Universitätsklinikum Ulm

Klinik für Neurologie

Direktor: Prof. Dr. med. A. C. Ludolph

Proteomische Untersuchungen aus dem Liquor cerebrospinalis schizophrener Patienten

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin

der Medizinischen Fakultät der Universität Ulm

vorgelegt von

Julia Ruhnke

geboren in Bad Mergentheim

2013

Amtierender Dekan: Prof. Dr. Thomas Wirth

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Markus Otto

2. Berichterstatter: PD Dr. Nenad Vasic

Tag der Promotion: 13.02.2014

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis V
1 Einleitung 1
1.1 Schizophrenie 1
1.1.1 Epidemiologie 1
1.1.2 Symptomatik und Diagnostik 1
1.1.3 Verlauf 2
1.1.4 Ätiopathogenese 2
1.1.5 Pathophysiologie: Dopaminhypothese 4
1.2 Liquor cerebrospinalis 4
1.2.1 Liquorproteine 5
1.2.2 Blut-Liquor-Schranke 5
1.2.3 klinische Relevanz 6
1.3 Proteomanalyse 6
1.3.1 Das Proteom 6
1.3.2 Methoden der Proteomanalyse 7
1.4 Aufgabenstellung und Zielsetzung 9
2 Material und Methoden 10
2.1 Material 10
2.1.1 Geräte und Laborbedarf 10
2.1.2 Chemikalien und Reagenzien 11
2.1.3 Antikörper 12
2.1.4 Assays 12
2.1.5 Software 12
2.1.6 Puffer und Lösungen 13
2.1.7 Liquorproben 15
2.2 Methoden 17
2.2.1 Erfassung der Liquorparameter 17
2.2.2 2D-DIGE 19
2.2.3 2D-Immunoblot Alpha-1-Antitrypsin 26
2.2.4 Western-Blot Apolipoprotein A-IV 29
2.2.5 ELISA S-100B, Tau, Beta-Amyloid und Haptoglobin 29

2.2.6 Radioimmunoassay Orexin 29
2.2.7 Statistische Auswertung 30
3 Ergebnisse 31
3.1 Immunglobuline im Liquor 31
3.2 Vergleich des Proteoms: 2D-Gelelektrophorese 32
3.3 Validierung der Kandidatenproteine 37
3.3.1 Haptoglobin-ELISA 37
3.3.2 Alpha-1-Antitrypsin 2D-Immunoblot 38
3.3.3 Apolipoprotein A-I-ELISA 40
3.3.4 Immunoblot Apolipoprotein A-IV 42
3.3.5 Biomarker im Liquor schizophrener Patienten 43
4 Diskussion 44
4.1 Relevanz 44
4.2 Patientenauswahl 44
4.3 Ergebnisdiskussion 45
4.3.1 Akute-Phase-Proteine 46
4.3.2 Apolipoprotein A-I und A-IV 47
4.3.3 Tau-Protein und Beta-Amyloid 48
4.3.4 Orexin A 49
4.3.5 S-100B 50
4.3.6 Herkunft der Proteine – Blut oder Gehirn? 51
4.3.7 Einfluss der antipsychotischen Medikation 51
4.4 Methodenkritik 2D-Gelelektrophorese 52
4.4.1 2D-DIGE 52
4.4.2 präanalytische Liquordepletion 52
4.4.3 Räumliche Auflösung 53
4.4.4 Gelfreie Methoden 54
4.5 Schlussfolgerung und Ausblick 55
5 Zusammenfassung 57
6 Literaturverzeichnis 59
Anhang 73
Danksagung 74
Lebenslauf 75

Abkürzungsverzeichnis

2D	zweidimensional
Apo	Apolipoprotein
APS	Ammoniumpersulfat
CPE	Chlorpromazin-Äquivalent
Cy	Cyanin
DIGE	Difference gel electrophoresis
DISC	disrupted in schizophrenia
DMF	Dimethylformamid
DSM IV	Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders
DTT	Dithiothreitol
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
HRP	Horseradish peroxidase (Meerrettichperoxidase)
ICD-10	International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems
IEF	isoelektrische Fokussierung
Ig	Immunglobulin
IPG	Immobilisierte pH-Gradienten
iTRAQ	Tags for Relative and Absolute Quantification
MALDI	Matrix assisted laser desorption ionization
MRT	Magnetresonanztomografie
MS	Massenspektrometrie
MW	Molekülmasse
NHS	N-Hydroxysuccinimid
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	phosphate buffered saline
PET	Positronen Emissions Tomographie
RIA	Radioimmunoassay
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TOF	time of flight

TRIS	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
WHO	World Health Organization
ZNS	Zentrales Nervensystem

1 Einleitung

1.1 Schizophrenie

Die Schizophrenie repräsentiert eine der schwerwiegendsten psychiatrischen Erkrankungen. Es handelt sich um eine komplexe Störung, die das Denken, die Gefühle und das Handeln des Menschen sowie seine Sinne derart beeinflusst, dass der Bezug zu sich selbst wie auch zur Umwelt massiv beeinträchtigt wird (Remschmidt et al. 2011). In diesem Abschnitt sollen die wichtigsten Aspekte zur Epidemiologie, Symptomatik, Verlauf, Diagnostik und Ätiopathogenese der Schizophrenie dargestellt werden.

1.1.1 Epidemiologie

Die Schizophrenie ist mit einer Lebenszeitprävalenz von 1% eine der häufigsten psychiatrischen Erkrankungen. In einer von der WHO durchgeführten Studie in 10 verschiedenen Ländern variiert die Jahresinzidenz im Altersbereich von 15-54 Jahren zwischen 0,16 bis 0,42 pro 1000 Einwohner. Die Prävalenz liegt zwischen 1,4 und 4,6 pro 1000 Einwohner (Jablensky 2000). Der Erkrankungsgipfel liegt in der Regel zwischen dem 15. und 30. Lebensjahr. Männer und Frauen sind in etwa gleich häufig betroffen, wobei Männer durchschnittlich 3-4 Jahre früher erkranken (Hafner 1998).

1.1.2 Symptomatik und Diagnostik

Erstmals beschrieb Emil Kraepelin 1898 die Erkrankung, der sie vor dem Hintergrund der erheblichen kognitiven Einschränkungen als „Dementia praecox“ bezeichente. 1911 ersetzte Eugen Bleuler den Begriff durch die Bezeichnung *Schizophrenie* (abgeleitet vom altgriechischen *schizein,* „abspalten“ und *phren*, „Geist“). Mit diesem Begriff bezog er sich auf eine „Desorganisiertheit des Denkprozesses, fehlende Kohärenz zwischen Denken und Emotionen sowie die Abspaltung von der Realität (Butcher et al. 2009). Der Psychiater Kurt Schneider definierte 1938 Symptome ersten Ranges (Wahnwahrnehmungen, dialogisierende akustische Halluzinationen und Störungen des Ich-Erlebens) und Symptome zweiten Ranges (optische, gustatorische oder olfaktorische Halluzinationen, Wahnideen). Inzwischen werden die Symptome zusätzlich in Positiv- und Negativsymptome differenziert. Als Positivsymptome gelten Wahn, Halluzinationen

und Denkstörungen, wohingegen Negativsymptome durch Affektverflachung und sozialen Rückzug gekennzeichnet sind (Crow 1980).

Daran angelehnt sind die heutigen Klassifikationssysteme nach ICD-10 (International Classification of Diseases and Related Health Problems) und DSM IV (Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders). Die Diagnose kann nach ICD- 10 gestellt werden, wenn die Symptome mindestens einen Monat kontinuierlich vorliegen und keiner organischen Grunderkrankung, einer Alkohol- oder Substanzintoxikation, einem Abhängigkeitssyndrom oder einem Entzugssyndrom zugeordnet werden kann.
Im ICD-10 und DSM IV werden die paranoide, desorganisierte, katatone, undifferenzierte und residuale Form als Subformen der Schizophrenie unterschieden. Da sich die Symptome im Verlauf der Krankheit verändern können, ändert sich so auch die Diagnose des Subtypes.

1.1.3 Verlauf

Der akuten schizophrenen Erkrankung geht meist eine uncharakteristische Prodromalphase voraus, in der sich vor Allem depressive Symptome zeigen. Der weitere Verlauf schizophrener Erkrankungen kann sehr unterschiedlich sein. Die akute Phase dauert Wochen bis Monate und kann in Schüben mit zurückbleiben einer Residualsymptomatik oder völliger Remission verlaufen. Der Residualzustand ist hauptsächlich durch Nagativsymptome geprägt. Im Wesentlichen können vier Verlaufsformen unterschieden werden: Eine einmalige Episode ohne bleibende Beeinträchtigungen, mehrere Episoden ohne bleibende Beeinträchtigungen sowie mehrere Episoden mit bleibenden oder sogar zunehmenden Beeinträchtigungen (Shepherd et al. 1989). Insgesamt besteht bei an Schizophrenie erkrankten Patienten ein erhöhtes Suizidrisiko (Palmer et al. 2005).

1.1.4 Ätiopathogenese

Ein genetischer Zusammenhang ist durch Familien- Adoptions- und Zwillingsstudien belegt: Es konnte gezeigt werden, dass direkte Verwandte eines Erkrankten ein erhöhtes Risiko haben, ebenfalls zu erkranken und dass das Risiko mit steigendem Verwandtschaftsgrad zunimmt (McGue et al. 1989). Inzwischen konnten einige Mutationen im humanen Genom identifiziert werden, die mit dem

Auftreten einer Schizophrenie assoziiert werden: Wichtige Beispiele wären das DISC1 und DISC2-Gen (St Clair et al. 1990, Millar et al. 2000), das Dysbindin-Gen (DTNBP1) (Straub et al. 2002), das Gen für Neuregulin1 (Petryshen et al. 2005) und das Gen für Catechyl-O- Methyltransferase (Sagud et al. 2010). Allerdings scheint jedes der bisher endeckten Risikogene jeweils nur einen schwachen Effekt auf die Krankheitsentstehung zu haben (Kirov et al. 2005). Die Tatsache, dass unter eineiigen Zwillingen die Konkordanz für Schizophrenie lediglich 50% beträgt (McGue et al. 1989), macht zudem deutlich, dass genetische Disposition allein nicht für die Erklärung der Krankheitsentstehung ausreicht. Nach dem Vulnerabilitäts-Stressmodel müssen neben der genetischen Disposition noch weitere Faktoren hinzukommen, damit es zur Manifestation der Erkrankung kommt (Zubin et al. 1985). Zu diesen Faktoren zählen beispielsweise geburtshilfliche Komplikationen (McNeil et al. 2000), das Aufwachsen in städtischer Umgebung (Pedersen et al. 2001) und vorgeburtliche Infektionen mit Herpes Simplex Virus Typ2 (Buka et al. 2001), sozialer Stress oder Drogenkonsum. Somit kann das komplexe Zusammenspiel zwischen genetischer Komponente und der Umwelt als entscheidend für den Ausbruch einer schizophrenen Psychose betrachtet werden.

Die Tatsache, dass viele der Faktoren während der Prä- oder Perinatalzeit, also lang vor der klinischen Manifestation der Erkrankung im frühen Erwachsenenalter einwirken, führte zur Theorie einer gestörten Hirnentwicklung. Dafür spricht auch, dass Kinder, die später an einer Schizophrenie erkranken, schon früh eine verzögerte Entwicklung wie beispielsweise späteren Spracherwerb und verzögertes Erlernen des Laufens zeigen (Jones et al. 1994, Cannon et al. 2002). Für eine gestörte Hirnentwicklung sprechen auch neuropathologische Studien, die eine veränderte Zytoarchitektur im Hirn schizophrener Patienten zeigen konnten (Akbarian et al. 1993).

Dem gegenüber steht die Theorie der Neurodegeneration als Pathomechanismus der Schizophrenie. Sie fußt auf der Beobachtung struktureller Hirnveränderungen wie die Reduktion des Hirnvolumens und eine Erweiterung des Ventrikelsystems mit Betonung der Seitenventrikel (DeLisi et al. 2004, Cahn et al. 2002). Gegen eine klassische Neurodegeneration, wie sie bei der Alzheimer- Demenz auftritt, spricht allerdings das Fehlen der Gliose als typisches Zeichen für Neurodegeneration (Woods 1998) und die Tatsache, dass die kognitiven Fähigkeiten schizophrener

Patienten zwar zum Zeitpunkt der Krankheitsmanifestation reduziert sind, jedoch in den Folgejahren keine Progredienz zeigen (Hoff et al. 2005).

1.1.5 Pathophysiologie: Dopaminhypothese

Die bedeutendste Theorie zur Pathophysiologie der Schizophrenie beschreibt die Dopaminhypothese. Die Idee, dass Dopamin und dopaminerge Mechanismen zentral bei der Krankheitsentstehung sind, beruhte ursprünglich zum Einen auf der Beobachtung, dass dopaminerge Substanzen wie Amphetamin schizophrenie-ähnliche Symptome auslösen (Lieberman et al. 1987) und zum Anderen darauf, dass alle antipsychotisch wirkende Medikamente Dopamin-Rezeptoren blockieren (Seeman et al. 1976). Dies führte zu der Annahme, dass die Schizophrenie durch funktionelle Überaktivität des dopaminergen Systems bedingt ist. Später wurde die Hypothese dahingehend ergänzt, dass wohl eine Hyperaktivität im mesolimbischen Dopminsystem für die Positivsymptome und eine Hypoaktivität im Mesocortikalen Dopaminsystem für die Negativsymptome verantwortlich ist. (Davis et al. 1991). In Positronen-Emissions-Tomographischen (PET) Untersuchungen des Gehirns schizophrener Patienten konnte ein erhöhter präsynaptischer Dopamingehalt (Howes et al. 2009) sowie eine erhöhte Dopaminausschüttung im Striatum dargestellt werden (Abi-Dargham et al. 2000). Aufbauend auf der Beobachtung, dass Glutamatrezeptor (NMDA)-Antagonisten wie Phencyclidin und Ketamin schizophrene Positiv- wie auch Negativsymptomatik hervorrufen können, wurde eine Unterfunktion der glutamatergen Signaltransduktion als Ursache schizophrener Erkrankungen angenommen (Krystal et al. 1994). Eine Vielzahl an klinischen Studien haben seither diese ursprüngliche Beobachtung bestätigt (Coyle 2006, Kegeles et al. 2000). Die Glutamathypothese ist nicht im Widerspruch zur Dopaminhypothese zu sehen, da gezeigt werden konnte, dass NMDA-Rezeptor-Antagonisten auch zu einer erhöhten Ausschüttung von Dopamin im präfrontalen Cortex und subcorticalen Strukturen führt (Bowers et al., 1987).

1.2 Liquor cerebrospinalis

Das menschliche Gehirn und Rückenmark ist vom so genannten Liquor cerebrospinalis umgeben. Der normale Liquor ist eine klare farblose Flüssigkeit, die proteinarm und fast zellfrei ist. Er dient der Kontrolle der chemischen

Umgebung des zentralen Nervensystems (ZNS), Drainage von Abfallprodukten ins Blut sowie dem mechanischen Schutz des Gehirns (Huhmer et al. 2006).
Gebildet wird der Liquor in den Plexus choroidei der Ventrikel, den so genannten inneren Liquorräumen durch aktiven Transport des Choroidalepithels und Filtration des Plasmas über die Kapillaren des Choroidplexus (Reiber 2003a). Liquor fließt von den inneren Liquorräumen in den äußeren Liquorraum, den Subarachnoidalraum und wird dort über die Subarachnoidalzotten in die venösen Sinus rückresorbiert. Bei einem Gesamtvolumen von 165ml (Reiber 2003a) variiert die tägliche Liquorproduktion altersabhängig von 500ml/d bei jungen bis 250ml/d bei älteren Menschen (May et al. 1990).

1.2.1 Liquorproteine

Der Proteingehalt im Liquor ist verglichen mit dem im Plasma deutlich geringer. Nur etwa 20% der Liquorproteinmenge stammt aus dem Gehirn, nicht alle Proteine darunter sind jedoch hirnspezifisch. Der Großteil der Liquorproteine stammt aus dem Blut und beträgt im normalen Liquor bis zu 80%, wovon Albumin den weitaus größten Teil ausmacht (Reiber et al. 2001b). Die Plasmaproteine gelangen durch Diffusion oder aktiven Transport über die Blut-Liquor-Schranke aus dem Plasma in den Liquor. Den Diffusionsgesetzen folgend geschieht der Austausch größerer Moleküle wie beispielsweise IgM langsamer und resultiert in einem steileren Konzentrationsgradient zwischen Blut und Liquor (3000:1), als dies bei kleineren Molekülen wie Albumin (200:1) der Fall ist (Reiber et al. 2001b, Felgenhauer 1974).

1.2.2 Blut-Liquor-Schranke

Die Blut-Liquor-Schranke bezeichnet keine morphologisch fassbare Struktur, sondern beschreibt pauschal das Verhältnis der Proteinkonzentrationen zwischen venösem Blut und Liquor. Spricht man in diesem Zusammenhang von einer Schrankenfunktionsstörung, ist damit ein erhöhter Proteingehalt im Liquor im Verhältnis zum Serum gemeint. Viele neurologische Krankheiten gehen mit einer erhöhten Liquorproteinkonzentration einher, die als Blut-Liquor-Schrankendysfunktion bezeichnet wird. Die Vorstellung eines „Lecks“ der Blut-Liquor-Schranke als Ursache wird zunehmend von der Vorstellung abgelöst, dass der erhöhten Proteinkonzentration einer verringerten Liquorflussrate zu Grunde

liegt und dabei die Durchlässigkeit bzw. Selektivität der Blut-Liquor-Schranke unverändert bleibt (Reiber 2003a). Als Maß für die Schrankenfunktion dient der Liquor/Serum-Konzentrationsquotient von Albumin (Andersson et al. 1994). Albumin ist ein Serumprotein, das ausschließlich in der Leber und nicht im Gehirn synthetisiert wird. So stammt das im Liquor gemessene Albumin ausschließlich aus dem Blut und ist somit ein idealer Parameter, um alle Einflüsse und Einschränkungen für die Passage eines Proteins vom Blut in den lumbalen Liquor zu charakterisieren, einschließlich der individuellen Liquorflussgeschwindigkeit (Reiber 2003a). Da die Liquorproduktion und so auch der Liquorfluss mit steigendem Alter abnimmt, nimmt dementsprechend auch der Albuminquotient mit steigendem Alter zu.

1.2.3 klinische Relevanz

Von klinischer Bedeutung ist die Liquordiagnostik bisher in der Diagnosestellung neurologischer Erkrankungen wie der Alzheimer-Demenz oder entzündlicher Erkrankungen wie der Multiplen Sklerose oder der Meningitis (Tumani et al. 2009). Dabei kann der durch Lumbalpunktion gewonnene Liquor auf für die jeweilige Krankheit charakteristische Veränderungen hin untersucht werden.

1.3 Proteomanalyse

1.3.1 Das Proteom

Die Gesamtheit aller Proteine einer Zelle, eines Organismus oder einer Körperflüssigkeit zu einem bestimmten Zeitpunkt unter genau definierten Bedingungen werden als 'Proteom' bezeichnet (Deutsche Gesellschaft für Proteomvorschung e.V.).

Im Gegensatz zum Genom, das eine statische Größe darstellt, stellt das Proteom eine dynamische Größe dar. Ein Gen kann durch Transkriptionsregulation, alternatives Spleißen oder posttranslationale Modifikationen zu einer Vielzahl verschiedener Genprodukte führen. So spiegelt die Untersuchung auf Proteinebene die pathophysiologischen Prozesse im untersuchten Organismus näher wider als die Analyse auf Genom- oder Transkriptebene. (Banks et al. 2000) Die Methoden der Proteomik ermöglichen zudem, ohne vorausgehende Annahme von Kandidat- Molekülen das gesamte Proteom in einem gegebenen Gewebe oder einer Körperflüssigkeit zu untersuchen (Taurines et al. 2011).

1.3.2 Methoden der Proteomanalyse

Die Proteomanalyse besteht aus zwei wesentlichen Komponenten: der Proteinfraktionierung und der Proteinidentifikation. Gelelektrophorese und Säulen-Chromatographie sind die gängigsten Methoden zur Proteinfraktionierung, denen sich die Massenspektrometrie zur Proteinidentifikation anschließt (Minden 2007).

2D-Gelelektrophorese

Die klassische Gel- basierte Methode zur Proteinfraktionierung, wie sie in der vorliegenden Arbeit durchgeführt wurde, ist die 2D-Gelelektrophorese. Das Prinzip beruht auf der Kombination zweier unterschiedlicher Trennschritte. Im ersten Schritt erfolgt die Auftrennung der Proteine bezüglich ihres isoelektrischen Punktes, genannt isolelektrische Fokussierung (IEF). Anschließend werden die Proteine in der zweiten Dimension nochmals nach ihrer elektrophoretischen Mobilität durch konventionelle SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE) aufgetrennt. Durch die Kombination dieser beiden Techniken orthogonal zueinander kann eine besonders hoch auflösende Trennung erreicht werden.
Ein Problem der 2D ist das hohe Maß an Gel- zu Gel- Variabilität der Spot-Muster, die es erschweren, zwischen einer echten biologischen Variation und einer experimentell bedingten Variation zu unterscheiden (Alban et al. 2003).

DIGE

Die Technik der difference in gel Gelelectrophoresis (DIGE, erstmals 1997 von Minden et al beschrieben) ermöglicht das simultane Auftrennen mehrerer Proben in einem Gel und verringert so das Problem der Gel- zu- Gel- Variabilität. Dazu werden die Proteine jeder Probe mit jeweils unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen markiert (Minden 2012). Die Markierung der Proteine erfolgt nach dem Prinzip des Minimal- Labeling. Das heißt, das Verhältnis von Farbstoff (Dye) zu Protein wird sehr niedrig gewählt, um zu erreichen, dass an jedes Protein nur maximal ein Dye Molekül bindet. Insgesamt werden nur 3-5% der in der Probe vorhandenen Proteine markiert (Marouga et al. 2005a).Die NHS-reaktive Gruppe (*N*-Hydroxysuccinimid) der Farbstoffe bindet kovalent über eine Amidbindung an die ε- Aminogruppe der Lysine im Protein. Dabei wird die einfach positive Ladung des Lysins durch die einfach positive Ladung des Farbstoffes

ersetzt, wodurch der isoelektrische Punkt des Proteins im Vergleich zum unmarkierten Protein unverändert bleibt (GE Healthcare).
Nach der elektrophoretischen Auftrennung können die Farbstoffe auf Grund ihrer spezifischen Exzitations- Wellenlängen getrennt visualisiert und verglichen werden.
Im Anschluss an die Software-gestützte Auswertung der Expressionsmuster werden die Proteine, bei denen eine unterschiedliche Abundanz festgestellt wurde, mittels Massenspektrometrie identifiziert (z.B. MALDI-MS= Matrix unterstützte Laser-Desorptions-/Ionisations- Massenspektrometrie).

