Aus der Klinik und Poliklinik für Psychiatrie und Psychotherapie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Direktorin: Univ.-Prof. Dr. med. Meisenzahl-Lechner

Die Veränderung der Expression von Genen der neuronalen Plastizität unter dem Einfluss von Haloperidol und Clozapin in unterschiedlichen Regionen des männlichen Rattenhirns

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von
Fabian Manthey
2018

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

gez.:

Dekanin/Dekan: Prof. Dr. Nikolaj Klöcker

Erstgutachterin: PD Dr. Martina von Wilmsdorff

Zweitgutachterin: PD Dr. Eva Neuen-Jacob

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht in:

Von Wilmsdorff M., Manthey F., Bouvier ML., Stahelin O., Falkai P., Meisenzahl-Lechner M., Schmitt A., Gebicke-Haerter PJ. (2018) Effects of haloperidol and clozapine on synapse-related gene expression in specific brain regions of male rats. In: Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci 268(6), 555-563

Zusammenfassung

Die Schizophrenie ist eine schwere, meist chronisch verlaufende psychische Erkrankung. Sie geht mit strukturellen Veränderungen des Gehirns, wie auch mit Veränderungen des Transmitterhaushaltes einher. Hiervon sind unter anderem die Transmitterstoffe Dopamin, Glutamat und Serotonin betroffen, welche in Abhängigkeit von der betrachteten Hirnregion vermehrt oder aber vermindert ausgeschüttet werden. Ziel dieser Arbeit war es zu untersuchen, inwieweit Haloperidol und Clozapin die Expression von Genen verändern, die für Proteine codieren, die direkt in die synaptische Transmission involviert sind (SNAP-25, STX1a, SYT-6, SYP, VAMP-2), die Bestandteile der extrazellulären Matrix sind (COLA4A, LAMC-3) und die an dem Prozess der synaptischen Plastizität beteiligt sind (DCTN-6, BDNF, STX12). Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war es, mögliche Unterschiede im Expressionsverhalten der Gene unter dem Einfluss von Antipsychotika in verschiedenen Hirnregionen (PRL, CG, CPU, DG, CA1 und CA3) zu detektieren. Hierfür wurden männlichen Sprague Dawley Ratten drei Monate entweder Clozapin oder Haloperidol ins Futter gemischt, um eine orale und damit für die Versuchstiere möglichst stressfreie Aufnahme der Medikamente zu ermöglichen. Nach 12-wöchiger Behandlung erfolgte die Entnahme der Gehirne, die Anfertigung von Schnittserien und das Ausstanzen oben genannter Hirnareale. Daraufhin wurde eine Analyse der Genexpression mittels zweier unterschiedlicher Verfahren, der quantitativen *Real Time* PCR und dem auf der Luminex Technologie basierenden *QuantiGene Plex Assay* durchgeführt. Dies führt zu dem dritten Ziel dieser Arbeit, einem Vergleich dieser beiden Nachweismethoden. Zuallererst lässt sich festhalten, dass Haloperidol insgesamt einen stärkeren Effekt auf das Expressionsverhalten der untersuchten Gene hat als Clozapin. Letzteres führte ausschließlich zu einer statistisch signifikanten Herabregulation von SNAP-25 (qRT-PCR-*Down*-CG) und STX1a (Luminex-*Down*-CPU). Haloperidol hingegen führte zu einer statistisch signifikanten Herabregulation von SNAP-25 (*Down*-CA3) und einer Heraufregulation von STX1a (*Up*-CA1) jeweils in der qRT-PCR. Im Luminex Verfahren zeigte sich unter Haloperidol eine Herabregulation von VAMP-2 (*Down*-PRL und *Down*-DG) und eine Heraufregulation der Gene STX1a (*Up*-CA1) und STX12 (*Up*-CA1). Diese Ergebnisse deuten auf einen unterschiedlichen Wirkungsmechanismus beider Antipsychotika und eventuell auf einen Wirkungsunterschied zwischen atypischen und typischen Antipsychotika hin. Des Weiteren haben beide Antipsychotika keinen Effekt auf die Gene, die für Proteine der extrazellulären Matrix codieren (COLA4A, LAMC-3). Beide Antipsychotika haben nach dreimonatiger Applikation nur einen geringen Effekt auf solche Gene, die für Proteine codieren, die an der neuronalen Plastizität beteiligt sind. Nur DCTN-6 zeigt sich in der qRT-PCR unter Clozapin (*Up*-CA1) und unter Haloperidol (*Down*-CA3) marginal signifikant verändert. Das wichtigste Gen in diesem Zusammenhang, BDNF, ist in keiner untersuchten Hirnregion statistisch signifikant verändert. Besonders Haloperidol führt zu Veränderungen des Expressionsverhaltens von Genen, die direkt an der synaptischen Übertragung beteiligt sind (SNAP-25, STX1a, VAMP-2). Generell ist ein Muster in der Richtung der Expressionsveränderung jedoch nicht zu erkennen. Vielmehr zeigen sich hier in Abhängigkeit der untersuchten Hirnregion unterschiedliche Ergebnisse. Im Rahmen einer Schizophrenie ist der Transmitterstoffwechsel in Abhängigkeit der Hirnregion unterschiedlich gestört und jede Hirnregion in spezifischer Weise pathologisch verändert. Die Ergebnisse dieser Arbeit lassen den Schluss zu, dass Antipsychotika, insbesondere Haloperidol, die synaptische Übertragung hirnregionspezifisch beeinflussen. So wirkt Haloperidol mit einem starken Effekt im Hippocampus. Der Vergleich von qRT-PCR und LuminexVerfahren deutet darauf hin, dass letzteres Verfahren für den mRNA-Nachweis der hier untersuchen Gene ungeeignet scheint. Nur in einer Hirnregion für ein Gen entsprachen sich die Regulationstendenzen der beiden Verfahren (STX1a *up* in CA1). Vor diesem Hintergrund sind natürlich die Ergebnisse des Luminex Verfahrens zunächst kritisch zu sehen. Zum jetzigen Zeitpunkt ist diese Arbeit jedoch die erste, welche das *QuantiGene Plex Assay* zum Gennachweis bei eingefrorenen Rattenhirnproben verwendet hat, so dass weitere Studien folgen müssten um die erzielten Ergebnisse zu verifizieren.

Summary

Schizophrenia is a server, mostly chronic mental disorder. It is associated with structural changes in the brain, as well as changes in the transmitter system. These include the transmitter substances dopamine, glutamate and serotonin, which are increased or decreased depending on the considered brain region. The aim of this study was to investigate to what extent haloperidol and clozapine alter the expression of genes coding for proteins, which are directly involved in synaptic transmission (SNAP-25, STX1a, SYT-6, SYP, VAMP-2), which are components of the extracellular matrix (COLA4A, LAMC-3) and which are involved in the process of synaptic plasticity (DCTN-6, BDNF, STX12). Another aim of this study was to detect possible differences in the expression behavior of these genes under the influence of antipsychotics in different brain regions (PRL, CG, CPU, DG, CA1 and CA3). For this purpose, male Sprague Dawley rats were given either clozapine or haloperidol in the feed for three months in order to allow an oral and therefore as stress-free as possible admission of the drugs to the animals. After 12 weeks of treatment, the brains were removed, slices of 60 µm thickness were cut on a cryostat and the above-mentioned brain areas were excised by sterile biopsy punches with plunger with 1.0 or 1.5 mm diameter from the right hemispheres according to the brain atlas of Paxinos and Watson (1999). Subsequently, an analysis of gene expression using two different methods, the quantitative Real Time PCR and the Luminex based QuantiGene Plex Assay was performed. This leads to the third aim of this study, a comparison of these two detection methods. First of all, haloperidol has an overall stronger effect on the expression behavior of the genes studied than clozapine. The latter resulted exclusively in a statistically significant down-regulation of SNAP-25 (qRT-PCR-Down-CG) and STX1a (Luminex-Down-CPU). Haloperidol, on the other hand, led to a statistically significant down-regulation of SNAP-25 (Down-CA3) and up-regulation of STX1a (Up-CA1) in qRT-PCR. In the Luminex procedure, haloperidol was shown to downregulate VAMP-2 (Down-PRL and Down-DG) and up-regulated the genes STX1a (Up-CA1) and STX12 (Up-CA1). These results suggest a different mechanism of action of both antipsychotics and possibly an effect difference between atypical and typical antipsychotics. Furthermore, both antipsychotics have no effect on the genes encoding extracellular matrix proteins (COLA4A, LAMC-3). Both antipsychotics have little effect on those genes encoding proteins involved in neuronal plasticity. Only DCTN-6 is marginally altered in the qRT-PCR under clozapine (Up-CA1) and under haloperidol (Down-CA3). The most important gene in this context, BDNF, is not statistically significantly altered in any examined brain region. Haloperidol in particular leads to changes in the expression behavior of genes directly involved in synaptic transmission (SNAP-25, STX1a, VAMP-2). In general, a pattern in the direction of the expression change can not be recognized. Rather, different results are found here depending on the examined brain region. In schizophrenia, the transmitter metabolism is differently disturbed depending on the brain region and each brain region is pathologically altered in a specific manner. The results of this study lead to the conclusion that antipsychotics, in particular haloperidol, influence the synaptic transmission specifically for each brain region. Haloperidol has a strong effect in the hippocampus. The comparison of qRT-PCR and Luminex method indicates that the latter method seems to be unsuitable for mRNA detection of the genes examined here. Only in one brain region for one gene did the regulatory tendencies of the two methods (STX1a up in CA1) correspond. Against this backdrop the results of the Luminex method are initially critical. At present, however, this study is the first to use the QuantiGene Plex Assay for the detection of frozen rat brain specimens, so further studies would be needed to verify the results obtained.

Abkürzungsverzeichnis

AMPA	Alpha-Amino-3-Hydroxy-5-Methyl-4-Isoxazolpropriонsäure
ANOVA	Analysis of Variance
BA	Brodmann Areal
bDNA	Branched DNA
Bdnf	Brain-derived neutropic factor
BL	Blockers
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
CA	Cornu ammonis
cDNA	Complementary/copy DNA
CE	Capture Extenders
CG	Gyrus cinguli
COLA4	Collagen Typ 4
CP	Capture Probes
CPU	Caudatus Putamen
CPZ	Chlorpromazin
CT	Cycle of Threshold
DG	Gyrus Dentatus
DISC-1	Disrupted in schizophrenia-1
DCTN-6	Dynactin 6
DNA	Desoxyribonucleic acid
EPMS	Extrapyramidal motorische Störung
EZM	Extrazelluläre Matrix
FRET	Fluorescence resonance energy transfers
GABA	Gamma-Ammnino-Buttersäure
GIT	Gastrointestinaltrakt
GRIP	Glutamate receptor interacting protein 1
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
HT-Rezeptor	Hydroxytryptamin-Rezeptor
LAMC-3	Laminin gamma 3
LE	Label Extenders
LSD	Lyergsäurediethylamid
LTP	Long Term Potentiation
MMLV	Moloney Murine Leukemia Virus

mRNA	Messenger RNA
Munc-18	mammalian uncoordinated-18
Ncl	Nucleus
NEEP21	Neuron-enriched endosomal protein of 21kDa
NGF	Nerve growth factor
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
NT	Neutrophine
OD	Optische Dichte
Oligo-DT-Primer	OLIGO-Desoxythymidintriphosphat-Primer
PCP	Phencyclidin
Poly(I:C)	Polycylidylsäure
PRL	Prälimbischer Kortex
qRT-PCR	Quantitative Real-Time PCR
RIN	RNA Integrity Number
RNA	Ribonucleic acid
RNase	Ribonukleasen
rRNA	Ribosomale RNA
RT	Reverse Transkriptase
RVP	respiratory virus panel
SAPE	Streptavidin konjugiertes R-Phycerythin
siRNA	small interfering RNA
SNAP-25	Synaptosomal-associated protein 25
SNARE	Soluble N-ethylmaleimide-sensitive-factor attachment receptor
STX1a	Syntaxin1a
STX12	Syntaxin12
SYP	Synaptobrevin
SYT	Synaptotagmin
Trk	Tropomyosin-related Kinase
tRNA	Transfer-RNAs
T-SNARE	Target SNARE
Tukey-HSD-Test	Tukey´s Honestly Signifikant Difference Posthoc Test
VGlut1	Vesiculärer Glutamatrezeptor1
V-SNARE	Vesicle SNARE
ZNS	Zentrales Nervensystem

1. Einleitung 1
1.1 Epidemiologie 1
1.2 Kosten der Erkrankung 1
1.3 Ätiopathogenese 2
1.3.1 Genetische Faktoren 3
1.3.2 Strukturelle Gehirnveränderungen 3
1.3.2.1 Präfrontaler Kortex 4
1.3.2.2 Gyrus Cinguli 4
1.3.2.3 Caudatus Putamen 5
1.3.2.4 Hippokampus 5
1.3.3 Transmitter 6
1.3.3.1 Dopamin 6
1.3.3.2 Glutamat 7
1.3.3.3 Serotonin 8
1.4 Symptome und Diagnostik 8
1.5 Subtypisierung der Schizophrenie 10
1.6 Therapie der Schizophrenie 10
1.6.1 Medikamentöse Therapie 11
1.6.1.1 Typische Antipsychotika 11
1.6.1.1.1 Haloperidol 12
1.6.1.2 Atypische Antipsychotika 14
1.6.1.2.1 Clozapin 14
1.7 Grundlagen der neuronalen Plastizität 16
1.7.1 Funktionelle Gliederung der untersuchten Gene 17
1.7.1.1 Gene der extrazellulären Matrix 18
1.7.1.1.1 LAMC-3 18
1.7.1.1.2 COL4A-Gen 18
1.7.1.2 Gene der synaptischen Plastizität 19
1.7.1.2.1 BDNF 19
1.7.1.2.2 DCTN-6 20
1.7.1.2.3 STX12 20
1.7.1.3 Gene, der an der Transmitterexozytose beteiligten Proteine 21

2. Material und Methode 22
2.1 Versuchstiere 22
2.1.1 Tierhaltung 22
2.1.2 Verabreichung der Antipsychotika 22

2.2 Quantitative real Time PCR und Luminex Verfahren ... 23
2.2.1 Materialgewinnung ... 23
2.2.2 Darstellung der Stanzen ... 25
2.2.3 Aufbau der DNA ... 28
2.2.4 Aufbau der RNA ... 29
2.2.5 RNA-Isolierung ... 30
2.2.5.1Theoretische Grundlage ... 30
2.2.5.2 Praktische Anwendung ... 31
2.2.6 RNA-Konzentrationsbestimmung ... 32
2.2.6.1 Photometrische Messung mittels Nanodrop ... 32
2.2.6.1.1 Theoretische Grundlage ... 32
2.2.6.1.2 Praktische Anwendung ... 33
2.2.6.2 RNA-Qualitätskontrolle mittels Agilent 2100 Bioanalyzer ... 33
2.2.6.2.1 Theoretische Grundlage ... 33
2.2.6.2.2 Praktische Anwendung ... 34
2.2.7 Reverse Transkription ... 35
2.2.7.1 Theoretische Grundlage ... 35
2.2.7.2 Praktische Anwendung ... 36
2.2.8 Auswahl der Zielgene und Primer ... 37
2.2.9 Polymerase-Kettenreaktion ... 39
2.2.9.1 Klassische Polymerase-Kettenreaktion ... 39
2.2.10 Quantitative Real Time PCR ... 40
2.2.10.1 Theoretische Grundlage ... 40
2.2.10.2 Praktische Anwendung ... 41
2.2.10.3 Theoretische Grundlage der Auswertung ... 42
2.2.11 Luminex Verfahren ... 43
2.2.11.1 Theoretische Grundlage ... 43
2.2.11.2 Praktische Anwendung ... 44
2.3 Statistische Auswertung ... 46

3. Ergebnisse ... 46
3.1 Serumspiegel von Clozapin und Haloperidol ... 46
3.2 Ergebnisse der Qualitätskontrolle der RNA ... 47
3.3 Statistische Auswertung der Ergebnisse der qRT-PCR und des Luminex Verfahrens ... 49
3.4 Graphische Darstellung der Ergebnisse der qRT-PCR und des Luminex Verfahrens ... 52
3.4.1 Prälimbischer Kortex ... 52
3.4.2 Gyrus cinguli ... 53

3.4.3 Caudatus Putamen 53
3.4.4 Hippokampus 54
3.4.4.1 Gyrus Dentatus 54
3.4.4.2 Cornu Ammonis 1 54
3.4.4.3 Cornu Ammonis 3 55

4. Diskussion 62
4.1 Prälimbischer Kortex 62
4.2 Gyrus Cinguli 66
4.3 Caudatus Putamen 69
4.4 Hippokampus 72
4.4.1 Gyrus Dentatus 72
4.4.2 Cornu Ammonis 1 73
4.4.3 Cornu Ammonis 3 75
4.5 Vergleich der Ergebnisse des qRT-PCR und des Luminex Verfahrens 77

5. Limitation und Ausblick 83

6. Literaturverzeichnis 84

1. Einleitung

1.1 Epidemiologie

Bei der Schizophrenie handelt es sich um eine schwere, meist chronisch verlaufende psychische Erkrankung. Die Schizophrenie ist eine endogene Psychose mit einer Vielzahl charakteristischer Störungen im Bereich des Denkens, der Wahrnehmung, der Gefühlswelt, des Antriebs oder der Psychomotorik. Als Kennzahlen zur Beschreibung der Epidemiologie einer Krankheit dienen Inzidenz und Prävalenz. Die Inzidenz ist die Anzahl an Neuerkrankungen während eines bestimmten Zeitraumes innerhalb einer definierten Population. Sie beträgt für die Schizophrenie etwa 0,17-0,54/1000. Die Prävalenz, also die Anzahl an Erkrankten an innerhalb einer definierten Population zu einem bestimmten Zeitpunkt, liegt bei 1,4-4,6/1000 (Jablensky 2000). Die Wahrscheinlichkeit an einer Schizophrenie zu erkranken ist nach älteren Studien für Männer und Frauen gleich (Häfner et al. 1998). Neuere Übersichtsarbeiten zeigen aber einen leicht erhöhten Anteil bei Männern (Tandon et al. 2008). Das Manifestationsalter der Erkrankung bei Frauen liegt im Mittel 3,4 Jahre später als bei Männern, bei etwa 25 bis 29 Jahren, während es bei Männern bei 20 bis 24 Jahren liegt (Thorup et al. 2007). Nach der Menopause (Altersgruppe der 45- bis 50-jährigen) erkranken aber mehr Frauen zum ersten Mal an einer Schizophrenie mit einem insgesamt ungünstigerem prognostisch zu erwartendem Verlauf. Dies weist auf geschlechtsspezifische Unterschiede hin, wobei vermutet wird, dass Geschlechtshormone, speziell das Östrogen, hierbei eine Rolle spielen (Hayes et al. 2012). Die Lebenserwartung schizophrener Patienten ist im Vergleich zur Normalbevölkerung um 22,5 Jahre reduziert (Tiihonen et al. 2007). Ursächlich hierfür ist zum einen das vermehrte Auftreten natürlicher Todesursachen wie Neoplasien, kardiovaskuläre und respiratorische Erkrankungen, aber auch eine erhöhte Rate an unnatürlichen Todesursachen. Hier nimmt Suizid den prozentual größten Anteil ein (Brown et al. 2000).

1.2 Kosten der Erkrankung

Die Schizophrenie gilt als die teuerste psychiatrische Erkrankung überhaupt. In Deutschland liegen die Gesamtkosten der Schizophrenie pro Jahr bei etwa 4,3 bis 9,2 Milliarden Euro (Kissling et al.1999). Dies liegt zum einen an dem frühen Beginn und dem häufig chronischen Verlauf der Erkrankung, so dass über einen sehr langen Zeitraum kontinuierlich direkte Kosten

für das Gesundheitssystem anfallen. Zum anderen bedingt gerade der frühe Krankheitsbeginn auch sehr hohe indirekte Kosten, also solche, die durch den Produktivitätsausfall der Erkrankten verursacht werden. Schätzungen haben einen Anteil von 1,5-3% der Gesamtausgaben für das Gesundheitswesen in Industrieländern zur Behandlung der Schizophrenie ergeben (Knapp und Razzouk, 2008). In Deutschland belaufen sich die direkten Behandlungskosten eines an Schizophrenie erkrankten Patienten im Durchschnitt auf 14.204 Euro. Hierzu müssen jedoch noch die indirekten Kosten einer Schizophrenieerkrankung addiert werden. 14,7% der vierzigjährigen Betroffenen werden in Deutschland frühzeitig berentet. Dies hat einen Einnahmeausfall der Rentenversicherungsträger und einen Steuerausfall von schätzungsweise zwei Milliarden Euro/Jahr zur Folge (Clade 2003).

1.3 Ätiopathogenese

Die Ätiologie der Schizophrenie ist multifaktoriell und lässt sich mit dem Vulnerabilitäts-Stress-*Coping*-Modell (Abb.1) erklären (Zubin und Spring, 1976), welches neurobiologische, psychische und soziale Faktoren berücksichtigt.

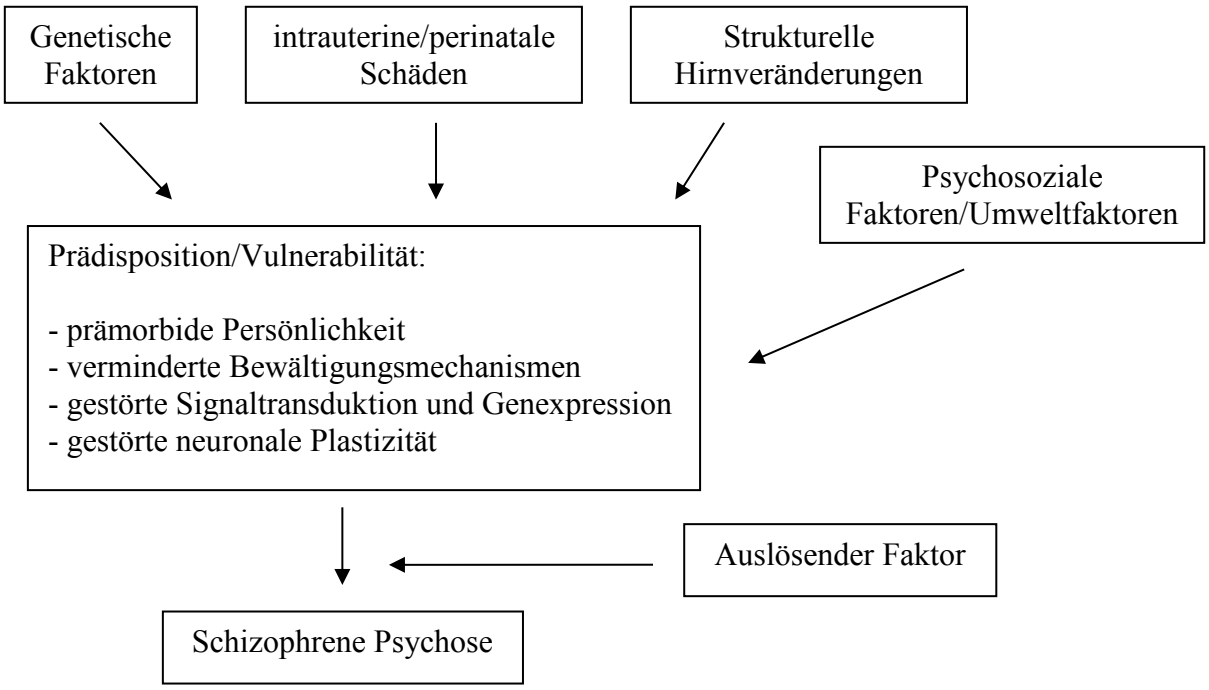


Abb.1: Vulnerabilitäts-Stress-*Coping* Modell. Verschiedene Faktoren, wie genetische Disposition, intrauterine und perinatale Schäden, strukturelle Hirnveränderung, und psychosoziale Faktoren bedingen eine Prädisposition, die die Entstehung einer Schizophrenie bei Auftreten von internen und/oder externen Stressoren begünstigt (modifiziert nach Zubin and Spring, 1976).

Für die Vulnerabilität im Sinne einer Prädisposition spielen sowohl genetische, als auch intrauterin und perinatal schädigende Einflussfaktoren eine Rolle. Psychosoziale Einflüsse

scheinen eher für den Verlauf der Krankheit ausschlaggebend zu sein. Noch vor Ausbruch der Krankheit treten neuronale Entwicklungsstörungen auf, die die Informationsverarbeitung im Gehirn beeinträchtigen und eine prämorbide Persönlichkeitsstruktur bedingen. Dies führt zu einem reduzierten Bewältigungsvermögen (*Coping*) gegenüber externen Stressoren und kann somit zur Auslösung einer akuten Psychose führen. Als Stressoren gelten einschneidende, zu emotionaler Belastung führende Lebensereignisse, eine schizoide Persönlichkeitsstruktur, ein instabiles, kleines soziales Netzwerk, eine überstimulierende soziale Umgebung, wie auch ein kritikbetontes und emotional überladenes Familienumfeld. Als protektive Faktoren werden psychosoziale Intervention, antipsychotische Medikation, ein intaktes Familienumfeld, wie auch gute eigene Bewältigungsstrategien beschrieben (Nuechterlein et al. 1992).

1.3.1 Genetische Faktoren

Studien belegen, dass bei Angehörigen 1. Grades von schizophrenen Patienten die Lebenszeitprävalenz ebenfalls an Schizophrenie zu erkranken bei 2 – 16% liegt (Lichtermann et al. 2000). Trotz dieser großen Variabilität liegt eine signifikant größere Häufigkeit von Sekundärfällen im Vergleich zu Angehörigen Gesunder vor (2%). Bestätigt wird der Einfluss genetischer Faktoren auf die Entstehung der Schizophrenie durch zahlreiche Zwillingsstudien. Die Konkordanzrate, also die Wahrscheinlichkeit, dass ein Zwilling betroffen ist, wenn auch der andere Zwilling erkrankt ist, liegt bei dizygoten Zwillingen bei etwa 6-14%, bei monozygoten Zwillingen hingegen bei etwa 80% (Sullivan et al. 2003). Monozygote Zwillinge verfügen über ein identisches Erbmaterial, so dass dieser Wert den genetischen Einfluss bei der Entstehung der Schizophrenie belegt. Gleichzeitig wird aber auch die Relevanz nicht-genetischer Faktoren für die Ätiologie schizophrener Erkrankungen deutlich.

1.3.2 Strukturelle Gehirnveränderungen

Verschiedene Studien haben nachgewiesen, dass es bei schizophrenen Patienten zu charakteristischen hirnstrukturellen Veränderungen kommt. So kann eine Reduktion des Hirnvolumens mit Betonung der grauen Substanz beobachtet werden. Dieser Verlust ist assoziiert mit einer Verminderung neurokognitiver Funktionen (Gur et al. 1999). Des Weiteren kann bei den Betroffenen eine Veränderung des Ventrikelsystem nachgewiesen werden. Schon 1972 wurde mittels kernspintomographischen Untersuchungen eine generalisierte Vergrößerung des Ventrikelsystems dargestellt. Dies konnte durch eine Vielzahl weiterer Studien unter der Verwendung moderneren Bildgebungsverfahren spezifiziert werden. So zeigt

sich zum einen eine Zunahme des Ventrikelvolumens im dritten Ventrikel, welche mit einer Zunahme des kognitiven Defizits einhergeht (Bornstein et al. 1992). Zum anderen wurde eine Vergrößerung der Seitenventrikel mit Betonung des linken Temporalhorns nachgewiesen (Shenton et al. 2001). Das gesunde menschliche Gehirn zeigt normalerweise eine asymmetrische Gliederung. Präfrontale, prämotorische und temporale Areale sind auf der rechten Seite größer als auf der linken, wohingegen es sich bei sensomotorischen und occipitoparietalen Arealen genau seitenverkehrt verhält. Diese Asymmetrie ist bei schizophrenen Patienten vermindert, beziehungsweise stellenweise sogar aufgehoben (Bilder et al. 1994). Darüber hinaus zeigen sich bei schizophren Erkrankten spezifische Veränderungen der in dieser Arbeit untersuchten Hirnareale, welche im Folgenden erläutert werden.

1.3.2.1 Präfrontaler Kortex

Untersuchungen des Frontallappens zeigen eine Volumenminderung des präfrontalen Kortex mit einer Reduktion der Stoffwechselaktivität in dieser Region (Hill et al. 2004). Darüber hinaus findet sich im präfrontalen Kortex eine abnorm hohe neuronale Dichte mit Verminderung der kortikalen Dicke, was für eine Verminderung des Neuropils spricht (Selemon et al. 1995). Es zeigt sich ein frontal betonter Verlust der grauen Substanz, welcher mit einer Verminderung neurokognitiver Funktionen und einer Störung der Verarbeitung und Erkennung von Emotionen assoziiert ist (Knöchel et al. 2016; Maat et al. 2016). Auf Transmitterebene kann im präfrontalen Kortex schizophrener Patienten eine Reduktion der Expression von Dopamin D1, D3 und D4 Rezeptoren (Meador-Woodruff et al.1997; Okubo et al. 1997), wie auch eine verminderte Expression von N-Methyl-D-Aspartat-Rezeptoruntereinheiten (NMDA) nachgewiesen werden (Kristansen et al. 2006).

1.3.2.2 Gyrus Cinguli

Ebenfalls von einer Volumenreduktion betroffen, ist der gesamte Gyrus cinguli, einhergehend mit einer reduzierten Stoffwechselaktivität im anterioren Segment (Haznedar et al. 2004). Darüber hinaus zeigt sich eine Abnahme der Dicke der grauen Substanz mit Reduktion der Neuronendichte. Es besteht ein Zusammenhang zwischen Ausmaß der Volumenreduktion und Dauer der Erkrankung, sowie der Schwere der Positiv- und Negativsymptomatik (Wang et al. 2007). Im anterioren Gyrus cinguli schizophrener Patienten kommt es zudem zu einer Reduktion vesikulärer Glutamatrezeptoren und damit zu einer Störung der Glutamatfreisetzung (Oni-Orisan et al. 2008).

1.3.2.3 Caudatus Putamen

Das Putamen ist über den Nucleus accumbens mit dem Nucleus caudatus zum Striatum verbunden und als Teil der Basalganglienschleife in einen neuronalen Kreislauf zwischen Kortex und Thalamus eingeschaltet. Bei schizophrenen Patienten kommt es neben einer Volumenreduktion, zu einer Reduktion der metabolischen Stoffwechselrate mit einer verminderten Zellzahl im Putamen (Kreczmanski et al. 2007). Die Volumenreduktion betrifft vor allem das mittlere und anteriore Segment des Putamen mit Dominanz im linken Putamen und ist mit einer affektiven Nivellierung bei schizophrenen Patienten assoziiert (Ballmeier et al. 2008; Hong et al. 2015). Auf Transmitterebene findet sich in der gesamten striatalen Region, einschließlich des Putamens, eine dopaminerge Hyperaktivität mit einer erhöhten präsynaptischen Dopaminsynthese und erhöhten Dichte an Dopamin D2 Rezeptoren (Hietala et al. 1995; Farde et al. 1990).

1.3.2.4 Hippokampus

Eine Volumenreduktion des gesamten Temporallappens betrifft verstärkt die linke Gehirnhälfte, mit Betonung des linken medialen und superioren Temporallappenanteils (Honea et al. 2005). Zum superioren Temporallappen gehört auch das Planum temporale, welches bei schizophrenen Erkrankten ebenfalls eine linksbetonte Volumenreduktion zeigt (Falkai et al. 1995). Der mediale Temporallappen beinhaltet unter anderem den Hippokampus, den Gyrus Parahippokampalis, dessen Rindenschicht als entorhinaler Kortex bezeichnet wird und nahtlos in das Subiculum übergeht, sowie die Amygdala. Alle drei Strukturen sind Teil des limbischen Systems, wobei die beiden Erstgenannten für die Gedächtnisbildung und die Amygdala für die emotionale Einfärbung von Gedächtnisinhalten verantwortlich sind. Die Hippokampusformation besteht aus dem Subikulum, dem Gyrus Dentatus (DG) sowie dem Cornu Ammonis (CA). Letzteres gliedert sich in die Regionen CA1-CA4. Der Hippokampus ist bei der Schizophrenie durch eine Vielzahl morphologischer Veränderungen gekennzeichnet, die im Folgenden vorgestellt werden. Bei schizophrenen Erkrankten konnte eine Volumenreduktion, sowie eine Reduktion der grauen Substanz im Hippokampus festgestellt werden. Diese Veränderungen lassen sich schon zu Beginn der Erkrankung detektieren, sind aber mit fortschreitender Krankheitsdauer progredient (Kawano et al. 2015). Des Weiteren kommt es zu einem Verlust von Neuronen in der Pyramidenzellschicht in allen Regionen des Cornu ammonis (Falkai und Bogerts, 1986) einhergehend mit einer Reduktion der Neuronengröße vor allem im entorhinalen Cortex, des Subikulums und der CA1-Region (Arnold et al. 1995). Im Hippokampus unterhält der entorhinale Kortex direkte Projektionen zu

den Regionen DG, CA1 und CA3. Des Weiteren projiziert der entorhinale Kortex über den Tractus perforans in die Körnerzellschicht des Gyrus Dentatus, der über die Moosfasern mit der CA3-Region in Verbindung steht. Über die Schaffer-Kollaterale, die Axon-Kollaterale der Pyramidenzellen, kommuniziert die Region CA3 mit der Region CA1, von wo aus wiederum Projektionen zum entorhinalen Kortex und zum Gyrus Dentatus ziehen. Transmitter in allen Synapsen ist Glutamat, wobei in der Pyramidenzellschicht von CA1 und CA3 GABAerge Interneurone als Modulatoren der exizitatorischen Übertragung liegen. Bei an Schizophrenie Erkrankten kommt es sowohl auf der morphologischen Ebene der Neurone, als auch auf der Ebene der synaptischen Übertragung zu einer Störung dieser komplexen Verschaltung. So konnte gezeigt werden, dass es zu einer Reduktion der Synapsenbildung der Moosfasern kommt, also zu einer gestörten Verbindung zwischen Gyrus Dentatus und CA1 (Kolomeets et al. 2007). Auf der Ebene der synaptischen Übertragung konnte eine verminderte Übertragung des inhibitorischen Transmitters Gamma-Amino-Buttersäure (GABA) nachgewiesen werden (Reynolds et al. 1990). Des Weiteren ist eine Störung der glutamatergen Transmission im Hippokampus schizophrener Patienten gut untersucht. Die NMDA Rezeptoruntereinheit NR1 ist essenziell für die Funktion des Rezeptors. NR1mRNA ist aber bei an Schizophrenie Erkrankten in allen hippokampalen Regionen vermindert, vor allem aber in der CA3-Region (Gao et al. 2000). Es wurde auch über eine Reduktion der Kainatrezeptordichte in den Regionen CA3 und DG berichtet (Kerwin et al. 1990). GluR1/GluR2mRNA, welche für eine Untereinheit des Alpha-Amino-3-Hydroxy-5-Methyl-4-Isoxazolproprionsäre (AMPA) Rezeptors codieren, zeigen eine verminderte Expression im Subikulum, wie auch in den Regionen CA3 und DG schizophrener Patienten (Eastwood et al. 1995). Des Weiteren konnte eine verminderte Expression des vesikulären Glutamattransportes1 (VGlut1) in den oben genannten Hirnregionen nachgewiesen werden. VGlut1 ist integraler Bestandteil des Transportproteins, welches den Transmitter Glutamat in die Vesikel befördert (Eastwood et al. 2005). Alle diese Studien belegen eine Störung der synaptischen Übertragung des exzitatorischen Transmitters Glutamat bei an Schizophrenie Erkrankten, welche zu einer Störung in der Kommunikation der einzelnen hippokampalen Regionen untereinander führt.

1.3.3 Transmitter

1.3.3.1 Dopamin

Schon 1963 erkannten Carlsson und Lindquvist die zentrale Rolle des Transmitters Dopamin in der Pathogenese der Schizophrenie. Sie postulierten die Theorie einer dopaminergen

Hyperaktivität bei schizophrenen Erkrankten. Sie wiesen nach, dass Antipsychotika über eine Blockade zentraler D2 Rezeptoren antipsychotisch wirksam sind. Ergänzend konnte gezeigt werden, dass Amphetamine über eine zentrale Dopaminausschüttung zu einer psychoseähnlichen Symptomatik führen (Synder 1973). Mit Hilfe modernerer Untersuchungsmethoden konnten in den letzten Jahren die molekularen Mechanismen der dopaminergen Hyperaktivität erklärt werden. So zeigt sich bei Patienten mit Schizophrenie neben einer vermehrten präsynaptischen Dopaminanreicherung (Hietala et al. 1995), eine verstärkte Ausschüttung von Dopamin auf einen exogenen Reiz, deren Intensität mit der Zunahme der Positivsymptomatik korreliert (Abi-Dargham et al. 1998). Außerdem konnte eine erhöhte intrasynaptische Blockade von Dopaminrezeptoren in Ruhe im Vergleich zu gesunden Probanden nachgewiesen werden (Abi-Dargham et al. 2000). Eine reine dopaminerge Hyperaktivität als neurobiologisches Grundkonzept der Schizophrenie reicht jedoch nicht aus. So führt eine Blockade der D2 Rezeptoren zu einer Reduktion der Positiv-, gleichzeitig aber zu einer Verstärkung der Negativsymptomatik (Andreasen 1985). Darüber hinaus zeigt das atypische Antipsychotikum Clozapin eine schwächere Affinität zum D2 Rezeptor als Chlorpromazin (CPZ), ist aber allen anderen Antipsychotika bei der Behandlung der therapierefraktären Schizophrenie überlegen (Miyamoto et al. 2014). Es entwickelte sich daraufhin die Theorie einer frontalen dopaminergen Hypoaktivität bei gleichzeitiger Existenz einer subkortikalen dopaminergen Hyperaktivität als erweiterte Dopaminhypothese (Davis et al. 1991). Passend hierzu konnte gezeigt werden, dass die bei Gesunden normalerweise erhöhte D1-Rezeptordichte im frontalen Kortex bei schizophrenen Patienten vermindert ist. Diese Verminderung ist assoziiert mit der Schwere der Negativsymptomatik (Okubo et al. 1997; Hall et al. 1994).

1.3.3.2 Glutamat

Ein weiterer Transmitter, der in der Pathogenese der Schizophrenie eine zentrale Rolle einnimmt, ist der exzitatorisch wirksame Transmitter Glutamat. Antagonistisch am glutamatergen NMDA-Rezeptor wirkendes Phencyclidin (PCP) oder Ketamin führt zu einer schizophrenieähnlichen Symptomatik (Adler et al. 1999). Diese beinhaltet im Gegensatz zur Amphetaminpsychose sowohl eine Positiv-, als auch eine Negativsymptomatik. Auf Grund dessen wurde vermutet, dass eine Dys- oder Unterfunktion des Glutamatrezeptors an der Ätiopathogenese der Schizophrenie beteiligt sein muss. Glutamatrezeptoren lassen sich in G-Protein gekoppelte metabotrobe Rezeptoren, sowie ionotrope Rezeptoren unterteilen. Zu den ionotropen Glutamatrezeptoren gehören AMPA-Rezeptoren, NMDA-Rezeptoren und Kainat-Rezeptoren. NMDA- und AMPA-Rezeptoren sind an der Postsynapse, Kainat-Rezeptoren an

der Präsynapse lokalisiert. Hier sind sie in die Regulation der Glutamatfreisetzung eingeschaltet. Eine Aktivierung der AMPA- und Kainat- Rezeptoren bewirkt eine Öffnung von Ionenkanälen und damit eine sofortige Depolarisierung. Der NMDA-Rezeptor hingegen ist liganden- und spannungsabhängig. Er bewirkt bei Aktivierung u.a. eine *Long Term Potentiation* (LTP) im Hippokampus und beeinflusst somit wesentlich die Gedächtnisfunktion (Nakanishi, 1992). Bei schizophrenen Patienten kommt es zu den zuvor erläuterten hirnregionsspezifischen Veränderungen der ionotropen Glutamatrezeptoren, die alle zu einer verminderten glutamatergen Transmission führen. In den letzten Jahren konnte zudem eine Synopsis beider Transmitterhypothesen erstellt werden. So führt eine Stimulation des Dopamin D2 Rezeptors zu einer Inhibition der NDMA vermittelten Glutamatfreisetzung, so dass die bei schizophrenen Erkrankten postulierte striatale dopaminerge Hyperaktivität eine glutamaterge Hypoaktivität bedingen könnte (Laruelle et al. 2003).

1.3.3.3 Serotonin

Woolley und Shaw (1954) zeigten schon in den 50er Jahren, dass Lysergsäurediethylamid (LSD) als Serotoninrezeptor-Antagonist eine halluzinogene Wirkung besitzt. Wieder in Betracht gezogen wurde die Serotoninhypothese der Schizophrenie, als entdeckt wurde, dass atypische Antipsychotika auch mit den Serotoninrezeptoren interagieren. So wirkt Clozapin u.a. antagonistisch am 5-Hydroxytriptamin$_{2A}$ -Rezeptor (HT-Rezeptor) und agonistisch am 5-HT$_{1A}$-Rezeptor (Meltzer et al. 2003). Eine Reihe von Studien hat sich auf Expressionsveränderungen der Serotoninrezeptoren in verschiedenen Hirnarealen schizophrener Patienten konzentriert, wobei hier oftmals keine eindeutigen Ergebnisse erzielt werden konnten. Einzig die Expression des 5-HT$_{2A}$-Rezeptors scheint bei Patienten mit Schizophrenie im frontalen Kortex vermindert (Ohuoha et al. 1993).

