

**Aus dem Institut für Neuropathologie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Direktor: Univ.-Professor Dr. med. G. Reifenberger**

**Ein revers-translatinaler Ansatz zur
Identifikation von Biomarkern bei DISC1-
assoziierten chronischen mentalen
Erkrankungen**

Dissertation

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

vorgelegt von

Laura Hecher

(2021)

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

gez.:

Dekan: Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter: Prof. Dr. med. Carsten Korth

Zweitgutachter: Prof. Dr. med. Rüdiger J. Seitz

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

- Trossbach, S.V., **Hecher, L.**, Schafflick, D., Deenen, R., Popa, O., Lautwein, T., Tschirner, S., Kohrer, K., Fehsel, K., Papazova, I., Malchow, B., Hasan, A., Winterer, G., Schmitt, A., Meyer Zu Horste, G., Falkai, P., Korth, C. (2019) Dysregulation of a specific immune-related network of genes biologically defines a subset of schizophrenia. *Transl Psychiatr*, (9) 156-171
- Trossbach, S. V., Bader, V., **Hecher, L.**, Pum, M. E., Masoud, S. T., Prikulis, I., Schäble, S., de Souza Silva, M. A., Su, P., Boulat, B., Chwiesko, C., Poschmann, G., Stühler, K., Lohr, K. M., Stout, K. A., Oskamp, A., Godsave, S. F., Müller-Schiffmann, A., Bilzer, T., Steiner, H., Peters, P. J., Sauvage, M., Ramsey, A. J., Miller, G. W., Liu, F., Seeman, P., Brandon, N. J., Huston, J. P. & Korth, C., (2016) Misassembly of full-length Disrupted-in-Schizophrenia 1 protein is linked to altered dopamine homeostasis and behavioral deficits. *Mol Psychiatry*, (21), 1561-1572

Zusammenfassung

Diese Dissertation beschäftigt sich mit der Identifizierung von Biomarkern für eine biologische Subgruppe chronisch mental erkrankter Patienten.

Die schizophrenen Störungen bilden eine biologisch heterogene Gruppe psychiatrischer Erkrankungen, gekennzeichnet durch charakteristische Veränderungen im Denken, in der Wahrnehmung sowie im Bereich der affektiven Reaktionen der betroffenen Individuen. Aufgrund des aktuellen Mangels an Biomarkern, als objektiv messbare Indikatoren spezifischer pathophysiologischer Regulationsprozesse, beruht die Diagnosestellung und Einordnung dieser Störungen bislang ausschließlich auf klinischen Kriterien. Die pharmakologische Therapie dieser Erkrankungen erfolgt daher rein entlang der Symptomkontrolle und -reduktion. Die „DISC1opathien“ beinhalten eine Subgruppe von symptomatisch heterogenen chronisch mental kranken Patienten mit dem gemeinsamen Merkmal von unlöslichem Disrupted-in-Schizophrenia 1 (DISC1) Protein im Gehirn.

Anhand dieser Arbeit wurden mithilfe unterschiedlicher Methoden verschiedene Kandidatengene und -proteine für DISC1opathien identifiziert.

Im Rahmen eines revers-translationalen Forschungsansatzes wurde anhand eines transgenen Rattenmodells (tgDISC1), welches nicht-mutiertes DISC1 Protein überexprimiert, Blut und Liquor analysiert. Mononucleare Zellen des peripheren Bluts transgener DISC1-Ratten zeigen ein verändertes Genexpressionsmuster im Vergleich mit ihren nicht transgenen Wurfgeschwister. Eine Analyse schizophrener Patienten und gesunden Kontrollen bestätigte ähnliche Expressionsunterschiede.

Im Liquor von tgDISC1-Ratten gelang der Nachweis von DISC1-Protein, was eine intrazerebrale DISC1-Ausscheidung über den Liquor und eine sekundäre Veränderung des intrathekalen Proteoms, wie wir es in tgDISC1-Ratten feststellen konnten, nahelegt. Zudem zeigen DISC1-Ratten ein insgesamt vergrößertes Ventrikelvolumen, passend zum Phänotyp schizophrener Patienten.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen veränderte Regulationsprozesse in DISC1opathien, welche sich sowohl im Blut als auch im Liquor von tgDISC1 Ratten nachweisen lassen. Es ließen sich einzelne Kandidatengene im Blut nachweisen, die einen wichtigen Schritt zur Entwicklung von Biomarker-Kombinationen darstellen.

Der Nachweis phänotypischer Übereinstimmungen, wie dem vergrößerten Ventrikelvolumen und ähnliche Expressionsunterschiede im Blut legen nahe, dass dieses Rattenmodell auch eine gute Möglichkeit zur Entwicklung einer zielgerichteten pharmakologischen Therapie darstellen könnte.

Abstract

This thesis focuses on the identification of biomarkers for a biological subset of chronic mental illnesses (CMIs).

Schizophrenic disorders are a biological heterogenic group of psychiatric illnesses, marked by characteristic changes considering the thinking, perception, as well as the affective reactions of the patients. Up to now, the diagnosis and classification of mental disorders relied exclusively on clinical criteria, due to the absence of distinct biomarkers as objective measurable indicators for a specific pathophysiological regulation process. Therefore, the pharmacological therapy of these diseases therefore only aims for symptom control.

„DISC1opathies“ are a subgroup of symptomatically heterogenic chronic mental illnesses with the common feature of insoluble Disrupted-in-Schizophrenia 1 (DISC1) protein in the brain.

In this thesis, we identified several candidate genes and -proteins for DISC1opathies through different methods. Using a reverse translational approach, we analysed blood and cerebral fluid of transgenic rats, overexpressing non-mutant, full-length human DISC1 (tgDISC1).

Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) of tgDISC1 rats show a different gene expression pattern than their non-transgenic littermates. The analyses of schizophrenic patients and healthy controls confirmed similar differences in gene expression.

We could detect DISC1 in the cerebral fluid of tgDISC1 rats, suggesting an intracerebral excretion of DISC1 as well as a secondary change of the intrathecal proteome.

In addition, tgDISC1 rats showed an increased overall ventricle volume, similar to the phenotype of schizophrenic patients.

The results of this thesis show modified regulation processes in DISC1opathies, which can be detected in the blood and the cerebral fluid of tgDISC1 rats. We could identify candidate genes in the blood, which constitute an important step in the development of combinations of biomarkers. The proof of phenotypical characteristics, such as the enlarged ventricle volume and the similar differences in gene expression in tgDISC1 rats and schizophrenic patients, suggests, that this rat model may also offer a promising opportunity to develop targeted therapies.

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
$\Delta\Delta C_t$	delta-delta C_t -Wert
ADHS	Aufmerksamkeits-Defizit-Hyperaktivitäts-Syndrom
Anxa2	Annexin A2
Anxa3	Annexin A3
Anxa4	Annexin A4
Anxa6	Annexin A6
ApoE	Apolipoprotein E
AR	arbitrary unit
BF	bound fraction
bp	Basenpaar
Ca1	Carboanhydrase 1
Ca3	Carbonanhydrase 3
Ccl4	Chemokine (C-C motif) ligand 4
Ckm	Creatine kinase M-type
CMI	chronic mental illnesses
CT	Computertomographie
C_t	threshold cycle
CTRL	Kontrollgruppe
DF	depleted fraction
DISC1	Disrupted in Schizophrenia 1
E. coli	Escherichia coli
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
DPBS	Dulbecco's Phosphatgepufferte Salzlösung
DSM	Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders
DSST	Digit Symbol Substitution Test
E	Embryonalwoche
ECL	Enhanced chemical luminescence detection reagent
EDTA	Ethylendiamintetressigsäure
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent-Assay
ERES	Endoplasmic Reticulum-Exit-Sites

FC	Fold Change
FDR	false discovery rate
FOV	Sichtfeld
g	Erdbeschleunigung
GDP	Guanosindiphosphat
GTP	Guanosintriphosphat
GSK3-beta	Glykogensynthase-Kinase 3 beta
GTP	Guanosintriphosphat
H₂O	Wasser
hCG	Humanes Choriongonadotropin
HER2/neu	Humaner Epidermaler Wachstumsfaktor Rezeptor
HM	Hämoglobin
Hom	Homogenat
ICD	International Classification of Diseases
Ifng	Interferon gamma
Il12rb2	Interleukin 12 receptor, beta 2
JAK	Januskinase
Kal-7/Rac1	Kalirin-7/Ras-related C3 botulinum toxin substrat
l	Liter
LC	liquid chromatography
LOD	logarithm oft the odds
LIS1	Lissencephaly 1
LM	littermates
LMU	Ludwig-Maximilians-Universität
LVR	Landschaftsverband Rheinland
M	Marker
Mb	Myoglobin
MRT	Magnetresonanztomographie
MS	Massenspektrometrie
mTOR	mammalian target of rapamycin
N/A	not available
NaCl	Natriumchlorid
NDEL1	Nuclear Distribution Factor E-like
NK-Zelle	Natürliche Killerzellen
NSP	non-specifically binding proteins

NTC	no Template Control
OPL	OncoProteomics Laboratory
P11	Protein S100A10
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PANSS	Positive and Negative Syndrome Scale
PBS	Phosphatgepufferte Saline
PBS-T	Phosphatgepufferte Salzlösung plus Tween
PCR	Polymerasekettenreaktion
PK	Primer Konstellation
PLA2	Phospholipase A2
Pla2g7	Phospholipase A2, Gruppe VII
PTSD	Posttraumatic stress disorder
PV	Parovalbumin
mTOR	mammalian target of rapamycin
Rgs1	Regulator of G-protein signaling 1
GSK3-beta	Glykogensynthase-Kinase 3 beta
RIN	RNA-Integritätsnummer
RNA	Ribonukleinsäure
ROI	region of Interest
RT	Raumtemperatur
RT-qPCR	quantitative real-time Polymerasekettenreaktion
SCID-1	Strukturiertes Klinisches Interview für DSM-IV
SCZ	Schizophrenie
SDS	Natrium-Dodecylsulfat
SDS PAGE	sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
sh	short-hairpin
SOD1	Superoxid-Dismutase 1
sp	space line
STAT	Signal Transducers and Activators of Transcription
T. et al.	Trossbach et al.
TBM	tensor-based morphometry
TE	Echozeit
TG	transgene Gruppe
tg	transgen
TH	Tyrosinhydroxylase

TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin
TMT	Trial Making Test
TNIK	Traf2 and Nck-interacting kinase
TR	Repetitionszeit
UDG	Uracil-N-Glycosylase
VLMT	Verbal Learning and Memory Test
VUmc	Vrije Universiteit Medical Center, Amsterdam
WGCNA	Weighted Gene Co-expression Network Analysis
Wnt	Wingless-Int-1
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	I
Abkürzungsverzeichnis	III
1 Einleitung	1
1.1 Chronisch mentale Erkrankungen	1
1.1.1 Definition von chronisch mentalen Erkrankungen	1
1.1.2 Schizophrenie als Beispiel einer chronisch mentalen Erkrankung.....	1
1.1.3 Die Relevanz von Biomarkern in der Diagnostik von chronischen mentalen Erkrankungen	4
1.1.4 Revers-translationale Medizin zur Entdeckung biologischer Marker.....	6
1.1.5 Volumetrische Vorstudien des Ventrikelsystems bei Schizophrenen Patienten....	8
1.2 Das Konzept der DISC1opathien	9
1.2.1 Proteinaggregation in neurodegenerativen Erkrankungen.....	9
1.2.2 Disrupted-in-Schizophrenia 1 (DISC1)	10
1.2.3 Konzept der DISC1opathien.....	12
1.2.4 Funktion und Interaktionspartner von DISC1	13
1.3 tgDISC1-Ratten Modell	15
1.4 Ziele der Arbeit	17
2 Material und Methoden	18
2.1 Material	18
2.1.1 Chemikalien	18
2.1.2 Basispuffer.....	19
2.1.3 Kits	19
2.1.4 Versuchsgeräte und weitere Verbrauchsmaterialien	20
2.1.5 Software.....	20
2.1.6 Tiere und Tierhaltung.....	20
2.1.7 Patientenkollektiv	21
2.2 Methoden	22
2.2.1 Analyse der Blutproben	22
2.2.1.1 Blutentnahme	22
2.2.1.2 Isolierung von mononuclearen Zellen aus peripherem Blut	22
2.2.1.3 RNA-Extraktion von PBMCs	23
2.2.1.4 Quantitative Nukleinsäurenanalyse	24
2.2.1.5 Genexpressionsanalyse durch Affymetrix GeneChip® Microarrays.....	24
2.2.1.6 Etablierung der optimalen Bedingungen der real-time quantitativen PCR.....	25
2.2.1.6.1 Primerdesign	25

2.2.1.6.2	Primertest mittels PCR und Gelelektrophorese	26
2.2.1.6.3	Primeroptimierung durch Primermatrix und quantitative PCR	28
2.2.1.6.4	Auswahl des Referenzgens	30
2.2.1.7	cDNA-Synthese	30
2.2.1.8	Validierung der Microarray Resultate durch quantitative PCR mit optimierten Primern	31
2.2.1.9	Validierung der identifizierten Genveränderungen von tgDISC1-Ratten in humanen Proben	33
2.2.2	Analyse der Liquorproben.....	35
2.2.2.1	Liquor Entnahme	35
2.2.2.2	Überprüfung der Liquorproben auf Blutverunreinigungen.....	36
2.2.2.3	Proteinnachweis mittels SDS-Gelelektrophorese und Western Blot	39
2.2.2.4	GeLC-MS/MS basierte Proteomic-Analyse	40
2.2.2.4.1	Protein Depletion und Probenkonzentration.....	40
2.2.2.4.2	Eindimensionale SDS-Elektrophorese.....	42
2.2.2.5	GeLC-MS/MS basierte Proteomanalyse	44
2.2.3	Volumetrische Analyse der intrazerebralen Ventrikel von tgDisc1-Ratten durch zerebrale Magnetresonanztomographie	44
2.2.3.1	Vorbereitung und Durchführung der zerebralen Magnetresonanztomographie.....	44
2.2.3.2	Datenanalyse	45
3	Ergebnisse	45
3.1	Genexpressionsanalyse von PBMCs transgener Disc1 Ratten.....	45
3.1.1	Genexpressionsanalyse durch Affymetrix GeneChip® Microarrays	45
3.1.2	Validierung der Microarray Resultate durch quantitative PCR	47
3.2	Validierung der Genexpressionsanalyse in schizophrenen Patienten.....	49
3.3	Hämoglobinkonzentration der einzelnen Liquorproben	51
3.4	DISC1-Nachweis im Liquor von tgDISC1-Ratten mittels Western Blot	52
3.5	GeLC-MS/MS basierte Proteomanalyse	53
3.6	Volumetrische Analyse der intrazerebralen Ventrikel transgener DISC1- Ratten.....	61
4	Diskussion.....	62
4.1	Genexpressionsanalyse von PBMC transgener DISC1 Ratten und schizophrener Patienten	62
4.2	Liquoranalyse durch Western Blot.....	66
4.3	GeLC-MS/MS basierte Proteomic-Analyse.....	66
4.4	Volumetrische Analyse der intrazerebralen Ventrikel transgener DISC1- Ratten.....	69
5	Literatur- und Quellenverzeichnis	70

6	Anhang.....	77
7	Danksagung	78

1 Einleitung

1.1 Chronische mentale Erkrankungen

1.1.1 Definition von chronischen mentalen Erkrankungen

Chronische mentale Erkrankungen (aus dem Englischen: chronic mental illnesses (CMIs)) sind Störungen, die progressiv und wenn zum Teil auch intermittierend, so doch fortwährend verlaufen. Zu ihnen gehören Untergruppen der Schizophrenie, aber auch Untergruppen rekurrenter affektiver Störungen wie zum Beispiel bipolare affektive Störungen oder monopolarer, rezidivierender depressiver Störungen (Horst Dilling, 2015).

1.1.2 Schizophrenie als Beispiel einer chronisch mentalen Erkrankung

Schizophrene Störungen sind eine heterogene Gruppe psychiatrischer Störungen, gekennzeichnet durch charakteristische Störungen im Denken, der Wahrnehmung sowie der affektiven Reaktionen (Leucht, 2019).

Bislang beruht die Diagnosestellung rein auf der Anamneseerhebung anhand eines Interviews sowie klinischen Kriterien gemäß den Diagnosestandards der ICD-10 (Internationale statistische Klassifikation der Krankheiten und verwandter Gesundheitsprobleme 10. Revision, WHO 1992).

Dies liegt vor allem an fehlenden Biomarkern, zur objektiven Messung biologischer Prozesse, die sowohl eine diagnostische als auch eine prognostische Aussagekraft haben können. Validierte Biomarker können die Diagnosesicherheit erhöhen, und ein wichtiger Bestandteil der Arzneimittelentwicklung und einer zielgerichteten Therapie werden.

Krankheitsbild

Schizophrene Störungen sind gekennzeichnet durch ein vielseitiges Erscheinungsbild. Sie beinhalten meist sog. Positivsymptome, die vorwiegend in der akuten Erkrankungsphase dominieren, wie Wahnvorstellungen, Halluzinationen, Ich-Störungen und formale Denkstörungen. Zu den Negativsymptomen, die vor allem in der chronischen Phase im Vordergrund stehen, gehören Antriebslosigkeit, soziale Isolation, depressive Verstimmungen und Affektverflachung (Arolt, 2006, Leucht, 2019). Zudem kommen kognitive Symptome wie Aufmerksamkeitsdefizite, Störungen des Kurzzeitgedächtnisses, u.a. Schwierigkeiten in der selektiven Filterung verschiedener Reize, gezielter Aufmerksamkeitsverlagerung und Aufrechterhaltung einer Daueraufmerksamkeit.

Bezüglich der exekutiven Funktionen zeigen sich vor allem Defizite in der Problemlösung und Konzeptbildung (Leucht, 2019). Diese Beeinträchtigungen weisen aus neuropsychologischer Sicht auf eine Dysfunktion in den frontalen und mediotemporalen Hirnregionen hin.

Ein wichtiges Kriterium in der Differenzialdiagnostik der Schizophrenie ist das Fehlen einer weiteren eindeutigen Gehirnerkrankung, Intoxikation oder anderer bereits vorher diagnostizierten psychischen Erkrankung (Leucht, 2019).

Der Verlauf der Schizophrenie kann sehr unterschiedlich sein. Der Krankheitsbeginn äußert sich meist gegen Ende des jugendlichen Alters bzw. im frühen Erwachsenenalter mit einer sogenannten Prodromalphase, in welcher die betroffenen Patienten oft an emotionaler Labilität oder auch Interessensverlust leiden. Es kommt zu einer zunehmenden sozialen Isolation aufgrund einer fortschreitenden Positivsymptomatik mit Wahnvorstellungen. Im akuten Schub breiten sich die Symptome dann schnell aus und meist kommen zu den bereits verstärkt auftretenden Wahnvorstellungen, Halluzinationen und Unruhezustände hinzu. Nach einem akuten Schub nehmen die Symptome gewöhnlich wieder ab. Bei manchen bleibt lediglich eine Restsymptomatik vorhanden, während es bei anderen zu einer Chronifizierung geprägt von Negativsymptomen wie Antriebsarmut, Depression und Affektverflachung kommt (Leucht, 2019).

Ätiologie:

Es gibt verschiedene Faktoren, denen eine erhöhte Vulnerabilität für die Manifestation der Schizophrenie zugesprochen wird.

Die Relevanz erblicher Faktoren wurde in zahlreichen Familien- und Zwillingsstudien bereits verdeutlicht und beträgt ca. 50% (Leucht, 2019, Erlenmeyer-Kimling et al., 1995). Linkage-Studien untersuchen, ob Merkmale in einer Familie überzufällig auftreten und die, für diese Merkmale relevanten Gene auf dem gleichen Chromosom nahe aneinander liegen. In einer Reihe solcher Studien wurden bereits einige Chromosomenregionen herausgefunden, deren Veränderung mit hoher Wahrscheinlichkeit mit dem Entstehen einer der oben genannten Erkrankungen assoziiert werden kann (Harrison and Owen, 2003, Arolt, 2006, Leucht, 2019).

Die Dopamin-Hypothese der Schizophrenie beschreibt eine prä- oder postsynaptische Regulationsstörung des Dopaminstoffwechsels mit resultierender dopaminbedingter Überaktivität in limbischen Hirnregionen und Unteraktivität im Frontalhirn (Howes and Kapur, 2009, Leucht, 2019).

Weinberger, Murray und Lewis diskutierten bereits 1987 Anomalien in der neuronalen Entwicklung als Schlüsselfaktor in der Pathophysiologie der Schizophrenie (Weinberger, 1987, Murray and Lewis, 1987). Demnach führen pathogenetische Faktoren prä- und postnatal zu einer veränderten Gehirnentwicklung, welche sich in einer veränderten kortikalen Zytoarchitektur und veränderten anatomischen und funktionellen Schaltkreisen führt. Diese Störung der neuronalen Entwicklung führt zu einem erhöhten Krankheitsrisiko. Letztlich mitentscheidend ob es zum Ausbruch der Erkrankung kommt, ist das Vulnerabilitäts-Stress-Verhältnis. Dieses wird beeinflusst von Persönlichkeitsfaktoren, kritischen Lebensereignissen, dem familiären Umfeld und entsprechender „Expressed Emotion“, sprich der familiären Kommunikation (Leucht, 2019).

Therapie:

Aufgrund der großen Heterogenität sowohl der vermuteten Ätiologie als auch der Symptomatik fehlt es aktuell an kausaler Therapie.

Mit Einführung der zufällig entdeckten Antipsychotika in der Behandlung schizophrener Patienten in den 1950er Jahren, ging die Hospitalisierungsrate stark zurück (Davis et al. 1989). Trotzdem ist der Einsatz von Neuroleptika mit einer Reihe von unerwünschten Nebenwirkungen verbunden. Vor allem die typischen Nebenwirkungen auf das extrapyramidalmotorische System wie die Entwicklung eines Parkinsonoids mit Rigor und Hypokinese, akut-dystone Reaktionen (20% der Fälle) oder Akathisie in 30% werden von den Betroffenen meist als sehr beeinträchtigend empfunden. Hier zeigen Antipsychotika der 2. Generation zwar einen erheblichen Vorteil gegenüber denen der 1. Generation, demgegenüber steht jedoch das erhöhte Risiko von Gewichtszunahme und damit verbundenen erhöhten vaskulären und diabetogenen Risikofaktoren bei der Behandlung durch Antipsychotika der 2. Generation (Leucht, 2019).

Während die Positivsymptome in ca. 2/3 der Fälle erfolgreich durch antipsychotische Pharmaka therapiert werden können, gelingt dies bei der Negativsymptomatik und den resultierenden kognitiven Defiziten der Erkrankung meist nicht. Hinzukommt eine Therapieresistenz bei ca. 20-30% der Patienten.

In solchen Fällen hat sich häufig eine Therapie mit Clozapin als wirkungsvoll erwiesen. Dies geht jedoch mit dem lebensbedrohlichen Risiko einer Agranulozytose einher (Leucht, 2019).

1.1.3 Die Relevanz von Biomarkern in der Diagnostik von chronischen mentalen Erkrankungen

Bislang beruht die Diagnose Schizophrenie rein auf den klinischen Symptomen der Patienten, die anhand von Patientengesprächen erhoben werden und eine große heterogene Bandbreite aufweisen.

Es besteht eine große Überlappung zwischen den möglichen Symptomen einer Schizophrenie und denen der hauptsächlichen Differentialdiagnosen bipolare Störung mit psychotischen Symptomen und Depression mit psychotischen Symptomen (Owen et al., 2016).

Die im *Lancet* 2016 veröffentlichte Tabelle verdeutlicht die Symptomüberschneidung zwischen den einzelnen Differentialdiagnosen und zeigt, dass lediglich die Gewichtung der einzelnen Symptome zusammen mit dem zeitlichen Auftreten der Symptomatik eine Differenzierung der einzelnen Erkrankungen erlaubt.

	Schizophrenie	Bipolare Störungen	Schizoaffektive Störungen	Autismus	ADHS
Hauptsymptome	Wahnhafte Episoden, Halluzinationen, Motivationsverlust, verminderte Sprache, sozialer Rückzug	depressive und hochgestimmte Episoden	Wahnhafte Episoden, Halluzinationen, Stimmungsschwankungen	Soziale und interaktive Störungen, repetitives Verhalten	Hyperaktivität, verminderte Konzentration, impulsives Verhalten
Nebensymptome	depressive und hochgestimmte Episoden, Kognitive Beeinträchtigung	Wahnhafte Episoden, Halluzinationen	Kognitive Beeinträchtigung	Wahnhafte Episoden, Halluzinationen, Kognitive Beeinträchtigung	Kognitive Beeinträchtigung
Vererblichkeit	Ca. 80%	85%	85%	58%	75%
Durchschnittliches Manifestationsalter	16-30 Jahre	18-40 Jahre	25-35 Jahre	< 3 Jahre	7-12 Jahre
Pharmakologische Therapie	Antipsychotika	Antidepressiva, Stimmungsstabilisierer	Antidepressiva, Stimmungsstabilisierer		Stimulanzien

Tabelle 1: Klinische Symptome von Schizophrenie, bipolaren Störungen, schizoaffektiven Störungen, Autismus, ADHS

Die oben abgebildete Tabelle verdeutlicht die Symptomüberschneidung der einzelnen Differentialdiagnosen der Schizophrenie. ADHS = Aufmerksamkeits-Defizit-Hyperaktivitäts-Syndrom. Es erfolgte eine sinngemäße Übersetzung aus dem Englischen (Owen et al., 2016).

Die Heterogenität der klinischen Präsentation schizophrener Patienten legt bereits eine Heterogenität in der Pathogenese der Krankheit nahe.

Ein Lösungsansatz für zunächst eindeutigere Diagnostik und dementsprechend zielgerichteterer Therapien könnte eine Aufteilung des Symptomkomplexes Schizophrenie

in einzelne Subgruppen der Erkrankung anhand von biologisch definierten Fällen und deren Pathogenese sein.

Biomarker sind objektiv messbare biologische Indikatoren, die die ausschlaggebenden pathophysiologischen Regulationswege einer spezifischen Erkrankung widerspiegeln und somit sowohl in der Diagnostik als auch in der Therapie und Prognose entscheidend sein können. Somit lässt sich je nach ihrer Funktion zwischen diagnostischen, prognostischen und arzneimittelbezogenen Biomarkern unterscheiden.

Diagnostische und prognostische Biomarker sind krankheitsbezogene Risikoindikatoren und können zu einer objektiveren Diagnostik als die symptombezogene Diagnostik es derzeit hinsichtlich der Schizophrenie leisten kann, führen.

Der aktuell noch vorherrschende Mangel an Biomarkern in der Diagnostik von chronischen mentalen Erkrankungen liegt zum einen an der oben beschriebenen Heterogenität der einzelnen Subgruppen, welche bislang unter dem Begriff Schizophrenie zusammengefasst sind, als auch von der multifaktoriellen Krankheitsgenese basierend sowohl auf genetischer Prädisposition, als auch exogenen Einflussfaktoren.

Arzneimittelbezogene Biomarker messen den Therapieerfolg spezifischer Medikamente. Überdies führt die Entwicklung von Biomarkern zu mehr Verständnis und Wissen hinsichtlich der Pathophysiologie, wodurch auch die Entwicklung krankheitsspezifischer Medikation erleichtert werden kann.

Eine sichere Diagnosestellung anhand von Biomarkern ist ein weiterer Schritt in Richtung personalisierter Medizin mit größerem Nutzen für die Patienten.

Wichtig für den klinischen Nutzen von Biomarkern ist deren leichte und gut reproduzierbare Gewinnung durch möglichst geringe invasive Eingriffe sowie deren klinische Wertigkeit, welche sich im Wesentlichen aus der diagnostischen *Accuracy* (dt. Richtigkeit), der Fähigkeit eines diagnostischen Verfahrens, zwischen zwei alternativen Gesundheitszuständen zu unterscheiden (Zweig and Campbell, 1993), ergibt. Idealerweise sollte ein Biomarker eine hohe Sensitivität als auch Spezifität haben. Alternativ ergibt eine Kombination aus zwei Biomarkern, einer mit hoher Sensitivität plus einer mit hoher Spezifität, einen geeigneten diagnostischen Test mit hoher *Accuracy*.

Körperflüssigkeiten wie zum Beispiel Blut, Urin oder Liquor ergeben sich zum einen als gut zugängliche Quellen, zum anderen ermöglichen sie den Zugang zu molekularen Biomarkern, die auf Grundlage der biophysiologischen Veränderungen der Krankheit oder auch Behandlung beruhen. Beispiele für etablierte molekulare Biomarker, sowohl diagnostisch, prädiktiv, als auch für zielgerichtete Therapien, gibt es bereits zahlreich in der Onkologie, aber auch in der Immunologie. Meist handelt es sich hierbei um Stoffwechselprodukte,

Antigene oder Genprodukte. Choriongonadotropin (hCG) ist ein Peptidhormon, welches physiologisch in der Schwangerschaft, jedoch auch von Tumoren der Keimdrüsen gebildet wird und als Verlaufsparemeter unter Therapie dient. Das Medikament Herceptin® ist ein Beispiel der zielgerichteten Therapien. Es basiert auf dem monoklonalen Antikörper Trastuzumab, der an den epidermalen Wachstumsfaktorrezeptor HER2/neu (Humaner Epidermaler Wachstumsfaktor Rezeptor) bindet, welcher sich auf der Zelloberflächen bestimmter Krebszellen befindet und so deren Wachstum hemmt. Als Indikation für eine solche Therapie wird der Nachweis von HER2-Überexpression bei Mamma- und Magenkarzinom Patienten gewertet (Untch, 2006).

Blutzellen und speziell Lymphozyten wurden als Quelle von Biomarkern bereits umfangreich untersucht. RNA- und Protein basierende Studien basieren auf der Annahme, dass chronische mentale Erkrankungen auf Veränderungen im Proteinlevel im Gehirn zurück zu führen sind und diese sich in den peripheren Körperflüssigkeiten, wie zum Beispiel dem Blut, widerspiegeln.

Diese Annahme führt zu dem Ziel, Schlüsselproteine in chronischen mentalen Erkrankungen zu identifizieren, welche im klinischen Alltag gut zu analysieren wären und somit als diagnostisches und prognostisches Kriterium dienen können.

1.1.4 Revers-translationale Medizin zur Entdeckung biologischer Marker

Der Begriff Translationale Medizin beinhaltet den disziplinübergreifenden Teil der Biomedizin, der anhand von effizienter Integration präklinischer Forschung in die Behandlung von Patienten im klinischen Alltag geprägt ist.

Das Konzept stammt aus den 1990er Jahren und war zuerst unter dem Namen „bench to bedside“ bekannt.