MALDI TOF

In vorliegender Arbeit wurde zur Proteinidentifikation die Matrix Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight- Massenspektrometrie (MALDI-TOF-MS) angewandt, die auf der massenabhängigen Flugzeit eines beschleunigten Ions beruht. Bei der MALDI wird das zu untersuchende Protein zunächst enzymatisch mittels Trypsin gespalten. Die Peptide werden dann mit einer Matrix kokristallisiert. Durch einen Laser wird das Probenmaterial aus der Matrix gelöst und gleichzeitig ionisiert, indem Protonen von den Matrixmolekülen auf das Protein übertragen werden. Diese Ionen werden durch ein Hochspannungsfeld in einem Vakuum beschleunigt und durch einen Detektor registriert. Da die Flugzeit vom Masse-/Ladungsverhältnis der Ionen abhängt, kann durch die Messung der Flugzeit auf deren Masse zurückgeschlossen werden (Doran et al. 2007). Aus der Zusammenschau der Massen der einzelnen Peptid- Stücke ergibt sich ein Profil, das als so genannter „Peptid- Fingerprint“ ein bestimmtes Protein eindeutig definiert. Ein Vergleich dieser Profile mit bestehenden Datenbanken erlaubt so die Identifikation der meisten Proteine. MALDI-MS zeichnet sich durch kurze Analysezeiten, hohe Empfindlichkeit und die Möglichkeit zur Auomatisierung aus (Marvin et al. 2003).

1.4 Aufgabenstellung und Zielsetzung

Die Diagnosestellung der Schizophrenie ist nach wie vor klinisch orientiert und basiert auf der Anamnese von Patienten und Angehörigen. Bisher steht kein laborchemischer Test zur Diagnosesicherung zur Verfügung. Die Liquoranalyse dient bei der Diagnostik der Schizophrenie bisher lediglich zum Ausschluss anderer Symptomursachen, da bisher noch keine krankheitsspezifischen Marker identifiziert werden konnten.

Ziel dieser Arbeit war es deshalb, Biomarker im Liquor schizophrener Patienten zu finden, welche sowohl dazu beitragen könnten, die Diagnosestellung zu erleichtern, als auch die Pathogenese der Erkrankung besser zu verstehen. Hierfür wurden mit Hilfe der 2D-DIGE und MALDI-TOF Proteine im Liquor schizophrener Patienten identifiziert, deren Konzentration sich von der im Liquor gesunder Kontrollen unterscheidet. Die Ergebnisse wurden anschließend an einem größeren Kollektiv mittels 2D-Immunoblot, Western-Blot und ELISA validiert. Zusätzlich wurden die Liquorkonzentrationen der hirnspezifischen Proteine Tau, Beta-Amyloid, S100B und Orexin A vergleichend bestimmt.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte und Laborbedarf

Blotgerät (TE 77 ECL Semi-Dry Transfer Unit)	GE Healthcare, München
Blotmembran (Immobilon- P Transfer Membran)	Millipore, Bredford, MA, USA
ECL-Kamera (Image Quant LAS 4000)	GE Healthcare, München
Elektrophoreseeinheit (Mini-PROTEAN Tetra Cell)	BioRad, München
Elekrophoreseeinheit (Ettan Dalt II)	GE Healthcare, München
Feinwaage	Sartorius AG, Göttingen
Filtrationseinheiten (VIVASPIN 2)	Sartorius AG, Göttingen
Fluoreszenzscanner (Ettan Dalt)	GE Healthcare, München
Fokussier-Einheit IPGphor	Pharmacia Biotech, Schweiz
Gamma Counter (Gamma Master 1277).	LKB Wallac, Turku,. Finnland
Gelgießeinheit (Ettan Dalt II System)	GE Healthcare, München
Glasplatten klein	BioRad, München
Gießeinheit klein	BioRad, München
Immobiline DryStrip Reswelling Tray	GE Healthcare, München
Immobiline DryStrip 18cm (pH 4-7)	GE Healthcare, München
Immobiline DryStrip 7cm (pH 3-5,6)	GE Healthcare, München
Konzentrator (Concentrator 5301)	Eppendorf, Hamburg
Magnetrührer	IKA, Staufen
Parafilm	Pechiney Plastic Packaging, Neenah, WI, USA
Pipetboy Pipetus	Hirschmann, Eberstadt
Pipetten (10, 20, 100, 200, 1000µl)	VWR, Darmstadt
Pipettenspitzen	Sarstedt, Nümbrecht
Reaktionsgefäße	Sarstedt, Nümbrecht
Rotationsschüttler (Thermomixer comfort)	Eppendorf, Hamburg
Rüttelplatte (GFL 3006)	GFL, Burgwedel

Spannungsquelle (Electrophoresis power supply Consort EV231)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Vortexer (Vortex Genie 2)	Scientific Industries, Bohemia, USA

Zentrifugen

Centrifuge 5810R	Eppendorf, Hamburg
Biofuge pico	Heraeus, Hanau
Biofuge fresco	Heraeus, Hanau
Sorvall RC 3B Plus	Thermo Fisher Scientific Rochester, USA

2.1.2 Chemikalien und Reagenzien

Aceton	Sigma-Aldrich, Steinheim
Acrylamid 30%	BioRad, Hercules CA, USA
Agarose	Sigma-Aldrich, Steinheim
Albumin und IgG removal Kit	GE-Healthcare, München
Ammoniumpersulfat (APS)	AppliChem, Darmstadt
Borsäure	J.T. Baker, Deventer NL
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt
Butanol	Merck, Darmstadt
CHAPS	Merck, Darmstadt
G-Dye- Stocklösung	DyeAgnostics, Halle Saale
Dimethylformamide	DyeAgnostics, Halle Saale
DL- Dithiothreitol	Sigma, Steinheim
HRP Component A und B	PJK, Kleinblittersdorf
Essigsäure	Fluka, Seelze
Ethanol	Sigma-Aldrich, Steinheim
Formaldehyd	Calbiochem, USA
Glycerin (100%)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Harnstoff	Applichem, Darmstadt
Iodacetamid	Sigma-Aldrich, Steinheim
IPG- Puffer	GE- Healthcare, München
Isopropanol	Sigma-Aldrich, Steinheim
Magic Mark XP Western Protein Standard	Invitrogen, Karlsruhe

2- Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, Steinheim
Methanol	Sigma-Aldrich, Steinheim
Milchpulver	Carl Roth, Karlsruhe
$Na_2S_2O_3$	AppliChem, Darmstadt
Natriumcarbonat	Merck, Darmstadt
PlosOne DryStrip Cover Fluid	GE Healthcare, München
Phosphat- buffered- saline (PBS)	Biochrome AG, Berlin
Roti- Load 1 4x konzentriert	Roth, Karlsruhe
Salzsäure	VWR International GmbH, Darmstadt
Sodiumdodecylsulfat (SDS)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Silbernitrat	AppliChem, Darmstadt
TEMED	Serva, Heidelberg
Thioharnstoff	Fluka, Steinheim
Trizma base	Sigma-Aldrich, Steinheim
Tween 20	AppliChem, Darmstadt

2.1.3 Antikörper

Anti-Apo A-IV-IgG (aus Maus)	Abcam, Cambridge, UK
Anti-Serpin A-I-l IgG (aus Maus)	Antibody R&D Systems
Horseradish peroxidase-conjugated polyclonal Goat Anti-Mouse 1g/l	Dako, Glostrup, Dänemark

2.1.4 Assays

Human S-100B ELISA	BioVendor, Brno, Tschechien
Orexin A- RIA- Kit	Phoenixpharmaceuticals, Inc.
Tau INNOTEST® hTau Ag	Innogenetics, Gent, Belgien
ß- Amyloid INNOTEST® ß- AMYLOID$_{(1-42)}$	Innogenetics, Gent, Belgien
Haptoglobin-ELISA	GenWay Biotech, San Diego

2.1.5 Software

Microsoft Office PowerPoint 2007	Microsoft Corporation, USA
Microsoft Office Excel 2007	Microsoft Corporation, USA
Microsoft Office Word 2007	Microsoft Corporation, USA
Graph PadPrism 05	GraphPad Software, San Diego, CA

Protein Statistics in CSF analysis with ReibergramsVersion 3.0	COMED GmbH, Soest
DeCyder Version 5.02	GE Healtcare, München
Quantity one	BioRad, München

2.1.6 Puffer und Lösungen

Lysispuffer für CyDye-Labeling

7 M	Harnstoff (reinst)
2 M	Thioharnstoff
4 % (w/v)	CHAPS (reinst)
30 mM	TRIS-HCl pH 8,1 bei 10 ℃

Rehydrierungspuffer für IPG-Streifen(=Lysepuffer)

7 M	Harnstoff (reinst)
2 M	Thioharnstoff
4 % (w/v)	CHAPS (reinst)
1 % (w/v)	DTT (reinst)
1 % (v/v)	IPG-Puffer (pH entsprechend dem der IPG-Streifen, also hier pH 4-7)

4x Lysepuffer

7 M	Harnstoff
2 M	Thioharnstoff
4 %	CHAPS
4 %	DTT
4 %	IPG- Puffer

Äquilibrierungspuffer 1

1 %	DTT
50 mM	TRIS-HCl pH 8,8
3 %	SDS
6 M	Harnstoff
30 %	Glycerin (100 %)

Äquilibrierungspuffer 2

4 %	IAA
50 mM	TRIS-HCl pH 8,8
3 %	SDS
6 M	Harnstoff
30 %	Glycerin (100 %)

Laufpuffer TRIS-Glycin-Gele

Anoden-Laufpuffer

25 mM	Tris
192 mM	Glycin
0,1%	SDS

Kathoden-Laufpuffer

50 mM	Tris
384 mM	Glycin
0,2 %	SDS

Trenngelpuffer

1,5 M Tris-HCl pH 8,8

0,4 % SDS

Sammelgelpuffer

0,5 M Tris-HCl pH 6,8

0,4 % SDS

Blotpuffer

Stammlösung A

Tris-HCl 2,1 M, pH 10,4

ad 1000 ml ddH_2O

ad 2000 ml ddH_2O

Blotpuffer A

200 ml Stammlösung A

600 ml Methanol

Stammlösung B+C

Tris-HCl 250 mM/ pH 10,4

ad 1000 ml ddH2O

Blotpuffer B

200 ml Stammlösung B+C

600 ml Methanol

ad 2000 ml ddH_20

Blotpuffer C

200 ml Stammlösung B+ C

ad 1500 ddH_20

mit Borsäure (0,5 M) auf pH 9 einstellen

Agaroselösung

0,5 % (w/v) Agarose in Kathoden-Laufpuffer

10-fach PBS

95,5g PBS

ad 1000 ml ddH_2O

PBS-Tween
100 ml 10-fach PBS
0,075 % Tween

Blockpuffer
5 % Milchpulver
ad 100 ml PBS-Tween

2.1.7 Liquorproben

Probengewinnung

Die verwendeten Proben wurden aus der Liquorsammlung des Liquorlabores der Universitätsklinik Ulm zur Verfügung gestellt. Alle Proben wurden durch Liquorpunktion in der psychiatrischen beziehungsweise neurologischen Universitätsklinik Ulm zu diagnostischen Zwecken gewonnen. Unmittelbar nach der Entnahme wurden die Routine-Liquorparameter (im Liquorlabor der Universitätsklinik Ulm) bestimmt. Dazu gehören Zellzahl, Gesamtprotein, Laktat, Albumin, Liquor/Serum-Albuminquotient, Immunglobuline und oligoklonale IgG Banden. Bis zum weiteren experimentellen Gebrauch wurden die Liquorproben bei -80℃ gelagert.

Probenauswahl

Es wurden insgesamt 12 Schizophreniepatienten ausgewählt, davon jeweils 6 Frauen und 6 Männer. Alle Patienten waren akut stationär behandelte Patienten der psychiatrischen Universitätsklinik Ulm, Abteilung Psychiatrie III.

Die Diagnose einer paranoiden Schizophrenie wurde von Psychiatern der Universitätsklinik anhand des DSM IV gestellt. Es wurden ausschließlich Patienten mit der Erstdiagnose einer Schizophrenie ausgewählt, bei denen keine psychiatrische Vorgeschichte bekannt war. Entsprechend sind es junge Patienten, deren Alter im Mittel bei 23,6 Jahren lag (Standardabweichung 3,0 Jahre). Zum Zeitpunkt der Diagnosestellung lagen sowohl Positiv- als auch Negativsymptome vor, wobei alle Patienten an einer akuten Psychose litten. Mittels Magnetresonanztomografie (MRT) wurden sichtbare zerebrale Veränderungen ausgeschlossen. Auch wurde darauf geachtet, dass keine chronische oder

entzündliche neurologische oder internistische Erkrankung vorlag, die unter Umständen Einfluss auf den Liquor haben könnten. Zudem wurden Patienten mit anamnestisch bekanntem regelmäßigem Substanzabusus (Alkohol, Drogen) sowie Patienten mit vorbestehender Medikamenteneinnahme ausgeschlossen. Im Routineliquorbefund lag ein Normalbefund vor.

Im Anschluss daran wurden entsprechend dazu geeignete Normalkontrollen ausgewählt. Diese Patienten befanden sich jeweils im neurologischen Universitäts- und Rehabilitationsklinikum Ulm in stationärer Behandlung. Es wurden die Diagnosen Spannungskopfschmerz, Migräne, Lumboischialgie oder Zervikobrachialgie gestellt. Diese Kontrollgruppe wurde bezüglich Alter, Geschlecht und Standardliquorbefund passend zur Gruppe der Schizophrenie-Patienten ausgewählt (siehe Tab.1). Im MRT, dem Routine-Labor und der neurologischen Untersuchung wurde ein Normalbefund erhoben. Zudem lag bei diesen Patienten ebenfalls kein regelmäßiger Substanzabusus vor.

Tab. 1: Alter, Geschlecht und Standardliquorbefund der beiden Gruppen Angegeben sind Mittelwert ± Standardabweichung

	Patienten Schizophrenie	**Patienten Kontrolle**
Anzahl Proben	12	12
Geschlecht (m/w)	6/6	6/6
Alter (Jahre)	23,7 ±2,7	24,4 ±4,2
Zellzahl (/µl)	1,0 ±1,2	0,5 ±0,9
Laktat (mmol/l)	1,4 ±0,2	1,5 ±0,2
Gesamtprotein (mg/l)	438,2 ±196,3	353,8 ±169,5
Albuminquotient ($x10^{-3}$)	5,6 ±2,9	4,1 ±2,2

Medikation

Die akute Psychose aller ausgewählten Schizophrenen Patienten wurde bis zur Liquorpunktion zunächst mit atypischen Neuroleptika (Risperidol oder Olanzapin) behandelt. Keiner der Patienten wurde jedoch bis zum Zeitpunkt der Liquorpunktion länger als 4 Wochen antipsychotisch behandelt.

Um die unterschiedlichen Medikationen zwischen den einzelnen Patienten vergleichbar zu machen, wurden die Antipsychotika-Dosen in Chlorpromazin-

Äquivalente (CPE) umgerechnet (nach Woods 2003). Dabei entsprechen jeweils 2mg/d Risperidol und 5mg/d Olanzapin einer Dosis von 100mg/d Chlorpromazin.

Tabelle 2: Antipsychotische Medikation der 12 gelelektrophoretisch untersuchten Patienten bis zum Zeitpunkt der Liquorpunktion (LP). Das Chlorpromazin-Äquivalent (CPE) ist sowohl als Tagesdosis als auch unter Berücksichtigung der Einnahmedauer als kumulative Dosis angegeben. M1-6: Männer, F1-6: Frauen

	Medikationsdauer bis LP (d)	Tagesdosis (CPE in mg/d)	kumulative Dosis (CPE in mg/d)
M1	12	300	3600
M2	7	100-300	1300
M3	13	200-400	4400
M4	3	100-200	500
M5	25	50-300	2350
M6	6	250	1500
F1	12	100-200	2300
F2	15	200-400	4600
F3	1	200	200
F4	24	200-400	8600
F5	3	300	900
F6	7	50-100	600

2.2 Methoden

2.2.1 Erfassung der Liquorparameter

Standardliquorbefund

Die Standardliquordiagnostik wurde im Rahmen der klinischen Diagnostik im Liquorlabor der neurologischen Universitätsklinik Ulm erhoben. Sie beinhaltet die nephelometrische Konzentrationsbestimmung der Immunglobuline IgA, IgM und IgG, Albumin und des Gesamtproteins. Die oligoklonalen Banden wurden mittels isoelektrischer Fokussierung detektiert.

Immunglobuline im Liquor

Um die Herkunft der Immunglobuline (Ig) im Liquor zu beurteilen, wurden diese mittels der Methode nach Reiber erfasst. Dabei werden die Liquor/Serum-Quotienten von IgG, IgA und IgM jeweils im Verhältnis zum Liquor/Serum-Albuminquotient betrachtet. So ist es möglich, die intrathekale Immunglobulinfraktion unabhängig von der individuellen Schrankenfunktion und der individuellen Serumkoznetration zu betrachten. Somit ist ablesbar, ob

bestimmte Immunglobuline im Serum oder intrathekal produziert werden. Im Reibergramm bezeichnet Qlim die hyperbole Grenzlinie zur Unterscheidung zwischen intrathekal gebildeter und aus dem Blut stammender Immunglobulinfraktion im Liquor. Werte oberhalb von Q_{Lim} repräsentieren die intrathekale Fraktion in Prozent der gesamten Immunglobulinkonzentration im Liquor (Abb.1). Die hyperbolen Grenzlinien wurden zunächst empirisch ermittelt (Reiber et al. 1987) und wurden durch die Theorie für molekulare Diffusions/Liquorflussrate gestärkt (Reiber 1994). Im Reibergramm wird die Grenze für den altersabhängigen Referenzbereich des Albuminquotients nach folgender Formel berechnet: Q_{Alb}= (4+ Alter(Jahre)/15) x 10^{-3} (Reiber et al. 2001a)

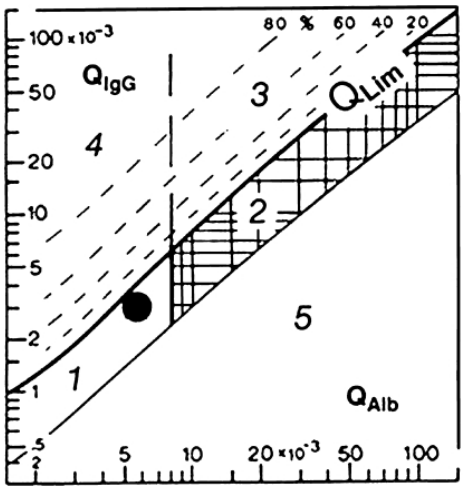

Abb.1: Liquor/Serum-Quotienten-Diagramm für IgG nach Reiber

Abszisse: Q_{alb}(Liquor/Serum-Quotient Albumin) Ordinate: Q_{IgG} (Liquor/Serum-Quotient IgG) Q_{Lim}: Grenze zwischen intrathekaler und peripherer IgG- Fraktion.

Es werden 5 Bereiche unterschieden: 1 normale Schrankenfunktion ohne intrathekale IgG-Synthese, 2 isolierte Schrankenstörung, 3 Schrankenstörung kombiniert mit intrathekaler IgG-Synthese, 4 Intrathekale IgG- Synthese ohne Schrankenstörung 5 ist nicht möglich und deutet auf einen methodischen Messfehler hin.

2.2.2 2D-DIGE

Die Methode der DIGE ermöglicht es, mehrere Proben in ein und demselben Gel gemeinsam aufzutrennen. Das Vorgehen hierfür ist in Abb.2 schematisch dargestellt.

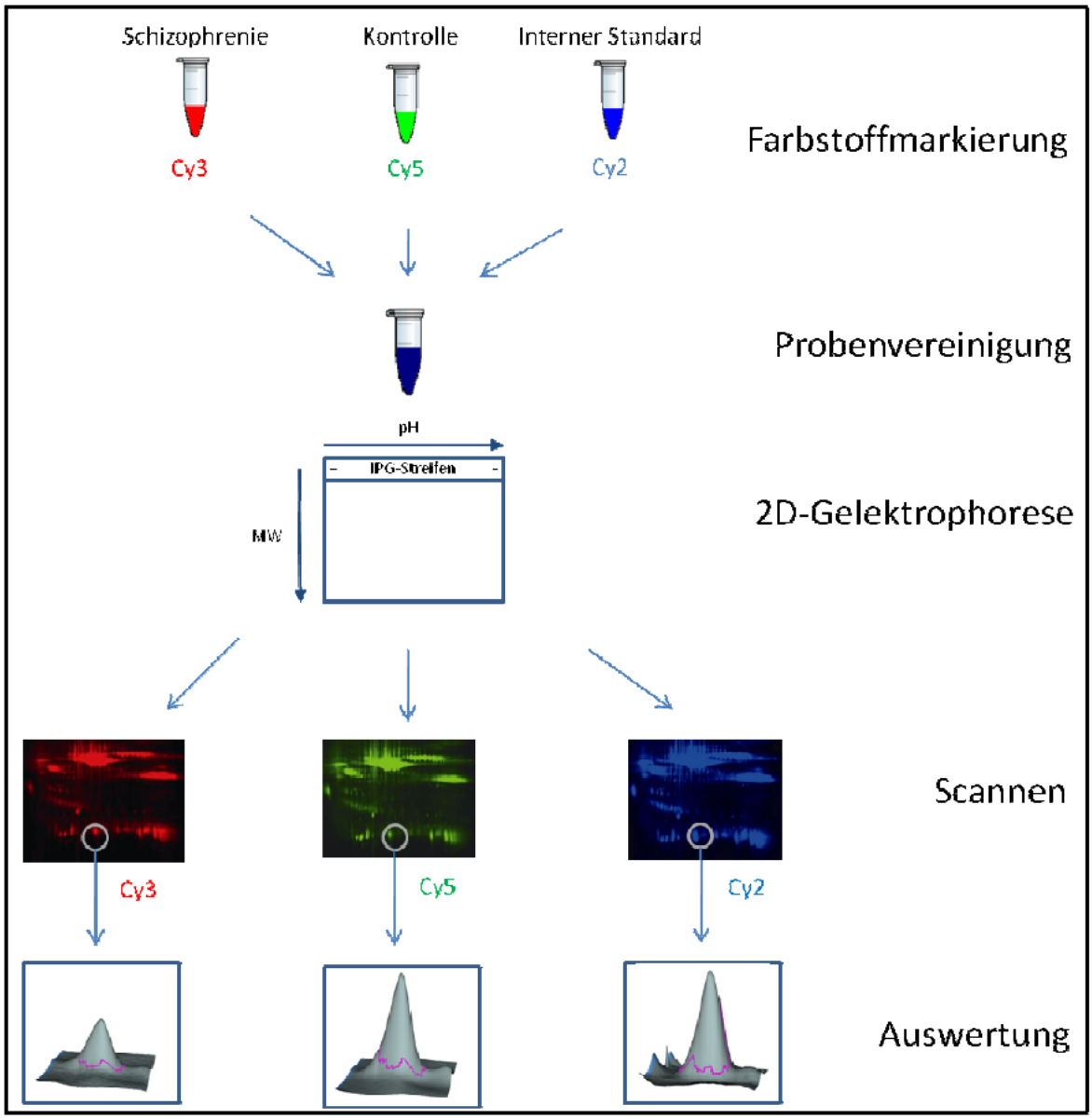

Abb.2 Schematische Darstelllung der 2D-DIGE Methode.