1.4 Symptome und Diagnostik

Die klinische Symptomatik der Schizophrenie ist sehr heterogen. Klinisch und therapeutisch relevant lässt sich dieser Symptomkomplex in zwei große Gruppen aufteilen:

Positivsymptomatik: Hierunter versteht man Übersteigerungen und starke Fehlinterpretationen des normalen Erlebens. Hierzu gehören:
(a) Wahn: Verfolgungs- und Beeinträchtigungswahn, Beziehungswahn

(b) Denkstörungen: zerfahrenes Denken, Gedankenabreißen, Vorbeireden
(c) Halluzinationen: dialogisierende oder kommentierende Stimmen, optische Halluzinationen
(d) Ich-Störungen: Depersonalisation und Derealisation, Fremdbestimmung des Denkens

Negativsymptomatik: Hierunter versteht man Einschränkungen des normalen Erlebens:
(a) Störungen der Affektivität: Gefühlsarmut, Parathymie, Depression, läppischer Affekt
(b) Störungen des Antriebs: Antriebsarmut, Interessenminderung
(c) Störungen der Psychomotorik: Apathie, Stupor
(d) Störungen des Sozialverhaltens: soziale Isolation

Das Auftreten der einzelnen Symptome ist fakultativ und kann in Art, Anzahl und Ausprägung stark variieren. Um die Diagnose einer Schizophrenieerkrankung stellen zu können, gibt es unterschiedliche Diagnosevorgaben, u.a. die Einteilung in Symptome 1. und 2. Ranges nach Kurt Schneider. Aktuell verwendet und den Leitlinien entsprechend ist der Kriterienkatalog nach ICD-10 (*International Classification of Diseases*). Nach ICD-10 werden folgende diagnostische Leitsymptome unterschieden:

1. Dialogisierende oder kommentierende Stimmen
2. Kontroll- oder Beeinflussungswahn; Wahnwarnehmungen
3. bizarrer Wahn
4. Gedankenlautwerden, -eingebung, -entzug oder –ausbreitung
5. anhaltende Halluzinationen jeder Sinnesmodalität
6. Gedankenabreißen oder -einschieben in den Gedankenfluss
7. Katatone Symptomatik
8. Negativsymptomatik

Für die Diagnose einer Schizophrenie muss mindestens ein Symptom der Gruppe 1-4 oder mindestens zwei der Symptome der Gruppe 5-8 für mindestens einen Monat vorhanden sein. Ausschlusskriterien sind unter anderem hirnorganische Erkrankungen oder der Konsum psychotroper Substanzen. Ebenso sollte die Diagnose Schizophrenie nicht gestellt werden, wenn depressive oder manische Symptome überwiegen, und diesen keine schizophrene Symptomatik vorausgegangen ist.

1.5 Subtypisierung der Schizophrenie

Kraeplin unterteilte schon 1904 die Schizophrenie in die drei „klassischen“ Subtypen paranoid, hebephren und kataton. Die aktuelle ICD-10 Klassifikation erweitert diese Einteilung in die 9 folgenden Subtypen:

1. F20.0 paranoide Schizophrenie
2. F20.1 hebephrene Schizophrenie
3. F20.2 katatone Schizophrenie
4. F.20.3 undifferenzierte Schizophrenie
5. F20.4 postschizophrene Depression
6. F20.5 schizophrenes Residuum
7. F20.6 Schizophrenia simplex
8. F20.8 sonstige Schizophrenie
9. F20.9 Schizophrenie, nicht näher bezeichnet

Dieses Klassifikationssystem wird aber zunehmend kritisch gesehen, da die einzelnen Subtypen im Verlauf einer schizophrenen Erkrankung ineinander übergehen können und zudem die jeweiligen Symptome eines Subtyps nicht für diesen spezifisch sind (Albus 2012).

1.6 Therapie der Schizophrenie

Die Therapie der Schizophrenie besteht aus einem krankheitsphasenspezifischen multimodalen Konzept. Es beinhaltet medikamentöse, psychotherapeutische, soziotherapeutische und rehabilitative Ansätze, die alle gemeinsam als Ziel haben, eine therapeutische Kontinuität mit möglichst langanhaltender Symptomfreiheit zu erreichen. Phasenspezifisch gliedert sich die Therapie in eine primäre Akuttherapie, eine sekundäre Rezidivprophylaxe und tertiäre Maßnahmen zur sozialen Wiedereingliederung der Patienten und zur Vermeidung einer Krankheitschronifizierung. Nicht-medikamentöse Therapieverfahren umfassen neben psychoedukativen Ansätzen, der Familienintervention und verhaltenstherapeutischen Interventionen, eine Vielzahl weiterer Maßnahmen, wie z.B. Training sozialer Fähigkeiten und Ergotherapie

1.6.1 Medikamentöse Therapie

Als erstes Antipsychotikum wurde Chlorpromazin in den 50er Jahren des 19. Jahrhunderts entwickelt. Ursprünglich wurde nach einem Antihistaminikum als potentes Anästhetikum geforscht. Chlorpromazin zeigte jedoch neben einer sehr starken sedierenden Wirkung, auch einen antipsychotischen Effekt bei schizophrenen Patienten (Shen 1999). Einteilen lassen sich die Vielzahl heute existierender unterschiedlicher Antipsychotika nach ihrem Nebenwirkungsprofil, bzw. dem Risiko extrapyramidalmotorische Störungen (EPMS) auszulösen. Typische oder konventionelle Antipsychotika der 1. Generation lösen wesentlich häufiger EPMS aus als die atypischen, neueren Antipsychotika der 2. Generation (Leucht et al. 2009). Die Wirksamkeit der Antipsychotika kann durch ihre neuroleptische Potenz beschrieben werden. Als Bezugspunkt dient Chlorpromazin, dessen neuroleptische Potenz gleich eins gesetzt wird. In Tabelle 1 sind typische und atypische Antipsychotika mit Angabe der jeweiligen Chlorpromazin-Äquvalenzdosis aufgelistet. Diese ist definiert als antipsychotisch wirksame Dosis des jeweiligen Antipsychotikums in mg Chlorpromazin (Davis 1974)

Antipsychotikum	**Chlorpromazin-Äquivalenzdosis (100 mg CPZ) in mg**
Typische Antipsychotika	
Haloperidol	2
Benperidol	1
Fluphenazin	2
Perphenazin	7
Atypische Antipsychotika	
Risperidon	2
Olanzapin	5
Aripriprazol	7,5
Clozapin	50-75

Tabelle 1: Chlorpromazin-Äquivalenzdosis verschiedener Antipsychotika. Übersicht über ausgewählte typische und atypische Antipsychotika und deren Chlorpromazin (CPZ)-Äquivalenzdosis (modifiziert nach Andreasen et al. 2010; Woods, 2003).

1.6.1.1 Typische Antipsychotika

Neben der oben erwähnten Einteilung von Antipsychotika an Hand ihrer neuroleptischen Potenz, können typische Antipsychotika auch durch ihre chemische Struktur in Subgruppen klassifiziert werden (Tabelle 2). Die antipsychotische Wirkung der typischen Antipsychotika

beruht im Wesentlichen auf einer Blockade von zentralen Dopamin D2 Rezeptoren und ihre Potenz steht in engem Zusammenhang mit ihrer Affinität zu diesen Rezeptoren (Creese et al. 1976). Hochpotente Antipsychotika wirken stark antipsychotisch und eignen sich somit zur Therapie der Positivsymptomatik. Niederpotente Antipsychotika hingegen wirken nur schwach antipsychotisch, dafür aber stärker sedierend. Typische Antipsychotika sind durch die Korrelation ihrer klinischen Potenz mit dem Auftreten von EPMS charakterisiert (Hansen et al. 1997).

Chemische Klasse	Typika
Thioxanthene	Clopenthixol, Flupenthixol, Thiotixin, Chlorprothixen
Phenothiazine	Fluphenazin, Clorpromazin, Levomopromazin, Perazin
Azaphenothiazine	Prothipendyl, Oxypendyl
Benzoquinolizine	Tetrabenazin, Benzquinamid
Diphenylbutylpiperidine	Fluspridin, Penfluridol
Dibenzoxipine	Loxapin
Indole	Oxerpertin, Molindon
Butyrophenone	Haloperidol, Benperidol

Tabelle 2: Einteilung der Antipsychotika nach chemischen Klassen. Übersicht über die verschiedenen chemischen Klassen (linke Spalte) typischer Antipsychotika (rechte Spalte).

1.6.1.1.1 Haloperidol

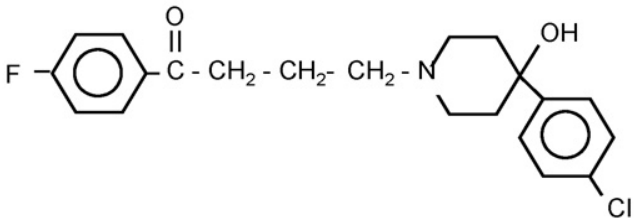


Abb.2: Strukturformel von Haloperidol. Summenformel: $C_{21}H_{23}ClFNO_2$ (modifiziert nach Munoz und Alam, 2009)

Haloperidol (gamma-(4-(p-Chlorphenyl)4-hydroxy-piperidino) -p-fluorbutyrophenon), gehört zu den Derivaten der Butyrophenone (Abb.2). Entwickelt wurde Haloperidol bei dem Versuch potente Analgetikaderivate des Pethidins herzustellen. Eines dieser Derivate, R-1187, zeigte in Tierversuchen ein Chlorpromazin-ähnliches Wirkungsprofil. Mit dem Ziel, den antipsychotischen Effekt bei gleichzeitiger Minimierung der morphinähnlichen Nebenwirkungen zu verstärken, entwickelte ein Mitarbeiter von Janssen, Bert Hermanns, am

11. Februar 1958 R-1625, das spätere Haloperidol. Unter dem Namen Haldol wurde Haloperidol erstmals im Oktober 1959 auf den belgischen Markt gebracht und in den nächsten zehn Jahren zunehmend in Europa verwendet. (Munoz und Alam, 2009)

Wirkungsmechanismus: Haloperidol gehört zu der Gruppe der hochpotenten Antipsychotika, d.h. die antipsychotische Wirkung steht im Vergleich zu dem sedierenden Effekt im Vordergrund. Wie alle Antipsychotika bindet auch Haloperidol antagonistisch an zentralen Dopamin D2 Rezeptoren. Studien haben gezeigt, dass der antipsychotische Effekt ab einer Blockade von 65% aller D2 Rezeptoren einsetzt. Im Gegensatz zu atypischen Antipsychotika interagiert Haloperidol in einem wesentlich geringeren Ausmaß mit anderen zentralen Rezeptoren (Kapur et al. 2000a).

Nebenwirkungen: Haloperidol antagonisiert mit einer hohen Affinität den Dopamin D2 Rezeptor. Ab einer Blockade von 78% dieser Rezeptoren kommt es zum Auftreten charakteristischer Nebenwirkungen unter Haloperidoltherapie (Kapur et al. 2000a). So wird durch eine Blockade der D2 Rezeptoren im nigrostriatalen System eine Morbus Parkinson-ähnliche Symptomatik ausgelöst. Der Morbus Parkinson ist eine degenerative Erkrankung, die zu einem Untergang der dopaminproduzierenden Zellen der Pars Compacta der Substantia Nigra führt. Dieser Dopaminmangel bedingt ein Ungleichgewicht in der Funktion der Basalganglien und führt damit zu den klassischen Parkinson-Symptomen Rigor, Tremor, Bradykinese und posturale Instabilität. Über die Blockade des D2 Rezeptors im nigrostriatalen System durch Antipsychotika, wird dieser Dopaminmangel imitiert. Ab einer Blockade von 78% der D2 Rezeptoren kommt es zu dem Auftreten von EPMS. Die Häufigkeit einer solchen Symptomatik unter Haloperidoltherapie liegt bei etwa 44%. EPMS können unterteilt werden in akut auftretende EPMS und Spätdyskinesien. Akute EPMS umfassen Frühdyskinesien, Akathisie und Parkinsonismus. Spätdyskinesien treten frühestens acht Wochen nach Therapiebeginn auf und sind im Gegensatz zu den akuten EPMS häufig irreversibel (Carlson et al. 2003). Ebenfalls über einen Antagonismus am D2 Rezeptor kommt es zu einer Zunahme des Prolaktinspiegels unter Haloperidoltherapie. Dopamin wirkt über den D2 Rezeptor im tuberoinfundibulären Trakt inhibierend auf die Prolaktinsekretion aus dem Hypophysenvorderlappen. Serotonin hingegen wirkt stimulierend (Halbreich et al. 2003). Auch wenn Haloperidol zu den hochpotenten Antipsychotika gehört und damit im Vergleich zu z.B. Chlorpromazin einen geringeren sedierenden Effekt hat, ist die Sedierung dennoch eine klassische unerwünschte Nebenwirkung der Haloperidoltherapie. Des Weiteren führt eine längere Gabe von Haloperidol, neben einer geringeren Gewichtszunahme, zu verschiedenen

vegetativen Beschwerden, wie Kopfschmerzen, Übelkeit, Erbrechen, Palpitationen und Verlängerung der QT-Zeit (Kane und Correll, 2010).

1.6.1.2 Atypische Antipsychotika

Antipsychotika der 2. Generation oder atypische Antipsychotika stellen eine sehr heterogene Gruppe von Substanzklassen dar, die nicht einheitlich definiert ist. Der Begriff „Atypisch“ bezog sich ursprünglich nur auf die Beobachtung, dass EPMS unter der Therapie mit neueren Antipsychotika wesentlich seltener auftreten, als nach der Verabreichung von typischen Antipsychotika. Darüber hinaus kann der Terminus „Atypisch“ durch eine Reihe weiterer Unterschiede charakterisiert werden. So zeigen atypische Antipsychotika eine bessere Wirkung sowohl auf die Positiv- als auch auf die Negativsymptomatik, ein geringeres Risiko für das Auftreten einer Hyperprolaktinämie und eine höhere Therapieakzeptanz verbunden mit einer geringeren Abbruchrate und besseren Therapieerfolgen (Tollefson et al. 1997).

1.6.1.2.1 Clozapin

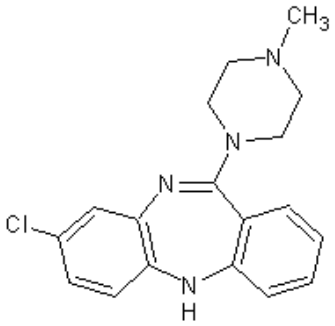


Abb.3: Strukturformel von Clozapin. Summenformel $C_{18}H_{19}ClN_4$, (modifiziert nach Schaber et al. 1998).

Clozapin (8-Chlor-11-(4-methyl-1-piperanzinyl)-5-H-dibenz(b,e)-1,4-diazepin) ist ein Dibenzodiazepinderivat (Abb.3) und wurde 1958 von Schweizer Pharmazeuten auf Basis des trizyklischen Antidepressivums Imipramin entwickelt. Neben einem sehr guten antipsychotischen Effekt führt Clozapin nicht oder nur sehr selten zu den typischen Nebenwirkungen, wie z.B. EPMS. 1972 kam es zu der Markteinführung von Clozapin in der Schweiz und in Österreich (Crilly 2007). Kurz bevor Clozapin vor der Markteinführung in den USA stand, berichteten Idänpään-Heikkilä et al. (1975) von 18 Fällen schwerer Blutbildungsstörungen unter Clozapintherapie, wobei acht Patienten an Agranulozytose verstarben. Clozapin wurde in einigen europäischen Ländern vom Markt genommen und auch die Einführung in die USA wurde zunächst zurückgestellt. Anfang der 80er Jahre war man sich

jedoch einig, dass die Agranulozytose zwar durch Clozapin verursacht wird, das Risiko jedoch durch engmaschige Blutkontrollen vermindert werden kann. Zudem zeigte sich Clozapin gegenüber Chlorpromazin in der medikamentösen Behandlung der Schizophrenie überlegen, so dass Clozapin am 5.2.1990 unter dem Handelsnamen Clozaril in den USA eingeführt wurde (Crilly 2007). Heute ist Clozapin Mittel der ersten Wahl bei der Behandlung der therapieresistenten Schizophrenie und erzielt hier einen besseren therapeutischen Effekt als andere Antipsychotika (Stroup et al. 2016).

Wirkungsweise: Clozapin interagiert neben den Dopaminrezeptoren D2 und D4 noch mit einer Vielzahl anderer Rezeptoren und zwar mit einer höheren Affinität zu diesen Rezeptoren als typische Antipsychotika. So bindet Clozapin den 5-HT_{2A}-Rezeptor stärker als den D2 Rezeptor. Eine serotonerge Hemmung im nigrostriatalen System bewirkt normalerweise eine verminderte Dopaminsynthese. Durch die Aufhebung dieser Hemmung durch Clozapin würde es zu einer vermehrten Dopaminsekretion kommen und somit zu einem verminderten Auftreten von EPMS. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass reine 5-HT_{2A}-Rezeptor-Antagonisten keine antipsychotische Wirkung entfalten. Des Weiteren zeigt Clozapin eine komplette 5-HT_{2A}-Rezeptor-Besetzung bei einer Dosierung mit therapeutischer Wirksamkeit (Kapur und Seeman, 2001). Typische Antipsychotika, wie z.B. Haloperidol besetzen bei einer therapeutischen Dosierung 65-85% der Dopaminrezeptoren. Clozapin hingegen zeigt nur eine Rezeptorbesetzung von 20-65%, was erklären würde, wieso keine EPMS oder Prolaktinerhöhung unter Therapie mit diesem Medikament auftreten (Nord und Farde, 2010). Ein antipsychotischer Effekt wird jedoch erst ab einer D2 Blockade von 60-80% erreicht. Die durch Clozapin verursachte Rezeptorbesetzung liegt jedoch unter diesem Bereich (Kapur et al. 2000). Eine Erklärung für dieses Phänomen bietet das so genannte Konzept der *„loose binding“* oder *„fast dissociation“*. Clozapin zeigt, wie viele andere Atypika auch, eine hohe Inhibitionskonstante des D2 Rezeptors und eine schnelle Dissoziationsgeschwindigkeit, d.h. es kann leichter und damit schneller als klassische Antipsychotika durch das physiologische Dopamin vom Rezeptor verdrängt werden. (Kapur et al. 2001). Dieses Konzept der *„loose binding*“, möglicherweise in Kombination mit dem Effekt von Clozapin auf den 5-HT_{2A}-Rezeptor, könnte die Wirkungsweise des Clozapins erklären. Einen weiteren Ansatz bietet die Tatsache, dass Clozapin im Gegensatz zu Haloperidol verhältnismäßig schwach die Dopaminrezeptoren im Striatum bindet, aber verstärkt im Thalamus und temporalen Kortex. Somit in diesen Hirnregionen, in denen Antipsychotika ihre antipsychotische Wirkung entfalten. (Xiberas et al. 2001).

Nebenwirkungen: Unter Clozapin kann es zu sehr schweren Veränderungen des Blutbildes in Form einer Agranulozytose, also einem Abfall der Granulozytenzahl unter 500/µl, kommen. Die Inzidenz für das Auftreten einer Agranulozytose unter Clozapintherapie liegt bei 0,8-1%, wobei die Clozapindosis keinen Einfluss auf die Höhe des Risikos hat. Um solche Fälle zu verhindern, wurde 1979 das Konzept der kontrollierten Anwendung entwickelt. Dieses besagt, dass innerhalb der ersten 18 Wochen der Therapie mit Clozapin die Leukozytenzahl wöchentlich und danach monatlich kontrolliert werden muss. So treten 85% der Agranulozytosefälle innerhalb der ersten 18 Wochen auf (Alvir et al. 1993). Clozapin kann zu einer Vielzahl weiterer, potenziell lebensbedrohlicher Komplikationen führen, die in folgender Tabelle 3 zusammengefasst werden.

Lebensbedrohliche Nebenwirkungen		Häufige Nebenwirkungen	
Blutbild	Agranulozytose	GIT	Obstipation, Übelkeit, Erbrechen, Hypersalivation
ZNS	Krampfanfälle	Autonome Störungen	Hyper-/ Hypotension, Tachykardie, Synkopen, Sedation
GIT	Toxische Hepatitis	Stoffwechsel	Hyperglykämie, Gewichtszunahme

Tabelle 3: Nebenwirkungsprofil von Clozapin. Übersicht über die unmittelbar lebensbedrohlichen und häufigen Nebenwirkungen von Clozapin (zusammengefasst nach Iqbal et al. 2003).
ZNS - Zentralnervensystem, GIT- Gastrointestinaltrakt.

1.7 Grundlagen der neuronalen Plastizität

Neuronale Plastizität beschreibt die Fähigkeit von Nervenzellen, sich dynamisch in Abhängigkeit ihrer Aufgaben zu verändern. Diese Fähigkeit der Modulation ist die Grundlage der Entwicklung des menschlichen Gehirns, ist aber auch im adulten Gehirn in allen Regionen u.a. bei Lernprozessen oder reparativen Prozessen bei strukturellen Hirnschädigungen zu beobachten. Neuronale Plastizität spielt sich im Gehirn auf unterschiedlichen Ebenen ab (Abb.4).

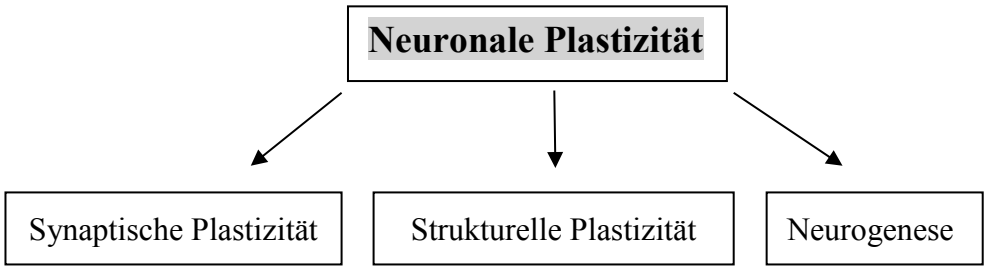


Abb.4: Unterschiedliche Ebenen der neuronalen Plastizität. Diese beinhaltet dynamischen Veränderungen, die direkt die synaptische Übertragung betreffen, zu strukturellen Hirnveränderungen führen, wie auch die Entwicklung neuer Nervenzellen aus Stammzellen (modifiziert nach Buonomano, 1998).

Unter dem Begriff der synaptischen Plastizität werden Veränderungen in der synaptischen Transmission als Ausdruck einer Anpassung auf äußere Einflüsse verstanden. Diese Veränderungen können durch eine Modulation der Transmitterfreisetzung, der prä- und postsynaptischen Rezeptoren und intrazellulärer Signalkaskaden sowohl die Präsynapse, als auch die Postsynapse betreffen. Eine strukturelle Plastizität beschreibt Veränderungen in der Aussprossung, Größe oder Ausrichtung von Axonen, einzelner Dentrite oder ganzer Dendritenbäumen. Neurogenese, also das Wachstum neuer Nervenzellen aus Stammzellen, findet hauptsächlich während der Embryogenese statt, lässt sich aber auch im adulten Gehirn in der subgranulären Zone des Gyrus dentatus und der subventrikulären Zone zwischen Striatum und den Seitenventrikeln nachweisen (Lledo et al. 2006; Buonomano et al. 1998). Entsprechend der unterschiedlichen Ebenen der neuronalen Plastizität sind unterschiedliche Gene und damit unterschiedliche von ihnen codierte Proteine an diesem Prozess beteiligt. Im Folgenden werden die in dieser Arbeit untersuchten Gene und deren Involvierung in den Prozess der neuronalen Plastizität vorgestellt.

1.7.1 Funktionelle Gliederung der untersuchten Gene

Die untersuchten Gene lassen sich anhand der Funktion der von ihnen codierten Proteine in drei Gruppen unterteilen (Tabelle 4). Eine Gruppe wird durch die Gene LAMC-3 und COL4A gebildet, deren codierte Proteine Bestandteile der extrazellulären Matrix sind. Die zweite Gruppe beinhaltet die Gene DCTN-6, BDNF und STX12. Diese codieren jeweils für Proteine, die indirekt auf die synaptische Transmission einwirken und im Rahmen der synaptischen Plastizität eine Rolle spielen. Die dritte Gruppe beinhaltet SNAP-25, STX1a, SYP, SYT-6 und

VAMP-2, also solche Gene, deren Proteine unmittelbar an der Exozytose von Transmitterstoffen an der Präsynapse und damit in die Signaltransduktion involviert sind.

EZM	Synaptische Plastizität	Exozytose
LAMC-3	BDNF	SNAP-25
COL4A	DCTN-6	STX1a
	STX12	SYP
		VAMP-2
		SYT-6

Tabelle 4: Funktionelle Gruppierung der untersuchten Gene. In der ersten Spalte finden sich Gene, die für Proteine der extrazellulären Matrix (EZM) codieren. In Spalte zwei solche Gene, deren Proteine indirekt auf die synaptische Übertragung einwirken und für die synaptische Plastizität des adulten Gehirnes essentiell sind. In der letzten Spalte sind die Gene aufgelistet, deren Proteine unmittelbar an der Transmitterexozytose beteiligt sind. LAMC-3 – Laminin Gamma 3, COL4A – Kollagen Typ 4, BDNF – *Brain-derived neurotrophic factor,* DCTN-6 – Dynactin 6, STX12 – Syntaxin12, SNAP-25 - *Synaptosomal-associated protein 25,* STX1a – Syntaxin1a, SYP – Synaptophysin, VAMP-2 – *Vesicle associated membrane protein,* SYT-6 – Synaptotagmin6

1.7.1.1 Gene der extrazellulären Matrix

1.7.1.1.1 LAMC-3

Laminine sind kollagenähnliche Glykoproteine und als Bestandteile der extrazellulären Matrix wesentlich an der Bildung der Basalmembran beteiligt. Laminine setzen sich aus drei unterschiedlichen Ketten zu einem Heterotrimer zusammen, wobei insgesamt fünf verschiedene Alpha-, drei Beta- und drei Gamma-Ketten existieren. Laminin gamma 3 kommt in Niere, Haut, Muskel, Reproduktionsorganen und im Gehirn vor (Gersdorff et al. 2006). Lamc-3 spielt eine wichtige Rolle in der Gehirnentwicklung. So konnte gezeigt werden, dass Lamc-3 in verschiedenen Phasen parallel zu Genen, bei denen der Beitrag zur Hirnentwicklung bekannt ist, in höherer Konzentration vorkommt und dass Mutationen im LAMC-3-Gen zu einer fehlerhaften Gehirnentwicklung führen (Barak et al. 2011). Darüber hinaus ist Lamc-3 an der Migration von Astrozyten und somit an dynamischen Veränderungen des adulten Gehirnes beteiligt (Gnanaguru et al. 2013). Des Weiteren scheinen Laminine bei dem Prozess der Langzeitpotenzierung im Hippokampus beteiligt zu sein und wirken somit auf die synaptische Plastizität (Nakagami et al. 2000). Der genaue zelluläre Mechanismus dieser komplexen Funktionen von Lamc-3 ist noch nicht bekannt und bedarf weiterer Untersuchungen.

1.7.1.1.2 COL4A

Kollagen Typ 4 kommt im Gegensatz zu den anderen Kollagenen ausschließlich als Bestandteil der Basalmembran vor. Es ist ein Heterotrimer und existiert in drei verschiedenen Varianten

(α1 α1 α2, α3 α4 5α und α5 α5 α6). Codiert werden die einzelnen Untereinheiten durch die entsprechenden Gene: COL4A1-COL4A2 auf Chromosom 13, COL4A3-COL4A4 auf Chromosom 2 und COL4A5-COL4A6 auf dem X-Chromosom. Collagen Typ 4 erfüllt eine Vielzahl an unterschiedlichen Funktionen und ist neben der Beeinflussung der Zelladhäsion und Zelldifferenzierung, in die neuronale Migration, das neuronale Wachstum und die Synapsenfunktion involviert. (Khoshnoodi et al. 2008; Halfer und Yip, 2014). Mutationen im Gen COL4A werden mit verschiedenen zerebralen Erkrankungen in Zusammenhang gebracht wie der Porencephalie, einer autosomal-dominant vererbten Störung, die mit Hirnzysten und Defekten der weißen Hirnsubstanz einhergeht, Läsionen der kleinen Gefäße des Gehirns in Kombination mit dem gehäuften Auftreten von Schlaganfällen und dem HANAC-Syndrom (*Hereditary angiopathy with nephropathy, aneurysms and muscle cramps*) (Gould et al. 2006; Plaisier et al. 2007). Ferner konnte gezeigt werden, dass COL15A1 und COL4A1 im superioren temporalen Kortex von an Schizophrenie Erkrankter vermindert exprimiert sind (Schmitt et al. 2012).

1.7.1.2 Gene der synaptischen Plastizität

1.7.1.2.1 BDNF

BDNF (*Brain-derived neurotrophic factor*) gehört mit NGF (*nerve growth factor*) und NT3-NT6 (Neutrophine) zu der Gruppe der Neutrophine, welche als Wachstumsfaktoren im zentralen und peripheren Nervensystem eine Schlüsselrolle in der synaptischen Plastizität einnehmen. Neutrophine entfalten ihre Wirkung über die Bindung an Tyrosinkinaserezptoren aus der Trk-Familie (*Tropomyosin-related kinase*). BDNF bindet hauptsächlich an TrkB und setzt so eine äußerst komplexe Signalkaskade in Gang. Die Funktion von BDNF im zentralen Nervensystem ist vielfältig. So nimmt BDNF eine zentrale Rolle in der synaptischen Plastizität, also der Fähigkeit des Gehirns sich durch äußere Einflüsse strukturell auf Ebene der Synapse und neuronalen Aussprossung zu verändern, ein. BDNF beeinflusst so sowohl die „*early LTP*" über eine Hochfrequenzstimulation der Postsynapse, als auch die „*later LTP*" über eine Modifikation der Proteinbiosynthese im Hippokampus (Cowansage et al. 2010). Des Weiteren hat BDNF verschiedene andere Einflüsse auf den Transmitterhaushalt im ZNS. Tabelle 5 gibt eine Übersicht, wie BDNF akut und chronisch die synaptische Übertragung und Plastizität im ZNS beeinflusst.

BDNF					
Akut	Erhöhte präsynaptische Glutamat- und Acetylcholin-freisetzung	Induktion der Langzeitpo-tenzierung	Erhöhter Kaliumeinstrom an der Postsynapse	Erhöhung von Amplitude und Frequenz der postsynaptischen Erregung	Erhöhung der NMDA-Rezeptordichte
Chronisch	Dendritenwachs-tum	Vermehrte Aussprossung GABAerger Neurone	Modulation der Expression von Dopaminrezeptoren	Schutz dopaminerger Neurone vor neurotoxischen Stoffen	

Tabelle 5: Akute und chronische Wirkung von BDNF auf den Transmitterhaushalt und die synaptische Plastizität im zentralen Nervensystem. Die obere Zeile der Tabelle zeigt die unmittelbaren durch BDNF induzierten Effekte, die untere Zeile solche, die durch eine längere BDNF Stimulation verursacht werden (modifiziert nach Sala et al. 1998; Cownsage et al. 2010)

1.7.1.2.2 DCTN-6

Das Gen DCTN-6 codiert für das Protein p27, welches eine Untereinheit des Proteinkomplexes Dynactin darstellt. Dynactin besteht aus insgesamt elf Untereinheiten, deren größter Vertreter p150, codiert durch DCTN-1, ist. Dynactin spielt eine zentrale Rolle im axonalen Transport. Das neuronale Zytoskelett ist aus Mikrotubuli, Aktinfilamenten und Neurofilamenten aufgebaut. Dienen letztere vor allem dem Zellschutz, sind Aktinfilamente und Mikrotubuli Leitstrukturen für den Transport von Stoffen, wie Proteine, in Nervenzellen. Mikrotubuli sind Leitstrukturen für langstreckige, axonale Transporte. Dynactin bindet über die p150 Untereinheit an die Mikrotubili und an das Protein Dynein. Letzteres ist in der Lage, einen Komplex mit Proteinen und Neurofilamenten zu bilden. Der Dynein/Dynactin Komplex ist für den retrograden Transport, also von der Zellperipherie entlang des Axons zum Zellkörper, verantwortlich (Levy und Holzbaur, 2006). Hierdurch erfüllt Dynactin eine Vielzahl unterschiedlicher Funktionen im ZNS. So werden unter anderem Neutrophine retrograd in den Zellkörper transportiert, wo sie ihre komplexe Signalkaskade in Gang setzen, so dass Dynactin indirekt auf die synaptische Plastizität einwirkt. Darüber hinaus ist Dynactin integraler Bestandteil von Neuronenwachstum und –stabilisierung, axonaler Aussprossung und Synaptogenese (Murphey et al.1999; Abe et al. 2008). P27, als relativ kleine Untereinheit des Dynactin-Proteinkomplexes, ist nicht direkt an der Bindung von Dynein beteiligt, hat aber eine wichtige stabilisierende Wirkung auf den Dynactin/Dynein Komplex (Yeh et al. 2012).

1.7.1.2.3 STX12

Syntaxin12 ist nicht wie Syntaxin1a direkt an der Exozytose von Transmitterstoffen beteiligt, sondern an Endosomen lokalisiert (Tang et al. 1998). Hier modifiziert Syntaxin12 die

Interaktion des Glutamatrezeptors GluR2 und GRIP1 (*Glutamate receptor interacting protein 1*) mit dem ebenfalls an den Endosomen lokalisierten Protein NEEP21 (*Neuron-enriched endosomal protein of 21kDa*) und somit die Wiederaufbereitung von GluR2. Dadurch hat es direkten Einfluss auf die synaptische Übertragungsrate des Transmitters Glutamat (Steiner et al. 2005).

1.7.1.3 Gene, der an der Transmitterexozytose beteiligten Proteine

Die Voraussetzung jeder synaptischen Übertragung ist ein Aktionspotenzial, welches an der Präsynapse zu einer Öffnung spannungsabhängiger Ca2+-Kanäle führt. Der hieraus resultierende Ca2+ Einstrom in die Präsynapse initiiert die Freisetzung von Transmittern aus den Vesikeln. Grundlage dieser Exozytose bilden die SNARE Proteine (*Soluble N-ethylmaleimide-sensitive-factor attachment receptor*), deren wichtigste Vertreter **Synaptobrevin** (*Vesicle-associated membrane protein* = **Vamp**), **Syntaxin** (STX1a) und **Snap-25** (*Synaptosomal-associated protein 25*) sind. Die SNARE-Proteine können in zwei unterschiedliche Kategorien unterteilt werden: Target (T-) SNARE, wie Syntaxin und Snap-25, die in der präsynaptischen Membran verankert sind und Vesicle (V-) SNARE, deren wichtigster Vertreter Synaptobrevin ist und in der Vesikelmembran befestigt ist (Söllner et al. 1993). Synaptobrevin liegt zunächst im inaktiven Zustand komplexiert an Synaptophysin vor. Erst wenn Synaptophysin dissoziiert, ist eine Interaktion zwischen T- und V- SNARE möglich (Becher et al. 1999). Ähnliches gilt für das T-SNARE Protein Syntaxin. Dieses besteht aus einer langen N-terminalen Region, die in ein kurzes N-terminales Peptid und eine längere Habc-Domäne unterteilt werden kann. Erst, wenn das Regulatorprotein Munc-18 (*mammalian uncoordinated-18*) an das N-terminale Peptid des Syntaxins bindet, bilden Syntaxin und Snap-25 einen Anlagerungskomplex aus mit einer hohen Affinität für Synaptobrevin, so dass eine feste Bindung zwischen präsynaptischer Membran und Vesikel entsteht (Südhof und Rizo, 2011). In der Vesikelmembran liegt ein weiteres Protein, welches entscheidend für den Vorgang der Exozytose ist, **Synaptotagmin**. Dieses besteht aus einer intravesikulär gelegenen N-terminalen Sequenz, einer kurzen transmembranen Region, sowie zwei im Cytoplasma gelegenen C2 Domänen: C2A und C2B. An der C2A Domäne können drei Ca2+ Ionen binden, an der C2B Domäne zwei Ionen. Synaptotagmin fungiert als Calciumsensor und unterliegt einer kalziumabhängigen Konfirmationsänderung. Wenn Calcium in die Präsynapse einströmt, kommt es zu einer Interaktion zwischen Synaptotagmin und Syntaxin und schließlich zu einer vollkommenen Fusion von Vesikel und präsynaptischer Membran (Vrljic et al. 2010). Bei Säugetieren gibt es insgesamt 16 Isoformen in der Synaptotagminfamilie, die sich an Hand ihrer Kinetik in drei Gruppen unterteilen lassen. Die Synaptotagmine 1, 2 und 3 gehören zur

„schnellen Gruppe“, die Isoformen 5, 6, 9 und 10 zur „mittleren Gruppe“ und Synaptotagmin 7 repräsentiert die „langsame Gruppe“. Synaptotagmin 6 als Vertreter der mittleren Gruppe ist auf Grund seiner langsameren Kinetik dazu in der Lage, eine verspätete oder asynchrone Transmitterausschüttung 10-100msec nach Kollaps der Ca2+ Domäne zu gewährleisten (Hui et al. 2012).

2. Material und Methode

2.1 Versuchstiere

2.1.1 Tierhaltung

Alle Tierversuche wurden gemäß den Vorgaben der Tierversuchsanlage der Kliniken der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf durchgeführt und vor Beginn der Versuchsreihe nach §8 Abs.1 des Tierschutzgesetzes durch das Landesamt für Natur, Umwelt- und Verbraucherschutz NRW, Recklinghausen (Aktenzeichen 9.93.2.10.34.07.227) durchgeführt. Die Fütterungsversuche fanden in den Räumen der Tierversuchsanlage der Heinrich-Heine-Universität statt und wurden von Mitarbeitern des Forschungslabor Hirnmorphologie und tierexperimentelle Psychoseforschung des LVR Klinikums Düsseldorf durchgeführt. Untersucht wurden 30 männliche Sprague Dawley Ratten (Taconic, Dänemark). Diese wurden 21 Tage nach der Geburt von ihrer Mutter getrennt und in Gruppen von 5 Tieren untergebracht. Die Haltung der Versuchstiere erfolgte unter standardisierten Versuchsbedingungen entsprechend der Arbeiten von von Wilmsdorff et al. (2010 und 2013). So betrug der Hell/Dunkel-Rhythmus 12:12 Stunden Licht/Dunkelheit, wobei das Licht von 20.00 Uhr abends bis 08.00 Uhr morgens ausgeschaltet war. Die Kammertemperatur betrug 21 Grad Celsius mit einer Luftfeuchtigkeit von 60%. Die Tiere hatten den ganzen Versuchszeitraum über freien Zugang zu Wasser und erhielten gemahlene Futterpellets mit folgender Zusammensetzung: 89.0 % Trockenmasse, 19.0 % Rohprotein, 4.0 % Rohfett, 6.0 % Rohfaser, 7.5 % Rohasche mit zusätzlich 15 % Fettanteil (Altromin Spezialfutter GmbH, Deutschland).

2.1.2 Verabreichung der Antipsychotika

Mit der Verabreichung der Antipsychotika wurde erst begonnen, als die Tiere ein Alter von drei Monaten erreicht hatten. So konnten hormonelle Auswirkungen der Pubertät vermieden

werden. Der Fütterungsversuch begann in der 13. Lebenswoche und wurde bis zur 25. Woche fortgeführt. Die Ratten wurden in dieser Periode einzeln gehalten und zweimal pro Woche gewogen. Die 30 männlichen Versuchstiere wurden in drei Gruppen aufgeteilt. Einer Gruppe (n=10) wurde das atypische Antipsychotikum Clozapin (Leponex, Novartis, Deutschland) und einer weiteren (n=10) das typische Antipsychotikum Haloperidol (Haloneurol, Hexal, Deutschland) über die gemahlenen Futterpellets verabreicht. Die verbleibenden zehn Tiere dienten als Kontrollgruppe und bekamen gemahlene Futterpellets ohne Zusatz. Durch diese orale Verabreichungsform wurde der Stress für die Tiere minimiert im Gegensatz zu einer täglichen intramuskulären oder intraperitonealen Injektion. Gemäß der Studie von Kapur et al. (2000b), welche besagt, dass die Dosierung bei chronischer Haloperidolgabe in Tierversuchen in der Regel zu niedrig ist, wurde die Höhe der Dosierung von Haloperidol und Clozapin gemäß den Studien von Minet-Ringuet et al. (2006a; 2006b) angepasst. Haloperidol wurde mit einer Dosierung von 1 mg/kg Körpergewicht/Tag verabreicht. Dies entsprach einer mittleren tatsächlichen Dosis von 0,8$\pm$0,003 mg/kg Körpergewicht/Tag. Clozapin wurde in einer Dosis von 20 mg/kg Körpergewicht/Tag gegeben, wobei dies einer mittleren tatsächlichen Dosis von 18,5$\pm$0,26 mg/kg Körpergewicht/Tag entsprach. Hierbei wurde beachtet, dass die Halbwertszeit von Antipsychotika bei Nagetieren um den Faktor vier bis sechs kürzer als beim Menschen ist. In der 25. Woche wurden die Versuchstiere durch Pentobarbital (Narcoren, Merial, Deutschland) narkotisiert und das Blut mittels Aortenpunktion entnommen. Die Gehirne wurden ebenfalls entnommen und sofort über 2-Methylbutan, das mittels flüssigem Stickstoff auf -80°C gekühlt worden war, eingefroren und bei –80°C gelagert. Die Serumspiegel von Clozapin, seinem Metaboliten N-desmethylclozapin und Haloperidol wurden mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) im biochemischen Labor des LVR Klinikums Düsseldorf bestimmt.

2.2 Quantitative Real Time PCR und Luminex-Verfahren

2.2.1 Materialgewinnung

Ziel war es, möglichst exakt Gewebe aus bestimmten Hirnarealen der Versuchstiere zu gewinnen (Abb.5).