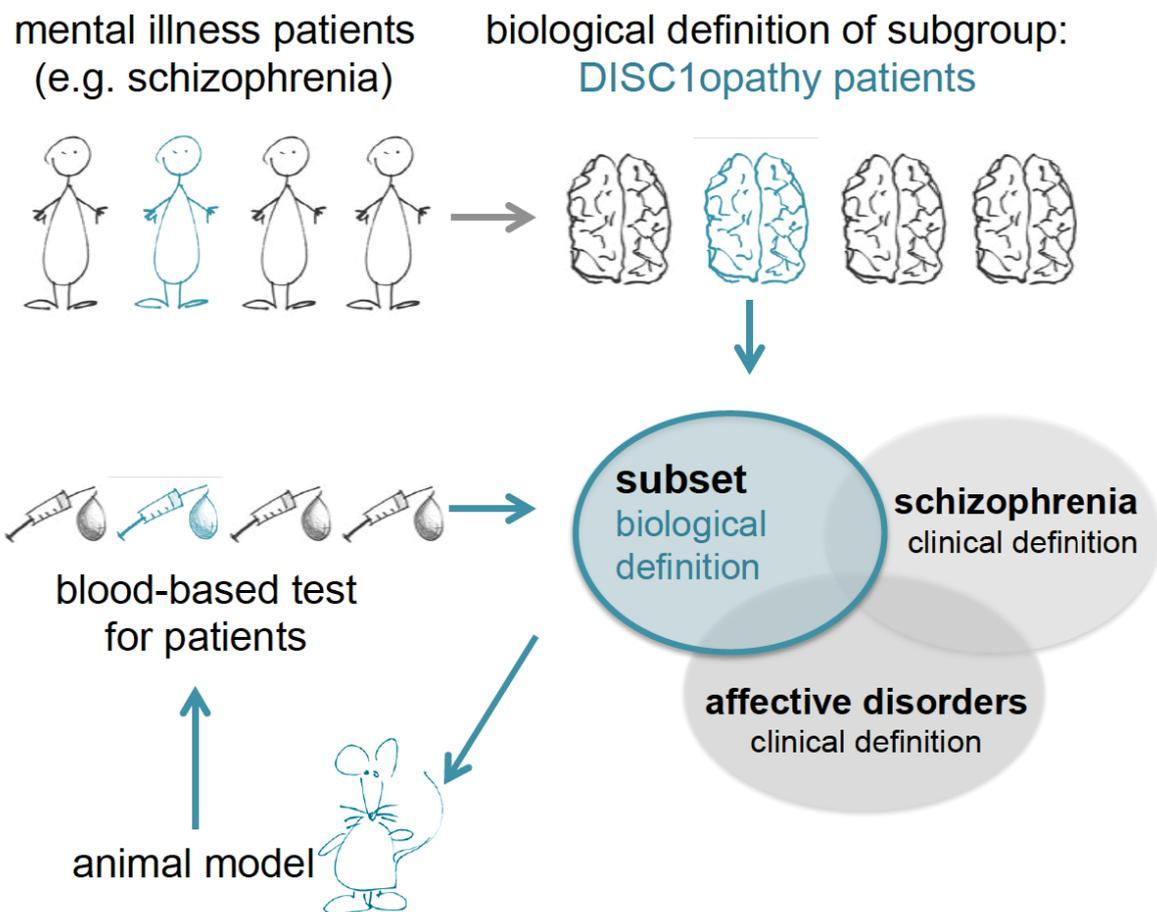


Abbildung 1: Die Revers-translationale Methode zur Etablierung von Biomarkern (Trossbach et al., 2019)

Die Heterogenität der Symptome von chronisch mental erkrankten Patienten führt zu einem Mangel an klar definierten Kategorisierungskriterien, welche für die Biomarker Entwicklung notwendig ist. Die Definierung von Untergruppen basierend auf menschlicher Neuropathobiochemie, in unserem Fall fehlgefaltetes DISC1 Protein in *post mortem* Gehirnen schizophrener Patienten (Leliveld et al., 2008), ermöglichte uns die Entwicklung eines Rattenmodell für diese spezifische Untergruppe schizophrener Patienten (Trossbach et al., 2016), welches ein verändertes Proteinnetzwerk zeigte (Sialana et al., 2018). Anhand dieses Tiermodells lassen sich Veränderungen in der Signaltransduktion analysieren, die für die in der Schizophrenie bekannten Verhaltensveränderungen verantwortlich sind und biologische Marker identifizieren, welche mithilfe der revers-translationen Methode zurück in eine Subgruppe schizophrener Patienten transferiert werden könne.

Die revers-translationale Medizin beinhaltet den bidirektionalen Prozess. In unserem Fall von dem Patienten- zu einem Rattenmodell, um anhand von diesem Rattenmodell biologische Marker zu eruieren, die in der klinischen Diagnostik von Patienten einzusetzen sind. Revers-translationale Medizin startet mit einem Patienten, der in unserem Fall die klinische Diagnose Schizophrenie hat. Anhand von postmortem Untersuchungen der Gehirne solchen Patienten hinsichtlich spezieller Neuropathologie, konnte eine Untergruppe der Patienten mit unlöslichen DISC1-Proteinen identifiziert werden. Diese Patienten zeigten zu Lebzeiten

Symptome passend zu der klinischen Diagnose einer Schizophrenie oder einer affektiven Störung.

Es wurde ein Rattenmodell mit der Protein-Pathologie entwickelt, welche zu einem Phänotyp mit unlöslichem DISC1-Protein führt (Trossbach et al., 2016). Anhand dieses Rattenmodells wurden verschiedene Experimente durchgeführt mit dem Ziel einen biologischen Marker zu finden, der eine Unterscheidung von tgDISC1-Ratten zu ihren Wurfgeschwistern erlaubt.

Im nächsten Schritt sollte ein Transfer der identifizierten biologischen Marker auf Patienten erfolgen, um eine die Untergruppe der DISC1-Patienten anhand eines Bluttests identifizieren zu können.

Im nächsten Schritt könnte diese Entdeckung einer definierten Pathologie die Herstellung einer kausalen Pharmakotherapie bedeuten.

1.1.5 Volumetrische Vorstudien des Ventrikelsystems bei Schizophrenen Patienten

Die Erweiterung der Seitenventrikel bei Schizophrenen Patienten ist einer der häufigsten replizierten Befunde in der Literatur betreffend die Neurophysiologie bei Schizophrenie.

Bereits 1955 zeigten sich pneumencephalographisch vergrößerte innere Liquorräume, bei Patientin mit fortgeschrittener Erkrankung (Huber, 1955). In den 70er Jahren wurde durch Computertomographie (CT) eine Vergrößerung der Seitenventrikel bei schizophrenen Patienten (Johnstone et al., 1976) festgestellt. Shelton und Weinberger überprüften 1986 CT Aufnahmen schizophrener Patienten und fanden in 75% der Fälle eine Vergrößerung der Seitenventrikel (Shelton RC, 1986). Auch wenn dies kein spezifisches Symptom der Schizophrenie ist, eine Ventrikelvergrößerung ist bei einer Vielzahl von mentalen Erkrankungen wie zum Beispiel Alzheimer Erkrankungen, Hydrozephalus, Chorea Huntington oder auch Medikamentenassoziiert zu finden, so liegt doch die Vermutung nahe, dass eine Vergrößerung der Seitenventrikel mit einer Volumenverminderung des Gehirns einhergeht.

Durch die Vorteile der Technik der Magnetresonanztomographie (MRT) gelangen in den folgenden Jahren zahlreiche Studien, die eine strukturelle Änderung des Gehirns von schizophrenen Patienten bestätigten.

Shenton und seine Kollegen veröffentlichten 2001 eine Zusammenfassung von 55 MRT-Studien (Shenton et al., 2001) von denen 44, sprich 80%, eine Vergrößerung der Seitenventrikel dokumentierten. In den meisten Studien, die diese Vergrößerung nicht dokumentierten, fiel zumindest eine Vergrößerung des Temporalhörnern der Seitenventrikel

auf. Am häufigsten fiel eine Prominenz des linken Seitenventrikels im Vergleich zum rechten auf.

Post mortem Studien an Gehirnen betroffener Patienten ergaben die gleichen Befunde wie diese MRT-Ergebnisse. Hier fanden sich in zahlreichen Studien sowohl verminderte Hirnvolumina als auch vergrößerte Temporalhörner der Seitenventrikel.

In 33 untersuchten Studien bezüglich der Größe des dritten Ventrikels fand sich in 24 Studien, sprich 73%, eine Vergrößerung des dritten Ventrikels. Letzteres lässt eine Volumenminderung des Thalamus vermuten.

1.2 Das Konzept der DISC1opathien

1.2.1 Proteinaggregation in neurodegenerativen Erkrankungen

In einer Vielzahl von neurodegenerativen Erkrankungen konnte bereits eine Akkumulation von unlöslichen intra- und extrazellulären Proteinen im zentralen Nervensystem nachgewiesen werden. Beispiel für Proteinakkumulation ist die Alzheimer Erkrankung, in der extrazelluläre β -Amyloid Plaques und intrazellulär Tau Fibrillen zu finden sind. Beim Parkinson sind es alpha-Synuclein positive Lewy-Körperchen, die sich intrazellulär ansammeln. In Prionenerkrankungen wie der Creutzfeld-Jakob-Krankheit findet sich eine Ansammlung von PrP^{Sc}-Plaques (Prion Protein Scrapie; pathogene Form des Prion-Proteins, zuerst bei an Scrapie erkrankten Tieren gefunden). Ein weiteres Beispiel ist die Amyotrophe Lateralsklerose, in der in etwa 20% der familiären Fälle eine Mutation im Superoxid-Dismutase codierenden SOD1-Gen zu finden ist (Taylor et al., 2002).

Meist ist es wie im letzten Fall eine Mutation eines proteincodierenden Gens, welches durch eine Proteinfehlfaltung zu einer toxischen Ablagerung und somit Dysfunktion des entsprechenden Proteins führt (Kopito, 2000). Die Mutationen in den familiären Formen der jeweiligen Krankheiten führen interessanterweise meist zu Veränderungen in denselben Proteinen, wie die, welche auch in den sporadischen Formen nachgewiesen wurden (Prusiner, 2001). Die Idee ist, dass aberrante Proteinhomöostase, Proteostase, ein Zeichen für eine dysfunktionelle Zellpathologie ist. Wenngleich bei neurodegenerativen Erkrankungen dies so bedeutend ist, dass es zum Zelltod kommt, könnte aberrante Proteostase auch in subtileren Formen existieren, die nicht zum Zelltod führen, z.B. bei chronischen mentalen Erkrankungen (Bradshaw and Korth, 2019).

Auf Grundlage diese Forschungserkenntnisse erfolgten bereits 2008 die ersten Studien, ob Proteinfehlfaltung und -akkumulation auch in chronischen mentalen Erkrankungen eine Rolle spielen. Leliveld und seinen Kollegen analysierten hierzu *post mortem* Gehirngewebe,

von Patienten mit Phänotypen einer affektiven Störung oder Schizophrenie. Es gelang ihnen bei 15% der untersuchten Patientenhirne signifikante Mengen an unlöslichem DISC1 Protein zu isolieren (Leliveld et al., 2008). Diese Erkenntnis legt die Hypothese nahe, dass die Ansammlung von spezifischen Proteinen ein wichtiger Aspekt in der Erforschung von Biomarkern einer Subgruppe von chronischen mentalen Erkrankungen darstellen könnte. Eines der aussichtsreichsten Kandidatengene in der Forschung von chronischen mentalen Erkrankungen stellt das Gen dar, welches für das DISC1 Protein kodiert.

1.2.2 Disrupted-in-Schizophrenia 1 (DISC1)

Das *DISC1*-Gen, *Disrupted-in-Schizophrenia 1*, wurde erstmals in einer schottischen Familie mit zahlreichen chronischen mentalen Erkrankungen unterschiedlicher Phänotypen identifiziert.

Hier zeigte sich eine hohe Korrelation zwischen einer balancierten Chromosomentranslokation $t(1;11)$ (q42.1;q14.3) sowie verschiedenen chronischen mentalen Erkrankungen wie der Schizophrenie, Bipolarer Störung und wiederkehrenden depressiven Störungen.

In einer klinischen Studie von Blackwood in 2001 wurden von 87 untersuchten Familienmitglieder 37 als Träger der Translokation identifiziert. 29 der 37 Mutationsträger wiesen eine psychiatrische Diagnose auf. Sieben der Mutationsträger litten an einer Schizophrenie, einer an einer bipolaren Störung und 10 an einer relevanten wiederkehrenden Depression (Blackwood et al., 2001)

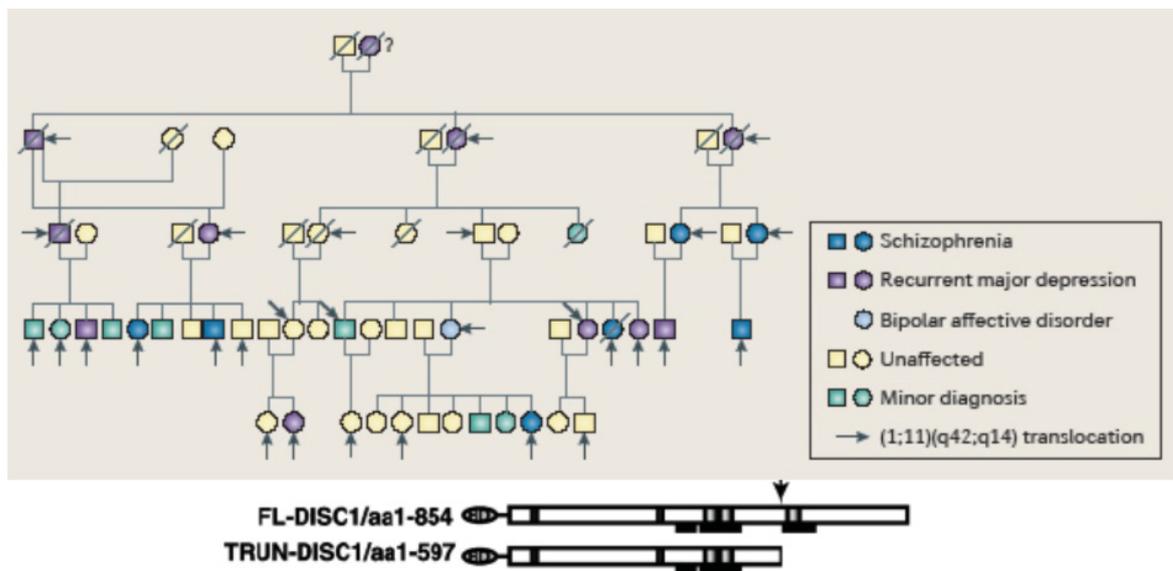


Abbildung 2: Stammbaum einer schottischen Familie, in welcher das *DISC1* Gen entdeckt wurde. Blackwood et al. (2001) *AJHG* 69:428 Brandon & Sawa (2011) *Nat Rev Neurosci* 12:707

Diese Entdeckung führte zu der Annahme, dass eine Veränderung in einem oder mehreren Genen an dem Bruchpunkt oder in seiner unmittelbaren Nähe zu einem erhöhten Risiko hinsichtlich der Entstehung einer Psychose führt. Ein Maximum von LOD 7.1 (*logarithm of the odds*: Wahrscheinlichkeit, dass zwei Loci auf demselben Chromosom nah beieinander liegen und somit gekoppelt sind) bestätigte eine Verbindung der Chromosomentranslokation mit den klinischen Phänotypen bestehend aus Schizophrenie, bipolarer Störung und rezidivierenden massiven Depressionen. Aufgeteilt in die einzelnen Subgruppen lag der LOD bezüglich affektiver Störungen bei 4.5, die Assoziation zwischen einer Translokation in dem Bereich und Schizophrenie bei LOD 3.6

Die neu entdeckte Chromosomentranslokation führte zu einem bis dahin unbeschriebenes Gen, welches heute Disrupted-in-Schizophrenia 1 (*disc1*) genannt wird, sowie zu dem entsprechenden nicht kodierenden Antisense-Strang, Disrupted-in-Schizophrenia 2 (*disc2*). Durch die balancierte Translokation t(1;11) (q42;q14) kommt es zu einem Bruchpunkt im Intron 8, zwischen Exon 8 und 9, wodurch höchstwahrscheinlich ein C-Terminal verkürztes Proteinprodukt entsteht, welches statt 854 nur 597 Aminosäuren enthält (Millar et al., 2000). All die untersuchten Familienmitglieder der oben beschriebenen schottischen Familie enthielten eine heterozygote Mutation, sprich ein intaktes DISC1-Protein plus eine verkürzte Proteinvariante (Blackwood et al., 2001).

Der wenn auch einprägsame Name Disrupted-in-Schizophrenia 1 birgt den Irrtum, dass eine Mutation in diesem Gen rein mit der Krankheit Schizophrenie zu assoziieren ist. Dass dies nicht der Fall ist, zeigen die oben genannten Studien, in denen die Mutationsträger eine große

Bandbreite von chronischen mentalen Erkrankungen aufwiesen. Vielmehr scheint das Gen einen vulnerablen Locus für diverse mentale Erkrankungen darzustellen.

1.2.3 Konzept der DISC1opathien

Proteinfehlfaltungserkrankungen, wie sie bereits als Tauopathien oder Synucleinopathien bekannt sind, umfassen eine Reihe von phänotypisch und/ oder pathophysiologisch voneinander abzugrenzenden Krankheitsbildern mit demselben Grundprinzip. Aufgrund von Proteinfehlfaltung kommt es entweder zur toxischen Ablagerung oder zu einem Funktionsverlust des entsprechenden Proteins. Während Proteinaggregationen im Rahmen neurodegenerativer Erkrankungen meist zum Zelltod führt, so kann eine aberrante Proteostase in subtiler Form auch nur zu einer dysfunktionellen Zellpathologie führen ohne dabei zum Zelltod zu führen (Bradshaw and Korth, 2019). Entsprechend des betroffenen Proteins erfolgt die Zuteilung zu verschiedenen Proteinopathien.

Die „DISC1opathien“ beinhalten eine Subgruppe von symptomatisch heterogenen chronisch mental kranken Patienten mit dem gemeinsamen Merkmal von unlöslichem DISC1-Protein im Gehirn. Untersucht wurden 15 *post mortem* Gehirne von chronisch mental erkrankten Patienten, von denen ca. 47 Prozent; zwei Patienten mit der Diagnose Schizophrenie, zwei mit der Diagnose Bipolare Störung und drei Patienten mit Depressiver Störung, größere Mengen aggregiertes DISC1 aufwiesen, während sich weder in den gesunden Kontrollen noch im Gewebe der Patienten mit anderen neurodegenerativen Erkrankungen wie zum Beispiel Alzheimer oder frontotemporale Demenz DISC1-Aggregate zu finden waren. Einem eindeutigen Phänotypen konnten die DISC1-Aggregate dabei nicht zugeordnet werden, was die Heterogenität der DISC1opathien, die man auch schon in der Schottischen Ursprungsfamilie beobachten konnte, unterstreicht (Korth, 2012).

Ein weiteres Merkmal von Proteinopathien ist die Fähigkeit der angesammelten Proteine zur interzellulären Transmission. Dies zeigte sich sowohl in den Prionenerkrankungen (Prusiner, 2001) als auch in anderen Erkrankungen mit Proteinakkumulationen wie zum Beispiel den Tauopathien (Clavaguera et al., 2009) und Synucleinopathien (Kordower et al., 2008, Desplats et al., 2009).

Ottis und seine Kollegen zeigten, dass DISC1-Fragmente, welche in *E.coli* Zellen exprimiert wurden, interzelluläre Transmission vergleichbar mit der von synthetisch hergestelltem oligomerischem alpha-Synuclein zeigte. In der Zelle führten die DISC1-Aggregate neben ihrer eigenen Unlösbarkeit durch Bindung weiterer zuvor löslicher Proteine zu deren verminderten Löslichkeit (Zhu et al., 2017).

Das Konzept der DISC1opathien beinhaltet also eine Untergruppe von Patienten mit chronischer mentaler Erkrankung, die sich zwar klinisch heterogen präsentieren, deren Gemeinsamkeit jedoch eine DISC1 abhängige Proteinaggregation im Gehirn ist.

1.2.4 Funktion und Interaktionspartner von DISC1

DISC1 ist ein zytoplasmatisches Strukturprotein, welches in verschiedenen Bereichen des Gehirns, vor allem während der neuronalen Entwicklung, aber auch im adulten Gehirn exprimiert wird (Seshadri et al., 2010).

DISC1 interagiert mit über 150 Proteinen (Camargo et al., 2007) ohne enzymatische Aktivität, sondern vielmehr als Strukturprotein, welches durch intermolekulare Protein-Protein-Interaktion die Funktion der bindenden Proteine reguliert (Yerabham et al., 2018).

Am N-terminalen Ende von DISC1 befindet sich eine dimetrische D Region (Yerabham et al., 2017). An seinem C-terminalen Ende enthält DISC1 multiple *coiled-coil*-Proteindomänen (umeinandergewundene alpha-Helices), sowie zwei Leucin-Zipper-Motive und bietet somit wichtige Interaktionsmöglichkeiten mit anderen Proteinen (Millar et al., 2000, Yerabham et al., 2017).

Durch die Regulation von neuronaler Proliferation und Migration hat DISC1 eine wichtige Rolle in der neuronalen Entwicklung (Kamiya et al., 2005, Mao et al., 2009), welche bekannterweise in der Entstehung von chronischen mentalen Erkrankungen, wie zum Beispiel der Schizophrenie, eine entscheidenden Rolle spielt (Lewis and Levitt, 2002, Jaaro-Peled et al., 2009).

Der enge Zusammenhang von DISC1 und der neuronalen Entwicklung konnte durch eine Expressionsanalyse von DISC1 in Mäusegehirnen während der Embryonalphase gezeigt werden. An den Embryonaltagen 14. Und 15. (E14 - E15) zeigt sich eine erhöhte Expression von DISC1. Eine zweite Phase der erhöhten Expression zeigte sich um den 35. postnatalen (P35) Tag. In beiden Phasen besteht eine hohe Aktivität hinsichtlich der neuronalen Entwicklung (Mao et al., 2009, Schurov et al., 2004).

In der erwachsenen Maus zeigte sich eine hauptsächliche Expression von DISC1 in den Regionen des Gyrus Dentatus und im olfaktorischen Bulbus, welche beide eine hohe Neurogenese aufweisen (Mao et al., 2009).

Einer der ersten Schritte der Cortigogenese, nach der Induktion der Neuralplatte, ist die neuronale Proliferation. DISC1 interagiert mit dem Wnt-Signalweg (Wingless-Int-1-Signalweg), welcher eine wichtige Rolle in der Embryogenese hat, indem es den Abbau von β -Catenin reguliert. Bindet Wnt an seinen Rezeptor und Co-Rezeptor wird eine Aktivierungskaskade gestartet, welche die Glykogensynthase-Kinase 3 beta (GSK3-beta)

inaktiviert. GSK3-beta ist eine Serin/Threonin-Protein-Kinase und wichtiger Bestandteil des β -Catenin abbauenden Komplexes indem es unter anderem β -Catenin phosphoryliert. Die Phosphorylierung von β -Catenin führt zur Ubiquitylierung und dem Abbau von β -Catenin. Wird der Abbau β -Catenin jedoch verhindert, akkumuliert dieses und gelangt so in den Zellkern, wo es an andere Transkriptionsfaktoren bindet und diese aktiviert.

Neben Wnt-aktivierten Proteinen, konnte gezeigt werden, dass auch DISC1 GSK3-beta inhibieren und somit den Abbau von β -Catenin verhindert kann. Die Inhibierung von GSK3-beta durch DISC1, bestätigte sich nicht nur in embryonalen Zellen, sondern auch in adulten Zellen des Gyrus dentatus (Mao et al., 2009).

Die Stabilisierung von β -Catenin ermöglicht DISC1 somit die Regulation der neuronalen Proliferation durch die Transkription der Wnt-Signalweg abhängigen Gene.

Darüber hinaus konnten Mao und seine Kollegen zeigen, dass ein gestörter DISC1/GSK3-beta Signalweg zu pathologischem Verhalten führte. Die Mäuse, in denen die Expression von DISC1 im Gyrus Dentatus ausgeschaltet wurde, zeigten hyperaktives Verhalten in neuer Umgebung und depressives Verhalten (Mao et al., 2009).

Der neuronalen Proliferation folgen die neuronale Migration, Aggregation und Differenzierung. Die neuronale Migration ist abhängig von der korrekten Lokalisation der zentrosomalen Proteine sowie der Mikrotubulusorganisation. Es konnte gezeigt werden, dass in utero Expression von *short-hairpin* RNAs (shRNAs) gegen *disc1* sowie auch die Expression einer verkürzten Mutation von *disc1* an E14,5. zu verspäteter neuronaler Migration und fehlgeleiteten Dendriten kortikaler Neurone führte (Kamiya et al., 2005). DISC1 fungiert hier als ein wichtiges Verankerungsprotein, welches in Wechselwirkung mit Dynein/Dynactin-Motorproteinen, Nuclear Distribution Factor E-like (NDEL1) und Lissencephaly 1 (LIS1) an das Zentrosom bindet (Ishizuka et al., 2011, Bradshaw et al., 2008).

Im adulten Gehirn spielt DISC1 eine wichtige Funktion bei Lern- und Gedächtnisprozessen indem es den Transport über die Mikrotubuli, sowie die Signalübertragung über Synapsen und neuronale Plastizität beeinflusst. 2007 zeigten Duan und seine Kollegen, dass DISC1 *knockdown* (Herunterregulierung eines Gens) in neuentstandenen Zellen des Gyrus Dentatus des Hippocampus' zu Hypertrophie des Zellsoma, beschleunigtem dendritischem Wachstum mit Fehlpositionierung der einzelnen Dendriten sowie erhöhter intrinsischer Erregbarkeit und beschleunigter Synaptogenese führt (Duan et al., 2007). Eine wichtige Rolle scheint hierbei die Interaktion von DISC1 mit Gridin (zuvor als KIAA1212 bezeichnet), einem AKT (einer Serin/Threonin-Kinase) bindenden und dies inaktivierendem Protein, zu spielen,

wodurch der Signalweg von AKT und *mammalian target of rapamycin* (mTOR) maßgeblich beeinflusst wird (Kim et al., 2009, Enomoto et al., 2009).

Des Weiteren findet man DISC1 in der Postsynapse ausgereifter Neurone (Kirkpatrick et al., 2006), wo es die Signalübertragung durch die Aktivierung und Blockade einzelner Synapsen-Proteine beeinflusst. So führt DISC1 zum Beispiel zu einer Blockade des Kal-7/Rac1 Signalweges (*Kalirin-7/Ras-related C δ botulinum toxin substrate*). Kal-7 agiert, ungebunden an DISC1 als GDP/GTP-Austauschfaktor (Guanosindiphosphat/Guanosintriphosphat). Durch Kal-7 aktiviertes Rac1 führt wiederum zu einem vermehrten Wachstum dendritischer Dornfortsätze, jedoch bei Überaktivität gleichzeitig auch zu vermehrtem Dendritenverlust im Gehirn (Hayashi-Takagi et al., 2010). Eine weitere Interaktion zeigt DISC1 mit TNIK (Traf2 and Nck-interacting kinase), eine weiteren Serine/Threonine Kinase, welche sowohl die Rezeptordichte von Glutamat, als auch die anderer Synapsen-Proteinen aufrechterhält. DISC1 bindet TNIK und inaktiviert seine Kinaseaktivität, wodurch es zu einer Degeneration spezifischer postsynaptischer Proteine kommt (Wang et al., 2011).

Zusammenfassend lässt sich anhand der multiplen Funktionen von DISC1 im Gehirn in Zusammenhang mit dem Wissen, dass der größte Teil der Bindungspunkte sich am C-terminalen Ende befindet, zum einen die große Bandbreite der DISC1-assoziierten Erkrankungen erklären, als auch die klinische Bedeutsamkeit einer C-Terminall verkürzten Mutation, wie sie in der schottischen Familie gefunden wurde.

1.3 tgDISC1-Ratten Modell

Das transgene Rattenmodell, das nicht-mutiertes humanes DISC1 Protein hinter dem PrP Promoter leicht überexprimiert, wurde entwickelt, um die Fehlfaltung oder die Fehlassemblierung des DISC1 Proteins abzubilden und somit die gestörte DISC1 Signaltransduktion, die möglicherweise bei vielen Patienten mit sporadischer, Schizophrenie eine Rolle spielt.

Um die Auswirkungen fehlerhafter Proteostase besser untersuchen zu können, wurde das erste transgene Rattenmodell für ein Kandidatengen einer chronischen mentalen Erkrankung generiert. Die Ratten zeigten eine erhöhte Expression von humanem, nicht mutiertem

DISC1, welches verglichen mit endogenem Ratten Disc1-Proteinlevels etwa um das 11-fache erhöht war (Trossbach et al., 2016).

Die Vorteile eines Ratten- gegenüber einem Mausmodell sind vor allem deren größere physiologische, genetische und morphologische Ähnlichkeit zum Menschen im Vergleich mit denen der Mäuse (Do Carmo and Cuello, 2013).

Da in chronischen mentalen Erkrankungen auch die kognitive Entwicklung eine große Rolle spielt, ist es ein weiterer Vorteil, dass Ratten sowohl intelligenter als auch sozial kompatibler sind als Mäuse und somit in der Lage sind, komplexere Aufgaben besser und Lernprozesse schneller zu absolvieren.

Außerdem erleichtert die größere Körpergröße sowohl Interventionen als auch die Gewinnung von Körperflüssigkeiten wie Blut oder Liquor zur Analyse von Biomarkern.

Dopamin-abhängige Verhaltensauffälligkeiten der tgDISC1-Ratte

Die tgDISC1-Ratten weisen perinukleäre Proteinaggregate vor allem in Gehirnregionen mit erhöhtem Dopaminniveau wie zum Beispiel dem Striatum auf. TgDISC1-Ratten zeigen eine Amphetamine-Hypersensitivität (Trossbach et al., 2016), welche auch bei Patienten mit der Diagnose Schizophrenie bekannt ist.

Desweiteren zeigten die tgDISC1-Ratten hyperexploratives Verhalten sowie Defizite im Rotarod, sprich in der Koordination und Konzentrationsausdauer (Trossbach et al., 2016). In *ex vivo* Analysen der Dopaminrezeptoren konnte gezeigt werden, dass tgDISC1-Ratten 80% mehr Dopaminrezeptoren des Typs D2 haben. Außerdem konnte eine vermehrte Translokation von Dopamintransportern in die Plasmamembran und somit ein erhöhter Einstrom von Dopamin in die Zelle beobachtet werden. Die erhöhte Konzentration von Dopamin im Zytosol führte wiederum zu DISC1 Multimerisierung und dem vermehrten Anfall unlöslicher DISC1-Aggregate (Trossbach et al., 2016).

Neuropathologische Veränderungen in der tgDISC1 Ratte

Es konnte nachgewiesen werden, dass tgDISC1-Ratten sowohl weniger TH-positive Fasern, als auch ein vergrößertes Striatum und somit eine reduzierte Dichte Tyrosinhydroxylase (TH)-positiver Fasern im Striatum aufweisen. Des Weiteren konnte eine reduzierte Dichte TH-positiver Zellen in der Substantia nigra, Pars compacta, gefunden werden (Hamburg et al., 2016).

Der nigrostriatale Signalweg besteht aus dopaminergen Neuronen in der Pars compacta der Substantia nigra, deren Neurite ins Striatum reichen. Eine reduzierte Dichte dopaminerger

Fasern im Striatum ist im Zusammenhang mit verschiedenen neurologischen Erkrankung bereits als Ursache für Stimmungsschwankungen assoziiert (Calabresi et al., 2014).