Die Schizophrenie- und Kontrollproben werden mit Cy3 oder Cy5 markiert, der interne Standard mit Cy2. Diese drei Proben werden gemischt und gemeinsam in einem Gel zweidimensional aufgetrennt. Beim Scannen entstehen entsprechend der 3 unterschiedlichen Farbstoffe pro Gel 3 Gelbilder. Diese Gelbilder werden mit der DeCyder Software ausgewertet, um unterschiedlich exprimierte Spots zu lokalisieren. Diese Spots werden schließlich aus dem Gel entnommen und massenspektromoetrisch identifiziert. IPG: immobilisierter pH-Gradient; Cy: Cyanin-Farbstoff; MW: Molekülmasse

Probenaufbereitung

Einengen und Entsalzen

Zunächst wurden die Liquorproben bei Raumtemperatur aufgetaut, 10 Sekunden gevortext und davon jeweils 600 µl in die Filtrationseinheiten pipettiert. Nun wurden die Proben bei 20℃ und 3000 rpm solange zentrifugiert, bis der Liquor auf ca. 50-100 µl eingeengt war.

Albumin- und IgG-Entfernung

Der Anteil von Albumin und IgG am Proteingehalt in humanem Liquor beträgt bis zu 80 %. Da diese in der 2D-Elektrophorese geringer konzentrierte Proteine überlagern würden, ist es erforderlich, diese Proteine vorher zu entfernen. Hierfür wurde das „Albumin and IgG Removal kit“ von GE Healthcare verwendet.

Zu den eingeengten Proben wurde jeweils 450 µl der Agarosegebundenen Antikörper zugegeben. Anschließend erfolgte einstündige Inkubation auf einem Rotationsschüttler mit 1400 rpm. Nach 5-minütiger Zentrifugation bei 4℃ wurde der nun Albumin- und IgG verarmte Überstand vorsichtig entnommen.

Acetonfällung

Der Albumin- und IgG verarmte Liquor wurde mit dem dreifachen Volumen an -20℃ kaltem Aceton aufgefüllt und nach kurzem Vortexen für mindestens eine Stunde bei –20℃ gefällt. Die Proteine wurden dann 20 Minuten mit 1300 rpm bei 4℃ pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet nun so lange an der Luft getrocknet, bis sich keine Flüssigkeitsreste mehr in den Eppendorfgefäßen befanden.

Die Proteinpellets wurden anschließend mit jeweils 31 µl Lysispuffer versetzt und für eine Stunde auf dem Rotationsschüttler in Lösung gebracht.

Farbstoffmarkierung

Zunächst wurde aus jeder nun 30 µl enthaltenden Probe ein Aliquot von 10 µl entnommen und zum internen Standard vereint. Vor Gebrauch mussten die bei -20℃ gelagerten Farbstoffe aufgetaut und mit Dimethylformamid (DMF) rekonstituiert werden. Dazu wurde je 0,25 µl des Farbstoffes mit DMF auf 1 µl aufgefüllt. Anschließend wurde in je 20 µl Probenvolumen 1 µl des verdünnten Farbstoffes zugegeben. Der interne Standard wurde mit Cyanin (Cy) 2 markiert, die Proben der schizophrenen Patienten und der Kontrollpatienten wurden jeweils

im Wechsel mit Cy3 und Cy5 markiert, um eine einseitige Beeinflussung der Auswertung durch den Farbstoff auszuschließen. Die Proben wurden kurz anzentrifugiert und für 30 Minuten auf Eis gestellt.
Um die Markierungsreaktion zu stoppen, wurde 1 µl einer 10 mM Lysin- Lösung in jedes 20+1µl Aliquot pipettiert, in den internen Standard die entsprechend vervielfachte Menge. Die Proben wurden daraufhin nochmals für weitere 10 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wurde jeweils eine mit Cy5 markierte Kontrolle (22 µl) mit einer Cy3 markierten Schizophrenieprobe (22 µl) (bzw. umgekehrt) und dem internen Standard (22 µl) vereint. Zum Schluss wurde 22 µl des 4x *CyDye* Lysispuffers hinzugegeben.

Isoelektrische Fokussierung (erste Dimension)

Bei der Isoelektrischen Fokussierung (IEF) werden die Proteine auf einen Gelstreifen mit immobilisiertem pH-Gradient (IPG-Streifen) aufgetragen und durch Anlegen eines elektrischen Feldes ihrem isoelektrischen Punkt entsprechend aufgetrennt. Die Proteine wandern im Gel bis zu dem Punkt, an dem der pH-Wert der Matrix ihrem isoelektrischen Punkt entspricht.

Rehydrierung der Streifen

Für die IEF wurden Streifen mit 240 mm Länge und einem pH-Bereich von 4-7 verwendet. Die Streifen wurden vor Gebrauch bei -80℃ gelagert.
Um die Streifen verwenden zu können, mussten diese zunächst in Lysispuffer rehydriert werden.
Der „Immobiline DryStrip Reswelling Tray“ ist ein Plexiglasgefäß, in dem die Gelstreifen in einzelnen Quellkammern waagerecht rehydriert werden.
In jede zu beladende Kammer wurde 1200 µl des Rehydrierungspuffers pipettiert. Anschließend wurden die aufgetauten Gelstreifen luftblasenfrei mit der Gelseite nach unten in die Quellkammern gelegt. Daraufhin wurde jede streifenbeladene Kammer mit 2-3 ml Paraffin überschichtet. Die Rehydrierung erfolgte über Nacht bei Raumtemperatur.

Isoelektrische Fokussierung

Vorbereitend wurde der Keramikboden der Fokussiereinheit mit ca. 125 ml Paraffin-Öl geflutet. Die rehydrierten Streifen wurden mit der Gelseite nach oben

mittig in die einzelnen Keramikvertiefungen gelegt. Dabei zeigte das azide Streifenende zur Anode und das basische entsprechend zur Kathode. Auf die jeweiligen Streifenenden wurden mit destilliertem Wasser befeuchtete Filterpapierstreifen so gelegt, dass sie an einer Seite das Gel der Streifen überlappten. Die Klemmelektroden wurden nun so aufgebracht, dass sie Kontakt zu den Papierstreifen hatten. Die Proben-Behälter wurden an der anodischen Seite eingeklemmt (Abb.3).



Abb.3: Der Aufbau der Fokussierungseinheit in Seitenansicht. 1: Fokussiereinheit 2: Gelstreifen 3: Filterpapier 4: Elektrode 5: Proben- Behälter

Die vorbereiteten Proben wurden dann jeweils in einen Probenbehälter pipettiert. Die isoelektrische Fokussierung erfolgte bei Raumtemperatur nach folgendem Protokoll:

Laufstundenprotokoll

	Zeit	Spannung	Einstellung
Stufe 1	8 h	300 V	step & hold
Stufe 2	6 h	1000 V	gradient
Stufe 3	4 h	8000 V	gradient
Stufe 4	3 h	8000 V	step & hold

<u>Äquilibrierung</u>

Die zweistufige Äquilibrierung dient dazu, einen optimalen Transfer der Proteine aus dem IPG-Streifen in das SDS-Gel zu erreichen. Die Äquilibrierung erfolgte in zwei Schritten unter ständigem Schütteln.

Im ersten Schritt wurden die Streifen zunächst 20 Minuten in 50 ml des Äquilibrierungspuffers 1 inkubiert. Das darin enthaltene DTT bewirkt eine

Reduktion der Disulfidbindungen. Die Reoxidation der Thiolgruppen wurde durch Iodacetamid im zweiten Äquilibrierungsschritt (20 Minuten) verhindert.

Zweite Dimension

Die Proteine wurden in der zweiten Dimension entsprechend ihrer Molekülmasse aufgetrennt.

Gießen der SDS- Polyacrylamidgele

Vorbereitend wurden zwei der gründlich gereinigten Glasplatten jeweils so übereinandergelegt, dass sie unten bündig übereinander lagen und somit oben eine Glasplatte 0,5 cm länger war als die andere.

Zum Gießen der Gele wurde die zum Ettan DALT II System (Firma Amersham Biotech, Uppsala) gehörende Gießkammer verwendet. In dieser Gießkammer können bis zu 14 Gele auf einmal gegossen werden. Zwischen die einzelnen Gelkassetten wurden ca. 1 mm dicke Trennfolien gelegt, um später die Entnahme der gefüllten Gelkassetten zu erleichtern. Der Verschlussdeckel wurde vorne mit Hilfe von 6 nicht zu fest angezogenen Schrauben angebracht. Anschließend wurde die Kammer senkrecht aufgestellt und die vorbereitete Acrylamid-Lösung zügig in das seitliche Reservoir eingefüllt. Die Lösung wurde solange eingegossen, bis sich der aufsteigende Flüssigkeitsspiegel ca. 1,5-2 cm unter der Oberkante der Gelplatten befand.

Die Gele wurden mit wassergesättigtem Butanol überschichtet und die Apparatur mit Parafilm abgedichtet. Die Polymerisation erfolgte über Nacht. Nach der Polymerisation wurden die Gelplatten entnommen, das Butanol abgegossen und die Gelplatten in feuchte Tücher gewickelt bis zum Gebrauch bei 4℃ gelagert.

Gellösung für 12,5 %-ige Gele: Volumen für 6 Gele (600 ml)

Acrylamid 30 % Stocklösung	250,2 ml
TRIS-HCl 1,5 M pH 8,8	150 ml
ddH_2O	190,8 ml
SDS-Lösung 10 %	13,2 ml
APS 10 %	3 ml
TEMED 10 %	0,198 ml

Die Gellösung wurde zunächst ohne TEMED angesetzt. Erst unmittelbar vor dem Gießen der Gele wurde TEMED unter intensivem Rühren hinzugefügt.

Aufbringen der IPG-Streifen auf das SDS-Gel

Die äquilibrierten Streifen wurden nun kurz im Kathodenlaufpuffer geschwenkt und dann zwischen den beiden Glasplatten bis zur Gelkante vorgeschoben, bis sie dem Gel jeweils bündig und luftblasenfrei anlagen. Zur Fixierung des Streifens wurde dieser mit ca. 2 ml erhitzter Agaroselösung (mit Bromphenolblau) überschichtet.

Nach Erkalten der Agarose wurden die Gelplatten in die zuvor mit 7,5 l Anoden-Laufpuffer gefüllte Ettan DALT II Elektrophoreseeinheit gestellt. Freie Plätze wurden mit Platzhaltern aus Plexiglas belegt. Gegebenenfalls musste noch etwas Anoden-Laufpuffer bis zu den Gummilippen nachgefüllt werden. Nun wurde die Kammer mit ca. 3 l Kathoden- Puffer (= 2x Anoden-Puffer) bis zum Überlaufventil gefüllt.

Die Elektrophorese erfolgte über Nacht bei durch ein internes Kühlaggregat konstant gehaltener Temperatur von 20℃. Die Elektr ophorese wurde jeweils beendet, wenn die Bromphenolblau-Lauffront das Ende des Gels erreicht hatte.

Laufprotokoll TRIS-Gele 12,5 % (Angaben pro Gel)

	Zeit	Bedingungen
Step 1	1 h	0,25 W
Step 2	2 h	0,5 W
Step 3	ca. 13 h	3,5 W

CyDye-Fluoreszenz-Scan mit Ettan DIGE Imager

Um die Fluoreszenz-markierten Proteine sichtbar zu machen, wurden die Gele unmittelbar nach Ende der Gelelektrophorese mit dem Ettan DIGE Imager eingescannt. Dazu wurden die Glasplatten von außen mit 70 % Ethanol gründlich gereinigt. Alle Gele wurden nacheinander mit denselben Einstellungen gescannt. Danach wurden die Gele bis zum Picken der Spots in feuchte Tücher gewickelt und bei 4℃ gelagert.

Die statistische Auswertung der eingescannten Gele erfolgte mit der DeCyder™ 2-D Differential Analysis Software. Zunächst wurde hiermit eine automatische

Spotdetektion durchgeführt. Die geschätzte Spotanzahl wurde auf 110000 Spots pro Gel festgelegt. Um richtig positive Spots einzuschließen und falsch positive Spots, wie z.B. Staubartefakte auszuschließen, wurden folgende Ausschlussparameter festgelegt: Slope 1,2; Area 80; height 80

Das Gel mit den meisten identifizierten Spots wurde als Mastergel definiert. Der erste automatisierte Vergleich der Gele mit dem Mastergel musste manuell überprüft werden. Die Zuordnung der sich in den verschiedenen Gelen entsprechenden Spots musste dann gegebenenfalls nachkorrigiert werden.

Zusätzlich erfolgte die Normalisierung des Volumens der Cy3 (Probe 1) und Cy5 (Probe 2) markierten Spots in Bezug zu den Cy2 (interner Standard) markierten Spots. Die bei der Auswertung selektierten Spots wurden anschließend aus dem Gel entnommen (sog. Picken).

Spot-Picken und Proteinidentifikation

Ein Ausdruck des eingescannten Gelbildes wurde zur Orientierung beim Picken der Spots verwendet, indem er exakt unter die Glasplatte gelegt wurde. So konnten die Spots auf dem Gel lokalisiert werden.

Die Proben wurden manuell ausgestanzt und jeweils separat in die Wells einer 96 Well Platte gegeben.

Die gepickten Proteinspots wurden auf Trockeneis gelagert nach Göttingen geschickt und dort im Max-Planck-Institut in der Arbeitsgruppe *Proteomics* von Dr. Olaf Jahn massenspektrometrisch analysiert. Hierfür kam ein Ultraflex MALDI-ToF Massenspektrometer zum Einsatz (Jahn et al. 2006). Die Proteinidentifikation erfolgte anhand einer Mascot-Suche gegen eine humane Datenbank.

Silberfärbung

Um nach dem Picken der Spots die Treffgenauigkeit zu überprüfen, wurden die Spots des entsprechenden Gels mittels Silberfärbung sichtbar gemacht. Die im Folgenden genannten Lösungen wurden jeweils mit bidestilliertem Wasser hergestellt, wobei jeweils ca. ein halber Liter Lösung pro Gel benötigt wurde.

Die einzelnen Schritte wurden nacheinander wie folgt durchgeführt:

Schritt	Reagenzien	Inkubationszeit
Fixierung	40 % Ethanol,10 % Essigsäure	2 h
Waschen	30 % Ethanol	2x 20 min
Waschen	bidestilliertes Wasser	1x 20 min
Sensitivierung	0,02 % $Na_2S_2O_3$ x $5H_20$	1x 1 min
Waschen	bidestilliertes Wasser	2x 20 sec
Färbung	0,2 % Silbernitrat	1x 20 min
Waschen	bidestilliertes Wasser	2x 20 sec
Entwicklung	3 % Na_2CO_3 + 0,05 % Formaldehyd	unter Sichtkontrolle
Stoppen	5 % Essigsäure	5 min
Waschen	bidestilliertes Wasser	

Die jeweiligen Lösungen wurden zusammen mit dem Gel in eine Glaswanne gegeben und während der Inkubationszeiten leicht geschwenkt. Nach Ablauf der Zeit wurde die jeweilige Lösung abgegossen und die nächste Lösung eingegossen. Der Schritt der Entwicklung erfolgte unter Sichtkontrolle, das heißt so lange, bis der gewünschte Grad an Intensität der Spots erreicht war.

2.2.3 2D-Immunoblot Alpha-1-Antitrypsin

Beim Immunoblot werden Proteine, die zuvor gelelektrophoretisch aufgetrennt wurden, auf eine Trägermembran übertragen und so fixiert. Die Proteine können dann mit Hilfe spezifischer Antikörper detektiert werden.

Für die 2D-Gelelektrophorese wurden 7 cm lange IPG-Streifen mit einem pH-Bereich von 3-5,6 verwendet. Die Rehydrierung der IPG-Streifen erfolgte analog zum oben beschriebenen Ablauf (IPG- Puffer nach Herstellerempfehlung: pH3,5-5,0).

Probenvorbereitung

Die bei -80 ℃ gelagerten Liquorproben wurden auf E is aufgetaut. 10 µl jeder Probe wurden mit 90 µl Lysepuffer versetzt (Zusammensetzung siehe S.1, IPG-Puffer pH-Bereich 3,5- 5,0) und für 5 Minuten bei Raumtemperatur geschüttelt.

Isoelektrische Fokussierung

Die rehydrierten Streifen wurden in das Fokussiergerät eingelegt und pro Streifen eine Liquorprobe aufgetragen.

Die Isoelektrische Fokussierung erfolgte über Nacht nach folgendem Protokoll:

Step 1 100 V= 4 h
Step 2 300 V= 4,34 h
Step 3 1000 V= 30 min
Step 4 5000 V= 1,30 h
Step 5 5000 V= 45 min
Step 6 500 V= ca.10 h

Die Äquilibrierung der Streifen erfolgte im Anschluss wie oben beschrieben in 2 Schritten.

Zum Gießen der Gele wurden zunächst jeweils zwei Glasplatten übereinander gelegt und in die Gelgießapparatur eingespannt. Folgende Lösungen wurden angesetzt (Menge für 6x 1 mm Gele):

Trenngel (12 %)		Sammelgel (4 %)	
H_2O	12,99 ml	H_2O	9 ml
Trenngelpuffer	9,75 ml	Sammelgelpuffer	3,75 ml
Acrylamid	16,26 ml	Acrylamid	2,25 ml
APS (10 %)	129 µl	APS (10 %)	75 µl
TEMED	60 µl	TEMED	30 µl

TEMED wurde jeweils erst kurz vor Gebrauch der Lösungen zugegeben.

Zunächst wurde das Trenngel bis zur Markierung gegossen und mit Isopropanol überschichtet. Nach der Polymerisation wurde das Isopropanol abgegossen, die Gelkante mit destilliertem Wasser nachgespült und die Restflüssigkeit mit Whatmanpapier aufgesaugt. Nun wurde das Sammelgel bis zur Glaskante gegossen und der Kamm oben aufgesteckt. Nach Polymerisation wurden der Kamm entnommen und die äquilibrierten Streifen nach kurzem Schwenken in 1x Lämmlipuffer bündig an die Gelkante angelegt und mit Agarose+ Bromphenolblau

überschichtet. Anschließend wurden die Glasplatten in die Halterung der Elektrophoreseeinheit eingelegt. Die Elektrophorese-Kammer wurde zu 1/3 mit 1x Lämmlipuffer befüllt.
Der Protein Standard (MagicMark) wurde 1:10 mit 4x Probenauftragspuffer Roti-Load 1 verdünnt und davon pro Gel jeweils 3,5 µl verwendet.
Die Elektrophorese lief bei einer Stromstärke von 25 mA pro Gel, 300V, 100W so lange, bis die Bromphenol-Lauffront das Ende des Gels erreicht hat.

Immunoblot

Die Immunoblots wurden mit Hilfe eines *Semi-Dry-Blotsystems* durchgeführt. Hierfür wurden zunächst Blotpapiere in den verschiedenen Blotpuffern (A, B, C) getränkt. Die Blot-Membran wurde mit Methanol aktiviert und anschließend mit Blotpuffer B befeuchtet. Nachdem der Boden der Blotkammer mit Blotpuffer B befeuchtet wurde, wurden nacheinander ein Blotpapier aus Puffer A, ein Papier aus B, die Membran, das Gel und zum Schluss zwei Blotpapiere aus Puffer C bündig und luftblasenfrei übereinander gelegt. Nach Befeuchten des Deckels mit Blotpuffer C wurde die Apparatur geschlossen und bei einer Stromstärke von 47 mA pro Gel für 45 Minuten geblottet.
Die freien Bindungsstellen auf der Membran wurden durch Inkubation in Blockpuffer blockiert, um unspezifische Bindungen des Antikörpers zu verhindern. Dies erfolgte unter Schütteln für mindestens 1 h bei Raumtemperatur.
Der primäre Antikörper (Anti-*Serpin A1,* Maus, monoclonal) wurde 1:1000 mit Blockpuffer verdünnt, davon 2,5 ml auf jede Membran gegeben und bei 4℃ über Nacht inkubiert.
Nach anschließendem Waschen der Membranen für 3x 10 min mit PBS-Tween wurde der sekundäre mit Meerettichperoxidase (HRP) konjugierte Antikörper 1:2000 mit Blockpuffer verdünnt und pro Membran 2 ml 1 h lang bei Raumtemperatur inkubiert.
Nach erneutem Waschen (3x 10 min mit PBS-Tween) erfolgte die Belichtung mit der Kamera.
Dazu wurde pro Membran jeweils 1 ml HRP-Komponente- A und B vereinigt und auf die Membran gegeben. Nach 5-minütiger Inkubation erfolgte die Belichtung für 30, 60 und 120 Sekunden.

2.2.4 Western-Blot Apolipoprotein A-IV

Für den Western-Blot von Apolipoprotein A-IV wurden die Liquorproben auf Eis aufgetaut und jeweils 150 µl auf 30 µl einrotiert. Anschließend wurde jeweils 10 µl 4xRoti hinzugegeben und die Proben für 5 Minuten bei 99℃ geschüttelt. Die vorbereiteten Gele wurden mit den Proben und 3,5 µl des Markers (siehe oben) beladen. Das weitere Vorgehen für Gelelektrophorese, Blot und Entwicklung erfolgte analog zum 2D-Immunoblot (S.14) Der anti Apo A-IV-Antikörper wurde in einer Verdünnung von 1:1000 verwendet.

2.2.5 ELISA S-100B, Tau, Beta-Amyloid und Haptoglobin

Die verwendeten ELISA-Kits zur Messung von S-100B, Tau und Beta-Amyloid beruhen alle auf dem Prinzip des Sandwich ELISA. Dabei werden zwei Antikörper verwendet, die spezifisch an das nachzuweisende Antigen binden. Die Mikroplatten sind bereits mit dem ersten Antikörper vorbeschichtet. Dieser bindet dann das Antigen der zugegebenen Probe. Nach Abwaschen der ungebundenen Probenbestandteile wird ein mit Biotin gekoppelter Antikörper hinzugegeben, der ebenfalls an das Antigen bindet und es entsteht ein Antikörper-Antigen-Antikörper-Komplex. Nach erneutem Waschen und Bindung von Peroxidase gelabeltem Streptavidin wird durch Zugabe eines Substrates ein Farbumschlag ausgelöst. Dieser Farbumschlag kann anhand der Absorption mit dem Mikroplattenleser gemessen werden. Die Absorption ist proportional zur Konzentration des zu messenden Proteins und kann mit Hilfe einer Standardreihe quantifiziert werden.
Die Assays sowie die Probenvorbereitung wurden jeweils entsprechend der Anweisungen des Herstellers durchgeführt. Für den Haptoglobin- ELISA wurden die Serumproben 1:50000 und die Liquorproben 1:30 verdünnt, ansonsten wurden die Proben unverdünnt verwendet.