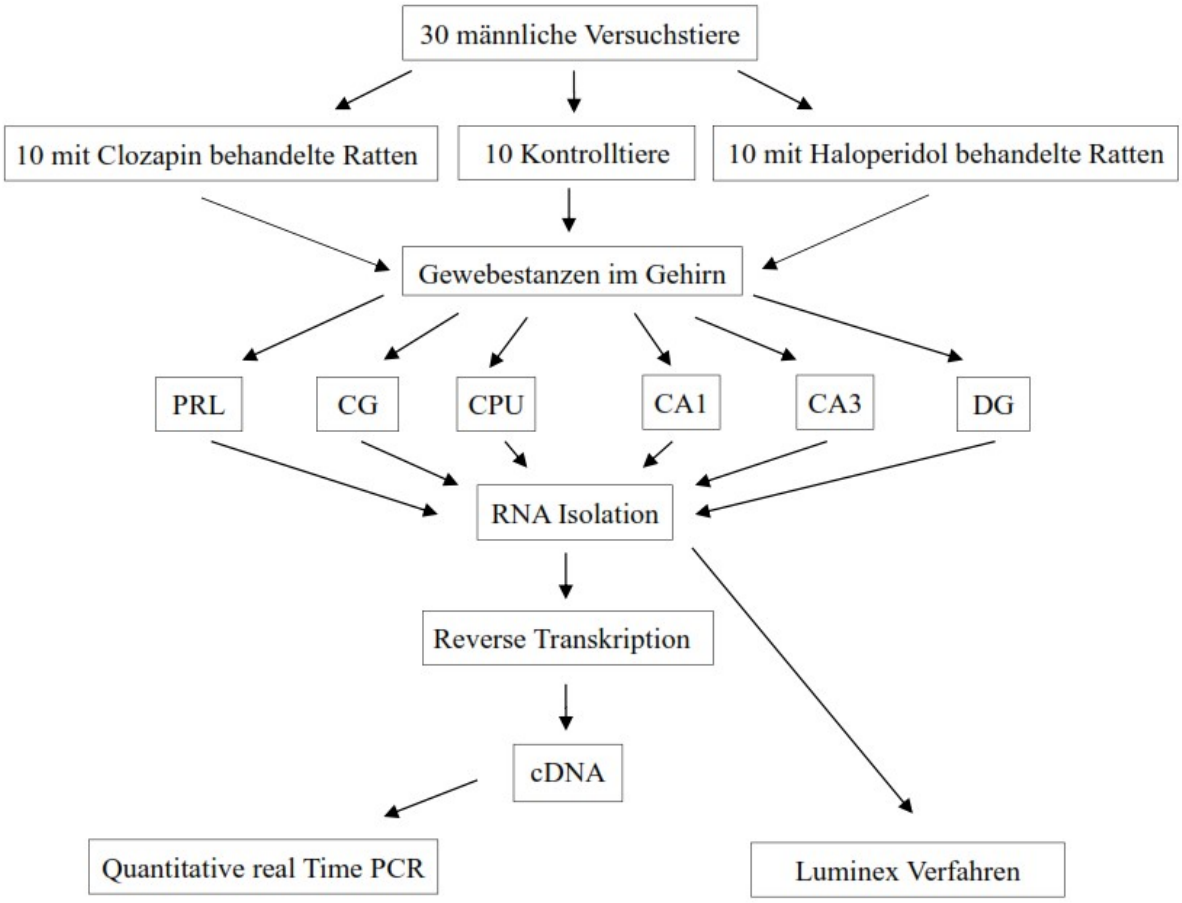


Abb.5: Graphische Übersicht der Versuchsreihe. 30 Versuchstiere wurden in drei Gruppen (n=10) aufgeteilt. Nach der Gewebeentnahme aus verschiedenen Hirnregionen wurde eine Veränderung der Genexpression verschiedener Gene der neuronalen Plastizität mittels qRT-PCR und dem Luminex Verfahren untersucht. PRL – prälimbischer Kortex, CG – Gyrus cinguli, CPU – Caudatus Putamen, CA1 – Cornu Ammonis1, CA3 – Cornu Ammonis3, DG – Gyrus Dentatus, cDNA – *copy* DNA, PCR – *Polymerase Chain Reaction*

Die Probenentnahme erfolgte aus dem prälimbischen Kortex (PRL), dem Gyrus Cinguli (CG), dem Caudatus Putamen (CPU) und dem Hippokampus (CA1, CA3 und DG). Zur Orientierung diente der Rattenhirnatlas von Paxinos and Watson (1999). Vor Beginn der eigentlichen Materialgewinnung erfolgte die Anfertigung einer Schnittserie eines Testhirnes. Bei diesem wurde eine Hirnhälfte in den oben angegebenen Arealen komplett ausgestanzt und die Schnittserie entweder mit Kresylviolett oder *Luxol fast blue* angefärbt. Um das Gewebe exakt aus diesen bestimmten Hirnarealen zu gewinnen, wurde ein spezielles „*Biopsy Punch Set*“ (kai Europe GmbH, Solingen, Deutschland) verwendet (Abb.6). Hierbei handelt es sich um ein Stanzsystem mit Auswurf, welches dazu entwickelt wurde, aus Gewebe schonend und möglichst genau Proben zu gewinnen. Insgesamt standen zwei verschiedene Stanzen mit einem Durchmesser von 1mm und 1,5mm zur Verfügung. Verwendet wurde für das Putamen eine Stanze mit dem Durchmesser 1,5mm, für die übrigen Hirnregionen eine 1,0mm durchmessende Stanze.



Abb.6: Darstellung des *Biopsy Punch Sets* (kai Europe, Solingen, Deutschland). Die Abbildung zeigt die verwendeten Stanzen in unterschiedlichen Größen, zu erkennen an der unterschiedlichen farblichen Markierung der jeweiligen Stanzen (rosa: 1mm, gelb: 1,5mm)

Die Anfertigung der Schnittserien und der Stanzen erfolgte in einem Kryostat (Leica Jung CM 3000, Leica Vertrieb GmbH, Bensheim). Die Schnittdicke betrug 60µm, so dass ein exaktes Ausstanzen mit genauer Identifikation der jeweiligen Hirnregionen möglich war. Die Kammertemperatur lag bei -20 °C und die Objektträgertemperatur bei -15°C. Das zuvor bei -80°C eingefrorene Rattenhirn wurde zunächst im Kryostaten für etwa eine halbe Stunde bei -20°C gelagert und auf dem Probenträger des Kryostaten mit *Cryo Glue* (*Slee medical* GmbH, Mainz) fixiert. Nach Anfertigung eines 60µm dicken Hirnschnitts wurde dieser mit einem Pinsel auf einen auf -20°C gekühlten Superfrost plus-Objektträger (Menzel Glas, Monheim, Deutschland) gezogen. Hier wurde das entsprechende Areal der linken Hirnhemisphäre identifiziert und ausgestanzt. Die Stanzproben wurden dann in gekühlte Mikroreaktionsgefäße ausgeworfen. Das so gewonnene Material wurde dann wieder umgehend bei -80 Grad Celsius eingefroren. Während der Arbeit wurde stets darauf geachtet, dass die Kühlkette nicht unterbrochen wurde.

2.2.2 Darstellung der Stanzen

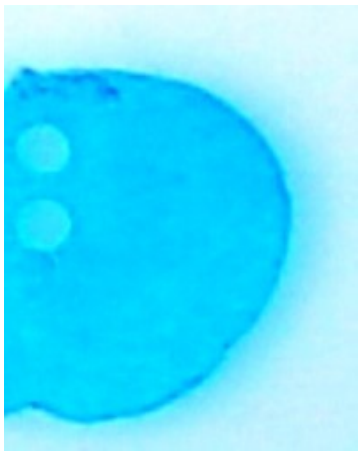
Abbildung 7 a-f gibt eine Übersicht über die Materialgewinnung aus den Rattenhirnen. Die Abbildung i. stammt aus dem Rattenhirnatlas von Paxinos and Watson (1999) und dient der Orientierung. Die beiden folgenden Abbildungen zeigen Schnitte der ausgestanzten Gehirnareale von unbehandelten Rattenhirnen, welche zur besseren Darstellung ii. mit *Luxol fast blue*-Färbung (4fach vergrößert) und iii. mit Kresylviolett-Färbung (10fache Vergrößerung) angefärbt wurden.

a. Prälimbischer Kortex (PRL)

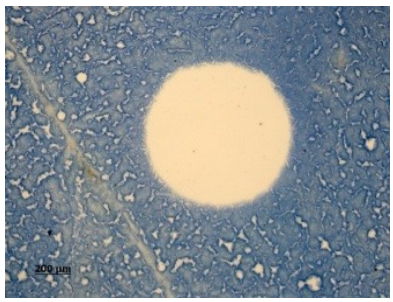
i.



ii.



iii.

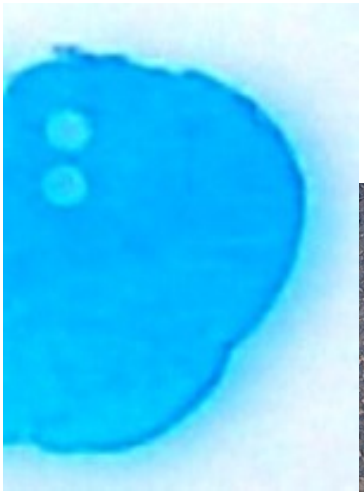


b. Gyrus Cinguli (CG)

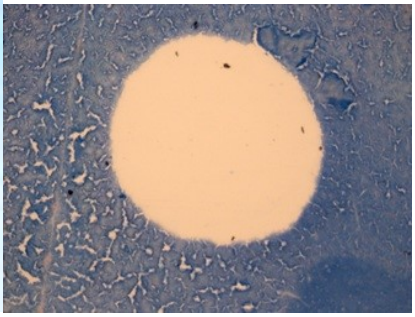
i.



ii.

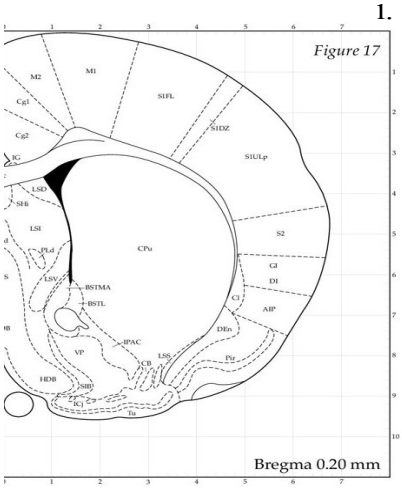


iii.



c. Caudatus Putamen (CPU)

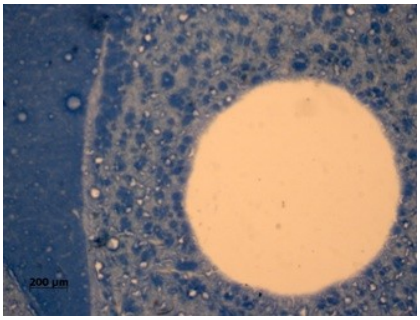
i.



ii.

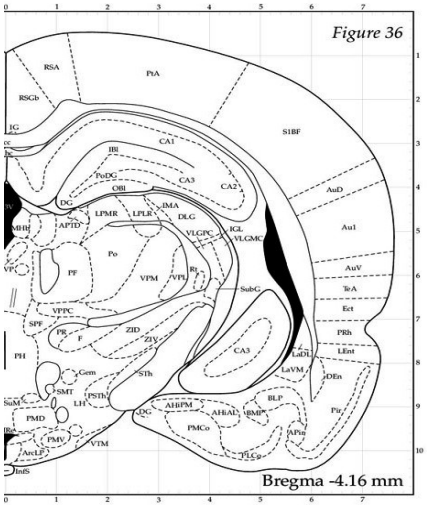


iii.



d. Gyrus Dentatus (DG)

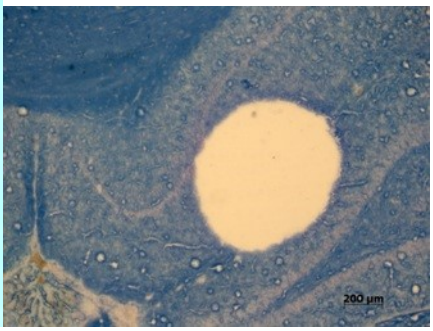
i.



ii.

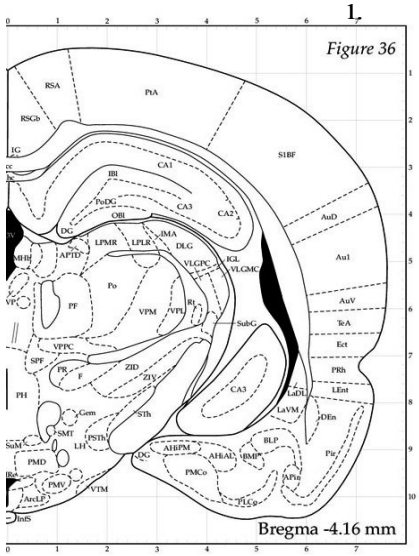


iii.

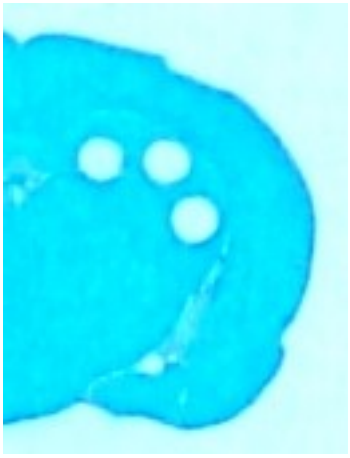


e. Cornu Ammonis 1 (CA1)

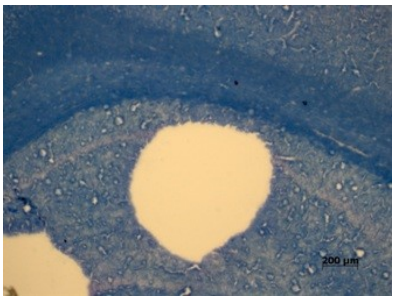
i.



ii.

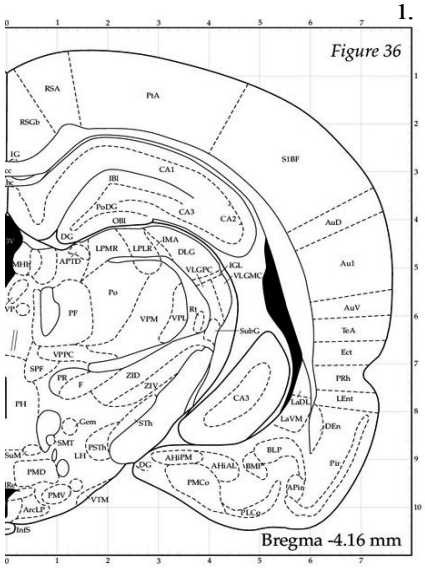


iii.



f. Cornu Ammonis 3 (CA3)

i.



ii.



iii.

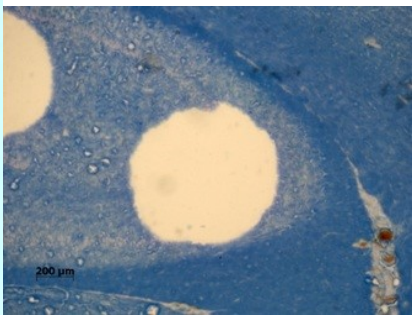


Abb.7a-f: Bildliche Darstellung der Stanzproben. Gezeigt wird exemplarisch eine Stanzprobe aus den jeweiligen untersuchten Hirnarealen der linken Hemisphäre des Rattenhirns. i. zeigt die Übersicht aus dem Rattenhirnatlas von Paxinos und Watson (1999). ii. zeigt die 4fache Vergrößerung des Schnittes mit *Luxol fast blue*-Färbung. iii. zeigt die 10fache Vergrößerung des Schnittes mit Kresylviolett-Färbung.

2.2.3 Aufbau der DNA

DNA (*Desoxyribonucleic acid*) ist eine polymere Verbindung, die aus Nukleotiden aufgebaut ist. Ein Nukleotid besteht aus einer stickstoffhaltigen, heterozyklischen Base, deren chemische Struktur einem Purin- oder Pyrimidinderivat entspricht, einer Pentose, sowie einem oder mehrerer Phosphatresten. Bei der DNA werden insgesamt vier Basen unterschieden: Die Purinbasen Adenin (A) und Guanin (G), so wie die Pyrimidinbasen Cytosin (C) und Thymin (T). Grundlage eines DNA Einzelstrangs ist eine Phosphorsäuredieesterbindung zwischen zwei Basen. Hierbei ist das 5'-C-Atom einer Ribose über ein Phosphat mit dem 3'-C-Atom der nächsten Ribose verbunden. Die Nukleotidpolymere lagern sich komplementär zueinander in Form eines Doppelstrangs an. Die Basen des Nukleotids liegen innen, Pentose und Phosphatrest kommen nach außen zum Liegen. Grundlage des DNA-Doppelstrangs sind Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den polaren Gruppen der Basen, so dass die komplementären Basen Thymin und Adenin, über zwei Wasserstoffbrücken und Guanin und Cytosin über drei Wasserstoffbrücken miteinander verbunden sind. Die beiden Einzelstränge besitzen eine Polarität und verlaufen in entgegengesetzter Richtung, d.h. an dem Ende, an dem der eine Strang sein 5'-Phosphatende hat, befindet sich das 3'-OH-Ende des anderen Stranges. Die DNA liegt jedoch nicht in einer linearen Struktur im Zellkern vor, sondern in Form einer Doppelhelix. Grundlage hierfür sind die Wasserstoffbrücken der Basen, die Hydrophilie des DNA-Rückgrats und besonders die Wechselwirkungen zwischen den Basenstapeln. Hierbei handelt es sich um Dipol-Wechselwirkungen zwischen den aromatischen Ringsystemen der heterozyklischen Basen. Sie tragen wesentlich stärker zur Stabilität der Tertiärstruktur der DNA bei als die Wasserstoffbrückenbindungen (Yakovchuk et al. 2006). Ein DNA-Doppelstrang lässt sich durch thermische Denaturierung in zwei voneinander getrennte Einzelstränge aufspalten. Der Schmelzpunkt der DNA hängt vor allem vom Guanin-Cytosin Gehalt ab, da GC-Stapel energetisch günstiger sind als AT-Stapel (De Ley 1970). Insgesamt existieren drei Strukturkonfirmationen der DNA, die A-, B- und Z-DNA, wobei die B-DNA in vivo am häufigsten vertreten ist.

2.2.4 Aufbau der RNA

Die Grundstruktur der RNA (*Ribonucleic acid*) entspricht der DNA. Jedoch ist die Base Thymin, gegen die RNA spezifische Base Uracil (U) ausgetauscht und anstatt einer Desoxyribose enthält die RNA eine Ribose. Im Gegensatz zur DNA liegt die RNA in den Zellen weitestgehend als stark gefalteter Einzelstrang vor. RNA-Moleküle erfüllen im Organismus verschiedene Aufgaben, wie z.B. die Übersetzung genetischer Informationen in Proteine. Es existieren unterschiedliche Arten von RNA-Molekülen, die generell in nicht-codierende und codierende RNAs eingeteilt werden können (Brosius und Tiedge, 2004). Abbildung 8 zeigt eine Übersicht.

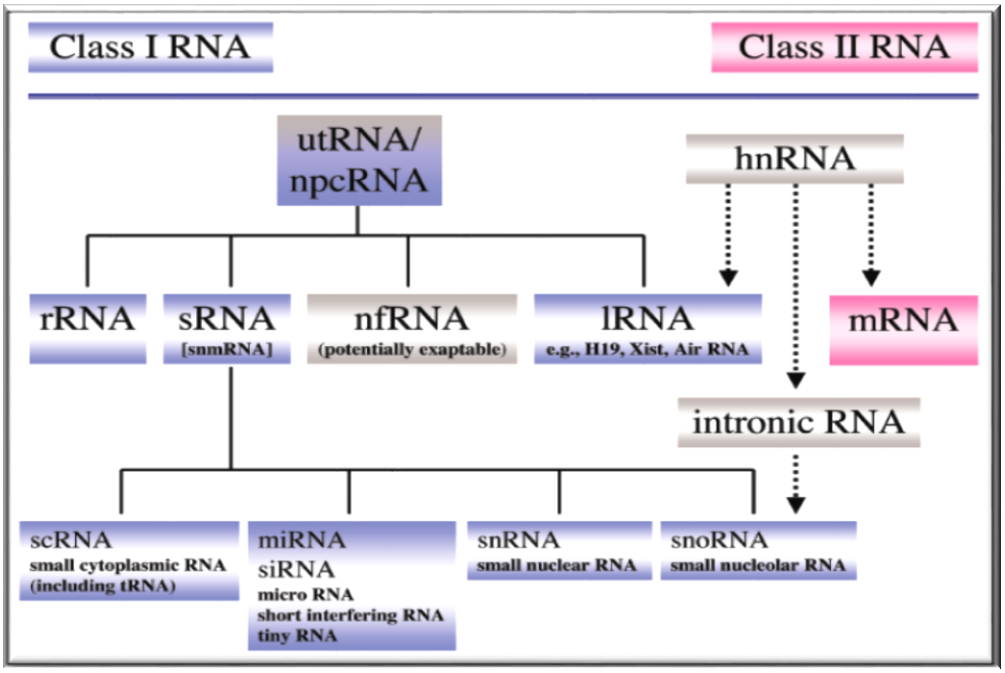


Abb.8: Übersicht über die verschiedenen RNA Moleküle (aus Brosius und Tiedge, 2004). Ut/npcRNA – *untranslated/non-protein coding* RNA, rRNA – ribosomale RNA, sRNA – *small* RNA, nfRNA – *non-functional* RNA, scRNA – *small cytoplasmic* RNA, miRNA – *micro* RNA, siRNA – *small interfering* RNA, snRNA – *small nuclear* RNA, snoRNA – *small nucleolar* RNA, hnRNA – *hetergeneous* RNA, lRNA – *large* RNA, mRNA – *messenger* RNA.

Zu den nicht-codierenden RNAs gehören u.a. Transfer-RNAs (tRNAs) und ribosomale RNAs (rRNAs), die beide an der Proteinbiosynthese beteiligt sind. Die rRNA macht mit etwa 80% den größten Anteil an der Gesamtmenge der RNA aus. Die mRNA (*messenger* RNA) repräsentiert hauptsächlich die Klasse der codierenden RNAs. Sie ist das RNA-Transkript eines bestimmten Teilabschnitts der DNA (Gen) und codiert für ein Protein. Auf der Ebene der DNA und prä-mRNA liegt die Information des Gens noch in Form von Introns (nicht codierende Bereiche) und Exons (codierende Bereiche) vor. Die Exons machen hierbei mit etwa 2% nur einen geringen Anteil des gesamten humanen Genoms aus (Mattick und Makunin, 2006). Die Introns hingegen liegen in einer deutlich höheren Anzahl vor und sind in ihrer

Nukleotidsequenz wesentlich länger, mit einer maximalen Nukleotidanzahl von mehr als 30.000 (*International Human Genome Sequencing Consortium*, 2001). Bei der Synthese der mRNA werden die Introns jedoch aus der prä-mRNA herausgeschnitten, dem sogenannten *Splicing*, so dass die mRNA nur aus codierenden Bereichen besteht.

2.2.5 RNA-Isolierung

2.2.5.1 Theoretische Grundlage

Die Grundproblematik der RNA-Isolierung aus Gewebe besteht in der Notwendigkeit einer möglichst frühzeitigen Inaktivierung der Ribonukleasen (RNase). RNasen sind Enzyme, die am Abbau der RNA beteiligt sind. Sie katalysieren die hydrolytische Spaltung der Phosphorsäuredieesterbindungen zur Ribose eines Nukleotids und spalten so RNA-Stränge in Einzelnukleotide auf. RNasen sind sehr stabil und benötigen im Gegensatz zur Desoxyribonuklease keinen Cofaktor, wie z.B. Mg^{2+}, um katalytische Aktivität zu zeigen. Sie kommen in jedem Organismus ubiquitär als Bestandteil jeder Zelle vor und werden u.a. über den Schweiß ausgeschieden. Auf Grund dessen ist bei der Arbeit mit RNA stets darauf zu achten, möglichst sauber zu arbeiten, um einer Kontamination der Proben mit RNase entgegen zu wirken. Hierzu ist das Tragen von Handschuhen obligat, wie auch die Verwendung von RNase-freien Materialien zur Gewebeaufbereitung. Zur Isolierung von RNA aus Geweben existieren verschiedene Methoden und es stehen eine Vielzahl von fertigen *Kits* verschiedener Firmen zur Verfügung. Grundprinzip aller Methoden ist es, die Zellen zu lysieren, RNase zu inaktivieren und die RNA von zellulären Bestandteilen zu trennen. Zur RNA-Isolierung wurde in der vorliegenden Arbeit *Trizol Reagent* (*Life Technologies*, Darmstadt, Deutschland) verwendet, basierend auf der *Single-Step* Methode von Chomczynski und Sacchi (1987). Trizol enthält Phenol und Guanidinthiocyanat. Letzteres ist eine chaotrope Verbindung, welche eine Zelllyse, sowie nahezu gleichzeitig eine Inaktivierung der RNase bewirkt. Die Zugabe von Phenol, ein hydroxysubstituiertes Benzol und somit eine schwache Säure, bewirkt eine Lösung nicht nur von Proteinen, sondern auch von kleineren DNA-Fragmenten. Da die Deaktivierung der RNase sofort nach der der Zelllyse stattfindet, ist dieses Verfahren sehr stabil und liefert in der Regel qualitativ hochwertige RNA Produkte. Um eine bessere Barriere zwischen wässriger und organischer Phase zu erreichen, wurden spezielle *Eppendorf Phase Lock Gel Tubes* verwendet. Die RNA-Aufreinigung und -Konzentration wurde mit dem *RNeasy® MinElute™ Cleanup Kit* (Quiagen GmbH, Hilden, Deutschland) nach Herstellerprotokoll durchgeführt. Die genauen Inhalte des Kits werden vom Hersteller nicht dokumentiert, eine Übersicht liefert Tabelle 6. Bei diesem Verfahren wird eine Kieselgelmembran verwendet, die RNA-Moleküle

ab einer Größe von 200 Nukleotiden bindet. So findet vor allem eine Konzentration der mRNA statt, da viele rRNAs und tRNAs aufgrund ihrer kleineren Nukleotidsequenz selektiv herausgefiltert werden.

Material	Anzahl/Menge
RNeasy MinElute Spin Columns	50
Sammeltubes (1,5ml)	50
Sammeltubes (2,0 ml)	100
RLT Puffer	45ml
RPE Puffer	1ml
Rnase-freies H20	10ml

Tabelle 6: Zusammensetzung des *RNeasy® MinElute™ Cleanup Kit* (Quiagen GmbH, Hilden, Deutschland).

2.2.5.2 Praktische Anwendung

Der erste Arbeitsschritt bei der RNA-Isolierung ist die Homogenisierung des Gewebes. Das bei -80°C eingefrorene ausgestanzte Hirngewebe wurde jeweils mit 1ml *Trizol Reagent* versetzt. Um einen Zerfall der RNA zu verhindern, wurde dieser Arbeitsschritt auf Trockeneis bei 4°C durchgeführt. Die Suspension wurde dann mit einer Kanüle (20 Gauge) 30mal titriert. Nach einer Wiederholung dieses Vorgangs mit einer 22 Gauge-Kanüle erfolgte eine zehnminütige Inkubation bei Raumtemperatur. Den zweiten Schritt in der RNA-Isolierung stellt die Phasenseparation dar. Hierfür wurden 200 µl Chloroform zum Homogenat gegeben und es erfolgte ein intensives Vortexen des Gemisches für 30 Sekunden. Chloroform bewirkt eine Denaturierung der im Homogenat enthaltenden Proteine und auf Grund seiner hohen Dichte eine bessere und schnellere Trennung der organischen von der wässrigen Phase. Das Gemisch wurde dann in ein *Phase Lock Gel Heavy T*ube gegeben und für 15 Minuten bei 4°C bei 12000 g zentrifugiert. Als Ergebnis waren in dem Reaktionsgefäß nun drei unterschiedliche Phasen zu erkennen: Eine obere wässrige RNA enthaltende Phase, eine Interphase mit DNA, sowie die untere Chloroformphase mit Proteinen. In einem dritten Arbeitsschritt erfolgte nun die RNA-Präzipitation. Die wässrige obere Phase wurde in 100 µl Schritten in ein neues, RNase freies Reaktionsgefäß bis zu einer Gesamtmenge von 500 µl pipettiert. Dann wurde 1 ml vol 70 % Ethanol hinzugefügt und 30 Sekunden gevortext. Ethanol führt hierbei zu einem Wasserentzug an den hydratisierten Molekülen der RNA, so dass diese ausfällt. Der letzte Arbeitsschritt bestand in der RNA-Aufreinigung mittels dem *RNeasy® MinElute™ Cleanup Kit* (Quiagen,

Hilden, Deutschland). 700 µl des Lysats wurden zu der *Quiagen Rneasy MinElute Spin Column* in einem 2 ml Sammeltube pipettiert und bei 8000 g für 15 Sekunden zentrifugiert. Das Filtrat wurde verworfen und 700 µl des RW1-Puffers erneut auf die Säule gegeben. Nach einer erneuten Zentrifugation bei 8000 g für 15 Sekunden und Entsorgung des gebildeten Filtrats wurde die Säule in ein neues 2 ml Sammelgefäß überführt. Dann wurden 500 µl des RPE-Puffers zur Säule pipettiert und bei 8000 g für 15 Sekunden zentrifugiert. Das Gemisch wurde als nächstes mit 500µl 80 % Ethanol versetzt und für zwei Minuten bei 8000 g zentrifugiert. Der Durchfluss wurde entfernt, das Sammelgefäß ausgetauscht und das Spin Column erneut für fünf Minuten bei voller Geschwindigkeit zentrifugiert, um das restliche Ethanol zu entfernen. Nach Übertragung der Säule in ein neues 1,5 ml Sammelgefäß wurden 14 µl Rnase freies Wasser direkt auf die Kieselgelmembran appliziert und fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Dann erfolgte eine erneute Zentrifugation bei voller Geschwindigkeit für eine Minute und eine Wiederholung des Arbeitsschrittes mit der Hinzugabe von 9,5µl RNase freiem H_2O. Die so gewonnene RNA wurde dann bei -70 °C eingefroren.

2.2.6 RNA-Konzentrationsbestimmung

2.2.6.1 Photometrische Messung mittels Nanodrop

2.2.6.1.1 Theoretische Grundlage

Die photometrische Messung durch das Nanodrop 1000 Spectrophotometer (Peqlab, Erlangen, Deutschland) dient der Konzentrationsbestimmung der isolierten RNA-Proben. Hiermit ist es möglich, RNA-Konzentrationen von 2ng/µl bis zu 3000ng/µl zu detektieren. Außerdem lässt sich eine Verunreinigung der Proben durch andere organische Materialien ausschließen. Die optische Dichte (OD), also das Absoprtionsmaximum von Nukleinsäuren liegt bei einer Wellenlänge von λ= 260nm. Ein Wert von OD260 = 1 entspricht einer Konzentration von 37µl/ml RNA in der gemessenen Probe. Hieraus resultiert unter Berücksichtigung der Verdünnung folgende Formel zur Berechnung der RNA Konzentration:

Konzentration [µg/ml] = OD260 × 37 µg/ml × Verdünnungsfaktor

Zur Beurteilung der Reinheit einer RNA-Probe existieren die 260/280 und die 260/230 Ratio. Potenzielle Kontaminationsquellen einer RNA-Probe sind im Allgemeinen Proteine, deren OD λ = 280 nm beträgt. Der Quotient aus OD 260/ OD280 sollte bei reiner DNA bei etwa 1,8, bei reiner RNA bei 2,0 liegen. RNA hat eine höhere 260/280 Ratio als DNA, da die in RNA enthaltende Base Uracil eine höhere Ratio als die DNA spezifische Base Thymin besitzt. Ist der

Quotient kleiner als die oben angegebenen Werte, spricht dies für eine Verunreinigung der Probe mit Proteinen oder anderen Substanzen, die ihr Absorptionsmaximum bei einer Wellenlänge von λ = 280 nm erreichen. Die 260/230 Ratio dient ebenfalls der Bestimmung des Reinheitsgrades einer RNA-Probe. Der Quotient sollte für Nukleinsäuren bei 2,0-2,2. liegen. Ist dieser niedriger, spricht dies für eine Kontamination der Probe mit Substanzen mit einer OD bei λ = 230 nm. Beispielhaft sei auch das in dieser Arbeit verwendete *Triazol Reagent* zu nennen mit einem biphasischem Absorptionsmaximum bei 230 und 260 nm.

2.2.6.1.2 Praktische Anwendung

Bei der Verwendung des Nanodrop 1000 Spectrophotometers genügt 1 µl RNA-Lösung für die Messung. Diese wurde auf den unteren Messsockel des Probenarms pipettiert. Nach Verschluss des Probenarms und Starten der *Software* wurde die photometrische Messung automatisch durchgeführt und die Ergebnisse samt graphischer Darstellung ausgewertet. Abbildung 9 zeigt die beispielhafte graphische Darstellung einer DNA-Probe.

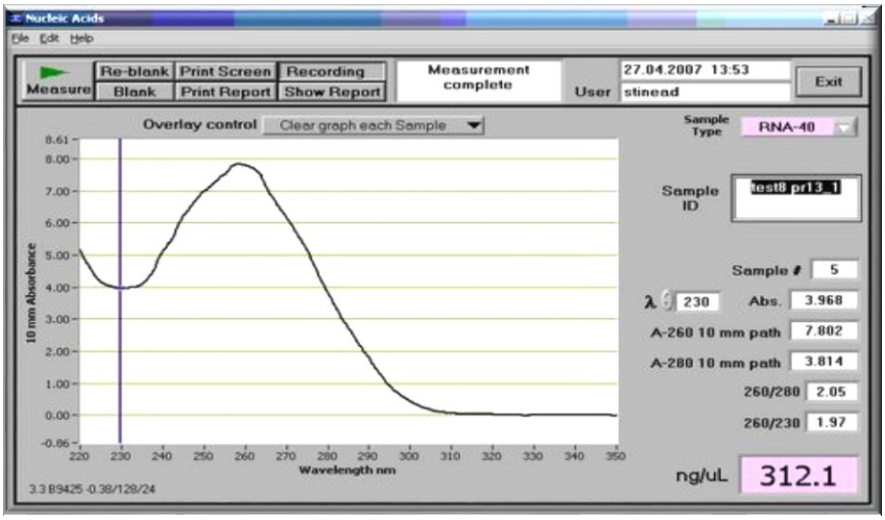


Abb.9: Photometrische Messung. Beispielhafte Darstellung einer Messung einer DNA Probe durch das Nanodrop 1000 Spectrophotometer mit einem für DNA typischen Absorptionsmaximum bei 260nm

2.2.6.2 RNA-Qualitätskontrolle mittels Agilent 2100 Bioanalyzer

2.2.6.2.1 Theoretische Grundlage

Eine weitere Qualitätskontrolle der isolierten RNA wurde mit dem *Agilent 2100 Bioanalyzer* (*Agilent Technologies*, Santa Clara, USA) durchgeführt. Dieses Verfahren basiert auf der *Lab-on-a-chip*-Technologie und kombiniert die Methodik der Kapillarelektrophorese mit einer Laserdetektion mittels Fluoreszenzfarbstoff. Die graphische Darstellung der Ergebnisse erfolgt in Form Gel-ähnlicher Banden und Elektropherogramme (Abb.10 und 11). Darüber hinaus wird

die in der Probe enthaltende RNA Konzentration, das 28s:18s Verhältnis sowie die RNA *Integrity Number* (RIN) angegeben. Der RIN Wert ist ein Maß für die Qualität der RNA, wobei ein RIN Wert von 10 einer optimalen RNA-Qualität und ein Wert von 0 einer kompletten RNA-Degradation entspricht. Bei der klassischen Qualitätsmessung der RNA mittels Gelelektrophorese erfolgt die Wertung der Qualität einzig durch die Betrachtung des Verhältnisses der 28S und 18S Untereinheiten der ribosomalen RNA. Eine 28S/18S rRNA-Ratio von ≥ 2 entspricht hierbei einer hohen RNA Qualität. Diese Methode ist jedoch sehr subjektiv und zeigt Ungenauigkeiten in der Reproduzierbarkeit der Ergebnisse (Imbeaud et al. 2005). Im RIN-Algorithmus ist hingegen, neben der 28S/18S Ration, eine Beurteilung des gesamten Elektropherogramms enthalten. Des Weiteren ist der RIN-Wert durch die maschinelle Standardisierung unabhängig vom Durchführenden und somit besser vergleichbar. Bei der Verwendung des *Agilent 2100 Bioanalyzers* wird die zu untersuchende RNA in das Probengefäß des Mikrochips pipettiert. Dann erfolgt das Anlegen eines elektrischen Feldes. Die Proben werden elektrophoretisch in einem Separationskanal aufgetrennt und wandern in die im Chip enthaltene Mikrokapillare. Die Detektion erfolgt mittels dem in den Mikrokapillaren eingelagertem Fluoreszenzfarbstoff *PicoGreen*, der mit der RNA interkaliert. Die Ergebnisse werden dann digital erfasst und wie beschrieben graphisch dargestellt.

2.2.6.2.2 Praktische Anwendung

1µl der RNA wurde mit 9 µl Aqua dest. verdünnt, auf den nach Herstellerprotokoll vorbereiteten Chip gegeben und mittels Agilent 2100 Bioanalyzer untersucht und ausgewertet. Verwendet wurden insgesamt 15 Mikrochips, die jeweils mit maximal elf Proben beladen wurden. Als untere Qualitätsgrenze für die RNA wurde ein RIN-Wert von ≥7,5 definiert.

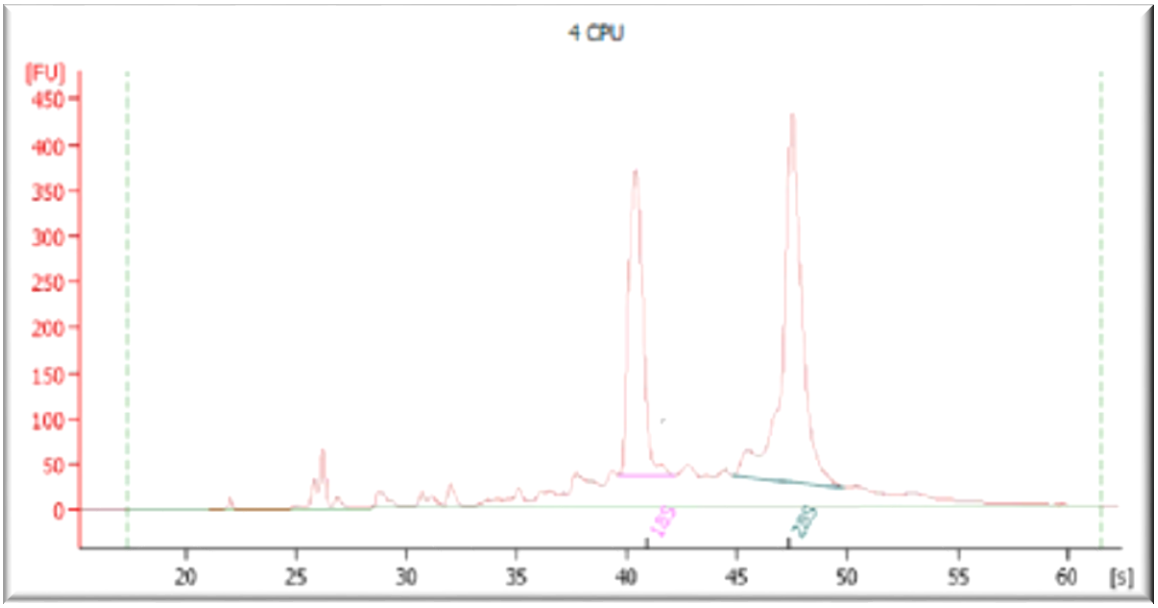


Abb. 10: Beispielhafte Darstellung des Elektropherogramms der Probe 4 CPU

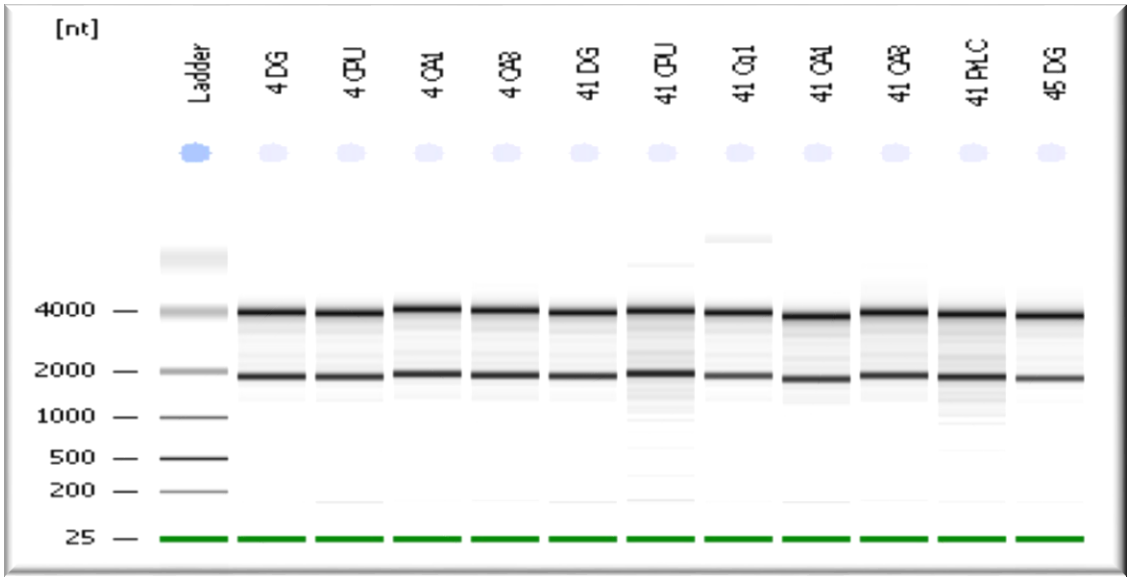


Abb.11: Darstellung der Gel-ähnlichen Banden von Proben aus unterschiedlichen Hirnarealen

2.2.7 Reverse Transkription

2.2.7.1 Theoretische Grundlage

Für die Durchführung der quantitativen *Real-Time-PCR* (qRT-PCR) muss die isolierte RNA zunächst in cDNA *(complementary- oder copy-DNA*) umgeschrieben werden. Hierfür wird das aus Retroviren isolierte Enzym Reverse Transkriptase (RT) verwendet. Dieses besitzt zwei essentielle Aktivitäten. Als RNA-abhängige DNA-Polymerase katalysiert es, ausgehend von

einem RNA-Einzelstrang, zunächst die Synthese eines DNA/RNA-Hybridstranges. Der RNA-Anteil wird dann durch die RNase-H-Aktivität der RT abgespalten, so dass ein komplementärer DNA-Einzelstrang entsteht (Schultz und Champoux, 2008). Danach kann die Synthese eines DNA-Doppelstranges erfolgen. Es existieren verschiedene Reverse Transkriptasen, die aus unterschiedlichen Retroviren isoliert wurden. Grundproblem vieler RTs ist eine zu hohe intrinsische RNase-H-Aktivität. Diese führt bei der reversen Transkription zu einem hohen Verlust der RNA und somit zu kürzeren cDNA Produkten. Um an die RNA binden zu können, benötigt die RT *Primer*. Bei der reversen Transkription in vitro kommen in der Regel zwei unterschiedliche *Primer*sorten zur Anwendung. So existieren Oligo-Desoxythymidintriphosphat (Oligo-dT) *Primer*, die spezifisch an das 3'Poly A-Schwanzende der mRNA binden. mRNAs sind jedoch zu lang, als dass sie von einer RT komplett in eine cDNA umgeschrieben werden können, so dass die Synthese häufig vor dem 5'Ende der mRNA abgebrochen wird. Hier liegen jedoch häufig die proteincodierenden Bereiche, die dann nicht in cDNA umgesetzt werden. Als eine weitere Möglichkeit existieren *Random Primer*, sechs Basenpaar lange Oligonukleotide. Diese binden zufällig ubiquitär an die mRNA. Auf diese Weise wird gewährleistet, dass auch die hinteren mRNA-Abschnitte in cDNA umgesetzt werden. Die entstandenen cDNA Sequenzen sind dann jedoch kürzer, als bei der Verwendung von *Oligo-dT-Primern*.