Des Weiteren zeigten tgDISC1-Ratten eine Verschiebung von Parvalbumin (PV)-positiven Interneuronen von oberflächlicheren Kortexschichten (II, III), in tiefer gelegene Schichten (V, VI). Diese Verschiebung zeigte sich sowohl in der *forelimb region* (Bereich der vorderen Extremitäten) des primär somatosensiblen Cortex, als auch in dem sogenannten *barrel field* des primär somatosensiblen Cortex. Ein Bereich mit besonderer Säulen-Organisation, deren Verteilungsmuster mit dem der Spürhaare übereinstimmt. In beiden Regionen zeigte sich keine Veränderung in der Gesamtmenge PV-positiver Interneurone (Hamburg et al., 2016). Außerdem zeigte sich eine signifikante Reduktion PV-positiver Zellen im dorsalen Striatum, sowie im CA1 Feld des Hippocamps (Hamburg et al., 2016).

Als eine mögliche Ursache für die Verschiebung der PV-positiven Interneurone kommt die in der Schizophrenie bereits vorbekannte Migrationsstörung während der Gehirnentwicklung in Frage.

1.4 Ziele der Arbeit

Schizophrenie ist ein Krankheitsbild geprägt von biologischer Heterogenität. Diese Erkenntnis bedeutet, dass zunächst eine Unterteilung in einzelne Subgruppen erfolgen muss, um repräsentative Studienergebnisse hinsichtlich des biologischen Ursprungs, deren Mechanismen und letztendlich der Forschung an neuen Medikamenten zu erlangen.

Jeglicher Versuch einheitliche Ergebnisse für den Symptomkomplex Schizophrenie zu erlangen, wird dem vernichtenden Verdünnungseffekt durch die biologische Heterogenität unterliegen.

Ziel dieser Arbeit ist anhand von revers-translatinaler Medizin einen Biomarker für eine Subgruppe schizophrener Patienten, der DISC1opathien, zu identifizieren.

Die Notwendigkeit von Biomarkern besteht nicht nur um die bislang rein klinische Diagnose mittels objektiver Methoden zu sichern, sondern auch zur besseren Unteilbarkeit der einzelnen Subgruppen, als auch für die Entwicklung gezielter Pharmakotherapie.

Untersucht wurden sowohl mononukleäre Zellen des peripheren Blutes (engl.: Peripheral Blood Mononuclear Cell = PBMC), Liquor, als auch Auffälligkeiten der Hirnmorphologie als potenzielle Quellen eines Biomarkers.

1. Die PBMCs von tgDISC1-Ratten und deren Wurfgeschwistern (engl. *littermates* = LM) wurden hinsichtlich Unterschiede in der Genexpression analysiert. Anschließend wurde getestet, ob die dort gewonnen Ergebnisse auch in PBMCs schizophrenen Patienten und deren gesunden Kontrollen validierbar sind und somit als Biomarker für DISC1opathien dienen.
2. Im Liquor erfolgte eine Untersuchung des Materials hinsichtlich unterschiedlicher Proteinlevels in tgDISC1-Ratten und deren Wurfgeschwistern.
3. Die durchgeführte bildgebende Untersuchung der tgDISC1-Ratten und deren Wurfgeschwistern diente der volumetrischen Analyse des intrazerebralen Ventrikelsystems.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien

100 bp plus DNA Marker "ready-to-load"	Biobudget
100% Isofluran	Actavis
DMSO	Sigma-Aldrich
EDTA	AppliChem
Ethanol	VWR Chemicals
Kaliumchlorid	Sigma-Aldrich
Ketavet (Ketamin)	Pfizer
Methanol	Merck
Midori Green Advance DNA Stain	Nippon Genetics
Milchpulver (Skim Milk Powder)	Oxoid
Ni-NTA Agarose	Qiagen
Phosphorsäure	Merck
TRIS	Merck
TWEEN	Sigma-Aldrich

2.1.2 Basispuffer

PBS

NaCl	137 mM
KCl	2,7 mM
KH ₂ PO ₄	2 mM
Na ₂ HPO ₄	10 mM

PBS-T

NaCl	137 mM
KCl	2,7 mM
KH ₂ PO ₄	2 mM
Na ₂ HPO ₄	10 mM
Tween	0,05%

HAC-Lösung

Essigsäure	1 ml
Milli Q Wasser	1 l

TAE

TRIS	40 mM
Essigsäure	20 mM
EDTA	1 mM

Ladepuffer

TRIS, pH 6,8	100 mM
SDS	4 %
Glycerin	20 %
Bromphenol blue	0,2 %
Beta-Mercaptoethanol	4 %

Laufpuffer

TRIS	25 mM
Glycin	250 mM
SDS	0,1%

Transferpuffer

TRIS	48 mM
Glycin	39 mM
Methanol	20%

2.1.3 Kits

Coomassie blue	Expedeon
D-PBS	Invitrogen
dNTP Set	Quiagen
Ficoll-Paque PREMIUM	GE Healthcare Life Sciences
HotStarTaq® DNA-Polymerase	Qiagen
NuPAGE™ MES SDS Buffer Kit	Thermo Fisher Scientific
NuPAGE™ Sample Reducing Agent (10X)	Thermo Fisher Scientific
PageRuler Prestained Protein Ladder 0-170 kDa	Thermo Fisher Scientific
Platinum® SYBR® Green qPCR SuperMix-UDG	Thermo Fisher Scientific
QIAshredder	Qiagen

Rat Hemoglobin (HM) ELISA Kit	GenWay Biotech
RevertAid First Strand cDNA-Synthese Kit	Thermo Fisher Scientific
RNase Free DNaseI Set	Qiagen
RNeasy Mini Kit	Qiagen
Seppro Rat Spin Columns	Sigma-Aldrich
WT Plus Reagent Kit, Affymetrix	Thermo Fisher Scientific

2.1.4 Versuchsgeräte und weitere Verbrauchsmaterialien

Glaskapillare (OD.:1mm; I.D.: 0,78 mm)	
Tecan Safire Plattenlesegerät	Tecan
Mini Spin Tischzentrifuge	Eppendorf AG
Affymetrix WT Plus Reagent Kit	Thermo Fisher Scientific
Nanodrop-ND-1000-Spektrophotometer	Thermo Fisher Scientific
NuPAGE 4-12%, Bis-Tris, 1.0 mm, Protein Gel,	Thermo Fisher Scientific
Safe-lock tubes 1,5 mL	Eppendorf AG
Speed Vac Zentrifuge	Eppendorf AG
Thermocycler T3000	Biometra
XCell SureLock Mini-Cell	Thermo Fisher Scientific
Eppendorf Centrifuge 5417R	Eppendorf AG

2.1.5 Software

Anatomist/ BrainVisa program version 4.3.0	NeuroSpin,
GeneSpring GX Software	Agilent Technologies
MaxQuant Software	Max Planck Universität
StepOne Software v2.3	Thermo Fisher Scientific
XFluor4 Software	Tecan, Männedorf

2.1.6 Tiere und Tierhaltung

Alle Experimente erfolgten in Übereinstimmung mit den behördlichen Richtlinien des Nationalen Ausschusses zum Schutz von für wissenschaftliche Zwecke verwendete Tiere – kurz Nationaler Ausschuss Tierschutzgesetz der Bundesrepublik Deutschland und nach Genehmigung des Tierversuchsantrages zur Organentnahme 022/03. Es wurden alle

Bemühungen unternommen, die Anzahl an Versuchstieren möglichst gering zu halten und Unannehmlichkeiten für die Tiere zu minimieren.

Die Generierung der transgenen Ratten erfolgte durch die Injektion eines linearisiertem CosCHa.tet Vector Fragments mit dem *full-length, non-mutant* humanan DISC1 als Transgen mit den Polymorphismen F607 und C704 in die Pronuclei von Sprague Dawley Ratten. Die volle Integration des Transgens in das Rattengenom wurde anhand der Schwanzspitze der Tiere, durch Polymerasekettenreaktion (PCR) und *Southern Blotting* der genomischen DNA kontrolliert.

Es wurden jeweils drei Tiere pro Käfig unter Standardbedingungen mit zwölf Stunden Tag-Nacht-Rhythmus (Licht von 7 bis 19 Uhr, Dunkelheit von 19 bis 7 Uhr) und Futter- und Wasserzufuhr *ad libitum* gehalten. Alle Experimente erfolgten mit ausgewachsenen tgDISC1 Ratten und deren *littermates* im Alter von 8-9 Monaten.

2.1.7 Patientenkollektiv

Neben der Analyse der Genexpression von tgDISC1-Ratten und ihren *littermates* erfolgte anhand derselben Methode eine Analyse von gesunden Kontrollen und Patienten mit der Diagnose Schizophrenie. Die ausgewählten schizophrenen Patienten des LVR-Klinikums Düsseldorf der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf waren zum Zeitpunkt der Blutentnahme klinisch stabil für mehr als sechs Wochen. Alle Patienten und negativen Kontrollen unterzogen sich einem strukturierten Interview (SCID-1). Die Diagnose wurde anhand der DSM-IV Kriterien (New York State Psychiatric Institute, 1995) erneut bestätigt. Aus der untersuchten Patientenkohorte erhielten 78,4% eine antipsychotische Monotherapie mit Amisulprid, Ariprazol, Fluphenazin, Olanzapin, Paliperidon, Quetiapin, Risperidon oder Ziprasidon. Einige der restlichen 21,6% Patienten erhielten eine Kombination aus zwei Antipsychotika. Die ausgewählten gesunden Negativkontrollen durften bislang keine Schizophreniediagnose, sowie lebenslang keine Alkoholabhängigkeit oder Abhängigkeit illegaler Drogen aufweisen. Desweiteren durften die gesunden Negativkontrollen keine begleitende neurologische Erkrankung oder einen ähnlichen Gesundheitszustand aufweisen, der als potentieller Konfounder der Studie, wie zum Beispiel Drogenkonsum innerhalb der letzten sechs Monate, in Betracht gezogen wurde. Die aktuelle Psychopathologie der schizophrenen Patienten wurde durch den *Positive and Negative Syndrome Scale* (PANSS) (Kay et al., 1987) erhoben. Die Studie wurde von der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf (EudraCT-Number: 2006-006329-19) genehmigt.

2.2 Methoden

2.2.1 Analyse der Blutproben

2.2.1.1 Blutentnahme

Die Blutentnahme wurde in der Neuropathologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf durch Herzpunktion am narkotisierten Tier vorgenommen.

1. Zur Narkose wird 1 mL Ketavet (100 mg/mL) Injektionslösung intraperitoneal verabreicht.
2. In Rückenlage wird der Processus Xyphoideus des Sternums ertastet und unmittelbar kaudal davon eine Kanüle in der Medianlinie eingeführt. Diese wird in Richtung kranial links lateral, dorsal ca. 2 – 3 cm weiter eingeführt.
3. Erst wird das Blut passiv in eine EDTA enthaltende Spritze fließen gelassen, dann weiter langsam und vorsichtig abgezogen, um einen Herzkollaps oder eine Zellyse zu verhindern. Noch am selben Tag wurden die Proben mit Ficoll-PREMIUM weiterbehandelt und bis dahin bei + 4°C gelagert.

2.2.1.2 Isolierung von mononuclearen Zellen aus peripherem Blut

Zur Isolierung der PBMCs aus dem EDTA angereicherten Blut wurde die Lösung Ficoll-Paque PREMIUM der Firma GE Healthcare Life Science verwendet. Es wurde nach Herstellerangaben gearbeitet.

1. Das mit EDTA angereicherte Blut wird 1:1 mit D-PBS-Lösung verdünnt.
2. Je 4 mL des verdünnten Blutes werden auf je 3 mL Ficoll-Paque PREMIUM geschichtet.
3. Nach einer Zentrifugation (400 x g, 40 min, 19°C, ohne Bremse) wird das überschüssige Plasma abpipettiert, und die Interphase (ca. 1 mL) aus mononucleären Zellen anschließend mit einer sterilen Pipette in ein frisches 15 mL Zentrifugenröhrchen transferiert
4. Nachdem 7 mL D-PBS - Lösung zu den Zellen gegeben und vorsichtig mit einer Pipette vermischt werden, werden die Zellen erneut zentrifugiert (100 x g, 10 min, 19°C, ohne Bremse).
5. Der Überschuss wird abpipettiert und die Zellen wiederholt in 7 mL D-PBS - Lösung gewaschen und unter vorherigen Bedingungen zentrifugiert.

Nach erneuter Abpipettierung des Überstandes wurden die isolierten PBMCs bis zur weiteren Verarbeitung in drei Aliquots schockgefroren und bis zur weiteren Behandlung bei -80°C gelagert.

2.2.1.3 RNA-Extraktion von PBMCs

Die RNA-Extraktion erfolgte mit dem Qiagen-Kit, sowie dem dazu gehörigen RNase freiem DNaseI Set.

Vorab erfolgt der Ansatz einer DNase-I-Stammlösung der Firma Qiagen nach Herstellerprotokoll für die gesamte Anzahl der Proben. Die Stammlösung wurde in einzelnen Aliquots aufgeteilt, um ein mehrmaliges Auftauen der Proben zu verhindern und bei -80°C gelagert.

Die Proben werden mit Hilfe des QIAshredders und dem Lysepuffer RLT lysiert und homogenisiert. Es wurde nach Herstellerangaben gearbeitet.

1. 600 μL RLT-Puffer wird auf die gefrorenen Zellenpellets gegeben und bei Raumtemperatur innerhalb von 5 Minuten vollständig aufgetaut.
2. Das Lysate wird auf eine QIAshredder Säule pipettiert und für 2 Minuten auf höchster Stufe zentrifugiert.
3. Das Reaktionsgemisch wird mit demselben Volumen (600 μL) 70%igem Ethanol aufgefüllt und durch Pipettieren gut durchmischt.
4. 600 μL der Probe werden auf eine RNeasy Säule geladen und bei 8000 g 15 Sekunden zentrifugiert.
5. Der Durchfluss wird verworfen und Schritt 4 mit den verbleibenden 600 μL wiederholt.
6. 350 μL des Waschpuffers RW1 werden auf die Säule geladen, bei 8000 g 15 Sekunden zentrifugiert und der Durchfluss verworfen.
7. Zum Verdau der DNA werden 10 μL der im Vorfeld angesetzten DNase-I-Lösung vorsichtig mit 70 μL des RDD-Puffers vermischt und direkt auf die Silicagel-Membran pipettiert. Das Reaktionsgemisch wird für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.
8. Danach wird die Säule wieder mit 350 μL RW1-Puffer gewaschen (Zentrifuge: 8000 g, 15 Sekunden) und der Durchfluss verworfen.
9. Es folgen zwei weitere Waschgänge mit je 500 μL des RPE-Puffers (Zentrifuge: 8000 g, 15 Sekunden).
10. Nach der zweiten Waschung wird die Auffangröhre mitsamt des Durchflusses verworfen und die Membransäule auf ein neues 2 mL Reaktionsgefäß gesetzt.

11. Um die Silicagel-Membran zu trocknen, wird diese für 1 Minute bei 8000 g zentrifugiert und anschließend auf ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß gesetzt.
12. 40 µL RNase freies Wasser werden auf die Mitte der Membran pipettiert und für 1 Minute bei 8000 g zentrifugiert.
13. Um eine gründliche Auswaschung der Membran und somit eine höhere RNA-Konzentration zu erreichen, wird das Eluat erneut auf die Säule pipettiert und für 1 Minute bei 8000 g zentrifugiert.
14. Die gewonnene RNA wird auf Eis gestellt und die Konzentration mittels quantitativer Nukleinsäureanalyse ermittelt.

2.2.1.4 Quantitative Nukleinsäureanalyse

Die Konzentrationsbestimmung der isolierten RNA-Proben erfolgte mit dem NanoDrop-ND-1000-Spektrophotometer.

Nach einer Nullung des Geräts durch RNase freies Wasser, reicht jeweils 1 µL der einzelnen RNA-Proben zur Bestimmung der RNA-Konzentration aus.

Die RNA-Konzentration wird durch Absorptionsmessung bei der Wellenlänge 260 nm bestimmt. Eine Absorptionseinheit A entspricht 40 µg ssRNA/mL.

Daraus folgt: $c \text{ (}\mu\text{g RNA/ ml)} = A_{260} \times 40$

2.2.1.5 Genexpressionsanalyse durch Affymetrix GeneChip® Microarrays

Die Genexpressionsanalyse der totalen RNA mittels Affymetrix GeneChip® Microarrays erfolgte durch das BMFZ (Biologisch-Medizinisches Forschungszentrum der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf). Alle Arbeiten erfolgten gemäß den Angaben des Herstellers. Zunächst erfolgte die Qualitätskontrolle der Gesamt-RNA mittels dem Agilent 2100 Bioanalyser. Alle in der Auswertung berücksichtigten Proben zeigen eine hohe RNA-Qualität (RIN >9) (Schroeder et al., 2006).

Mit Hilfe des WT Plus Reagent Kit der Firma Affymetrix erfolgte die Amplifikation Biotin markierter cDNA. Dabei wird 100 ng der totalen RNA mittels Reverser Transkriptase zu cDNA synthetisiert, fragmentiert und mittels Desoxyribonukleotidyltransferase mit Biotin markiert.

Die biotin-markierte cDNA wird anschließend für 16 Stunden bei 45°C an Affymetrix Rat Gene 2.0 ST Gene Expressions Microassays im GeneChip Hybridization Oven 645 hybridisiert, gewaschen, mit einem Streptavidin/ Phycoerythrin Konjugat gefärbt und durch den Scanner 3000 7G (Affymetrix) ausgelesen.

Drei Proben (2x TG, 1x LM) passierten nicht die Hybridisierungs-Qualitätskontrolle, zwei weitere Proben (1x TG, 1x LM) mussten aufgrund von post mortem detektierten, nicht-transgen-assoziierten Malformationen ausgeschlossen werden, so dass letztendlich 5 transgene DISC1 Ratten und 7 nicht transgene Wurfgeschwister analysiert wurden.

Die Datenanalyse erfolgte durch die GeneSpring GX Software (Vers. 12.5; Agilent Technologies).

Differenzierte Genexpression wird statistisch durch einen moderaten T-test ermittelt, wobei eine Signifikanzschwelle von $p = 0,01$ festgelegt wurde.

2.2.1.6 Etablierung der optimalen Bedingungen der real-time quantitativen PCR

2.2.1.6.1 Primerdesign

Die Validierung einiger, anhand von Literaturrecherche ausgewählter, Gene erfolgte durch quantitative real-time Polymerasekettenreaktion (RT-qPCR) (siehe 2.2.1.6.3, S. 28).

Das Primerdesign, sowie die anschließende Primeroptimierung, stellen wichtige Parameter für das Ergebnis der qPCR dar.

1. Zunächst wurde die Nukleotidsequenz des zu untersuchenden Gens mit Hilfe einer öffentlichen Datenbank (National Center for Biotechnology Information) herausgesucht. Um die Amplifikation genomischer DNA zu vermeiden, wurde eine Intron-überspannende Primersequenz von ca. 200 bp (Basenpaar) Länge gewählt.
2. Aus dieser Intron-überspannenden Primersequenz wurden mit Hilfe der Freeware Primer3 nach folgenden Kriterien geeignete Primer erstellt:
 - Primerlänge: ca. 20 Nukleotide
 - GC-Gehalt: wenn möglich über 60%
 - Schmelztemperatur: 55 – 60°C
 - möglichst gleiche Schmelztemperatur von Forward- und Reverse-Primer
 - keine intern komplementären Sequenzen, um die Bildung von Sekundärstrukturen zu vermeiden
 - wenn möglich G- oder C-reiche 3'Enden, um die Primerhybridisierung zu erleichtern
 - keine komplementären Basen an den 3'Enden, um die Bildung von Primer-Dimeren zu vermeiden
3. Mit Hilfe der „BLAST“ Funktion (blast.ncbi.nlm.nih.gov/) wurde die Spezifität der Primer geprüft.

2.2.1.6.2 Primertest mittels PCR und Gelelektrophorese

Die initialen Primertests der designten Primer erfolgten durch mehrere Durchläufe der klassischen PCR mit jeweils unterschiedlichen Bedingungen durch unterschiedliche Reaktionszusätze.

Klassische PCR

Die PCR ist eine Methode zur selektiven Amplifikation spezifischer DNA-Sequenzen. Die Reaktion läuft in drei sich wiederholenden Schritten ab. Der Auftrennung der Doppelhelix in seine Einzelstränge (Denaturierung), der Anlagerung der Primer, die den Startpunkt der DNA-Polymerase markieren (Annealing) und der Verlängerung (Extension) der beiden DNA-Doppelhelices durch den Anbau neuer Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTPs) durch die DNA-Polymerase.

Hierzu wurde die HotStarTaq® DNA-Polymerase (Quiagen, Hilden, Germany) verwendet. Je nach addiertem Reaktionszusatz ergaben sich dabei folgende Reaktionsansätze:

Komponente	Menge		
	ohne Zusatz	5% DMSO	5x Faktor Q
cDNA	5 µL	5 µL	5 µL
Forward Primer	1 µL	1 µL	1 µL
Reverse Primer	1 µL	1 µL	1 µL
10mM dNTP	0,5 µL	0,5 µL	0,5 µL
10x PCR Puffer	2,5 µL	2,5 µL	2,5 µL
HotStarTaq® DNA-Polymerase	0,125 µL	0,125 µL	0,125 µL
5% DMSO	-	1,25 µL	-
5x Faktor Q	-	-	5 µL
steriles PCR Wasser	14,875 µL	13,625 µL	9,875 µL
Gesamtvolumen	25 µL	25 µL	25 µL

Tabelle 2: HotStarTaq®-PCR-Ansatz mit verschiedenen Reaktionszusätzen

Die zu amplifizierende cDNA, die Menge der Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTPs), des PCR-Puffers, sowie der HotStarTaq® DNA-Polymerase und der Primer bleibt in jedem Ansatz gleich. Lediglich die Menge des sterilen PCR Wassers ändert sich, je nach hinzugegebenen Reaktionszusatz, sodass in jedem Fall ein Gesamtvolumen von 25 µL entsteht.

Als Reaktionsbedingungen wurde im Thermocycler folgendes PCR-Programm eingestellt:

PCR-Schritt	Temperatur	Zeit	Zyklusanzahl
Initiale Aktivierung der DNA-Polymerase	95°C	15 min	1
<i>Denaturierung</i>	95°C	30 s	35
<i>Annealing</i>	60°C	30 s	
<i>Extension</i>	72°C	20 s	
Finale <i>Extension</i>	72°C	5 min	1
Kühlung	4°C	unbegrenzt	1

Tabelle 3: Reaktionsbedingungen (PCR Programm) für die PCR mit der HotStarTaq® DNA-Polymerase

Die drei Schritte der PCR (Denaturierung, Annealing, Extension) wurden in 35 Zyklen wiederholt, bevor es zur finalen Extension und somit zum Abschluss der PCR-Reaktion kommt. Anschließend wurden die Proben bei 4°C bis zur weiteren Verarbeitung im Thermocycler gekühlt.

1. Zunächst wurde jeder Primer mittels HotStarTaq®-PCR ohne weitere Zusätze getestet.
2. Die Darstellung des PCR-Produkts erfolgte durch Gelelektrophorese.

Die Agarose-Gelelektrophorese ist eine Methode zur Auftrennung von DNA-Fragmenten nach der Fragmentgröße.

Ein Agarosegel besteht durch Quervernetzung einzelner Moleküle aus einer Siebstruktur, deren Porengröße von der Konzentration des Gels abhängt. Durch das Anlegen einer elektrischen Spannung wandern die negativ geladenen DNA-Fragmente in Richtung des Pluspols. Hierbei sind kleinere DNA-Fragmente einem geringeren Widerstand ausgesetzt als große Fragmente, wodurch eine Auftrennung der Proben nach ihrer Größe möglich ist.

Reaktionsansatz und Reaktionsbedingungen für ein 2,5%iges Agarose Gel:

- Elektrophoresepuffer: TRIS-Essigsäure-EDTA-Puffer (TAE)
- Agarosemenge: 3,75 g auf 150 mL Gesamtmenge
- Gel-Farbstoff: 3,5 µL Midori Green
- 10x Ladepuffer: 5 µL
- Volumen pro aufgetragene Probe inkl. Ladepuffer: 25 µL
- Spannung: 180 V
- Laufzeit: 23 Min
- Marker: 5 µL 100 bp Marker (Biobudget)

3. Einige wurden durch erneute HotStarTaq[®]-PCR Durchläufe mit den Zusätzen Faktor Q und 5% DMSO, welche die Synthesemenge steigern und Inhibitoren der PCR beseitigen, getestet (siehe Tabelle 2: HotStarTaq[®]-PCR-Ansatz mit verschiedenen Reaktionszusätzen S. 26). Die Reaktionsbedingungen blieben unverändert (siehe Tabelle 3: Reaktionsbedingungen (PCR Programm) für die PCR mit der HotStarTaq[®] DNA-Polymerase, S. 27).
4. Die Darstellung erfolgte durch Auftragung der Proben auf 2,5%igen Agarose-Gel (siehe Reaktionsansatz und Reaktionsbedingungen für ein 2,5%iges Agarose Gel, S. 27).

2.2.1.6.3 Primeroptimierung durch Primermatrix und quantitative PCR

Nachdem die beste Bedingung für jeden Primer in der HotStarTaq[®]-PCR gefunden wurde, wurde das ideale Primer-Verhältnis durch die real-time quantitative PCR (RT-qPCR) mit SYBR[®]-Green ermittelt.

RT-qPCR mit SYBR[®]-Green

Die qPCR ermöglicht zusätzlich zur selektiven Amplifikation von spezifischen DNA-Sequenzen die Quantifizierung des PCR-Produkts. Hierbei wird die Methode der herkömmlichen PCR mit einer Fluoreszenzdetektion kombiniert.

SYBR-Green I ist ein Fluoreszenzfarbstoff, der häufig in der qPCR eingesetzt wird. Dabei handelt es sich um einen asymmetrischen Cyanin-Farbstoff, der sich an doppelsträngige DNA bindet und bei Absorption von blauem Licht fluoresziert. Mit jeder Amplifikation durch die DNA-Polymerase entstehen weitere DNA-Doppelstränge als PCR-Produkt, an die SYBR-Green I bindet. Somit steigt die Fluoreszenz proportional mit dem PCR-Produkt, sodass eine Berechnung der spezifischen RNA in der Ausgangsprobe möglich ist. Bei der real-time qPCR (RT-qPCR) erfolgt die Fluoreszenzdetektion in der exponentiellen Phase. In dieser Phase erfolgt, ausgehend von 100%iger Reaktionseffektivität mit jedem PCR-Zyklus, eine exakte Verdopplung des PCR-Produkts.

Verwendet wurde das Platinum[®] SYBR[®]-Green I qPCR SuperMix-UDG (Invitrogen, Germany), welches die Reagenzien zur Amplifikation (Platinum[®] Taq DNA Polymerase, dGTP, dATP, dCTP, dUTP) und Detektion (SYBR[®]-Green I) bereits in einer Lösung kombiniert. Des Weiteren enthält die Lösung Uracil-N-Glycosylase (UDG), ein Enzym zur Qualitätssteigerung der PCR, indem es die Reamplifikation von Verunreinigungen verhindert.

Der Reaktionsansatz für eine RT-qPCR mit dem verwendeten Platinum[®] SYBR[®]-Green I qPCR SuperMix-UDG (Invitrogen, Germany) setzt sich wie folgt zusammen:

Komponente	Menge		
	ohne Zusatz	5% DMSO	5x Faktor Q
cDNA	5 µL	5 µL	5 µL
Forward Primer	0,75 µL *	0,75 µL *	0,75 µL
Reverse Primer	0,75 µL *	0,75 µL *	0,75 µL
5% DMSO	-	1,25 µL	-
5x Faktor Q	-	-	5 µL
SYBR®-Green	12,5 µL	12,5 µL	12,5 µL
steriles PCR Wasser	6 µL *	4,75 µL *	1 µL *
Gesamtvolumen	25 µL	25 µL	25 µL

Tabelle 4: Reaktionsansatz der RT-qPCR mit SYBR®-Green

Hier aufgeführt sind die drei möglichen Reaktionsansätze für die RT-qPCR mit SYBR®-Green, ohne Zusatz, mit 5% DMSO und 5x Faktor Q, die jeweils ein Gesamtvolumen von 25 µL ergeben. * Hier dargestellt ist der Reaktionsansatz für ein häufig versendetes Primer-Verhältnis von 1:1 je 300nM. Das jeweils optimale Primer-Verhältnis zwischen dem Forward und dem Reverse Primer wird mit Hilfe der Primermatrix (29Tabelle 5: Primermatrix zur Optimierung der Primer-Verhältnisse, S.26) ermittelt. Daraus resultiert jeweils die entsprechende Menge an sterilem PCR Wassers, um ein einheitliches Gesamtvolumen von 25 µL zu erreichen.

Hierbei wurden folgende Primer-Verhältnisse getestet:

	Forward Primer		Reverse Primer		Gesamtvolumen Primerpaar
	nM	µL	nM	µL	µL
1	50	0,13	50	0,13	0,26
2	50	0,13	300	0,75	0,88
3	50	0,13	900	2,25	2,38
4	300	0,75	50	0,13	0,88
5	300	0,75	300	0,75	1,5
6	900	2,25	50	0,13	2,38

Tabelle 5: Primermatrix zur Optimierung der Primer-Verhältnisse

Es wurden für jedes zu untersuchende Primerpaar sechs verschiedene Konstellationen zwischen Forward und Reverse Primer getestet.

Als Reaktionsbedingungen wurde im Thermocycler folgendes PCR-Programm eingestellt:

PCR-Schritt	Temperatur	Zeit	Zyklusanzahl
Initiale Aktivierung der DNA-Polymerase	95°C	15 min	1
<i>Denaturierung</i>	95°C	15 s	30
<i>Annealing + Elongation</i>	60°C	1 min	
Kühlung	4°C	unbegrenzt	1

Tabelle 6: Reaktionsbedingungen (PCR-Programm) mit SYBR®-Green

Die Testung der verschiedenen Primer-Verhältnisse erfolgte für jeden Primer jeweils in Triplikaten. Jede PCR beinhaltete eine Positiv- (Referenzgen) und eine Negativ- (Probe ohne DNA) Kontrolle.

Nach der abgelaufenen PCR wurde für jede Konstellation eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt, um zusätzliche PCR-Produkte zu detektieren und somit die Spezifität der Primer zu bestimmen.

Die Datenverarbeitung erfolgte durch die StepOne Software v2.3 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA).

2.2.1.6.4 Auswahl des Referenzgens

Ein Referenzgen ist ein Gen, welches konstant exprimiert wird und sich daher als positive Kontrolle für die PCR eignet. Für die Validierung der Microarray Resultate durch quantitative PCR wurden *β-actin* und *ARF1* getestet. Die Testung und Optimierung der Primer erfolgte wie unter 2.2.1.6.2 auf S. 26 und 2.2.1.6.3 auf S. 28 beschrieben.

Die konstant besten Ergebnisse ließen sich mit einem Primerpaar für *β-actin* erzielen. Die schlussendlich gewählte Primersequenz, -verhältnis und gewählten Bedingungen finden sich in der Tabelle 7 auf S.31 und Tabelle 8 auf S.34.

2.2.1.7 cDNA-Synthese

Die cDNA-Synthese erfolgte mit dem RevertAid First Strand cDNA-Synthese Kit (Fermentas). Hierbei dient die Sequenzabfolge der zuvor gewonnenen total RNA als Vorlage, sodass mit Hilfe des Enzyms Reverse Transkriptase durch reverse Transkription eine komplementäre DNA erstellt wird. Die Reverse Transkriptase ist eine RNA-abhängige DNA-Polymerase, die zur Synthese einen Primer benötigt. Der Primer, ein kurzer komplementärer DNA-Abschnitt, bindet an die RNA und dient der Reversen Transkriptase

als Startpunkt der Synthese. Wir nutzten einen Random Hexamer Primer bestehend aus einem Mix von diversen sechs zufällig zusammengesetzten Nukleotiden.

