry</i> 12(1): 74-8
52	Frankle, W. G., J. Lerma, et al. (2003). "The synaptic hypothesis of schizophrenia." <i>Neuron</i> 39(2): 205-16.
53	Millar, J. K., J. C. Wilson-Annan, et al. (2000). "Disruption of two novel genes by a translocation co-segregating with schizophrenia." <i>Hum Mol Genet</i> 9(9): 1415-23.
54	Ekelund, J., D. Lichtermann, et al. (2000). "Genome-wide scan for schizophrenia in the Finnish population: evidence for a locus on chromosome 7q22." <i>Hum Mol Genet</i> 9(7): 1049-57.
55	Ekelund, J., I. Hovatta, et al. (2001). "Chromosome 1 loci in Finnish schizophrenia families." <i>Hum Mol Genet</i> 10(15): 1611-7.
56	Ekelund, J., W. Hennah, et al. (2004). "Replication of 1q42 linkage in Finnish schizophrenia pedigrees." <i>Mol Psychiatry</i> 9(11): 1037-41.
57	Hamshere, M. L., N. M. Williams, et al. (2006). "Genome wide significant linkage in schizophrenia conditioning on occurrence of depressive episodes." <i>J Med Genet</i> 43(7): 563-7.

## Anhang

58	Hwu, H. G., C. M. Liu, et al. (2003). "Linkage of schizophrenia with chromosome 1q loci in Taiwanese families." <i>Mol Psychiatry</i> 8(4): 445-52.
59	Macgregor, S., P. M. Visscher, et al. (2004). "A genome scan and follow-up study identify a bipolar disorder susceptibility locus on chromosome 1q42." <i>Mol Psychiatry</i> 9(12): 1083-90.
60	Curtis, D., G. Kalsi, et al. (2003). "Genome scan of pedigrees multiply affected with bipolar disorder provides further support for the presence of a susceptibility locus on chromosome 12q23-q24, and suggests the presence of additional loci on 1p and 1q." <i>Psychiatr Genet</i> 13(2): 77-84.
61	Detera-Wadleigh, S. D., J. A. Badner, et al. (1999). "A high-density genome scan detects evidence for a bipolar-disorder susceptibility locus on 13q32 and other potential loci on 1q32 and 18p11.2." <i>Proc Natl Acad Sci U S A</i> 96(10): 5604-9.
62	Hashimoto, R., T. Numakawa, et al. (2006). "Impact of the DISC1 Ser704Cys polymorphism on risk for major depression, brain morphology and ERK signaling." <i>Hum Mol Genet</i> 15(20): 3024-33.
63	Thomson PA, Harris SE, Starr JM, Whalley LJ, Porteous DJ, Deary IJ. (2005). <i>Neurosci Lett</i> . 2005 Nov. 25;389(1):41-5
64	Callicott, J. H., R. E. Straub, et al. (2005). "Variation in DISC1 affects hippocampal structure and function and increases risk for schizophrenia." <i>Proc Natl Acad Sci U S A</i> 102(24): 8627-32.
65	Di Giorgio, A., G. Blasi, et al. (2008). "Association of the SerCys DISC1 polymorphism with human hippocampal formation gray matter and function during memory encoding." <i>Eur J Neurosci</i> 28(10): 2129-36.
66	DeRosse, P., C. A. Hodgkinson, et al. (2007). "Disrupted in schizophrenia 1 genotype and positive symptoms in schizophrenia." <i>Biol Psychiatry</i> 61(10): 1208-10.
67	Millar, J. K., S. Christie, et al. (2001). "Genomic structure and localization within a linkage hotspot of Disrupted In Schizophrenia 1, a gene disrupted by a translocation segregating with schizophrenia." <i>Mol Psychiatry</i> 6(2): 173-8.
68	Taylor, M. S., R. S. Devon, et al. (2003). "Evolutionary constraints on the Disrupted in Schizophrenia locus." <i>Genomics</i> 81(1): 67-77.
69	Ishizuka, K., M. Paek, et al. (2006). "A review of Disrupted-In-Schizophrenia-1 (DISC1): neurodevelopment, cognition, and mental conditions." <i>Biol Psychiatry</i> 59(12): 1189-97.
70	Knee, R. and P. R. Murphy (1997). "Regulation of gene expression by natural antisense RNA transcripts." <i>Neurochem Int</i> 31(3): 379-92.
71	Zhou, X., M. A. Geyer, et al. (2008). "Does disrupted-in-schizophrenia (DISC1) generate fusion transcripts?" <i>Mol Psychiatry</i> 13(4): 361-3.
72	Morton, C. J. and I. D. Campbell (1994). "SH3 domains. Molecular 'Velcro'." <i>Curr Biol</i> 4(7): 615-7.
73	Pawson, T. and J. Schlessingert (1993). "SH2 and SH3 domains." <i>Curr Biol</i> 3(7): 434-42.
74	Meyer, K. D. and J. A. Morris (2008). "Immunohistochemical analysis of DISC1 expression in the developing and adult hippocampus." <i>Gene Expr Patterns</i> 8(7-8): 494-501.
75	Ma, L., Y. Liu, et al. (2002). "Cloning and characterization of DISC1, the mouse ortholog of DISC1 (Disrupted-in-Schizophrenia 1)." <i>Genomics</i> 80(6): 662-72.
76	Kirkpatrick, B., L. Xu, et al. (2006). "DISC1 immunoreactivity at the light and ultrastructural level in the human neocortex." <i>J Comp Neurol</i> 497(3): 436-50.
77	Mao, Y., X. Ge, et al. (2009). "Disrupted in schizophrenia 1 regulates neuronal progenitor proliferation via modulation of GSK3beta/beta-catenin signaling." <i>Cell</i> 136(6): 1017-31.