2.2.7.2 Praktische Anwendung

Für die Durchführung der reversen Transkription wurde der *High Capacity RNA-to-cDNA Master Mix* (*Life Technologies*, Darmstadt, Deutschland) verwendet und nach dem Herstellerprotokoll vorgegangen. Tabelle 7 gibt eine Übersicht über die in dem Master Mix enthaltenen Komponenten.

High Capacity RNA-to-cDNA Master Mix
$MgCl_2$
DNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)
Rekombinanter RNase Inhibitor
Random Primer
Oligo-dT-Primer
Reverse Transkriptase
Stabilisatoren

Tabelle 7: Übersicht über den Inhalt des *High Capacity RNA-to-cDNA Master Mix*

Bei der verwendeten RT handelt es sich um die MMLV (*Moloney Murine Leukemia Virus*) RT. Diese besitzt im Vergleich zu anderen RTs eine geringere RNase-H-Aktivität und führt so zu

qualitativ hochwertigeren cDNA-Produkten. Durch die Kombination von sowohl *Oligo-dT-Primern*, als auch *Random Primern* wird ein nahezu komplettes Umlesen der mRNA in cDNA gewährleistet. Der *Master Mix* wurde zunächst nach Protokoll vorbereitet und dann mit einem Anteil von 4µl mit der RNA und RNase- und Dnase-freiem-Aqua dest auf einen Reaktionsansatz mit insgesamt 20 µl pipettiert. Das Reaktionsgemisch wurde nach einer kurzen Zentrifugation zunächst auf Eis gelagert. Die eigentliche Reaktion der reversen Transkription fand in einem *Thermocycler* statt. Dieser wurde wie folgt programmiert (Tabelle 8).

	Schritt 1	**Schritt 2**	**Schritt 3**	**Schritt 4**
Temperatur (Grad Celsius)	25	42	85	85
Zeit (Minuten)	5	30	5	5

Tabelle 8: Übersicht über die Programmierung *des Thermocyclers* für die reverse Transkription

Auf diese Weise konnten jeweils 100 ng der zuvor isolierten RNA in cDNA umgeschrieben werden. Die cDNA wurde dann in einem 1:5 Verhältnis mit Rnase-DNase freiem Aqua dest verdünnt und bei -20 Grad Celsius eingelagert.

2.2.8 Auswahl der Zielgene und *Primer*

Bei der Auswahl der *Primer* wurde das im Internet frei zugängliche Programm *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) verwendet. Bei den *Primern* handelt es sich um synthetisch hergestellte Oligonukleotide, mit einer Länge zwischen 20 bis 30 Basenpaaren. Für die Durchführung der qRT-PCR bedarf es eines *Forward*- und eines *Backward*-Primers, die zur jeweils gesuchten cDNA-Nukleotidsequenz komplentär sind. Um eine möglichst große Amplifikationseffizienz bei der qRT-PCR zu erreichen, gilt es bei der Auswahl der Nukleotidsequenzen der *Primer* Folgendes zu beachten: Die *Primer* sollten eine geringe Komplementarität an ihrem 3'-Ende besitzen, um so einer *Primer*hybridisierung und damit der Bildung von *Primer*dimeren vorzubeugen. Des Weiteren muss die Nukleotidsequenz des *Primers* so ausgewählt werden, dass es nicht zur Ausbildung interner Sekundärstrukturen kommt, sogenannter *Hairpins*. Auch sollten die unterschiedlichen *Primer* eine relativ ähnliche Schmelztemperatur haben. Tabelle 9 zeigt die untersuchten Gene und die zugehörigen *Primer*. Als interne Kontrolle der Ergebnisse der qRT-PCR dienten *Housekeeping*-Gene. Diese kommen ubiquitär und stark exprimiert in allen Zellen vor. Ihre Expression ist unabhängig vom Alter des Organismus und wird nicht durch die Behandlung durch Externas beeinflusst, so dass ihre Konzentration in den mit Clozapin und Haloperidol behandelten Ratten und der

Kontrollgruppe gleich ist (Thellin et al. 1999). Tabelle 10 gibt eine Übersicht der verwendeten *Housekeeping*-Gene, die in dieser Arbeit untersuchten Gene und die ihnen jeweils zugehörigen *Primern*.

Gen	*Forward-Primer*	*Backward-Primer*
SNAP-25	CTGGAGGAGATGCAGAGGAG	GATTTGGTCCATCCCTTCCT
VAMP-2	ATGTGGACAAGGTCCTGGAG	CTTGGCTGCACTTGTTTCAA
SYP	CAGTGGGTCTTTGCCATCTT	ATCTTGGTAGTGCCCCCTTT
STX1a	GCCCTCAGTGAGATCGAGAC	CACGTAGTCCACAGCGTGTT
STX12	GCAGGACTCAAGCAAACTCC	TAGGGGCAAGGACCCTAACT
SYT-6	CCTATGAGGAGCTGGCTGAC	TTGCTTTGAGATTGCGACAC
BDNF	GCGGCAGATAAAAAGACTGC	GCAGCCTTCCTTCGTGTAAC
BDNF	GCGGCAGATAAAAAGACTGC	GCAGCCTTCCTTCGTGTAAC
DCTN-6	TCATTATCGGCGAAGGAAAC	TCCTGCCTACGTACGCTTTT
LAMC-3	CACATGGATCCTTGCATCAC	TCCAAGTTGTGCTTGTCAGC
COLA4A	CCAGGATTCCAAGGTCAGAA	CCCTGGTTCTCCTTTGATGA

Tabelle 9: Übersicht über die untersuchten Zielgene und ihnen zugehörigen *Primern*. In der linken Spalte werden die untersuchten Zielgene aufgeführt. Die mittlere Spalte zeigt die Basensequenz der jeweiligen *Forward- Primer* und die letzte Spalte die Basensequenz der *Backward-Primer.*

Housekeeping Gene	*Forward-Primer*	*Backward-Primer*
GAPDH	CTCATGACCACAGTCCATGC	TTCAGCTCTGGGATGACCTT
ACTB	GTCGTACCACTGGCATTGTG	TCTCAGCTGTGGTGGTGAAG
RPL-27	GAATTGACCGCTATCCCAGA	CAGTGCTGGGTCTCTGAACA
RPL-l6	AAGTTTGTCATCGCCACCTC	GCTTTCTGATCAGCCTTTCG
HMBS	CTGTGGTAGCGATGCTGAAA	TCCAATGGTAAAGCCAGGAG

Tabelle 10: Übersicht über die verwendeten *Housekeeping-Gene* und ihnen zugehörigen *Primern.* In der linken Spalte werden die verwendeten *Housekeeping*-Gene aufgeführt. Die mittlere Spalte zeigt die Basensequenz der jeweiligen *Forward- Primer* und die letzte Spalte die Basensequenz der *Backward-Primer.* GAPDH - Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase, ACTB – Beta-Actin, RPL-27 - *Ribosomal Protein L27,* RPL-16 – *Ribosomal Protein L16,* HMBS - Hydroxymethylbilan-Synthase

2.2.9 Polymerase-Kettenreaktion

2.2.9.1 Klassische Polymerase-Kettenreaktion

Die PCR (*Polymerase Chain Reaction*) ist eine Methode zur Amplifikation von Nukleinsäuren, mit der es möglich ist, in einer heterogenen Mischung von DNA Sequenzen eine bestimmte DNA Sequenz selektiv zu vermehren. Erstmals entwickelt wurde dieses Verfahren von K.Mullis im Jahr 1983 (Mullis et al. 1986). Zur Durchführung der klassischen PCR benötigt es einer thermostabilen DNA-Polymerase, einer Ausgangs-DNA (*Template*), Nukleotiden, sowie *Primern*. Der Prozess gliedert sich in die drei Arbeitsschritte Denaturierung, *Annealing* und Elongation. Bei der Denaturierung wird die zu amplifizierende DNA zunächst auf 93-95 °C erhitzt, so dass sich die Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den komplementären Basen auftrennen und der DNA-Doppelstrang in zwei Einzelstränge zerfällt. Als zweiter Schritt erfolgt das *Annealing*. Damit eine Hybridisierung der *Primer* mit den DNA-Einzelsträngen erfolgen kann, muss die Temperatur gesenkt werden. Die optimale *Annealing*-Temperatur richtet sich nach dem Cytosin-Guanin-Gehalt des *Primers*, sowie nach dessen Basensequenz. Normalerweise liegt hier die Temperatur bei 50-70 °C, wobei die Renaturierungstemperatur in der Regel 5 °C unter der errechneten Schmelztemperatur der *Primer* liegt. Die Elongation stellt den letzten Abschnitt eines PCR-Zyklus dar. Die DNA-Synthese erfolgt bei etwa 70-75 °C, um eine erneute spontane Anlagerung der zuvor getrennten DNA-Einzelstränge zu verhindern. Die verwendete DNA-Polymerase muss also hitzestabil sein, da sie zum einen bei den oben angegebenen Temperaturen effizient arbeiten muss und zum anderen durch die vorherigen

Denaturierungsschritte nicht beschädigt werden darf. Erstmals isoliert wurde eine Polymerase mit solchen Eigenschaften aus dem in heißen Schwefelquellen lebenden Bakterium Thermus aquaticus, die so genannte Taq-Polymerase mit einem Temperaturoptimum bei etwa 80 °C (Chien et al. 1976). Die *Primer* geben bei der Elongation den zu kopierenden DNA-Abschnitt vor. Nach der Elongation wird eine Verdopplung der Menge an DNA-Molekülen erreicht, so dass man bei 30 Zyklen bis zu einer Billion Kopien eines einzelnen DNA-Moleküls erhält. Abbildung 12 stellt die einzelnen Schritte eines PCR-Zyklus dar. Nach einer exponentiellen Phase der Zunahme der Menge an PCR-Produkten, kommt es zu einer Plateauphase. Ursächlich hierfür ist unter anderem eine Abnahme der Substratkonzentrationen und der Menge funktionsfähiger Polymerasen. Dies führt neben einer verminderten Syntheserate, zu einer vermehrten Herstellung falscher Produkte. Es sollten also immer nur so viele PCR Zyklen durchgeführt werden, bis die Plateauphase erreicht ist.

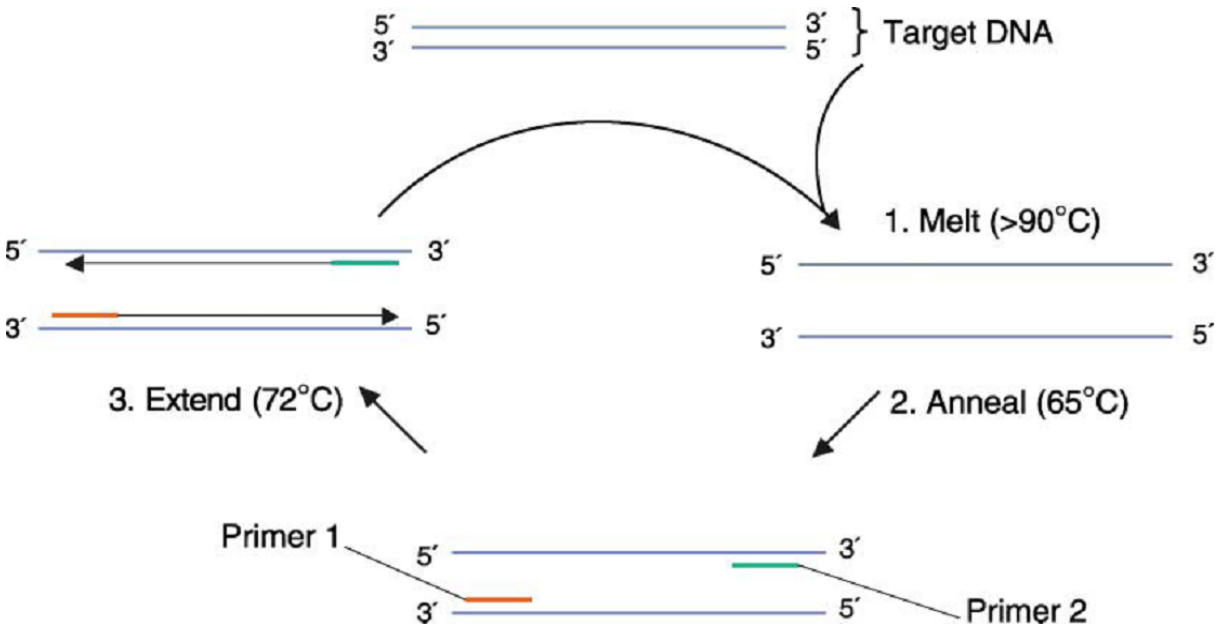


Abb.12: Darstellung der einzelnen Schritte eines PCR Zyklus. Denaturierung (1.), *Annealing* (2.) und Elongation (3.) (Brownstein, 2004).

2.2.10 Quantitative *Real Time PCR*

2.2.10.1 Theoretische Grundlage

Eine Weiterentwicklung der klassischen PCR ist die quantitative *Real Time PCR*. Diese geht über die reine Amplifikation einzelner DNA-Abschnitte hinaus. So ist es möglich, nicht nur eine Aussage darüber zu treffen, ob ein bestimmter DNA-Abschnitt in einer Probe vorhanden ist, sondern auch in welcher Menge (quantitativer Nachweis). Es ist möglich, schon während

den einzelnen PCR Zyklen die quantitative Menge der gesuchten DNA zu bestimmen, so dass man von einer Echtzeit-PCR spricht. Sie basiert auf der Detektion von fluoreszierenden Signalen, die proportional zu der Menge der PCR-Produkte während der Amplifikation erzeugt werden. Erstmals entwickelt wurde dieses Prinzip im Jahr 1992 (Higushi et al. 1993). Der Farbstoff Ethidiumbromid fluoresziert, wenn er in doppelsträgige DNA eingelagert ist. Gibt man einen solchen Farbstoff während der PCR dem DNA-Gemisch hinzu, lässt sich über die detektierte Intensität der Fluorenszenz zu jedem Zeitpunkt der PCR eine Aussage über die Konzentration der amplifizierten DNA treffen. Durch die Weiterentwicklung dieses Verfahrens stehen heute eine Vielzahl solcher interkalierender Fluoreszenzfarbstoffe zur Verfügung, wie z.B. *Pico-Green* oder *SYBR Green.* Letzterer bindet unspezifisch an doppelsträngige DNA und erzeugt unter UV-Licht ein Fluoreszenzsignal. Die Stärke des Signals hängt von der Menge gebundener DNA ab, d.h. es steigt proportional zur Menge der durchgeführten PCR Zyklen. *SYBR Green* erzeugt an doppelsträngiger DNA in gebundener Form ein mehr als 1000fach stärkeres Signal, als wenn es alleine vorliegen würde (Dragan et al. 2012). Nachteilig an dieser Methodik ist die Unspezifität der Bindung des Farbstoffes. Bilden zwei *Primer* beispielsweise ein *Primer*dimer, kommt es auch hier zu einer Farbstoffanlagerung. Ein weiteres Verfahren basiert auf dem Prinzip des *Fluorescence resonance energy transfers* (FRET oder Förster-Resonanzenergietransfer), in dem fluoreszenzmarkierte Oligonukleotide, die als spezifische Hybridisierungssonden fungieren, eingesetzt werden. Hierbei überträgt ein Donor- Fluochrom seine Energie bei Anregung mit UV Licht auf ein Akzeptor-Fluochrom. Nimmt der Abstand zwischen den beiden Fluochromen zu, nimmt auch FRET und damit das Fluoreszenzsignal des Akzeptors ab, wohingegen das des Donors wieder zunimmt. Es existieren verschiedene Verfahren die sich das FRET Prinzip zunutze machen, wie z.B. *Taq Man*Sonden, *LoopTag*-Sonden, *LightCycler*-Sonden oder *Molecular Beacons* (Didenko, 2001). Bei einer generell sehr hohen Spezifität liegt der entscheidende Nachteil in einer sehr aufwendigen Herstellung dieser Sonden. Aus diesem Grund wurde bei dieser Arbeit nach sorgfältiger *Primer*auswahl ein interkalierender Farbstoff verwendet.

2.2.10.2 Praktische Anwendung

Die qRT-PCR wurde mit dem *Applied Biosystem 7900 HT Realtime PCR system* (*Life Technologies*) unter Verwendung des *Power SYBR Green PCR Master Mix* (*Life Technologies*) durchgeführt. Dieser enthält neben Nukleotiden, eine rekombinant modifizierte Taq-Polymerase (AmpliTaq Gold® DNA Polymerase), sowie den Farbstoff *SYBR Green*. Bei der Herstellung der einzelnen Ansätze für die qRT-PCR wurde nach Herstellerprotokoll

vorgegangen und nach folgendem Schema jeweils auf ein Gesamtvolumen von 10,0 µl als Endvolumen pipettiert (Tabelle 11).

Komponente	Volumen [µl]
Power SYBR Green PCR Master Mix	5
Forward Primer (Konzentration: 10µmol/l)	0,4
Backward Primer (Konzentration: 10µmol/l)	0,4
Aqua dest	2,2
cDNA	2
Total	10

Tabelle 11: Reaktionsansatz für die qRT-PCR. Links sind die einzelnen Komponenten aufgelistet, rechts das Volumen in Mikroliter (µl).

Es erfolgte dann ein kurzes Vortexen der Proben, um ein Absinken des *PCR Master Mix* auf Grund seiner höheren Dichte im Reaktionsgefäß zu verhindern. Als nächstes wurden die Proben nach einem zuvor definierten Schema auf 384er-Platten pipettiert und diese dann in das *Applied Biosystem 7900 HT Realtime PCR System* gegeben. Die qRT-PCR Reaktion erfolgte nach folgendem Temperaturprofil in insgesamt 40 Zyklen: Zunächst wurde die Polymerase bei einer Temperatur von 95 °C für zehn Minuten aktiviert. Dann erfolgte eine 15 Sekunden dauernde Denaturierung bei 95 °C, gefolgt von einer *Annealing*- und Elongationsphase bei 60 °C für jeweils eine Minute. Die Detektion des Fluoreszenzsignals erfolgte automatisch nach der Elongationsphase am Ende eines jeden Zyklus. Der *7900 HT Realtime PCR Cycler* verfügt über einen Laser, der das Fluoreszenzsignal anregt. Die Aufzeichnung erfolgt über einen Spektographen und eine CCD (*charge-coupled device*) Kamera. Zur Auswertung der detektierten Fluoreszenzintensitäten wurde die *Applied Biosystem Sequence Detection System* (SDS) *Software Version* 2.2.2 verwendet.

2.2.10.3 Theoretische Grundlage der Auswertung

Als Maß für die DNA-Quantität in einer Probe nach einer durchgeführten qRT-PCR wird der CT-Wert verwendet (*Cycle of Threshold*). Dieser ist definiert als der PCR Zyklus, bei dem das Fluoreszenzsignal einen zuvor festgelegten Schwellenwert überschreitet. Je mehr DNA zu Beginn der PCR-Reaktion vorliegt, desto früher wird der CT-Wert erreicht. Ein Vergleich der CT-Werte zweier Zielgene zeigt jedoch nur, welches der Zielgene im Verhältnis zu dem

anderen stärker exprimiert oder supprimiert wurde. Eine Normalisierung und damit relative Quantifizierung der Ergebnisse erfolgt, in dem die CT-Werte der *Housekeeping*-Gene in Bezug zu denen der Zielgene gesetzt werden. Hierbei ergibt sich der ΔCT-Wert, der wie folgt definiert ist: $\Delta CT = CT_{Zielgen} - CT_{Housekeeping\text{-}Gen}$. Dementsprechend gilt, je höher ΔCT, desto niedriger ist die Expression eines Gens. Eine Weiterführung dieses Prinzips stellt das ΔΔCT Berechnungsmodell dar. Hier wird vom ΔCT Wert der experimentell behandelten Proben der ΔCT Wert der Kontrolle abgezogen ($\Delta\Delta CT = \Delta CT_{behandelte\ Proben} - \Delta CT_{Kontrolle}$). Geht man von einer exponentiellen Vermehrungsrate der DNA-Menge während jedes einzelnen PCR-Zyklus aus, ergibt sich daraus folgende arithmetische Formel: Ratio = 2^–ΔΔCT (Livak et Schmittgen, 2001).

2.2.11 Luminex-Verfahren

2.2.11.1 Theoretische Grundlage

Eine weitere Methode zur Quantifizierung von RNA, neben der qRT-PCR, stellt das auf der Luminextechnologie basierende *QuantiGene Plex 2.0 Assay* (Affimetrix, Santa Clara, USA) dar. Es ermöglicht den quantitativen RNA-Nachweis direkt aus der RNA Probe, ohne dass diese zuvor in cDNA umgeschrieben werden muss. Es ist keine RNA-Aufreinigung oder reverse Transkription nötig, wodurch zusätzliche Arbeitsschritte und damit auch potenzielle Fehlerquellen vermindert werden. Mit dieser Methode ist es möglich, eine Vielzahl von analytischen Parametern in einer einzelnen Probe mit geringem Volumen gleichzeitig zu bestimmen (Abb.13). Grundlage der Technologie ist die Kombination von fluoreszierenden Mikrosphären als Festphase für die zu untersuchende Probe mit als *Amplifier* genutzter *branched* DNA (bDNA). Bei den Mikrosphären oder *Beads* handelt es sich um mikroskopisch kleine sphärische Polystyrolpartikel, die spezifisch an das jeweilige Zielmolekül binden. Die *Beads* sind mit fluoreszierenden Farbstoffen in den Farbtönen rot und infrarot markiert, wobei diese Farbstoffe in jeweils zehn verschiedenen Konzentrationsstufen miteinander kombiniert werden. Insgesamt existieren also 100 unterschiedliche Schattierungen von Rot und Infrarot, wobei jede dieser Fluoreszenzintensitäten eine Population von *Beads* definiert. Diese Fluoreszenzkodierung der *Beads* ist die Grundlage für ihre Erkennung durch das Analysegerät und liefert somit den Nachweis, ob eine gesuchte Zielsequenz in der untersuchten Probe enthalten ist. Um nun einen DNA/RNA-Hybrid herstellen zu können, werden insgesamt drei verschiedene, synthetisch hergestellte Oligonukleotide verwendet: *Capture Extenders* (CE), *Label Extenders* (LE) und *Blockers* (BL). An den *Beads* sind sogenannte *Capture Probes* (CP) verankert, über die einen CE komplementär an der gesuchten Zielsequenz der jeweiligen RNA

spezifisch bindet. An einer anderen Lokalisation erfolgt die komplementäre Anlagerung eines LE an die RNA. Durch die Zugabe der BL werden unspezifische oder falsche Bindungen verhindert. Sie binden an die Stellen der RNA, die nicht durch LE oder CE belegt sind. In einem zweiten Schritt erfolgt nun die Hybridisierung verzweigter DNA Moleküle (*Amplifier/bDNA*) an den LE. Diese besitzen Bindungsstellen für biotinylierte *Label Probes*. Wird nun ein Fluoreszenzfarbstoff hinzugegeben, der in der Lage ist, Biotin zu binden, wie z.b. Streptavidin konjugiertes R-Phycoerythrin (SAPE), wird bei entsprechender Anregung ein für jedes inkubierte *Bead* spezifisches Fluoreszenzsignal erzeugt (Flagella et al. 2006, Abb.13). Die Analyse und Auswertung dieser Signale erfolgt automatisch im Luminex-Analysesystem und basiert auf dem Prinzip der Durchflusszytometrie. Die behandelten Proben werden an zwei unterschiedlichen Lasern vorbeigeleitet, die dann das jeweilige Fluoreszenzsignal detektieren. Der erste Laser dient der Klassifizierung der *Beads*. Deren Fluoreszenzfarbstoffe emittieren in einem Wellenlängenbereich von 645 bis 669 nm und >712 nm. Bei dem zweiten Laser handelt es sich um Argon-Germanium-Festkörperlaser (532nm). Er dient der Quantifizierung, da die Menge gebundener RNA proportional zur Intensität des Fluoreszenzsignals ist. Es sollten generell solche Fluoreszenzfarbstoffe verwendet werden, die in einem Wellenlängenbereich von 563 und 587 nm emittieren. Die Absorptionmaxima von SAPE liegen bei 490 nm, 545 nm und 565 nm mit einem Emissionsmaximum von 580 nm. Das so detektierte Signal wird dann automatisch für jede *Bead*population als mittlere Fluoreszenzsintensität (MFI) wiedergegeben.

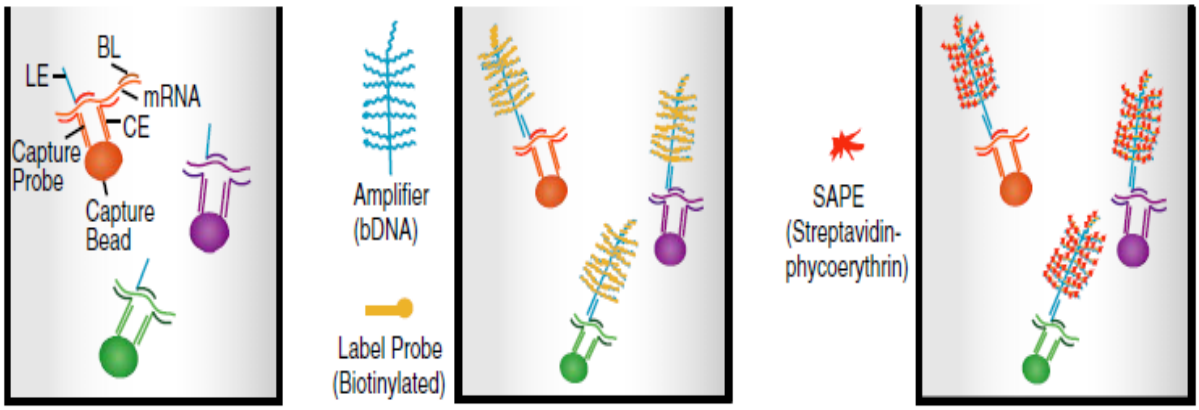


Abb.13 Schematische Darstellung des Multiplex-Analyseverfahrens (aus Flagella et al. 2006). LE - Label Extender, BE – Blockers, CE – Capture Extender, mRNA – Messenger RNA, bDNA – branched DNA.

2.2.11.2 Praktische Anwendung

Die Versuche zum Luminex Verfahren wurden von Mitarbeitern der Firma Progen, Progen Biotechnik GmbH, Heidelberg, Deutschland, durchgeführt. Folgende Angaben beziehen sich

auf das Herstellerprotokoll. Zur Verwendung kam das *QuantiGene Plex 2.0 Assay Kit* (Affimetrix, Santa Clara, USA). Es wurden dieselben *Housekeeping*-Gene verwendet und bis auf BDNF, COL4A und LAMC-3 auch dieselben Zielgene untersucht, wie zuvor bei der qRT-PCR. Die Expression der Gene BDNF, COL4A und LAMC-3 wurde nicht gemessen. Eine Übersicht über die genaue Zusammensetzung des *Kits* gibt die Tabelle 12.

Komponente	**Lagerungstemperatur**
Proteinkinase K1	-80 °C
Blocking Reagenz	-80 °C
Label Probe	-80 °C
2.0 *Pre-Amplifier*	-80 °C
2.0 *Amplifier*	-80 °C
Amplifier Verdünnung	2-8 °C
Label Probe Verdünnung	2-8 °C
Streptavidin-conjugated R-Phycoerythrin/ SAPE	2-8 °C
SAPE Verdünnung	2-8 °C
Lysis Mixture	15-30 ^C
Wasch Puffer 1 und 2	15-30 °C

Tabelle 12: Übersicht über den Inhalt des *QuantiGene Plex 2.0 Assay Kits*. In der linken Spalte sind die einzelnen Komponenten und in der rechten Spalte die jeweilige Lagerungstemperatur in Grad Celsius (°C) aufgelistet.

Für jeden Reaktionsansatz wurde dann folgende Zusammensetzung pipettiert. (Tabelle 13)

Komponente	**Konzentration [µl]**
Dnase und RNase freies H20	38,7
Lysis Mixture	33,3
Blocking Reagenz	2
Capture Beads	1
2.0 Probe Set	5
RNA Probe	20
Total	100

Tabelle 13: Übersicht über die Zusammensetzung des Reaktionsansatzes Tag 1. Links werden die einzelnen Komponenten, rechts die jeweilige Konzentration in Mikroliter (µl) aufgeführt.

Zur Hybridisierung der einzelnen Komponenten wurde das Gemisch für 20 Stunden bei 54 °C inkubiert. Am darauf folgenden Tag wurden zunächst die 2.0 *Amplifier* und *Pre-Amplifier DNA* vorbereitet, dann jeweils 100 µl der Probe beigefügt und für jeweils eine Stunde bei 50^C inkubiert. Als nächstes erfolgte die Vorbereitung der *Label Probe*, von der schließlich 100 µl dem Reaktionsansatz hinzugefügt wurden. Dieser wurde anschließend erneut für eine Stunde bei 50 °C gelagert. Zur Vervollständigung des Reaktionsansatzes wurden noch 100 µl des *SAPE Working*-Reagenz hinzu pipettiert. Zuletzt erfolgte die automatische Quantifizierung der RNA nach dem zuvor beschriebenen Prinzip. Bei der Auswertung der Ergebnisse fand das Luminex Lx200 IS Analysesystem (Progen, Heidelberg, Deutschland) Anwendung.

2.3 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung und graphische Darstellung der Ergebnisse erfolgte mit Excel 2010 und *R Statistical Software*. Die Expression der einzelnen Gene wurde auf ihre jeweilige Signifikanz hin mit ANOVA (*Analysis of Variance*) untersucht. Um Signifikanzen zwischen den einzelnen Gruppen – Kontrolle, Clozapin und Haloperidol - zu analysieren wurde der *Tukey's Honestly Significant Difference Posthoc Test* (Tukey HSD Test) durchgeführt. Mit dem Tukey HSD Test lässt sich die kleinste noch signifikante Differenz zwischen zwei Gruppenmittelwerten berechnen, d.h. der Test dient der Bestimmung signifikanter Unterschiede zwischen Gruppenmittelwerten. Als höchst signifikant wird ein p-Wert von $p<0.05$ festgelegt, als marginal signifikant ein p-Wert zwischen $p\leq0,1$ bis 0.05. Auf eine Bonferroni-Korrektur wurde auf Grund des explorativen Designs dieser Arbeit verzichtet.

3. Ergebnisse

3.1 Serumspiegel von Clozapin und Haloperidol

Es konnten sowohl für Haloperidol, (29,4$\pm$8,4 ng/ml), Clozapin (80,4$\pm$5,6 ng/ml) als auch N-desmethylclozapin (69,8$\pm$5,5 ng/ml) pharmakologisch wirksame Serumspiegel ermittelt werden.

3.2 Ergebnisse der Qualitätskontrolle der RNA

Die Tabellen 14a-f geben eine Übersicht über die im *Agilent 2100 Bioanalyzer* ermittelten Daten der Qualitätskontrolle der aus dem ausgestanzten Hirngewebe gewonnenen RNA der einzelnen Gehirnregionen. In der ersten Spalte jeder Tabelle ist die Nummer der verwendeten Stanzprobe wiedergegeben. In Spalte zwei finden sich die ermittelten RIN-Werte, wobei ein RIN-Wert ≥7,5 einer hohen Qualität der RNA entspricht. In der dritten Spalte sind die 28s/18s-Ratio aufgelistet und in der letzten Spalte die in jeder Probe enthaltenen RNA-Konzentration in pg/µl. Insgesamt wurden für jedes Hirnareal Stanzproben aus 27 Gehirnen gewonnen. Für die Region CA3 konnte die Probe Nummer 17 nicht verwendet werden, da auf Grund äußerer Schäden aus der betroffenen Hirnregion bei den Stanzversuchen nicht genügend Material gewonnen werden konnte. Dasselbe gilt in der Region CPU für Probe Nummer 4 und in der Region PRL für die Proben 4, 8 und 22. Die Proben mit einem RIN-Wert <7,5 wurden nicht berücksichtigt.

PRL			
Probe	RIN	28s/18s	RNA-Konz. (pg/µl)
1	9,00	1,3	8,244
2	8,70	1,0	6,026
3	7,80	1,2	8,302
4	-----	----	-------
5	7,70	1,4	3,821
6	7,90	1,3	6,997
7	8,70	1,6	8,325
8	-----	----	-------
9	9,00	1,6	8,135
10	7,90	1,2	6,560
11	8,40	1,3	7,446
12	8,00	1,3	4,989
13	8,20	0,9	5,230
14	9,10	1,7	6,398
15	9,00	1,5	10,297
16	8,80	1,4	8,040
17	8,60	1,5	7,682
18	8,20	1,4	6,447
19	8,60	1,4	8,550
20	8,70	1,7	7,412
21	7,80	1,3	6,253
22	-----	----	--------
23	7,90	1,3	6,075
24	8,30	1,0	8,115
25	9,20	1,5	7,250
26	8,50	1,1	9,591
27	9,10	1,5	8,051

CG			
Probe	RIN	28s/18s	RNA-Konz. (pg/µl)
1	6,70	0,9	11,809
2	7,10	0,9	6,817
3	8,00	1,4	6,427
4	-----	----	---------
5	7,20	1,1	8,831
6	8,50	1,4	7,980
7	7,20	1,0	8,620
8	8,10	1,4	8,681
9	7,80	1,4	6,568
10	8,10	1,4	8,033
11	8,00	1,4	5,944
12	7,10	0,9	5,203
13	8,50	1,3	3,771
14	7,30	1,0	3,726
15	8,60	1,6	7,193
16	8,00	1,4	5,242
17	8,10	1,4	8,477
18	9,20	1,6	5,058
19	7,30	1,0	6,565
20	8,60	1,4	7,074
21	8,40	1,7	4,698
22	9,10	1,5	10,896
23	7,40	1,3	10,332
24	9,10	0,9	8,534
25	7,40	1,0	14,009
26	8,90	1,4	11,069
27	8,80	1,6	7,980

Tabellen 14a und 14b. RIN Werte, 28s/18s Ration und RNA-Konzentration der Proben in den Hirnregionen PRL und CG. Die linke Tabelle zeigt die RIN-Werte, die 28s/18s Ration und die RNA Konzentration in pg/µl der 27 Proben für den prälimbischen Kortex. Die rechte Tabelle führt die entsprechenden Werte für den Gyrus Cinguli auf.

CPU

Probe	RIN	28s/18s	RNA-Konz. (pg/µl)
1	6,60	1,3	35,609
2	8,40	1,3	21,195
3	7,50	1,2	16,909
4	9,00	1,4	14,503
5	9,10	1,3	16,489
6	7,80	1,3	21,277
7	8,30	1,2	25,430
8	7,70	1,3	19,883
9	7,20	1,4	22,270
10	6,60	1,1	24,136
11	7,80	1,3	17,024
12	7,80	1,3	14,738
13	7,60	1,6	13,898
14	8,90	1,5	11,046
15	6,60	1,1	23,667
16	8,50	1,4	14,892
17	7,80	1,1	19,151
18	8,10	1,3	21,691
19	7,00	1,3	18,365
20	7,50	0,7	20,620
21	6,40	1,3	21,195
22	8,30	1,5	21,452
23	7,90	1,4	17,277
24	8,20	1,1	30,420
25	7,50	0,7	21,792
26	8,10	1,1	20,731
27	7,20	1,3	21,297

DG

Probe	RIN	28s/18s	RNA-Konz. (pg/µl)
1	8,50	1,2	8,410
2	9,40	1,4	5,032
3	8,80	1,4	8,523
4	9,50	1,4	8,234
5	9,30	1,5	4,877
6	9,20	1,4	5,360
7	8,90	1,3	6,124
8	9,00	1,3	9,028
9	9,40	1,7	6,358
10	9,20	1,7	4,454
11	9,20	1,8	4,667
12	8,70	1,4	6,952
13	9,50	1,6	6,416
14	9,00	1,5	4,881
15	8,90	1,6	4,037
16	9,10	1,3	6,983
17	8,20	1,2	4,079
18	9,00	1,5	8,115
19	9,30	1,8	3,170
20	8,90	1,4	8,857
21	9,10	1,8	4,744
22	9,60	1,8	1,948
23	9,30	1,8	3,170
24	9,30	1,5	9,361
25	8,80	1,3	4,621
26	9,20	1,2	8,410
27	9,20	1,6	2,690

Tabellen 14c und 14d. RIN Werte, 28s/18s Ration und RNA-Konzentration der Proben in den Hirnregionen CPU und DG. Die linke Tabelle zeigt die RIN-Werte, die 28s/18s Ration und die RNA Konzentration in pg/µl der 27 Proben aus dem Caudatus Putamen. Die rechte Tabelle führt die entsprechenden Werte im Gyrus Dentatus auf.

CA1

Probe	RIN	28s/18s	RNA-Konz. (pg/µl)
1	8,40	1,1	5,484
2	9,00	1,4	5,633
3	9,00	1,6	6,814
4	9,20	1,4	10,258
5	8,90	1,5	6,994
6	8,80	1,5	7,048
7	8,70	1,6	7,015
8	8,90	1,7	9,278
9	9,30	1,7	7,758
10	8,40	1,4	6,644
11	8,80	1,4	5,500
12	7,60	1,7	6,283
13	8,90	1,1	6,188
14	9,00	1,4	4,389
15	8,40	1,6	4,362
16	8,80	1,4	5,649
17	9,00	1,7	7,901
18	8,90	1,5	10,511
19	7,80	1,3	5,675
20	8,60	1,4	8,879
21	8,50	1,7	5,670
22	9,20	1,6	8,663
23	8,90	1,5	5,601
24	8,40	1,3	11,192
25	9,00	1,5	11,624
26	8,30	1,4	12,376
27	8,90	1,5	7,344

CA3

Probe	RIN	28s/18s	RNA-Konz. (pg/µl)
1	8,80	1,3	4,157
2	8,70	1,7	6,341
3	8,50	1,2	3,084
4	9,00	1,4	6,980
5	8,90	1,6	4,854
6	9,10	1,6	4,129
7	9,00	1,7	4,897
8	8,50	1,3	6,297
9	9,00	1,4	6,612
10	8,20	1,4	3,727
11	8,40	1,5	8,827
12	8,50	1,5	5,536
13	8,80	1,5	7,230
14	8,50	1,4	4,993
15	8,20	1,4	3,727
16	8,80	1,4	6,158
17	-----	----	-------
18	9,00	1,5	3,352
19	8,50	1,3	7,562
20	8,50	1,1	3,237
21	8,00	1,3	3,629
22	9,10	1,5	3,798
23	8,90	1,4	5,426
24	8,60	1,2	8,928
25	9,30	1,5	3,352
26	8,90	1,3	4,973
27	8,80	1,4	6,153

Tabellen 14e und 14f. RIN Werte, 28s/18s Ration und RNA-Konzentration der Proben in den Hirnregionen CA1 und CA3. Die linke Tabelle zeigt die RIN-Werte, die 28s/18s Ration und die RNA Konzentration in pg/µl der 27 Proben aus dem Cornu Ammonis 1.Die rechte Tabelle führt die entsprechenden Werte im Cornu Ammonis 3 auf.