1. Zum Aufschmelzen der RNA, damit die Primer binden können, werden 1 µg der total RNA zusammen mit 0,5 µl random hexamer primer 5 min im Thermocycler auf 65°C erhitzt und dann sofort auf Eis gekühlt.
2. Anschließend werden 4 µL 5x Reaktionspuffer, 0,5 µL RNase Inhibitor, 2 µL dNTPs (10mM) und 1 µL ReverdAid H Minus M-MuLV Reverse Transkriptase hinzugegeben.
3. Die Reverse Transkription wird für 5 Minuten bei 25°C und anschließend für 60 Minuten bei 42 °C durchgeführt.
4. Durch Erhitzung des Reaktionsgemisches auf 70°C für 5 Minuten wird das Enzym inaktiviert und die Reaktion somit gestoppt.
5. Es werden 10 µL RNaseI freies Wasser hinzugefügt, sodass eine Gesamtmenge von 30 µL entsteht.
6. Die gewonnene cDNA wird 1:25 mit DNaseI freiem Wasser verdünnt und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

2.2.1.8 Validierung der Microarray Resultate durch quantitative PCR mit optimierten Primern

Die Validierung der Microarray-Resultate erfolgte durch quantitative PCR mit optimierten Primern. Die Durchführung erfolgte wie in S. 49 beschrieben.

Die einzelnen Gene wurden unter folgenden Bedingungen amplifiziert und die Quantität anschließend gemessen:

Gen Symbol (Ratte)	primer forward 5'-3'	primer reverse 5'-3'	PK	cDNA Verd.	Zusätze	LM (n)	TG (n)
Ccl4	CTCTCTCCTCCTGCTTGTGG Konzentration: 900 nM	CACAGATTTGCCTGCCTTTT Konzentration: 50 nM	6	1:25	5% Factor Q	8	6
C3	GAGAGCTGGTTGTGGACCAT Konzentration: 50 nM	CAGTCGCAGGTCAATGAAGA Konzentration: 300 nM	2	1:25	5% Factor Q	7	5
Il12rb2	AGCCTCTTAACAGCACATCCT Konzentration: 300 nM	TGAAATTCATATTCTGTGAATGGTCT Konzentration: 300 nM	5	1:25	-	8	5
Slc27a2	GCAGGAAATACAACGCCACT Konzentration: 50 nM	TCTTCCAACAGCTCCGATTT Konzentration: 300 nM	2	1:25	5% Factor Q	8	5
Il13ra1	GAAACATGGAGGGTGCAAGT Konzentration: 300 nM	CACTGCGACAAAGACTGGAA Konzentration: 300 nM	5	1:25	5% Factor Q	7	5
Ifng	GCCCTCTGGCTGTTACTG Konzentration: 50 nM	CTGATGGCCTGGTTGTCTTT Konzentration: 300 nM	2	1:25	5% Factor Q	7	3
Sod1	CCACTGCAGGACCTCATTTT Konzentration: 300nM	CACCTTTGCCCAAGTCATCT Konzentration: 300nM	5	1:25	5% Factor Q	8	6
Ywhab	CTGTGTCAAACCTCCAGCAG Konzentration: 50nM	CAGGCTACAGGCCTTTTCAG Konzentration: 300nM	2	1:25	5% Factor Q	8	6
Actin	GAGAGGGAAATCGTGCGTG Konzentration: 300 nM	CATGGATGCCACAGGATTCC Konzentration: 300 nM	5	je nach Target	-		

Tabelle 7: Optimale Primerbedingungen

Die untersuchten Gene wurden unter den oben genannten Bedingungen amplifiziert und die Menge der Amplifikation anschließend gemessen. Die Basenfolge der einzelnen Primer findet sich entsprechend unter primer forward 5'-3' und primer reverse 5'-3. Das Verhältnis zwischen *forward* und *reverse* Primer, die Primer Konstellation (PK), lässt sich anhand der Primerverhältnis mithilfe der Tabelle 5: Primermatrix zur Optimierung der Primer-Verhältnisse, S. 29 ermitteln. Je nach genutzten Zusätzen (Spalte 6) finden sich die jeweiligen Reaktionsansätze unter Tabelle 4: Reaktionsansatz der RT-qPCR mit SYBR®-Green, S.34. „n“ bezeichnet die Nummer an Tieren, welche jeweils von den *littermates* (LM) und transgenen Tieren (TG) in die Ergebnisse mit einbezogen wurden.

Jede Probe wurde jeweils im Triplikat getestet. Die Reaktionsbedingungen sind in der Tabelle 6: Reaktionsbedingungen (PCR-Programm) mit SYBR®-Green, S.30 aufgeführt. Die Datenanalyse erfolgte durch die $\Delta\Delta C_t$ Methode. Der C_t (threshold cycle) Wert ist festgelegt als Zyklusanzahl, ab welcher die Amplifikationskurve einen Schwellenwert NTC (No Template Control) überschreitet, welcher im linearen Abschnitt der Amplifikation liegt. Zunächst erfolgte die Normalisierung aller C_t Werte eines Kandidatengens auf derselben qPCR-Platte anhand einer endogenen Kontrolle, dem Referenzgen β -actin (siehe 2.2.1.6.4 , S.30) wodurch man den delta C_t Wert erhält ($\Delta C_t = C_t$ Kandidatengen - C_t Referenzgen). Anschließend wird die Differenz der ΔC_t Werte zwischen den tgDISC1 Tiere (TG) und *littermates* (LM) zu einer Kontrollprobe gebildet, welches den delta-delta C_t -Wert ($\Delta\Delta C_t$) darstellt, um eine Normalisierung zwischen den Platten zu ermöglichen. Der Fold Change (FC), sprich relative Expressionsunterschied, ergibt sich mittels Delogarithmierung, aus folgender Gleichung $FC = 2^{-\Delta\Delta C_t}$. Die weitere statistische Analyse erfolgte mit Hilfe des IBM SPSS Statistik Programms (IBM, Ehningen, Germany) und GraphPad Prism Version 6 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA).

2.2.1.9 Validierung der identifizierten Genveränderungen von tgDISC1-Ratten in humanen Proben

Einige Kandidatengene, die sich auch mittels quantitativer PCR validieren ließen, wurden zudem auch in humanen PBMCs bestimmt. Hierzu stellte uns die Klinik und Poliklinik für Psychiatrie und Psychotherapie freundlicherweise PBMCs von Patienten mit der Diagnose Schizophrenie und Kontrollen zur Verfügung.

Zur Analyse der humanen Proben wurden dieselben Verfahren verwendet wie bei der Analyse der PBMCs von tgDISC1-Ratten und deren *littermates*, um einen möglichst exakten Vergleich der Expressionsunterschiede der Kandidatengene ziehen zu können. Als Referenzprobe wurde in allen Optimierungsschritten und finalen Analysen stets das Blut eines gesunden Probanden verwendet.

Isolierung von mononuklearen Zellen aus peripherem Blut

Zur Isolierung der mononuklearen Zellen aus dem peripheren Blut wurde die Lösung Ficoll-Paque Plus der Firma GE Healthcare Life Science verwendet, welches speziell für die Isolation humaner PBMCs entwickelt wurde. Es wurde nach Herstellerangaben gearbeitet, wie in 2.2.1.2 Isolierung von mononuclearen Zellen aus peripherem Blut beschrieben.

RNA-Extraktion

Die RNA-Extraktion erfolgte nach den Herstellerangaben, wie in 2.2.1.3 (S.23) mit dem Qiagen-Kit, sowie dem dazu gehörigen RNaseI-freien DNaseI Set. Als einzige Abweichung erfolgte die Verdünnung in Schritt 12 nicht mit 40 µL, sondern mit 20 µL, so dass am Ende eine RNA-Konzentration von ca. 100 ng/µL resultierte.

cDNA-Synthese

Aus der gewonnenen RNA wurde je 1µg, wie in 2.2.1.7 beschrieben, cDNA synthetisiert, welche am Ende 1:10 verdünnt wurde.

Etablierung der optimalen Bedingungen der real-time quantitativen PCR mit humaner cDNA

Die Optimierung der Bedingungen erfolgte genau wie bei der Optimierung der Bedingungen für die Ratten cDNA. Zunächst wurden wie in 2.2.1.6.1 (S.25) beschrieben, Primer für die zu untersuchenden Gene im Humanen Genom herausgesucht. Dabei galten dieselben Kriterien wie unter Punkt 2 (2.2.1.6.1) beschrieben. Die Primer wurden wie in 2.2.1.6.2 (S.26) beschrieben zunächst mittels PCR und Gelelektrophorese getestet und dann wie in 2.2.1.6.3 (S.28) beschrieben, entsprechend durch die Zugabe von Zusätzen (Tabelle 4:

Reaktionsansatz der RT-qPCR mit SYBR®-Green, S.29) und Variationen hinsichtlich verschiedener Primer-Verhältnisse (Tabelle 5: Primermatrix zur Optimierung der Primer-Verhältnisse, S.29) optimiert.

cDNA-Synthese

Die cDNA Synthese erfolgte wie in 2.2.1.7 (S.30) beschrieben mit dem RevertAid First Strand cDNA-Synthese Kit (Fermentas). Hierbei diente 1 µg der zuvor gewonnenen RNA als Synthese Vorlage. Es wurden auch hier Random Hexamer Primer verwendet. Die gewonnene cDNA wurde 1:10 verdünnt.

Quantitative PCR mit SYBR®-Green unter optimierten Bedingungen

Die Durchführung erfolgte wie auf S.49 beschrieben.

Die einzelnen Gene wurden unter folgenden Bedingungen amplifiziert und die Quantität anschließend gemessen:

Gen Symbol (human)	primer forward 5'-3'	primer reverse 5'-3'	PK	cDNA Verd.	Zusätze	CTRL (n)	SCZ (n)
C3	GCTCCAGACACAGATGACCTG Konzentration: 50 nM	GCGTAGACCTTGACTGCTCCA G Konzentration: 300 nM	2	1:10	-	44	15
IL13RA1	CCACCCGAGGGAGCCAGCTC Konzentration: 50 nM	CTTCTGGGGGTGAGATC Konzentration: 50 nM	1	1:10	-	50	16
ARF1	GACCACGATCCTCTACAAGC Konzentration: 300 nM	TCCCACACAGTGAAGCTGATG Konzentration: 300 nM	5	je nach Target	-		

Tabelle 8: Optimale Primerbedingungen für humane Primer

Die untersuchten Gene wurden unter den oben genannten Bedingungen amplifiziert und die Menge der Amplifikation anschließend gemessen. Die Basenfolge der einzelnen Primer findet sich entsprechend unter primer forward 5'-3' und primer reverse 5'-3'. Das Verhältnis zwischen *forward* und *reverse* Primer lässt sich anhand der Primerverhältnis mithilfe der Tabelle 5: Primermatrix zur Optimierung der Primer-Verhältnisse, S. 29 ermitteln. Je nach genutzten Zusätzen (Spalte 6) finden sich die jeweiligen Reaktionsansätze unter Tabelle 4: Reaktionsansatz der RT-qPCR mit SYBR®-Green, S.29

Jede Probe wurde jeweils im Triplikat getestet. Die Reaktionsbedingungen sind in der Tabelle 6: Reaktionsbedingungen (PCR-Programm) mit SYBR®-Green, S.30 aufgeführt. Die Datenanalyse erfolgte durch die $\Delta\Delta C_t$ Methode.

2.2.2 Analyse der Liquorproben

2.2.2.1 Liquor Entnahme

Die Liquor Entnahme wurde im Anschluss an die terminale Herzpunktion in der Neuropathologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf durch Punktion der Cisterna magna am toten Tier vorgenommen.

1. Der Kopf des Tieres wurde in leicht erhöhter Position so fixiert, dass der Nackenbereich leicht überstreckt und gut einsehbar war.
2. Zunächst erfolgte die Freilegung des Subokzipitalraumes. Mit einem Scherenschnitt erfolgte die Durchtrennung der Haut. Anschließend wurde die Nackenmuskulatur mit einem sterilen Skalpell durchtrennt und die Membrana atlantooccipitalis posterior vorsichtig frei präpariert.
3. Im Anschluss wurde die zwischen dem Kleinhirn und dem Rückenmark liegende Cisterna Magna mit einer Glaskapillare (OD.:1mm; I.D.: 0,78 mm) punktiert. Die Glaskapillare ist dabei auf einer Kanüle (0,45 mm x 25 mm) fixiert, an deren Ende eine 1 mL Spritze angebracht ist. Bei der Liquorabnahme wurde äußerst penibel darauf geachtet, keine Gefäße zu verletzen, wodurch eine Blutkontamination erfolgen könnte.
4. Die Probe wurde unmittelbar nach Abnahme bei 27g für 3 Minuten zentrifugiert, um den Liquor von möglichen Kontaminationen durch feste Bestandteile zu trennen.
5. Der klare Liquor wurde mit einer sterilen Pipette abpipettiert und in einem 60 µL plus je nach gewonnener Liquorgesamtmenge ein bis zwei weiteren 10 µL Aliquots schockgefroren und bis zur weiteren Verarbeitung bei -80°C gelagert.

A

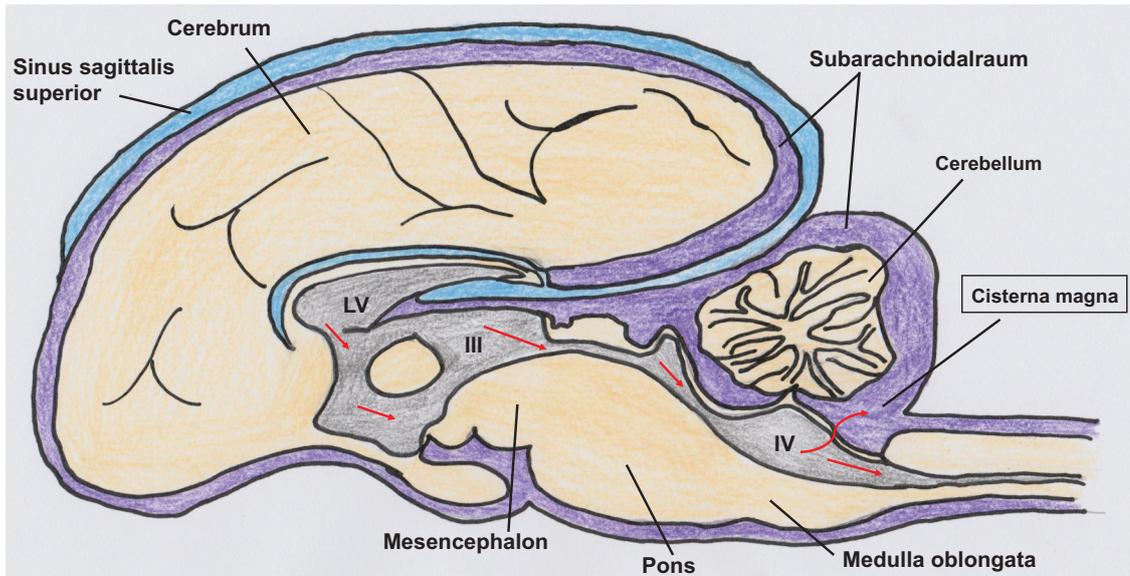


Abbildung 3: Liquorentnahme aus der Cisterna magna

Nach der Herzpunktion erfolgte durch Punktion der Cisterna magna die Liquorentnahme am leblosen Tier. Die Cisterna magna (Synonym: Cisterna cerebellomedullaris) ist eine mit Liquor gefüllte Erweiterung des Subarachnoidalraums, die zwischen dem Kleinhirn und dem Rückenmark liegt. Der Liquor wird von den Plexus choroidei, welche an der Innenseite des Unterhorns der Seitenventrikel (LV = lateral ventricle) und im Dach des 3. (III) und 4. (IV) Ventrikels liegen, produziert. Aus den beiden Seitenventrikeln gelangt der Liquor über die Foramina interventricularia in den 3. Ventrikel und von hier über den Aquädukt zum 4. Ventrikel, der sich in den Zentralkanal fortsetzt. Außerdem steht der 4. Ventrikel über die Foramen Luschkae sowie dem Foramen Magendii mit dem Subarachnoidalraum in Verbindung. Das Foramen Magendii mündet in die Cisterna magna, aus welcher die Liquorentnahme erfolgte.

2.2.2.2 Überprüfung der Liquorproben auf Blutverunreinigungen

Um mögliche Blutverunreinigungen in den Liquorproben quantifizieren zu können, wurde eine auf Antikörperreaktionen basierende Analyse mit Hilfe des Rat Hemoglobin (HM) ELISA Kit (GenWay Biotech) durchgeführt. Es wurde nach Herstellerangaben gearbeitet.

Vorbereitung:

1. Die 5-fach konzentrierte Verdünnungslösung wurde 1:5 mit destilliertem Wasser zur einfach konzentrierten Arbeitslösung verdünnt.
2. Die 20-fach konzentrierte Waschlösung wurde 1:20 mit destilliertem Wasser verdünnt.
3. Pro verwendetem Teststreifen wurden 10 μ L des Meerrettichperoxidase-konjugierten Anti-Rat HM Antikörpers zu 990 μ L der einfach verdünnten Arbeitslösung gegeben und vorsichtig vermischt.

4. 1 mL destilliertes Wasser wurde dem Rat HM Calibrator hinzugefügt und auch dies vorsichtig vermischt, sodass der der Rat HM Calibrator in einer Konzentration von 1,067 µg/mL vorlag.
5. Die zu analysierenden Liquorproben wurden in einem Verhältnis von 1/5000 mit destilliertem Wasser verdünnt.
6. Die Standardmischungen wurden frisch direkt vor Beginn des Experimentes nach folgender Tabelle angefertigt:

Standard	Hämoglobinkonzentration [ng/µL]	Zusatz zur Arbeitslösung	Arbeitslösung [µL]
A	1920	5 µL Rat HM Calibrator	495
6	200	100 µL Standard A	746
5	100	300 µL Standard 6	300
4	50	300 µL Standard 5	300
3	25	300 µL Standard 4	300
2	12,5	300 µL Standard 3	300
1	6,25	300 µL Standard 2	300
0	0		600

Tabelle 9: Standardmischungen

Die Standards 0 bis 6 wurden nach Herstellerangaben angefertigt. Dabei wurde zur Anfertigung des Standard A 5 µL Rat HM Calibrator zu 495 µL der einfach konzentrierten Arbeitslösung gegeben. Für den Standard 6 wurden 100 µL des Standard A zu 746 µL der einfach konzentrierten Arbeitslösung gegeben. Daraus resultierte eine Hämoglobinkonzentration von 200 ng/µL. Für die folgenden Standards 5 bis 1 wurden jeweils 300 µL des vorherigen Standards zu 300 µL der einfach konzentrierten Arbeitslösung gegeben und somit eine immer größere Verdünnung erzeugt. Standard 0 bestand nur aus der einfach konzentrierten Arbeitslösung und somit einer Hämoglobinkonzentration von 0 ng/µL.

ELISA:

1. Je 100 µL der Standardmischungen 0 bis 6, sowie je 100 µL der einzelnen Liquorproben wurden in ein Duplikat pipettiert.

2. Anschliessend wurde die mit Anti-Rat HM beschichtete Mikrotiterplatte bei Raumtemperatur für 60 Minuten waagrecht und abgedeckt inkubiert. Hierbei bindet das Hämoglobin der Liquorproben bzw. der Standardmischungen an die Anti-Rat HM Antikörper auf der Mikrotiterplatte.
3. Nach Ablauf der 60 Minuten wurde der Inhalt der einzelnen Wells komplett aspiriert. Um eine gegenseitige Kontamination der einzelnen Proben zu vermeiden, wurde pro Duplikat jeweils eine neue, sterile Pipettenspitze verwendet.
4. Um ungebundene Proteine zu entfernen, wurde die gesamte Mikrotiterplatte anschließend in vier Waschschritten für je 5 Minuten gewaschen. Hierbei wurde jedes Well komplett mit der einfach konzentrierten Waschlösung gefüllt. Nach 5 Minuten wurde die gesamte Waschlösung mitsamt der ungebundenen Proteine durch rasches Wenden und Ausschütteln der Mikrotiterplatte verworfen. Dieser Waschvorgang wurde noch weitere drei Mal wiederholt.
5. Nach Abschluss der Waschschrritte wurde in jedes Well je 100 μL des verdünnten Meerrettichperoxidase-konjugierten Anti-Rat HM Antikörpers hinzugefügt und die Mikrotiterplatte bei Raumtemperatur weitere 30 Minuten waagrecht und in Dunkelheit inkubiert. Diese Enzyme gebundenen Antikörper binden wiederum an die bereits in Schritt 2 entstandenen Hämoglobin-Anti-Hämoglobin Komplexe.
6. Anschließend wurde die Platte erneut wie in Schritt 4 beschrieben in vier Waschschritten für je 5 Minuten gereinigt.
7. Nach dem erneuten Waschvorgang wurden je 100 μL einer chromogenen Lösung, bestehend aus 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB) und Wasserstoffperoxid in einer Zitronensäure (pH 3,3), in jedes Well pipettiert und für exakt 10 Minuten bei Raumtemperatur in Dunkelheit inkubiert.
8. Nach 10 Minuten wurde die Reaktion durch Beifügen von je 100 μL der Stopplösung, bestehend aus 0,3 M Schwefelsäure, beendet.
9. Es erfolgte die Absorptionsbestimmung jedes einzelnen Wells bei 450 nm.
10. Zur Auswertung der Ergebnisse wurde der durchschnittliche Hintergrundwert von jeder einzelnen Probe subtrahiert und die Werte anhand der durch die Standardwerte erstellten Standardkurve analysiert.

2.2.2.3 Proteinnachweis mittels SDS-Gelelektrophorese und Western Blot

Primärantikörper	mAB „14F2“a-DISC PFHM-Konz.10 mM NaN ₃ , Korth lab (Ottis et al., 2011) Verdünnung 1:500
Sekundärantikörper	goat a mouse IgG + IgM 0,8 mg/mL Verdünnung 1:50000
Marker	PageRuler Prestained Protein Ladder 0-170 kDa
Gel	4-12 % Invitrogen

Als Western Blot wird ein Verfahren zur Detektion von Proteinen bezeichnet. Zunächst werden die Proteine ihrer Molekülgröße nach durch eine diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese (*SDS PAGE*) aufgetrennt. Anschließend werden die Proteine durch Elektroblothing-Verfahren auf eine Proteinbindende Membran übertragen und durch einen spezifischen Antikörper angefärbt.

1. Je 10 µL der einzelnen Proben und 2 µL des Markers wurden in die Gelkammern aufgetragen und bei 120 V durch Gelelektrophorese aufgetrennt.
2. Nach der Auftrennung erfolgte die Übertragung der Proteine im Gel auf eine Nitrocellulose- Membran. Dies geschieht durch einen sogenannten Blot-Sandwich, der wie folgt aufgebaut ist: Anode – Schwamm – Filterpapier – Nitrocellulose-Membran – Polyacrylamidgel – Filterpapier – Schwamm – Kathode.
3. Anschließend wurde das Sandwich über Nacht bei 4 °C in einer Blotting Transfer Apparatur bei 130 mA in Transferpuffer geblottet. Durch die oben genannte Anordnung verlief das elektrische Feld so senkrecht zum Gel, so dass die Proteine vom Gel auf die Membran transferiert wurden.
4. Anschließend wurde die Membran erneut über Nacht in PBS-T mit 5 % Milchpulver geblockt, um unspezifische Proteinbindungen auf der Membran zu verhindern.
5. Am nächsten Tag wurde die Membran für 10 Minuten mit PBS-T gewaschen und anschließend erneut über Nacht bei 4°C mit dem Primärantikörper 1:500 verdünnt in PBS-T inkubiert.
4. Am folgenden Tag erfolgte erneut eine Waschung der Membran in drei Zyklen von je 10 Minuten in PBS-T.
5. Anschließend wurde der Meerrettichperoxidase-konjugierte Sekundärantikörper in einer Verdünnung von 1:50000 aufgetragen, wodurch eine Markierung des an die Proteinbanden gebundenen Primärantikörpers entsteht.

6. Die Membran wurde erneut in drei Zyklen von je 10 Minuten in PBS-T gewaschen.
7. Zur Detektion der Proteinbanden wurde 800 μL eines *Enhanced chemical luminescence detection reagent* (ECL) verwendet, welches im Verhältnis von 1:1 aus Reagenz 1 und 2 besteht. Dieses Reagenz dient als Substrat der Meerrettichperoxidase, welche die Umsetzung von Luminol in seine oxidierte Form katalysiert, sodass eine detektierbare Lumineszenz entsteht.
8. Anschließend wird der Blot in Klarsichtfolie eingeschweißt und in einer Dunkelkammer entwickelt. Die durch ECL und Meerrettichperoxidase entstandene Lumineszenz belichtet einen Hyperfilm, wodurch die Proteinbanden detektiert werden können.

2.2.2.4 GeLC-MS/MS basierte Proteomic-Analyse

2.2.2.4.1 Protein Depletion und Probenkonzentration

Bevor die Liquorproben für die weitere Proteomic-Analyse auf ein SDS-Gel aufgeladen wurden, erfolgte eine Protein Depletion und Probenkonzentration, um eine spezifischere Proteomic-Analyse zu ermöglichen. Hierfür wurden die Seppro Rat Spin Columns der Firma Sigma Aldrich verwendet. Die Methode beruht auf Antikörper-Antigen Interaktion, wodurch die sieben am meisten vorkommenden Proteine der Ratte aus dem Liquor herausgefiltert werden.

Reaktionsvorbereitung:

1. Die einzelnen Puffer wurden nach Herstellerangaben verdünnt.
2. 10 μL der Proben wurden in 1x Dilution Puffer auf 500-650 μL verdünnt. Größere Partikel wurden durch zentrifugieren (10000 g, 1 Min) in einem 0,45 μm Spin Filter entfernt.

Immunocapture Verfahren

3. Vor dem ersten Gebrauch wurde die untere Spitze der Spin Säule entfernt und die Säule in ein 2 ml Reaktionsgefäß gesetzt.
4. Zum Trocknen der Membran wurde die Säule für 30 Sekunden bei 268 g zentrifugiert.
5. Nachdem die Verschlusskappe auf die untere Spitze gesetzt wurde, wurden sofort 0,5 mL der verdünnten Probe hinzugefügt und die Säule oben mit einem Verschlussdeckel verschlossen.

6. Die Membran und die Probe wurden durch Schütteln und Wenden der Säule vermischt und bei Raumtemperatur 15 Min auf einem Rotator inkubiert.
7. Nach erneutem Wenden der Säule, wurde die untere Verschlusskappe entfernt und die Säule in ein mit DF1 (depleted fraktion) beschriftetes 2 mL Reaktionsgefäß gesetzt und bei 268 g für 30 Sekunden zentrifugiert. Der Durchfluss (DF1) wurde gesammelt und auf Eis gestellt.
8. Anschließend wurde die Säule auf ein Neues, mit DF2 beschriftetes 2 mL Reaktionsgefäß, gesetzt, 0,5 mL des 1x Verdünnungspuffers hinzugefügt und die Probe mit der Membran erneut durch Schütteln und Wenden vermischt. Es erfolgte eine erneute Zentrifugation bei 268 g für 30 Sekunden. Der Durchfluss DF2 und DF1 wurden vorsichtig gemischt und bei -80°C eingefroren.

Auswaschen der gebundenen Proteine:

9. Um die nicht spezifisch gebundenen Proteine zu entfernen, wurde die Membran anschließend in 3 Waschgänge mit 1x Verdünnungspuffer gewaschen. Dazu wurde für jeden Waschschrift erst die untere Verschlusskappe angebracht, anschließend 0,5 mL 1x Verdünnungspuffer hinzugefügt, die Säule mit dem oberen Verschlussdeckel verschlossen und die Membran mit dem Puffer durch Schütteln und Wenden vermischt. Anschließend wurde die untere Verschlusskappe bei umgedrehter Säule entfernt und die Säule in eine neues, mit NSP (non-specifically binding proteins) beschriftetes 2 mL Reaktionsgefäß platziert. Die Säule wurde 30 Sekunden bei 268 g zentrifugiert und der Durchfluss gesammelt.
10. Die gebundenen Proteine wurden durch 4 Waschgänge mit dem 1x Stripping Puffer innerhalb von 15 Minuten eluiert. Hierzu wird die untere Verschlusskappe auf die Säule gesetzt, 0,5 mL des 1x Stripping Puffers hinzugefügt, die Säule durch den oberen Verschlussdeckel verschlossen und die Membran mit dem Puffer durch Schütteln und Wenden vermischt. Nach einer Inkubationszeit von 3 Minuten wird die Verschlusskappe bei umgedrehter Säule entfernt und die Säule in ein neues 2 ml Reaktionsgefäß gesetzt. Die Säule wird 30 Sekunden bei 268 g zentrifugiert und der Durchfluss BF (bound fraction).
11. Anschließend wurden die Säulen sofort durch folgende Schritte neutralisiert:
 - a. 0,6 mL des 1x Neutralisationspuffer wurden hinzugegeben und durch Schütteln vermischt. Anschließend erfolgte eine Inkubation bei Raumtemperatur für 15 Minuten.
 - b. Es erfolgte eine Zentrifugation für 30 Sekunden bei 268 g.

- c. Anschließend erfolgte eine erneute Suspension in 0,5 mL mit 1x Verdünnungspuffer. Zur weiteren Lagerung der Säulen bei 2 - 8°C wurde ein Puffer mit 0,02% Natriumazid verwendet.
12. Alle vier Durchflüsse der gebundenen Proteine werden zusammengefügt (4 x 0,5 mL BF = 2mL), mit 200 µL des 10 x Neutralisationspuffer neutralisiert und bei -80°C bis zur weiteren Verwendung weggefroren.

Konzentration der Proben:

1. Die depletierten Probe (DF) und die der gebundenen Proteine (BF) wurden auf Eis aufgetaut.
2. Pro Probe wurde ein Amicon Filter mit 1 mL Mili-Q Wasser gefüllt und 10 Minuten bei 3000 g zentrifugiert.
3. Das restliche Wasser wurde entfernt, die Liquorproben aufgetragen und erneut 10 Minuten bei 3 000 g zentrifugiert.
4. Dieser Zentrifugationsschritt wurde so oft wiederholt, bis das Volumen 250 µL entsprach.
5. 1 mL 25 mM Ammonium Bicarbonat Puffer wurde hinzugefügt und erneut so oft für 10 Minuten bei 3000 g zentrifugiert bis das Volumen wieder 250 µL entsprach.
6. Diese 250 µL wurden in ein neues Reaktionsgefäß überführt und so lange auf den Speed Vac gestellt, bis die konzentrierte Proteinmenge exakt 20 µL entsprach. Dabei wurde genau darauf geachtet, dass die Probe nicht austrocknet.
7. 20µL Proben wurden mit 7 µL SDS 4-fachem Probenpuffer und 3 µL reducing agent (10x) vermischt. 5 Minuten bei 100 ° C gekocht und dann bei -20°C weggefroren.

2.2.2.4.2 Eindimensionale SDS-Elektrophorese

Zur Proteomanalyse erfolgten zwei verschiedenen Experimente mit derselben Analyse-Methode, aber unterschiedlichem Experimentaufbau.