2.2.6 Radioimmunoassay Orexin

Das verwendete Verfahren beruht auf dem Grundprinzip des Radioimmunoassays (RIA). Dabei wird das zu messende Antigen zusammen mit einer definierten Menge an radioaktiv markiertem Antigen (Tracer) mit spezifischen Antikörpern versetzt. Die markierten und unmarkierten Antigene konkurrieren so um die

begrenzte Zahl an Antikörperbindungsstellen. Entsprechend der Konzentrationsverhältnisse kommt es zur Gleichgewichtseinstellung. Im Anschluss werden die Antigen-Antikörper-Komplexe durch einen zweiten Antikörper von den ungebundenen Antigenen separiert. Die Messung des nach der Zentrifugation gewonnenen Präzipitates erfolgt im Gammazähler. Die Menge an markiertem Antikörper-gebundenem Antigen ist dabei umgekehrt proportional zur Antigenkonzentration der zu messenden Probe.

2.2.7 Statistische Auswertung

Die statistische Analyse und graphische Darstellung erfolgte mit GraphPad Prism 5 und Microsoft Office Powerpoint 2007. Die Signifikantstests wurden mit dem Students t-Test durchgeführt.

Für die Auswertung der 2D-DIGE-Gele wurde die Software DeCyder™ verwendet. Nach der automatischen Spotdetektion erfolgte die Zuordnung der miteinander korrespondierenden Spots zwischen den Gelen. Dieses sogenannte Spot-matching erfolgte in zwei Schritten: Zunächst durch die DeCyder-Software selbst gefolgt von einer gründlichen manuellen Nachkorrektur.

Es schloss sich die automatische Quantifizierung an. Dabei entsprechen die Spot-Volumina der Fluoreszenzintensität nach Subtraktion des Hintergrundes. Dieser Wert ist proportional zur Proteinmenge des jeweiligen Spots im jeweiligen Gel. Die so erhaltenen Abundanzfaktoren wurden auf den internen Standard normalisiert. Bei der statistischen Auswertung wurden die p-Werte mit dem Student’s t-Test berechnet. Im Anschluss an diese Analyse wurden die Spots herausgesucht, bei denen im Vergleich von Krank und Gesund ein p-Wert von unter 0,05 bestand.

3 Ergebnisse

In vorliegender Arbeit wurde das Liquorproteom schizophrener Patienten mit dem gesunder Kontrollen verglichen.

3.1 Immunglobuline im Liquor

Um die Immunglobulinfraktionen im Liquor zu vergleichen, wurden die aus der Routineliquordiagnostik stammenden Parameter nach Reiber ausgewertet (Abb.4). Es zeigten sich sowohl bei den Schizophrenie-Patienten als auch bei den Kontrollpatienten normwertige bis leicht erhöhte Albuminquotienten. (Referenzbereich nach Reiber auf das Durchschnittsalter von 24 Jahren bezogen: 5,6 x 10^{-3}) Die Liquor/Serum-Quotienten für IgG, IgA und IgM wurden auf die jeweiligen Albuminquotienten bezogen. Alle Werte liegen unterhalb der Grenzlinie zwischen intrathekal gebildeter und aus dem Blut stammender Immunglobulinfraktion. Somit liegt bei den hier untersuchten Patienten mit der Erstdiagnose einer Schizophrenie wie bei den gesunden Kontrollen keine intrathekale Immunglobulinsynthese vor.

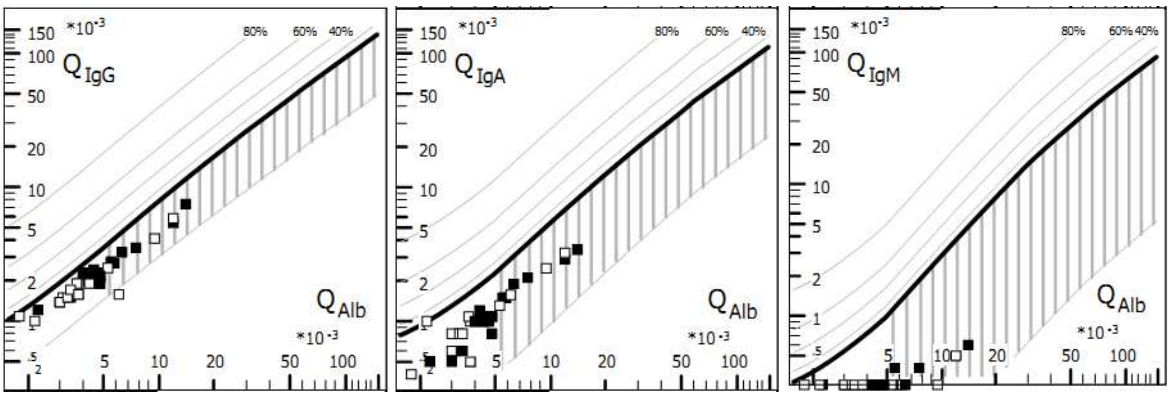

Abb. 4 Reibergramm zum Vergleich der Immunglobuline von schizophrenen Patienten und Kontrollpatienten. Die Liquor/Serum-Quotienten von IgG, IgA und IgM sind) gegen den Albuminquotient aufgetragen. Schwarz: schizophrene Patienten. (n=12) Weiß: Kontrollpatienten.(n=12) Abszisse: Q_{alb}(Liquor/Serum-Quotient Albumin) Ordinate: Q_{IgG}(Liquor/Serum-Quotient IgG) Q_{Lim}: Grenze zwischen intrathekaler und peripherer IgG- Fraktion. Die Albumin- und Immunglobulinkonzentrationen in Liquor und Serum wurden nephelometrisch bestimmt.

3.2 Vergleich des Proteoms: 2D-Gelelektrophorese

Für den Vergleich des gesamten Proteoms wurden die Liquorproben mittels 2D-Gelelektrophorese aufgetrennt.

Hierfür wurde zunächst jeweils der Liquor von 6 Schizophrenie-Patientinnen und 6 Kontrollpatientinnen aufbereitet, mit Fluoreszenzfarbstoffen markiert und pro Gel die Probe eines Schizophrenen Patienten und einer Kontrolle gemeinsam mit dem internen Standard aufgetragen und aufgetrennt. Analog dazu wurden die Liquores von 6 männlichen Patienten und Kontrollen miteinander verglichen. Da diese Gele nicht auswertbar waren, wurde der Versuch mit jeweils 4 Patienten, von denen noch ausreichend Liquor vorhanden war, wiederholt. Die so erhaltenen Gele wurden eingescannt und es resultierten für jedes Gel jeweils drei Gelbilder. (jeweils ein Bild für schizophrenen Patient, Kontrollpatient und den internen Standard). Abb.5 zeigt exemplarisch jeweils 2 aus dem Fluoreszenz-Scan resultierende Proteinbilder aus jedem Versuchslauf.

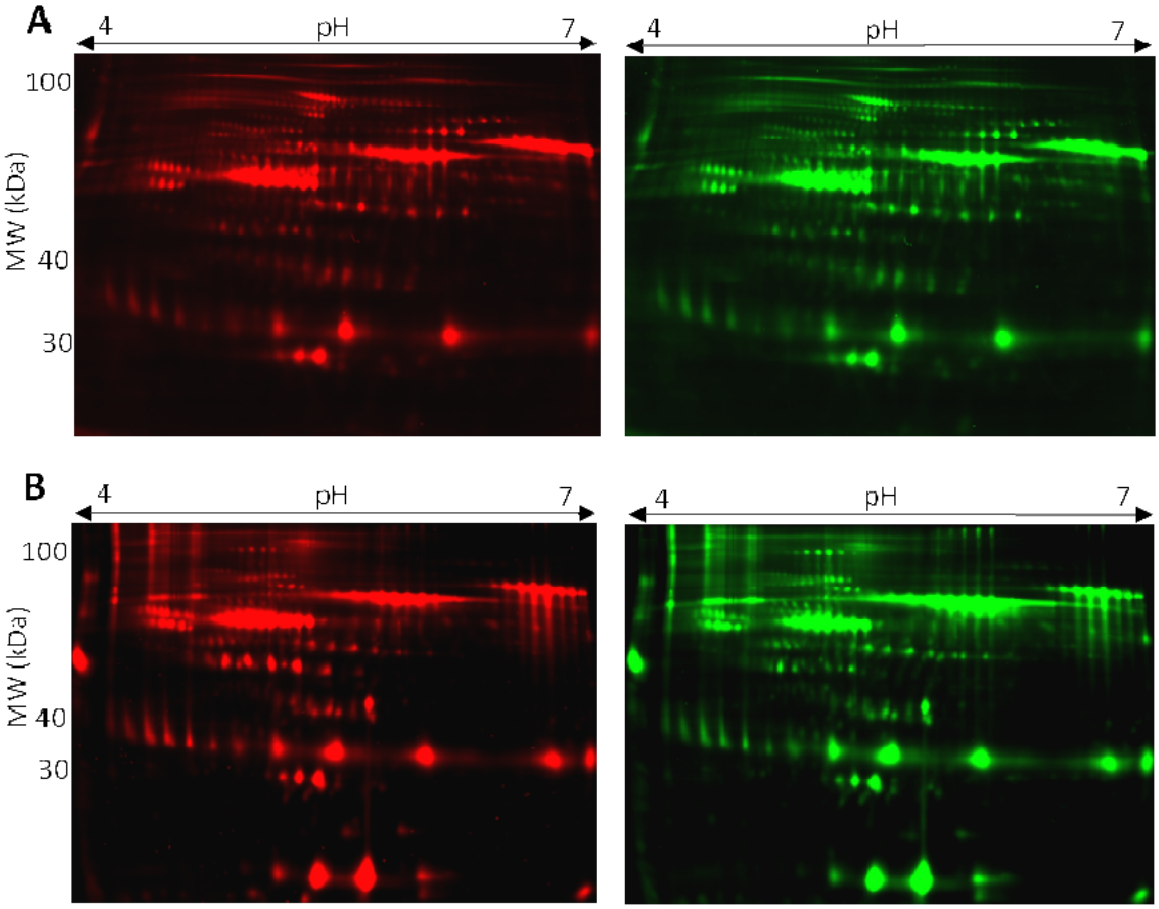

Abb. 5: Liquorproteom nach zweidimensionaler gelelektrophoretischer Auftrennung. Exemplarisch ist jeweils der Versuchslauf eines weiblichen Probenpaares (A) und eines männlichen Probenpaares (B) gezeigt. Es wurde jeweils ein schizophrene(r) Patient(in) (links, Cy3-markiert) zusammen mit einem/er Kontrollpatient(in) (rechts Cy5-markiert) und dem internen Standard (nicht gezeigt) auf ein Gel aufgetragen. pH- Bereich 4-7; Molekulargewicht (MW) in Kilodalton (kDa).

Bei der Auswertung der Gelbilder mit der Software DeCyder entspricht das Spot-Volumen der Fluoreszenzintensität. Dieser Wert ist proportional zur Proteinmenge des jeweiligen Spots im jeweiligen Gel.

Es wurden die Spots detektiert, deren Proteinmenge sich im Vergleich von Krank zu Gesund um mindestens das 1,4-fache unterschied und diese Unterschiede im t-Test als signifikant detektiert wurden ($p<0,05$). Abb. 6 zeigt die Spots in den Gelen, welche diese Kriterien erfüllten.

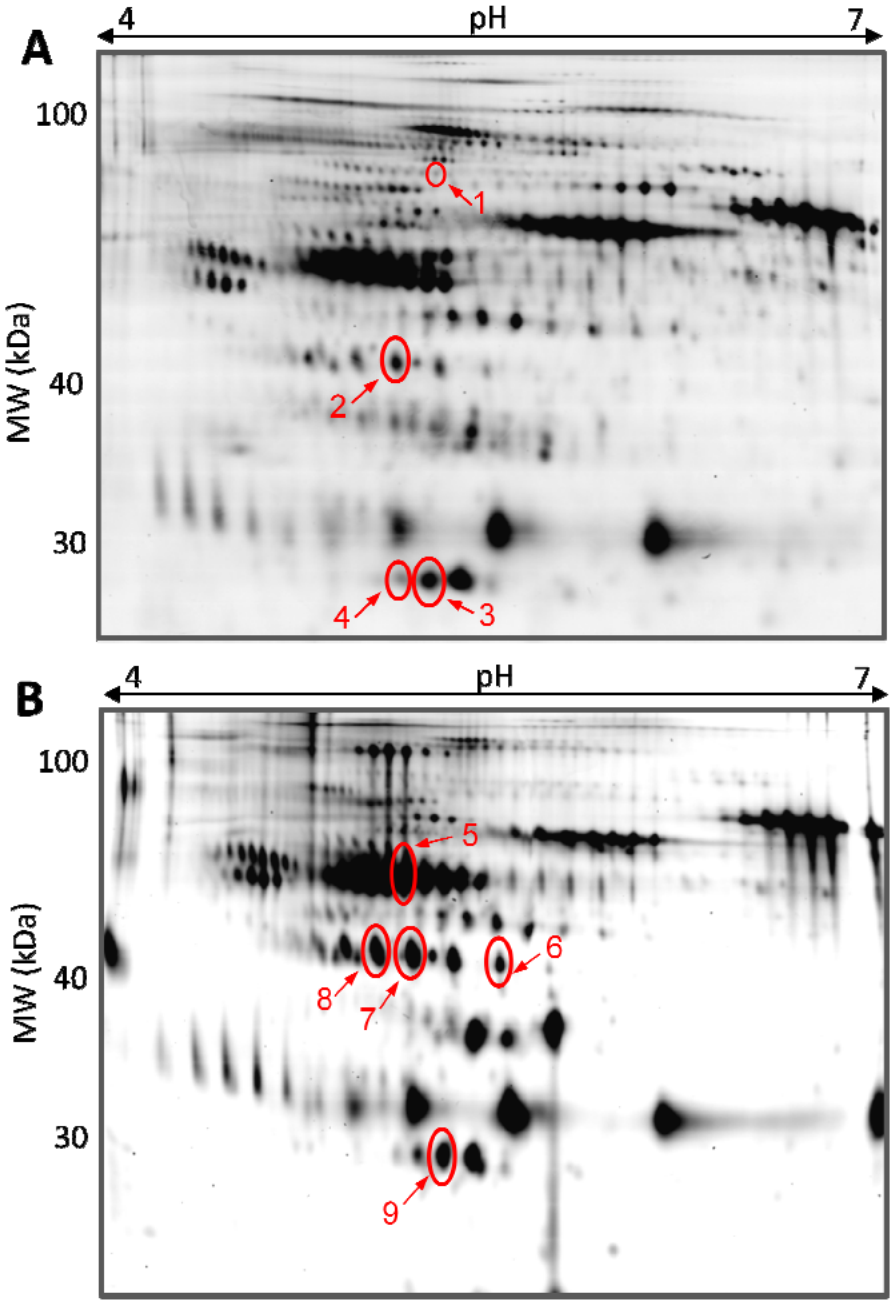

Abb.6: Signifikante Abweichungen der Proteinmenge im Liquor schizophrener Patienten. Die Pfeile zeigen die Proteinspots, die sich bei der statistischen Auswertung aller Gele mit DeCyder im Vergleich von Schizophreniepatienten mit gesunden Kontrollen unterschieden. Exemplarische Gelelektrophorese-Bilder aus dem weiblichen (A) und männlichen (B) Patientenkollektiv. pH- Bereich 4-7; Molekulargewicht (MW) in Kilodalton (kDa).

Diese ausgewählten Spots wurden aus einem repräsentativen Gel entnommen und mit Hilfe der MALDI-TOF Massenspektrometrie analysiert (Tab.3 und Tab.4 im Anhang). Die identifizierten Proteine sind dreidimensional dargestellt (Abb.7).

Tab.3: Massenspektrometrisch identifizierte Proteine. Die Berechnung der normalisierten Abundanzfaktoren (ein Faktor von 1 bedeutet dabei keine Regulation, ein Faktor von 2 entspricht einer Verdoppelung der Abundanz) sowie der p-Werte des Student's t-Tests erfolgte automatisch durch das Programm DeCyder™.

Spot	Name des Proteins	Abundanzfaktor	t-Test	Anzahl der den Spot enthaltenden Gele (Gesamtzahl der Gele)
1	Nicht identifizierbar	1,72	0,02	6 (6)
2	Apolipoprotein A-IV	1,67	0,087	5 (6)
3	Apolipoprotein A-I	1,61	0,0064	6 (6)
4	Nicht identifizierbar	1,48	0,032	6 (6)
5	Alpha-1- Antitrypsin	1,46	0,01	4 (4)
6	Haptoglobin	3,4	0,014	4 (4)
7	Haptoglobin/ Apolipoprotein A-IV	3,57	0,0091	4 (4)
8	Haptoglobin	3,7	0,015	4 (4)
9	Apolipoprotein A-I	1,48	0,18	4 (4)

Für den Großteil der Spots konnte in der Massenspektrometrie jeweils ein Protein eindeutig zugeordnet werden. Dem mit 7 bezeichneten Spot im Versuchslauf der männlichen Probanden (im Versuchslauf der weiblichen Probanden Spot 2 entsprechend) konnte allerdings kein einzelnes Protein zugeordnet werden: es wurde sowohl Apo A-IV als auch Haptoglobin identifiziert (Tab.3). Der Grund hierfür ist, dass beide Proteine ähnliche Werte für Molekülmasse und den isoelektrischen Punkt aufweisen und so in der Gelelektrophorese im selben Bereich des Gels zu finden sind. Aus diesem Grund wurden in den sich anschließenden Validierungsversuchen beide Proteine berücksichtigt.

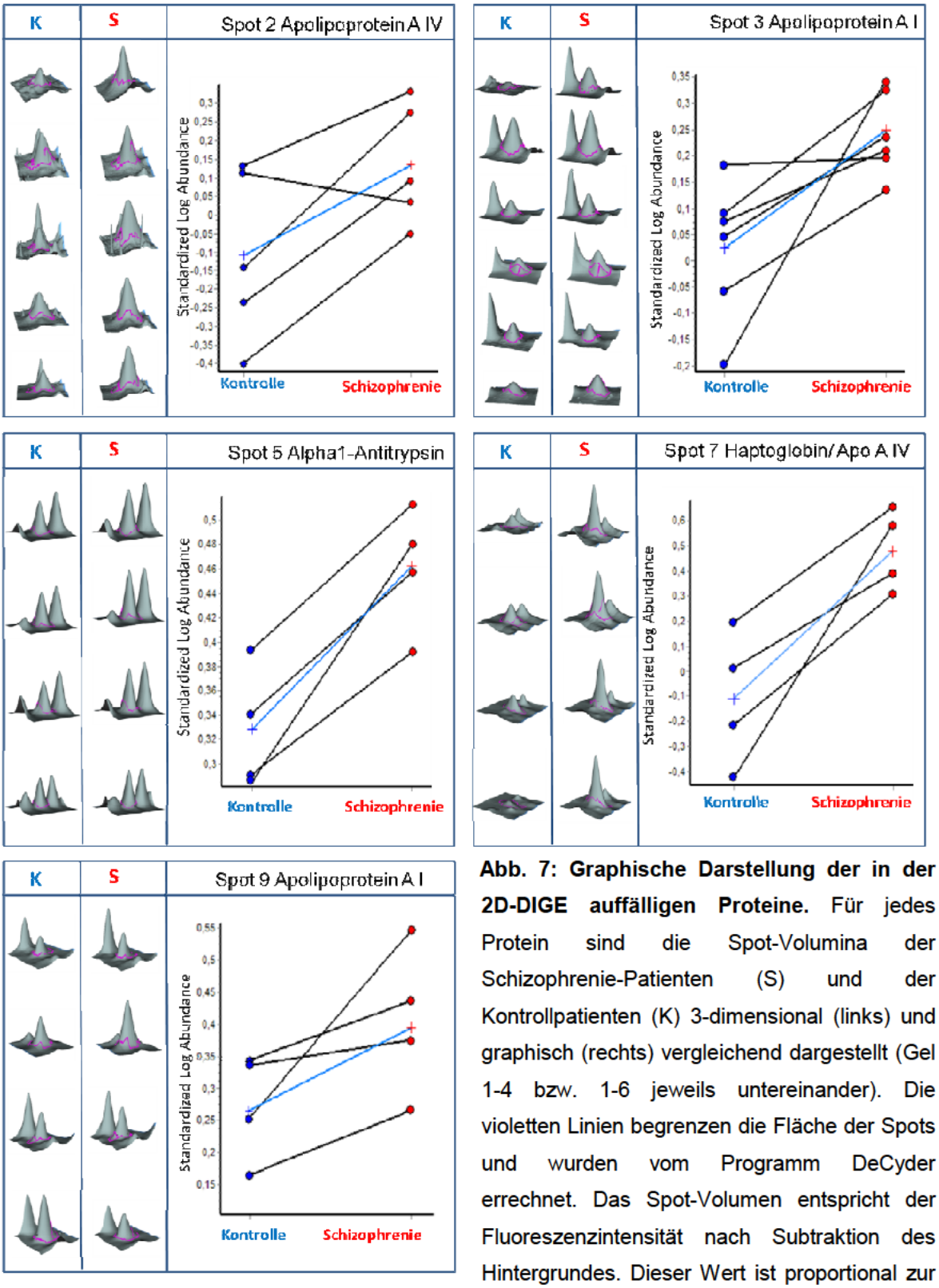

Abb. 7: Graphische Darstellung der in der 2D-DIGE auffälligen Proteine. Für jedes Protein sind die Spot-Volumina der Schizophrenie-Patienten (S) und der Kontrollpatienten (K) 3-dimensional (links) und graphisch (rechts) vergleichend dargestellt (Gel 1-4 bzw. 1-6 jeweils untereinander). Die violetten Linien begrenzen die Fläche der Spots und wurden vom Programm DeCyder errechnet. Das Spot-Volumen entspricht der Fluoreszenzintensität nach Subtraktion des Hintergrundes. Dieser Wert ist proportional zur Proteinmenge des jeweiligen Spots im jeweiligen Gel. In der graphischen Darstellung ist auf der y-Achse der Logarithmus des Verhältnisses der auf den internen Standard normierten Spotvolumina dargestellt. Die durch einen Strich verbundenen Punkte entsprechen den Probenpaaren aus jeweils einem Gel. Blaue Linien: Mittelwerte. Für Haptoglobin ist exemplarisch Spot 7 dargestellt, die beiden anderen Spots stellen sich entsprechend dar.