3.3 Statistische Auswertung der Ergebnisse der qRT-PCR und des Luminex Verfahrens

Die Tabellen 15a-f stellen die statistischen Ergebnisse der qRT-PCR und Luminex Versuchsreihe in den sechs untersuchten Gehirnregionen dar. In der ersten Spalte sind die untersuchten Gene aufgelistet, Spalte zwei zeigt die ermittelten p-Werte der ANOVA. Die folgenden drei Spalten zeigen die Signifikanzen, die im Post-Hoc Test ermittelt wurden, jeweils für die Gruppen Clozapin (Clo) vs. Kontrolle, Haloperidol (Ha) vs. Kontrolle (Ko) und Haloperidol vs. Clozapin. Signifikante p-Werte sind in den Tabellen fett und rot, marginal signifikante p-Werte kursiv und gelb markiert

PRL	**qRT-PCR**				**Luminex**			
	ANOVA	Tukey HSD Test			ANOVA	Tukey HSD Test		
Gene		Clo vs. Ko	Ha vs. Ko	Ha vs. Clo		Clo vs. Ko	Ha vs. Ko	Ha vs. Clo
BDNF	0.5216	0.5039	0.7830	0.9011	----------	---------	---------	---------
COLA4A	0.8091	0.8010	0.8857	0.9915	----------	---------	---------	---------
DCTN-6	0.2051	0.4484	0.1848	0.6948	0.2587	0.9759	0.2928	0.3468
LAMC-3	0.6688	0.6493	0.9693	0.8190	----------	---------	---------	---------
SNAP-25	0.8290	0.8737	0.9860	0.8225	*0.0998*	0.2251	*0.0993*	0.8219
STX12	0.8459	1.000	0,8575	0.8771	0.2013	0.7353	0.5569	0.1753
STX1a	0.8398	0.9916	0.8799	0.8460	0.7675	0.8344	0.9966	0.7897
SYP	0.7006	0.8364	0.9337	0.6828	*0.0788*	0.6617	0.3424	*0.0652*
SYT-6	0.2016	0.9716	0.2388	0.2619	0.3877	0.8828	0.6638	0.3590
VAMP-2	0.7294	0.9550	0.8367	0.7178	**0.0030**	0.9998	**0.0081**	**0.0053**

Tabelle 15a: Ergebnisse prälimbischer Kortex. Darstellung der Ergebnisse der ANOVA und des Tukey HSD Tests für das Luminex und das qRT-PCR Verfahren im prälimbischen Kortex (PRL) mit p≤0,05 signifikant und *p≤0,1-0,05 marginal signifikant* (Trend). Ko - Kontrollgruppe, Clo - Clozapingruppe, Ha – Haloperidolgruppe, ANOVA – *Analysis of Variance*, Tukey HSD Test - *Tukey's Honestly Significant Difference Posthoc Test*

CG	qRT-PCR				Luminex			
	ANOVA	Tukey HSD Test			ANOVA	Tukey HSD Test		
Gene		Clo vs. Ko	Ha vs. Ko	Ha vs. Clo		Clo vs. Ko	Ha vs. Ko	Ha vs. Clo
BDNF	0.1766	0.2548	0.7446	0.3693	----------	---------	---------	---------
COLA4A	0.5950	0.5809	0.9869	0.6708	----------	---------	---------	---------
DCTN-6	0.1051	0.5967	0.2405	0.1106	0.3678	0.9962	0.4865	0.3967
LAMC-3	0.6655	0.9918	0.8343	0.6547	----------	---------	---------	---------
SNAP-25	**0,004**	**0.0013**	0.1626	**0.003**	0.2106	0.2125	0.8783	0.4155
STX12	*0.0647*	0.8984	*0.0590*	0.2641	0.7649	0.9827	0.7686	0.8443
STX1a	0.8006	0.9099	0.9354	0.7851	0.7984	0.8404	0.8116	0.9970
SYP	**0.0242**	0.3879	*0.0838*	**0.0267**	0.6233	0.5955	0.8674	0.8832
SYT-6	0.2894	0.3074	0.9962	0.3977	0.6373	0.8879	0.8964	0.6101
VAMP-2	0.8346	0.9993	0.8412	0.8772	0.1096	0.9795	0.1483	0.1689

Tabelle 15b: Ergebnisse Gyrus cinguli. Darstellung der Ergebnisse der ANOVA und des Tukey HSD Tests für das Luminex und das qRT-PCR Verfahren im Gyrus cinguli (CG) mit p≤0,05 signifikant und *p≤0,1-0,05 marginal signifikant* (Trend). Ko - Kontrollgruppe, Clo - Clozapingruppe, Ha - Haloperidolgruppe, ANOVA – *Analysis of Variance*, Tukey HSD Test - *Tukey's Honestly Significant Difference Posthoc Test*

CPU	qRT-PCR				Luminex			
	ANOVA	Tukey HSD Test			ANOVA	Tukey HSD Test		
Gene		Clo vs. Ko	Ha vs. Ko	Ha vs. Clo		Clo vs. Ko	Ha vs. Ko	Ha vs. Clo
BDNF	0.2297	0.2036	0.5424	0.7076	----------	---------	---------	---------
COLA4A	0.1351	0.9651	0.2580	0.1475	----------	---------	---------	---------
DXTN-6	0.3624	0.7179	0.8140	0.3326	0.6652	0.7174	0.9992	0.7240
LAMC-3	0.2229	0.7014	0.2019	0.5409	----------	---------	---------	---------
SNAP-25	0.1211	0.3147	0.8558	0.1166	0.4732	0.8483	0.8027	0.4407
STX12	0.6413	0.6882	0.9971	0.7039	0.6886	0.6887	0.7797	0.9891
STX1a	0.3668	0.3540	0.8655	0.6016	**0.0102**	**0.0085**	0.3998	0.1245
SYP	0.1236	0.7173	0.4145	0.1088	0.1773	0.4585	0.8211	0.1638
SYT-6	0.9605	0.9893	0.9910	0.9566	0.3448	0.5472	0.9514	0.3480
VAMP-2	0.6872	0.8638	0.9506	0.6677	0.9543	0.9754	0.9975	0.9540

Tabelle 15c: Ergebnisse Caudatus Putamen. Darstellung der Ergebnisse der ANOVA und des Tukey HSD Tests für das Luminex- und das qRT-PCR Verfahren im Caudatus Putamen *(CPU)* mit p≤0,05 signifikant *und p≤0,1-0,05 marginal signifikant* (Trend). Ko - Kontrollgruppe, Clo - Clozapingruppe, Ha - Haloperidolgruppe, ANOVA – *Analysis of Variance*, Tukey HSD Test - *Tukey's Honestly Significant Difference Posthoc Test*

DG	qRT-PCR				Luminex			
	ANOVA	Tukey HSD Test			ANOVA	Tukey HSD Test		
Gene		Clo vs. Ko	Ha vs. Ko	Ha vs. Clo		Clo vs. Ko	Ha vs. Ko	Ha vs. Clo
BDNF	*0.0879*	0.1172	0.9842	0.1572	----------	---------	---------	---------
COLA4A	0.8319	0.8622	1.000	0.8629	----------	---------	---------	---------
DCTN-6	0.4015	0.3849	0.6103	0.9315	0.2288	0.5075	0.7935	0.2105
LAMC-3	0.5428	0.8598	0.5137	0.7939	----------	---------	---------	---------
SNAP-25	0.5847	0.9205	0.8033	0.5583	0.1459	0.1792	0.2354	0.9935
STX12	*0.0699*	*0.0696*	0.7941	0.2166	*0.0502*	*0.0631*	0.9697	0.1154
STX1a	0.6539	0.6881	0.9897	0.7448	**0.0129**	*0.0812*	0.6203	**0.0123**
SYP	0.5105	0.4857	0.8840	0.7776	0.5165	0.9993	0.5831	0.5619
SYT-6	*0.0642*	0.7316	*0.0609*	0.1835	0.1279	0.1700	0.1970	0.9995
VAMP-2	0.2736	0.6450	0.7417	0.2472	**0.0208**	0.7944	**0.0208**	*0.0794*

Tabelle 15d: Ergebnisse Gyrus Dentatus. Darstellung der Ergebnisse der ANOVA und des Tukey HSD Tests für das Luminex und das qRT-PCR Verfahren im Gyrus Dentatus *(DG)* mit p≤0,05 signifikant und *p≤0,1-0,05 marginal signifikant* (Trend) . Ko - Kontrollgruppe, Clo - Clozapingruppe, Ha - Haloperidolgruppe, ANOVA – *Analysis of Variance*, Tukey HSD Test - *Tukey's Honestly Significant Difference Posthoc Test*

CA1	qRT-PCR				Luminex			
	ANOVA	Tukey HSD Test			ANOVA	Tukey HSD Test		
Gene		Clo vs. Ko	Ha vs. Ko	Ha vs. Clo		Clo vs. Ko	Ha vs. Ko	Ha vs. Clo
BDNF	0.3600	0.9127	0.1138	0.3871	----------	---------	---------	---------
COLA4A	0.9568	0.9979	0.9678	0.9605	----------	---------	---------	---------
DCTN-6	*0.0693*	*0.0589*	0.7719	0.2155	0.5039	0.9519	0.6870	0.4908
LAMC-3	0.5231	0.5271	0.7250	0.9321	----------	---------	---------	---------
SNAP-25	0.4624	0.6506	0.8775	0.4374	0.1722	0.2897	0.9732	0.2000
STX12	*0.0710*	0.4328	*0.0603*	0.5767	**0.0194**	0.3322	**0.0147**	0.2234
STX1a	**0.0036**	0.5511	**0.0133**	**0.0046**	**0.0022**	0.9906	**0.0051**	**0.0055**
SYP	*0.0962*	0.2733	0.6074	*0.0825*	0.3679	0.3458	0.6165	0.8951
SYT-6	0.1263	0.9127	*0.1138*	0.3871	0.1884	0.8375	0.1782	0.3940
VAMP-2	0.5488	0.9834	0.5377	0.7173	0.5054	0.9993	0.5629	0.5666

-

Tabelle15e: Ergebnisse Cornu Ammonis 1. Darstellung der Ergebnisse der ANOVA und des Tukey HSD Tests für das Luminex und das qRT-PCR Verfahren im Cornu Ammonis 1(CA1) mit p≤0,05 signifikant und *p≤0,1-0,05 marginal signifikant* (Trend). Ko - Kontrollgruppe, Clo - Clozapingruppe, Ha - Haloperidolgruppe, ANOVA – *Analysis of Variance*, Tukey HSD Test - *Tukey's Honestly Significant Difference Posthoc Test*

CA3	qRT-PCR				Luminex			
	ANOVA	Tukey HSD Test			ANOVA	Tukey HSD Test		
Gene		Clo vs. Ko	Ha vs. Ko	Ha vs. Clo		Clo vs. Ko	Ha vs. Ko	Ha vs. Clo
BDNF	0.1225	0.6251	0.1500	0.6412	----------	---------	---------	---------
COLA4A	0.1401	0.1454	0.3225	0.8220	----------	---------	---------	---------
DCTN-6	*0.0777*	0.7960	*0.0672*	0.3487	0.9191	0.9310	0.9999	0.9369
LAMC-3	0.7694	0.9566	0.7500	0.9213	----------	---------	---------	---------
SNAP-25	**0.0103**	0.9908	**0.0134**	**0.0303**	0.4609	0.8941	0.4389	0.6878
STX12	0.5051	0.6993	0.5055	0.9669	0.9938	0.9948	0.9948	1.0000
STX1a	0.1429	0.9005	0.1422	0.6367	**0.0378**	0.8181	0.1361	**0.0364**
SYP	0.1298	0.5307	0.1120	0.6367	0.4491	0.9992	0.5332	0.4919
SYT-6	*0.0583*	0.1128	*0.0904*	0.9917	0.9104	0.9171	0.9984	0.9378
VAMP-2	0.3786	0.8453	0.3477	0.7253	*0.0783*	0.9970	0.1323	0.1036

Tabelle 15f: Ergebnisse Cornu Ammonis 3. Darstellung der Ergebnisse der ANOVA und des Tukey HSD Tests für das Luminex und das qRT-PCR Verfahren in der Hirnregion Cornu Ammonis 3 (CA3) mit p≤0,05 signifikant und *p≤0,1-0,05 marginal signifikant* (Trend). Ko - Kontrollgruppe, Clo - Clozapingruppe, Ha - Haloperidolgruppe, ANOVA – *Analysis of Variance*, Tukey HSD Test - *Tukey's Honestly Significant Difference Posthoc Test*

3.4 Graphische Darstellung der Ergebnisse der qRT-PCR und des Luminex Verfahrens

In den Abbildungen 14a-f erfolgt die graphische Darstellung der Ergebnisse für die qRT-PCR und für die Luminex Versuchsreihe. Die Y-Achse zeigt die Veränderung der Genexpression im Vergleich zur Kontrollgruppe. Die X-Achse stellt die Kontrollgruppe dar. Sind die Veränderungen in der Genexpression im Vergleich zur Kontrollgruppe statistisch höchst signifikant, sind diese mit einem roten Stern markiert, bei einer marginalen Signifikanz findet sich ein gelber Stern zur Hervorhebung.

3.4.1 Prälimbischer Kortex

Im prälimbischen Kortex (Abb.14a) zeigt sich ein sehr heterogenes Regulationsverhalten der untersuchten Gene, sowohl im qRT-PCR und im Luminex Verfahren, als auch im Vergleich der Ergebnisse der beiden Verfahren untereinander. Im Luminex Verfahren konnte eine statistisch signifikante Veränderung der Expression für das Gen VAMP-2 unter Haloperidoleinfluss ermittelt werden (ANOVA: $F[(2.20)=7.88, p=0.0030]$, Tukey $HSD_{Haloperidol\ vs.\ Kontrolle}$ $p=0.0081$). Hier zeigt sich im Vergleich zur Kontrollgruppe eine verminderte Genexpression. Marginal signifikant verändert zeigt sich im Luminex-Verfahren das Gen SNAP-25 (ANOVA: $F[(2.20)=2.59, p=0.0998]$, Tukey-$HSD_{Haloperidol\ vs.\ Kontrolle}$ $p=0.0993$). Haloperidol führt hier ebenfalls zu einer verminderten Expression im Vergleich zur

Kontrollgruppe. Beide Ergebnisse finden in der qRT-PCR Versuchsreihe keine Bestätigung. Hier konnte für keines der untersuchten Gene eine statistisch signifikante Veränderung ermittelt werden. Ferner sind im Luminex Verfahren alle untersuchten Gene – wenn auch ohne statistische Signifikanz – vermindert exprimiert. In der qRT-PCR hingegen zeigt sich sowohl in der Haloperidol-, als auch in der Clozapingruppe eine sehr heterogene Regulationstendenz der untersuchten Gene, zumal die Standartabweichung recht groß ist, so dass eine abschließende Beurteilung nur eingeschränkt möglich ist.

3.4.2 Gyrus cinguli

Im Gyrus cinguli (Abb.14b) zeigt sich in der qRT-PCR Versuchsreihe für das Gen SNAP-25 unter der Gabe von Clozapin eine statistisch signifikante verminderte Regulation (ANOVA: [F(2.14)=3.7872, p=0.0004], Tukey-HSD$_{\text{Clozapin vs. Kontrolle}}$ p=0.0013). Eine entsprechende Tendenz findet sich auch im Luminex-Verfahren für das Gen SNAP-25, jedoch ohne statistische Signifikanz. Das Gen STX12 zeigt sich unter Haloperidoleinfluss im Vergleich zur Kontrollgruppe statistisch marginal signifikant hoch reguliert (ANOVA: F[(2.14)=3.77, p=0.0647], Tukey-HSD$_{\text{Haloperidol vs. Kontrolle}}$ p= 0.0590). Im Luminex Verfahren findet sich erneut eine entsprechende Regulationstendenz, jedoch ohne statistisch signifikantes Ergebnis. Marginal signifikant verändert zeigt sich das Gen SYP in der qRT-PCR unter Haloperidolgabe im Vergleich zur Kontrollgruppe. Hier konnte ebenfalls eine vermehrte Expression nachgewiesen werden (ANOVA: [F(2.14)=6.68, p=0.0242], Tukey-HSD$_{\text{Haloperidol vs. Kontrolle}}$ p=0.0838). Generell konnte im Luminex Verfahren für keines der betrachteten Gene eine statistisch signifikante Veränderung nachgewiesen werden. In der qRT-PCR führt Haloperidol, wenn auch nicht statistisch signifikant, im Vergleich zur Kontrollgruppe zu einer verstärkten Expression der untersuchten Gene bis auf das Gen BDNF.

3.4.3 Caudatus Putamen

Im Caudatus Putamen (Abb.14c) findet sich eine statistisch signifikante Veränderung im Luminex Verfahren ausschließlich bei dem Gen STX1a (ANOVA: F[(2.2)= 5.74, p=0.0102], Tukey-HSD$_{\text{Clozapin vs. Kontrolle}}$ p= 0.0085). Dieses ist unter Einfluss von Clozapin im Vergleich zur Kontrollgruppe vermindert exprimiert. In der qRT-PCR Versuchsreihe zeigt sich eine entsprechende Regulationstendenz von STX1a, jedoch ohne statistische Signifikanz. Generell findet sich für keines der untersuchten Gene im qRT-PCR Verfahren in der Gehirnregion CPU eine statistisch signifikante Änderung der Regulationstendenz. Im Luminex Verfahren sind

zudem alle untersuchten Gene, bis auf SYT-6, unter dem Einfluss von Clozapin tendenziell vermindert exprimiert.

3.4.4 Hippokampus

3.4.4.1 Gyrus Dentatus

Im Gyrus dentatus (Abb.14d) konnten statistisch signifikante Veränderungen im Regulationsverhalten im Luminex-Verfahren für das Gen VAMP-2 unter Haloperidoleinfluss nachgewiesen werden. Hier zeigt sich im Vergleich zur Kontrollgruppe eine verminderte Expression (ANOVA: F[(2.23)=4.61, p=0.0208], Tukey-$HSD_{\text{Haloperidol vs. Kontrolle}}$ p=0.0208). Diese Regulationstendenz findet sich auch in der qRT-PCR wieder jedoch ohne statistische Signifikanz. Des Weiteren sind die Gene STX12 (ANOVA: F[(2.23)=3.42, p=0.0502], Tukey-$HSD_{\text{Clozapin vs. Kontrolle}}$ p=0.0631) und STX1a (ANOVA: F[(2.23)=5.29, p=0.0129], Tukey-$HSD_{\text{Clozapin vs. Kontrolle}}$ p=0.0812) im Luminex Verfahren unter Clozapineinfluss marginal signifikant verändert. Hier zeigt sich im Vergleich zur Kontrollgruppe bei beiden Genen eine verstärkte Expression. In der qRT-PCR lassen sich für STX1a und STX12 entsprechende Regulationstendenzen unter Clozapingabe finden, bei dem Gen STX12 ist diese Veränderung ebenfalls marginal signifikant (ANOVA: F[(2.14)=3.05, p=0.0699], Tukey-$HSD_{\text{Clozapin vs. Kontrolle}}$ p=0.0696). Ebenfalls statistisch marginal signifikant verändert ist in der qRT-PCR die Expression des Gens SYT-6. Es zeigt sich eine erhöhte Expression im Vergleich zur Kontrollgruppe unter Gabe von Haloperidol (ANOVA: F[(2.14)=4.30, p=0.0642], Tukey-$HSD_{\text{Haloperidol vs. Kontrolle}}$ p=0.0609). Auch hier findet sich eine entsprechende Veränderung im Luminex Verfahren, wenn auch ohne statistische Signifikanz. Interessanterweise führt Clozapin in der qRT-PCR Versuchsreihe bei allen Genen im Vergleich zur Kontrollgruppe zu einer verstärkten Expression. Ebenfalls werden alle Gene in der qRT-PCR bis auf VAMP-2 und SNAP-25 unter Haloperidol vermehrt exprimiert.

3.4.4.2 Cornu Ammonis 1

In der Hirnregion CA1 (Abb.14e) zeigt sich bei dem Gen STX1a sowohl in der qRT-PCR (ANOVA: F[(2.14)=10.16, p=0.0036], Tukey-$HSD_{\text{Haloperidol vs. Clozapin}}$ p=0.0133) als auch im Luminex-Verfahren (ANOVA: F[(2.22)=8.17, p=0.0022], Tukey-$HSD_{\text{Haloperidol vs. Kontrolle}}$ p= 0,0051) eine statistische signifikante Veränderung So wird STX1a in beiden Verfahren unter Haloperidoleinfluss im Vergleich zur Kontrollgruppe verstärkt exprimiert. Ebenfalls im Luminex-Verfahren statistisch signifikant verändert ist das Gen STX12 (ANOVA:

F[(2.22)=4.70, p=0.0194], Tukey-HSD$_{\text{Haloperidol vs. Kontrolle}}$ p=0.0147). Hier zeigt sich unter Haloperidoleinfluss im Vergleich zur Kontrollgruppe eine verstärkte Expression. Dieselbe Regulationstendenz als Trend findet sich auch in der qRT-PCR für STX12 (ANOVA: F[(2.14) = 3.27, p=0.0710], Tukey-HSD$_{\text{Haloperidol vs. Kontrolle}}$ p=0.0603). Des Weiteren konnte in der qRT-PCR für das Gen DCTN-6 eine marginal signifikante Veränderung nachgewiesen werden. Hier zeigt sich unter Clozapineinfluss im Vergleich zur Kontrollgruppe eine verminderte Expression (ANOVA: F[(2.14) = 3.14, p= 0.0693], Tukey-HSD$_{\text{Clozapin vs. Kontrolle}}$ p=0.0589). Ferner sind in der qRT-PCR, wenn auch nicht mit durchgehender statistischer Signifikanz, alle Gene die unmittelbar an der synaptischen Übertragung beteiligt sind im Vergleich zur Kontrollgruppe unter Haloperidol vermehrt exprimiert.

3.4.4.3 Cornu Ammonis 3

In der Hirnregion CA3 (Abb.14f) konnte im Luminex Verfahren bei allen untersuchten Genen keine statistisch signifikante Veränderung detektiert werden. Im qRT-PCR Verfahren wird das Gen SNAP-25 unter Haloperidoleinfluss im Vergleich zur Kontrollgruppe statistisch signifikant herunterreguliert (ANOVA: F[(2.13)=7.51, p=0.0103], Tukey-HSD$_{\text{Haloperidol vs. Kontrolle}}$ p=0.0134). SYT-6 ist unter Haloperidolgabe im Vergleich zur Kontrollgruppe vermindert exprimiert, jedoch nur mit einer statistisch marginalen Signifikanz (ANOVA: F[(2.13)=4.21, p=0.0583], Tukey-HSD$_{\text{Haloperidol vs. Kontrolle}}$ p=0.0904). Ebenfalls zu einer marginal signifikanten verminderten Expression kommt es in der qRT-PCR unter Haloperidoleinfluss bei dem Gen DCTN-6 im Vergleich zur Kontrollgruppe (ANOVA: F[(2.13)=3.81, p=0.0777], Tukey-HSD$_{\text{Haloperidol vs. Kontrolle}}$ p=0.0672). In der qRT-PCR werden alle untersuchten Gene sowohl unter Haloperidol als auch unter Clozapin im Vergleich zur Kontrollgruppe in der Region CA3 herunter reguliert. Dieselben Regulationstendenzen, wenn auch nicht statistisch signifikant, finden sich im Luminex Verfahren für alle Gene unter Haloperidoleinfluss.

Prälimbischer Kortex

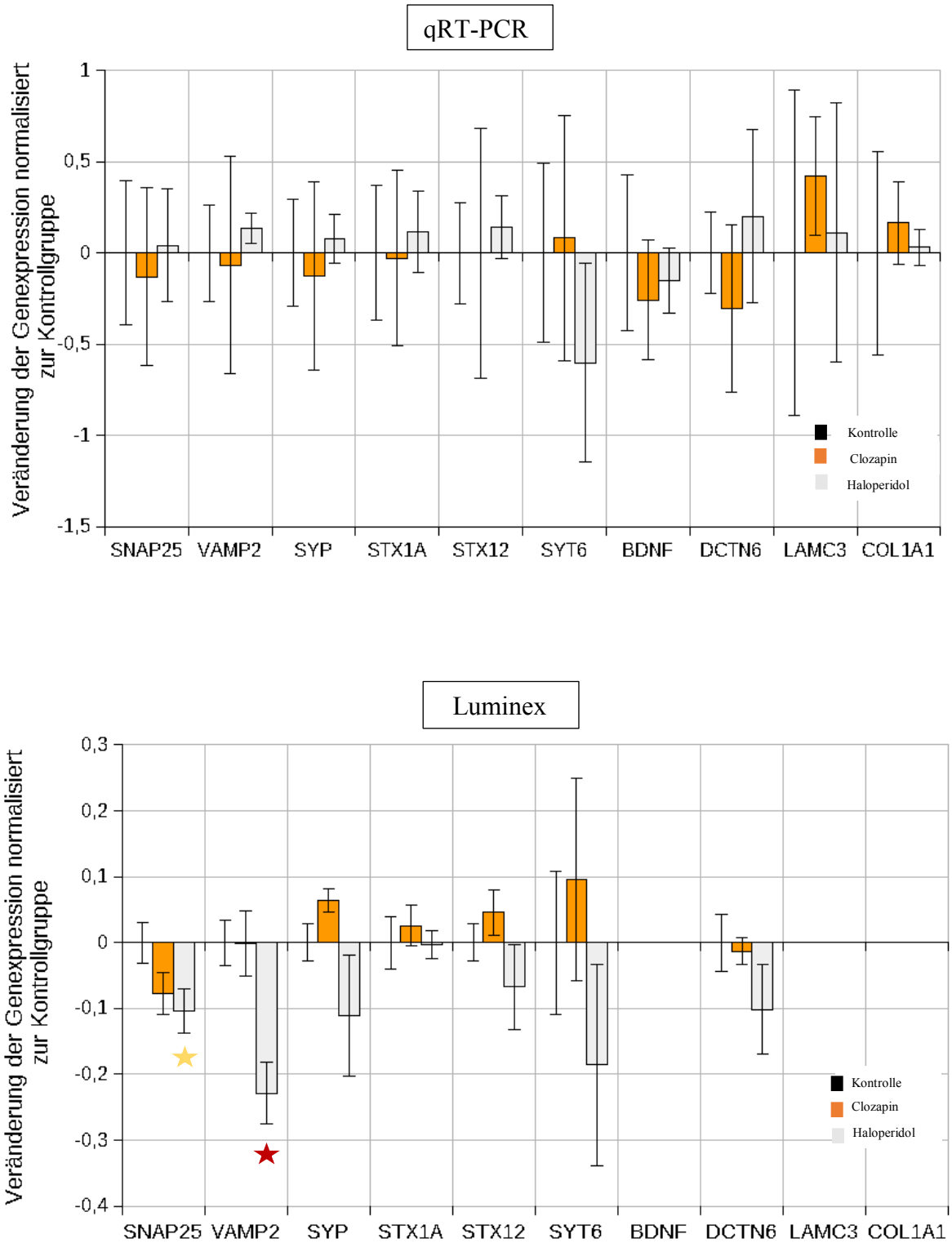


Abb.14a Graphische Darstellung der Ergebnisse im prälimbischen Kortex. Graphische Darstellung der Veränderung der Expression der untersuchten Gene im qRT-PCR und Luminex Verfahren im Vergleich zur Kontrollgruppe unter Haloperidol- und Clozapineinfluss für die Gehirnregion **prälimbischer Kortex**. Auf der Y-Achse wird die Veränderung der Genexpression normalisiert zur Kontrollgruppe gezeigt. ★ **p≤0.05** ★ **p≤0.1-0.05**

Gyrus cinguli

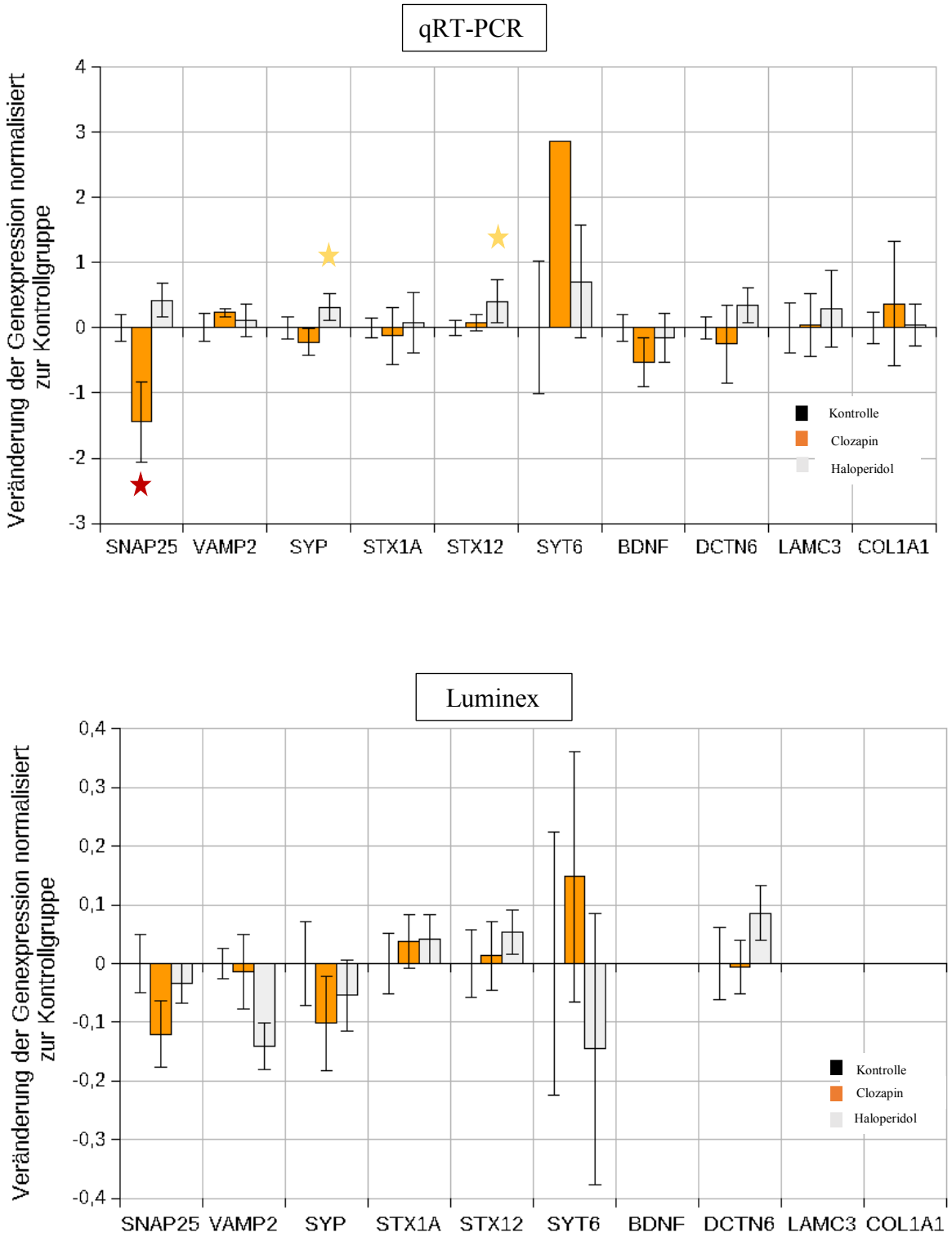


Abb.14b Graphische Darstellung der Ergebnisse im Gyrus cinguli. Graphische Darstellung der Veränderung der Expression der untersuchten Gene im qRT- PCR und Luminex Verfahren im Vergleich zur Kontrollgruppe unter Haloperidol- und Clozapineinfluss für die Gehirnregion **Gyrus cinguli**. Auf der Y-Achse wird die Veränderung der Genexpression normalisiert zur Kontrollgruppe gezeigt.
★ **p≤0.05** ★ **p≤0.1-0.05**

Caudatus Putamen

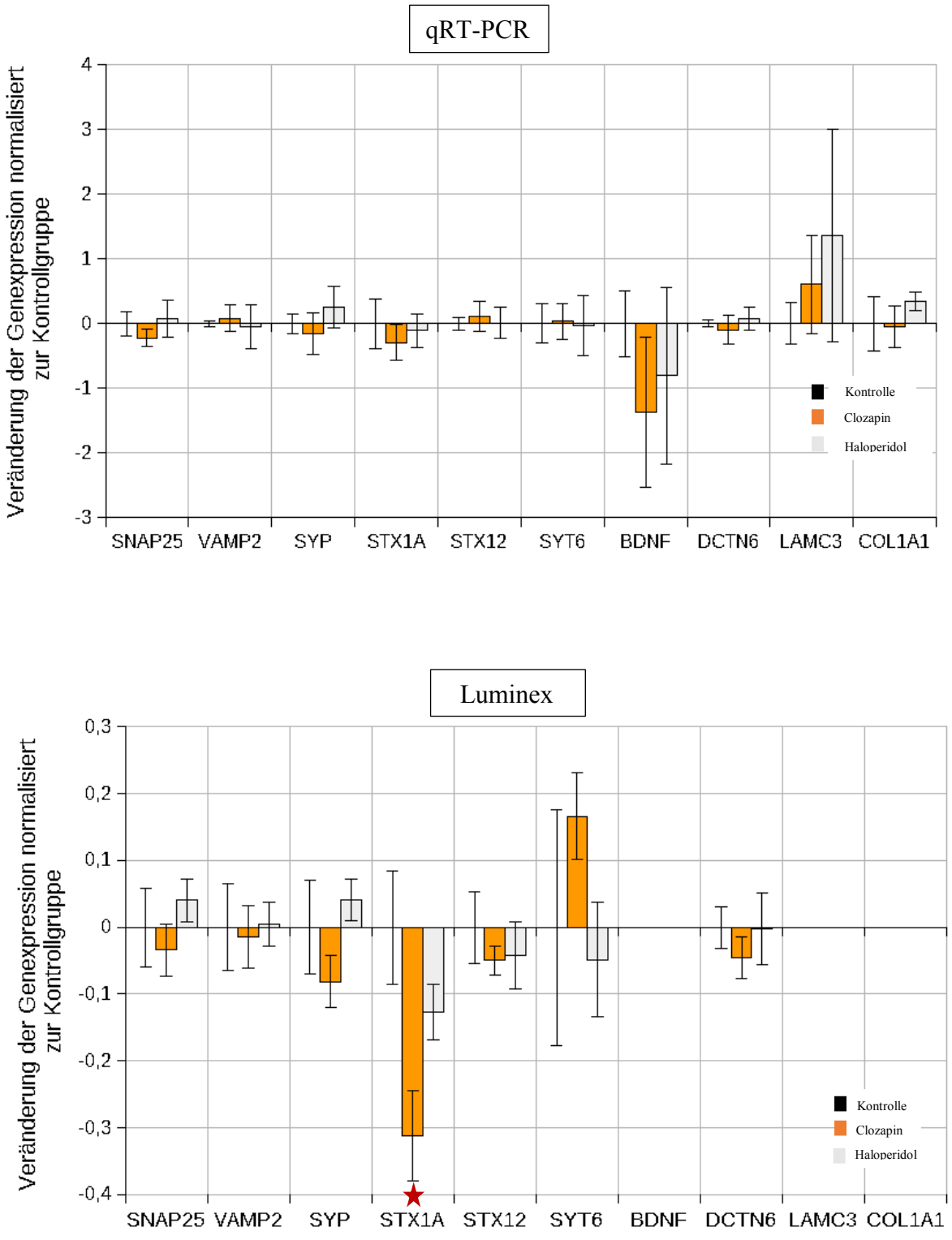


Abb.14c Graphische Darstellung der Ergebnisse im Caudatus Putamen. Graphische Darstellung der Veränderung der Expression der untersuchten Gene im qRT-PCR und Luminex Verfahren im Vergleich zur Kontrollgruppe unter Haloperidol- und Clozapineinfluss für die Gehirnregion **Caudatus Putamen**. Auf der Y-Achse wird die Veränderung der Genexpression normalisiert zur Kontrollgruppe gezeigt. ★ **p≤0.05** ★ **p≤0.1-0.05**

Gyrus Dentatus

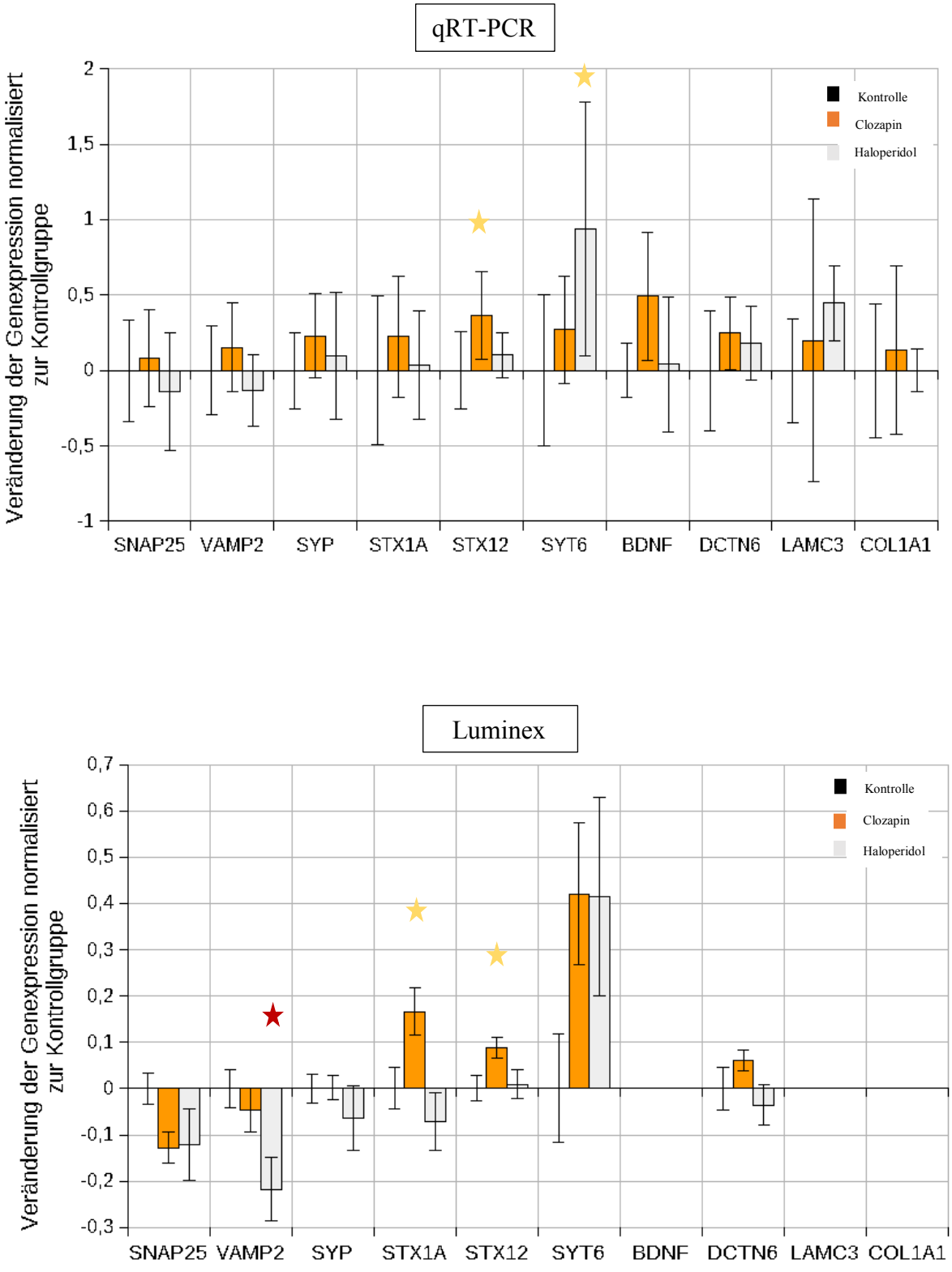


Abb.14d Graphische Darstellung der Ergebnisse im Gyrus Dentatus. Graphische Darstellung der Veränderung der Expression der untersuchten Gene im qRT-PCR und Luminex Verfahren im Vergleich zur Kontrollgruppe unter Haloperidol- und Clozapineinfluss für die Gehirnregion **Gyrus Dentatus**. Auf der Y-Achse wird die Veränderung der Genexpression normalisiert zur Kontrollgruppe gezeigt. ★**p≤0.05** ★**p≤0.1-0.05**