Im ersten Umlauf erfolgte die Analyse von einzelnen Liquor-Proben der transgenen DISC1 Ratten und deren Wurfgeschwister mit N = 5 je Gruppe, 60 µl pro Probe. Im zweiten Umlauf wurden die einzelnen Proben (N = 6 je Gruppe, 70 µl pro Probe) der beiden Gruppen (TG vs. LM) *gepoolt* (dt.: zusammengefasst) und die Analyse erfolgte anhand von jeweils 2 Pools der beiden Gruppen.

Hier wird exemplarisch das Verfahren des ersten Umlaufs, der Analyse der einzelnen Proben beschrieben:

Die eindimensionale SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis = Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese) ist eine Methode zur Auftrennung von Proteinen nach ihrer Molekülgröße. Je kleiner die Proteine sind, desto weiter ist deren relative Wanderungsstrecke durch das Gel. Diese Methode wurde zur Vorfraktionierung der Proteine verwendet.

Puffer	SDS 4-fachem Probenpuffer + Reducing Agent (10x)
Gel	4- 12 % NuPage Novex Midi Bis-Tris Gel, Invitrogen
Färbung	Coomassie blue
Marker	PageRuler Prestained Protein Ladder 0 - 170 kDa

1. Hierfür wurden die eingefrorenen Proben, die bereits 7 μ L des SDS 4-fachen Probenpuffer und 3 μ L des reducing agent (10x) enthielten (Gesamtmenge: 30 μ L), zunächst für 5 Minuten bei 100° C zur Denaturierung der Proteine erhitzt.
2. Anschließend wurden die Proben auf ein Gel (Invitrogen NuPage Novex 4-12% Bis-Tris-Midi Gel, ThermoFischer) aufgetragen und dabei immer zwei Reihen Abstand zwischen den einzelnen Proben gelassen.
3. Das Gel wurde bei 100 V solange laufen gelassen, bis alle Proben vollständig im Gel waren. Hierdurch entstand eine Vorfraktionierung der einzelnen Proteine.
4. Anschließend erfolgte eine Fixierung für fünf Minuten durch folgendes Gemisch:
 - 250mL Ethanol
 - 17,65 mL Phosphorsäure
 - 232,35 mL Milli Q Wasser
 - Gesamtmenge: 500 mL
5. Anschließend wurde das Gel durch Instant Blue, ein Fertig-Coomassie-Gemisch, der Firma expedeon bestehend aus Coomassie R250, G250, Ethanol, Phosphorsäure und destilliertem Wasser über Nacht gefärbt und fixiert.
6. Am nächsten Tag wurde das Gel in drei Waschschritten für je 20 Minuten mit 1 mL einer 30%igen Ethanol-Lösung gewaschen.
7. Die einzelnen Gelspuren wurden unter einer Reinraumwerkbank unter Kreatinin-freien Bedingungen mit einem sterilen Skalpell aus dem Gel geschnitten und in ein steriles Eppendorf Tube platziert. Zum Versand nach Amsterdam wurde in jedes Eppendorf Reaktionsgefäß eine 0,1% HAc-Lösung (1 mL Essigsäure auf 1L Milli Q Wasser) hinzugefügt und die Proben auf Trockeneis lagernd verschickt.

2.2.2.5 GeLC-MS/MS basierte Proteomanalyse

Die Analyse der Proben erfolgte durch das Onco Proteomics Laboratory des VUmc (Vrije Universiteit Medical Center) Department for Medical Oncology in Amsterdam und nach der GeLC-MS Methode, zusammengesetzt aus einer eindimensionalen Elektrophorese (siehe 2.2.2.4.2, S.42), gefolgt von einer Flüssigchromatographie (*liquid chromatography*, LC) mit Massenspektrometrie (MS) -Kopplung.

Hierbei wurden die mittels eindimensionaler Elektrophorese (SDS-PAGE) bereits vorfraktionierten Proteine zunächst durch tryptischen In-Gel-Verdau (Rosenfeld et al., 1992) in Peptide gespalten und somit für die massenspektrometrische Analyse vorbereitet.

Die Aufspaltung in Peptide vor der Massenspektrometrie hat folgende Vorteile. Zunächst erleichtert es die Extraktion der Proben aus dem Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgel. Des Weiteren entstehen dadurch Peptide mit einem C-terminalen Ende, was die anschließende Datenbank-Suche deutlich erleichtert. Es verhindert die Detektion von Isoformen eines Proteins, sowie posttranslationale Proteinmodifikation und ermöglicht die Kopplung der Flüssigchromatographie mit der Massenspektrometrie durch hochauflösende Tandem Massenspektrometrie (nanoLC-MC/MC).

Die anschließende Analyse der Werte erfolgte mit Hilfe der Software MaxQuant für Peptid/Protein Identifikation und Qualifikation.

2.2.3 Volumetrische Analyse der intrazerebralen Ventrikel von tgDisc1-Ratten durch zerebrale Magnetresonanztomographie

2.2.3.1 Vorbereitung und Durchführung der zerebralen Magnetresonanztomographie

Die Durchführung der Magnetresonanztomographie (MRT) erfolgte dankenswerterweise durch die Mercator Research Group, "Functional Architecture of Memory Unit", der Ruhr-Universität Bochum.

Die Versuchstiere werden während der MRT-Untersuchung mit 2% Isofluran narkotisiert. Während der gesamten Untersuchung erfolgt eine Überwachung und engmaschige Kontrolle von Atmung und Körpertemperatur.

Die cMRT-Aufnahmen wurden mit einem 7.0 Tesla MR-Tomographen der Firma Bruker BioSpin (Billerica, MA, USA) durchgeführt. Es wurde eine spezielle Ratten-Kopfspule (Bruker BioSpin) mit 20 mm Oberfläche, sowie eine quadratische Senderspule (Bruker BioSpin) mit einem inneren Durchmesser von 86 mm verwendet.

Es wurden folgende Sequenzpunkte in koronarer Schichtführung akquiriert T2-RARE (Repetitionszeit (TR) = 7080 864 ms; Echozeit (TE) = 14.370 ms; 256x256 Matrix; RARE-Faktor = 4, Sichtfeld (FOV) = 4cmx4cm, Scandauer 906 Sekunden). Pro Versuchstier wurden 48 Schnitte (0.156x0.156x0.5mm) erstellt.

2.2.3.2 Datenanalyse

Die Analyse der MRI Scans erfolgte mit Hilfe des Anatomist/ BrainVisa Programms, Version 4.3.0 (NeuroSpin, GIF-sur-Yvette, Frankreich).

Hierbei wurden die Pixel in jedem einzelnen Schnittbild hinsichtlich ihrer anatomischen Zugehörigkeit markiert. Für unsere Arbeiten wurden nur die einzelnen Ventrikel als *Region of Interest* (ROI) markiert und je nach Ventrikel-Zugehörigkeit (rechter Seitenventrikel = rLV, linker Seitenventrikel = lLV, 3. Ventrikel = III, 4. Ventrikel = IV) unterschiedlich benannt. Anschließend erfolgte mit Hilfe einer 3D Rekonstruktion die Volumenbestimmung in mm³.

3 Ergebnisse

3.1 Genexpressionsanalyse von PBMCs transgener Disc1 Ratten

3.1.1 Genexpressionsanalyse durch Affymetrix GeneChip® Microarrays

Mit dem Ziel mögliche Expressionsunterschiede von Kandidatengenen als Biomarker von DISC1opathien zu finden, führten wir eine Genexpressionsanalyse von PBMCs tgDISC1 tgDISC1-Ratten und deren *littermates* durch.

Hierfür extrahierten wir zunächst PBMCs von tgDISC1-Ratten und deren *littermates* und transkribierten anschließend daraus mRNA, anhand derer wir mittels Affymetrix GeneChip® Microarrays und der GeneSpring GX software (Agilent Technologies) die Genexpression analysierten.

Drei Proben (2x TG, 1x LM) passierten nicht die Hybridisierungs-Qualitätskontrolle, zwei weitere Proben (1x TG, 1x LM) mussten aufgrund von post mortem detektierten, nicht-transgen-assoziierten Malformationen ausgeschlossen werden, so dass letztendlich 5 transgene DISC1 Ratten und 7 nicht transgene Wurfgeschwister analysiert wurden.

Die Microarray Analyse ergab eine Reihe von Genen mit signifikanter Expressionsdifferenz. Meist lag eine Unterregulierung, gemessen als Fold Change (FC), in den PBMCs der tgDISC1-Ratten vor,

	Eingangsname	Gensymbol [Ratte]	Protein	TG versus LM		
				Gen-expression	FC	P-Wert
1	RGS1_RAT	Rgs1	Regulator of G-protein signaling 1	▼	- 2.03	0.0062
2	CCL4_RAT	Ccl4	Chemokine (C-C motif) ligand 4	▼	- 1.67	0.0001
3	D4A8L8_RAT	Fpr2 Fpr2l	Formyl peptide receptor 2 Formyl peptide receptor 2-like	▼	- 1.65	0.0053
4	CO3_RAT	C3	Complement component 3	▼	- 1.63	0.0037
5	Q9WVL9_RAT	Nkg7	Natural Killer Cell Group 7	▼	- 1.60	0.0004
6	F1LRH7_RAT	Il12rb2	Interleukin 12 receptor, beta 2	▼	- 1.59	0.0095
7	ILEUA_RAT	Serpinb1a	Serine proteinase inhibitor, clade B, member 1a	▼	- 1.52	0.0071
8	Q5MPU9_RAT	Ly49si3	Immunoreceptor Ly49si2	▼	- 1.51	0.0060
9	Q5M7T7_RAT	Pla2g7	Phospholipase A2, group VII	▼	- 1.48	0.0056
10	H2A2A_RAT	LOC690131 Hist2h2aa3	Similar to H2A histone family, member O Histone cluster 2, H2aa3	▼	- 1.47	0.0002
11	Q66HN6_RAT	Slc27a2	Solute carrier family 27 (fatty acid transporter), member 2	▼	- 1.46	0.0089
12	Q561K3_RAT	Il13ra1	Interleukin 13 receptor, alpha 1	▼	- 1.45	0.0074
13	CP4F3_RAT	Cyp4f18	Cytochrome P450, family 4, subfamily f, polypeptide 18	▼	- 1.44	0.0038
14	RL10_RAT	Rpl10	Ribosomal protein L10	▼	- 1.41	0.0059
15	D3ZPB4_RAT	Olr428	Olfactory receptor 428	▲	1.41	0.0092
16	IFNG_RAT	Ifng	Interferon gamma	▼	- 1.38	0.0014
17	D1MF50_RAT	RGD1561778	Similar to dendritic cell-derived immunoglobulin (Ig)-like receptor 1	▼	- 1.38	0.0055
18	F1LYV1_RAT	Scimp	SLP adaptor and CSK interacting membrane protein	▼	- 1.37	0.0018
19	TSN31_RAT	Tspan31	Tetraspanin 31	▼	- 1.36	0.0041
20	D4AC93_RAT	Tmem223	Transmembrane protein 223	▼	- 1.35	0.005

Tabelle 10: Top 20 Gene mit unterschiedlicher Expression in PBMCs von tgDISC1-Ratten verglichen mit deren Wurfgeschwistern (Trossbach et al., 2019)

Die Genexpressionsanalyse der totalen RNA erfolgte durch das BMFZ (Biologisch-Medizinisches Forschungszentrum der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf). Durch einen moderaten T-test wurde die differenzierte Genexpression ermittelt. Dabei wurde eine Signifikanzschwelle bei $p = 0,01$ festgelegt. Pfeil nach unten, steht für eine reduzierte Genexpression, Pfeil nach oben für eine erhöhte Genexpression. Der „Fold Change“ (FC) zeigt das Verhältnis zwischen den normalisierten Expressionsraten der untersuchten Gene in den Proben der transgenen DISC1 Ratten (TG, n = 5) und den Proben der nicht transgenen Wurfgeschwister (LM, n = 7).

Sowohl *Rgs1*, als auch *Ccl4* (chemokine (C-C motif) ligand 4) sind Regulatoren des G Protein basierenden Signalwegs mit einer Co-Expressionsrate von 0.669 im Menschen. *Il12rb2*, *Ifng*, *Ccl4* und *Il13ra1* sind Teil des Zytokin-Zytoki-Rezeptor-Interaktions-Signalweg. *Il12rb2*, *Ifng*, und *Il13ra1* spielen gleichzeitig eine große Rolle im JAK-STAT-Signalweg (JAK = Januskinase, STAT = *Signal Transducers and Activators of*

Transcription). Beides Signalwege, welche eine große Rolle in der intrazellulären und extrazellulären Signalübertragung spielen.

Vier der Top 20 Gene, *Rgs1*, *Ccl4*, *Il12rb2* und *Ifng*, werden vor allem in den T-Zellen, und NK-Zellen exprimiert. Gene Ontology und Ingenuity Pathway Analysis (Quiagen) weisen auf eine positive Regulation der toll-like Rezeptoren-, T-Zell-Aktivierung und -Proliferation-Signalwege hin sowie auf eine positive Regulation der Kommunikation zwischen dem angeborenen und erworbenen Immunsystem (Trossbach et al., 2019).

3.1.2 Validierung der Microarray Resultate durch quantitative PCR

Zur Validierung der Microarray Resultate erfolgte eine quantitative PCR mit optimierten Primern und etablierten Bedingungen der zellulär interessantesten Kandidatengene.

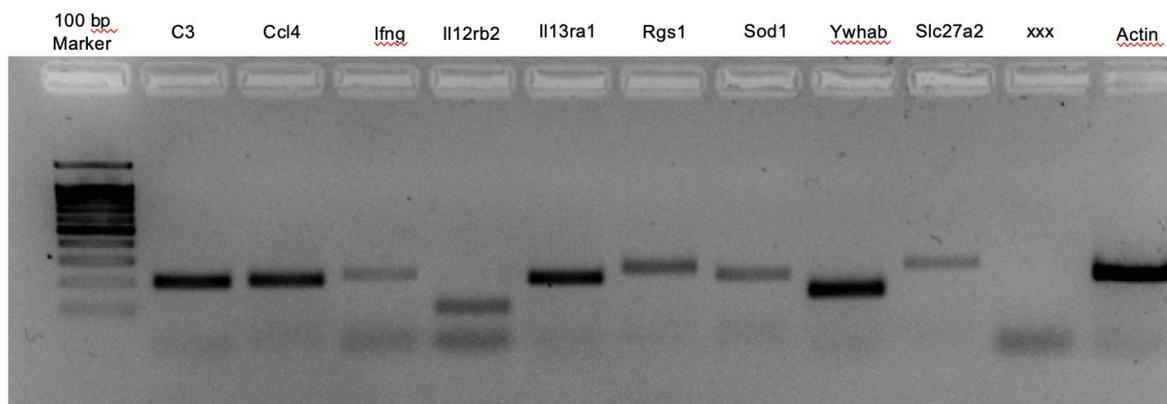


Abbildung 4: Gelelektrophorese der optimierten Primer

Darstellung der optimierten Primer auf einem 2,5%iges Agarose Gel unter den in Tabelle 7: Optimale Primerbedingungen (S. 31) aufgeführten Bedingungen. Der Reaktionsansatz und die Reaktionsbedingungen sind in Tabelle 4 (S. 29) und Tabelle 6 (S. 30) aufgeführt. Aufgetragen wurden jeweils 20 μ L der Probe plus 5 μ L des 10x Ladepuffers. Als Farbstoff wurden 3,5 μ L Midori Green verwendet. Die Laufzeit des Gels betrug 23 Min. bei 180 V. Als Marker wurden 5 μ L eines 100 bp Marker der Firma Biobudget verwendet.

Aus den Top 20 Genen mit unterschiedlicher Expression in PBMCs von tgDISC1-Ratten und deren Wurfgeschwister wurden sechs zellulär interessante Gene zur Validierung mittels Realtime-PCR Analyse ausgewählt. Zudem erfolgte die Validierung noch an zwei weiteren Kandidatengenen. *Sod1* (Superoxid-Dismutase 1) mit einem Fold Change (FC) von 1,29 und $p = 0,004$, dessen Unterregulierung bereits zuvor bei Schizophrenie Patienten kurz nach Symptombeginn berichtet wurde (Coughlin et al., 2013). *Ywhab* (14-3-3 Protein beta/alpha) mit einem FC von 1,14 und $p = 0,009$, dessen Proteingruppe als Biomarker im Liquor von Creutzfeldt-Jakob Patienten zu finden ist.

Die reduzierte Genexpressionsdifferenz bestätigte sich sechs der acht untersuchten Kandidatengene.

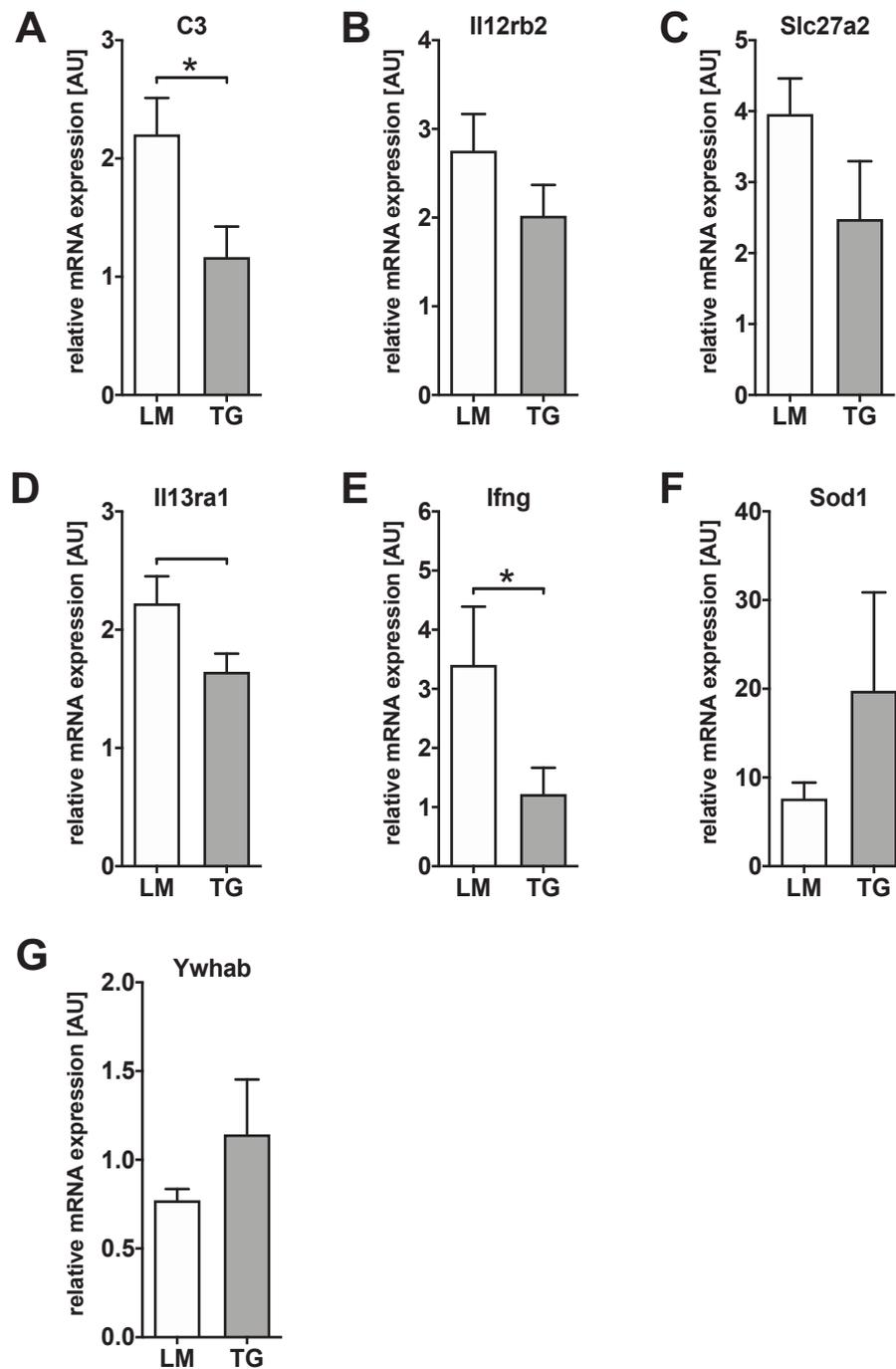


Abbildung 5: Verifizierung der Microarray-Ergebnissen durch quantitative Realtime-PCR

Littermates (LM, weißer Balken, n = 5-7) und transgener DISC1 Ratten (TG, grauer Balken, n = 3-6) zeigten in der Realtime-PCR eine unterschiedliche Genexpression bei einem Teil der getesteten Kandidatengene. Die Darstellung erfolgt anhand einer beliebigen Einheit (engl. Arbitrary units = AU) (A) Die relativen mRNA Levels in C3 waren signifikant reduziert in tgDISC1-Ratten T-test $*P = 0,035$. (B) Es konnte kein signifikanter Unterschied in der Genexpression von Il12rb2 in tgDISC1-Ratten detektiert werden. T-test $P = 0,244$. (C) Slc27a2 war nicht wesentlich unterschiedlich exprimiert in PBMCs von tgDISC1-Ratten. T-test $P = 0,129$. (D) Eine reduzierte Expression von Il13ra1 konnte in tgDISC1-Ratten gesehen werden. T-test $P = 0,085$. (E) Die Expression von Ifng war signifikant reduziert in tgDISC1-Ratten. Mann-Whitney U-test $*P = 0,053$. (F) Die Genexpression von Sod1 war in tgDISC1-Ratten hochreguliert Mann-Whitney U-test $P = 0,1419$ (G) Es konnte kein signifikanter Unterschied in der Genexpression von Ywhab zwischen tgDISC1-Ratten und deren *littermates* gefunden werden. T-Test $P = 0,4136$

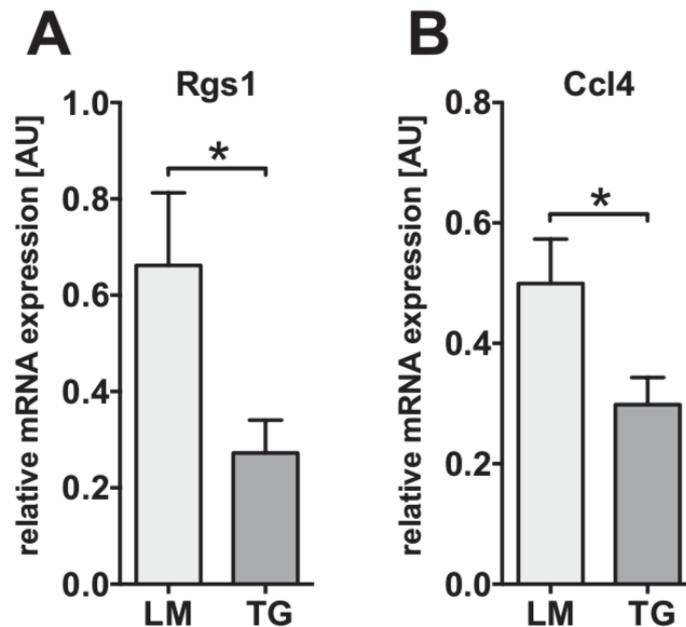


Abbildung 6: Re-Analyse der Verifizierung der Microarray-Ergebnissen durch quantitative Realtime-PCR

Littermates (LM, weißer Balken, n = 5-7) und transgener DISC1 Ratten (TG, grauer Balken, n = 3-6) zeigten in der Realtime-PCR (Re-Analyse durch Dr. Trossbach) eine unterschiedliche Genexpression der Gene Rgs1 und Ccl4. Die Darstellung erfolgt anhand einer beliebigen Einheit (engl. Arbitrary units = AU) **(A)** Die Expression von Rgs1 in tgDISC1-Ratten war reduziert. T-test $*P = 0,043$. **(B)** Eine signifikant reduzierte Expression von Ccl4 konnte in tgDISC1-Ratten gesehen werden. T-test $*P = 0,043$. Die Re-Analyse erfolgte durch Dr. Trossbach mit Isolierung neuer RNA und cDNA Synthese. Die Daten wurden freundlicherweise zur Verfügung gestellt (Trossbach et al., 2019).

3.2 Validierung der Genexpressionsanalyse in schizophrenen Patienten

Um zu testen, ob die im Rattenmodell für eine Subgruppe zutreffende Veränderungen der Genexpression auch erfolgreich für die Identifizierung einer Subgruppe von schizophrenen Patienten geeignet ist, erfolgte eine Genexpressionsanalyse mittels qPCR der zellulär interessantesten Kandidatengene, aufgelistet in

Tabelle 10: Top 20 Gene mit unterschiedlicher Expression in PBMCs von tgDISC1-Ratten verglichen mit deren **Wurfgeschwistern** (S. 46) in einer limitierten Patientenkohorte des LVR-Klinikums Düsseldorf der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf mit der Diagnose Schizophrenie nach DSMIC/SCID und entsprechenden Kontrollen.

Unserer Hypothese nach, sollten die Kandidatengene in der besagten Untergruppe von schizophrenen Patienten mit einer möglichen DISC1 Pathologie eine ähnlich reduzierte Genexpression derselben Gene aufweisen, wie in der Analyse der DISC1 Ratten.

Sowohl die Top-Kandidatengene *RGS1* und *CCL4*, als auch weitere der Top 20 Gene zeigten, wie bereits in der Analyse der tgDISC1-Ratten, ein vermindertes Expressionsmuster, sodass die Hypothese durch ein ähnliches Expressionsmuster bestätigt wurde. Ein Teil der Analysen erfolgte durch Dr. Trossbach.

Ratten

Gen Symbol	Microarray	qPCR	humane qPCR
Rgs1	↓	↓	↓ (T. et al.)
CCL4	↓	↓	↓ (T. et al.)
C3	↓	↓	↓
IL12RB2	↓	n.s.	n.s. (T. et al.)
SLC27A2	↓	n.s.	n.s. (T. et al.)
IL13RA1	↓	n.s.	n.s.
IFNG	↓	↓	n.s. (T. et al.)
Sod1	↓	n.s.	n.g.
Ywhab	↓	n.s.	n.g.

Tabelle 11 Überblick über die Gene, welche in Ratten und im Menschen getestet wurden

Pfeil nach unten, steht für eine reduzierte Genexpression, Pfeil nach oben für eine erhöhte Genexpression in tgDISC1-Ratten oder Schizophrenen Patienten verglichen zu den jeweiligen Kontrollen. Abkürzungen: n.s., nicht signifikant unterschiedlich; n.g., nicht getestet; T. et al. die Analyse erfolgte durch Dr. Trossbach.

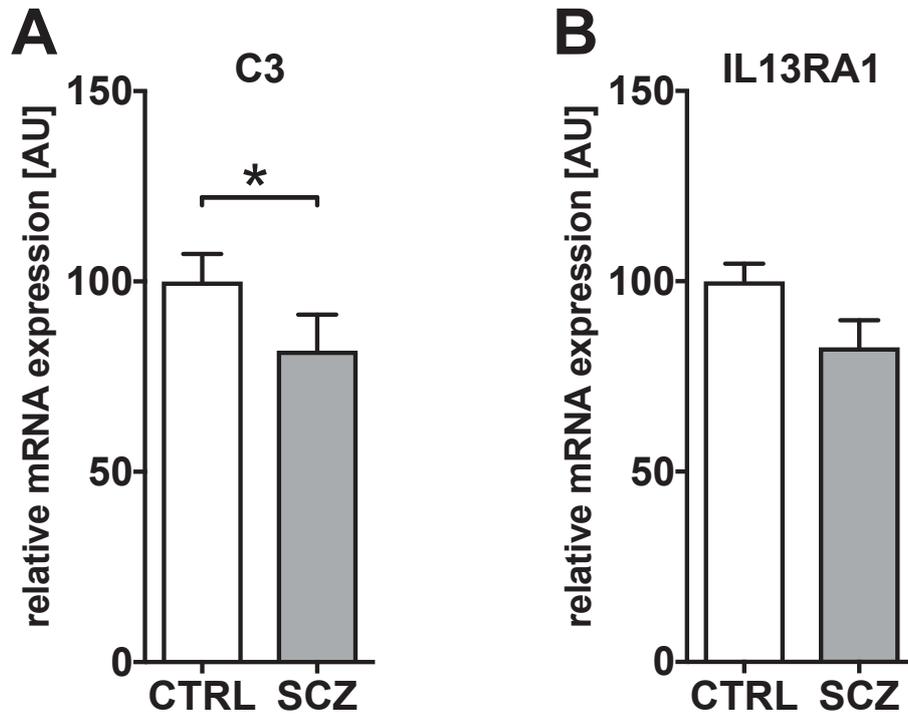


Abbildung 7: Validierung der Genexpressionsanalyse in schizophrenen Patienten mittels qPCR

Patienten mit der Diagnose Schizophrenie nach DSMIC/SCID (SCZ, grauer Balken) zeigten in der Realtime-PCR eine unterschiedliche Genexpression gegenüber der Kontrollgruppe (CTRL, weißer Balken). Das Genexpressionsmuster entsprach dabei dem der in tgDISC1-Ratten bereits nachgewiesene Genexpressionsmuster. Die Darstellung erfolgt anhand einer beliebigen Einheit (engl. Arbitrary units = AU) **(A)** Die Patientengruppe (SCZ, n = 15) zeigte eine reduzierte Expression von C3 im Vergleich zur Kontrollgruppe (CTRL, n = 44). T-test $*P = 0,016$. **(B)** Die Expression von Il13ra1 war in schizophrenen Patienten (SCZ, n = 16) reduziert im Vergleich zu Kontrollgruppe, n = 50). T-test $P = 0,077$.

3.3 Hämoglobinkonzentration der einzelnen Liquorproben

Mit Hilfe des Rat Hemoglobin (HM) ELISA Kit (GenWay Biotech) erfolgte die Quantifizierung der Hämoglobinkonzentration in den einzelnen Liquorproben, um mögliche Blutverunreinigungen so identifizieren und von der weiteren Analyse ausschließen zu können.

Hierbei handelt es sich um ein Double-Antibody-Sandwich-ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent-Assay), ein immunologisches Verfahren zum Nachweis von spezifischen Substanzen in Körperflüssigkeiten, in unserem Fall Hämoglobin in Liquorproben. Das Hämoglobin bindet an einen spezifischen Antikörper, sodass ein Hämoglobin-Anti-Hämoglobin Komplexe entsteht, an welchen wiederum ein zweiter, Enzym gebundener Antikörper bindet. Durch die Hinzugabe einer chromogenen Lösung reagiert das Enzym und ermöglicht die Absorption bei 450 nm, welche direkt mit der Hämoglobinkonzentration der Proben korreliert.