3.3 Validierung der Kandidatenproteine

Die gelelektrophoretisch identifizierten Proteine, die sich in ihrer Liquorkonzentration zwischen krank und gesund signifikant unterschieden, wurden im Anschluss jeweils an einem größeren Kollektiv mit einer anderen Methode untersucht, um die gefundenen Unterschiede zu validieren. Hierfür kamen entweder ELISA, Western Blot oder 2D-Blot zum Einsatz.

3.3.1 Haptoglobin-ELISA

Zur Validierung einer erhöhten Haptoglobinkonzentration im Liquor schizophrener Patienten wurde ein Haptoglobin-ELISA durchgeführt. Um bei erhöhten Liquor-Konzentrationen zwischen intrathekaler oder aus dem Blut stammender Ursache unterscheiden zu können, wurde die Haptoglobinkonzentration zusätzlich im Serum bestimmt. Zusätzlich zu den in der 2D-Gelelektrophorese untersuchten männlichen Patienten wurden noch die Proben von jeweils 10 neu ausgewählten Schizophreniepatienten und Kontrollpatienten untersucht. Diese Patienten wurden nach den gleichen Kriterien wie das anfängliche Kollektiv ausgewählt.

Sowohl im Liquor als auch im Serum zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen schizophrenen Patienten und Kontrollen (Abb. 8 A und B). Die in der 2D-Gelelektrophorese dokumentierten Unterschiede konnten jedoch für die einzelnen Patienten bestätigt werden (Abb.8 A).

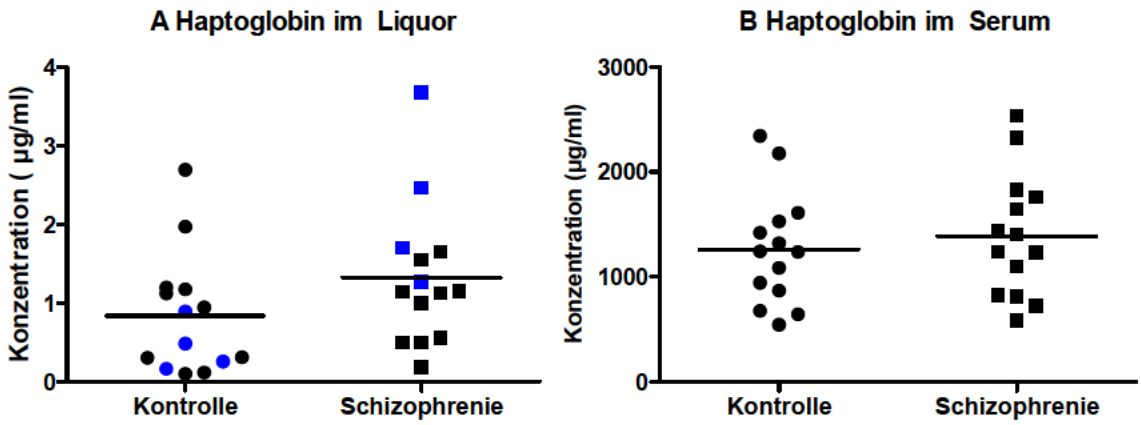

Abb.8: Haptoglobin-ELISA von Liquor und Serum von Schizophrenie-und Kontrollpatienten. Die Liquorproben wurden 1:30 verdünnt, die Serumproben 1:50000. Die Konzentrationsangaben sind auf die unverdünnten Proben hochgerechnet. Der waagerechte Strich markiert jeweils den Mittelwert. **(A) Liquorproben** n=14, p= 0,07. Farblich hervorgehoben sind die Werte der Proben, welche in der 2D-DIGE untersucht wurden. **(B) Serumproben** n=14, p= 0,60.

Um die Abhängigkeit der Liquorkonzentration des hauptsächlich aus dem Serum stammenden Haptoglobins von der Schrankenfunktion darzustellen, wurde der Albuminquotient verwendet. Dieser stellt ein Maß für die Schrankenfunktion dar und wurde in der Routine-Liquordiagnostik mitbestimmt. Mit nachlassender Schrankenfunktion und somit steigendem Albuminquotient steigt auch das Verhältnis der Haptoglobin-Konzentration im Liquor zu der im Serum an (Abb.9). Diese Korrelation spiegelt den physiologischen Zusammenhang der Liquorkonzentration von Blutproteinen und der Schrankenfunktion wider.

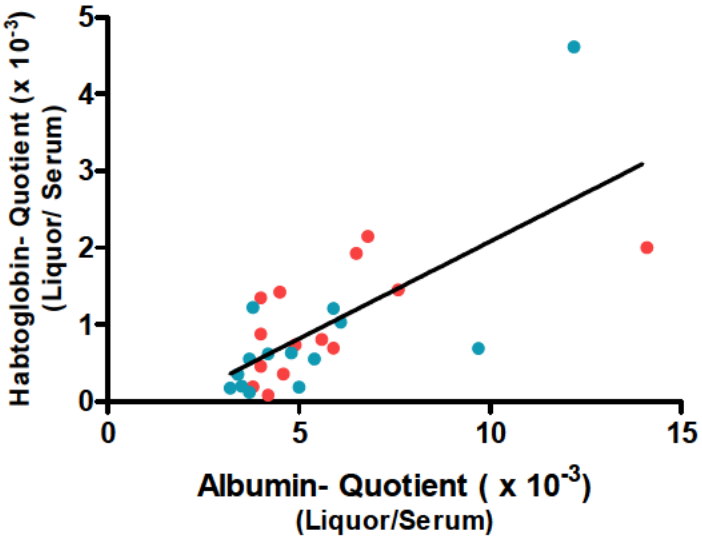

Abb.9: Abhängigkeit des Liquor/Serum-Haptoglobinquotients von der Schrankenfunktion. Der Albuminquotient wurde im Rahmen der Routineliquordiagnostik bestimmt. Der Albuminquotient dient als Maß für die Blut-Liquor-Schrankenfunktion. Mit steigendem Quotient nimmt die Schrankendysfunktion zu. Rot: Schizophrene Patienten. Blau: Kontrollpatienten.n=28; r^2=0,51 p< 0,0001

3.3.2 Alpha-1-Antitrypsin 2D-Immunoblot

Alpha-1-Antitrypsin ist ein Protein, von dem mehrere Isoformen bekannt sind. Diese unterscheiden sich in ihrem isoelektrischen Punkt, nicht aber in ihrer Molekülmasse.

Für Alpha-1-Antitrypsin wurde in der 2D-Gelelektrophorese nur 1 Spot, der eine Isoform repräsentiert, als leicht reguliert identifiziert. Um zu untersuchen, ob bei Schizophreniepatienten unter den Isoformen von Alpha-1-Antitrypsin isoliert eine Isoform heraufreguliert ist, wurde ein 2D- Immunoblot durchgeführt. Es wurde jeweils 10 µl Liquor auf einem IPG-Streifen mit einem pH-Bereich von 3-5,6

fokussiert und dann in der zweiten Dimension aufgetrennt. Es konnten 6 Isoformen mit Hilfe eines primären Antikörpers gegen Alpha-1-Antitrypsin auf einer Höhe von 60 kDa detektiert werden (Abb. 10).

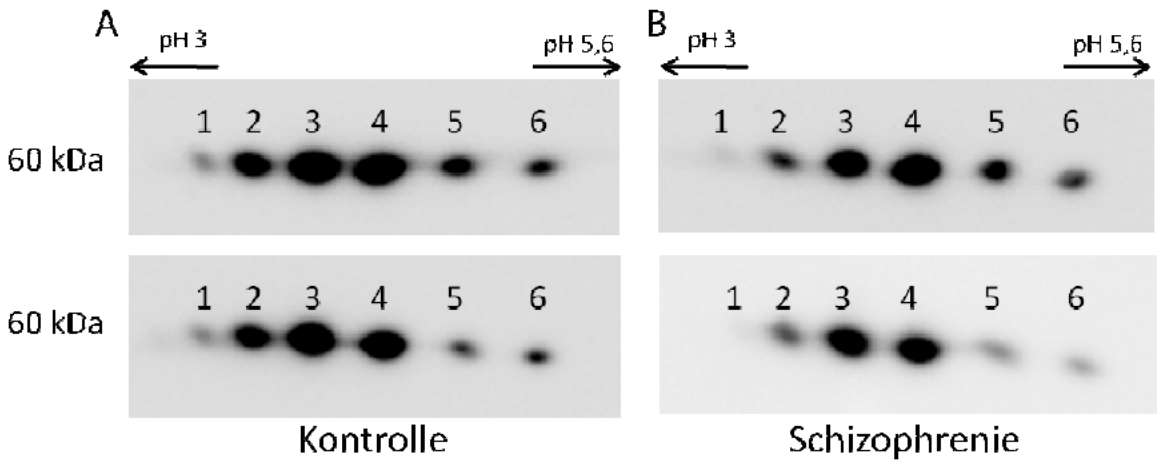

Abb. 10: Die Isoformen von Alpha-1-Antitrypsin im Liquor. Exemplarische Darstellung von jeweils 2 Immunoblots von Kontrollen **(A)** und Schizophrenie-Patienten **(B)**. Zweidimensionale Auftrennung in einem pH-Bereich von 3-5,6 (Pfeile). Es konnten jeweils 6 Isoformen detektiert werden (1-6)

Die Quantifizierung der einzelnen Spots erfolgte mit dem Programm Quantity one. Diese Werte wurden auf die Summe aller Spots in einem Gel normiert. Es konnte für keine der Isoformen signifikante Unterschiede nachgewiesen werden (Abb.11).

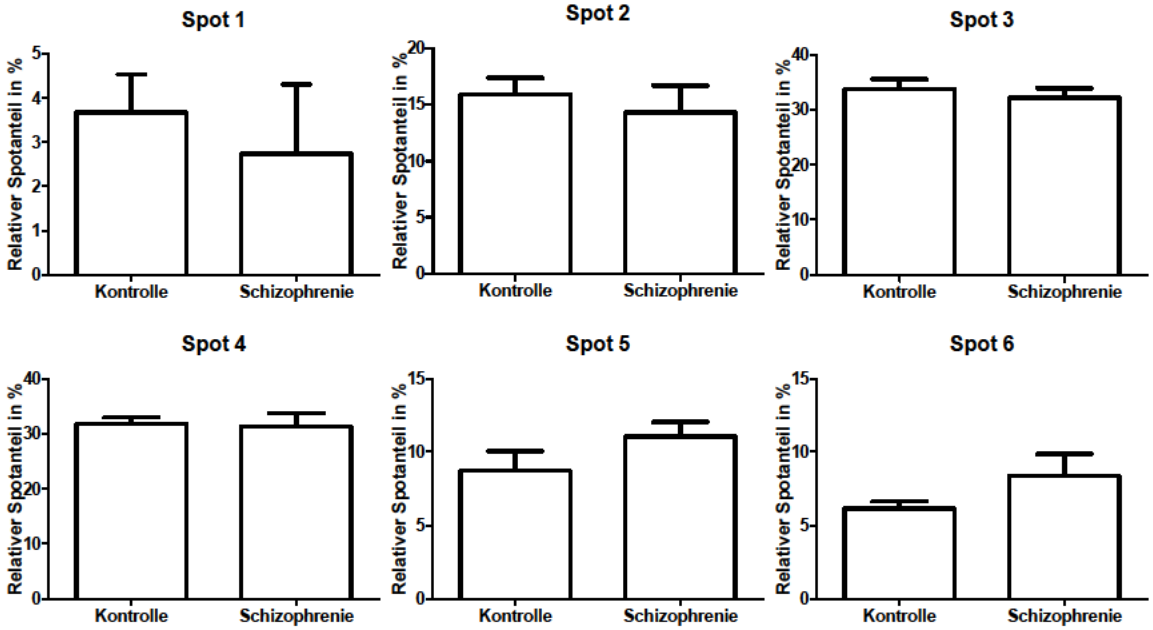

Abb.11: Vergleich der Isoformen von Alpha-1-Antitrypsin.

Die Isoformen von Alpha-1-Antitrypsin wurden mit Hilfe des 2D-Immunoblots sichtbar gemacht und quantifiziert. Diese Werte wurden auf die Summe aller Spots in einem Gel normiert und als relativer Spotanteil in Prozent angegeben. n=14, p_1: 0,11; p_2: 0,55; p_3: 0,38; p_4: 0,86; p_5: 0,08; p_6: 0,13

3.3.3 Apolipoprotein A-I-ELISA

Für die Validierung einer erhöhten Apolipoprotein A-I-Konzentration im Liquor schizophrener Patienten wurde analog zum Vorgehen für Haptoglobin ein ELISA von Liquor und Serum durchgeführt. Es wurde der Liquor der in der DIGE verwendeten männlichen und weiblichen Proben verwendet sowie der von zusätzlich 10 neuen schizophrenen Patienten und Kontrollen. Im Liquor konnte eine erhöhte Konzentration von Apo A-I nicht bestätigt werden (Abb.12 A). Im Serum fiel auf, dass die Konzentration bei schizophrenen Patienten sogar eher erniedrigt ist (Abb.12 B).

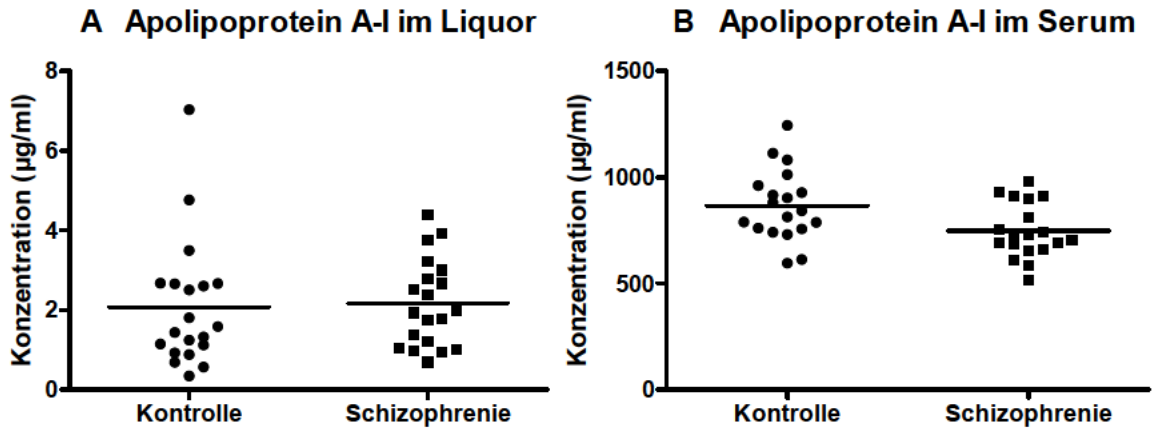

Abb.12: Apolipoprotein A-I-ELISA von Liquor und Serum von Schizophrenie-und Kontrollpatienten. (A) Die Liquorproben wurden unverdünnt verwendet n=20, p= 0,44 **(B)** Die Serumproben wurden 1:50000 verdünnt. n=20, p= 0,02. Die Konzentrationsangaben sind auf die unverdünnten Proben hochgerechnet. Der waagerechte Strich markiert jeweils den Mittelwert.

Da Apo A-I ebenfalls wie Haptoglobin ein Serumprotein ist, ist seine Liquorkonzentration zum Einen von der Serumkonzentration, und zum Anderen von der Funktion der Blut-Liquor-Schranke abhängig (Abb.13).

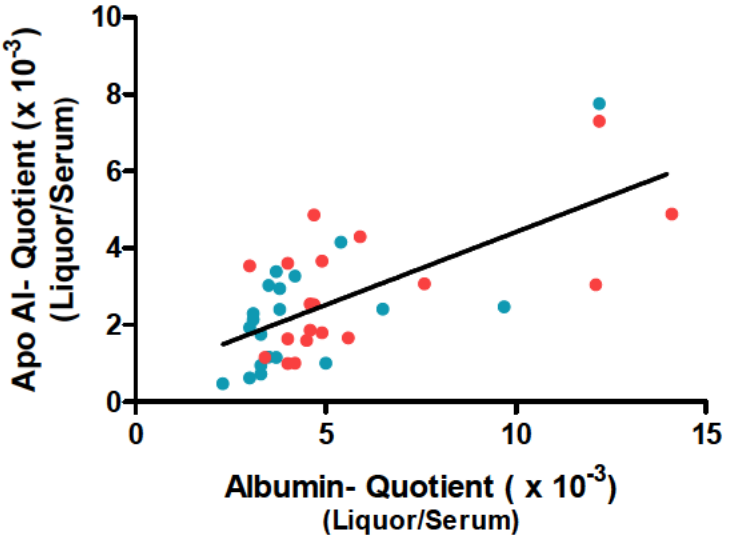

Abb.13: Abhängigkeit des Liquor/Serum-Apolipoprotein A-I-Quotients von der Schrankenfunktion. Der Albuminquotient wurde im Rahmen der Routineliquordiagnostik bestimmt. Der Albuminquotient dient als Maß für die Blut-Liquor-Schrankenfunktion. Mit steigendem Quotient nimmt die Schrankendysfunktion zu. Rot: Schizophrene Patienten. Blau: Kontrollpatienten.Die gerade Linie entspricht der Regressionsgerade. n=40; r^2=0,45, p<0,0001

3.3.4 Immunoblot Apolipoprotein A-IV

Da für Spot 7 in der Massenspektrometrie zusätzlich zu Haptoglobin auch Apo A-IV identifiziert wurde, erfolgte auch für dieses Protein ein Validierungsversuch. Die Konzentration von Apo A-IV im Liquor wurde zwischen den beiden Kollektiven mittels Immunoblot verglichen. Es wurde jeweils 150µl Liquor gelelektrophoretisch aufgetrennt und mit spezifischen Antikörpern gegen Apo A-IV eine Bande auf Höhe von 45 kDa detektiert (Abb.14 A). Die Banden wurden quantifiziert und mit Hilfe der 50 kDa-Bande des MagicMarks normalisiert. Im Vergleich zwischen Schizophrenie-Proben und Kontrollproben konnte kein signifikanter Unterscheid ermittelt werden (Abb.14 B).

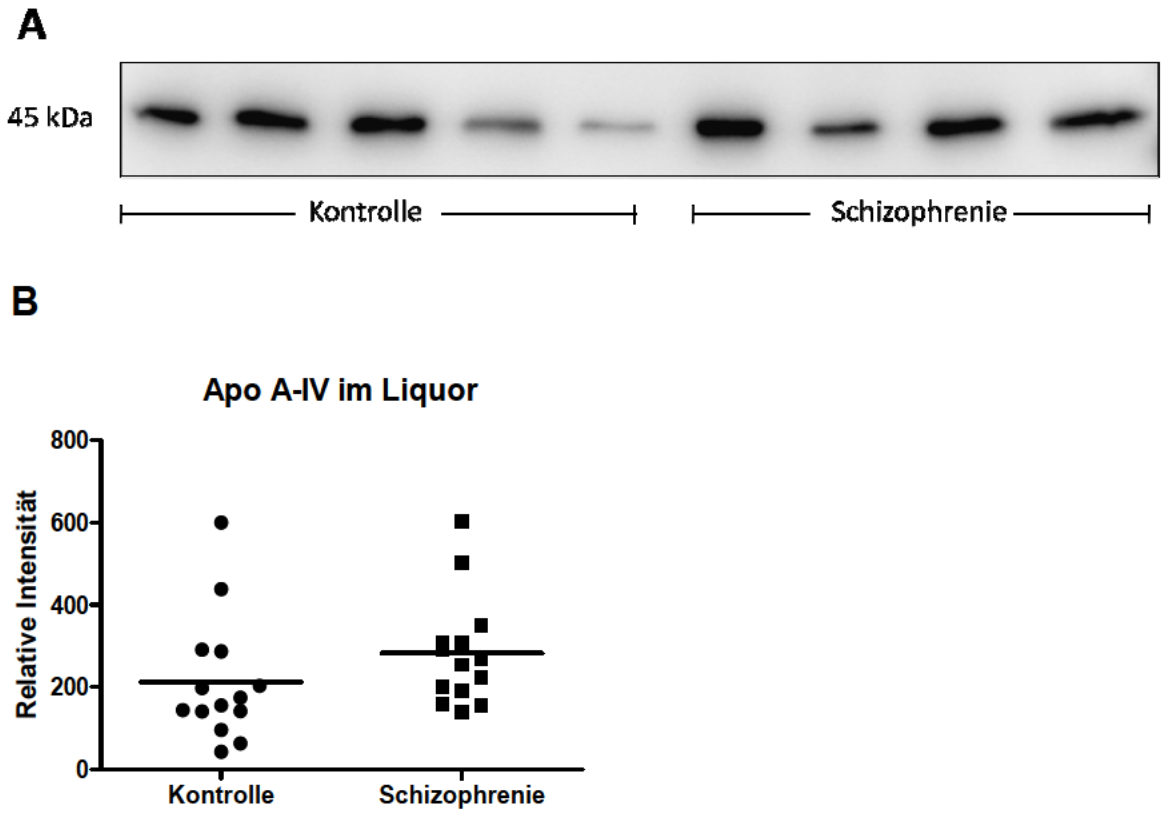

Abbildung 14: Immunoblot Apolipoprotein A-IV (Apo A-IV) vom Liquor Schizophrener Patienten und Kontrollpatienten. (A) exemplarischer Blot für vier Schizophrenie- Proben und 5 Kontrollproben. Es wurde jeweils 150µl Liquor aufgetragen und die Banden auf einer Höhe von 45kDa detektiert. **(B)** Die Banden wurden quantifiziert und die normalisierten Werte (entsprechen der relativen Intensität) verglichen. n=14, p=0,07; waagerechte Linien: Mittelwerte.

3.3.5 Biomarker im Liquor schizophrener Patienten

Um die Proben weiter zu charakterisieren, wurden bekannte Biomarker untersucht. Es wurde hierfür das gleiche Probenkollektiv wie für die 2D- DIGE verwendet. Tau, Beta-Amyloid und S-100B als Marker für Neurodegeneration wurden im Liquor der beiden Gruppen per ELISA gemessen. Hierfür wurden ELISA- Kits verwendet. Zur Messung von Orexin A wurde ein Radioimmunoassay durchgeführt.

Für keinen der Biomarker ergaben sich signifikante Unterschiede (Abb.15).