Cornu Ammonis 1

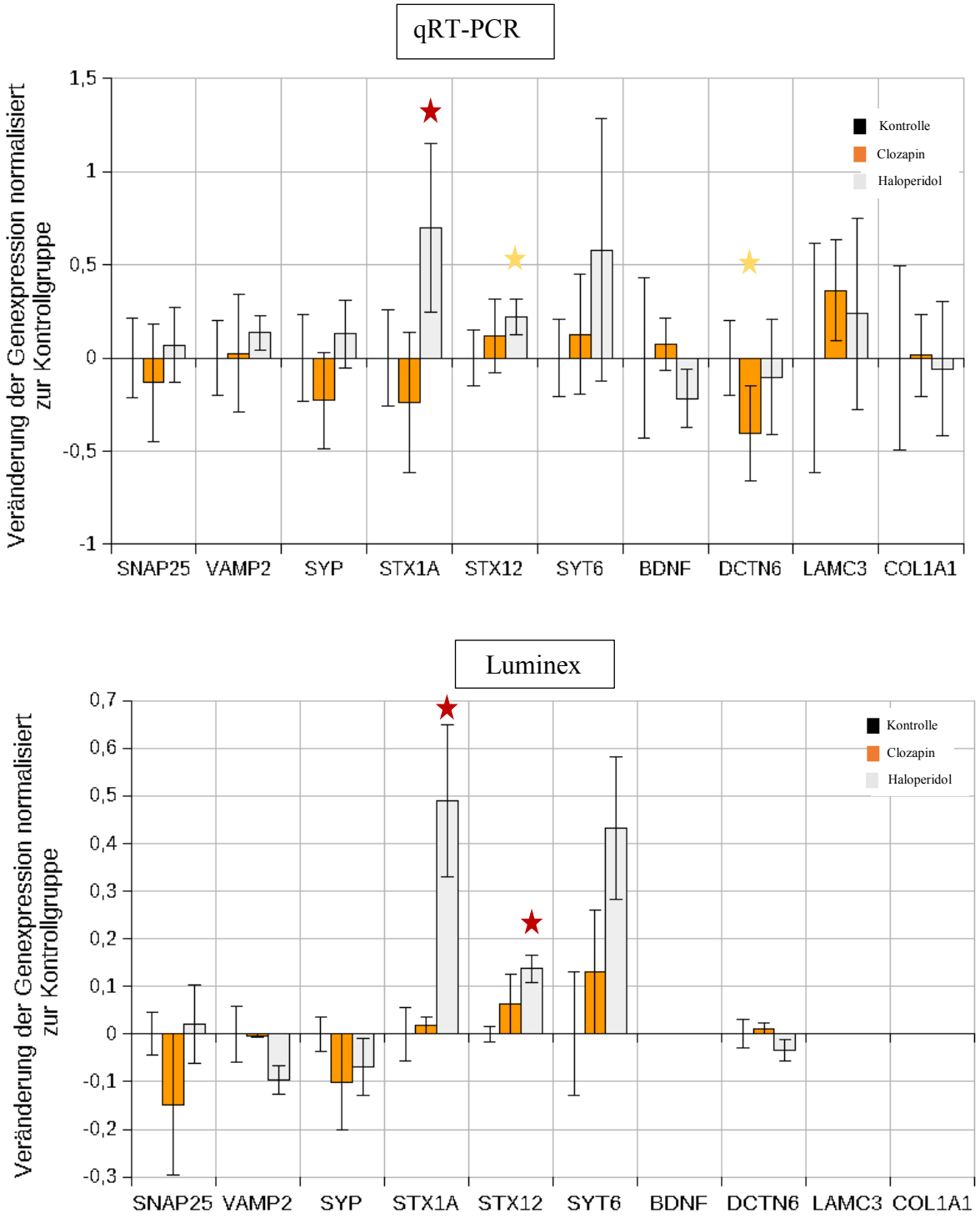


Abb.14e Graphische Darstellung der Ergebnisse im Cornu Ammonis 1. Graphische Darstellung der Veränderung der Expression der untersuchten Gene im qRT-PCR und Luminex Verfahren im Vergleich zur Kontrollgruppe unter Haloperidol- und Clozapineinfluss für die Gehirnregion **Cornu Ammonis 1**. Auf der Y-Achse wird die Veränderung der Genexpression normalisiert zur Kontrollgruppe gezeigt. ★ **p≤0.05** ★ **p≤0.1-0.05**

Cornu Ammonis 3

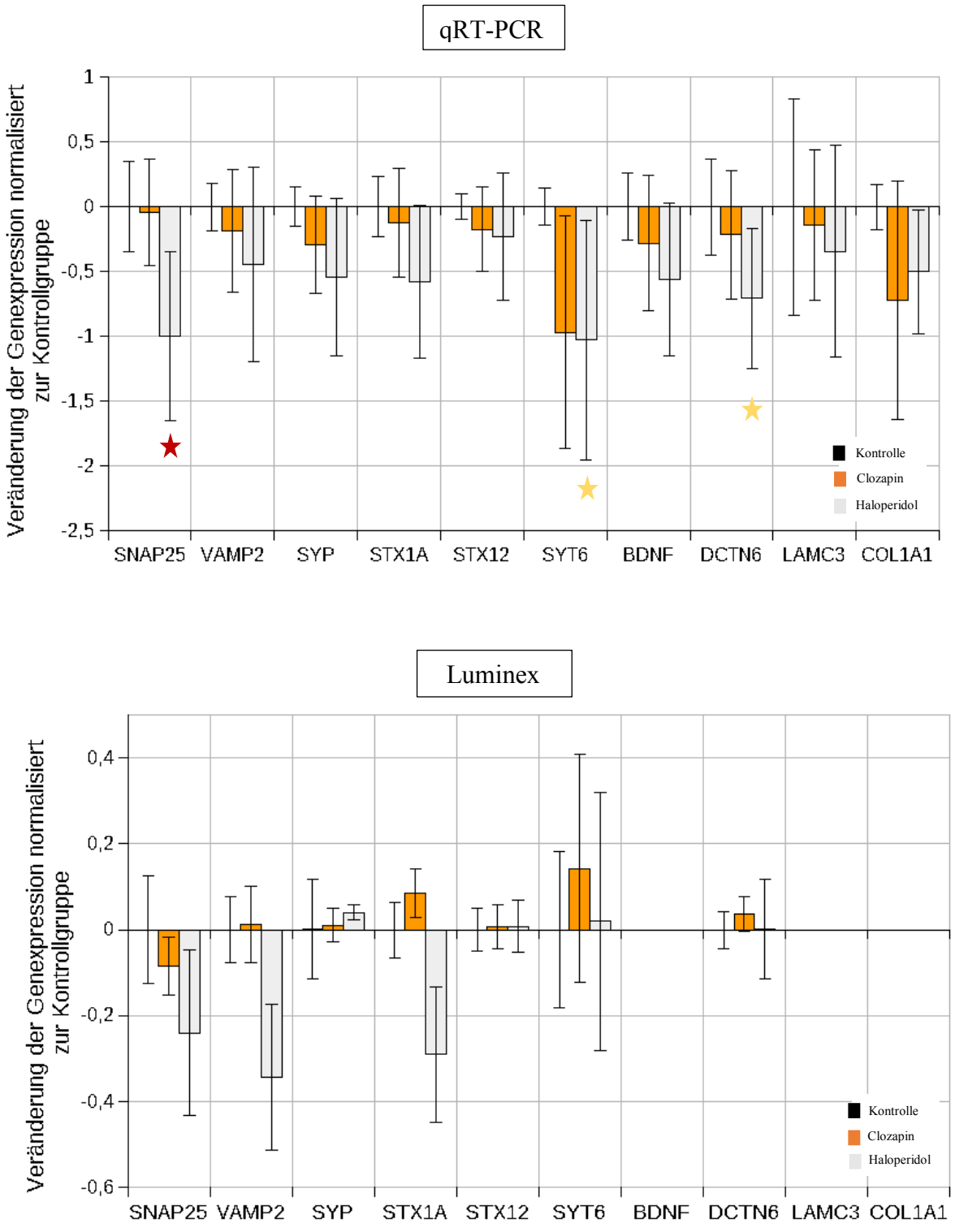


Abb.14f Graphische Darstellung der Ergebnisse im Cornu Ammonis 3. Graphische Darstellung der Veränderung der Expression der untersuchten Gene im qRT-PCR und Luminex Verfahren im Vergleich zur Kontrollgruppe unter Haloperidol- und Clozapineinfluss für die Gehirnregion **Cornu Ammonis 3**. Auf der Y-Achse wird die Veränderung der Genexpression normalisiert zur Kontrollgruppe gezeigt. ★ **p≤0.05** ★ **p≤0.1-0.05**

4. Diskussion

In der nachfolgenden Diskussion erfolgt eine systematisierte Betrachtung der untersuchten Hirnregionen und der jeweils statistisch signifikant veränderten Gene. Die Ergebnisse der Arbeit werden zunächst mit Studien eines ähnlichen Designs verglichen, worauf ein Ausblick zu tierexperimentellen Schizophreniemodellen und Postmortemstudien der Schizophrenie erfolgt.

4.1 Prälimbischer Kortex

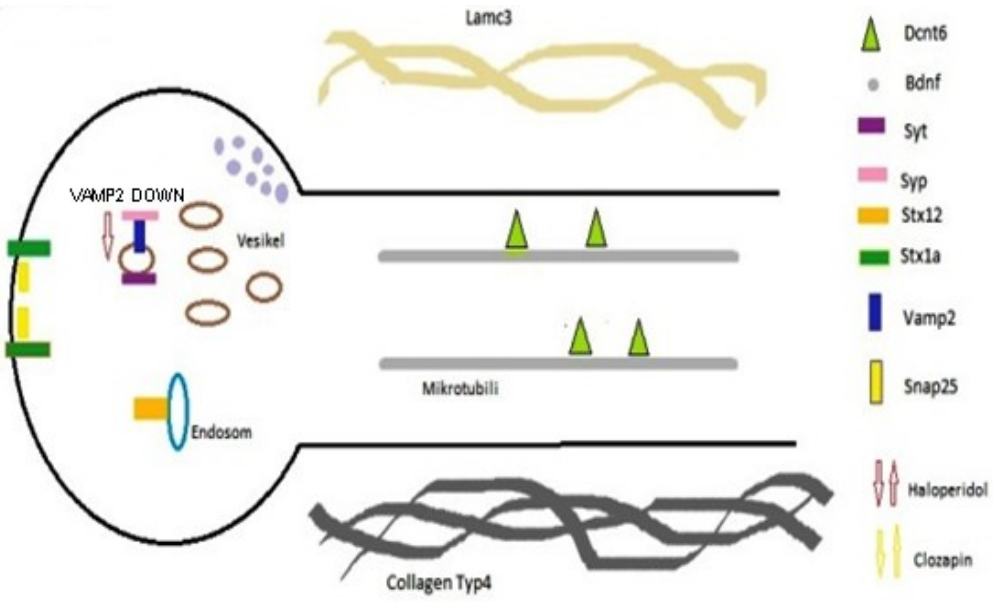


Abb.15a: Graphische Darstellung einer Synapse im prälimbischen Kortex und der in dieser Arbeit untersuchten Gene (DCTN-6, BDNF, SYT, SYP, STX12, STX1a, VAMP-2, SNAP-25, LAMC-3, COLA4A). Darstellung der Regulationstendenz unter Haloperidol (⇩ = Herabregulation, ⇧ = Heraufregulation) und unter Clozapin (⇩ = Herabregulation, ⇧ = Heraufregulation). Im prälimbischen Kortex zeigt sich eine verminderte Expression von VAMP-2 unter Haloperidoleinfluss.

Die 12-wöchige Applikation von Haloperidol führte zu einer verminderten Expression von VAMP-2 im prälimbischen Kortex im Luminex Verfahren, jedoch nicht in der qRT-PCR (Abb.15a). In letzterem Verfahren konnte für keines der betrachteten Gene eine statistisch signifikante Veränderung nachgewiesen werden. Ferner zeigt sich für das Gen SNAP-25 eine marginal signifikante Herabregulation unter Haloperidoleinfluss im Luminex Verfahren. VAMP-2 codiert für das *Vesicle-associated membrane*-Protein-2 (Synaptobrevin-2), welches

zusammen mit Snap-25 und Syntaxin1a Teil des SNARE-Komplexes und damit direkt an der Exozytose von Transmittern beteiligt ist. Mäuse, denen das funktionierende VAMP-2 Gen fehlt, sind nicht lebensfähig und zeigen dramatisch herabgesetzte synaptische Transmissionsraten (Schoch et al. 2001). In einer Studie von Nakahara et al. (1998) wurde ebenfalls die Wirkung von Haloperidol auf die Expression von Genen, die an der synaptischen Transmission beteiligt sind, untersucht. Haldol Decanoat (25 mg /eq 0.5 ml/kg) wurde über einen Zeitraum von 28 Tagen intramuskulär in männliche Ratten injiziert. Es erfolgte eine Untersuchung des frontalen Kortex, des Striatums, des Nucleus accumbens, der Substantia Nigra und der ventralen tegmentalen Area nach Veränderungen der Genexpression mittels qRT-PCR. VAMP-2 zeigte sich im präfrontalen Kortex unter Haloperidoleinfluss nicht signifikant verändert, entsprechend der in dieser Arbeit beim qRT-PCR Verfahren erzielten Ergebnisse. Im Luminex Verfahren konnte jedoch eine verminderte Expression von VAMP-2 unter Haloperidoleinfluss gefunden werden. Die Ursachen dieser unterschiedlichen Ergebnisse lassen sich möglicherweise in der kürzeren Medikamentenapplikationszeit (28 Tage vs. 12 Wochen), der Applikationsart (intramuskulär vs. oral) und hiermit verbundenem erhöhtem Stresslevel der Versuchstiere und einer größeren und damit weniger genauen Schnittdicke der untersuchten Hirne (300µm vs. 60µm) begründen. Des Weiteren wurde der präfrontale Kortex als Ganzes und nicht explizit der prälimbische Kortex betrachtet. Da sich die Ergebnisse von Nakahara et al. und die hier im qRT-PCR Verfahren erzielten Ergebnisse entsprechen, könnte dies auch in der unterschiedlichen Nachweismethode begründet sein (Luminex vs. qRT-PCR Verfahren). In einer Studie von Chana et al. (2009) wurde humanes fetales Gehirngewebe mit Clozapin (0,5µM) und Haloperidol (2µM) für einen Zeitraum von drei Wochen behandelt. Anschließend erfolgte die Messung der Genexpression von VAMP-1 und SNAP-25 mittels qRT-PCR. Hier zeigte sich unter Clozapineinfluss eine statistisch siginfikante Heraufregulation von VAMP-1 im Vergleich zur Kontrollgruppe, wohingegen für SNAP-25 keine Veränderung gefunden werden konnte. Haloperidol hatte keinen statistisch signifikanten Einfluss auf das Expressionsverhalten der untersuchten Gene. Auf Grund der erheblichen Unterschiede im Studiendesign zwischen der Arbeit von Chana et al. und den hier durchgeführten Versuchen, u.a. der Betrachtung von VAMP-1, und nicht VAMP-2, lassen sich die Ergebnisse beider Arbeiten nur bedingt vergleichen. Dennoch deutet der experimentelle Versuch von Chana et al. darauf hin, dass atypische Antipsychotika, in diesem Fall Clozapin, das Expressionsverhalten von VAMP-1 beeinflussen können. Zu diesem Zeitpunkt liegen keine weiteren Studien vor, die den Einfluss von Clozapin und Haloperidol auf die Expression von VAMP-2 im prälimbischen Kortex in Tierversuchen untersuchen, so dass weitere Arbeiten folgen müssten, um die hier dargestellten Ergebnisse zu verifizieren. Es existiert jedoch eine Reihe von Studien, die in

Tiermodellen der Schizophrenie den Zusammenhang unterschiedlicher ätiopathogenetischer Risikofaktoren, die die Entstehung einer Schizophrenie begünstigen können, mit einer Veränderung der in dieser Arbeit betrachteten Gene untersuchen. Stress während der Schwangerschaft stellt einen der Risikofaktoren für die Entwicklung einer Schizophrenie dar. In Tierversuchen führt eine chronische Stressexposition des Muttertieres und der Feten zu Verhaltensauffälligkeiten und zu Lern- und Gedächtnisdefiziten (Koenig et al. 2005). In einer Studie von Kinnunen et al. (2003) wurde der Einfluss von perinatalem Stress auf die Expression von VAMP-2 und SNAP-25 im Frontallappen von Ratten untersucht. Trächtige Sprague-Dawley Ratten wurden acht Tage lang wiederholt verschiedenen Stressformen, u.a. Exposition einer kalten Umgebung, Nahrungskarenz oder Isolation ausgesetzt. Nach der Geburt erfolgte die Entnahme des Frontallappens und der Nachweis mehrerer Gene mittels *Microarray*-Analyse und qRT-PCR. Für VAMP-2 und SNAP-25 konnte eine signifikante Herabregulation nachgewiesen werden. Einer konsekutiven Schlussfolgerung entsprechend, wäre nun anzunehmen, dass die Gabe von Antipsychotika zu einer vermehrten Expression von VAMP-2 führen müsste. Dies zeigt sich in den hier durchgeführten Versuchen jedoch nicht. Kinnunen et al. (2003) untersuchten jedoch den Frontallappen als Ganzes und nicht explizit nur den prälimbischen Kortex. Ferner wurden in dieser Arbeit gesunde Ratten, und nicht solche, die zuvor Stressfaktoren ausgesetzt waren, untersucht. Müller et al. (2011) untersuchten in einem ähnlichen Stressmodell männliche Sprague-Dawley Ratten. 36 Versuchstiere wurden in drei Gruppen à 12 Tiere aufgeteilt. Zwei Gruppen wurden 21 Tage entweder für sechs Stunden oder für eine halbe Stunde Stress ausgesetzt. Die letzte Gruppe diente als Kontrollgruppe. Nach Versuchsende wurden die Tiere getötet und mittels qRT-PCR Veränderungen der Expression von STX1a, SNAP-25, SYT-1 und VAMP-2 im präfrontalen Kortex und im Hippokampus untersucht. VAMP-2 war in beiden Hirnregionen, sowohl in der 6h-Stress- als auch in der 1/2h-Stress-Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe heraufreguliert. Zu ähnlichen Ergebnissen kommt eine weitere Studie (Forrest et al. 2012), in welcher trächtige Ratten während der letzten sieben Tage der Schwangerschaft mit Polycytidylsäure ((Poly(I:C)) behandelt wurden. Poly(I:C) aktiviert über *Toll-Like*-3-Rezeptoren das Immunsystem und imitiert so eine virale Infektion. Am postnatalen Tag 21 wurden die Rattenwelpen getötet und mittels *Western-Blot* die Proteinkonzentration von Synaptotagmin und Vamp-1 im Gehirn der Versuchstiere gemessen. Es konnte eine signifikante Erhöhung von Vamp-1 detektiert werden. Pränataler und perinataler Stress, pränatale Infektionen, Stress in der Pubertät und im Erwachsenenalter, wie auch eine gestörte intrazerebrale Konnektivität sind Risikofaktoren für die Entstehung einer Schizophrenie. Wie oben gezeigt führen einige dieser Faktoren in Tiermodellen der Schizophrenie zu einer veränderten Expression von VAMP-2 im präfrontalen Kortex, wobei

die Regulationstendenz uneinheitlich ist. In dieser Arbeit führte Haloperidol im Gegensatz zu Clozapin, entsprechend den Ergebnissen der Arbeiten von Forrest et al. und Müller et al. zu einer Herabregulation dieses Gens, was auf einen möglichen therapeutischen Angriffspunkt auf der Ebene der Synapse von typischen Antipsychotika hinweisen könnte. Weitere Studien, mit ähnlichem Versuchsaufbau, in denen ein Zusammenhang zwischen möglichen Schizophrenieauslösern, einer veränderten Genexpression und anschließender antipsychotischer Therapie untersucht wird, müssten zur Bestätigung der hier erzielten Ergebnisse folgen. Ein direkter Vergleich der hier dargestellten Ergebnisse im prälimbischen Kortex mit Studien von Patienten mit Schizophrenie ist nur eingeschränkt möglich, da in den meisten Postmortemstudien Patienten untersucht wurden, die bereits antipsychotisch behandelt wurden. Es lässt sich also nicht schlussfolgern, ob die gefundenen Veränderungen der Genexpression auf die Erkrankung Schizophrenie zurückzuführen sind, oder aber als Folge einer im Vorfeld erfolgten antipsychotischen medikamentösen Therapie zu betrachten sind. Dementsprechend uneinheitlich sind die Ergebnisse dieser Studien. In der Arbeit von Maycox et al. (2009) konnten Veränderungen in der Expression von VAMP-2 in Gehirnen von Patienten mit Schizophrenie im Vergleich zu denen einer gesunden Kontrollgruppe gefunden werden. Studien, die eine mögliche Veränderung der Konzentration von VAMP-2 in den Gehirnen von Patienten mit Schizophrenie untersuchten, fanden keine Veränderung im frontalen, parietalen und temporalen Kortex (Honer et al. 2002; Gabriel et al. 1997), sowie im Cerebellum (Mukaetova-Ladinska et al. 2002). Sokolov et al. (2000) wiesen jedoch eine erhöhte Gesamtkonzentration von VAMP-2 im superioren temporalen Kortex bei jüngeren und eine verminderte Konzentration bei älteren Patienten mit Schizophrenen nach. Interessant wären in Zukunft Studien, welche explizit einen möglichen Einfluss von Clozapin und Haloperidol auf das Expressionsverhalten von VAMP-2 im präfrontalen Kortex von an Schizophrenie Erkrankter untersuchen.

4.2 Gyrus Cinguli

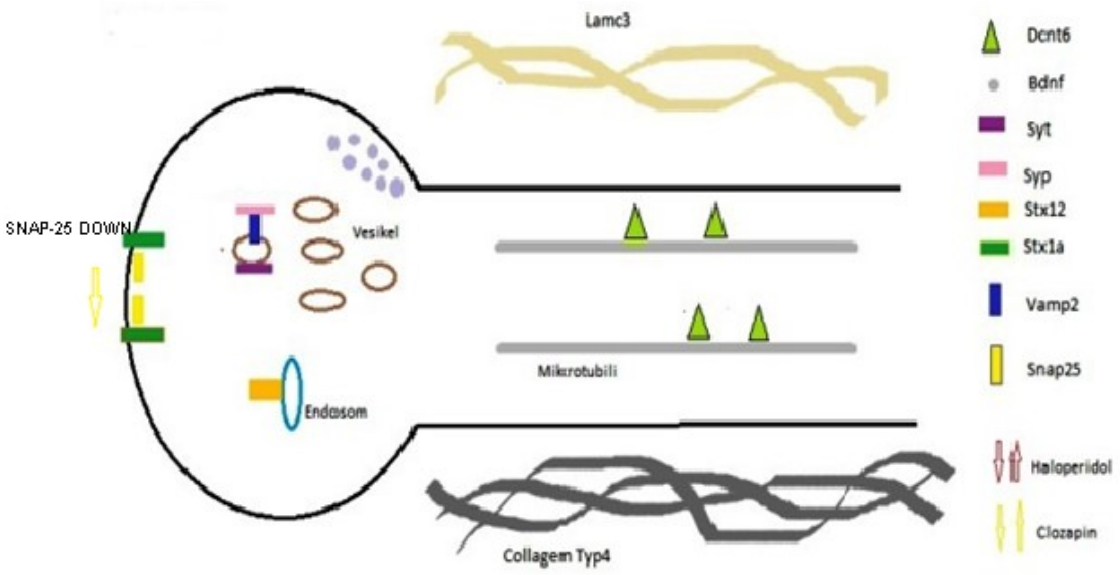


Abb.15b: Graphische Darstellung einer Synapse im Gyrus cinguli und der in dieser Arbeit untersuchten Gene (DCTN-6, BDNF, SYT, SYP, STX12, STX1a, VAMP-2, SNAP-25, LAMC-3, COLA4A). Darstellung der Regulationstendenz unter Haloperidol (⇩ = Herabregulation, ⇧ = Heraufregulation) und unter Clozapin (⇩ = Herabregulation, ⇧ = Heraufregulation). Im Gyrus cinguli zeigt sich eine vermehrte Expression von SNAP-25 unter Clozapineinfluss.

Im Gyrus Cinguli konnte in der qRT-PCR Versuchsreihe eine statistisch signifikante Herabregulation des Gens SNAP-25 unter Clozapineinfluss detektiert werden (Abb.15b). Für Haloperidol wurde in der qRT-PCR Versuchsreihe ein Trend für eine erhöhte Regulation für die Gene SYP und STX12 gefunden. Im Luminex Verfahren zeigten alle Gene, sowohl unter Clozapin-, als auch unter Haloperidoleinfluss keine statistisch signifikante Veränderung der Expression. Diese Arbeit ist die Erste, welche den Einfluss von Antipsychotika in einem tierexperimentellen Modell auf die Expression von SNAP-25 explizit im Gyrus Cinguli untersucht hat, so dass weitere Studien zu dieser Thematik folgen müssten um die hier erzielten Ergebnisse zu verifizieren. Studien, die eine Veränderung der Expression von SNAP-25 unter dem Einfluss von Antipsychotika in Tiermodellen in anderen Gehirnregionen untersuchen, kommen zu unterschiedlichen Ergebnissen. Nakahara et al. fanden in ihrer Studie, analog zu den hier erzielten Ergebnissen, keine Veränderung der Expression von SNAP-25 in den Gehirnregionen Striatum, frontaler Kortex und Ncl. Accumbens unter dem Einfluss von Haloperidol (Nakahara et al. 1998). Die Gabe von Clozapin erfolgte jedoch nicht. Auch wurde nicht isoliert der Gyrus Cinguli betrachtet. In der Arbeit von Barakauskas et al. (2010) wurde Ratten über einen Zeitraum von 28 Tagen Haloperidol oder Clozapin per intraperitonealer Injektion verabreicht. Anschließend wurde mittels ELISA die Proteinkonzentration von Vamp-

2, Snap-25 und Stx1a im ventromedialen Abschnitt des Nucleus caudatus gemessen. Haloperidol führte zu einer vermehrten Expression aller betrachteten Proteine, Clozapin hingegen nur zu einer Erhöhung der Vamp-2 Proteinkonzentration. Diese Studie und auch die Ergebnisse in dieser Arbeit weisen darauf hin, dass eine Veränderung der Expression von SNAP-25 unter Clozapineinfluss abhängig von der untersuchten Gehirnregion ist. Einige Studien mit Tiermodellen zur Schizophrenie zeigen Veränderungen der Expression von SNAP-25 auf, wobei erneut in keiner dieser Studien explizit der Gyrus cinguli untersucht wurde. In den Stressmodellen von Kinnunen et al. und Müller et al. wurden jeweils eine verminderte Expression von SNAP-25 nachgewiesen. In einer Arbeit von Sommer et al. (2010) wurden Rattenwelpen vier Tage nach der Geburt für fünf Tage einer Hypoxie ausgesetzt. Komplikationen während der Geburt und eine Sauerstoffunterversorgung während und in den ersten Tagen nach der Geburt stellen Risikofaktoren für die Entstehung einer Schizophrenie dar. Anschließend erfolgte bei einer Gruppe von Tieren die Gabe von Clozapin (45mg/kg/Tag) für 30 Tage. Mittels *Microarray* und qRT-PCR wurde dann das Expressionsverhalten verschiedener Gene unter den Einflussfaktoren Hypoxie und Clozapin im Putamen, im Frontallappen, im Parietallappen und im Temporallappen untersucht. SNAP-25 zeigte sich im Putamen vermindert, im Frontallappen vermehrt exprimiert. Die Gabe von Clozapin hatte sowohl in der Normoxie- als auch in der Hypoxiegruppe keinen Einfluss auf das Expressionsverhalten von SNAP-25. Zu diesem Zeitpunkt, ist die Studie von Sommer et al., die einzige Arbeit, welche den Einfluss von Clozapin auf die Expression von SNAP-25 untersucht. Es konnte keine statistisch signifikante Veränderung für SNAP-25 nachgewiesen werden. Dies steht der, in dieser Arbeit nachgewiesenen verminderten Expression von SNAP-25 gegenüber. Diese differierenden Ergebnisse lassen sich jedoch neben der unterschiedlichen Applikationsdauer der Antipsychotika dadurch begründen, dass in der Arbeit von Sommer et al. nicht explizit der Gyrus cinguli untersucht wurde und weisen somit erneut darauf hin, dass der Einfluss von Antipsychotika auf das Expressionsverhalten von Genen auch von der betrachteten Gehirnregion abzuhängen scheint. Die Ergebnisse dieser Studien sind zum Teil widersprüchlich, lassen aber dennoch die Schlussfolgerung zu, dass eine Veränderung der Expression von SNAP-25 in tierexperimentellen Studien Hinweise auf einen Beitrag von SNAP-25 zur Pathogenese der Schizophrenie geben könnte und Antipsychotika über eine Veränderung der Expression von SNAP-25 ihre Wirksamkeit entfalten könnten. Untermauert wird diese These durch die Arbeiten von Jeans et al. (2006) und Oliver und Davies (2009). Hier konnte gezeigt werden, dass die Missensmutation 167T im SNAP-25-Gen von Mäusen (=*Blind-Drunk Mouse /Bdr-Mutation*) zu einer erhöhten Bindungsaffinität von Snap-25 führt, was wiederum eine Beeinträchtigung der Exozytose und damit verminderten Amplitude kortikaler

postsynaptischer Potenziale nach sich zieht. Dies verursacht bei den betroffenen Mäusen schizophrenieähnliche Symptome, wie z.B. eine gestörte sensomotorische Verarbeitung und apathische Verhaltensweisen. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass perinataler Stress als Risikofaktor für die Entstehung einer Schizophrenie bei den *Blind-Drunk*-Mäusen zu einer Zunahme dieser Symptomatik führt und dass diese durch die kurzfristige Gabe von Clozapin oder Haloperidol gebessert wird. DISC-1 (*Disrupted in Schizophrenia*) ist eines der Suszeptibilitätsgene der Schizophrenie. Transgene Mäuse mit einem mutierten DISC-1 Gen zeigen ebenfalls schizophrenieähnliche Verhaltensweisen und weisen darüber hinaus eine verminderte Konzentration von Snap-25 auf (Pletnikov et al. 2007). In Postmortemstudien konnte eine reduzierte Konzentration von Snap-25 in den Brodmannarealen 10 (präfrontal), 20 (temporal) und eine erhöhte Ansammlung im Brodmannareal 9 (präfrontal) festgestellt werden (Thompson et al. 1998; Karson et al. 1999). Weitere Studien wiesen eine verminderte Konzentration von Snap-25 im Hippokampus schizophrener Patienten nach (Thompson et al. 2003; Young et al. 1998), gleichzeitig jedoch auch eine erhöhte Konzentration von Snap-25 im Liquor schizophrener Erkrankter (Thompson et al. 1998). Ferner konnte eine erhöhte Protein-Protein Interaktion der einzelnen Komponenten des SNARE Komplexes, inklusive von Snap-25 im Gyrus cinguli und im orbitofrontalen Kortex bei an Schizophrenie Erkrankten gefunden werden (Ramos-Miguel et al. 2015). In einer weiteren Studie wurde die Snap-25 Proteinkonzentration im ventromedialen Teil des Ncl. Caudatus von 15 Patienten mit Schizophrenie gemessen. Es zeigte sich eine signifikante verminderte Konzentration von Snap-25 und darüber hinaus eine größere Snap-25-Syntaxin Protein Interaktion (Barakauskas et al. 2016). Zu Bedenken ist hier, dass keine der genannten Studien zwischen medikamentös behandelten und nicht behandelten Patienten mit Schizophrenie unterscheidet und somit eine Beeinflussung der Ergebnisse durch eine mögliche antipsychotische Therapie nicht ausgeschlossen werden kann. Lochmann und Mitarbeiter (2013) fanden zudem heraus, dass ein Zusammenhang zwischen der Schizophrenie und einer Veränderung im SNAP-25 Gen (SNAP25- rs1503112 Polymorphismus) existiert.

4.3 Caudatus Putamen

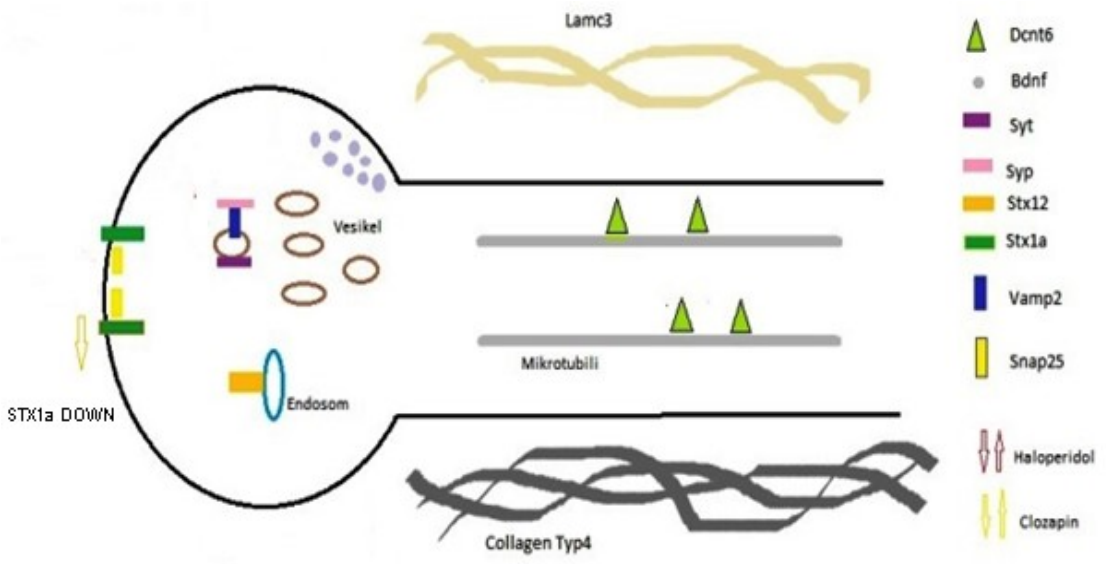


Abb.15c: Graphische Darstellung einer Synapse im Caudatus Putamen und der in dieser Arbeit untersuchten Gene (DCTN-6, BDNF, SYT, SYP, STX12, STX1a, VAMP-2, SNAP-25, LAMC-3, COLA4A). Darstellung der Regulationstendenz unter Haloperidol (⇩ = Herabregulation, ⇧ = Heraufregulation) und unter Clozapin (⇩ = Herabregulation, ⇧ = Heraufregulation). Im Putamen kommt es unter Clozapineinfluss zu einer verminderten Expression Stx1a

In der hier durchgeführten Versuchsreihe zeigte sich im qRT-PCR Verfahren keines der untersuchten Gene signifikant verändert. Eine verminderte Expression von STX1a nach Clozapinapplikation konnte jedoch im Luminex-Verfahren beobachtet werden. STX1a ist als Bestandteil des SNARE-Komplexes unmittelbar an der Exozytose von Transmitterstoffen beteiligt. Nakahara et al. (1998) fanden analog zu den hier erzielten Ergebnissen keine Veränderung der Expression von STX1a nach 28-tägiger, intramuskulärer Haloperidolapplikation im Striatum der untersuchten Ratten. Eine reduzierte Expression von STX1a konnte jedoch im Nucleus accumbens nachgewiesen werden. Der Nucleus accumbens als verbindende Kernregion zwischen Putamen und Nucleus caudatus wurde in der hier durchgeführten Arbeit jedoch nicht explizit untersucht. In der Arbeit von Barakauskas et al. (2010), in der nach 28-tägiger Haloperidol- oder Clozapininjektion die Proteinkonzentration von Vamp-2, Snap-25 und Stx1a im ventromedialen Abschnitt des Nucleus caudatus gemessen wurde, führte Haloperidol zu einer vermehrten Expression aller betrachteten Proteine, Clozapin ausschließlich zu einer erhöhten Expression von Vamp-2. Diese Ergebnisse unterscheiden sich zum Teil von den in dieser Arbeit erzielten Resultaten. Die Ursache hierfür könnte unter anderem in der Nachweismethode (ELISA vs. Luminex/qRT-PCR), der Applikationsart (intraperitoneal vs. oral) und der Applikationsdauer (28 Tage vs. 12 Wochen) liegen. Ein

direkter Vergleich zwischen Genbestimmung und Messung der Proteinkonzentration ist zudem nur eingeschränkt möglich, da Proteine beispielsweise auch als inaktive Vorstufen vorliegen können und erst bei Bedarf aktiviert werden. Darüber hinaus betrachteten Barakauskas und Mitarbeiter nicht explizit das Putamen, sondern einen Teil des Nucleus caudatus. Beide Kerngebiete bilden zwar zusammen das Striatum, ein unterschiedlicher Effekt von Antipsychotika auf die Expression von Genen in verschiedenen Arealen des Striatums ist jedoch keinesfalls auszuschließen. In der Arbeit von Sommer et al. (2010), in der mittels *Microarray* und qRT-PCR das Expressionsverhalten verschiedener Gene unter den Einflussfaktoren Hypoxie und Clozapin untersucht wurde, konnte unter dem Einflussfaktor Hypoxie eine vermehrte Expression von STX1a im Frontallappen und eine verminderte Expression im Temporallappen aufgezeigt werden. Die Gabe von Clozapin führte sowohl in der Normoxie- als auch in der Hypoxiegruppe zu einer signifikanten Erhöhung von STX1a im Parietallappen. Im Frontallappen zeigte sich in der Normoxiegruppe eine verminderte Expression von STX1a unter Clozapineinfluss. Das Putamen wurde nicht explizit unter Clozapineinfluss untersucht. Die Ergebnisse der Arbeiten von Barakauskas et al. (2010) und Sommer et al. (2010), wie auch die Ergebnisse dieser Arbeit deuten darauf hin, dass Clozapin über eine Veränderung der Expression von STX1a, welches direkt in die synaptische Transmission eingeschaltet ist, die Kommunikation zwischen Nervenzellen beeinflussen könnte. Erneut zeigt sich jedoch, dass die Richtung der Regulationstendenz abhängig von der untersuchten Gehirnregion zu sein scheint. In der Arbeit von Müller et al. (2011) zeigte sich unter dem Einflussfaktor Stress bei erwachsenen Tieren eine vermehrte Expression von STX1a im präfrontalen Kortex. Das Putamen wurde in dieser Arbeit nicht untersucht. Zu diesem Zeitpunkt liegen keine weiteren Studien vor, die das Expressionsverhalten von STX1a explizit im Putamen unter Einfluss von Antipsychotika untersucht haben, so dass weitere Studien folgen müssten um die hier erzielten Ergebnisse zu verifizieren. Verschiedene Studien belegen einen Zusammenhang zwischen einer veränderten Expression von STX1a und der Schizophrenie. So zeigen *HPC-1/Syntaxin-1a Knockout*-Mäuse Verhaltensweisen ähnlich den Symptomen einer Schizophrenie, wie z.B. neurokognitive und neuromuskuläre Störungen (Fujiwara et al. 2010). Auch in Postmortemstudien wurde über eine Veränderung der Expression von Syntaxin in den Gehirnen von an Schizophrenie Erkrankten berichtet. Die Ergebnisse dieser Studien variieren jedoch je nach untersuchter Hirnregion. Generell zeigt sich Syntaxin im superioren temporalen Kortex bei jüngeren Patienten mit Schizophrenie erhöht, wohingegen es bei älteren Patienten vermindert auftritt (Sokolov et al. 2000). Bei an Schizophrenie Erkrankten kommt es zudem zu einer gestörten Syntaxin-Phosphorylierung, wodurch die Bindung zu Snap-25 instabil wird. Dies wiederum führt zu einer gestörten Funktion des SNARE-Komplexes und damit zu einer

gestörten Exozytose (Castillo et al. 2010). Des Weiteren konnte eine erhöhte Aktivität von Stx1a im Gyrus Cinguli in den Gehirnen von Patienten mit einer Schizophrenie gemessen werden (Honer et al. 1997). Gleichzeitig wurde eine verminderte Proteinkonzentration von Syntaxin in striatalen Hirnregionen nachgewiesen (Barakauskas et al. 2010). Gil-Pisa et al. (2012) untersuchten die Veränderung der Proteinkonzentration von Syntaxin im präfrontalen Kortex von an Schizophrenie Erkrankten unter der Berücksichtigung des Faktors der antipsychotischen Medikation. So wurde in dieser Postmortemstudie u.a. verschiedene Proteine des SNARE Komplexes bei 12 medikamentös nicht behandelten, im Vergleich zu 12 behandelten Patienten mit Schizophrenie untersucht. Es konnte eine erhöhte Konzentration von Stx1a in der Gruppe der medikamentenfreien Probanden gefunden werden. Unter antipsychotischer Therapie zeigte sich eine Reduktion dieser erhöhten Konzentration. Diese war im Vergleich zu einer gesunden Kontrollgruppe aber immer noch erhöht. Die Ergebnisse dieser Studie entsprechen den in dieser Arbeit erzielten Ergebnissen, wobei Gil-Pisa und Mitarbeiter keine Differenzierung der antipsychotischen Medikation vorgenommen haben. Insgesamt zeigen die hier zitierten Studien jedoch auf, dass eine gestörte synaptische Konnektivität unter der Beteiligung von Syntaxin zur Pathogenese der Schizophrenie beitragen kann.

4.4 Hippokampus

4.4.1 Gyrus Dentatus

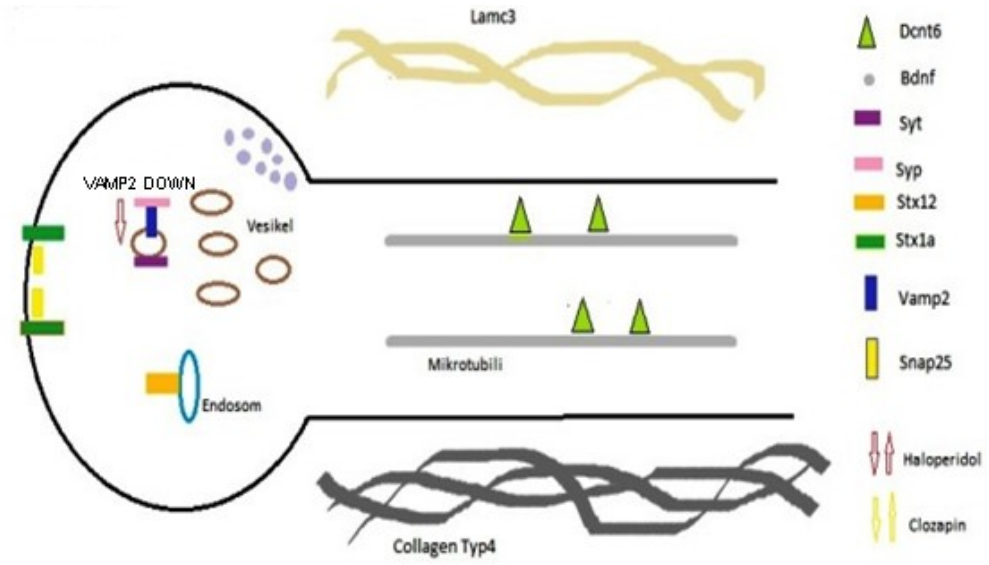


Abb.15c: Graphische Darstellung einer Synapse im Gyrus Dentatus und der in dieser Arbeit untersuchten Gene (DCTN-6, BDNF, SYT, SYP, STX12, STX1a, VAMP-2, SNAP-25, LAMC-3, COLA4A). Darstellung der Regulationstendenz unter Haloperidol (⇩ = Herabregulation, ⇧ = Heraufregulation) und unter Clozapin (⇩ = Herabregulation, ⇧ = Heraufregulation). Im Gyrus Dentatus zeigt sich unter dem Einfluss von Haloperidol eine verminderte Expression des Gens VAMP-2.