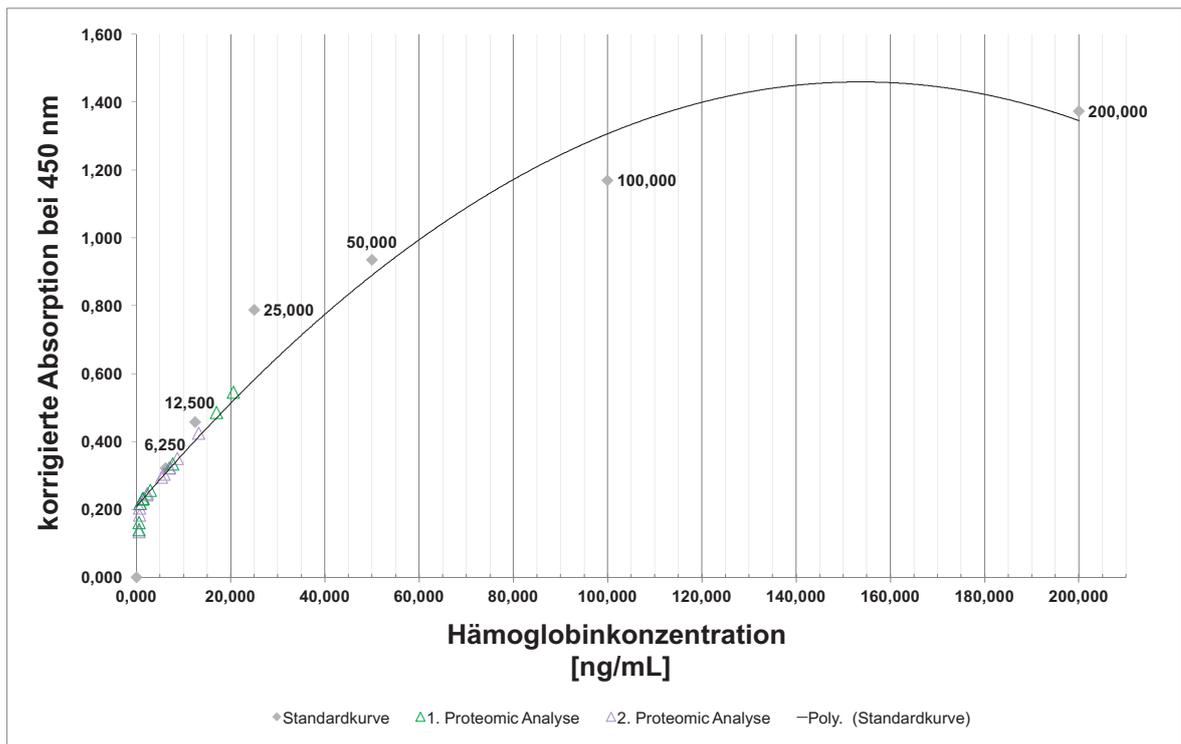


Abbildung 8: Hämoglobinkonzentration der einzelnen Liquorproben

Die Werte der einzelnen Liquorproben wurde anhand der, durch die Standardwerte erstellte, polynomische Standardkurve 2. Grades berechnet. Hierfür wurde für jedes Duplikat der Mittelwert berechnet und der durchschnittlichen Hintergrundwert subtrahiert. Anhand der Standardwerte wurde eine polynomische Standardkurve 2. Grades mit folgender Gleichung erstellt: mittlere korrigierte Absorption = $-5 \cdot 10^{-5} x^2 + 0,0163 x + 0,2085$. Mittels dieser Gleichung wurde ausgehend von der mittleren korrigierten Absorption (y-Achse) die Hämoglobinkonzentration (x-Achse) der einzelnen Liquorproben ermittelt.

Die mittlere Hämoglobinkonzentration lag bei 4,9549 ng/mL. Die maximale Hämoglobinkonzentration lag bei 20,642 ng/mL, sodass alle Proben in die weitere Analyse inkludiert werden konnten.

3.4 DISC1-Nachweis im Liquor von tgDISC1-Ratten mittels Western Blot

Um nachzuweisen, dass sich DISC1 im Liquor von tgDISC1-Ratten befindet, erfolgte die Liquoranalyse tgDISC1-Ratten und deren Wurfgeschwister mittels SDS-Gelelektrophorese und Western Blot.

Hier zeigte sich eine DISC1 Expression im Liquor von tgDISC1-Ratten, während diese im Liquor der nicht-tragenen Wurfgeschwister fehlt, wodurch eine intrazerebrale DISC1-Ausscheidung über den Liquor naheliegender ist. Der intrathekale Nachweis von DISC1 ist

ein wichtiger Bedingungsfaktor für weitere Liquor-Proteomik-Analysen in tgDISC1-Ratten, hinsichtlich der Hypothese, dass DISC1 einen Einfluss auf das intrathekale Proteom hat.

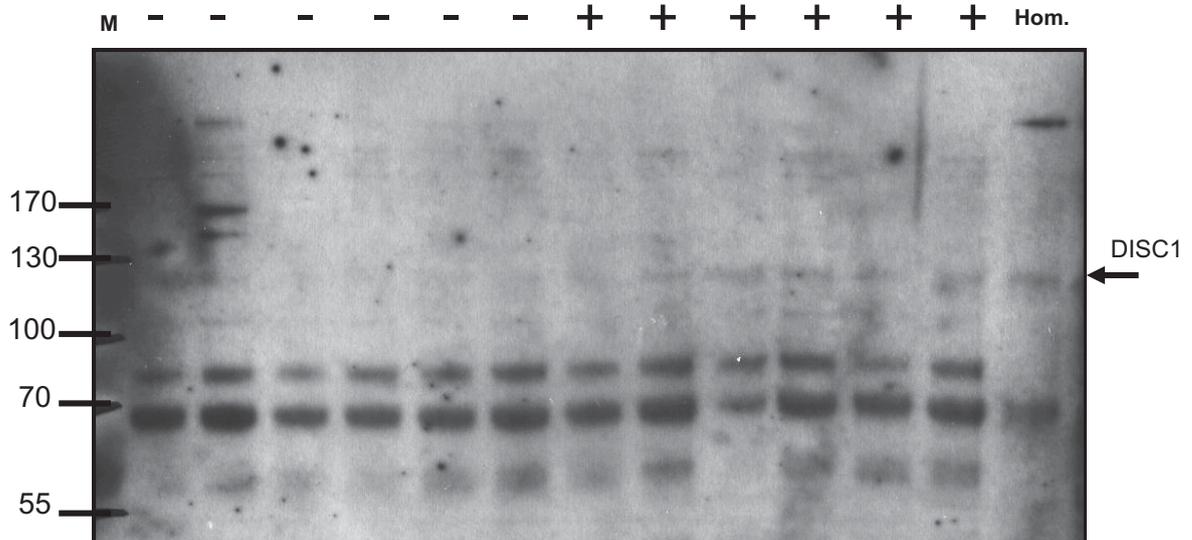


Abbildung 9: DISC1-Nachweis Western Blot

Mittels SDS-Gelelektrophorese und Western Blot wird die DISC1 Expression und Aggregation zwischen tgDISC1-Ratten der Foundergruppe 1 (+) und deren nicht transgenen Wurfgeschwistern (-) verglichen. *Full-length* humanes DISC1 Transgen Expression konnte in heterozygoten tgDISC1-Ratten mittels anti-DISC1 Antikörper 14F2 (Ottis et al., 2011) festgestellt werden. In den Wurfgeschwistern konnte kein huDISC1 detektiert werden. In der letzten Spalte wurde ein 2,5%iges TG-Homogenat (Hom.) als positive Probe aufgetragen. Als Marker (M) diente der PageRuler Prestained Protein Ladder 0 - 170 kDa. Die Proben wurden auf ein 4 - 12 % NuPage Novex Midi Bis-Tris Gel der Firma Invitrogen aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte bei 120 V.

3.5 GeLC-MS/MS basierte Proteomanalyse

Um die Auswirkung von DISC1 auf das intrathekale Proteom zu verstehen und darauf basierend der Identifizierung eines Biomarkers näher zu kommen, wurde die GeLC-MS/MS Methode angewandt um eine eingehende Liquoranalyse von tgDISC1-Ratten und deren nicht-transgenen Wurfgeschwistern durchzuführen.

Die Liquorproben wurden unmittelbar nach der Abnahme auf niedriger Stufe zentrifugiert, um mögliche Kontaminationen durch feste Bestandteile zu beseitigen und anschließend durch eine Antikörperreaktion basierende Analyse auf Blutkontaminationen überprüft.

Zur Vorbereitung auf die massenspektrometrische Analyse erfolgte eine Protein Depletion und Probenkonzentration sowie die Auftrennung bereits depletierter Proteine durch tryptischen In-Gel-Verdau in einzelne Peptide mittels SDS-PAGE. Die anschließende Färbung erfolgte mittels Coomassie Blue Färbung.

Es erfolgten zwei verschiedenen Experimente mit derselben Methode, aber unterschiedlichem Experimentaufbau.

Die Flüssigkeitschromatographie gekoppelte Massenspektroskopie erfolgte dankenswerterweise durch das OncoProteomics Laboratory (OPL), des VUmc (Vrije Universiteit Medical Center, Amsterdam).

Im ersten Experiment wurden die Proben (LM = 5; TG = 5) separat und für OPL verblindet analysiert.

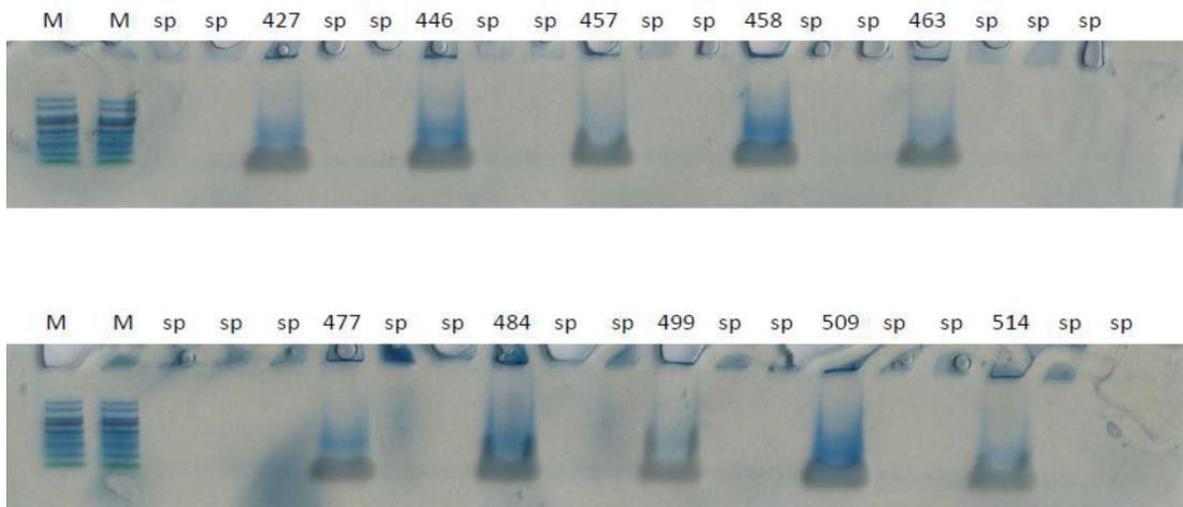


Abbildung 10: Auftrennung und Färbung der Liquorproben durch SDS-PAGE und Coomassie-Färbung

Die dargestellten Banden zeigen die einzelnen Liquorproben mit den jeweiligen Probennummern durch SDS-PAGE aufgetrennt und mit Coomassie gefärbt. Die Proben 427, 458, 477, 499 und 514 gehören der Gruppe 1, den nicht transgenen Wurfgeschwistern, der Kontrollgruppe an. Proben 446, 457, 463, 484 und 509 gehören der Gruppe 2 an, den tgDISC1-Ratten. Jeweils an den Rändern der beiden Gele befindet sich der Marker (M) PageRuler Prestained Protein Ladder 0 - 170 kDa. Die einzelnen Proben sind jeweils durch mindestens zwei space lines (sp) voneinander getrennt. Die Auftragung der jeweils 20 µL Probe erfolgte jeweils mit 7 µL eines SDS 4-fachem Probenpuffer, sowie 3 µL eines 10-fachen Reducing Agent. Die Proben wurden auf ein 4 - 12 % NuPage Novex Midi Bis-Tris Gel der Firma Invitrogen aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte bei 100 V. Die anschließende Färbung und Fixierung erfolgte über Nacht durch die Coomassiemischung Instant Blue der Firma expedeon.

In dem ersten Experimenten Aufbau wurde die nicht-transgene Probe 427 aufgrund der unsupervised (dt. unüberwachte) Clusteranalyse von der weiteren Datenanalyse entfernt. *Unsupervised* Lernverfahren werden in Clusteranalysen verwendet um mehrere Datenpunkte, ohne Ausgabevariablen, einer bestimmten Gruppe (sog. *Cluster*) zuzuordnen.

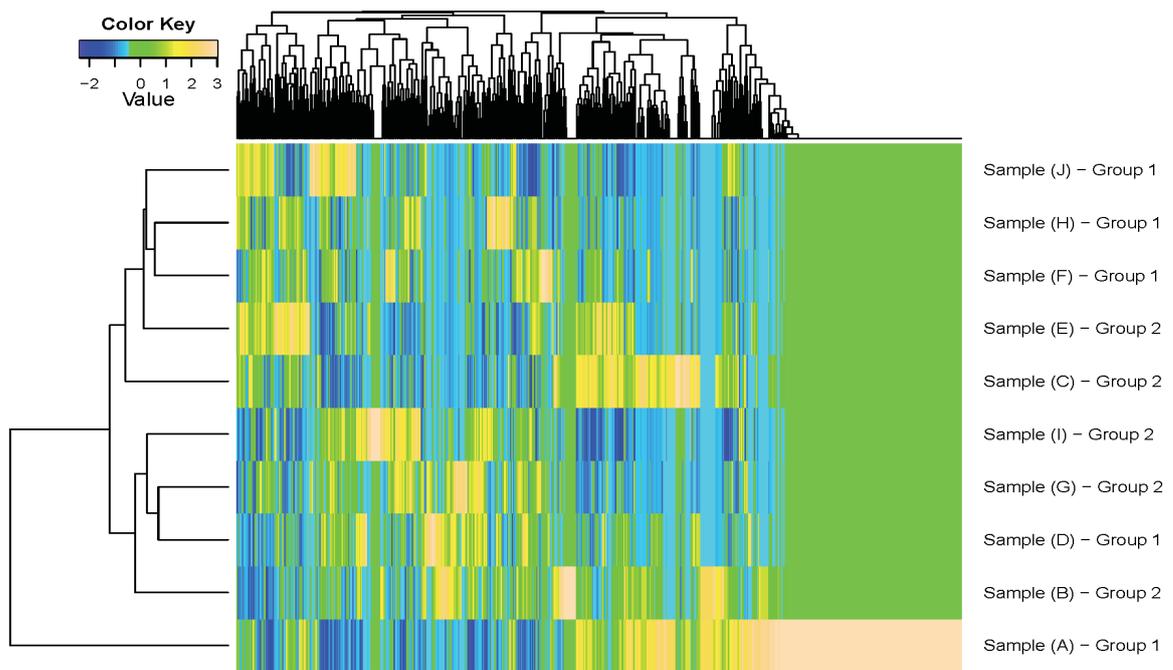


Abbildung 11: Unsupervised hierarchische Clusteranalyse

Zur Vorauswahl der Proben erfolgte eine *unsupervised* hierarchische Clusteranalyse, basierend auf der Proteinexpression von Ratten-Liquorproben. Die *unsupervised* Clusteranalyse von log₂-transformierter Protein Expression Ratio (orange: hohe Expression, blau: niedrige Expression) zeigte in der Probe 427 (*Sample A*) eine ungewöhnlich hohe Protein Expression, sodass diese Probe aus der weiteren Datenanalyse ausgeschlossen wurde.

Mittels GeLC-MS/MS mit einer MS Toleranz von 6 ppm (engl.: *parts per million*), einer minimalen Peptide Länge von 7 Aminosäuren und einer Peptide-, wie auch Protein FDR (engl.: *false discovery rate*) von 0,01 konnten insgesamt 700 verschiedene Proteine in den Liquorproben identifiziert werden. Der differenzierte Proteingehalt zwischen beiden Gruppen wurde anhand des *beta binominal tests* (Pham et al., 2010) ermittelt. Mit einem FC von 10000,0 zeigten 21 der 700 Proteine eine alleinige Expression in der Gruppe der tgDISC1-Ratten. Darunter zwei Rab Proteine, monomere G-Proteine, welche das Nukleotid GTP binden und an der Regulation des vesikulären Transportes im Endomembransystem beteiligt sind.

TG versus LM						
	Eingangsname	Gensymbol [Ratte]	Protein	Regulation	FC	P-Wert
1	CAH3_RAT	Ca3	Carbonic anhydrase 3	↑	10000,0	0,0076
2	KCRM_RAT	Ckm	Creatine kinase M-type	↑	10000,0	0,0101
3	CLH1_RAT	Cltc	Clathrin heavy chain 1	↑	10000,0	0,0228
4	MYG_RAT	Mb	Myoglobin	↑	10000,0	0,0241
5	CAH1_RAT	Ca1	Carbonic anhydrase 1	↑	10000,0	0,0254
6	RAB1A_RAT	Rab1A	Ras-related protein Rab-1A	↑	10000,0	0,0305
7	B0BNK1_RAT	Rab5c	RAB5C, member RAS oncogene family	↑	10000,0	0,0462
8	ACPH_RAT	Apeh	Acylamino-acid-releasing enzyme	↑	10000,0	0,0462
9	CH10_RAT	Hspe1	10 kDa heat shock protein, mitochondrial	↑	10000,0	0,0467
10	G3V9R8_RAT	Hnrnpc	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein C	↑	10000,0	0,0467
11	ENOB_RAT	Eno3	Beta-enolase	↑	10000,0	0,0807
12	TMED9_RAT	Tmed9	Transmembrane emp24 domain-containing protein 9	↑	10000,0	0,0841
13	D3ZVA5_RAT	Fbl1	Fibrillar-like 1	↑	10000,0	0,0841
14	M0R907_RAT	Snrpd3	Small nuclear ribonucleoprotein Sm D3	↑	10000,0	0,0876
15	Q5U362_RAT	Anxa4	Annexin	↑	10000,0	0,0876
16	B0BMY7_RAT	Twf2	Protein tyrosine kinase 9-like (A6-related protein) (Predicted), isoform CRA_b	↑	10000,0	0,0876
17	IDHP_RAT	ldh2	Isocitrate dehydrogenase [NADP], mitochondrial	↑	10000,0	0,0876
18	Q4KLI7_RAT	Sf3a3	splicing factor 3a, subunit 3	↑	10000,0	0,0876
19	CBPE_RAT	Cpe	Carboxypeptidase E	↑	10000,0	0,0885
20	ANXA6_RAT	Anxa6	Annexin A6	↑	10000,0	0,0900
21	Q499Q4_RAT	Pgm1	Phosphoglucomutase 1	↑	10000,0	0,0970
22	MFGM_RAT	Mfge8	Lactadherin	↑	4,9	0,0895
23	COF1_RAT	Cfl1	Cofilin-1	↑	2,3	0,0657
24	HBB1_RAT	Hbb	Hemoglobin subunit beta-1	↑	1,7	0,0764
25	KPYM_RAT	Pkm	Pyruvate kinase PKM	↑	1,6	0,0452
26	A1I3_RAT	A1i3	Alpha-1-inhibitor 3	↓	-1,4	0,0840
27	APOE_RAT	Apoe	Apolipoprotein E	↓	-1,4	0,0573
28	MUG1_RAT	Mug1	Murinoglobulin-1	↓	-1,5	0,0582
29	A1AG_RAT	Orm1	Alpha-1-acid glycoprotein	↓	-1,6	0,0991
30	F1LM05_RAT	LOC299282	Serine protease inhibitor A3N	↓	-1,6	0,0532
31	F2Z3T9_RAT	U2af2	U2 snRNP auxiliary factor large subunit	↓	-5,9	0,0618
32	F1LMM9_RAT	Gfm1	Elongation factor G, mitochondrial	↓	-10000,0	0,0528
33	THIC_RAT	Acat2	Acetyl-CoA acetyltransferase, cytosolic	↓	-10000,0	0,0528

Tabelle 12: Ergebnisse der Proteomanalyse im Liquor von tgDISC1-Ratten und deren Wurfgeschwister

Die Proteomanalyse der Liquorproben erfolgte durch das OncoProteomics Laboratory (OPL), des VUmc (Vrije Universiteit Medical Center, Amsterdam). Durch einen *beta binominal tests* (Pham et al., 2010) wurde der differenzierte Proteingehalt ermittelt. Der *Fold Change* (FC) zeigt das Verhältnis zwischen dem Proteingehalt in den Proben der transgenen DISC1 Ratten (TG) und den Proben der nicht transgenen Wurfgeschwister (LM) an. Ein FC von 10000,0 indiziert den alleinigen Proteinnachweis in einer der beiden zu differenzierenden Gruppen an. Der Pfeil nach unten, steht für einen reduzierten Proteinnachweis. Der Pfeil nach oben steht für einen erhöhten Proteinnachweis. In der Tabelle aufgeführt werden alle Proteine $p < 0,1$. Die grau hinterlegten Proteine fanden sich in beiden Analysen wieder.

Zur besseren Einteilung der betroffenen Proteine bezüglich ihrer zugehörigen Zellkompartimente erfolgte eine String-Analyse der in den tgDISC1-Ratten hochregulierten Proteine mit einem p-Wert von $< 0,1$.

GO ID	Zellkompartiment	Anzahl der Gene	p-Wert	p-Wert FDR	p-Wert bonferroni
GO:0070062	Exosomen	9	0,0000175	0,0076500	0,0223000
GO:0031982	Vesikel	9	0,0001900	0,0603000	0,2410000
GO:0044421	Extrazelluläre Struktur	9	0,0003520	0,0892000	0,4460000
GO:0005793	ER-Exit-Sites (ERES)	2	0,0012100	0,2200000	1,0000000
GO:0005905	Clathrin umhüllte Membranvertiefungen	2	0,0017600	0,2510000	1,0000000
GO:0005576	Extrazellulärraum	9	0,0017800	0,2510000	1,0000000
GO:0030658	Transportvesikel umhüllende Membran	2	0,0024800	0,3150000	1,0000000
GO:0042470	Melanosom	2	0,0069900	0,7390000	1,0000000
GO:0030133	Transportvesikel	2	0,0083200	0,8120000	1,0000000
GO:0031410	Zytoplasmatische Vesikel	4	0,0102000	0,9230000	1,0000000

Tabelle 13: String-Analyse zu den betroffenen Zellkompartimenten

Eine Vielzahl der in tgDISC1-Ratten hochregulierter Liquorproteine mit einem p-Wert $< 0,1$ befindet sich in Zellkompartimenten, die an dem intra- und interzellulären Transport beteiligt sind. FDR = *False Discovery Rate*

Im zweiten Experiment wurden die Proben der einzelnen Gruppen (LM, TG) in jeweils 2 Gruppen gepoolt, um das Probenvolumen zu erhöhen und dadurch die Assay-Durchführung zu verbessern. Zudem erwarteten wir durch das Pooling eine Reduktion der einzelnen Probenvariationen.

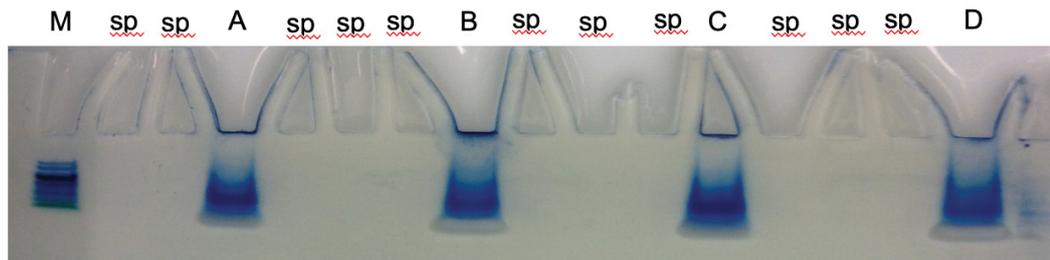


Abbildung 12: Auftrennung und Färbung der gepoolten Liquorproben durch SDS-PAGE und Coomassie-Färbung

Die dargestellten Banden zeigen die gepoolten Liquorproben in ihren jeweiligen Gruppen durch SDS-PAGE aufgetrennt und mit Coomassie gefärbt. Die gepoolten Liquorproben der tgDISC1-Ratten wurden in zwei Gruppen, A und C, aufgeteilt. Die gepoolten Liquorproben der nicht transgenen Wurfgeschwistern wurden in die Gruppen B und D aufgeteilt. In der ersten Spalte befindet sich der Marker (M) PageRuler Prestained Protein Ladder 0 - 170 kDa. Die einzelnen Proben sind jeweils durch drei space lines (sp) voneinander getrennt. Die Auftragung der jeweils 20 µL Probe erfolgte jeweils mit 7 µL eines SDS 4-fachem Probenpuffer, sowie 3 µL eines 10-fachen Reducing Agent. Die Proben wurden auf ein 4 - 12 % NuPage Novex Midi Bis-Tris Gel der Firma Invitrogen aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte bei 100 V. Die anschließende Färbung und Fixierung erfolgte über Nacht durch die Coomassiemischung Instant Blue der Firma expedeon.

Eingangsname	Gensymbol [Ratte]	Protein	TG versus LM			
			Regulation	FC	P-Wert	
1	B0BNN4_RAT	Cfp	Complement factor properdin	↑	10000,0	0,0267
2	CH60_RAT	Hspd1	60 kDa heat shock protein, mitochondrial	↑	10000,0	0,0274
3	D4AB87_RAT	Gstm6l	Protein Gstm6l	↑	10000,0	0,0696
4	PHKG2_RAT	Phkg2	Phosphorylase b kinase gamma catalytic chain, liver/testis isoform	↑	10000,0	0,0696
5	CAH3_RAT	Ca3	Carbonic anhydrase 3	↑	6,2	0,0039
6	ITGBL_RAT	Itgb1	Integrin beta-like protein 1	↑	3,5	0,0288
7	IGF2_RAT	Igf2	Insulin-like growth factor II	↑	2,8	0,0666
8	MYG_RAT	Mb	Myoglobin	↑	2,7	0,0580
9	D3ZE00_RAT	N/A	Ig-like domain-containing protein	↑	2,5	0,0793
10	ZP1_RAT	Zp1	Zona pellucida sperm-binding protein 1	↑	2,2	0,0467
11	Q5I0M1_RAT	Apoh	Apolipoprotein H	↑	2,1	0,0981
12	TPIS_RAT	Tpi1	Triosephosphate isomerase	↑	1,9	0,0262
13	IBP2_RAT	Igfbp2	Insulin-like growth factor-binding protein 2	↑	1,9	0,0314
14	CFAI_RAT	Cfi	Complement factor	↑	1,9	0,0325
15	Q68FY4_RAT	Gc	Group specific component	↑	1,7	0,0004
16	KNT2_RAT	N/A	T-kininogen 2	↑	1,7	0,0162
17	KCRM_RAT	Ckm	Creatine kinase M-type	↑	1,7	0,0652
18	AFAM_RAT	Afm	Afamin	↑	1,6	0,0042
19	KNT1_RAT	Map1	T-kininogen 1	↑	1,6	0,0866

20	FETUB_RAT	Fetub	Fetuin-B	↑	1,5	0,0298
21	PTGDS_RAT	Ptgds	Prostaglandin-H2 D-isomerase	↑	1,4	0,0289
22	CYTC_RAT	Cst3	Cystatin-C	↑	1,3	0,0104
23	HBA_RAT	Hba1	Hemoglobin subunit alpha-1/2	↑	1,2	0,0893
24	APOE_RAT	Apoe	Apolipoprotein E	↓	-1,2	0,0905
25	TRFE_RAT	Tf	Serotransferrin	↓	-1,3	0,0100
26	A2MG_RAT	A2m	Alpha-2-macroglobulin	↓	-1,3	0,0196
27	CO4_RAT	C4	Complement C4	↓	-1,3	0,0541
28	ALBU_RAT	Alb	Serum albumin	↓	-1,3	0,0692
29	CNTN1_RAT	Cntn1	Contactin-1	↓	-1,5	0,0129
30	Q7TP05_RAT	Cfb	Da1-24	↓	-1,7	0,0824
31	CLUS_RAT	Clu	Clusterin	↓	-1,8	0,0183
32	G3V758_RAT	Cntn2	Contactin 2	↓	-1,8	0,0372
33	D3ZQ25_RAT	Fbln1	Fibulin 1	↓	-1,8	0,0626
34	Q8CHN5_RAT	Npc2	Epididymal secretory protein	↓	-2,0	0,0583
35	CATL1_RAT	Ctsl	Cathepsin L1	↓	-2,4	0,0798
36	Q5M7T5_RAT	Serpinc1	Protein Serpinc1	↓	-2,5	0,0345
37	MFGM_RAT	Mfge8	Lactadherin	↓	-2,5	0,0919
38	ANXA2_RAT	Anxa2	Annexin A2	↓	-2,7	0,0384
39	CO1A1_RAT	Col1a1	Collagen alpha-1(I) chain	↓	-2,9	0,0790
40	GGH_RAT	Ggh	Gamma-glutamyl hydrolase	↓	-3,5	0,0714
41	GALNS_RAT	Galns	N-acetylgalactosamine-6-sulfatase	↓	-3,7	0,0275
42	CO9_RAT	C9	Complement component C9	↓	-5,0	0,0926
43	HTRA1_RAT	Htra1	Serine protease HTRA1	↓	-5,0	0,0926
44	NRX3A_RAT	Nrxn3	Isoform 14 of Neurexin-3	↓	-5,1	0,0545
45	PRDX1_RAT	Prdx1	Peroxiredoxin-1	↓	-5,1	0,0545
46	Q5M7T7_RAT	Pla2g7	Phospholipase A2, group VII	↓	-5,5	0,0068
47	ACE_RAT	Ace	Angiotensin-converting enzyme	↓	-6,0	0,0024
48	E9PSP1_RAT	Pltp	Protein Pltp	↓	-6,4	0,0278
49	D3ZFC6_RAT	Itih4	Protein Itih4	↓	-6,7	0,0334
50	FINC_RAT	Fn1	Isoform 4 of Fibronectin	↓	-6,9	0,0020
51	ENPP5_RAT	Enpp5	Ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase family member 5	↓	-7,1	0,0164
52	IGG2A_RAT	Igg-2a	Ig gamma-2A chain C region	↓	-9,3	0,0011
53	HPT_RAT	Hp	Haptoglobin	↓	-10,1	0,0013
54	AT1A1_RAT	Atp1a1	Sodium/potassium-transporting ATPase subunit alpha-1	↓	-11,4	0,0016
55	EZRI_RAT	Ezr	Ezrin	↓	-10000,0	0,0111
56	CBPE_RAT	Cpe	Carboxypeptidase E	↓	-10000,0	0,0130
57	G3V8M6_RAT	Folr1	Folate receptor 1 (Adult), isoform CRA_b	↓	-10000,0	0,0167
58	D3ZD31_RAT	Mrc1	Mannose receptor, C type 1 (Predicted)	↓	-10000,0	0,0283

59	AT2B3_RAT	Atp2b3	Isoform ZF of Plasma membrane calcium-transporting ATPase 3	↓	-10000,0	0,0283
60	Q6AYQ9_RAT	Ppic	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	↓	-10000,0	0,0317
61	GRP78_RAT	Hspa5	78 kDa glucose-regulated protein	↓	-10000,0	0,0338
62	LAMP1_RAT	Lamp1	Lysosome-associated membrane glycoprotein 1	↓	-10000,0	0,0338
63	ANXA6_RAT	Anxa6	Annexin A6	↓	-10000,0	0,0338
64	IRK13_RAT	Kcnj13	Inward rectifier potassium channel 13	↓	-10000,0	0,0364
65	AQP1_RAT	Aqp1	Aquaporin-1	↓	-10000,0	0,0364
66	E9PTX9_RAT	Slc12a2	Protein Slc12a2	↓	-10000,0	0,0627
67	F7EUB6_RAT	Fga	Fibrinogen alpha chain	↓	-10000,0	0,0627
68	D3ZUM4_RAT	Glb1	Beta-galactosidase	↓	-10000,0	0,0627
69	NPTX1_RAT	Nptx1	Neuronal pentraxin-1	↓	-10000,0	0,0627
70	NRCAM_RAT	Nrcam	Isoform 2 of Neuronal cell adhesion molecule	↓	-10000,0	0,0627

Tabelle 14: Proteomanalyse im Liquor von tgDISC1-Ratten und deren Wurfgeschwister mit gepoolten Liquorproben

Die Proteomanalyse der Liquorproben erfolgte erneut durch das OncoProteomics Laboratory (OPL), des VUmc (Vrije Universiteit Medical Center, Amsterdam). Durch einen *beta binominal tests* (Pham et al., 2010) wurde der differenzierte Proteingehalt ermittelt. Der *Fold Change* (FC) zeigt das Verhältnis zwischen dem Proteingehalt in den Proben der transgenen DISC1 Ratten (TG) und den Proben der nicht transgenen Wurfgeschwister (LM) an. Ein FC von 10000,0 indiziert den alleinigen Proteinnachweis in einer der beiden zu differenzierenden Gruppen an. Der Pfeil nach unten, steht für einen reduzierten Proteinnachweis. Der Pfeil nach oben steht für einen erhöhten Proteinnachweis. In der Tabelle aufgeführt werden alle Proteine $p < 0,1$. Die grau hinterlegten Proteine fanden sich in beiden Analysen wieder. Die kursiv gedruckten Proteine fanden sich aufgrund einer erfolgreichen Depletion nicht in der ersten Analyse.