## Anhang

78	James, R., R. R. Adams, et al. (2004). "Disrupted in Schizophrenia 1 (DISC1) is a multicompartimentalized protein that predominantly localizes to mitochondria." <i>Mol Cell Neurosci</i> 26(1): 112-22.
79	Schurov, I. L., E. J. Handford, et al. (2004). "Expression of disrupted in schizophrenia 1 (DISC1) protein in the adult and developing mouse brain indicates its role in neurodevelopment." <i>Mol Psychiatry</i> 9(12): 1100-10.
80	Austin, C. P., B. Ky, et al. (2004). "Expression of Disrupted-In-Schizophrenia-1, a schizophrenia-associated gene, is prominent in the mouse hippocampus throughout brain development." <i>Neuroscience</i> 124(1): 3-10.
81	Mackie, S., J. K. Millar, et al. (2007). "Role of DISC1 in neural development and schizophrenia." <i>Curr Opin Neurobiol</i> 17(1): 95-102.
82	Young, K. H. (1998). "Yeast two-hybrid: so many interactions, (in) so little time." <i>Biol Reprod</i> 58(2): 302-11.
83	Hayashi, M. A., F. C. Portaro, et al. (2005). "Inhibition of NDEL1 (nuclear distribution element-like)-oligopeptidase activity by disrupted-in-schizophrenia 1." <i>Proc Natl Acad Sci U S A</i> 102(10): 3828-33.
84	Feng, Y. and C. A. Walsh (2001). "Protein-protein interactions, cytoskeletal regulation and neuronal migration." <i>Nat Rev Neurosci</i> 2(6): 408-16.
85	Shu, T., R. Ayala, et al. (2004). "NDEL1 operates in a common pathway with LIS1 and cytoplasmic dynein to regulate cortical neuronal positioning." <i>Neuron</i> 44(2): 263-77.
86	Hannon, G. J. and J. J. Rossi (2004). "Unlocking the potential of the human genome with RNA interference." <i>Nature</i> 431(7006): 371-8.
87	Bagasra, O. and K. R. Prilliman (2004). "RNA interference: the molecular immune system." <i>J Mol Histol</i> 35(6): 545-53.
88	Kamiya, A., K. Kubo, et al. (2005). "A schizophrenia-associated mutation of DISC1 perturbs cerebral cortex development." <i>Nat Cell Biol</i> 7(12): 1167-78.
89	Taya, S., T. Shinoda, et al. (2007). "DISC1 regulates the transport of the NDEL1/NDEL1/NDEL1/NDEL1/LIS1/14-3-3epsilon complex through kinesin-1." <i>J Neurosci</i> 27(1): 15-26.
90	Niethammer, M., D. S. Smith, et al. (2000). "NDEL1 is a novel Cdk5 substrate that associates with LIS1 and cytoplasmic dynein." <i>Neuron</i> 28(3): 697-711.
91	Burdick, K. E., A. Kamiya, et al. (2008). "Elucidating the relationship between DISC1, NDEL1 and NDE1 and the risk for schizophrenia: evidence of epistasis and competitive binding." <i>Hum Mol Genet</i> 17(16): 2462-73.
92	Kamiya, A., T. Tomoda, et al. (2006). "DISC1-NDEL1/NDEL1 protein interaction, an essential component for neurite outgrowth, is modulated by genetic variations of DISC1." <i>Hum Mol Genet</i> 15(22): 3313-23.
93	Duan, X., J. H. Chang, et al. (2007). "Disrupted-In-Schizophrenia 1 regulates integration of newly generated neurons in the adult brain." <i>Cell</i> 130(6): 1146-58.
94	Bloom, L. and H. R. Horvitz (1997). "The <i>Caenorhabditis elegans</i> gene <i>unc-76</i> and its human homologs define a new gene family involved in axonal outgrowth and fasciculation." <i>Proc Natl Acad Sci U S A</i> 94(7): 3414-9.
95	Miyoshi, K., A. Honda, et al. (2003). "Disrupted-In-Schizophrenia 1, a candidate gene for schizophrenia, participates in neurite outgrowth." <i>Mol Psychiatry</i> 8(7): 685-94.
96	Millar, J. K., B. S. Pickard, et al. (2005). "DISC1 and PDE4B are interacting genetic factors in schizophrenia that regulate amp signaling." <i>Science</i> 310(5751): 1187-91.
97	Pickard, B. S., P. A. Thomson, et al. (2007). "The PDE4B gene confers sex-specific protection against schizophrenia." <i>Psychiatr Genet</i> 17(3): 129-33.
98	Brandon, N. J. (2007). "Dissecting DISC1 function through protein-protein interactions." <i>Biochem Soc Trans</i> 35(Pt 5): 1283-6.