Im Gyrus Dentatus zeigen sich in dieser Arbeit keine statistisch signifikanten Veränderungen der untersuchten Gene in der qRT-PCR Versuchsreihe. Eine verminderte Expression des Gens VAMP-2 konnte im Luminex Verfahren unter Haloperidoleinfluss detektiert werden (Abb. 15c). Unter der Gabe von Clozapin konnte in beiden Verfahren keine statistisch signifikante Veränderung der Gene nachgewiesen werden. Im Luminex Verfahren konnte lediglich eine marginal siginfikante Heraufregulation für die Gene STX1a und STX12 detektiert werden. Für letzteres Gen findet sich in der qRT-PCR eine marginal signifikante entsprechende Regulationstendenz unter dem Einfluss von Clozapin. In der qRT-PCR konnte ebenfalls für das Gen SYT-6 eine Heraufregulation unter Haloperidol als Trend ermittelt werden. VAMP-2 wird in dieser Arbeit unter dem Einfluss von Haloperidol, wie schon im prälimbischen Kortex, vermindert exprimiert. In den Arbeiten von Müller et al. (2011) und Forrest et al. (2012) führte chronischer Stress zu einer vermehrten Expression von VAMP-2 im Hippokampus, bzw. die Imitation einer perinatalen Infektion, zu einer vermehrten Expression von VAMP-1. Diesen Ergebnissen entsprechend führte der Einflussfaktor Hypoxie in der Arbeit von Sommer et al. (2010) zu einer vermehrten Expression von VAMP-2 im Putamen. Haloperidol scheint diesem

Effekt in gesunden Ratten durch eine Herabregulation des Gens entgegenzuwirken. Weitere Studien mit Tiermodellen zur Schizophrenie und anschließender antipsychotischer Therapie müssten folgen, um die hier genannte These zu bestätigen. Interessanterweise führt Clozapin in der qRT-PCR Versuchsreihe zu einer, wenn auch nicht statistisch signifikanten Heraufregulation aller betrachteter Gene in der Gehirnregion Gyrus Dentatus.

4.4.2 Cornu Ammonis 1

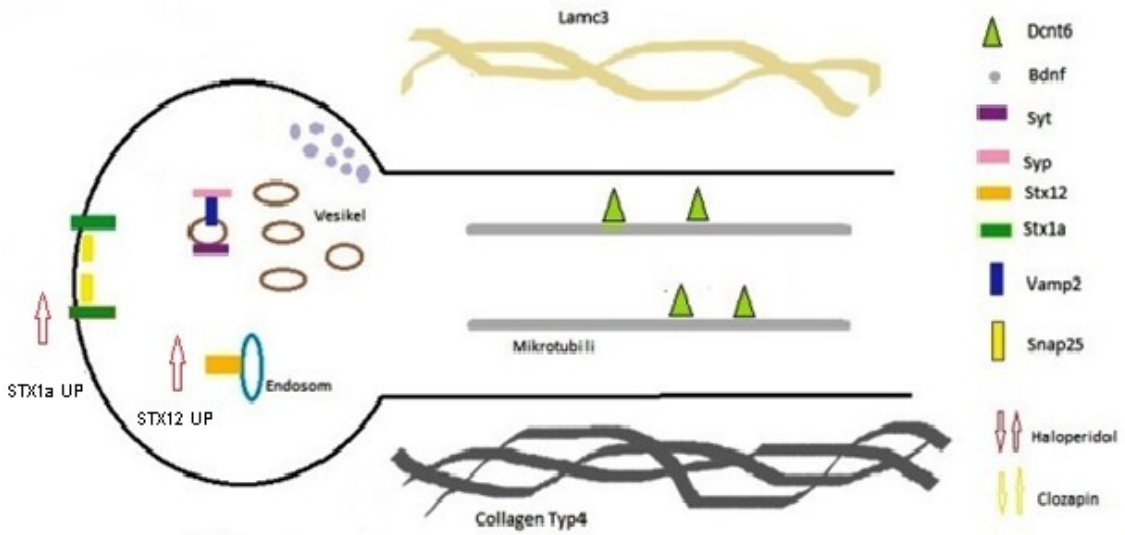


Abb.15e: Graphische Darstellung einer Synapse im Cornu Ammonis 1 und der in dieser Arbeit untersuchten Gene (DCTN-6, BDNF, Syt, SYP, STX12, STX1a, VAMP-2, SNAP-25, LAMC-3, COLA4A). Darstellung der Regulationstendenz unter Haloperidol (⇩ = Herabregulation, ⇧ = Heraufregulation) und unter Clozapin (⇩ = Herabregulation, ⇧ = Heraufregulation). In der Hirnregion CA1 zeigt sich unter dem Einfluss von Haloperidol eine vermehrte Expression der Gene STX1a und STX12.

Wie schon in den anderen Hirnregionen zuvor, zeigt Haloperidol auch in der Hirnregion CA1 einen stärkeren Effekt auf das Expressionsverhalten der untersuchten Gene als Clozapin. STX1a wird nach Haloperidolgabe in der Region CA1 vermehrt exprimiert (Abb. 15e). Diese Regulationstendenz ist sowohl in der qRT-PCR als auch in der Luminex Versuchsreihe unter der Gabe von Haloperidol statistisch signifikant. Ferner zeigt sich im Luminex Verfahren auch das Gen STX12 unter der Gabe von Haloperidol statistisch signifikant heraufreguliert. Bei den Ergebnissen des qRT-PCR Verfahrens lassen sich zudem marginal signifikante Veränderungen für STX12 unter Haloperidoleinfluss (heraufreguliert) und DCTN-6 nach der Gabe von Clozapin (herabreguliert) finden. Zu diesem Zeitpunkt liegen keine weiteren Studien vor, die

den Einfluss von Antipsychotika auf das Expressionsverhalten von STX1a im Hippokampus von Rattenhirnen untersuchen, so dass weitere Studien folgen müssten, um die hier dargestellten Ergebnisse zu bestätigen. Barakauskas et al. (2010) konnten in ihrer Arbeit analog zu den hier erzielten Ergebnissen eine vermehrte Expression von STX1a unter Haloperidolgabe nachweisen. Nakahara et al. (1998) wiesen in ihrer Arbeit hingegen eine verminderte Expression von STX1a nach Haloperidolapplikation nach. Untersucht wurde hier jedoch nicht der Hippokampus, sondern der ventromediale Teil des Nucleus caudatus, bzw. der Nucleus accumbens. In einer weiteren Studie wurden männliche Sprague-Dawley Ratten für 28 Tage Haloperidol (0,1mg/kg/d), Olanzapin (1mg(kg/d), Lithium (25,5mg/d) oder Lithium in Kombination mit einem der beiden Antipsychotika behandelt. Nach den 28 Tagen wurden die Tiere getötet, Hirnproben aus der Region des Parietallappens entnommen und mittels Westernblot die Proteinkonzentration von Snap-25 und Syntaxin 33 und 35 bestimmt. Entgegen den Ergebnissen in dieser Arbeit führte Haloperidol zu keiner Veränderung der Syntaxine, wohingegen sich unter Olanzapin eine erhöhte Konzentration nachweisen ließ (Scarr und Dean, 2012). Auf Grund des unterschiedlichen Studiendesigns und der unterschiedlichen untersuchten Syntaxin-Isoformen lassen sich die hier zitierten Studien nur eingeschränkt mit den Ergebnissen dieser Arbeit vergleichen. Die Gabe von Haloperidol führt jedoch in tierexperimentellen Studien zu einer veränderten Expression von STX1a, wobei die Tendenz dieser Veränderung hirnregionspezifisch zu sein scheint. In der Arbeit von Sommer et al. (2010), in der der Einfluss von Hypoxie und anschließender Behandlung mit Clozapin auf das Expressionsverhalten unterschiedlichen Gene in Rattenhirnen untersucht wurde, zeigte sich STX1a im Temporallappen unter dem Einflussfaktor „Hypoxie“ vermindert exprimiert. Eine anschließende Gabe von Clozapin hatte, wie auch in dieser Studie, keinen statistisch signifikanten Einfluss auf das Expressionsverhalten. Interessant wäre nun zu sehen, ob eine anschließende Haloperidolapplikation, wie in dieser Arbeit, zu einem Ausgleich der Herabregulation von STX1a in dieser Hirnregion führen würde. Unter Haloperidol kommt es, wie schon im Gyrus cinguli, zu einer Heraufregulation von STX1a in der Region CA1. Schmitt et al. (2012) untersuchten mittels *Microarray* und PCR Analyse den superioren temporalen Kortex von zehn Patienten mit Schizophrenie nach Veränderungen von Genen, die in den Prozess der synaptischen Plastizität involviert sind. Es konnte eine Herabregulation von STX12 und STX1a detektiert werden (Schmitt et al. 2012). Haloperidol führt in dieser Arbeit zu einer korrigierenden Heraufregulation dieser Gene. Über eine vermehrte Expression von STX1a und STX12, beides Gene, die direkt in die synaptische Übertragung involviert sind, scheint Haloperidol eine Steigerung dieser synaptischen Transmission zu bewirken. Weitere Tierversuche, in denen der Einfluss von Antipsychotika auf das Expressionsverhalten von

Genen der Präsynapse untersucht wird, müssten folgen, um diese These zu verifizieren. Diese Arbeit ist die Erste, welche den Einfluss von Antipsychotika in einem tierexperimentellen Modell auf die Expression von STX12 in einer hippokampalen Region untersucht hat. Ebenfalls liegen keine Arbeiten zu Tiermodellen der Schizophrenie vor, die eine Veränderung der Expression von STX12 im Hippokampus untersuchen. Wie schon zuvor beschrieben, korreliert die Syntaxin-Expression im temporalen Kortex bei an Schizophrenie Erkrankten negativ mit dem Alter (Sokolov et al. 2000). Zudem ist die Interaktion von Syntaxin/Snap-25 bei Patienten mit Schizophrenie gestört (Castillo et al. 2010). Wong und Mitarbeiter (2004) stellten erstmals einen Zusammenhang zwischen Polymorphismen im STX1a-Gen und der Erkrankung Schizophrenie her. Dies lässt die Schlussfolgerung zu, dass eine gesteigerte Expression von STX1a unter antipsychotischer Therapie die gestörte synaptische Übertragung auf molekularer Ebene ausgleichen könnte.

4.4.3 Cornu Ammonis 3

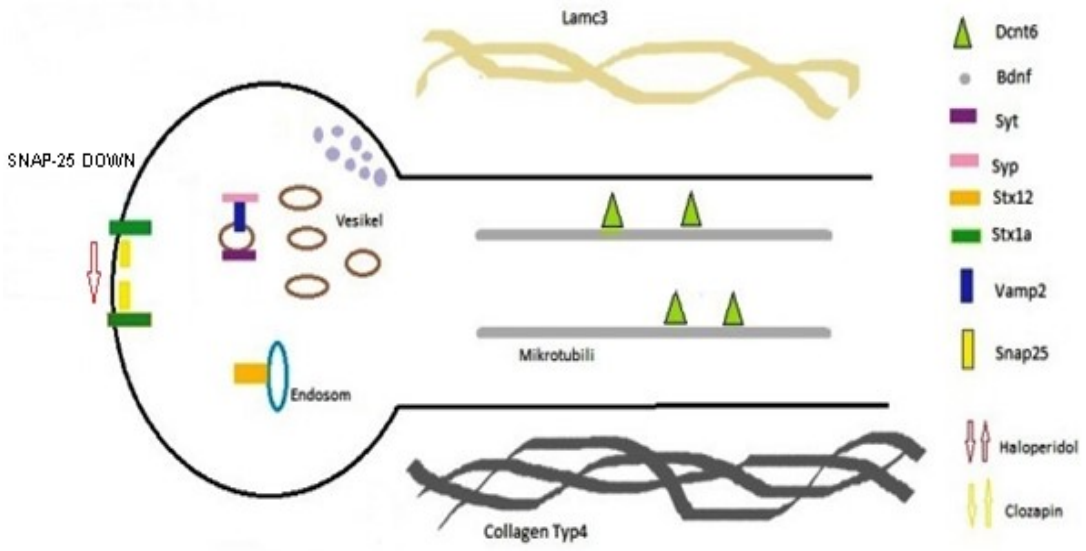


Abb.15f: Graphische Darstellung einer Synapse im Cornu Ammonis 3 und der in dieser Arbeit untersuchten Gene (DCTN-6, BDNF, SYT, SYP, STX12, STX1a, VAMP-2, SNAP-25, LAMC-3, COLA4A). Darstellung der Regulationstendenz unter Haloperidol (⇩ =Herabregulation, ⇧ = Heraufregulation) und unter Clozapin (⇩= Herabregulation, ⇧= Heraufregulation). In der Hirnregion CA3 zeigt sich unter Haloperidoleinfluss einer verminderten Expression des Genes SNAP-25.

In der CA3-Region des Hippokampus kommt es unter Haloperidoleinfluss im qRT-PCR Verfahren zu einer statistisch signifikanten verminderten Expression von SNAP-25 (Abb. 15f). Im Luminex Verfahren konnte dieses Ergebnis nicht bestätigt werden. Als Trend zeigen sich

die Gene SYT-6 und DCTN-6 unter Haloperidoleinfluss vermindert exprimiert. Interessanterweise sind alle Gene, wenn auch nicht durchgehend statistisch signifikant, in der qRT-PCR sowohl in der Haloperidol-, als auch in der Clozapingruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe herabreguliert. Weitere Arbeiten, die den Einfluss von Haloperidol auf das Expressionsverhalten von SNAP-25 untersuchen, kommen zu sehr unterschiedlichen Ergebnissen. In einer Studie von Barr et al. (2006) wurden männliche Sprague-Dawley Ratten 21 Tage mittels intraperitonealer Injektion mit Haloperidol (1mg/kg/Tag) behandelt. Anschließend erfolgte die Messung der Immunreaktivität von Snap-25 in den einzelnen Regionen des Hippokampus. Es zeigte sich im Gegensatz zu den hier erzielten Ergebnissen eine Erhöhung der Immunreaktivität von Snap-25 besonders in der Moosfaserregion von CA3. Zu Bedenken ist hier, dass die Applikationsdauer von Haloperidol kürzer war und sich die Applikationsart, wie auch die Nachweismethode in den beiden Arbeiten unterscheiden. In dieser Arbeit wurde die mRNA gemessen, Barr et al. haben jedoch das funktionsfähige Protein bestimmt. Dass die Veränderung der Expression von SNAP-25 unter Haloperidoleinfluss abhängig von der untersuchten Hirnregion ist, zeigen wiederum die Studien von Barakauskas et al. (2010) - SNAP-25 hoch reguliert unter Haloperidol im ventromedialen Teil des *Nucleus caudatus*- und von Nakahara et al. (1998) - SNAP-25 herunterreguliert unter Haloperidol im Nucleus accumbens- im Vergleich zu einer hier gezeigten verminderten Expression in der Region CA3. In einer Studie von Ozdemir et al. (2012) wurden *Swiss-albino*-Mäusen zunächst fünf Tage der NMDA-Antagonist MK-801 verabreicht. Dieser führt zu Verhaltensweisen ähnlich der Positivsymptomatik der Schizophrenie. Anschließend erhielten zwei Gruppen Haloperidol (1mg/kg/Tag) oder Clozapin (5mg/kg/Tag) über das Trinkwasser über einen Zeitraum von 14 Tagen. Hiernach wurden die Versuchstiere getötet und es erfolgte ein Nachweis der Proteinkonzentration von Snap-25 im Frontalhirn und im Hippokampus. Die Applikation von MK-801 hatte, wie eine anschließende Gabe von Haloperidol, keinen signifikanten Einfluss auf Snap-25. Clozapin hingegen führte zu einer Erhöhung der Snap-25-Proteinkonzentration im Hippokampus. Auf Grund des Designs dieser Studie ist jedoch nicht auszuschließen, dass die Wirkung von Clozapin auf Snap-25 auf die vorherige Gabe von MK-801 zurückzuführen ist. Zudem erfolgte hier die Betrachtung des Hippokampus als Ganzes und nicht wie in der hier durchgeführten Arbeit eine Untersuchung der einzelnen hippokampalen Regionen. Darüber hinaus wurde erneut nicht das Gen, sondern die Proteinkonzentration bestimmt. In einer Studie von Karlsen et al. (2013) wurde der Einfluss eines weiteren NMDA-Antagonisten, Phencyclidin (PCP), auf das Expressionsverhalten von SNAP-25 im Hippokampus von Rattenhirnen untersucht. In der Gruppe der Tiere, die 80 Tage lang PCP erhielten, zeigte sich eine statistisch signifikante Herabregulation von SNAP-25 in der

Hippokampusregion CA4. Eine anschließende Gabe eines Antipsychotikums erfolgte nicht. In der Arbeit von Müller et al. (2012) führte chronischer Stress zu keiner Veränderung der Expression von SNAP-25 im Hippokampus, jedoch zu einer verminderten Expression im präfrontalen Kortex. Die Ergebnisse dieser Studien sind zum Teil widersprüchlich, lassen aber dennoch die Schlussfolgerung zu, dass eine Veränderung der Expression von SNAP-25 in tierexperimentellen Studien Hinweise auf einen Beitrag von SNAP-25 zur Pathogenese der Schizophrenie geben könnten und Antipsychotika über eine Veränderung der Expression von SNAP-25 ihre Wirksamkeit entfalten könnten. Untermauert wird diese These durch die bereits zuvor erwähnten Arbeiten von Jeans et al. (2006) und Oliver et al. (2009), wie auch die Arbeit zum DISC-1 Gen in transgenen Mäusen (Pletnikov et al. 2008). Ein weiteres Tiermodell der Schizophrenie (Sommer et al. 2010) kam zu Ergebnissen, die denen in dieser Arbeit entsprechen. Hypoxie führte in dieser Studie zu einer vermehrten Expression von SNAP-25 im Temporallappen der untersuchten Ratten. Eine anschließende Behandlung mit Clozapin hatte wie in dieser Arbeit keinen statistisch signifikanten Effekt. Im Gegensatz zu Clozapin könnte Haloperidol möglicherweise analog zu den hier erzielten Ergebnissen dieser vermehrten Expression von SNAP-25 entgegenwirken. Die Gabe von Haloperidol erfolgte in der Arbeit von Sommer et al. jedoch nicht. Weitere Studien, die den Effekt von Antipsychotika auf die Expression präsynaptischer Gene in der Region CA3 untersuchen, müssten jedoch folgen, um die hier genannten Ergebnisse und Tendenzen zu verifizieren.

4.5 Vergleich der Ergebnisse des qRT-PCR und des Luminex Verfahrens

Das qRT-PCR Verfahren ist weltweit etabliert als Goldstandart zum Nachweis von Veränderungen der Genexpression. Es bietet die Vorteile einer hohen Sensitivität und eines präzisen Nachweises, bei relativ geringem Arbeits- und Zeitaufwand, einem niedrigen Risiko für Kontaminationen der Proben, sowie geringen Kosten. Die qRT-PCR ist in vielen diagnostischen Bereichen etabliert, u.a. in der Mikrobiologie und Infektiologie zur Detektion von Viren und Bakterien, im Bereich der Onkologie zum Nachweis von chromosomalen Translokationen und Einzelnukleotid-Polymorphismen, wie aber auch zur gezielten Untersuchung von Veränderungen der Genexpression (Klein 2002). In dieser Arbeit zeigt sich nur in der Hirnregion CA1 für das Gen STX1a eine einheitliche Veränderung der Regulationstendenz bei beiden Testverfahren (STX1a hoch reguliert unter Haloperidol). Werden die marginal signifikanten Ergebnisse in den Vergleich der beiden Nachweismethoden mit einbezogen, zeigen sich weitere Übereinstimmungen in den Regionen DG (STX12 hoch

reguliert unter Clozapin) und CA1 (STX12 hoch reguliert unter Haloperidol). Die Abbildungen 16a-d zeigen in einer dreidimensionalen Darstellung die marginalen und höchst signifikanten Veränderungen der Expression der untersuchten Gene unter Haloperidol und Clozapin für beide Verfahren. Dennoch zeigt diese Arbeit, dass das auf der Luminex Technologie basierende *QuantiGene Plex Assay 2.0* für den Nachweis von mRNA bei dem hier durchgeführten Versuchsmodell ungeeignet scheint. Der Hersteller verspricht mit dem *QuantiGene Plex Assay* ein Verfahren, welches simultan bis zu 80 Gene in einer Probe untersuchen kann. Dies entspricht ungefähr 20 PCR-Durchläufen. Es ist keine RNA-Aufreinigung und keine cDNA-Synthese mittels reverser Transkriptase nötig, wodurch die Risiken möglicher Probenverunreinigungen und Fehlerquellen minimiert werden. So ist RNA wesentlich anfälliger als DNA und auch die Taq-Polymerase kann durch verschiedene Stoffe, u.a. Aciclovir in ihrer Funktion beeinträchtigt werden (Flagella et al. 2006; Bustin und Nolan, 2004). Das auf fluoreszierenden *Beads* basierende Luminex Verfahren findet in abgewandelter Form zunehmend in unterschiedlichen medizinischen und wissenschaftlichen Bereichen Verwendung. So kann es zur Hepatitis B- und C-, wie auch zur HIV-Diagnostik genutzt werden (Yao et al. 2004; Gleaves et al. 2002; Elbeik et al. 2004). Des Weiteren kann es zum Nachweis von proinflammatorischen Cytokinen in humanem Blutplasma dienen, ein Testverfahren, welches in der Entwicklung neuer Medikamente eine wichtige Rolle spielt (Prabhakar et al. 2002). Für die Diagnostik von viralen Infektionen der oberen Atemwege wurde das ebenfalls auf fluoreszierenden *Beads* basierende *xTAG respiratory virus panel (RVP) fast Assay* entwickelt, welches 19 verschiedene Virusarten oder Virussubtypen detektieren kann. Studien, welche das Luminex Verfahren mit dem qRT-PCR Verfahren gegenüberstellen, kommen zu unterschiedlichen Ergebnissen. In einer Arbeit wurde das *xTAG respiratory virus panel (RVP) fast Assay* u.a. mit der qRT-PCR verglichen. Hierbei zeigte sich letzteres Verfahren sensitiver und spezifischer im Nachweis der viralen RNA (Choudhary et al. 2016). In einer weiteren Studie (Zhang et al. 2006) wurden *small interfering RNAs* (siRNAs) mit dem qRT-PCR und dem Luminex Verfahren nachgewiesen und die Ergebnisse beider Verfahren miteinander verglichen. Hierbei zeigten sich, bis auf eine leicht erhöhte Sensitivität für die qRT-PCR, keine weiteren Unterschiede und die Autoren der Arbeit kommen zu dem Schluss, dass das Luminex Verfahren zum Nachweis von siRNAs eine Alternative zur herkömmlichen qRT-PCR darstellt. In einer Arbeit von Munro et al. (2013) wurden beiden Testverfahren zum Nachweis verschiedener Influenzaviren angewandt. Die Ergebnisse des Luminex Verfahrens entsprachen im Großteil denen der qRT-PCR. Bei zwei Influenza Subtypen (Influenza H1 und Influenza Typ B) zeigte sich jedoch eine signifikant geringere Sensitivität beim Luminex Verfahren. In einer weiteren Studie (Worwa et al. 2014) wurden beide Verfahren zum Nachweis von

Einzelnukleotid-Polymorphismen im West-Nil-Virus angewendet. Auch hier zeigte sich die klassische qRT-PCR in Sensitivität und Spezifität dem Luminex Verfahren überlegen. Ein direkter Vergleich der hier zitierten Studien untereinander, wie auch mit den in dieser Arbeit erzielten Ergebnissen, ist nur eingeschränkt möglich, da sich die Studiendesigns zu sehr unterscheiden. Keiner der zitierten Studien verwendete das *QuantiGene Assay* und als Material dienten keine eingefrorenen Hirnproben von Ratten. Des Weiteren wurden unterschiedliche qRT-PCR Methoden durchgeführt und nicht durchgehend, wie in dieser Arbeit, die *SYBR Green* qRT-PCR. Kibriya et al. (2014) verwendeten in ihrer Studie das *QuantiGene Plex Assay* zum Nachweis von Telomeren, repetitiven DNA-Sequenzen, die das Ende eines Chromosoms markieren und mit Zellalterung und der Entstehung von Karzinomen assoziiert sind, und verglichen diese Ergebnisse mit denen einer qRT-PCR. Hierfür wurde DNA aus humanen Blutroben extrahiert und gezielt Telomere mittels *QuantiGene Plex Assay* und qRT-PCR nachgewiesen. Am Ende kommen die Autoren zu dem Schluss, dass sich die Ergebnisse beider Testverfahren entsprechen. Obwohl in dieser Arbeit das *QuantiGene Assay* verwendet wurde, sind dennoch gravierende Unterschiede zu dieser Studie vorhanden, so dass ein direkter Vergleich nicht möglich ist. So wiesen Kibriya et al. (2014) DNA und nicht mRNA nach, zudem stammten die untersuchten Proben nicht aus eingefrorenen Rattenhirnen, sondern aus menschlichen Blutproben. In einer weiteren Studie (Hall et al. 2015) wurde das *QuantiGene Plex Assay 2.0* und die qRT-PCR verwendet um Gene zur Subtypisierung des B-Zell-Lymphoms nachzuweisen. Hierfür wurden in Formalin fixierte und Paraffin eingebettete B-Zell-Lymphomtumorproben verwendet und die Ergebnisse mit bestehenden *Microarray*-Daten verglichen. Das *QuantiGene Assay* zeigte sich der qRT-PCR überlegen. Die Autoren weisen jedoch auch daraufhin, dass die qRT-PCR zum Gennachweis in Formalin fixierten und Paraffin eingebetteten Gewebeproben auf Grund der Anwesenheit von kreuzreagierenden RNA-Bestandteilen anfällig für Fehler ist. In der Arbeit von Cheng et al. (2012) wurde das *QuantiGene Assay 2.0* zum Nachweis einer möglichen veränderten Expression von Cytokinen und Chemokinen verwendet, nachdem zuvor bei den Versuchstieren (Schweine) eine Stimulation von *Toll-Like*-Rezeptoren durchgeführt wurde. Zur Validierung der Ergebnisse wurde ebenfalls eine konventionelle qRT-PCR durchgeführt und es zeigten sich vergleichbare Ergebnisse in beiden Nachweismethoden. In einer weiteren Studie (Metzger et al. 2013) wurde der Einfluss von Fasten, bzw. übermäßige Nahrungszufuhr auf das Expressionsverhalten von verschiedenen Wachstumsfaktoren in der Leber von Lachsen untersucht. Der Gennachweis fand mittels *QuantiGene Plex Assay* und qRT-PCR statt. Auch hier entsprachen sich die Ergebnisse beider Testverfahren. Zwar wurden gefrorene Gewebeproben untersucht, jedoch nicht, wie in der vorliegenden Arbeit, gefrorene Hirnproben von Ratten. Es existieren zu diesem

Zeitpunkt keine weiteren Studien mit einem exakt ähnlichen Versuchsaufbau. In einer weiteren Studie (Hammati et al. 2013) wurde das *QuantiGene Plex Assay* zum Nachweis von Genen in Rattenhirnen verwendet. Eine qRT-PCR wurde jedoch nicht parallel durchgeführt. Zum jetzigen Zeitpunkt ist diese Studie die Erste, in welcher eine Veränderung der Genexpression in gefrorenen Rattenhirnproben mittels *QuantiGene Assay* und qRT-PCR untersucht wurde. Auf Grund dessen müssten weitere Studien mit einem ähnlichen Versuchsaufbau wie in dieser Arbeit folgen, welche das *QuantiGene Assay* mit der konventionellen qRT-PCR vergleichen, um die hier gezeigte Tendenz der Unterlegenheit des *QuantiGene Assays* gegenüber der qRT-PCR zu verifizieren.

Clozapin - qRT-PCR

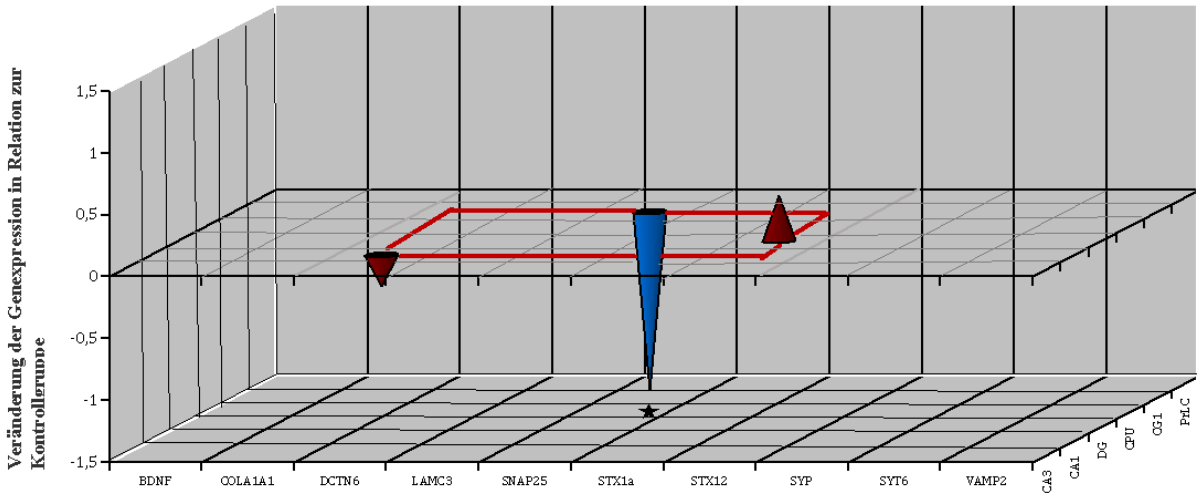


Abb. 16a: Darstellung der Veränderung der Genexpression unter dem Einfluss von Clozapin im qRT-PCR Verfahren. Auf der X-Achse sind die untersuchten Gene dargestellt. Die Y-Achse zeigt die Veränderung der Genexpression relativ zur Kontrollgruppe und die Z-Achse bildet die betrachteten Hirnregionen ab. Die roten Pfeiler stehen für eine Herauf-, die blauen Pfeiler für eine Herabregulation des jeweiligen Genes. Stern für p≤0,05, ohne Markierung für p≤0,1-0,05. Die in der Nullebene dargestellten roten Vernetzungslinien zeigen mögliche Gen-Gen-Interaktionen an.

Clozapin - Luminex

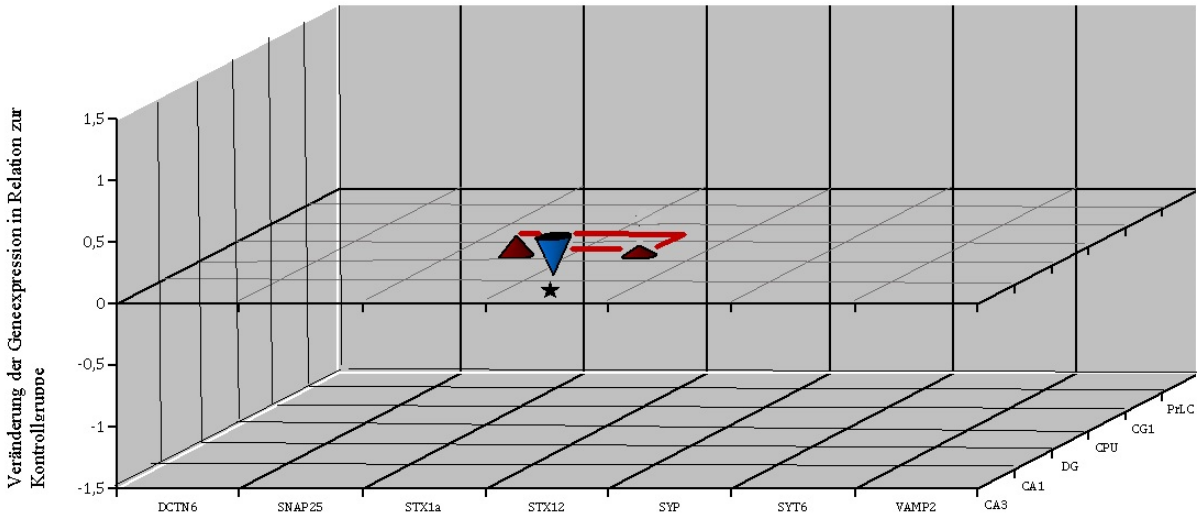


Abb. 16b: Darstellung der Veränderung der Genexpression unter dem Einfluss von Clozapin im Luminex Verfahren. Auf der X-Achse sind die untersuchten Gene dargestellt. Die Y-Achse zeigt die Veränderung der Genexpression relativ zur Kontrollgruppe und die Z-Achse bildet die betrachteten Hirnregionen ab. Die roten Pfeiler stehen für eine Herauf-, die blauen Pfeiler für eine Herabregulation des jeweiligen Genes. Stern für p≤0,05, ohne Markierung für p≤0,1-0,05. Die in der Nullebene dargestellten roten Vernetzungslinien zeigen mögliche Gen-Gen-Interaktionen an.

Haloperidol - qRT-PCR

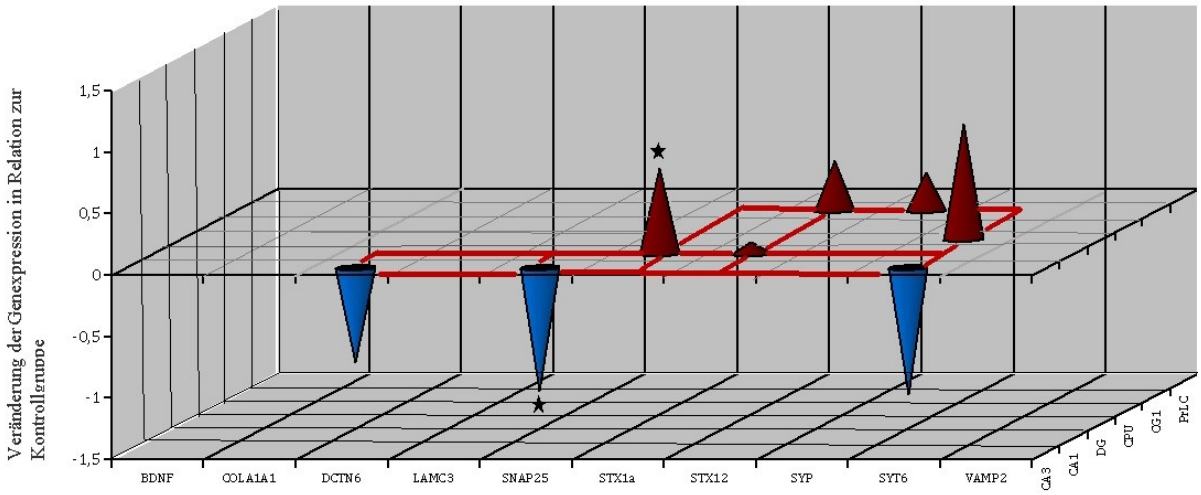


Abb.16c: Darstellung der Veränderung der Genexpression unter dem Einfluss von Haloperidol im qRT-PCR Verfahren. Auf der X-Achse sind die untersuchten Gene dargestellt. Die Y-Achse zeigt die Veränderung der Genexpression relativ zur Kontrollgruppe und die Z-Achse bildet die betrachteten Hirnregionen ab. Die roten Pfeiler stehen für eine Herauf-, die blauen Pfeiler für eine Herabregulation des jeweiligen Genes. Stern für p≤0,05, ohne Markierung für p≤0,1-0,05. Die in der Nullebene dargestellten roten Vernetzungslinien zeigen mögliche Gen-Gen-Interaktionen an.

Haloperidol - Luminex

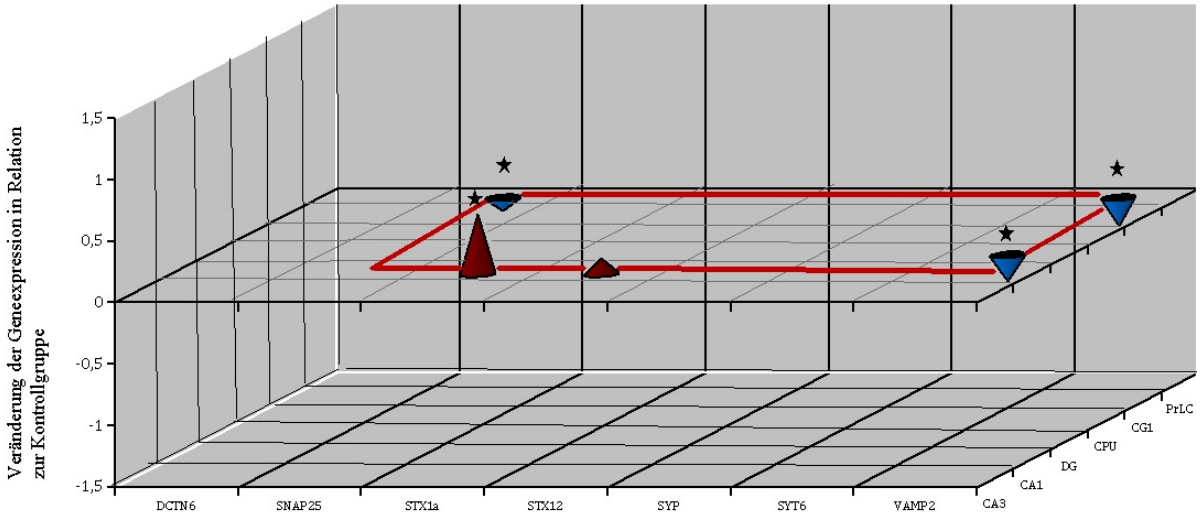


Abb.16d: Darstellung der Veränderung der Genexpression unter dem Einfluss von Haloperidol im Luminex Verfahren. Auf der X-Achse sind die untersuchten Gene dargestellt. Die Y-Achse zeigt die Veränderung der Genexpression relativ zur Kontrollgruppe und die Z-Achse bildet die betrachteten Hirnregionen ab. Die roten Pfeiler stehen für eine Herauf-, die blauen Pfeiler für eine Herabregulation des jeweiligen Genes. Stern für p≤0,05, ohne Markierung für p≤0,1-0,05. Die in der Nullebene dargestellten roten Vernetzungslinien zeigen mögliche Gen-Gen-Interaktionen an.

5. Limitation und Ausblick

1) Das Kollektiv dieser Arbeit ist mit n = 10 für jede Gruppe relativ klein und die Anzahl vergleichbarer Studien gering, so dass zu einer Verifizierung der hier erzielten Ergebnisse Studien mit identischem Design und mit einem größeren Kollektiv benötigt werden.
2) Die hier untersuchten Ratten waren ausschließlich männlich, so dass es interessant wäre, in einer Studie mit weiblichen und männlichen Ratten einen möglichen Geschlechtseinfluss zu untersuchen.
3) Die Applikationsdauer der Antipsychotika betrug in dieser Arbeit 12 Wochen. Die wenigen Arbeiten mit einem ähnlichen Studiendesign verwendeten in der Regel eine kürzere Applikationszeit (28 Tage) und Applikationsart (i.m., i.p. und i.v.) und erzielten zum Teil unterschiedliche Ergebnisse. Interessant wäre es in weiteren Studien herauszuarbeiten, ob diese Differenz tatsächlich auf die Applikationszeit oder –art zurückzuführen ist.
4) Zu diesem Zeitpunkt existieren relativ wenig Studien, die das Luminex und PCR Verfahren simultan zum Nachweis von Genexpression in einer Arbeit verwendet haben, so dass weitere Studien folgen müssten um die hier dargestellte Überlegenheit des PCR Verfahrens zu bestätigen.
5) Es handelt sich in dieser Arbeit um eine explorative, tierexperimentelle Studie, so dass die Ergebnisse nur schwer auf den Menschen und die Erkrankung der Schizophrenie zu übertragen sind. Weitere Studien, mit einem ähnlichen Design der Arbeit von Sommer et al. (2011), die potenziellen Risikofaktoren einer Schizophrenie (neonatale Hypoxie, Stress oder eine gestörte Hirnentwicklung) und eine anschließende Gabe von Antipsychotika, im idealen Fall die simultane Gabe von Atypika und Typika, kombinieren, müssten folgen um eine größere Aussagekraft und bessere Übertragbarkeit zu erreichen.
6) Änderungen der mRNA müssen sich nicht zwingend in einer entsprechenden Änderung der Proteinkonzentration wiederspiegeln (MacDonald et al. 2005). Auf Grund dessen wäre es in einer weiteren Studie interessant simultan die Änderungen der mRNA Konzentration und die Konzentration der von diesen Genen codierten Proteine zu messen.

6. Literaturverzeichnis

1) Abe TK, Honda T, Takei K, Mikoshiba K, Hoffman-Kim D, Jay DG, Kuwano R **(2008)**: Dynactin is essential for growth cone advance. In: Biochemical and Biophysical Research Communications 372 (3): 418–422.

2) Abi-Dargham A, Gil R, Krystal J, Baldwin RM, Seibyl JP, Bowers M. et al. **(1998)**: Increased Striatal Dopamine Transmission in Schizophrenia: Confirmation in a Second Cohort. In: Am J Psychiatry 155: 761–767.

3) Abi-Dargham A, Rodenhiser J, Printz D, Zee-Ponce Y, Gil R, Kegeles, LS. et al. **(2000)**: Increased baseline occupancy od D2 receptors by dopamine in schizophrenia. In: PNAS 97(14): 8104–8109.

4) Adler CM, Malhotra AK, Elman I, Goldberg T, Egan M, Pickar D, Breier A **(1999)**: Comparison of Ketamine-induced Thought Disorder in Healthy Volunteers and Thought Disorder in Schizophrenia. In: Am J Psychiatry 156: 1646–1649.

5) Albus M **(2012)**: Clinical Courses of Schizophrenia. In: Pharmacopsychiatry Suppl. 1: 31-35.