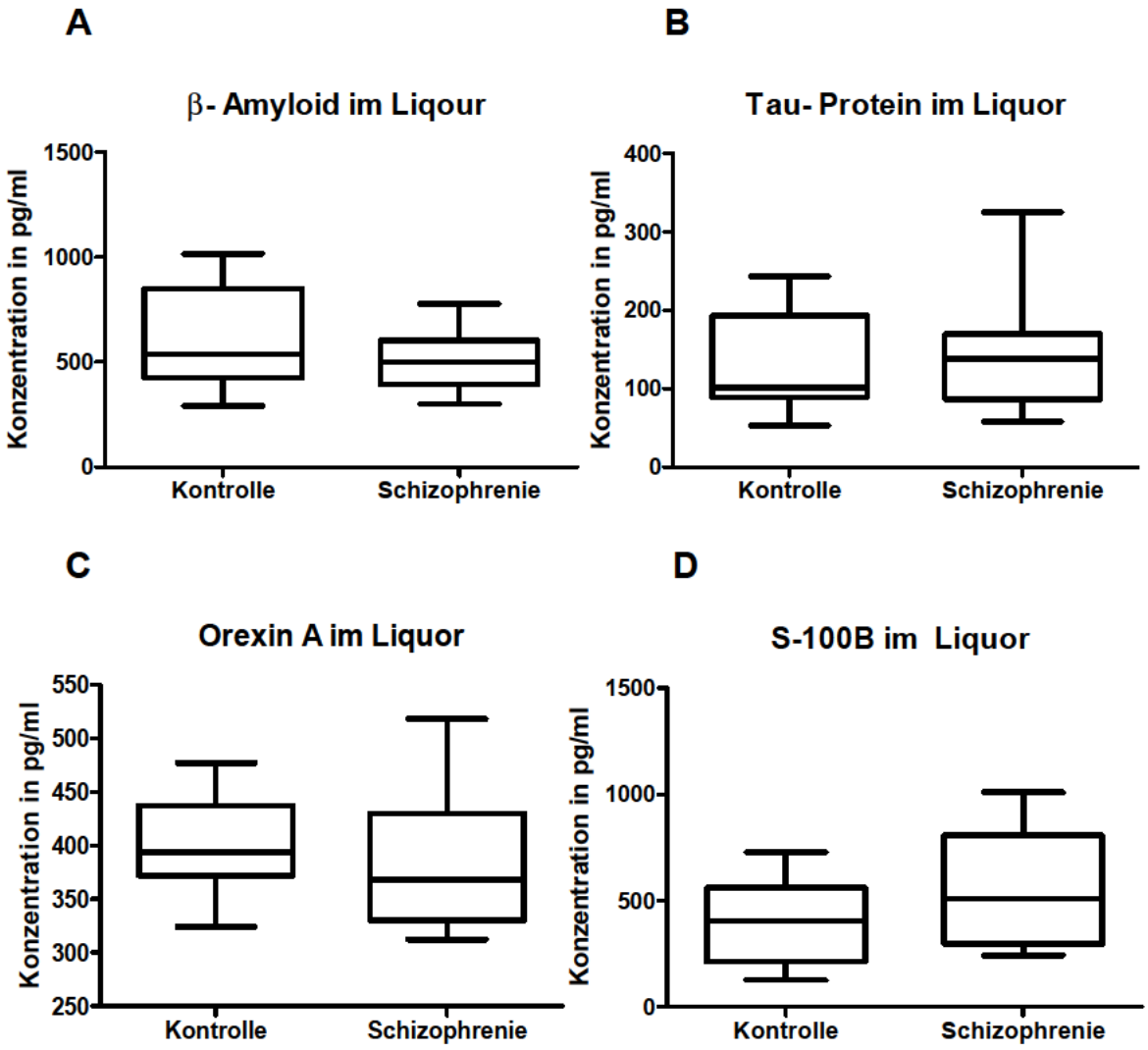

Abb.15: Biomarker im Liquor schizophrener Patienten und gesunder Kontrollen. n=12 Box: 25. bis 75. Percentile. waagerechte Linie: Median. Whiskers: Minimal- bzw. Maximalwert. n=12 **(A)** ß-Amyloid-ELISA. Für die Messung wurden unverdünnte Liquorproben verwendet. p=0,27 **(B)** Tau-ELISA. Für die Messung wurden unverdünnte Liquorproben verwendet p=0,91. **(C)** Orexin A-RIA. Es wurden unverdünnte Liquorproben verwendet. p=0,36 **(D)** S-100B-ELISA. Liquorproben 4-fach verdünnt. p=0,19

4 Diskussion

4.1 Relevanz

Die Schizophrenie ist eine schwere Erkrankung, deren Pathogenese trotz intensiver Forschung noch weitgehend unklar bleibt. Auch die eindeutige Diagnose ist oft schwer zu stellen, zum Einen weil die Symptome meist nur auf der Anamnese der Patienten selbst oder ihrer Angehörigen beruhen, und zum Anderen, weil bisher keine labordiagnostischen Marker zur Diagnosestellung verfügbar sind. Hier setzt vorliegende Arbeit an: Ziel war es, Biomarker im Liquor von Schizophrenen Patienten zu finden oder zumindest Tendenzen an Proteinveränderungen, die Hinweise auf die Pathogenese der Erkrankung geben könnten.

Liquor eignet sich für derartige Untersuchungen besonders gut: Er kann durch seine Nähe zum Gehirn die Veränderungen in diesem Organ gut abbilden, und ist dennoch über die Lumbalpunktion einer Diagnostik gut zugänglich.

Insgesamt ist es jedoch in vorliegender Arbeit nicht gelungen, eindeutige Biomarker für die Schizophrenie zu finden. Dies könnte in der Krankheit selbst, der Patientenauswahl oder der angewandten Methode begründet sein. Diese Aspekte sowie die Ergebnisse dieser Arbeit sollen im Folgenden diskutiert werden.

4.2 Patientenauswahl

Für die Durchführung der Versuche wurden Patienten mit der Erstmanifestation einer paranoiden Schizophrenie ausgewählt. Bei der Zusammenstellung des Patientenkollektivs wurde versucht, eine klinisch möglichst homogene Gruppe zu erzeugen. Dies ist jedoch auf Grund der Tatsache, dass die Diagnosestellung der Schizophrenie ausschließlich auf anamnestischen Angaben der Patienten oder Angehörigen beruht, nur eingeschränkt möglich. Da die Liquorgewinnung jeweils während des ersten akut psychotischen Schubes erfolgte, dürften sich alle Patienten im ungefähr gleichen Stadium ihrer Erkrankung befunden haben. Allerdings ist die Dauer der Prodromalphase, die dem akuten Schub oft Jahre voraus geht, bei dieser Vorgehensweise nicht festzustellen.

Zudem könnten die Symptome der als paranoide Schizophrenie zusammengefassten Erkrankung auf molekularer Ebene trotzdem auf

unterschiedlichen pathogenetischen Vorgängen beruhen. Tandon et al postulieren, dass es sich bei der Schizophrenie um keine einzelne Krankheitsentität, sondern vielmehr um ein Syndrom oder gar ein Gemisch aus phänotypisch gleichen Krankheitsentitäten und Syndromen unterschiedlichster pathogenetischer Ursachen handeln könnte (Tandon et al. 2009). Die Konsequenz für vorliegende Arbeit könnte sein, dass es deutliche Unterschiede in der Liquorproteinzusammensetzung immer nur in Teilen des klinisch homogen erscheinenden Patientenkollektivs gibt und so kein gemeinsamer Biomarker für die klinisch definierte Gruppe der Schizophrenie vorhanden ist. Dies könnte der Grund dafür sein, dass keine in der 2D-Elektrophorese gefundene Proteinveränderung an einem größeren Patientenkollektiv bestätigt werden konnte.

4.3 Ergebnisdiskussion

Bisher gibt es für die Schizophrenie nur wenige Untersuchungen, die sich mit der gelelektrophoretischen Biomarkersuche im Liquor beschäftigt haben. In einer Arbeit von 2003 (Jiang et al. 2003) wurden jeweils 10 gepoolte Liquorproben von 10 Schizophrenie- Patienten und Kontrollen gelelektrophoretisch untersucht. In dieser Arbeit wurde ein erniedrigtes Apo A-IV bei schizophrenen Patienten festgestellt. Dieser Widerspruch zu vorliegender Arbeit, bei der tendenziell eher eine Erhöhung des Proteins festgestellt wurde, könnte durch verschiedene Ursachen erklärt werden: Für die Arbeit von 2003 wurde ein undefiniertes Patientenkollektiv an Schizophreniekranken verwendet, wohingegen hier ausschließlich Patienten mit einer Erstmanifestation und akuten Symptomen für die Untersuchung verwendet wurden. Die Proteinzusammensetzung im Liquor und so auch die Apo A-IV-Konzentration könnte sich zu Beginn der Erkrankung von der im fortgeschrittenen Krankheitsstadium unterscheiden. Zudem wurden in vorliegender Arbeit immer die gleichen Volumina auf die Gele aufgetragen, wohingegen bei Jiang et al. die Normalisierung nach Gesamtproteingehalt vorgenommen wurde. Somit wurden immer die gleichen Proteinmengen auf ein Gel aufgetragen und miteinander verglichen. Die Gesamtkonzentration der Liquorproteine wird jedoch im Wesentlichen von den aus dem Blut stammenden Proteinen bestimmt (Reiber et al. 2001c). Sind einzelne Proteine im Serum und in der Folge auch im Liquor oder auf Grund einer Schrankenfunktionsstörung alle

Blutproteine erhöht, führt eine artifizielle Normalisierung auf den Gesamtproteingehalt so zu verfälschten Verhältnissen gerade der niedrig konzentrierten Hirnproteine (Brechlin et al. 2008a). Die Untersuchung von Einzelproben bietet im Gegensatz zur bei Jiang et al. durchgeführten Untersuchung gepoolter Proben zudem den Vorteil, dass auch einzelne Proteinveränderungen identifiziert werden können, die nicht bei allen Patienten vertreten sind. Eine Arbeit von 2010 konnte mit derselben Methode beim Vergleich von 17 Schizophrenen mit 10 gesunden Kontrollen Apolipoprotein E, Apolipoprotein A-I und Prostaglandin- H2 D-Isomerase als hochreguliert identifiziert werden (Martins-De-Souza et al. 2010). Hier wurden zwar ebenfalls Pools gebildet, jedoch wurden die Ergebnisse nochmals mit Western-Blots validiert.

4.3.1 Akute-Phase-Proteine

In vorliegender Arbeit wurden mittels 2D- Gelelektrophorese erhöhte Konzentrationen der Akute-Phase-Proteine Haptoglobin und Alpha-1-Antitrypsin detektiert. Diese Proteine werden im Rahmen der sogenannten Akute-Phase-Reaktion ausgeschüttet.

Als Akute-Phase-Proteine werden in der Leber produzierte Proteine bezeichnet, deren Plasmakonzentrationen sich im Rahmen eines entzündlichen Prozesses um mindestens 25% verändert. In diesem komplexen Prozess einer Entzündung haben die Akute-Phase-Proteine unterschiedlichste Funktionen: von der Einleitung und Verstärkung über die Dämpfung bis hin zur Auflösung einer Entzündungsreaktion (Gabay et al. 1999). Haptoglobin und Alpha-1-Antitrypsin gehören in diesem Zusammenhang zur Gruppe der antiinflammatorisch wirkenden Proteine. Haptoglobin bindet freies Hämoglobin, welches die Bildung von Hydroxyl-Radikalen fördert und wirkt somit antioxidativ (Sadrzadeh et al. 1984). Haptoglobin wird nach neueren Erkenntnissen auch im Gehirn von Oligodendrozyten synthetisiert und wirkt dort nach intrazerebralen Blutungen neuroprotektiv. (Zhao et al. 2009). Alpha-1-Antitrypsin schützt Gewebe, indem es die Aktivität proteolytisch wirkender Enzyme hemmt.

In der Gesamtheit konnten hier zwar für die Schizophrenie erhöhte Konzentrationen der Akute-Phase-Proteine an einem größeren Kollektiv nicht validiert werden, jedoch deuten verschiedene Arbeiten ebenso auf einen

Zusammenhang der Akute-Phase-Proteine mit der Schizophrenie hin: Einige Arbeiten identifizierten mit Hilfe der 2D-Gelelektrophorese im Serum schizophrener Patienten erhöhte Konzentrationen von Akute-Phase-Proteinen wie Haptoglobin und Alpha-1-Antitrypsin (Wan et al. 2007, Yang et al. 2006, Wong et al. 1996). Eine Assoziation des Immunsystems mit der Schizophrenie konnte zudem von vielfältigen Seiten gezeigt werden: Zum Einen erhöhen maternale Infektionen in der Schwangerschaft das Risiko für das Auftreten einer Schizophrenie bei den Kindern (Sorensen et al. 2009), zum anderen konnten erhöhte Interleukin 6-Serumkonzentrationen (Nunes et al. 2006), ein verändertes Verhältnis von Typ1- und Typ2-T-Helferzellen (Avgustin et al. 2005) sowie Autoantikörper bei der Schizophrenie nachgewiesen werden (Chang et al. 2011).
Da erhöhte Liquorkonzentrationen von Akute-Phase-Proteinen ebenso beim Guillain-Barré-Syndrom, der chronisch inflammatorischen demyelinisierenden Polyneuropathie und Chorea Huntington gefunden wurden (Zhang et al. 2012, Huang et al. 2011), scheinen sie nicht spezifisch für eine Erkrankung zu sein.
Für das Haptoglobin könnte ein nächster Schritt sein, die einzelnen Isoformen analog zum Vorgehen bei Alpha-1-Antitrypsin in ihrer Regulation zu vergleichen.

4.3.2 Apolipoprotein A-I und A-IV

Apolipoproteine stellen den Proteinanteil der Lipoproteine dar, die wasserunlösliche Lipide im Blut transportieren (Segrest et al. 2001).
Ihre Funktion im ZNS ist noch nicht klar, sie scheinen aber eine wichtige Rolle im Zusammenhang mit neurologischen Erkrankungen wie der Alzheimer-Demenz zu spielen (Reiss 2005, Csaszar et al. 1997). Auch wurden erhöhte Apo A-IV-Werte im Liquor von Chorea Huntington-Patienten gefunden (Huang et al. 2011). Das Gen für Apolipoprotein A-I liegt auf Chromosom 11q23 (Arinami et al. 1990), ein Bereich, dessen Mutation in einigen Studien auf ein erhöhtes Risiko für eine Schizophrenie hindeuten (Gurling et al. 2001).
Zur Liquorkonzentration von Apo A-I liegen in der Literatur sehr widersprüchliche Arbeiten vor: Hochregulation von Apo A-I im Liquor schizophrener Patienten auf der einen Seite (Martins-De-Souza et al. 2010), Herabregulation in Liquor, Hirn und peripheren Geweben (Huang et al. 2008) und Serum (Yang et al. 2006) auf der anderen Seite. Auch die in vorliegender Arbeit dokumentierten Ergebnisse sind nicht eindeutig, konnten die zunächst sehr deutlichen Unterschiede zwischen

Krank und Gesund an einem größeren Kollektiv im Liquor nicht bestätigt werden und sogar erniedrigte Werte im Serum festgestellt werden. Interessanterweise zeigten sich erhöhte Liquorwerte in der Literatur dort, wo die Patienten wie hier zumindest für kurze Zeit mit atypischen Antipsychotika behandelt wurden (Martins-De-Souza et al. 2010), wohingegen in der Arbeit von Huang et al die verwendeten Liquorproben von gänzlich unbehandelten Patienten stammen. Dies lässt vermuten, dass Apo A-I in Zusammenhang mit der Wirkung von Antipsychotika steht, zumal mit Chlorpromazin behandelte Ratten erhöhte Serumwerte für Apo A-I zeigten (La et al. 2007).

Für Apo A-IV wurden in einer Arbeit von 2003 erniedrigte Liquorkonzentrationen festgestellt, wohingegen hier eher eine Tendenz für erhöhte Werte zu verzeichnen war. Allerdings geht aus der Arbeit von Jiiang et al. nicht hervor, ob die verwendeten Patienten unter antipsychotischer Medikation standen.

4.3.3 Tau-Protein und Beta-Amyloid

Eine Erhöhung der Tau-Konzentration im Liquor stellt allgemein einen Indikator für Nervenzelluntergang dar, der zum Beispiel degenerativ, entzündlich oder vaskulär bedingt sein kann. (Schonknecht et al. 2003, Andreasen et al. 1998). Am besten untersucht ist diese Erhöhung bei der Diagnostik der Alzheimer-Demenz, die mit progredienten kognitiven Defiziten einher geht. Auch das Beta-Amyloid ist ein wichtiger Marker im Zusammenhang mit der Alzheimer-Demenz. Im Liquor von Patienten werden typischerweise erniedrigte Werte des Peptids schon in frühen Krankheitsstadien nachgewiesen (Sunderland et al. 2003). Kognitive Defizite stellen auch bei der Schizophrenie ein wichtiges Symptom sogar schon vor dem Auftreten der ersten psychotischen Episode dar (Bilder et al. 2006, Seidman et al. 2006). Bei dem hier untersuchten Patientenkollektiv konnten im Vergleich zu den gesunden Kontrollen keine erhöhten Tau- bzw. erniedrigten Beta-Amyloid-Konzentrationen im Liquor festgestellt werden. Dieses Ergebnis deckt sich mit den Ergebnissen der Arbeit von Schönknecht et al., in der die Tau-Konzentration an einem altersgemischtem Kollektiv untersucht wurde (Schonknecht et al. 2003).

In einer Arbeit von 2010 wurden zwar für Schizophreniepatienten erniedrigte Beta-Amyloid-Werte festgestellt, diese lagen jedoch noch signifikant höher als die der Alzheimer-Patienten (Frisoni et al. 2011). Die vorliegenden Ergebnisse unterstreichen die Theorie, dass neurodegenerative Vorgänge wie sie der

Azheimer-Demenz zugrunde liegen, nicht für die Pathogenese der Schizophrenie verantwortlich sind.

4.3.4 Orexin A

Orexine sind hypothalamische Neuropeptide, denen eine Vielzahl von Funktionen wie Schlaf-Wach-Regulation, Nahrungsaufnahme und Belohnungsverhalten zugeschrieben wird (Adamantidis et al. 2009). Eine Defizienz der Orexin-Neurotransmission spielt bei der Narkolepsie eine wichtige Rolle (Nishino et al. 2002, Nishino et al. 2001)). Neuere Untersuchungen haben gezeigt, dass Orexin-produzierende Zellen mit dem mesolimbischen Dopaminsystem der Area tegmentalis ventralis in Verbindung ein häufiges Phänomen darstellen (Benson 2006) und gezeigt werden konnte, dass einige Antipsychotika Orexin-Neurone aktivieren (Fadel et al. 2002a) und diese modulieren (Fadel et al. 2002b, Nakamura et al. 2000). Da dem Dopaminsystem eine wichtige Rolle bei der Entstehung der Schizophrenie zugeschrieben wird, liegt ein Zusammenhang des Orexinsystems mit der Schizophrenie nahe.

In vorliegender Arbeit wurden im Liquor keine Unterschiede zwischen Schizophreniepatienten und gesunden Kontrollen gesehen. In einer Arbeit von 2002 konnte mit der hier auch angewandten Methode an einem altersgemischten Patientenkollektiv ebenfalls keine signifikante Veränderung der Liquor-Orexinkonzentration festgestellt werden, jedoch eine Korrelation der Orexinkonzenztration und der Einschlaflatenz in der Patientengruppe (Nishino et al. 2002). Eine andere Gruppe konnte erniedrigte Konzentrationen bei Haloperidol-behandelten Patienten, jedoch nicht bei anderen Antipsychotika (Dalal et al. 2003). Diese widersprüchlichen Ergebnisse könnten der Tatsache geschuldet sein, dass das Rückenmark in hoher Dichte durch absteigende axonale Orexin enthaltende Projektionen innerviert wird (van den Pol 1999). So wäre es möglich, dass das im Liquor gemessene Orexin zum größten Teil die starke Orexin-Innervation des Rückenmarks widerspiegelt und nur zu einem verhältnismäßig geringem Teil die Vorgänge im Gehirn (Deutch et al. 2007). Folglich schließt der mangelnde Nachweis von Unterschieden der Orexinkonzentration im Liquor schizophrener Patienten einen Zusammenhang des Orexins mit der Schizophrenie nicht zwangsläufig aus.

4.3.5 S-100B

S-100B ist ein vornehmlich im Hirn produziertes Protein, das von Astrozyten synthetisiert wird und reguliert Proliferation und Differenzierung von Neuronen und Glia (Schafer et al. 1996). Natives S-100 wird als Homo- oder Heterodimer mit den zwei isomeren Untereinheiten α und β gefunden. Nach der neuen Nomenklatur wird die α-Untereinheit S-100A und die β-Untereinheit S-100B genannt (Schafer et al. 1995). Dabei kommen alle drei möglichen Kombinationen vor. Die Isoformen besitzen ein Molekulargewicht von je 10,5 kDa. S-100b (B-B-S-100) wird in hohen Konzentrationen in Gliazellen gefunden, S-100a (A-B-S-100) wird ebenso in Gliazellen mit Ausnahme von Schwannzellen gefunden. In peripheren Geweben kommt S-100 im Vergleich zum ZNS in deutlich geringeren Konzentrationen vor. In der Tumordiagnostik hat die Bestimmung des S-100-Proteins eine zunehmende diagnostische Bedeutung als Tumormarker bei malignen Melanomen (Abraha et al. 1997).

Neuere Studien weisen auf eine zentrale Rolle der Neuroglia bei der Pathogenese der Schizophrenie hin (Moises et al. 2002). So passen auch dazu die Ergebnisse einiger Studien, die erhöhte Konzentrationen von S-100B sowohl im Serum als auch im Liquor akut psychotischer Patienten zeigen (Steiner et al. 2006, Rothermundt et al. 2004, Rothermundt et al. 2001). Dies konnte in vorliegender Arbeit allerdings im Liquor nicht reproduziert werden. In diesen Arbeiten wurden luminometrische Immunoassays zur Messung der Liquorkonzentrationen verwendet, wohingegen hier ein ELISA verwendet wurde. Die Wahl der Methode dürfte jedoch bezüglich eines relativen Vergleichs zwischen krank und gesund keinen Einfluss haben. Ebenfalls ist die relativ geringe Größe des Kollektivs von n=12 und die vorangegangene antipsychotische Medikation nicht als ursächlich für die unterschiedlichen Ergebnisse anzusehen, denn Steiner et al. konnten signifikante Unterschiede im Liquor schon bei einem ebenfalls medikamentös vorbehandeltem Kollektiv identischer Größe feststellen. Somit bleibt die Rolle von S-100B bei der Schizophrenie aufgrund widersprüchlicher Ergebnisse weiter unklar. Ebenso, ob es sich im Falle einer erhöhten Liquorkonzentration um einen bei der Pathogenese der Schizophrenie beteiligten Mechanismus oder vielmehr um einen Kompensationsmechanismus handelt (Steiner et al. 2006).