## Anhang

99	Clapcote, S. J., T. V. Lipina, et al. (2007). "Behavioral phenotypes of DISC1 missense mutations in mice." <i>Neuron</i> 54(3): 387-402.
100	Lie, D. C., S. A. Colamarino, et al. (2005). "Wnt signalling regulates adult hippocampal neurogenesis." <i>Nature</i> 437(7063): 1370-5.
101	Harlow E, Lane D. (1988). "Antibodies, a laboratory manual". Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
102	Kohler, G. and C. Milstein (1975). "Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity." <i>Nature</i> 256(5517): 495-7.
103	Goding, J. W. (1980). "Antibody production by hybridomas." <i>J Immunol Methods</i> 39(4): 285-308.
104	Joseph Sambrook, David W. Russell (2001). "Molecular Cloning: A Laboratory Manual". Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
105	Quiagen Inc. (2003). "The QIAexpressionist™ - A handbook for high-level expression and purification of 6xHis-tagged proteins 5th edition". Quiagen Inc., Valencia, California.
106	Pirofski, L., A. Casadevall, et al. (1990). "Current state of the hybridoma technology." <i>J Clin Immunol</i> 10(6 Suppl): 5S-12S; discussion 12S-14S.
107	Kuhlmann, I. I., W. Kurth, et al. (1989). "Monoclonal antibodies: in vivo- and in vitro-production in laboratory scale with consideration of the legal aspects of animal protection." <i>ALTEX</i> 6(2): 12-26.
108	Bruce, M. P., V. Boyd, et al. (2002). "Dialysis-based bioreactor systems for the production of monoclonal antibodies--alternatives to ascites production in mice." <i>J Immunol Methods</i> 264(1-2): 59-68.
109	Hubert Rehm (2006). "Der Experimentator: Proteomics - 5th ed. German Edition". Springer Spektrum Verlag, Heidelberg, Germany.
110	Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." <i>Nature</i> 227(5259): 680-5.
111	Amersham (2006). "ECL Plus Western-Blotting Detection Reagents RPN2132 / RPN2133 Rev. D". GE Healthcare Biosciences, Pittsburgh, Pennsylvania.
112	Robert Novy, Don Drott, Keith Yaeger and Robert Mierendorf (2001). "Overcoming the codon bias of E. coli for enhanced protein expression". Novagen, EMD Millipore, Merck KGaA, Darmstadt, Germany.
113	Amersham (2007). "Antibody Purification Handbook Edition AC, 18-1037-46". GE Healthcare Biosciences, Pittsburgh, Pennsylvania.
114	Roche (2007). "DAPI Datasheet Ver. 4 No. 236276". Roche Applied Science, Indianapolis, Indiana.
115	Biorad (2001). "Biologic™ LP Chromatography System Instruction Manual" Biorad Life Science Research, Hercules, California.
116	GE Healthcare (2007). "Instructions 28-4026-53 AB for Sephacryl Columns". GE Healthcare Biosciences, Pittsburgh, Pennsylvania.
117	Korth, C. (2009). "DISCopathies: brain disorders related to DISC1 dysfunction." <i>Rev Neurosci</i> 20(5-6): 321-30.
118	Korth, C., P. Streit, et al. (1999). "Monoclonal antibodies specific for the native, disease-associated isoform of the prion protein". <i>Methods Enzym</i> 309: 106-22.