6) Alvir JMJ, Liebermann JA, Saffermans AZ, Schwimmer JL, Schaaf JA **(1993)**: Clozapine-induced Agranulocytosis. In: The New England Journal of Medicine 329(3): 162–167.

7) Andreasen NC **(1985)**: Positive vs. Negative Schizophrenia: A Critical Evaluation. In: Schizophrenia Bulletin 11(3): 381–390.

8) Andreasen NC, Pressler M, Nopoulos P, Miller D, Hon BC **(2010)**: Antipsychotic Dose Euqivalent and Dose-Years: A Standardized Method for Comparing Exposure to Different Drug. In: Biol Psychiatry 67: 255-262.

9) Arnold SE, Franz BR, Gur RC, Gur RE, Shapiro RM, Moberg PJ, Trojanowski JQ **(1995)**: Smaller Neuron Size in Schizophrenia in Hippocampal Subfields That Mediate Cortical-Hippocampal Interactions. In: Am J Psychiatry 152: 738–748.

10) Ballmeier M, Schlagenhaus F, Toga A, Gallinat J, Koslowski M, Zoli M. et al. **(2008)**: Regional patterns and clinical correlates of basal ganglia morphology in non-medicated schizophrenia. In: Schizophrenia Research 106 (2-3): 140–147.

11) Barak T, Kwan KY, Louvi A, Demirbilek V, Saygı S, Tüysüz B et al. **(2011)**: Recessive LAMC3 mutations cause malformations of occipital cortical development. In: Nat Genet 43 (6): 590–594.

12) Barakauskas VE, Beasley CL, Barr AM, Ypsilanti AR, Li HY, Thornton AE. et al. **(2010)**: A Novel Mechanism and Treatment Target for Presynaptic Abnormalities in Specific Striatal Regions in Schizophrenia. In: Neuropsychopharmacology 35: 1226–1238.

13) Barakauskas VE, Moradian A, Barr AM, Beasley AM, Beasley CL, Rosoklija G, Mann JJ, Ilievski B, Stankov A, Dwork AJ, Falkai P, Morin GB, Honer WG **(2016)**: Quantitative mass spectrometry reveals changes in SNAP-25 isoforms in schizophrenia. In: Schizophrenia Research 1-8.

14) Barr AM, Young CE, Phillips AG, Honer WG **(2006)**: Selective effects of typical antipsychotic drugs on SNAP-25 and synaptophysin in the hippocampal trisynaptic pathway. In: Int. J. Neuropsychopharm. 9:457–463.

15) Becher A, Drenckhahn A, Pahner I, Margittai M, Jahn R, Ahnert-Hilger G **(1999)**: The Synaptophysin-Synaptobrevin Complex: a Hallmark of Synaptic Vesicle Maturation. In: The Journal of Neuroscience 19(8): 1922–1931.

16) Bilder RM, Wu H, Bogerts B, Degreef G, Ashtari M, Alvir JMJ. et al. **(1994)**: Absence of Regional Hemispheric Volume Asymmetries in First-Episode Schizophrenia. In: Am J Psychiatry 151(10): 1437–1447.

17) Bornstein RA, Schwarzkopf SB, Olson SC, Nasrallah HA **(1992)**: Third-Ventricle Enlargement and Neuropsychological Deficit in Schizophrenia. In: Biol. Psychiatry 31: 954–961.

18) Brosius J, Tiedge, H **(2004)**: RNomenclature. In: RNA Biology 1: 81–83.

19) Brown S, Barraclough, B, Inskip H **(2000)**: Causes of the excess mortality of schizophrenia. In: The British Journal of Psychiatry 177: 212-217.

20) Brownstein MJ **(2004)**: PCR (Polymerase Chain Reaction). In: Encyclopedia of Biological Chemistry 3: 208–210.

21) Buonomano DV **(1998)**: CORTICAL PLASTICITY: From Synapses to Maps. In: Annu. Rev. Neurosci. 21: 149-186.

22) Bustin AS, Nolan T **(2004)**: Pitfalls of Quantitative RealTime Reverse-Transcription Polymerase Chain Reaction. In: Journal of Biomolecular Techniques. 15(3):155-166.

23) Carlson CD, Cavazzoni PA, Berg PH, Wei H, Beasley CM, Kane JM **(2003)**: An Integrated Analysis of Acute Treatment-Emergent Extrapyramidal Syndrome in Patients With Schizophrenia During Olanzapine Clinical Trials: Comparisons With Placebo, Haloperidol, Risperidone, or Clozapine. In: J Clin Psychiatry 64(8): 898–906.

24) Castillo MA, Ghose S, Tamminga CA, Ulery-Reynolds PG **(2010)**: Deficits in Syntaxin 1 Phosphorylation in Schizophrenia Prefrontal Cortex. In: Biological Psychiatry 67: 208–216.

25) Chana G, Lucero G, Salaria S, Lozach J, Du P, Woelck C, Everall I **(2009)**: Upregulation of NRG-1 and VAMP-1 in humain brain aggregates exposed to Clozapine. In: Schizophrenia Research 113: 273-279.

26) Cheng LK, Mompoint F, Guderian JA, Picone A, Orme IM, Coler RN. et al. **(2011)**: Transcriptional profiling of TLR-4/7/8-stimulated guinea pig splenocytes and whole blood by bDNA assay. In: Journal of Immunological Methods 373: 54-62.

27) Chien A, David BE, Trela JM **(1976)**: Deoxyribonucleic Acid Polymerae from the Extreme Thermophile Thermus aquaticus. In: Journal of Bacteriology 3: 1550–1557.

28) Chomczynski P, Sacchi N **(1987)**: Single-Step Method of RNA Isolation by Acid Guanidinium Thiocyanate-Phenol-Chloroform Extraction. In: Analytical Biochemistry 162:156–159.

29) Choudhary ML, Amand SP, Thike SA, Walimbe AM, Potdar VA, Chada MS, Mistra AC **(2016)**: Comparison of the Conventional Multiplex RT–PCR, Real Time RT–PCR and Luminex xTAGW RVP Fast Assay for the Detection of Respiratory Viruses. In: Journal of Medical Virology 88: 51-57.

30) Clade H **(2003)**: Fallbeispiel Schizophrenie: hohe soziale Kosten. In: Ärzteblatt 8: 353–354.

31) Cownsage KK, LeDoux JE, Monfils MH **(2010)**: Brain-Derived Neutrophic Factor: A Dynamic Gatekeeper of Neural Plasticity. In: Current Moleculart Pharmacology 3: 12–29.

32) Creese I, Burt DR, Snyder SH **(1976)**: Dopamine Receptor Binding Predicts Clinical and Pharmacological Potencies of Antipsychotic Drugs. In: Science 192: 481–483.

33) Crilly J **(2007)**: The history of clozapine and its emergence in the US market: a review and analysis. In: History of Psychiatry 18 (1): 39–60.

34) Davis JM **(1974)**: Dose equivalence of the anti-psychotic drugs. In: Journal of Psychiatric Research 11: 65–69.

35) Davis KL, Kahn RS, Ko G, Davidson M **(1991)**: Dopamine in Schizophrenia: A Review and Reconceptualization. In: Am J Psychiatry 148: 1474–1486.

36) De Ley J. **(1970)**: Reexamination of the Association Between Melting Point, Buoyant Density, and Chemical Base Composition of Deoxyribonucleic Acid. In: Journal of Bacteriology 3:738–754.

37) Didenko VV **(2001)**: DNA Probes Using Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET) Design and Applications. In: Biotechniques 5: 1106–1121.

38) Dragan AI, Pavlovic R, McGivney JB, Casas-Fine JR, Bishop ES, Strouse RJ, Schenerman MA, Geddes CD **(2012)**: SYBR green 1: Fluorescence Properties und Interaction with DNA. In: J Fluorescence 22: 1189–1199

39) Eastwood SL, Harrison PJ **(2005)**: Decreased expression of vesicular glutamate transporter 1 and complexin II mRNAs in schizophrenia: further evidence for a synaptic pathology affecting glutamate neurons. In: Schizophrenia Research 73 (2-3): 159–172.

40) Eastwood SL, McDonald B, Burnet PWJ, Beckwith JP, Kerwin RW, Harrison PJ **(1995)**: Decreased expression of mRNAs encoding non-NMDA glutamate receptors GluRl and GluR2 in medial temporal lobe neurons in schizophrenia. In: Molecular Brain Research 29 (2): 211–223.

41) Elbeik T, Surtihodi J, Destree M, Gorlin J, Holodniy M, Jortani SA **(2004)**: Multicenter Evaluation of the Performance Characteristics of the Bayer VERSANT HCV RNA 3.0 Assay (bDNA). In: Journal of Clinical Microbiology. 42(2): 565-569.

42) Falkai P, Bogerts B **(1986)**: Cell Loss in the Hippocampus of Schizophrenics. In: Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci 236: 154 –161.

43) Falkai P, Bogerts B, Schneider T, Greve B, Pfeiffer U, Pilz K. et al. **(1995)**: Disturbed planum temporale asymmetry in schizophrenia. A quantitative post-mortem study. In: Schizophrenia Research 14 (2): 161–176.

44) Farde L, Wiesel FA, Stone-Elander S, Halldin C, Nordtröm AL, Hall H, Sedvall G **(1990)**: Dopamine D2 receptors in neuroleptic-naive schizophrenic patients, A positron emission tomgraphy study with (11C) raclopride. In: Arch Gen Psychiatry 47(3): 213–219.

45) Flagella M, Bui S, Zheng Z, Nguyen CT, Zhang A, Pastor L, Ma Y, Yang W, Crawford KL, McMaster GK, Witney F, Luo Y **(2006)**: A multiplex branched DNA assay for parallel quantitative gene expression profiling. In: Analytical Biochemistry 352: 50–60.

46) Forrest CM, Khalil OS, Pisar M, Smith RA, Darlington LG, Stone TW **(2012)**: Prenatal activation of Toll-like receptors-3 by administration of the viral mimetic poly(I:C) changes synaptic proteins, N-methyl-D-aspartate receptors and neurogenesis markers in offspring. In: Molecular Brain Research 5(22): 1–12.

47) Fujiwara T, Snada M, Kofuji T, Yoshikawa T, Akagawa K **(2010)**: HPC-1/syntaxin 1A gene knockout mice show abnormal behavior possibly related to a disruption in 5-HTergic systems. In: European Journal of Neuroscience 32 (1): 99–107.

48) Gabriel SM, Haroutunian V, Powchik P, Honer WG, Davidson M, Davis P, Davis KI **(1997)**: Increased concentrations of presynaptic proteins in the cingulate cortex of subjects with schizophrenia. In: Arch Gen Psychiatry 54(6): 559-566.

49) Gao XM, Sakai K, Roberts RC, Conley RR, Dean B, Tamminga CA **(2008)**: Inotropic Glutamate Receptors and Expression of N-Methyl-D-Aspartate Receptor Subunits in Subregions of Human Hippocampus: Effects of Schizophrenia. In: Am J Psychiatry 157: 1141–1149.

50) Gersdorff N, Kohfeldt E, Sasaki T, Timpl R, Miosge N **(2006)**: Laminin 3 Chain Binds to Nidogen and Is Located in Murine Basement Membranes. In: Journal of Biological Chemistry 280 (23): 22146–22153.

51) Gil-Pisa I, Munarriz-Cuezva E, Ramos-Miguel A, Urigüen L, Meana JJ, García-Sevilla JA **(2012)**: Regulation of munc18-1 and syntaxin-1A interactive partners in schizophrenia prefrontal cortex: down-regulation of munc18-1a isoform and 75 kDa SNARE complex after antipsychotic treatment. In: Int. J. Neuropsychopharm. 15: 573–588.

52) Gleaves CA, Welle J, Campbell M, Elbeik T, Ng V, Taylor PE. et al. **(2002)**: Multicenter evaluation of the Bayer VERSANT™ HIV-1 RNA 3.0 assay: analytical and clinical performanc. In: Journal of Clinical Virology 25: 205-216.

53) Gnanaguru G, Bachay G, Biswas S, Pinzon-Duarte G, Hunter DD, Brunken W J **(2013)**: Laminins containing the 2 and 3 chains regulate astrocyte migration and angiogenesis in the retina. In: Development 140 (9): 2050–2060.

54) Gould DB, PhalanF, Campbell MSE, Sundberg JP, Vahedi KMP, Bousser MG, Heutink P, Miner JH, Tournier-Lasserve E, John SWM **(2006)**: Role of COL4A1 in Small-Vessel Disease and Hemorrhagic Stroke. In: The New England Journal of Medicine 354(14): 1489–1496.

55) Gur RE, Turetsky BI, Bilker WB, Gur RC **(1999)**: Reduced Gray Matter Volume in Schizophrenia. In: Arch Gen Psychiatry 56: 905–911.

56) Häfner H, an der Heiden W, Behrens S, Gattaz WF, Hambrecht M, Löffler W, Maurer K. et al. **(1998)**: Causes and Consequences of the Gender Difference in Age an Onset of Schizophrenia. In: Schizophrenia Bulletin 24(1): 99–113.

57) Halbreich U, Kinon BJ, Gilmore JA, Kahn LS **(2003)**: Elevated prolactin levels in patients with schizophrenia: mechanisms and related adverse effects. In: Psychoneuroendocrinology 28: 53–67.

58) Halfer W, Yip J **(2014)**: An organizing function of basement membranes in the developing nervous system. In: Mechanisms of Development 133: 1-10.

59) Hall H, Sedvall G, Magnusson O, Kopp J, Halldin C, Farde L **(1994)**: Distribution of D1- and D2-Dopamine Receptors, and Dopamine and Its Metabolites in the Human Brain. In: Neuropsychopharmacology 11(4): 245–256.

60) Hall JS, Usher S, Byers RJ, Higgins RC, Memon D, Radford JA, Linton KM **(2015)**: QuantiGene Plex Represents a Promising Tool for Cell-of-Origin Subtyping of Diffuse Large B-Cell-Lymphoma. In: The Journal of Molecular Diagnostics 17(4): 402-411.

61) Hammati F, Dargati L, Nasoohi S, Omidbakhsh R, Mohamed R, Chik Z. et al. **(2013)**: Neororestorative effect of FTY720 in rat model of Alzheimer's disease: Comparison with Memantine. In: Behavioural Brain Research 252: 415-421.

62) Hansen TE, Casey ED, Hoffman WF **(1997)**: Neuroleptic Intolerance. In: Schizophrenia Bulletin 23(4): 567–582.

63) Hayes E, Gavrilidis E, Kulakrni J **(2012)**: The Role of Oestrogen and Other Hormones in the Pathophisology and Treatment of Schizophrenia. In: Schizophrenia Research and Treatment: 1-8.

64) Haznedar MM, Buchsbaum MS, Hazlett EA, Shihabuddin L, New A, Siever LJ **(2004)**: Cingulate gyrus volume and metabolism in the schizophrenia spectrum. In: Schizophrenia Research 71 (2-3): 249–262.

65) Hietala J, Syvälahti E, Kuoppamäki M, Haaparanta M, Ruotsalainen U, Vuorio K. et al. **(1995)**: Presynaptic dopamine function in striatum of neuroleptic-naive schizophrenic patients. In: The Lancet 346: 1130–1131.

66) Higuchi R, Fockler C, Dollinger G, Watson, R **(1993)**: Kinetic PCR Analysis: Real-time Monitoring of DNA Amplification Reactions. In: Bio/Technology 11: 1026–1030.

67) Hill K, Mann L, Lewis KR, Stephenson CME, Nimmo-Smith I, McKenna PJ **(2004)**: Hypofrontality in schizophrenia: a meta-analysis of functional imaging studies. In: Acta Psychiatry Scand 110: 243–256.

68) Honea R, Crow TJ, Passingham D, Mackay CE **(2005)**: Regional Deficits in Brain Volume in Schizopgrenia: A Meta-Analysis of Voxel-Based Morphometry Studies. In: Am J Psychiatry 162: 2223–2245.

69) Honer WG, Falkai P, Bayer TG, Xie J, Hu L, Li HY. et al. **(2002)**: Abnormalities of SNARE Mechanism Proteins in Anterior Frontal Cortex in Severe Mental Illness. In: Cerebral Cortex 12: 349–356.

70) Hong SB, Lee TY, Kwak YB, Kim SN, Kwan JS **(2015)**: Baseline putamen volume as a predictor of positiv symptom reduction in patients at clinical high risk for psychosis: A preliminary study. In: Schizophrenia Research 169: 178-185.

71) Hui E, Gaffaney JD, Wang Z, Johnson CP, Evans, CS, Chapman ER **(2012)**: Mechanism and function of synaptotagmin-mediated membrane apposition. In: Nat Struct Mol Biol 18 (7): 813–821.

72) Idänpään-Heikkilä J, Alhava E, Olkinuora M, Palva I **(1975)**: Clozapine and Agranulocytosis. In: The Lancet 24: 611.

73) Imbeaud S, Gradudens E, Boulanger V, Barlet X, Zaborski P, Everno E, Mueller O, Schroeder A, Auffray C **(2005)**: Towards standardization of RNA quality assessment using user-independent classifiers of microcapillary electrophoresis traces. In: Nucleic Acids Research 33 (6): 1–12

74) International Human Genome Sequencing Consortium **(2001)**: Initial sequencing and analysis of the human genome. In: Nature 409: 860–921.

75) Iqbal MM, Rahman A, Husain Z, Mahmud SZ, Ryan WG, Feldman JM **(2003)**: Clozapine: A Clinical Review of Adverse Effects and Mangement. In: Annuals of Clinical Psychiatry 15(1): 33–48.

76) Jablensky, A **(2000)**: Epidemiology of schizophrenia: the global burden disease and disability. In: *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* (250), S. 274–285.

77) Jeans AF, Oliver PL, Johnson R, Capogna M, Vikman J, Molnár Z. et al. **(2007)**: A dominant mutation in Snap25 causes impaired vesicle trefficking, sensorimotor gating, and ataxia in the blind-drunk mouse. In: Proceedings of the National Academy of Sciences 104(7): 2431–2436.

78) Kane JM, Correll CU **(2010)**: Pharmacologic treatement of schizophrenia. In: Dialogues Clin Neuroscience 12(3):345–357.

79) Kapur S, Seeman P **(2001)**: Does Fast Dissociation From the Dopamine D2 Receptor Explain the Action of Atypical Antipsychotics?: A New Hypothesis. In: Am J Psychiatry 158:360–369.

80) Kapur S, Wadenberg ML, Remington G **(2000b)**: Are Animal Studies of Antipsychotics Appropriately Dosed? Lessons From the Bedside of the Bench. In: Can J Psychiatry 45: 241–246.

81) Kapur S, Zipursky R, Jones C, Remington G, Houle S **(2000a)**: Relationship Between Dopamine D2 Occupancy, Clinical response, and Side Effects: A Double-Blind PET Study of First-Episode Schizophrenia. In: Am J Psychiatry 157: 514–520.

82) Karlsen AS, Kaalund SS, Møller M, Plath N, Pakkenberg B **(2013)**: Expression of presynaptic markers in a neurodevelopmental animal model with relevance to schizophrenia. In: NeuroReport 24: 928–933.

83) Karson CN, Mrak RE, Schluterman KO, Sturner KQ, Sheng JG, Griffin WS **(1999)**: Alterations in synaptic proteins and their encoding mRNAs in prefrontal cortex in schizophrenia: a possible neurochemical basis for "hypofrontality". In: Molecular Psychiatry 4: 39-45.

84) Kawano M, Sawada K, Shimodera S, Ogawa Y, Kariya S, Lang DL. et al. **(2015)**: Hippocampal Subfield Volumes in First Episode and Chronic Schizophrenia. In: PLOS One: 1-14.

85) Kerwin R, Patel S, Meldrum B **(1990)**: Quantitative autoradiographic analysis of glutamate binding sites in the hippocampal formation in normal and schizophrenic brain post mortem. In: Neuroscience 39 (1): 25–32

86) Khoshnoodi J, Pedchenko V, Hudson BG **(2008)**: Mammalian collagen IV. In: Microsc. Res. Tech. 71 (5): 357–370.

87) Kibriya MG, Jasmine F, Roy S, Ahsan H, Pierce B **(2014)**: Measurement of Telomere Length: A New Assay Using QuantiGene Chemistry on a Luminex Platform. In: Cancer Epidemio Biomarkers Prev 23(12): 2667-2672.

88) Kinnunen AK, Koenig JI, Bilbe G **(2003)**: Repeated variable prenatal stress alters pre- and postsynaptic gene expression in the rat frontal pole. In: Journal of Neurochemistry 86: 736–748.

89) Kissling W, Höffler J, Müller P, Rüther E, Trenckmann U, Uber A. et al. **(1999)**: Die direkten und indirekten Kosten der Schizophrenie. In: Fortschr. Neurol. Psychiat. 67: 29–36.

90) Klein D **(2002)**: Quantification using real-time PCR technology: applications and limitations. In: Trends in Molecular Medicine. 8(6):252-260.

91) Knapp M; Razzouk D **(2008)**: Costs of schizophrenia. In: Psychiatry 7(11): 491–494.

92) Knöchel C, Stäblein M, Prvulovic D, Ghinea D, Wenzler S, Pantel J. et al. **(2016)**: Shared and distinct gray matter abnormalities in schizophrenia, schizophrenia relatives and bipolar disorder in association with cognitive impairment. In: Schizophrenia Research 171: 140-148.

93) Koenig JI, Elmer GI, Shepard PD, Lee PR, Mayo C, Joy B, Hercher E, Brady DL **(2005)**: Prenatal exposure to a repeated variable stress paradigm elicits behavioural und neuroendocrinology changes in the adult offspring: potential rebalance to schizophrenia. In: Behavioural Brain Research 156: 251-261.

94) Kolomeets NS, Orlovskaya DD, Uranova NA **(2007)**: Decreased numerical density of CA3 hippocampal mossy fiber synapses in schizophrenia. In: Synapse 61(8): 615–621.

95) Kreczmanski P, Heinsen H, Mantua V, Woltersdorf F, Masson T, Ulfig N. et al. **(2007)**: Volume, neuron density and total neuron number in five subcortical regions in schizophrenia. In: Brain 130 (3): 678–692.

96) Kristansen LV, Beneyto M, Haroutunian V, Meador-Woodruff JH **(2006)**: Changes in NMDA receptor subunits and interacting PSD proteins in dorsalateral and anterior cingulate cortex indicate abnormal regional expression in schizophrenia. In: Molecular Psychiatry 11: 737–747.

97) Laruelle M, Kegeles LS, Abi-Dargham A **(2003)**: Glutamate, Dopamine, and Schizophrenia. In: Ann. N.Y. Acad. sci. 1003: 138–158.

98) Leucht S, Corves C, Arbter D, Engel RR, Davis JM **(2009)**: Second-generation versus first-generation antipsychotic drugs for schizophrenia: a meta-analysis. In: The Lancet 373: 31-41.

99) Levy JR, Holzbaur ELF **(2006)**: Cytoplasmic dynein/dynactin function and dysfunction in motor neurons. In: International Journal of Developmental Neuroscience 24 (2-3): 103–111.

100) Lichtermann D, Karbe E, Maier W **(2000)**: The genetic epidemiology of schizophrenia and of schizophrenia spectrum disorders. In: Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci 250: 304–310.

101) Livak KJ, Schmittgen TD **(2001)**: Analysis of Relative Gene Expression Data Using RealTime Quantitative PCR and the $\Delta\Delta$ CT Method. In: Methods 25: 402-408.

102) Lledo PM, Alonso M, Grubb MS **(2006)**: Adult neurogenesis and functional plasticity in neuronal circuits. In: Nat Rev Neurosci 7 (3):179–193.

103) Lochmann J, Balcar VJ, Stastny F, Sery O **(2013)**: Preliminary evidence for association between schizophrenia and polymorphism in the regulatory Regions of ADRA2A, DRD3 und Snap-25 Genes. In: Psychiatry Research 205: 7-12.

104) Maat A, Van Haren NEM, Bartholomeusz CF, Kahn RS, Cahn W (**2016)**: Emotion recognition and theory of mind are related to gray matter volume of the prefrontal cortex in schizophrenia. In: Eoropean Neuropsychopharmacology 26: 255-264.

105) MacDonald HT, Eaton ME, Dudman JT, Konradi C (2005): Antipsychotic drugy elevate mRNA levels of presynaptic proteins in the frontal cortex of the rat. In: Biol Psychiatry 57: 1041-1051

106) Mattick JS, Makunin IV **(2006)**: Non-coding RNA. In: Human Molecular Genetics 15: 17–29.

107) Maycox PR, Kelly F, Taylor A, Bates S, Reid J, Logandra R. et al. **(2009)**: Analysis of gene expression in two large schizophrenia cohorts identifies multiple changes associated with nerve terminal function. In: Molecular Psychiatry 14: 1083-1094.

108) Meador-Woodruff JH, Haroutunian V, Powchnik P, Davidson M, Davis KL, Watson SJ **(1997)**: Dopamine receptor transcript expression in striatum and prefrontal and occipital cortex. Focal abnormailities in orbitofrontal cortex in schizophrenia. In: Arch Gen Psychiatry 54(12): 1089–1095.

109) Meltzer HY, Li Z, Kaneda Y, Ichikawa J **(2003)**: Serotonin receptors. Their key role in drugs to treat schizophrenia. In: Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry 27 (79): 1159–1172.

110) Metzger DC. Luckennach JA, Dickey JT, Beckmann BR **(2013)**: Development of a multiplex gene expression assay for components oft he endocrine growth axis in coho salmon. In: General and Comparative Endocrionology 189: 134-140

111) Minet-Ringuet J, Even PC, Goubern M, Tomé D, de Beaurepaire R **(2006a)**: Long term treatment with olanzapine mixed with the food in male rats induces body fat deposition with no increase in body weight and no homogenic alteration. In: Appetite 46: 254-262.

112) Minet-Ringuet J, Even PC, Lacroix M, Tomé D, de Beaurepaire R **(2006b)**: A model for antipsychotic-induced obesity in the male rats. In: Psychopharmacology 187: 447-454.

113) Miyamoto S, Jarskog CF, Fleischhauer WW **(2014)**: New therapeutic approaches for treatment - resistant schizophrenia: A look to the future. In: Journal of Psychiatric Research 58: 1-6.

114) Müller HK, Wegener G, Popoli M, Elfving B **(2011)**: Differential expression of synaptic proteins after chronic restraint stress in rat prefrontal cortex and hippocampus. In: Brain Research: 26–37.

115) Mukaetova-Ladinska E.B, Hurt J, Honer WG, Harrington CR, Wischik CM **(2002)**: Loss of synaptic but not cytoskeletal proteins in the cerebellum of chronic schizophrenics. In: Neuroscience Letters 317: 161–165.

116) Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H **(1986)**: Specific Enzymatic Amplification of DNA in Vitro: The Polymerase Chain Reaction. In: Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology 263–273.

117) Munoz FL, Alam C **(2009)**: The consolidation of neuroleptic therapy: Janssen, the discovery of haloperidol and its introduction into clinical practice. In: Brain Research 79: 130-141

118) Munro SB, Kuypers J, Jerome KR **(2013)**: Comparison of a Multiplex Real-Time PCR Assay with a Multiplex Luminex Assay for Influenza Virus Detection. In: Journal of Clinical Microbiology. 51(4): 1124-1129.

119) Murphey RK, Caruccio PC, Getzinger M, Westgate PJ, Phillis RW **(1999)**: Dynein-Dynactin Function and Sensory Axon Growth during Drosophila Metamorphosis: A Role for Retrograde Motors. In: Developmental Biology 209: 85–97.

120) Nakagami Y, Abe K, Nishiyama N, Matsuki N **(2000)**: Laminin Degradation by Plasmin Regulates Long-Term Potentiation. In: The Journal of Neuroscience 20(5): 2008–2010.

121) Nakahara T, Nakamura K, Tsutsumi T, Hashimoto K, Hondo H, Hisatomi S. et al. **(1998)**: Effect of chronic haloperidol treatment on synaptic protein mRNAs in the rat brain. In: Molecular Brain Research 61: 238–242.

122) Nakanishi S **(1992)**: Molecular Diversity of Glutamate Receptors and Implications for Brain Function. In: Science 258: 597–602.

123) Nord M, Farde L **(2010)**: Atipsychotic occupancy of Dopamine Receptors in Schizophrenia. In: Neuroscience and Therapeutics: 1-7.

124) Nuechterlein KH, Dawson ME, Gitlin M, Ventura J, Goldstein MJ, Snyder KS et al. **(1992)**: Developmental Process in Schizophrenic Disorders: Longitudinal Studies of Vulnerability and Stress. In: Schizophrenia Bulletin 18(3): 387–425.

125) Ohuoha DC, Hyde TM, Kleinman JE **(1993)**: The role of serotonin in schizophrenia: an overview of the nomenclature, distribution and alterations of serotonin receptors in the central nervous system. In: Psychopharmacology 112: 5–15.

126) Oliver PL, Davies KE **(2009)**: Interaction between environmental and genetic factors modulates schizophrenic endophenotypes in the Snap-25 mouse mutant blind-drunk. In: Human Molecular Genetics 18:4576–4589.

127) Okubo Y, Suhara T, Suzuki K, Kobayashi K, Inoue O, Terasaki O. et al. **(1997)**: Decreased prefrontal dopamine D1 receptors in schizophrenia revealed by PET. In: Nature 385: 634–636.

128) Oni-Orisan A, Kristiansen LV, Haroutunian V, Meador-Woodruff JH, McCullumsmith RE **(2008)**: Altered Vesicular Glutamate Transporter Expression in the Anterior Cingulate Cortex in Schizophrenia. In: Biological Psychiatry 63 (8): 766–775.

129) Ozdemir H, Ertugrul A, Basar K, Saka E **(2012)**: Differential effects of antipsychotics on hippocampal presynaptic protein expressions and recognition memory in a schizophrenia model in mice. In: Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry 39: 62–68.

130) Paxinos G, Watson C (**1999):** The rat brain in stereotaxic coordinates., Academic Press, 4.Edition

131) Plaisier E, Gribouval O, Alamowitch S, Mougenot B, Prost C, Verpont MC. et al. **(2007)**: COL4A1 Mutations and Hereditary Angiopathy, Nephropathy, Aneurysms, and Muscle Cramps. In: The New England Journal of Medicine 375(26): 2686–2695.

132) Pletnikov MV, Ayhan Y, Nikolskaia O, Xu Y, Ovanesov MV, Huang H. et al. **(2007)**: Inducible expression of mutant human DISC1 in mice is associated with brain and behavioral abnormalities reminiscent of schizophrenia. In: Molecular Psychiatry 13: 173-186.

133) Prabhakar U, Eirikis C, Davis HM **(2002)**: Simultaneous quantification of proinflammatory cytokines in human plasma using the LabMAP2 assay. In: Journal of Clinical Virology 260: 207-218.

134) Ramos-Miguel A, Beasley CL, Dwork AJ, Mann JJ, Rosoklija G, Barr AM, Honer WG **(2015)**: Increased SNARE Protein-Protein Interactions in Orbitofrontal and Anterior Cingulate Cortices in Schizophrenia. In: Biological Psychiatry 78: 361-373.

135) Reynolds GP, Czudek C, Andrews HB **(1990)**: Deficit and Hemispheric aymmetry of GABA Uptake Sites in the Hippocampus in Schizophrenia. In: Biol. Psychiatry 27: 1038–1044.

136) Sala R, Viegi A, Rossi FM, Pizzorusso T, Bonanno G, Raiteri M, Maffei L **(1998)**: Nerve growth factor and brain-derived neutrophic factor increase neurotransmitter relase in the rat visual cortex. In: European Journal of Neuroscience 10: 2185–2191.

137) Scarr E, Dean B **(2012)**: Altered Neuronal Markers Following Treatment with Mood Stabilizer and Antipsychotic Drugs Indicate an Increased Likelihood of Neurotransmitter Release. In: Clinical Psychopharmacology and Neuroscience 10(1): 25-33.

138) Schaber G, Stevens I, Gaertner HJ, Dietz K, Breyer-Pfaff U **(1998)**: Pharmacokinetics of clozapine and its metabolites in psychiatric patients: plasma protein binding and renale cleareance. In: Br J Clin Pharmacol 46: 453-459

139) Schmitt A, Leonardi-Essmann F, Durrenberger PF, Wickert SP, Spanagel R, Arzberger T et al. **(2012)**: Structural synaptic elements are differentially regulated in superior temporal cortex of schizophrenia patients. In: Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci 262: 565-577.

140) Schoch S, Deák F, Königstorfer A, Mozhaeyva M, Sara Y, Südhof TC, Kavalali ET **(2001)**: SNARE Funktion Analyzed in Synaptobrevin/VAMP Knockout Mice. In: Science 294: 1117-1122.

141) Schultz SJ, Champoux JJ **(2008)**: RNase Activity: Structure, Specifity and Function in Reverse Transcription. In: Virus Res. 134: 86–103.

142) Selemon LD, Rajkowska G, Goldman-Rakic PS **(1995)**: Abnormally high neuronal density in the schizophrenic cortex. A morphometric analysis of prefrontal area 9 and occipital area 17. In: Arch Gen Psychiatry 52(10): 805–818.

143) Shen WW **(1999)**: A history of antipsychotic drug development. In: Comprehensive Psychiatry 40 (6): 407–414.

144) Shenton ME, Dickey CC, Frumin M, McCarley RW **(2001)**: A review of MRI findings in schizophrenia. In: Schizophrenia Research 49 (1-2): 1–52.

145) Snyder SH **(1973)**: Amphetamine Psychosis: A "Model" Schizophrenia Mediated by Catecholamines. In: Am J Psychiatry 130(1): 61–67.

146) Söllner T, Whitheart W, Brunner M, Erdjument-Bromage H, Geromanos S, Tempst P, Rothman JE **(1993)**: SNAP receptors implicated in vesicle targeting and fusion. In: Nature 362: 318–324

147) Sokolov BP, Tcherepanov AA, Haroutunian V, Davis KL **(2000)**: Levels of mRNAs Encoding Synaptic Vesicle and Synaptic Plasma Membrane Proteins in the Temporal Cortex of Eldery Schizophrenic Patients. In: Biol Psychiatry 48:184–196.

148) Sommer JU, Schmitt A, Heck M, Schaeffer EL, Fendt M, Zink M. et al. **(2010)**: Differential expression of presynaptic genes in a rat model of postnatal hypoxia: relevance to schizophrenia. In: Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci 260 (S2): 81–89.

149) Steiner P, Alberi S, Kulangara K, Yersin A, Sarria JCF, Regulier E et al. **(2005)**: Interactions between NEEP21, GRIP1 and GluR2 regulate sorting and recycling of the glutamate receptor subunit GluR2. In: The EMBO Journal 24: 2873–2884.

150) Stroup TS, Gerhard T, Crystal S, Huang C, Olfson M (2016): Comparative Effectiveness of Clozapine and Standard Antipsychotic Treatment in Adults With Schizophrenia. In: Am J Psychiatry 373: 166-173.

151) Südhof TC, Rizo J **(2011)**: Synaptic Vesicle Exocytosis. In: Cold Spring Harbor Perspectives in Biology 3 (12): 1-14.

152) Sullivan PF, Kendler KS, Neale MC **(2003)**: Schizophrenia as a Compex Trait. Evidence From a Meta-analysis of Twin Studies. In: Arch Gen Psychiatry 60: 1187-1192

153) Tandon R, Keshavan MS, Nasrallah HA **(2008)**: Schizophrenia: "Just the Facts" What we know in 2008. 2. Epidemiology and etiology. In: Schizophrenia Research 102: 1-18

154) Tang BL, Tan AEH, Lim LK, Lee SS, Low DYH, Hong W **(1998)**: Syntaxin 12, a Member of the Syntaxin Family Localized to the Endosome. In: Journal of Biological Chemistry 273 (12): 6944–6950.

155) Thellin O, Zorzi W, Lakaye B, Borman B, Couman B, Hennen G, Grisar T, Igout A, Heinen E **(1999)**: Housekeeping genes as internal standards: use and limits. In: Journal of Biotechnology 75: 291–2955.

156) Thompson PM, Egbufoama S, Vawter MP **(2003)**: SNAP-25 reduction in the hippocampus of patients with schizophrenia. In: Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry 27: 411–417.

157) Thompson PM, Sower AC, Perrone-Bizzozero NI **(1998)**: Altered Levels of the Synaptosomal Associated Ptotein SNAP-25 in Schizophrenia. In: Biol Psychiatry 43: 239–243.

158) Thorup A, Petersen L, Jeppersen P, Ohlenschlager J, Christensen T, Krarup G, Jargensen P, Nordentoft M **(2007)**: Gender Differences in Young Adults with First-Episode Schizophrenia Spectrum Disorders at Baseline in the Danish OPUS Study, In: The Journal of Norvous and Mental Disease 195 (5): 396-405.

159) Tiihonen J, Lönnqvist J, Wahlbeck K, Klaukka T, Niskamen L, Tanskanen A, Haukka J **(2009)**:11-year follow-up of mortality in patients with schizophrenia: a population-based cohort study (FIN11 study). In: Lancet 374: 620-627

160) Tollefson GD, Beasley CM, Tran PV, Street JS, Krueger JA, Tamura RN et al. **(1997)**: Olanzapine Versus Haloperidol in the Treatment of Schizophrenia and Schizophreniform Disorders: Results of an International Collaborative Trial. In: Am J Psychiatry 154: 457–465.

161) Von Wilmsdorff M, Bouvier ML, Henning U, Schmitt A, Gaebel W **(2010)**. The impact of antipsychotic drugs on food intake and body weight and on leptin levels in blood and hypothalamic ob-r leptin receptor expression in wistar rats. In: Clinics, 65(9): 885-894

162) Von Wilmsdorff M, Bouvier ML, Henning U, Schmitt A, Schneider-Axmann T, Gaebel W **(2013)**: The sex-dependent Impact of Cronic Clozapine and Haloperidol Treatment on Characteristics oft he Metbolic Syndrome in a Rat Model. In: Pharmacopsychiatry 46: 1-9.

163) Vrljic M, Strop P, Ernst JA, Sutton RB, Chu S, Brunger AT **(2010)**: Molecular mechanism of the synaptotagmin–SNARE interaction in Ca2+-triggered vesicle fusion. In: Nat Struct Mol Biol 17 (3): 325–331.

164) Wang L, Hosakere M, Trein JCL, Miller A, Ratnanather JT, Barch, DM. et al. **(2007)**: Abnormalities of cingulate gyrus neuroanatomy in schizophrenia. In: Schizophrenia Research 93 (1-3): 66–78.

165) Wong AHC, Trakalo J, Likhodi O, Yusuf M, Macedo A, Azevedo MH **(2004)**: Association between Schizophrenia and the Syntaxin 1A Gene. In: Biol Psychiatry 56: 24-29.

166) Woods SW **(2003)**: Chlorpromazine Equivalent Doses for the Newer Atypical Antipsychotics. In: J Clin Psychiatry 64(6): 663-667.

167) Woolley DW, Shaw E **(1954)**: A Biochemical und pharmacological suggestion about certain mental disorders. In: Biochemistry 40: 228-231.

168) Worwa G, Andrade CC, Thiemann TC, Park B, Maharaj PD, Anishchenko M. et al. **(2014)**: Allele-specific qRT-PR demonstrates superior pf single nucleotide polymorphisms as genetic markers for West Nile virus compared to Luminex and quantitative sequencing. In: Journal of Virological Methods 195: 76-85.

169) Xiberas X, Martinot JL, Mallet L, Artiges E, Loc'h C, Mazière B, Pallière-Martinot ML **(2001)**: Extrastriatal and striatal D2 dopamine receptor blockade with haloperidol or new antipsychotic drugs in patients with schizophrenia. In: The British Journal of Psychiatry 179 (6): 503–508.

170) Yakovchuk P, Protozanova E, Frank-Kamenetskii MD **(2006)**: Base-stacking and base-pairing contributions into thermal stability of the DNA double helix. In: Nucleic Acids Research 34(2): 564–574.

171) Yao JDC, Beld MG, Oon LLE, Sherlock CH, Germer J, Menting S et al. **(2004)**: Multicenter Evaluation of the VERSANT Hepatitis B Virus DNA 3.0 Assay. In: Journal of Clinical Microbiology 42(2): 800-806.

172) Yeh TY, Quintyne NJ, Scipioni BR, Eckley DM, Schroer TA **(2012)**: Dynactin's pointed-end complex is a cargo-targeting module. In: Molecular Biology of the Cell 23: 3827–3837.

173) Young C, Arima K, Xie J, Hu L, Beach TG, Falkai P, Honer WG **(1998)**: SNAP-25 Deficit and Hippocampal Connectivity in Schizophrenia. In: Cerebral Cortex 8: 261–268.

174) Zhang A, Pastor L, Nguyen K, Luo Y, Yang W, Flagella M. et al. **(2005)**: SmallI interfering RNA and Gene Expression Analysis Using a Multiplex Branched DNA Assay without RNA Purification. In: Journal of Biomolecular Screening 10(6): 549-556.

175) Zubin J, Spring B **(1976)**: Vulnerability - A New View of Schizophrenia. In: Journal of Abnormal Psychology 86(2): 103–126.

Danksagung

Zuallerst möchte ich Frau PD Dr. von Wilmsdorff für die Bereitstellung des Themas und die kontinuierliche Betreuung danken.
Mein Dank geht auch an Herrn Prof. Gebicke-Härter und Herrn Dr. Staehlin für die stetige und keinesfalls als selbstverständlich zu betrachtende Unterstützung. In diesem Zusammenhang möchte ich mich ganz besonders bei Frau Prof. Schmitt bedanken, die mir die ganze Zeit über mit ihrem fachlichen Rat zur Seite stand.
Ebenso möchte ich Frau Dr. Bouvier danken, für ihre fortwährende Unterstützung und genaue Kritik.
Mein besonderer Dank geht an meine Familie, meine Freundin und die Familie Johanning-Meiners für die moralische und fachliche Unterstützung, die es mir ermöglicht hat, diese Arbeit fertigzustellen.