4.3.6 Herkunft der Proteine – Blut oder Gehirn?

Die Erhöhung eines hauptsächlich aus dem Serum stammenden Proteins wie hier der Akute-Phase Proteine und Apolipoproteine im Liquor kann mehrere Ursachen haben, die es gilt zu differenzieren. Der Einfluss der Schrankenfunktion kann durch Berücksichtigung des Albuminquotients als Marker für die Schrankenfunktion eliminiert werden. In vorliegender Arbeit wurde versucht, bei beiden untersuchten Gruppen möglichst Patienten mit ähnlichen Werten für den Albuminquotient zu verwenden, so dass Unterschiede in der Schrankenfunktion eine möglichst geringe Rolle spielen. Zusätzlich ist es erforderlich, die Serumwerte ebenfalls zu bestimmen, um eine primäre Erhöhung im Serum und folglich nur eine sekundäre Erhöhung im Liquor aufzudecken. Auch können Reibergramme, wie es sie schon für die Immunglobuline gibt, eine Unterscheidung zwischen Blut- oder Hirnfraktion eines Proteins ermöglichen.

4.3.7 Einfluss der antipsychotischen Medikation

Um bei Patienten, die sich in einer akuten Psychose befinden, eine Lumbalpunktion durchführen zu können, müssen diese erst den Zustand der Einwilligungsfähigkeit erreichen, da es sich bei der diagnostischen Lumbalpunktion um eine invasive Untersuchung handelt. Deshalb standen die meisten hier eingeschlossenen Patienten zum Zeitpunkt der Lumbalpunktion unter einer antipsychotischen Akutmedikation. Diese Medikamente nehmen im Zuge ihrer therapeutischen Wirkung Einfluss auf Vorgänge im Gehirn (Rezeptorblockade) und könnten so auch die Proteinzusammensetzung im Liquor beeinflussen.

Die bei den hier eingeschlossenen Patienten verwendeten Antipsychotika Risperidon und Olanzapin gehören zur Gruppe der atypischen Neuroleptika. Sie unterscheiden sich zu den typischen Neuroleptika in ihrem erheblich selteneren Auftreten extrapyramidalmotorischer Störungen. Atypische Neuroleptika wirken über die Blockade zentraler Rezeptoren, insbesondere des Dopamin (D2)- und 5-HT2A-Rezeptors (Herdegen 2010). In der Arbeit von Yang et al konnte gezeigt werden, dass bei den Akutephaseproteinen Haptoglobin, Apolipoprotein A-I und -IV sowie Alpha-1-Antitrypsin kein Konzentrationsunterschied zwischen unmedizierten Patienten und Patienten, die 2 Monate mit dem atypischen Neuroleptikum Clozapin behandelt wurden, besteht (Yang et al. 2006).

Generell lässt sich ein Einfluss der antipsychotischen Medikation auf die Liquorproteinzusammensetzung jedoch nicht ausschließen.

4.4 Methodenkritik 2D-Gelelektrophorese

4.4.1 2D-DIGE

Die hier angewandte Technik der 2D-Gelelektrophorese ermöglicht die gleichzeitige Darstellung des gesamten Liquorproteoms und liefert Informationen über Molekülladung und -masse, Menge, Isoformen und posttranslationale Modifikationen und stellt somit eine etablierte Methode für die Proteomanaylse dar (Gauci et al. 2011).

Die *difference in gele Gelelectrophroresis* (DIGE, erstmals 1997 von Minden et al beschrieben) stellt eine Weiterentwicklung der herkömmlichen 2D-Gelelektrophorese dar und bietet ihr gegenüber einige wesentliche Vorteile:

Die DIGE erlaubt eine simultane Auftrennung zweier zu vergleichender Proben gleichzeitig in einem Gel und somit unter identischen elektrophoretischen Bedingungen. Dies bietet den Vorteil, experimentell bedingte Variationen von Gel zu Gel zu reduzieren und die experimentelle Handhabbarkeit zu verbessern. Durch das zusätzliche Auftragen eines jeweils identischen internen Standards auf jedes Gel wird zusätzlich die Vergleichbarkeit zwischen den Gelen verbessert und somit die Reproduzierbarkeit erhöht (Marouga et al. 2005b). Die hier verwendete Minimal Labelling Technologie ist zudem sensitiver als die bei der konventionellen 2D-Gelelektrophorese verwendete Silberfärbung (Miller et al. 2006, Patton 2002).

4.4.2 präanalytische Liquordepletion

Ein grundlegendes Problem der Proteomanalyse im Liquor stellt die hohe dynamische Bandbreite der Proteinkonzentrationen dar. Sie erstreckt sich über eine Größenordnung von mindestens 10^8 zwischen dem höchst konzentrierten Protein (Albumin mit 130-350 mg/l) und den niedrig konzentrierten Proteinen im Bereich von ng/l (Mouton-Barbosa et al. 2010). Hinzu kommt, dass die für die Liquoranalytik interessanten hirnspezifischen Proteine meist in geringer Konzentration vorliegen und nur einen kleinen Teil der Liquorproteine ausmachen. So macht der Anteil an Serumproteinen im Liquor bis zu 80% aus (Reiber 2003b). Hieraus resultiert, dass hirnspezifische Proteine durch in hoher Konzentration vertretene Serumproteine in der 2D- Gelelektrophorese überlagert werden.

Diese Tatsachen stellen eine analytische Herausforderung dar und verdeutlichen die Notwendigkeit der präanalytischen Liquordepletion, bei der hoch konzentrierte Proteine wie Albumin und Immunglobuline entfernt werden, um damit eine Anreicherung der niedriger konzentrierten Proteine zu ermöglichen.

In vorliegender Arbeit wurden Albumin und IgG vor der elektrophoretischen Auftrennung entfernt. Allerdings handelt es sich dennoch bei den hier in der 2D-DIGE identifizierten Proteinen ausschließlich um nicht hirnspezifische Proteine. Zusätzlich wäre folglich zu überlegen, noch andere hoch konzentrierte, nicht hirnspezifische Proteine wie Transferrin, IgA, IgM und Fibrinogen vor der elektrophoretischen Auftrennung zu entfernen, um somit mehr Spots visualisieren zu können (Ogata et al. 2005). Ein weiterer Vorteil der Depletion besteht darin, dass nach Entfernen der hoch konzentrierten Proteine insgesamt mehr Liquor auf die Gele auftragen werden kann, ohne dass sie überladen sind. So haben in der Folge die kleineren Spots einen höheren Proteingehalt und können so massenspektrometrisch leichter identifiziert werden.

Allerdings ist es auf der anderen Seite auch denkbar, dass Proteine, die an hoch konzentrierte Proteine gebunden sind oder mit ihnen assoziiert sind, bei der Depletion verloren gehen. Vor Allem die Entfernung von Albumin, an welches durch seine Transportfunktion viele Proteine gebunden sind, kann zum Verlust potentiell interessanter Proteine führen (Huang et al. 2005). Ein Beispiel hierfür ist die Tatsache, dass durch die Depletion von Albumin und IgG die hirnspezifischen Proteine Tau und HFAP mit entfernt werden und so in der 2D-DIGE nicht mehr nachgewiesen werden können (Brechlin et al. 2008b).

4.4.3 Räumliche Auflösung

Ein weiteres methodisches Problem geht auf die eingeschränkte räumliche Auflösungsfähigkeit der 2D-Gelelektrophorese zurück.

Wie in vorliegender Arbeit am Beispiel von Haptoglobin und Apolipoprotein A-IV zu sehen, werden Proteine, die sowohl einen ähnlichen isoelektrischen Punkt (5,3 vs. 6,1) als auch eine ähnliche Molekülmasse (45,4 kDa vs. 45,9 kDa) aufweisen, an der identischen Stelle im Gel dargestellt und somit überlagert. Im Programm DeCyder zeigte sich an dieser Stelle nur ein symmetrischer glatter Spot, wodurch vom Programm auch nur ein Regulationsfaktor errechnet werden konnte. Bei der Interpretation dieses Faktors kann somit nicht geklärt werden, ob nur eines der

beiden Proteine oder sogar beide Proteine für den Unterschied zwischen den beiden Gruppen verantwortlich sind. Auch wäre in letzterem Fall nicht ersichtlich, zu welchem Anteil die beiden Proteine jeweils an der Entstehung des gesehenen Unterschiedes beteiligt sind.

Ein Lösungsansatz für dieses Problem wäre, bei der Isoelektrische Fokussierung den relativ weiten pH-Bereich von 4- 7 in mehrere sich überlappende Teilbereiche aufzuteilen. So wird das Proteinbild in der ersten Dimension gestreckt und die räumliche Auflösung kann verbessert werden (Wildgruber et al. 2000).

Eine weitere Möglichkeit stellt die Durchführung einer dritten elektrophoretischen Auftrennung im Anschluss an die 2D-Gelelektrophorese dar. Dabei können die Bereiche, in denen große Proteinspots die Spots niedrig konzentrierter Proteine überlagern, ausgeschnitten werden und orthogonal zur Laufrichtung der zweiten Dimension erneut aufgetrennt werden. Nach dem gleichen Prinzip kann so auch für die Randbereiche eines 2D-Gels, in dem sich Proteine mit sehr hohem oder niedrigem isoelektrischen Punkt sammeln, eine höhere Auflösung erreicht werden (Butt et al. 2005).

In Bezug auf die sich anschließende massenspektrometrische Untersuchung ergibt sich aus diesen beiden Verfahren zur Verbesserung der Auflösung ebenfalls ein Vorteil: Durch die stärkere Auftrennung der Proteine liegen bei den zur Analyse entnommenen Gelstücken weniger komplexe Proteingemische vor, wodurch in der Folge die Proteinidentifikation weniger beeinträchtigt wird (Butt et al. 2005).

4.4.4 Gelfreie Methoden

Eine Alternative zur 2D-Gelelektrophorese in der Proteomforschung stellen die Gel-freien Methoden dar. An dieser Stelle sollen exemplarisch einige Methoden erläutert werden.

Eine Methode besteht in der Kombination der Flüssigchromatographie mit der anschließenden massenspektrometrischen Analyse (LC-MS). Die Möglichkeit, neben der Proteinanalyse auch einen quantitativen Vergleich zwischen zwei Proben vorzunehmen, bietet beispielsweise die iTRAQ (Isobaric Tags for Relative and Absolute Quantification) Dabei können auf Peptid-Ebene bis zu 4 unterschiedliche Proben in einem gemeinsamen Experiment massenspektrometrisch untersucht werden. Die Peptide der einzelnen Proben

werden hierfür mit *Tags* identischer Gesamtmasse markiert. Im Massenspektrometer fragmentieren diese *Tags* jedoch unterschiedlich und ermöglichen so die Unterscheidung und relative Quantifizierung der Proben.
Gel-freie Methoden bieten eine höhere Sensitivität für niedrigkonzentrierte Proteine und umgehen die Schwierigkeit der Gelelektrophorese, alle Proteine einer Probe in einem Gel aufzutrennen (Rabilloud 2002).
Ein wesentlicher Nachteil der Gel-freien Methoden ergibt sich jedoch aus der ihnen gemeinsamen Proteinanalyse auf Peptidebene. Das heißt, es wird aus einzelnen oder mehreren Peptiden auf das ursprüngliche Protein geschlossen. So ist es nicht möglich, durch die Analyse einzelner Peptide eines Proteins die oft zahlreichen Isoformen zu unterscheiden. Diese Isoformen entstehen durch posttranskriptionale (z.B. alternatives Spleißen) oder posttranslationale Modifikationen (z.B. Phosphorylierung, Trunkierung oder Glykosilierung) und können sich so stark in ihrer biologischen Funktion und Regulation unterscheiden (Mann et al. 2003). Somit ist die Differenzierung der einzelnen Isoformen von Bedeutung wenn es darum geht, das Proteom zweier unterschiedlicher Proben genauer miteinander zu vergleichen. Bei der 2D-PAGE ist es hingegen möglich, diese Isoformen darzustellen und zu differenzieren. Posttranslationale Modifikationen führen zu einer Veränderung des Isoelektrischen Punktes und der relativen Masse und werden folglich im Gel als einzelne Spots sichtbar (Baggerman et al. 2005).
In Zukunft werden voraussichtlich unter Berücksichtigung der jeweiligen Vor- und Nachteile in Abhängigkeit von der Fragestellung weiterhin sowohl Gel-basierte als auch Gel-freie Methoden zur Anwendung kommen (Rabilloud 2002).

4.5 Schlussfolgerung und Ausblick

In Zusammenschau aller Ergnisse dieser Arbeit ist es letztdendlich nicht gelungen, Biomarker für die Schizophrenie zu identifizieren. Die in der 2D-DIGE gesehenen Tendenzen konnten an einem größeren Patientenkollektiv nicht bestätigt werden. Daher scheint für die Biomarkersuche bei Schizphreniepatienten ein nächster notwendiger Schritt zu sein, die Methodik zu optimieren. Der DIGE-Ansatz zur Identifikation möglicher Biomarker hat sich mit relativ geringen Patientenzahlen bisher bei Meningitis und der Creuzfeld-Jakob-Krankheit bewährt (Jesse et al. 2010, Brechlin et al. 2008b). Unter Beibehaltung dieser Methode müsste für die

Schizophrenie, bei der es wahrscheinlich zu nur sehr geringen Veränderungen der Liquorproteine kommt, ein nächster Schritt sein, ein deutlich größeres Patientenkollektiv zu untersuchen. So könnte es auch möglich sein, eventuell vorhandene Untergruppen der paranoiden Schizophrenie zu differenzieren. Zu bedenken wäre dabei allerdings die durch die erhöhte Probenanzahl deutlich erschwerte Handhabbarkeit im Ablauf der 2D-Gelelektrophorese. Zudem wäre zu überlegen, wie oben beschrieben durch erweiterte präanalytische Liquordepletion und Verbesserung der räumlichen Auflösung vermehrt niedrig konzentrierte und hirnspezifische Proteine zu identifizieren.

5 Zusammenfassung

Die Schizophrenie gehört zu einer der schwerwiegendsten psychiatrischen Erkrankungen und ist mit einer Lebenszeitprävalenz von 1% zudem relativ häufig. Trotz intensiver Forschung leibt die Pathogenese noch weitgehend unklar. Zudem basiert die Diagnosestellung ausschließlich auf klinischen Beobachtungen und anamnestischen Berichten der Patienten oder deren Angehörigen. Laborchemische Untersuchungen dienen bisher lediglich dem Ausschluss anderen Ursachen für eine Psychose. Ziel dieser Arbeit war es deshalb, Biomarker im Liquor schizophrener Patienten zu finden, welche die Diagnostik erleichtern und etwas zum Verständnis der Krankheitsentstehung beitragen können. Hierfür wurden Liquorproben von Schizophrenie-Patienten verwendet, bei denen die Erstmanifestation einer paranoiden Schizophrenie diagnostiziert wurde. Dazu passend wurden gesunde Kontrollproben ausgewählt. Zunächst wurden die hirnspezifischen Proteine Tau, Beta-Amyloid, S100B und Orexin A mittels „Enzyme-Linked Immunosorbent Assay“ (ELISA) beziehungsweise „Radioimmunoassay“ bestimmt. Hierbei zeigten sich keine signifikanten Konzentrationsunterschiede zwischen Schizophrenie- und Kontrollpatienten. Für die Proteomanalyse kam die hierfür etablierte zweidimensionale „difference in-gel electrophorsis (2D-DIGE) zur Anwendung. Sie zeichnet im Gegensatz zur herkömmlichen 2D-Gelelektrophorese aus, dass durch die Fluoreszenzmarkierung mehrere Proben gemeinsam in einem Gel aufgetrennt werden können. Nach IgG- und Albuminentfernung wurden die beiden Gruppen jeweils unterschiedlich farbstoffmarkiert. Jeweils die Probe eines Schizophrenie-Patienten wurde gemeinsam mit einer Kontrollprobe und dem internen Standard auf ein Gel aufgetragen und in der ersten und zweiten Dimension aufgetrennt. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe der Software DeCyder™ (GE Healthcare). Die Spots mit signifikanten Unterschieden zwischen beiden Gruppen wurden im Anschluss massenspektrometrisch analysiert. Es konnten in der Schizophrenie-Gruppe die Akute-Phase-Proteine Alpha-1-Antirypsin und Haptoglobin sowie die Apolipoproteine A1 und A4 als erhöht detektiert werden. Diese aus der 2D-DIGE gewonnenen Ergebnisse wurden mit unabhängigen Methoden (Western-Blot, ELISA, 2D-Blot) an einem erweiterten Kollektiv untersucht. Die in der

Gelelektrophorese gesehenen Unterschiede konnten dort allerdings nicht bestätigt werden. Bei den zunächst detektierten Proteinen handelt es sich um nicht hirnspezifische Proteine, die größtenteils aus dem Blut in den Liquor gelangen. Zudem sind diese Proteine nicht als spezifisch für die Schizophrenie zu betrachten, sondern sind bereits bei zahlreichen neurologischen Erkrankungen beschrieben worden. Um vermehrt hirnspezifische Proteine zu detektieren, die meist in niedriger Konzentration im Liquor vorliegen, wäre folglich eine methodische Optimierung anzustreben: Eine erweiterte präanalytische Depletion kann die in hoher Konzentration vorliegenden unspezifischen Liquorproteine reduzieren um somit kleinere zuvor überlagerte Proteinspots sichtbar machen. Eine Verbesserung der räumlichen Auflösung der Gelelektrophorese kann durch einen dritten elektrophoretischen Auftrennungsschritt und die Aufteilung des pH-Bereichs in mehrere Teilbereiche erreicht werden und kann ebenso dazu beitragen, vermehrt niedrigkonzentrierte hirnspezifische Liquorproteine zu detektieren. Vorliegende Ergebnisse lassen insgesamt vermuten, dass es bei der Schizophrenie zu relativ geringen Veränderungen des Liquorproteoms kommt. Deshalb wäre es sicher notwendig, die initial untersuchte Probenanzahl deutlich zu erhöhen. So könnten auch geringe Proteinveränderungen im Liquor schizophrener Patienten sowie Veränderungen, die nur in Teilgruppen dieses Kollektivs vorliegen, sicherer detektiert werden. Für die praktikablere Handhabbarkeit der hohen Probenzahlen könnten neue Gel-freie Methoden zum Einsatz kommen.

6 Literaturverzeichnis

1. Abi-Dargham A, Rodenhiser J, Printz D, Zea-Ponce Y, Gil R, Kegeles L S, Weiss R, Cooper T B, Mann J J, Van Heertum R L, Gorman J M, Laruelle M: Increased baseline occupancy of D2 receptors by dopamine in schizophrenia. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A., 97: 8104-8109 (2000)

2. Abraha H D, Fuller L C, Du Vivier A W, Higgins E M, Sherwood R A: Serum S-100 protein: a potentially useful prognostic marker in cutaneous melanoma. Br.J.Dermatol., 137: 381-385 (1997)

3. Adamantidis A, de Lecea L: The hypocretins as sensors for metabolism and arousal. J.Physiol., 587: 33-40 (2009)

4. Akbarian S, Bunney W E,Jr, Potkin S G, Wigal S B, Hagman J O, Sandman C A, Jones E G: Altered distribution of nicotinamide-adenine dinucleotide phosphate-diaphorase cells in frontal lobe of schizophrenics implies disturbances of cortical development. Arch.Gen.Psychiatry, 50: 169-177 (1993)

5. Alban A, David S O, Bjorkesten L, Andersson C, Sloge E, Lewis S, Currie I: A novel experimental design for comparative two-dimensional gel analysis: two-dimensional difference gel electrophoresis incorporating a pooled internal standard. Proteomics, 3: 36-44 (2003)

6. Andersson M, Alvarez-Cermeno J, Bernardi G, Cogato I, Fredman P, Frederiksen J, Fredrikson S, Gallo P, Grimaldi L M, Gronning M: Cerebrospinal fluid in the diagnosis of multiple sclerosis: a consensus report. J.Neurol.Neurosurg.Psychiatry., 57: 897-902 (1994)

7. Andreasen N, Vanmechelen E, Van de Voorde A, Davidsson P, Hesse C, Tarvonen S, Raiha I, Sourander L, Winblad B, Blennow K: Cerebrospinal fluid tau protein as a biochemical marker for Alzheimer's disease: a community based follow up study. J.Neurol.Neurosurg.Psychiatry., 64: 298-305 (1998)

8. Arinami T, Hirano T, Kobayashi K, Yamanouchi Y, Hamaguchi H: Assignment of the apolipoprotein A-I gene to 11q23 based on RFLP in a case with a partial deletion of chromosome 11, del(11)(q23.3----qter). Hum.Genet., 85: 39-40 (1990)

9. Avgustin B, Wraber B, Tavcar R: Increased Th1 and Th2 immune reactivity with relative Th2 dominance in patients with acute exacerbation of schizophrenia. Croat.Med.J., 46: 268-274 (2005)

10. Baggerman G, Vierstraete E, De Loof A, Schoofs L: Gel-based versus gel-free proteomics: a review. Comb.Chem.High Throughput Screen., 8: 669-677 (2005)

11. Banks R E, Dunn M J, Hochstrasser D F, Sanchez J C, Blackstock W, Pappin D J, Selby P J: Proteomics: new perspectives, new biomedical opportunities. Lancet, 356: 1749-1756 (2000)

12. Benson K L: Sleep in schizophrenia: impairments, correlates, and treatment. Psychiatr.Clin.North Am., 29: 1033-45; abstract ix-x (2006)

13. Bilder R M, Reiter G, Bates J, Lencz T, Szeszko P, Goldman R S, Robinson D, Lieberman J A, Kane J M: Cognitive development in schizophrenia: follow-back from the first episode. J.Clin.Exp.Neuropsychol., 28: 270-282 (2006)

14. Brechlin P, Jahn O, Steinacker P, Cepek L, Kratzin H, Lehnert S, Jesse S, Mollenhauer B, Kretzschmar H A, Wiltfang J, Otto M: Cerebrospinal fluid-optimized two-dimensional difference gel electrophoresis (2-D DIGE) facilitates the differential diagnosis of Creutzfeldt-Jakob disease. Proteomics, 8: 4357-4366 (2008a)

15. Brechlin P, Jahn O, Steinacker P, Cepek L, Kratzin H, Lehnert S, Jesse S, Mollenhauer B, Kretzschmar H A, Wiltfang J, Otto M: Cerebrospinal fluid-optimized two-dimensional difference gel electrophoresis (2-D DIGE) facilitates the differential diagnosis of Creutzfeldt-Jakob disease. Proteomics, 8: 4357-4366 (2008b)

16. Buka S L, Tsuang M T, Torrey E F, Klebanoff M A, Bernstein D, Yolken R H: Maternal infections and subsequent psychosis among offspring. Arch.Gen.Psychiatry, 58: 1032-1037 (2001)