In beiden Runden konnten einzelne Kandidaten Proteine für DISC1opathien identifiziert werden. Trotzdem war die Überschneidung (Ca3, Mb, Ckm, Apoe) der identifizierten Proteine beider Analysen nicht besonders groß. Einige Proteine (Mfge8, Anxa6, Cpe) konnten zwar in beiden Analysen identifiziert werden, jedoch mit umgekehrtem *Fold Change*, sodass eine Tendenz der Expressionsrate nicht verifiziert werden konnte. Die Identifikation von herkömmlichen Proteinen wie Serotransferrin, Albumin und Haptoglobin, im zweiten Experimentenaufbau impliziert eine ineffektivere Depletion der gepoolten Proben als bei der Analyse einzelner Liquorproben. Unsere Hypothese, dass ein Poolen der Proben zu reduzierter Probenvariation führt, wurde durch die reduzierte Anzahl von 350 identifizierten Liquorproteinen im zweiten Experimentenaufbau bestätigt. Die erhöhte Anzahl von 77 Liquorproteinen mit $p < 1$ spricht für eine erhöhte Signifikanz der analysierten Proteine. Jedoch legt die Identifizierung von in der ersten Analyse erfolgreich depletierter Proteine eine ineffiziente Depletierung im zweiten Experimentenaufbau nahe, wodurch unspezifische Proteine möglicherweise die Analyse von unspezifischen überdeckt hat.

3.6 Volumetrische Analyse der intrazerebralen Ventrikel transgener DISC1-Ratten

Mittels MRT erfolgte eine volumetrische Analyse der intrazerebralen Ventrikelgröße der tgDISC1-Ratten im Vergleich zu nicht transgenen Wurfgeschwistern als Kontrolle. Unserer Hypothese nach weisen tgDISC1-Ratten ein insgesamt vergrößertes Ventrikelvolumen als die nicht transgenen Kontrollen auf. Diese Hypothese bestätigte sich und die transgenen DISC1 Ratten zeigten mit $20,75 \pm 2,5 \text{ mm}^3$ einen starken Trend ($p = 0,052$) zur Vergrößerung des intrazerebralen Ventrikelvolumens gegenüber dem der Negativkontrollen durch nicht transgene Wurfgeschwister mit $15,54 \pm 0,9 \text{ mm}^3$.

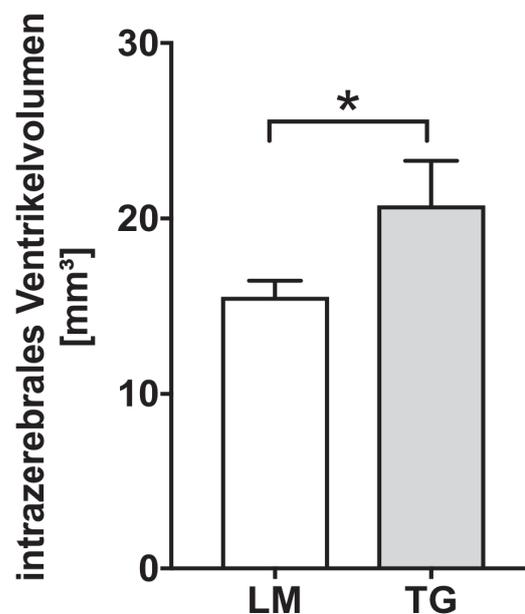


Abbildung 12: Intrazerebrales Ventrikelvolumen

Die Analyse des intrazerebralen Ventrikelvolumens erfolgte mittels MRT. Transgene DISC1 Ratten (TG, n = 8) zeigten ein signifikant vergrößertes ($p = 0,052$) totales Ventrikelvolumen gegenüber den *littermates* (LM, n = 10).

4 Diskussion

Im Rahmen dieser Arbeit wurde mittels revers-translationaler Medizin ein transgenes Rattenmodell zur Identifizierung von Biomarkern für eine Subgruppe schizophrener Patienten untersucht. Biomarker dienen nicht nur als objektive Diagnostikkriterien und Prognosemarkern, sondern dienen auch der Entwicklung gezielter Therapien.

Hierfür wurden sowohl PBMC, Liquor als auch hirmorphologische Auffälligkeiten mittels Kernspintomographie von tgDISC1-Ratten und deren Wurfgeschwister analysiert.

Die wesentlichen Ergebnisse dieser Arbeit sind:

1. Es erfolgte eine Genexpressionsanalyse von tgDISC1-Ratten und ihren nicht-transgenen Wurfgeschwister. Hierfür wurden zunächst mononukleäre Zellen des peripheren Blutes isoliert, RNA extrahiert und anschließend eine Micoarray-Analyse durchgeführt. Es zeigte sich ein verändertes Genexpressionsmuster in PBMC tgDISC1-Ratten gegenüber ihren nicht transgenen Wurfgeschwister.
2. Es erfolgte eine Expressionsanalyse einiger in Punkt 1 identifizierten Kandidatengene in mononukleäre Zellen des peripheren Blutes von schizophrenen Patienten. Hier zeigte sich ein ähnlich verändertes Genexpressionsmuster.
3. Mittels SDS-Gelelektrophorese und Western Blot lässt sich DISC1 im Liquor von tgDISC1-Ratten nachweisen, was eine intrazerebrale DISC1-Ausscheidung über den Liquor nahelegt.
4. Mithilfe der GeLC-MS/MS Methode konnte ein verändertes intrathekales Proteom in tgDISC1-Ratten gegenüber dem ihrer nicht transgenen Wurfgeschwister festgestellt werden und einzelne Kandidatenproteine identifiziert werden.
5. Es erfolgte eine volumetrische Analyse des intrazerebralen Ventrikelvolumens transgener DISC1 Ratten und deren nicht transgenen Wurfgeschwistern. Hier zeigte sich eine Vergrößerung des Ventrikelvolumen in tgDISC1-Ratten, wie sie auch in schizophrenen Patienten zu finden ist und somit eine Übereinstimmung eines phänotypischen Merkmals darstellt.

4.1 Genexpressionsanalyse von PBMC transgener DISC1 Ratten und schizophrener Patienten

Mit dem Ziel einen molekularen Biomarker für DISC1opathien zu finden, analysierten wir PBMCs transgener DISC1 Ratten und deren Wurfgeschwistern mittels Genexpressionsanalyse.

In tgDISC1-Ratten ließen sich mittels Affymetrix GeneChip® Microarrays eine Reihe von Genen mit signifikanter Expressionsdifferenz nachweisen, deren Ergebnisse wir anschließend mittels qPCR validierten konnten.

Da vier der Top 20 Gene, *Rgs1*, *Ccl4*, *Il12rb2* und *Ifng*, vor allem in T-, und NK-Zellen exprimiert werden, wäre auch eine generelle Fehlregulation immunregulierender Zellen in tgDISC1-Ratten möglich. Dies konnte jedoch im Anschluss an diese Arbeit mittels Durchflusszytometrie ausgeschlossen werden (Trossbach et al., 2019). Es konnte zwar eine Vermehrung von T-Zellen und eine signifikant erhöhte Expression von Cd3g, einem T-Zell Marker, in PBMCs von tgDISC1-Ratten nachgewiesen werden, jedoch zeigte sich keine Korrelation zwischen der Expressionshöhe von Cd3g und *Rgs1* oder *Ccl4*.

Mittels WGCNA“ (*Weighted Gene Co-expression Network Analysis*), einem von Langfelder und Horvath entwickelten Skript (Langfelder and Horvath, 2008), erfolgte die Konstruktion gewichteter Netzwerke der normalisierten Affymetrix Genexpressionsdaten. Unter den 104 konstruierten Modulen, zeigten 10 Module eine signifikante ($p < 0,05$) Veränderung der Netzwerktopographie in tgDISC1-Ratten. In dem Modul *hotpink4*, mit der höchsten Korrelation von $\rho = 0.7429$, bei einer Signifikanz von $p = 0,0056$, konnten die beiden Kandidatengene *Rgs1* und *Ccl4* als sogenannte *Hub*-Gene identifiziert werden. *Hubs* sind die zentralen Knotenpunkte eines Netzwerkes, welche am stärksten im Netzwerk verknüpfte sind und somit einen Hinweis für eine wichtige biologische Funktion im Netzwerk geben. Zusammenfassend konnte eine spezifische Dysregulation eines Netzwerkes aus immunvermittelten Genen ermittelt werden, welches die beiden Gene *Rgs1* und *Ccl4*, mit dem höchsten FC, im Zentrum der Interaktion hat.

Nach der Identifizierung eines veränderten Genexpressionsmusters in tgDISC1-Ratten zeigte sich auch in schizophrenen Patienten ein ähnlich verändertes Expressionsmuster. Insbesondere die beiden Top-Kandidatengene *RGS1* und *CCL4*, aber auch einige der anderen Gene, zeigten ein reduzierte Expressionsrate, ähnlich dem der in tgDISC1-Ratten gefundenen Expressionsmuster.

Eine Genexpressionsanalyse mittels qPCR an einer zweiten Patientengruppe mit der Diagnose Schizophrenie, aus der Ludwig-Maximilians-Universität (LMU) in München bestätigte ebenfalls das in dieser Arbeit identifizierte veränderte Genexpressionsmuster.

Auch hier zeigte sich eine signifikant verminderte Expression der vielversprechendsten Kandidatengene *RGS1* und *CCL4* sowie weiterer Kandidatengene (Trossbach et al., 2019).

Bereits im Vorfeld dieser Arbeit konnten in schizophrenen Patienten Veränderungen von DISC1 Proteinlevels nachgewiesen werden (Trossbach et al., 2014), was für die weitere Analysen von DISC1 spezifischen molekularen Veränderungen zur Identifizierung eines Biomarkers für schizophrene Patienten signifikant ist.

Wie in der Einleitung schon beschrieben ist neben der gut reproduzierbaren Materialgewinnung die diagnostische Accuracy ein wesentlicher Aspekt für den klinischen Nutzen von Biomarkern. Idealerweise sollte eine hohe Sensitivität als auch Spezifität erreicht werden, welche vor allem bei einer derart heterogenen Gruppe von schizophrenen Patienten durch die Kombination von zwei Markern zu erreichen ist. Im Anschluss an diese Arbeit konnte für die Marker Kombination der beiden Top-Kandidatengen *RGS1* und *CCL4* eine Spezifität von 97% bei einer Sensitivität von 27% ermittelt werden, sodass circa ein Viertel der Patientenkohorte mit dieser Marker Kombination identifiziert werden konnte (Trossbach et al., 2019). Dies legt die Überlegung nahe, dass die Kombination von *RGS1* und *CCL4* für eine Subgruppe von schizophrenen Patienten zutrifft. Aufgrund einer umfangreichen Phänotypisierung der zweiten Patientenkohorte, inklusiver Testung der kognitiver Fähigkeiten mittels *Verbal Learning and Memory Test* (VLMT) (Muller et al., 1997), zwei Teiltests des Hamburg–Wechsler Intelligenztests, *Digit Symbol Substitution Test* (DSST) und *Digit Symbol Substitution Test* (DSST)) (Tewes, 1994) und dem *Trial Making Test A and B* (TMT-A, TMT-B) (Tombaugh, 2004), sowie der Ermittlung der aktuellen Symptomlast anhand des PANSS, der aktuellen Medikation, der medizinischen Vorgeschichte sowie der demographischen Daten, gelang eine Zuteilung der Marker Kombination zu spezifischen Subgruppen. So konnte im Anschluss an diese Arbeit für eine Subgruppe von schizophrenen Patienten (27%), die einen späteren Krankheitsbeginn und einen niedrigen PANSS Score aufwiesen, eine spezifische Dysregulation immunvermittelter Gene mittels der Marker Kombination von *RGS1* und *CCL4* ermittelt werden (Trossbach et al., 2019). Zudem zeigte sich in der Patientengruppe der *RGS1* und *CCL4* positiven Patienten häufiger eine Clozapin Therapie (Trossbach et al., 2019), was für eine Therapieresistenz gegenüber der sonst üblichen reinen Dopaminantagonisten Therapie spricht (Sinclair and Adams, 2014).

Ob die Dysregulation immunvermittelter Gene in der Subgruppe von *RGS1/CCL4*-positiven Patienten aufgrund einer Fehlfaltung von DISC1 oder durch einer veränderte Regulationsfunktion des Proteins, entweder direkt oder immunvermittelt, zustande kommt, ist bislang unklar. Hierfür wäre eine *post mortem* Untersuchung mittels biochemischer Fraktionierung unlöslicher DISC1 Proteine der Marker-positiven Patienten notwendig (Leliveld et al., 2008). In jedem Fall spricht die gravierende Dysregulation des Netzwerkes

bei relativ moderater *DISC1* Überexprimierung für eine regulierende Rolle von *DISC1* in neuroimmunologischen Abläufen, neben seiner bereits bekannten Rolle in der neurologischen Entwicklung und synaptischer Funktionen (Brandon and Sawa, 2011) *RGS1*, ein Regulator des G-Protein Signalweges, ist ein Transkript des Chromosoms 1q31, welches sich auf der zytosolischen Seite der inneren Plasmamembran befindet. Es ist das einzige der Affymetrix Genexpressionsdaten, welches im Gehirn, in den Mikrogliazellen, exprimiert wird. *RGS1* wurde bereits mit chronischen mentalen Erkrankungen, v.a depressiven Erkrankungen und Angststörungen, in Verbindung gebracht (Hetteema et al., 2013). Eine direkte Assoziation zu Schizophrenie ist bislang nicht berichtet. Für *RGS4*, ebenfalls ein Regulationsprotein des G-Protein-Signalweges kodierendes Gen, wenn auch mit wenigen überlappenden konservierten Regionen mit *RGS1*, wurde ein Zusammenhang mit Schizophrenie bereits publiziert (Schwarz, 2018). Einzelnukleotid-Polymorphismen von *RGS1* wurden im Zusammenhang mit Multiple Sklerose, einer autoimmun, chronisch-entzündlichen Erkrankung des Zentralnervensystems, in Verbindung gebracht (Johnson et al., 2010) (International Multiple Sclerosis Genetics, 2010)

Da *RGS1* jedoch auch in Zusammenhang bei Erkrankungen außerhalb es Spektrum chronischen mentaler Erkrankungen, wie Melanomen (Rangel et al., 2008) und Spondylarthritis (Gu et al., 2009) als prognostischer Marker berichtet wurde, scheint eine Kombination mit einem weiteren Marker, wie *CCL4* für die Etablierung eines Biomarkers erneut sinnvoll.

CCL4 wird vor allem NK-, CD8+T-Zellen und CD14+ Monozyten exprimiert, welche in der zweiten Patientenkohorte der LMU ebenfalls reduziert waren. Zudem ergab eine Kovarianzanalyse einen signifikanten Einfluss von NKp46 auf die Expression von *CCL4*., sodass insgesamt nicht sicher belegt werden kann, ob der reduzierte *CCL4* Nachweis in der Genexpressionsanalyse durch eine tatsächliche Suppression der Expression oder durch eine generelle Reduktion der exprimierenden Zellen zustande kommt. Zwar konnten Karpiński und Kollegen ebenfalls eine Reduktion von NK-Zellen in schizophrenen Patienten nachweisen (Karpinski et al., 2016), jedoch ist es fraglich, ob sie mit 10% der PBMCs einen signifikanten Einfluss auf die *CCL4* Expression haben, während CD8+T T Zellen und CD14+ Monozyten, in denen *CCL4* ebenfalls exprimiert werden, jeweils 30 bzw. 20% der PBMCs ausmachen (Burel et al., 2017). Zudem zeigte ließ dich keine Reduktion der NK-Zellen in tg*DISC1*-Ratten nachweisen, während wir auch hier reduzierte *CCL4* Expressionsraten detektierten.

Zusammenfassend gelang es uns in dieser mittels revers-translationaler Medizin den Grundstein zur Definition einer Subgruppe von schizophrenen Patienten mit einer spezifischen Dysregulation immunvermittelter Zellen zu legen

Die molekularen Einzelheiten der DISC1 abhängigen Signalwege und deren Beeinflussung auf immunregulierende Gene muss noch weiter untersucht werden.

Zur Untersuchung der *Accuracay* der Markerkombination *RGS1/CCL4* sollte auch eine Untersuchung weiterer chronischen mentaler Erkrankungen erfolgen. Dies scheint besonders wichtig im Hinblick auf die mögliche Pleiotropie von DISC1

4.2 Liquoranalyse durch Western Blot

Mittels SDS-Gelelektrophorese und Western Blot konnten wir DISC1 im Liquor von tgDISC1-Ratten nachweisen und somit einen wichtigen Bedingungsfaktor für die folgende Liquor-Proteomik-Analysen tgDISC1-Ratten erfüllen. Der Nachweis von DISC1 im Liquor von tgDISC1-Ratten erhärtet unsere Hypothese, dass DISC1 Einfluss auf das intrathekale Proteom hat und Liquor somit als Biomarker in der Schizophrenie Diagnostik eine Rolle spielen könnte. Der Nachweis von DISC1 im Liquor von tgDISC1-Ratten mittels SDS-Gelelektrophorese und Western Blot ist bislang nicht publiziert.

4.3 GeLC-MS/MS basierte Proteomic-Analyse

Mittels GeLC-MS/MS konnten wir einige interessante Kandidatenproteine hinsichtlich eines veränderten intrathekalen Proteoms von tgDISC1 ermitteln. Trotz einer insuffizienten Albumin Depletion im zweiten Experiment, konnten einige Überlappungen (Ca3, Mb, Ckm, Apoe) beider Experimente gefunden werden. Die üblichen Protokolle zur Albumin Depletion von Liquorproben sind auf humane Proben und somit auf größere Volumina ausgelegt. Der Mangel an verfügbaren Protokollen für Ratten Liquor führte uns zu zwei verschiedenen Experimentaufbauten, aus deren Ergebnissen wir den Schluss ziehen, dass eine Untersuchung individueller Proben zu einer besseren Albumin Depletion und somit zu einem spezifischeren Ergebnis führen. Trotzdem sollte auch diese Albumin Depletion für eine größere Reliabilität noch weiterentwickelt und verbessert werden.

In beiden Analysen wurde ein reduzierter Nachweis (1. Analyse: $p = 0,057$; 2. Analyse: $p = 0,091$) von Apolipoprotein E (ApoE) in tgDISC1-Ratten im Vergleich zu deren nicht transgenen Wurfgeschwistern ermittelt. Apolipoproteine dienen im Körper als Lipidtransporter und haben eine wichtige Rolle im Fettstoffwechsel. Dysregulationen der Apolipoproteine sind mit zahlreichen kardiovaskulären Krankheiten als auch dem

metabolischen Syndrom und Diabetes mellitus 2 assoziiert ApoE ist das wichtigste Lipidprotein im Gehirn und der Haupttransporter von Cholesterin, einem essentiellen Baustein von Myelin und Steroidhormonen, im Gehirn, wodurch es in zahlreiche komplexe biologische Prozesse wie auch der intrazellulären und extrazellulären Signalübertragung, immunregulatorische Prozesse und der Zellproliferation involviert ist. Es wird hauptsächlich in Astrozyten, Microglia, Gefäßwänden und in Zellen des Plexus Choroideus synthetisiert (Yamazaki et al., 2019). Das Vorkommen von ApoE-Polymorphismen stellt einen Risikofaktor für *late-onset* Alzheimer-Erkrankungen dar (Yamazaki et al., 2019). Dysregulationen von Apolipoproteinen im Serum (Levin et al., 2010) als auch im Liquor (Huang et al., 2008) schizophrener Patienten wurden bereits zuvor berichtet. Wechselnde Berichte in der Literatur zwischen erhöhten und erniedrigten Proteinlevels legten bereits zuvor die Hypothese nahe, dass Apolipoproteine auch durch antipsychotische Medikamente beeinflusst werden. Dean und Kollegen konnten zeigen, dass ApoE in unbehandelten schizophrenen Patienten, kongruent zu unseren Ergebnissen, erniedrigt ist, während Patienten, die Stimmungsaufheller erhielten, erhöhte Serumspiegel aufweisen (Dean et al., 2008).

Auch die Carbonanhydrase 3 (Ca3) wurde in beiden Experimenten $p = 0,008$ bzw. $p = 0,004$ in einem signifikant erhöhten Level identifiziert. Die Ca3 ist bislang vor allem mit neuromuskulären Erkrankungen wie der Myasthenia gravis oder Muskeldystrophien assoziiert. Eine Erhöhung der Carbonanhydrase 1 (Ca1), welche im ersten Experiment mit einem FC von 10000,0 auch signifikant erhöht $p = 0,0254$ war, ist jedoch bereits mit psychiatrischen Erkrankungen assoziiert. Johnston-Wilson und Kollegen berichten von einer signifikanten Ca1 Erhöhung im frontalen Kortex depressiver Patienten (Johnston-Wilson et al., 2000). Dies ist besonders interessant vor dem Hintergrund, dass bereits zuvor berichtet wurde, dass Carbonanhydrase Hemmer als antipsychotische Substanzen dienen, was eine Involvierung der Proteine in die Pathophysiologie psychiatrischer Erkrankungen impliziert (Erzengin et al., 2014, Hayes, 1994)

Insgesamt fielen in dieser Studie drei verschiedene Annexine auf, welche mit einer Signifikanz von $p < 0,1$, veränderte Proteinlevels in tgDISC1-Ratten, im Vergleich zu deren Wurfgeschwister zeigten. Annexine sind eine Gruppe von Proteinen, Annexin A1-A11 und A13 (Gerke and Moss, 2002), die als wichtiger Bestandteil der kalziumabhängigen Membrankanälen, durch zahlreiche zelluläre Funktionen, die Antikoagulation, Endozytose, Exozytose, Signaltransduktion, zelluläre Proliferation und Apoptose involvierend (Mussunoor and Murray, 2008, Ernst et al., 1990, Comera et al., 1989, Moss and Morgan, 2004), Teil der Zellreperaturmechanismen sind. In unserem ersten Experiment konnte mit

einem FC von 10000 ein erhöhtes Level von Annexin A6 (Anxa6) ($p = 0,0900$) und Annexin A4 (Anxa4) ($p = 0,0876$) festgestellt werden. Im zweiten Experiment zeigte sich ein reduziertes Proteinlevel für Anxa6 mit einem FC von -10000 und $p = 0,0338$, sodass das Ergebnis für Anxa6 nicht reproduziert werden konnte, jedoch in beiden Fällen eine Dysregulation in den tgDISC1-Ratten vorlag. Ein weiteres Annexin Protein, Annexin A2 (Anxa2) zeigte sich in dem zweiten Experiment in reduzierter Menge mit einem FC von -2,7 und $p = 0,0384$. Bisher ist ein Zusammenhang von psychiatrischen Erkrankungen mit Anxa4 und Anxa6 noch nicht bekannt. Dysregulationen von Anxa2 wurden als p11/Anxa2 Komplex, ein Komplex mit dem Protein S100A10 (p11), bereits in der Literatur mit depressiven Erkrankungen, bipolarer Störung und PTSD (*posttraumatic stress disorder* = posttraumatische Belastungsstörung) assoziiert (Su et al., 2009, Jin et al., 2019, Milosevic et al., 2017). Eine Studie von Joaquim und Kollegen, identifizierte mittels Western Blot Analyse signifikant reduzierte Proteinlevels von Annexin A3 (Anxa3) im Blut schizophrener Patienten im Vergleich zu bipolaren Patienten und der Kontrollgruppe (Joaquim et al., 2019). Wie bereits in der Einleitung berichtet, beruht das Konzept der DISC1opathien auf einer Proteinfehlfaltung und -Akkumulation des Proteins DISC1, welches eine tragende Rolle in der Zellproliferation und intra- wie extrazellulären Signalübertragung hat, alles Mechanismen bei denen Annexine bereits in Verbindung gebracht wurden.

Zusammenfassend stellt die Liquor-Proteomik-Analyse ein interessantes, noch weiter ausbaubares Verfahren, zur Identifizierung möglicher Biomarker von DISC1opathien und zum Verständnis der Pathophysiologie einer Untergruppe schizophrener Patienten dar. Um dieses Verfahren fortzuführen, ist zunächst eine Verbesserung der Protein-Depletions - Methode zur Etablierung eines standardisierten Protokolls wichtig, welches auch für die kleinen Volumina von Rattenliquor geeignet ist. Zudem wäre eine Wiederholung des Experimentes mit einzelnen Liquorproben, ohne Pooling, bei einer erhöhten Probenanzahl sinnvoll, sowie eine Verifizierung der Proben mittels Western-Blot Analyse. Die Schwierigkeit dieses Verfahrens liegt in dem limitierten Probenmaterial einzelner Versuchstiere. Dennoch zeigt diese Studie, dass tgDISC1-Ratten ein verändertes intrathekales Proteom aufweisen und weitere Studien zur Vertiefung vielversprechend sind.

4.4 Volumetrische Analyse der intrazerebralen Ventrikel transgener DISC1-Ratten

Wir konnten in dieser Arbeit zeigen, dass tgDISC1-Ratten im Vergleich zu ihren nicht transgenen Wurfgeschwistern, kongruent zu ca 80% der vorherigen MR-Studien bei schizophrenen Patienten (van Haren et al., 2008, Berger et al., 2017, Rimol et al., 2010, Shenton et al., 2001) und DISC1 Mäusen (Pletnikov et al., 2008, Hikida et al., 2007), ein signifikant erweitertes Ventrikelvolumen aufweisen.

Auch wenn die Ventikelerweiterung kein spezifisches Symptom ist, so gehört es doch zu den am häufigsten replizierten Befunden in der Literatur die Neurophysiologie schizophrener Patienten. Eine Vergrößerung des Ventrikelvolumens legt eine Reduktion des Hirnvolumens nahe. Im Anschluss an diese Arbeit zeigte sich mittels automatischer Voxelmessung *tensor-based morphometry* (TBM) ein Trend zur Corpus-Callosum- und Capsula-Externa-Hypoplasie sowie eine Hippocampus-Hyperplasie in tgDISC1-Ratten, welcher anschließend, durch mikroskopische Volumenanalyse *post mortem*, bestätigt werden konnte (Hamburg et al., 2016). Del Re und Kollegen konnten 2016 passend dazu eine Korrelation zwischen dem Ventrikelvolumen und Corpus Callosum Volumen in schizophrenen Patienten nachweisen, welche in gesunden Kontrollen nicht zu sehen war (Del Re et al., 2016).

Ein limitierender Faktor dieser Ergebnisse ist die, wenn auch verblindete, manuelle Markierung der Pixel in jedem einzelnen Schnittbild hinsichtlich ihrer anatomischen Zugehörigkeit welche für die anschließende, automatisierte 3D Rekonstruktion und darauf basierende Volumenbestimmung ausschlaggebend ist.

Zusammenfassend unterstützt der Befund struktureller Hirnveränderungen bei schizophrenen Patienten die Hypothese einer veränderten Hirnentwicklung bei einer Subgruppe von schizophrenen Patienten und ist ein weiterer Fortschritt hinsichtlich des Verständnisses der Neuropathologie von Schizophrenie und DISC1opathien im Besonderen. Als Biomarker, im Sinne einer Differenzierung zwischen kranken und gesunden Patienten, reichen die bislang recht unspezifischen MR-Veränderung jedoch nicht aus.

5 Literatur- und Quellenverzeichnis

- AROLT, V. O., P; ROTHERMUNDT, M. 2006. Schizophrenie und verwandte Störungen - Neurobiologie. *Neurobiologie psychischer Störungen*. Föstl, Hautzinger, Roth ed. Heidelberg: Springer.
- BERGER, G. E., BARTHOLOMEUSZ, C. F., WOOD, S. J., ANG, A., PHILLIPS, L. J., PROFFITT, T., BREWER, W. J., SMITH, D. J., NELSON, B., LIN, A., BORGWARDT, S., VELAKOULIS, D., YUNG, A. R., MCGORRY, P. D. & PANTELIS, C. 2017. Ventricular volumes across stages of schizophrenia and other psychoses. *Aust N Z J Psychiatry*, 51, 1041-1051.
- BLACKWOOD, D. H., FORDYCE, A., WALKER, M. T., ST CLAIR, D. M., PORTEOUS, D. J. & MUIR, W. J. 2001. Schizophrenia and affective disorders--cosegregation with a translocation at chromosome 1q42 that directly disrupts brain-expressed genes: clinical and P300 findings in a family. *Am J Hum Genet*, 69, 428-33.
- BRADSHAW, N. J. & KORTH, C. 2019. Protein misassembly and aggregation as potential convergence points for non-genetic causes of chronic mental illness. *Mol Psychiatry*, 24, 936-951.
- BRADSHAW, N. J., OGAWA, F., ANTOLIN-FONTES, B., CHUBB, J. E., CARLYLE, B. C., CHRISTIE, S., CLAESSENS, A., PORTEOUS, D. J. & MILLAR, J. K. 2008. DISC1, PDE4B, and NDE1 at the centrosome and synapse. *Biochem Biophys Res Commun*, 377, 1091-6.
- BRANDON, N. J. & SAWA, A. 2011. Linking neurodevelopmental and synaptic theories of mental illness through DISC1. *Nat Rev Neurosci*, 12, 707-22.
- BUREL, J. G., QIAN, Y., LINDESTAM ARLEHAMN, C., WEISKOPF, D., ZAPARDIEL-GONZALO, J., TAPLITZ, R., GILMAN, R. H., SAITO, M., DE SILVA, A. D., VIJAYANAND, P., SCHEUERMANN, R. H., SETTE, A. & PETERS, B. 2017. An Integrated Workflow To Assess Technical and Biological Variability of Cell Population Frequencies in Human Peripheral Blood by Flow Cytometry. *J Immunol*, 198, 1748-1758.
- CALABRESI, P., PICCONI, B., TOZZI, A., GHIGLIERI, V. & DI FILIPPO, M. 2014. Direct and indirect pathways of basal ganglia: a critical reappraisal. *Nat Neurosci*, 17, 1022-30.
- CAMARGO, L. M., COLLURA, V., RAIN, J. C., MIZUGUCHI, K., HERMJAKOB, H., KERRIEN, S., BONNERT, T. P., WHITING, P. J. & BRANDON, N. J. 2007. Disrupted in Schizophrenia 1 Interactome: evidence for the close connectivity of risk genes and a potential synaptic basis for schizophrenia. *Mol Psychiatry*, 12, 74-86.
- CLAVAGUERA, F., BOLMONT, T., CROWTHER, R. A., ABRAMOWSKI, D., FRANK, S., PROBST, A., FRASER, G., STALDER, A. K., BEIBEL, M., STAUFENBIEL, M., JUCKER, M., GOEDERT, M. & TOLNAY, M. 2009. Transmission and spreading of tauopathy in transgenic mouse brain. *Nat Cell Biol*, 11, 909-13.
- COMERA, C., ROTHHUT, B., CAVADORE, J. C., VILGRAIN, I., COCHET, C., CHAMBAZ, E. & RUSSO-MARIE, F. 1989. Further characterization of four lipocortins from human peripheral blood mononuclear cells. *J Cell Biochem*, 40, 361-70.
- COUGHLIN, J. M., ISHIZUKA, K., KANO, S. I., EDWARDS, J. A., SEIFUDDIN, F. T., SHIMANO, M. A., DALEY, E. L., ZANDI, P. P., LEWEKE, F. M., CASCELLA, N. G., POMPER, M. G., YOLKEN, R. H. & SAWA, A. 2013. Marked reduction of soluble superoxide dismutase-1 (SOD1) in cerebrospinal fluid of patients with recent-onset schizophrenia. *Mol Psychiatry*, 18, 10-1.