## 6.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung	Beschreibung
<b>Abb. 1</b>	Darstellung der Rolle von DISC1 als Vulnerabilitätsfaktor für psychiatrische Erkrankungen
<b>Abb. 2</b>	Schematische Darstellung der DISC1 Transkripte
<b>Abb. 3</b>	Schematische Darstellung der putativen DISC1 Proteinstruktur
<b>Abb. 4</b>	Vorkommen und Kolo-kalisation verschiedener DISC1 Isoformen
<b>Abb. 5</b>	DISC1 als Stabilisator der $\beta$ -Catenin Konzentration
<b>Abb. 6</b>	Schema eines Hybridomaprotokolls
<b>Abb. 7</b>	Verwendete rDISC1 Fragmente
<b>Abb. 8</b>	PAGE aufgereinigter rDISC1 Fragmente (E. coli Expression)
<b>Abb. 9</b>	Bindung von rDISC316 an eine NHS-Sepharose-Matrix
<b>Abb. 10</b>	Schematischer Aufbau der Biologic LP Anlage
<b>Abb. 11</b>	Darstellung der Epitope von monoklonalen Antikörpern gegen DISC1
<b>Abb. 12</b>	Detektion rekombinater Proteine mit 3D4 im Western-Blot
<b>Abb. 13</b>	Immunopräzipitation mit 3D4
<b>Abb. 14</b>	Coomassiefärbungen verschiedener DISC1 Fragmente nach PAGE
<b>Abb. 15</b>	Fragmente von rDISC1 detektiert mit 2C7 nach Western-Blot.
<b>Abb. 16</b>	Ergebnisse der rDISC640 Detektion mit 2C7 nach Western-Blot
<b>Abb. 17</b>	Native PAGE mit Disc640 S704 und C704
<b>Abb. 18</b>	FICC und ICC von NLF Zellen mit 3D4 (Teil A und B)
<b>Abb. 19</b>	Immunohistochemie mit 3D4 auf Hirnschnitten.
<b>Abb. 20</b>	DISC1 Oligo-/Multimerisierungszustände und unterschiedliche Funktion
<b>Abb. 21</b>	Overlay der normalisierten Ergebnisse der SEC mit rDISC640 S704 und C704

## 6.3 Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
<b>Abb.</b>	Abbildung
<b>APS</b>	Ammoniumpersulfat
<b>AR</b>	„antigen retrieval“
<b>β-ME</b>	beta-Mercaptoethanol
<b>BSA</b>	bovines Serumalbumin
<b>cDNA</b>	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
<b>CHAPS</b>	Cholamidopropyldimethylammoniumpropansulfonat
<b>COMT</b>	Catechol-O-Methyltransferase
<b>Cys</b>	Cystein
<b>DAB</b>	Diaminobenzidin
<b>DAOA</b>	D-Aminosäureoxidaseaktivator
<b>DAPI</b>	Diamidinphenylindoldihydrochlorid
<b>DCO</b>	Desoxycholsäure
<b>DISC1</b>	Disrupted in Schizophrenia 1
<b>DMSO</b>	Dimethylsulfoxid
<b>DNA</b>	Desoxyribonukleinsäure
<b>DTNBP1</b>	Dysbindin
<b>DTT</b>	Dithiotreitol
<b>E. coli</b>	Escherichia coli
<b>ECL</b>	Verbesserte Chemilumineszens
<b>EDTA</b>	Ethylendiaminotetraessigsäure
<b>ELIFA</b>	„Enzyme Linked Immunoflow Assay“
<b>ELISA</b>	„Enzyme Linked Immunosorbent Assay“
<b>etc.</b>	et cetera
<b>Fc</b>	konstantes Fragment
<b>FCS</b>	Fötale Kälberserum
<b>FICC</b>	Floureszenzimmunohistochemie
<b>fMRI</b>	funktionelle Magnetresonanztomographie
<b>GABA</b>	gamma-Aminobuttersäure
<b>GKN</b>	Glukose-Kalium-Natrum
<b>HAT</b>	Hypoxanthin-Aminopterin-Thymidin
<b>HCF</b>	Hybridoma Cloning Factor
<b>HEPES</b>	Hydroxyethylpiperazinethansulfonsäure
<b>HGPRT</b>	Hypoxanthin-Guanin Phosphoribosyltransferase
<b>His</b>	Histidin
<b>HRP</b>	Meerrettichperoxidase
<b>HT</b>	Hypoxanthin-Thymidin
<b>ICC</b>	Immunohistochemie
<b>IPTG</b>	Isopropyl-β-D-thiogalactosid

## Anhang

<b>kb</b>	kilo-Basen
<b>LP</b>	„ <i>Low Pressure</i> “
<b>MTOC</b>	Mikrotubuli Organisationszentrum
<b>NLF</b>	humane Neuroblastomezellen
<b>NMDA</b>	N-Methyl-D-Aspartat
<b>NDEL1</b>	Nuclear Distribution Element-like Protein
<b>P/S</b>	Penicillin/Streptomycin
<b>PAGE</b>	Polyacrylamid Gelelektrophorese
<b>PBS</b>	Phosphatgepufferte Salzlösung
<b>PBS-A</b>	Phosphatgepufferte Salzlösung plus bovines Serumalbumin
<b>PBS-T</b>	Phosphatgepufferte Salzlösung plus Tween
<b>PDE</b>	Phosphodiesterase
<b>PEG</b>	Polyethylenglykol
<b>PMSF</b>	Phenylmethylsulfonylfluorid
<b>POD</b>	Peroxidase
<b>rDISC1</b>	rekombinates Disrupted in Schizophrenia 1
<b>RISC</b>	„RNA-induced silencing complex“
<b>RNA</b>	Ribonukleinsäure
<b>SA</b>	Streptavidin
<b>SCZ</b>	Schizophrenie
<b>SDS</b>	Natrium-Dodecylsulfat
<b>SEC</b>	Größenausschlusschromatographie
<b>Ser</b>	Serin
<b>shRNA</b>	„ <i>short hairpin</i> “ Ribonukleinsäure
<b>siRNA</b>	„ <i>small interfering</i> “ Ribonukleinsäure
<b>SMRI</b>	„ <i>Stanley Medical Research Institute</i> “
<b>sMRI</b>	strukturelle Magnetresonanztomographie
<b>SNP</b>	Singulärer Nukleotidpolymorphismus
<b>Tag</b>	Signalsequenz
<b>TE</b>	Tris-EDTA
<b>TEMED</b>	Tetramethylethylendiamin
<b>TK</b>	Thymidinkinase
<b>TRIS</b>	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
<b>TVA HHU</b>	Tierversuchsanstalt Heinrich Heine Universität (Düsseldorf)
<b>v/v</b>	Volumenprozent
<b>w/v</b>	Gewichtsprozent
<b>z.B.</b>	zum Beispiel
<b>ZNS</b>	Zentrales Nervensystem

## 6.4 Kurzlebenslauf - Philipp J. Hendriks

Philipp Johannes Hendriks  
geb. 22.06.1982 in  
47918 Tönisvorst

- 2002-2009: Studium der Humanmedizin an der HHU, Düsseldorf
- 2006-2008: Tätigkeiten als Doktorand, Neuropathologie HHU Düsseldorf,  
Abteilung Neurodegeneration
- 2008-2009: Praktisches Jahr im Hospital zum heiligen Geist, Kempen
- Nov. 2009: Bestehen der ärztlichen Prüfung in Kempen
- Dez. 2009: Erteilung der Approbation als Arzt durch die Bezirksregierung  
Düsseldorf
- Jan. 2010: Beginn der ärztlichen Tätigkeit im Hospital zum heiligen Geist,  
Kempen - Anästhesiologie

## 6.5 Danksagung

Ich danke meinen lieben Eltern Maria-Christine und Rolf-Johannes Hendriks, welche mir mein Medizinstudium und diese Promotion ermöglicht haben. Zudem danke ich meiner gesamten Familie für die immer wieder anspornenden Worte bezüglich der Fertigstellung dieser Arbeit.

Des Weiteren danke ich dem gesamten Team der Arbeitsgruppe „Neurodegeneration“ des neuropathologischen Institutes der HHU Düsseldorf für die vielen nützlichen Ratschläge und die kritische Diskussion der durchgeführten Experimente.

Insbesondere danke ich Herrn Prof. Dr. Carsten Korth für die Realisierung dieser Arbeit, sowie den Drs. Verian Bader, Andreas Müller-Schiffmann und Rutger Leliveld, welche mir zum einen Material für die nötigen Expressionen zur Verfügung stellten und zum Anderen immer für eine heitere und angenehme Arbeitsatmosphäre sorgten.

Diese Arbeit widme ich meinem lieben Großvater Johannes Bongartz (†Jan. 2009).

## 6.6 Erklärung

Die hier vorgelegte Dissertation habe ich eigenständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt.

Die Dissertation wurde in der vorgelegten oder in ähnlicher Form noch bei keiner anderen Institution eingereicht. Ich habe bisher keine erfolglosen Promotionsversuche unternommen.

(gez. Philipp Johannes Hendriks, Tönisvorst den 26.11.2012)