- DEAN, B., DIGNEY, A., SUNDRAM, S., THOMAS, E. & SCARR, E. 2008. Plasma apolipoprotein E is decreased in schizophrenia spectrum and bipolar disorder. *Psychiatry Research*, 158, 75-78.
- DEL RE, E. C., KONISHI, J., BOUIX, S., BLOKLAND, G. A., MESHOLAM-GATELY, R. I., GOLDSTEIN, J., KUBICKI, M., WOJCIK, J., PASTERNAK, O., SEIDMAN, L. J., PETRYSHEN, T., HIRAYASU, Y., NIZNIKIEWICZ, M., SHENTON, M. E. & MCCARLEY, R. W. 2016. Enlarged lateral ventricles inversely correlate with reduced corpus callosum central volume in first episode schizophrenia: association with functional measures. *Brain Imaging Behav*, 10, 1264-1273.
- DESPLATS, P., LEE, H. J., BAE, E. J., PATRICK, C., ROCKENSTEIN, E., CREWS, L., SPENCER, B., MASLIAH, E. & LEE, S. J. 2009. Inclusion formation and neuronal cell death through neuron-to-neuron transmission of alpha-synuclein. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106, 13010-5.
- DO CARMO, S. & CUELLO, A. C. 2013. Modeling Alzheimer's disease in transgenic rats. *Mol Neurodegener*, 8, 37.
- DUAN, X., CHANG, J. H., GE, S., FAULKNER, R. L., KIM, J. Y., KITABATAKE, Y., LIU, X. B., YANG, C. H., JORDAN, J. D., MA, D. K., LIU, C. Y., GANESAN, S., CHENG, H. J., MING, G. L., LU, B. & SONG, H. 2007. Disrupted-In-Schizophrenia 1 regulates integration of newly generated neurons in the adult brain. *Cell*, 130, 1146-58.
- ENOMOTO, A., ASAI, N., NAMBA, T., WANG, Y., KATO, T., TANAKA, M., TATSUMI, H., TAYA, S., TSUBOI, D., KURODA, K., KANEKO, N., SAWAMOTO, K., MIYAMOTO, R., JIJIWA, M., MURAKUMO, Y., SOKABE, M., SEKI, T., KAIBUCHI, K. & TAKAHASHI, M. 2009. Roles of disrupted-in-schizophrenia 1-interacting protein girdin in postnatal development of the dentate gyrus. *Neuron*, 63, 774-87.
- ERLENMEYER-KIMLING, L., SQUIRES-WHEELER, E., ADAMO, U. H., BASSETT, A. S., CORNBLATT, B. A., KESTENBAUM, C. J., ROCK, D., ROBERTS, S. A. & GOTTESMAN, II 1995. The New York High-Risk Project. Psychoses and cluster A personality disorders in offspring of schizophrenic parents at 23 years of follow-up. *Arch Gen Psychiatry*, 52, 857-65.
- ERNST, J. D., HOYE, E., BLACKWOOD, R. A. & JAYE, D. 1990. Purification and characterization of an abundant cytosolic protein from human neutrophils that promotes Ca²⁺(+)-dependent aggregation of isolated specific granules. *J Clin Invest*, 85, 1065-71.
- ERZENGIN, M., BILEN, C., ERGUN, A. & GENCER, N. 2014. Antipsychotic agents screened as human carbonic anhydrase I and II inhibitors. *Arch Physiol Biochem*, 120, 29-33.
- GERKE, V. & MOSS, S. E. 2002. Annexins: from structure to function. *Physiol Rev*, 82, 331-71.
- GU, J., WEI, Y. L., WEI, J. C., HUANG, F., JAN, M. S., CENTOLA, M., FRANK, M. B. & YU, D. 2009. Identification of RGS1 as a candidate biomarker for undifferentiated spondylarthritis by genome-wide expression profiling and real-time polymerase chain reaction. *Arthritis Rheum*, 60, 3269-79.
- HAMBURG, H., TROSSBACH, S. V., BADER, V., CHWIESKO, C., KIPAR, A., SAUVAGE, M., CRUM, W. R., VERNON, A. C., BIDMON, H. J. & KORTH, C. 2016. Simultaneous effects on parvalbumin-positive interneuron and dopaminergic system development in a transgenic rat model for sporadic schizophrenia. *Sci Rep*, 6, 34946.
- HARRISON, P. J. & OWEN, M. J. 2003. Genes for schizophrenia? Recent findings and their pathophysiological implications. *Lancet*, 361, 417-9.

- HAYASHI-TAKAGI, A., TAKAKI, M., GRAZIANE, N., SESHADRI, S., MURDOCH, H., DUNLOP, A. J., MAKINO, Y., SESHADRI, A. J., ISHIZUKA, K., SRIVASTAVA, D. P., XIE, Z., BARABAN, J. M., HOUSLAY, M. D., TOMODA, T., BRANDON, N. J., KAMIYA, A., YAN, Z., PENZES, P. & SAWA, A. 2010. Disrupted-in-Schizophrenia 1 (DISC1) regulates spines of the glutamate synapse via Rac1. *Nat Neurosci*, 13, 327-32.
- HAYES, S. G. 1994. Acetazolamide in bipolar affective disorders. *Ann Clin Psychiatry*, 6, 91-8.
- HETTEMA, J. M., AN, S. S., VAN DEN OORD, E. J., NEALE, M. C., KENDLER, K. S. & CHEN, X. 2013. Genetic association between RGS1 and internalizing disorders. *Psychiatr Genet*, 23, 56-60.
- HIKIDA, T., JAARO-PELED, H., SESHADRI, S., OISHI, K., HOOKWAY, C., KONG, S., WU, D., XUE, R., ANDRADE, M., TANKOU, S., MORI, S., GALLAGHER, M., ISHIZUKA, K., PLETNIKOV, M., KIDA, S. & SAWA, A. 2007. Dominant-negative DISC1 transgenic mice display schizophrenia-associated phenotypes detected by measures translatable to humans. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104, 14501-6.
- HORST DILLING, W. M., MARTIN H.SCHMIDT, 2015. *Internationale Klassifikation psychischer Störungen. ICD-10 Kapitel V (F). Klinisch-diagnostische Leitlinien.*, Göttingen, Hogrefe.
- HOWES, O. D. & KAPUR, S. 2009. The dopamine hypothesis of schizophrenia: version III--the final common pathway. *Schizophr Bull*, 35, 549-62.
- HUANG, J. T., WANG, L., PRABAKARAN, S., WENGENROTH, M., LOCKSTONE, H. E., KOETHE, D., GERTH, C. W., GROSS, S., SCHREIBER, D., LILLEY, K., WAYLAND, M., OXLEY, D., LEWEKE, F. M. & BAHN, S. 2008. Independent protein-profiling studies show a decrease in apolipoprotein A1 levels in schizophrenia CSF, brain and peripheral tissues. *Mol Psychiatry*, 13, 1118-28.
- HUBER, G. 1955. [The pneumoencephalogram at the onset of schizophrenic disease]. *Arch Psychiatr Nervenkr Z Gesamte Neurol Psychiatr*, 193, 406-26.
- INTERNATIONAL MULTIPLE SCLEROSIS GENETICS, C. 2010. IL12A, MPHOSPH9/CDK2AP1 and RGS1 are novel multiple sclerosis susceptibility loci. *Genes Immun*, 11, 397-405.
- ISHIZUKA, K., KAMIYA, A., OH, E. C., KANKI, H., SESHADRI, S., ROBINSON, J. F., MURDOCH, H., DUNLOP, A. J., KUBO, K., FURUKORI, K., HUANG, B., ZELEDON, M., HAYASHI-TAKAGI, A., OKANO, H., NAKAJIMA, K., HOUSLAY, M. D., KATSANIS, N. & SAWA, A. 2011. DISC1-dependent switch from progenitor proliferation to migration in the developing cortex. *Nature*, 473, 92-6.
- JAARO-PELED, H., HAYASHI-TAKAGI, A., SESHADRI, S., KAMIYA, A., BRANDON, N. J. & SAWA, A. 2009. Neurodevelopmental mechanisms of schizophrenia: understanding disturbed postnatal brain maturation through neuregulin-1-ErbB4 and DISC1. *Trends Neurosci*, 32, 485-95.
- JIN, J., BHATTI, D. L., LEE, K. W., MEDRIHAN, L., CHENG, J., WEI, J., ZHONG, P., YAN, Z., KOOIKER, C., SONG, C., AHN, J. H., OBERMAIR, G. J., LEE, A., GRESACK, J., GREENGARD, P. & KIM, Y. 2019. Ahnak scaffolds p11/Anxa2 complex and L-type voltage-gated calcium channel and modulates depressive behavior. *Mol Psychiatry*.
- JOAQUIM, H. P. G., COSTA, A. C., SERPA, M. H., TALIB, L. L. & GATTAZ, W. F. 2019. Reduced Annexin A3 in schizophrenia. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci*.

- JOHNSON, B. A., WANG, J., TAYLOR, E. M., CAILLIER, S. J., HERBERT, J., KHAN, O. A., CROSS, A. H., DE JAGER, P. L., GOURRAUD, P. A., CREE, B. C., HAUSER, S. L. & OKSENBERG, J. R. 2010. Multiple sclerosis susceptibility alleles in African Americans. *Genes Immun*, 11, 343-50.
- JOHNSTON-WILSON, N. L., SIMS, C. D., HOFMANN, J. P., ANDERSON, L., SHORE, A. D., TORREY, E. F. & YOLKEN, R. H. 2000. Disease-specific alterations in frontal cortex brain proteins in schizophrenia, bipolar disorder, and major depressive disorder. The Stanley Neuropathology Consortium. *Mol Psychiatry*, 5, 142-9.
- JOHNSTONE, E. C., CROW, T. J., FRITH, C. D., HUSBAND, J. & KREEL, L. 1976. Cerebral ventricular size and cognitive impairment in chronic schizophrenia. *Lancet*, 2, 924-6.
- KAMIYA, A., KUBO, K., TOMODA, T., TAKAKI, M., YOUN, R., OZEKI, Y., SAWAMURA, N., PARK, U., KUDO, C., OKAWA, M., ROSS, C. A., HATTEN, M. E., NAKAJIMA, K. & SAWA, A. 2005. A schizophrenia-associated mutation of DISC1 perturbs cerebral cortex development. *Nat Cell Biol*, 7, 1167-78.
- KARPINSKI, P., FRYDECKA, D., SASIADEK, M. M. & MISIAK, B. 2016. Reduced number of peripheral natural killer cells in schizophrenia but not in bipolar disorder. *Brain Behav Immun*, 54, 194-200.
- KAY, S. R., FISZBEIN, A. & OPLER, L. A. 1987. The positive and negative syndrome scale (PANSS) for schizophrenia. *Schizophr Bull*, 13, 261-76.
- KIM, J. Y., DUAN, X., LIU, C. Y., JANG, M. H., GUO, J. U., POW-ANPONGKUL, N., KANG, E., SONG, H. & MING, G. L. 2009. DISC1 regulates new neuron development in the adult brain via modulation of AKT-mTOR signaling through KIAA1212. *Neuron*, 63, 761-73.
- KIRKPATRICK, B., XU, L., CASCELLA, N., OZEKI, Y., SAWA, A. & ROBERTS, R. C. 2006. DISC1 immunoreactivity at the light and ultrastructural level in the human neocortex. *J Comp Neurol*, 497, 436-50.
- KOPITO, R. R. 2000. Aggresomes, inclusion bodies and protein aggregation. *Trends Cell Biol*, 10, 524-30.
- KORDOWER, J. H., CHU, Y., HAUSER, R. A., FREEMAN, T. B. & OLANOW, C. W. 2008. Lewy body-like pathology in long-term embryonic nigral transplants in Parkinson's disease. *Nat Med*, 14, 504-6.
- KORTH, C. 2012. Aggregated proteins in schizophrenia and other chronic mental diseases: DISC1opathies. *Prion*, 6, 134-41.
- LANGFELDER, P. & HORVATH, S. 2008. WGCNA: an R package for weighted correlation network analysis. *BMC Bioinformatics*, 9, 559.
- LELIVELD, S. R., BADER, V., HENDRIKS, P., PRIKULIS, I., SAJNANI, G., REQUENA, J. R. & KORTH, C. 2008. Insolubility of disrupted-in-schizophrenia 1 disrupts oligomer-dependent interactions with nuclear distribution element 1 and is associated with sporadic mental disease. *J Neurosci*, 28, 3839-45.
- LEUCHT, S. H., A; JÄGER, M; VAUTH, R; 2019. Schizophrenien und andere psychotische Störungen. In: BERGER, M. (ed.) *Pschiche Erkrankungen, Klinik und Therapie* 6ed. München Elsevier GmbH.
- LEVIN, Y., WANG, L., SCHWARZ, E., KOETHE, D., LEWEKE, F. M. & BAHN, S. 2010. Global proteomic profiling reveals altered proteomic signature in schizophrenia serum. *Mol Psychiatry*, 15, 1088-100.
- LEWIS, D. A. & LEVITT, P. 2002. Schizophrenia as a disorder of neurodevelopment. *Annu Rev Neurosci*, 25, 409-32.

- MAO, Y., GE, X., FRANK, C. L., MADISON, J. M., KOEHLER, A. N., DOUD, M. K., TASSA, C., BERRY, E. M., SODA, T., SINGH, K. K., BIECHELE, T., PETRYSHEN, T. L., MOON, R. T., HAGGARTY, S. J. & TSAI, L. H. 2009. Disrupted in schizophrenia 1 regulates neuronal progenitor proliferation via modulation of GSK3beta/beta-catenin signaling. *Cell*, 136, 1017-31.
- MILLAR, J. K., WILSON-ANNAN, J. C., ANDERSON, S., CHRISTIE, S., TAYLOR, M. S., SEMPLE, C. A., DEVON, R. S., ST CLAIR, D. M., MUIR, W. J., BLACKWOOD, D. H. & PORTEOUS, D. J. 2000. Disruption of two novel genes by a translocation co-segregating with schizophrenia. *Hum Mol Genet*, 9, 1415-23.
- MILOSEVIC, A., LIEBMANN, T., KNUDSEN, M., SCHINTU, N., SVENNINGSSON, P. & GREENGARD, P. 2017. Cell- and region-specific expression of depression-related protein p11 (S100a10) in the brain. *J Comp Neurol*, 525, 955-975.
- MOSS, S. E. & MORGAN, R. O. 2004. The annexins. *Genome Biol*, 5, 219.
- MULLER, H., HASSE-SANDER, I., HORN, R., HELMSTAEDTER, C. & ELGER, C. E. 1997. Rey Auditory-Verbal Learning Test: structure of a modified German version. *J Clin Psychol*, 53, 663-71.
- MURRAY, R. M. & LEWIS, S. W. 1987. Is schizophrenia a neurodevelopmental disorder? *Br Med J (Clin Res Ed)*, 295, 681-2.
- MUSSUNOOR, S. & MURRAY, G. I. 2008. The role of annexins in tumour development and progression. *J Pathol*, 216, 131-40.
- NEW YORK STATE PSYCHIATRIC INSTITUTE, B. R. 1995. Structured clinical interview for DSM-IV axis disorders (SCID). New York: M.B. First, R.L. Spitzer, M. Gibbon, J.B.W. Williams.
- OTTIS, P., BADER, V., TROSSBACH, S. V., KRETZSCHMAR, H., MICHEL, M., LELIVELD, S. R. & KORTH, C. 2011. Convergence of two independent mental disease genes on the protein level: recruitment of dysbindin to cell-invasive disrupted-in-schizophrenia 1 aggregates. *Biol Psychiatry*, 70, 604-10.
- OWEN, M. J., SAWA, A. & MORTENSEN, P. B. 2016. Schizophrenia. *The Lancet*, 388, 86-97.
- PHAM, T. V., PIERSMA, S. R., WARMOES, M. & JIMENEZ, C. R. 2010. On the beta-binomial model for analysis of spectral count data in label-free tandem mass spectrometry-based proteomics. *Bioinformatics*, 26, 363-9.
- PLETNIKOV, M. V., AYHAN, Y., NIKOLSKAIA, O., XU, Y., OVANESOV, M. V., HUANG, H., MORI, S., MORAN, T. H. & ROSS, C. A. 2008. Inducible expression of mutant human DISC1 in mice is associated with brain and behavioral abnormalities reminiscent of schizophrenia. *Mol Psychiatry*, 13, 173-86, 115.
- PRUSINER, S. B. 2001. Shattuck lecture--neurodegenerative diseases and prions. *N Engl J Med*, 344, 1516-26.
- RANGEL, J., NOSRATI, M., LEONG, S. P., HAQQ, C., MILLER, J. R., 3RD, SAGEBIEL, R. W. & KASHANI-SABET, M. 2008. Novel role for RGS1 in melanoma progression. *Am J Surg Pathol*, 32, 1207-12.
- RIMOL, L. M., HARTBERG, C. B., NESVAG, R., FENNEMA-NOTESTINE, C., HAGLER, D. J., JR., PUNG, C. J., JENNINGS, R. G., HAUKVIK, U. K., LANGE, E., NAKSTAD, P. H., MELLE, I., ANDREASSEN, O. A., DALE, A. M. & AGARTZ, I. 2010. Cortical thickness and subcortical volumes in schizophrenia and bipolar disorder. *Biol Psychiatry*, 68, 41-50.
- ROSENFELD, J., CAPDEVIELLE, J., GUILLEMOT, J. C. & FERRARA, P. 1992. In-gel digestion of proteins for internal sequence analysis after one- or two-dimensional gel electrophoresis. *Anal Biochem*, 203, 173-9.

- SCHROEDER, A., MUELLER, O., STOCKER, S., SALOWSKY, R., LEIBER, M., GASSMANN, M., LIGHTFOOT, S., MENZEL, W., GRANZOW, M. & RAGG, T. 2006. The RIN: an RNA integrity number for assigning integrity values to RNA measurements. *BMC Mol Biol*, 7, 3.
- SCHUROV, I. L., HANDFORD, E. J., BRANDON, N. J. & WHITING, P. J. 2004. Expression of disrupted in schizophrenia 1 (DISC1) protein in the adult and developing mouse brain indicates its role in neurodevelopment. *Mol Psychiatry*, 9, 1100-10.
- SCHWARZ, E. 2018. A gene-based review of RGS4 as a putative risk gene for psychiatric illness. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*, 177, 267-273.
- SESHADRI, S., KAMIYA, A., YOKOTA, Y., PRIKULIS, I., KANO, S., HAYASHI-TAKAGI, A., STANCO, A., EOM, T. Y., RAO, S., ISHIZUKA, K., WONG, P., KORTH, C., ANTON, E. S. & SAWA, A. 2010. Disrupted-in-Schizophrenia-1 expression is regulated by beta-site amyloid precursor protein cleaving enzyme-1-neuregulin cascade. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107, 5622-7.
- SHELTON RC, W. D. 1986. *Handbook of Schizophrenia: The Neuropathology of Schizophrenia*. , New York, Elsevier Science Publishers.
- SHENTON, M. E., DICKEY, C. C., FRUMIN, M. & MCCARLEY, R. W. 2001. A review of MRI findings in schizophrenia. *Schizophr Res*, 49, 1-52.
- SIALANA, F. J., WANG, A. L., FAZARI, B., KRISTOFOVA, M., SMIDAK, R., TROSSBACH, S. V., KORTH, C., HUSTON, J. P., DE SOUZA SILVA, M. A. & LUBEC, G. 2018. Quantitative Proteomics of Synaptosomal Fractions in a Rat Overexpressing Human DISC1 Gene Indicates Profound Synaptic Dysregulation in the Dorsal Striatum. *Front Mol Neurosci*, 11, 26.
- SINCLAIR, D. & ADAMS, C. E. 2014. Treatment resistant schizophrenia: a comprehensive survey of randomised controlled trials. *BMC Psychiatry*, 14, 253.
- SU, T. P., ZHANG, L., CHUNG, M. Y., CHEN, Y. S., BI, Y. M., CHOU, Y. H., BARKER, J. L., BARRETT, J. E., MARIC, D., LI, X. X., LI, H., WEBSTER, M. J., BENEDEK, D., CARLTON, J. R. & URSANO, R. 2009. Levels of the potential biomarker p11 in peripheral blood cells distinguish patients with PTSD from those with other major psychiatric disorders. *J Psychiatr Res*, 43, 1078-85.
- TAYLOR, J. P., HARDY, J. & FISCHBECK, K. H. 2002. Toxic proteins in neurodegenerative disease. *Science*, 296, 1991-5.
- TEWES, U. 1994. *HAWIE-R : Hamburg-Wechsler-Intelligenztest für Erwachsene, Revision 1991; Handbuch und Testanweisung*, Bern ; Göttingen ; Toronto ; Seattle, Huber.
- TOMBAUGH, T. N. 2004. Trail Making Test A and B: normative data stratified by age and education. *Arch Clin Neuropsychol*, 19, 203-14.
- TROSSBACH, S. V., BADER, V., HECHER, L., PUM, M. E., MASOUD, S. T., PRIKULIS, I., SCHABLE, S., DE SOUZA SILVA, M. A., SU, P., BOULAT, B., CHWIESKO, C., POSCHMANN, G., STUHLER, K., LOHR, K. M., STOUT, K. A., OSKAMP, A., GODSAVE, S. F., MULLER-SCHIFFMANN, A., BILZER, T., STEINER, H., PETERS, P. J., BAUER, A., SAUVAGE, M., RAMSEY, A. J., MILLER, G. W., LIU, F., SEEMAN, P., BRANDON, N. J., HUSTON, J. P. & KORTH, C. 2016. Misassembly of full-length Disrupted-in-Schizophrenia 1 protein is linked to altered dopamine homeostasis and behavioral deficits. *Mol Psychiatry*, 21, 1561-1572.
- TROSSBACH, S. V., FEHSEL, K., HENNING, U., WINTERER, G., LUCKHAUS, C., SCHABLE, S., SILVA, M. A. & KORTH, C. 2014. Peripheral DISC1 protein levels as a trait marker for schizophrenia and modulating effects of nicotine. *Behav Brain Res*, 275, 176-82.

- TROSSBACH, S. V., HECHER, L., SCHAFFLICK, D., DEENEN, R., POPA, O., LAUTWEIN, T., TSCHIRNER, S., KOHRER, K., FEHSEL, K., PAPAZOVA, I., MALCHOW, B., HASAN, A., WINTERER, G., SCHMITT, A., MEYER ZU HORSTE, G., FALKAI, P. & KORTH, C. 2019. Dysregulation of a specific immune-related network of genes biologically defines a subset of schizophrenia. *Transl Psychiatry*, 9, 156.
- UNTCH, M. J., CHRISTIAN J; THOMSEN, CHRISTOPH; NITZ, ULRIKE; VON MINCKWITZ, GUNTER; KAUFMANN, MANFRED; 2006. Adjuvante Therapie mit Trastuzumab bei Mammakarzinompatientinnen. *Deutsches Ärzteblatt International*, 103.
- VAN HAREN, N. E., CAHN, W., HULSHOFF POL, H. E. & KAHN, R. S. 2008. Schizophrenia as a progressive brain disease. *Eur Psychiatry*, 23, 245-54.
- WANG, Q., CHARYCH, E. I., PULITO, V. L., LEE, J. B., GRAZIANE, N. M., CROZIER, R. A., REVILLA-SANCHEZ, R., KELLY, M. P., DUNLOP, A. J., MURDOCH, H., TAYLOR, N., XIE, Y., PAUSCH, M., HAYASHI-TAKAGI, A., ISHIZUKA, K., SESHADRI, S., BATES, B., KARIYA, K., SAWA, A., WEINBERG, R. J., MOSS, S. J., HOUSLAY, M. D., YAN, Z. & BRANDON, N. J. 2011. The psychiatric disease risk factors DISC1 and TNK1 interact to regulate synapse composition and function. *Mol Psychiatry*, 16, 1006-23.
- WEINBERGER, D. R. 1987. Implications of normal brain development for the pathogenesis of schizophrenia. *Arch Gen Psychiatry*, 44, 660-9.
- YAMAZAKI, Y., ZHAO, N., CAULFIELD, T. R., LIU, C. C. & BU, G. 2019. Apolipoprotein E and Alzheimer disease: pathobiology and targeting strategies. *Nat Rev Neurol*, 15, 501-518.
- YERABHAM, A. S. K., MAS, P. J., DECKER, C., SOARES, D. C., WEIERGRABER, O. H., NAGEL-STEGER, L., WILLBOLD, D., HART, D. J., BRADSHAW, N. J. & KORTH, C. 2017. A structural organization for the Disrupted in Schizophrenia 1 protein, identified by high-throughput screening, reveals distinctly folded regions, which are bisected by mental illness-related mutations. *J Biol Chem*, 292, 6468-6477.
- YERABHAM, A. S. K., MULLER-SCHIFFMANN, A., ZIEHM, T., STADLER, A., KOBER, S., INDURKHYA, X., MARREIROS, R., TROSSBACH, S. V., BRADSHAW, N. J., PRIKULIS, I., WILLBOLD, D., WEIERGRABER, O. H. & KORTH, C. 2018. Biophysical insights from a single chain camelid antibody directed against the Disrupted-in-Schizophrenia 1 protein. *PLoS One*, 13, e0191162.
- ZHU, S., ABOUNIT, S., KORTH, C. & ZURZOLO, C. 2017. Transfer of disrupted-in-schizophrenia 1 aggregates between neuronal-like cells occurs in tunnelling nanotubes and is promoted by dopamine. *Open Biol*, 7.
- ZWEIG, M. H. & CAMPBELL, G. 1993. Receiver-operating characteristic (ROC) plots: a fundamental evaluation tool in clinical medicine. *Clin Chem*, 39, 561-77.

6 Anhang

Probennummer	mittlere, korrigierte Absorption bei 450 nm	Hämoglobinkonzentration [ng/μL]
463	0,256	2,936
484	0,486	17,024
509	0,334	7,699
446	0,545	20,642
457	0,161	0,596
477	0,233	1,503
499	0,217	0,815
514	0,231	1,381
458	0,140	0,564
427	0,231	1,381
1439	0,350	8,681
1445	0,425	13,284
1438	0,247	2,362
1480	0,324	7,086
1446	0,218	0,828
1462	0,204	0,716
1463	0,304	5,859
1453	0,135	0,557
1481	0,184	0,645
1520	0,244	2,178
1441	0,295	5,307
1482	0,322	6,963

Tabelle 15: Hämoglobinkonzentration der einzelnen Liquorproben

Nach Abschluss der ELISA Reaktion wurde die Absorption der einzelnen Wells mit Hilfe eines Mikrotiterplatten-Spektralphotometer der Firma ... (...) bei einer Wellenlänge von 450 nm gemessen. Nach Berechnung des Mittelwertes eines jeden Duplikates wurde der durchschnittlichen Hintergrundwert subtrahiert. Anhand der durch die Standartwerte erstellte polynomische Standardkurve 2. Grades ergab sich folgende Gleichung zur Berechnung der Hämoglobinkonzentration: mittlere, korrigierte Absorption = $-5^{(-05*x^2)} + 0,0163*x + 0,2$

7 Danksagung

Ich möchte all denjenigen danken, die diese Dissertation möglich gemacht haben.

Ich danke Prof. Dr. Carsten Korth, der mir dieses Dissertationsthema überlassen hat, für die gute Betreuung, den fachlichen Rat sowie für die Begeisterung und Motivation an der Forschung und auch nicht zuletzt für die Vertretung dieser Promotion vor der medizinischen Fakultät. Zu großem Dank verpflichtet bin ich zudem meiner wissenschaftlichen Betreuerin Dr. Svenja Troßbach. Ihre strukturierte und zielführende Anleitung im Labor sowie ihre immerwährende engagierte und kompetente Hilfestellung, weit über meine aktive Zeit als Doktorandin hinaus, haben mir diese Arbeit erst möglich gemacht. Für diese großzügige Unterstützung möchte ich mich ganz herzlich bedanken. Des Weiteren danke ich Dr. Verian Bader, der mich ebenso mit seiner Expertise und Erfahrung vor allem bei der Liquoranalyse unterstützt hat. Ich danke der gesamten Arbeitsgruppe Korth für die große Hilfsbereitschaft, die vielen Ratschläge, die zahlreichen - sowohl wissenschaftlichen, als auch nicht-wissenschaftlichen - Diskussionen und noch immer währenden Zusendungen lebensbereichernder Beiträge. Vielen Dank, dass ihr mich (und das als Medizinerin...) aufgenommen und begleitet habt. Für die Korrektur dieser Arbeit bedanke ich mich ganz herzlich bei Dr. Jens Parpart.

Von ganzem Herzen bedanke ich mich bei meinen langjährigen Freunden, deren Loyalität eine wichtige Grundlage für meinen Werdegang geschaffen hat. Allen voran Fritz Finne für die bislang 27 Jahre aufrichtiger Freundschaft. Rückblickend auf meine Studentenzeit möchte ich vor allem Laura Erschoff, Anne Parpart-Morina und Judith Bolzenius danken, ohne deren wertvolle Freundschaft so vieles nicht möglich gewesen wäre. Ebenso gilt mein Dank Jakob Meliles, dessen Rückhalt, Verständnis und Nachsicht hinsichtlich der Verschiebung sämtlicher Deadlines einen wichtigen Beitrag zur Vollendung dieser Arbeit geleistet haben.

Zu guter Letzt möchte ich mich herzlich bei meiner gesamten Familie für die großzügige Unterstützung bedanken. Hier gilt mein besonderer Dank meinem Papa, der mich von Beginn an in dieser Arbeit, aber auch darüber hinaus auf meinem Werdegang als Ärztin unterstützt hat. Seine Leidenschaft zur Medizin hat mich schon früh geprägt. Ich bedanke mich für die vielen wertvollen Ratschläge, unsere zahlreichen (oftmals auch kontroversen) Diskussionen, medizinischer und nicht-medizinischer Art, unsere geteilte Begeisterung für so viele Aspekte im Leben und die immerwährende Erinnerung zwischen all diesen die Balance zu wahren.