17. Butcher J N, Mineka S, Hooley J M: 14. Schizophrenie und andere psychotische Störungen. In: Butcher J N, Mineka S, Hooley J M: Klinische Psychologie, 13. Aufl, Pearson Studium, München, S. 580-583 (2009)

18. Butt R H, Coorssen J R: Postfractionation for enhanced proteomic analyses: routine electrophoretic methods increase the resolution of standard 2D-PAGE. J.Proteome Res., 4: 982-991 (2005)

19. Cahn W, Hulshoff Pol H E, Lems E B, van Haren N E, Schnack H G, van der Linden J A, Schothorst P F, van Engeland H, Kahn R S: Brain volume changes in first-episode schizophrenia: a 1-year follow-up study. Arch.Gen.Psychiatry, 59: 1002-1010 (2002)

20. Cannon M, Caspi A, Moffitt T E, Harrington H, Taylor A, Murray R M, Poulton R: Evidence for early-childhood, pan-developmental impairment specific to schizophreniform disorder: results from a longitudinal birth cohort. Arch.Gen.Psychiatry, 59: 449-456 (2002)

21. Chang S H, Chiang S Y, Chiu C C, Tsai C C, Tsai H H, Huang C Y, Hsu T C, Tzang B S: Expression of anti-cardiolipin antibodies and inflammatory associated factors in patients with schizophrenia. Psychiatry Res., 187: 341-346 (2011)

22. Coyle J T: Glutamate and schizophrenia: beyond the dopamine hypothesis. Cell.Mol.Neurobiol., 26: 365-384 (2006)

23. Crow T J: Positive and negative schizophrenic symptoms and the role of dopamine. Br.J.Psychiatry, 137: 383-386 (1980)

24. Csaszar A, Kalman J, Szalai C, Janka Z, Romics L: Association of the apolipoprotein A-IV codon 360 mutation in patients with Alzheimer's disease. Neurosci.Lett., 230: 151-154 (1997)

25. Dalal M A, Schuld A, Pollmacher T: Lower CSF orexin A (hypocretin-1) levels in patients with schizophrenia treated with haloperidol compared to unmedicated subjects. Mol.Psychiatry, 8: 836-837 (2003)

26. Davis K L, Kahn R S, Ko G, Davidson M: Dopamine in schizophrenia: a review and reconceptualization. Am.J.Psychiatry, 148: 1474-1486 (1991)

27. DeLisi L E, Sakuma M, Maurizio A M, Relja M, Hoff A L: Cerebral ventricular change over the first 10 years after the onset of schizophrenia. Psychiatry Res., 130: 57-70 (2004)

28. Deutch A Y, Bubser M: The orexins/hypocretins and schizophrenia. Schizophr.Bull., 33: 1277-1283 (2007)

29. Doran P, Donoghue P, O'Connell K, Gannon J, Ohlendieck K: Proteomic profiling of pathological and aged skeletal muscle fibres by peptide mass fingerprinting (Review). Int.J.Mol.Med., 19: 547-564 (2007)

30. Fadel J, Bubser M, Deutch A Y: Differential activation of orexin neurons by antipsychotic drugs associated with weight gain. J.Neurosci., 22: 6742-6746 (2002a)

31. Fadel J, Deutch A Y: Anatomical substrates of orexin-dopamine interactions: lateral hypothalamic projections to the ventral tegmental area. Neuroscience, 111: 379-387 (2002b)

32. Felgenhauer K: Protein size and cerebrospinal fluid composition. Klin.Wochenschr., 52: 1158-1164 (1974)

33. Frisoni G B, Prestia A, Geroldi C, Adorni A, Ghidoni R, Amicucci G, Bonetti M, Soricelli A, Rasser P E, Thompson P M, Giannakopoulos P: Alzheimer's CSF markers in older schizophrenia patients. Int.J.Geriatr.Psychiatry, 26: 640-648 (2011)

34. Gabay C, Kushner I: Acute-phase proteins and other systemic responses to inflammation. N.Engl.J.Med., 340: 448-454 (1999)

35. Gauci V J, Wright E P, Coorssen J R: Quantitative proteomics: assessing the spectrum of in-gel protein detection methods. J.Chem.Biol., 4: 3-29 (2011)

36. Gurling H M, Kalsi G, Brynjolfson J, Sigmundsson T, Sherrington R, Mankoo B S, Read T, Murphy P, Blaveri E, McQuillin A, Petursson H, Curtis D: Genomewide genetic linkage analysis confirms the presence of susceptibility loci for schizophrenia, on chromosomes 1q32.2, 5q33.2, and 8p21-22 and provides support for linkage to schizophrenia, on chromosomes 11q23.3-24 and 20q12.1-11.23. Am.J.Hum.Genet., 68: 661-673 (2001)

37. Hafner H: Onset and course of the first schizophrenic episode. Kaohsiung J.Med.Sci., 14: 413-431 (1998)

38. Herdegen T: Schizophrenie und wahnhafte Erkrankungen. In: Herdegen T: Kurzlehrbuch Pharmakologie und Toxikologie, 2. Aufl, Georg Thieme, Stuttgart, S. 370-373 (2010)

39. Hoff A L, Svetina C, Shields G, Stewart J, DeLisi L E: Ten year longitudinal study of neuropsychological functioning subsequent to a first episode of schizophrenia. Schizophr.Res., 78: 27-34 (2005)

40. Howes O D, Montgomery A J, Asselin M C, Murray R M, Valli I, Tabraham P, Bramon-Bosch E, Valmaggia L, Johns L, Broome M, McGuire P K, Grasby P M: Elevated striatal dopamine function linked to prodromal signs of schizophrenia. Arch.Gen.Psychiatry, 66: 13-20 (2009)

41. Huang H L, Stasyk T, Morandell S, Mogg M, Schreiber M, Feuerstein I, Huck C W, Stecher G, Bonn G K, Huber L A: Enrichment of low-abundant serum proteins by albumin/immunoglobulin G immunoaffinity depletion under partly denaturing conditions. Electrophoresis, 26: 2843-2849 (2005)

42. 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: Independent protein-profiling studies show a decrease in apolipoprotein A1 levels in schizophrenia CSF, brain and peripheral tissues. Mol.Psychiatry, 13: 1118-1128 (2008)

43. Huang Y C, Wu Y R, Tseng M Y, Chen Y C, Hsieh S Y, Chen C M: Increased prothrombin, apolipoprotein A-IV, and haptoglobin in the cerebrospinal fluid of patients with Huntington's disease. PLoS One, 6: e15809 (2011)

44. Huhmer A F, Biringer R G, Amato H, Fonteh A N, Harrington M G: Protein analysis in human cerebrospinal fluid: Physiological aspects, current progress and future challenges. Dis.Markers, 22: 3-26 (2006)

45. Jablensky A: Epidemiology of schizophrenia: the global burden of disease and disability. Eur.Arch.Psychiatry Clin.Neurosci., 250: 274-285 (2000)

46. Jahn O, Hesse D, Reinelt M, Kratzin H D: Technical innovations for the automated identification of gel-separated proteins by MALDI-TOF mass spectrometry. Anal.Bioanal Chem., 386: 92-103 (2006)

47. Jesse S, Steinacker P, Lehnert S, Sdzuj M, Cepek L, Tumani H, Jahn O, Schmidt H, Otto M: A proteomic approach for the diagnosis of bacterial meningitis. PLoS One, 5: e10079 (2010)

48. Jiang L, Lindpaintner K, Li H F, Gu N F, Langen H, He L, Fountoulakis M: Proteomic analysis of the cerebrospinal fluid of patients with schizophrenia. Amino Acids, 25: 49-57 (2003)

49. Jones P, Rodgers B, Murray R, Marmot M: Child development risk factors for adult schizophrenia in the British 1946 birth cohort. Lancet, 344: 1398-1402 (1994)

50. Kegeles L S, Abi-Dargham A, Zea-Ponce Y, Rodenhiser-Hill J, Mann J J, Van Heertum R L, Cooper T B, Carlsson A, Laruelle M: Modulation of amphetamine-induced striatal dopamine release by ketamine in humans: implications for schizophrenia. Biol.Psychiatry, 48: 627-640 (2000)

51. Kirov G, O'Donovan M C, Owen M J: Finding schizophrenia genes. J.Clin.Invest., 115: 1440-1448 (2005)

52. Krystal J H, Karper L P, Seibyl J P, Freeman G K, Delaney R, Bremner J D, Heninger G R, Bowers M B,Jr, Charney D S: Subanesthetic effects of the noncompetitive NMDA antagonist, ketamine, in humans. Psychotomimetic, perceptual, cognitive, and neuroendocrine responses. Arch.Gen.Psychiatry, 51: 199-214 (1994)

53. La Y J, Wan C L, Zhu H, Yang Y F, Chen Y S, Pan Y X, Feng G Y, He L: Decreased levels of apolipoprotein A-I in plasma of schizophrenic patients. J.Neural Transm., 114: 657-663 (2007)

54. Lieberman J A, Kane J M, Alvir J: Provocative tests with psychostimulant drugs in schizophrenia. Psychopharmacology (Berl), 91: 415-433 (1987)

55. Mann M, Jensen O N: Proteomic analysis of post-translational modifications. Nat.Biotechnol., 21: 255-261 (2003)

56. Marouga R, David S, Hawkins E: The development of the DIGE system: 2D fluorescence difference gel analysis technology. Anal.Bioanal Chem., 382: 669-678 (2005a)

57. Marouga R, David S, Hawkins E: The development of the DIGE system: 2D fluorescence difference gel analysis technology. Anal.Bioanal Chem., 382: 669-678 (2005b)

58. Martins-De-Souza D, Wobrock T, Zerr I, Schmitt A, Gawinecka J, Schneider-Axmann T, Falkai P, Turck C W: Different apolipoprotein E, apolipoprotein A1 and prostaglandin-H2 D-isomerase levels in cerebrospinal fluid of schizophrenia patients and healthy controls. World J.Biol.Psychiatry., 11: 719-728 (2010)

59. Marvin L F, Roberts M A, Fay L B: Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry in clinical chemistry. Clin.Chim.Acta, 337: 11-21 (2003)

60. May C, Kaye J A, Atack J R, Schapiro M B, Friedland R P, Rapoport S I: Cerebrospinal fluid production is reduced in healthy aging. Neurology, 40: 500-503 (1990)

61. McGue M, Gottesman I I: Genetic linkage in schizophrenia: perspectives from genetic epidemiology. Schizophr.Bull., 15: 453-464 (1989)

62. McNeil T F, Cantor-Graae E, Ismail B: Obstetric complications and congenital malformation in schizophrenia. Brain Res.Brain Res.Rev., 31: 166-178 (2000)

63. 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: Disruption of two novel genes by a translocation co-segregating with schizophrenia. Hum.Mol.Genet., 9: 1415-1423 (2000)

64. Miller I, Crawford J, Gianazza E: Protein stains for proteomic applications: which, when, why? Proteomics, 6: 5385-5408 (2006)

65. Minden J: Comparative proteomics and difference gel electrophoresis. BioTechniques, 43: 739, 741, 743 passim (2007)

66. Minden J S: Two-dimensional difference gel electrophoresis. Methods Mol.Biol., 869: 287-304 (2012)

67. Moises H W, Zoega T, Gottesman I I: The glial growth factors deficiency and synaptic destabilization hypothesis of schizophrenia. BMC Psychiatry, 2: 8 (2002)

68. Mouton-Barbosa E, Roux-Dalvai F, Bouyssie D, Berger F, Schmidt E, Righetti P G, Guerrier L, Boschetti E, Burlet-Schiltz O, Monsarrat B, Gonzalez de Peredo A: In-depth exploration of cerebrospinal fluid by combining peptide ligand library treatment and label-free protein quantification. Mol.Cell.Proteomics, 9: 1006-1021 (2010)

69. Nakamura T, Uramura K, Nambu T, Yada T, Goto K, Yanagisawa M, Sakurai T: Orexin-induced hyperlocomotion and stereotypy are mediated by the dopaminergic system. Brain Res., 873: 181-187 (2000)

70. Nishino S, Ripley B, Mignot E, Benson K L, Zarcone V P: CSF hypocretin-1 levels in schizophrenics and controls: relationship to sleep architecture. Psychiatry Res., 110: 1-7 (2002)

71. Nishino S, Ripley B, Overeem S, Nevsimalova S, Lammers G J, Vankova J, Okun M, Rogers W, Brooks S, Mignot E: Low cerebrospinal fluid hypocretin (Orexin) and altered energy homeostasis in human narcolepsy. Ann.Neurol., 50: 381-388 (2001)

72. Nunes S O, Matsuo T, Kaminami M S, Watanabe M A, Reiche E M, Itano E N: An autoimmune or an inflammatory process in patients with schizophrenia, schizoaffective disorder, and in their biological relatives. Schizophr.Res., 84: 180-182 (2006)

73. Ogata Y, Charlesworth M C, Muddiman D C: Evaluation of protein depletion methods for the analysis of total-, phospho- and glycoproteins in lumbar cerebrospinal fluid. J.Proteome Res., 4: 837-845 (2005)

74. Palmer B A, Pankratz V S, Bostwick J M: The lifetime risk of suicide in schizophrenia: a reexamination. Arch.Gen.Psychiatry, 62: 247-253 (2005)

75. Patton W F: Detection technologies in proteome analysis. J.Chromatogr.B.Analyt Technol.Biomed.Life.Sci., 771: 3-31 (2002)

76. Pedersen C B, Mortensen P B: Evidence of a dose-response relationship between urbanicity during upbringing and schizophrenia risk. Arch.Gen.Psychiatry, 58: 1039-1046 (2001)

77. Petryshen T L, Middleton F A, Kirby A, Aldinger K A, Purcell S, Tahl A R, Morley C P, McGann L, Gentile K L, Rockwell G N, Medeiros H M, Carvalho C, Macedo A, Dourado A, Valente J, Ferreira C P, Patterson N J, Azevedo M H,

Daly M J, Pato C N, Pato M T, Sklar P: Support for involvement of neuregulin 1 in schizophrenia pathophysiology. Mol.Psychiatry, 10: 366-74, 328 (2005)

78. Rabilloud T: Two-dimensional gel electrophoresis in proteomics: old, old fashioned, but it still climbs up the mountains. Proteomics, 2: 3-10 (2002)

79. Reiber H: Proteins in cerebrospinal fluid and blood: barriers, CSF flow rate and source-related dynamics. Restor.Neurol.Neurosci., 21: 79-96 (2003a)

80. Reiber H: Proteins in cerebrospinal fluid and blood: barriers, CSF flow rate and source-related dynamics. Restor.Neurol.Neurosci., 21: 79-96 (2003b)

81. Reiber H: Flow rate of cerebrospinal fluid (CSF)--a concept common to normal blood-CSF barrier function and to dysfunction in neurological diseases. J.Neurol.Sci., 122: 189-203 (1994)

82. Reiber H, Felgenhauer K: Protein transfer at the blood cerebrospinal fluid barrier and the quantitation of the humoral immune response within the central nervous system. Clin.Chim.Acta, 163: 319-328 (1987)

83. Reiber H, Otto M, Trendelenburg C, Wormek A: Reporting cerebrospinal fluid data: knowledge base and interpretation software. Clin.Chem.Lab.Med., 39: 324-332 (2001a)

84. Reiber H, Peter J B: Cerebrospinal fluid analysis: disease-related data patterns and evaluation programs. J.Neurol.Sci., 184: 101-122 (2001b)

85. Reiber H, Peter J B: Cerebrospinal fluid analysis: disease-related data patterns and evaluation programs. J.Neurol.Sci., 184: 101-122 (2001c)

86. Reiss A B: Cholesterol and apolipoprotein E in Alzheimer's disease. Am.J.Alzheimers Dis.Other Demen., 20: 91-96 (2005)

87. Remschmidt H, Theisen F: 2.1 Definition und Klassifikation. In: Remschmidt H, Theisen F: Schizophrenie, 1.Aufl, Springer, Berlin, Heidelberg, New York, S. 14-16 (2011)

88. Rothermundt M, Falkai P, Ponath G, Abel S, Burkle H, Diedrich M, Hetzel G, Peters M, Siegmund A, Pedersen A, Maier W, Schramm J, Suslow T, Ohrmann P, Arolt V: Glial cell dysfunction in schizophrenia indicated by increased S100B in the CSF. Mol.Psychiatry, 9: 897-899 (2004)

89. Rothermundt M, Missler U, Arolt V, Peters M, Leadbeater J, Wiesmann M, Rudolf S, Wandinger K P, Kirchner H: Increased S100B blood levels in unmedicated and treated schizophrenic patients are correlated with negative symptomatology. Mol.Psychiatry, 6: 445-449 (2001)

90. Sadrzadeh S M, Graf E, Panter S S, Hallaway P E, Eaton J W: Hemoglobin. A biologic fenton reagent. J.Biol.Chem., 259: 14354-14356 (1984)

91. Sagud M, Muck-Seler D, Mihaljevic-Peles A, Vuksan-Cusa B, Zivkovic M, Jakovljevic M, Pivac N: Catechol-O-methyl transferase and schizophrenia. Psychiatr.Danub, 22: 270-274 (2010)

92. Schafer B W, Heizmann C W: The S100 family of EF-hand calcium-binding proteins: functions and pathology. Trends Biochem.Sci., 21: 134-140 (1996)

93. Schafer B W, Wicki R, Engelkamp D, Mattei M G, Heizmann C W: Isolation of a YAC clone covering a cluster of nine S100 genes on human chromosome 1q21: rationale for a new nomenclature of the S100 calcium-binding protein family. Genomics, 25: 638-643 (1995)

94. Schonknecht P, Hempel A, Hunt A, Seidl U, Volkmann M, Pantel J, Schroder J: Cerebrospinal fluid tau protein levels in schizophrenia. Eur.Arch.Psychiatry Clin.Neurosci., 253: 100-102 (2003)

95. Seeman P, Lee T, Chau-Wong M, Wong K: Antipsychotic drug doses and neuroleptic/dopamine receptors. Nature, 261: 717-719 (1976)

96. Segrest J P, Jones M K, De Loof H, Dashti N: Structure of apolipoprotein B-100 in low density lipoproteins. J.Lipid Res., 42: 1346-1367 (2001)

97. Seidman L J, Buka S L, Goldstein J M, Tsuang M T: Intellectual decline in schizophrenia: evidence from a prospective birth cohort 28 year follow-up study. J.Clin.Exp.Neuropsychol., 28: 225-242 (2006)

98. Shepherd M, Watt D, Falloon I, Smeeton N: The natural history of schizophrenia: a five-year follow-up study of outcome and prediction in a representative sample of schizophrenics. Psychol.Med.Monogr.Suppl., 15: 1-46 (1989)

99. Sorensen H J, Mortensen E L, Reinisch J M, Mednick S A: Association between prenatal exposure to bacterial infection and risk of schizophrenia. Schizophr.Bull., 35: 631-637 (2009)

100. St Clair D, Blackwood D, Muir W, Carothers A, Walker M, Spowart G, Gosden C, Evans H J: Association within a family of a balanced autosomal translocation with major mental illness. Lancet, 336: 13-16 (1990)

101. Steiner J, Bielau H, Bernstein H G, Bogerts B, Wunderlich M T: Increased cerebrospinal fluid and serum levels of S100B in first-onset schizophrenia are not related to a degenerative release of glial fibrillar acidic protein, myelin basic protein and neurone-specific enolase from glia or neurones. J.Neurol.Neurosurg.Psychiatry., 77: 1284-1287 (2006)

102. Straub R E, Jiang Y, MacLean C J, Ma Y, Webb B T, Myakishev M V, Harris-Kerr C, Wormley B, Sadek H, Kadambi B, Cesare A J, Gibberman A, Wang X, O'Neill F A, Walsh D, Kendler K S: Genetic variation in the 6p22.3 gene DTNBP1, the human ortholog of the mouse dysbindin gene, is associated with schizophrenia. Am.J.Hum.Genet., 71: 337-348 (2002)

103. Sunderland T, Linker G, Mirza N, Putnam K T, Friedman D L, Kimmel L H, Bergeson J, Manetti G J, Zimmermann M, Tang B, Bartko J J, Cohen R M: Decreased beta-amyloid1-42 and increased tau levels in cerebrospinal fluid of patients with Alzheimer disease. JAMA, 289: 2094-2103 (2003)

104. Tandon R, Nasrallah H A, Keshavan M S: Schizophrenia, "just the facts" 4. Clinical features and conceptualization. Schizophr.Res., 110: 1-23 (2009)

105. Taurines R, Dudley E, Grassl J, Warnke A, Gerlach M, Coogan A N, Thome J: Proteomic research in psychiatry. J.Psychopharmacol., 25: 151-196 (2011)

106. Tumani H, Hartung H P, Hemmer B, Teunissen C, Deisenhammer F, Giovannoni G, Zettl U K, BioMS Study Group: Cerebrospinal fluid biomarkers in multiple sclerosis. Neurobiol.Dis., 35: 117-127 (2009)

107. van den Pol A N: Hypothalamic hypocretin (orexin): robust innervation of the spinal cord. J.Neurosci., 19: 3171-3182 (1999)

108. Wan C, La Y, Zhu H, Yang Y, Jiang L, Chen Y, Feng G, Li H, Sang H, Hao X, Zhang G, He L: Abnormal changes of plasma acute phase proteins in schizophrenia and the relation between schizophrenia and haptoglobin (Hp) gene. Amino Acids, 32: 101-108 (2007)

109. Wildgruber R, Harder A, Obermaier C, Boguth G, Weiss W, Fey S J, Larsen P M, Gorg A: Towards higher resolution: two-dimensional electrophoresis of Saccharomyces cerevisiae proteins using overlapping narrow immobilized pH gradients. Electrophoresis, 21: 2610-2616 (2000)

110. Wong C T, Tsoi W F, Saha N: Acute phase proteins in male Chinese schizophrenic patients in Singapore. Schizophr.Res., 22: 165-171 (1996)

111. Woods B T: Is schizophrenia a progressive neurodevelopmental disorder? Toward a unitary pathogenetic mechanism. Am.J.Psychiatry, 155: 1661-1670 (1998)

112. Yang Y, Wan C, Li H, Zhu H, La Y, Xi Z, Chen Y, Jiang L, Feng G, He L: Altered levels of acute phase proteins in the plasma of patients with schizophrenia. Anal.Chem., 78: 3571-3576 (2006)

113. Zhang H L, Zhang X M, Mao X J, Deng H, Li H F, Press R, Fredrikson S, Zhu J: Altered cerebrospinal fluid index of prealbumin, fibrinogen, and haptoglobin in patients with Guillain-Barre syndrome and chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy. Acta Neurol.Scand., 125: 129-135 (2012)

114. Zhao X, Song S, Sun G, Strong R, Zhang J, Grotta J C, Aronowski J: Neuroprotective role of haptoglobin after intracerebral hemorrhage. J.Neurosci., 29: 15819-15827 (2009)

115. Zubin J, Steinhauer S R, Day R, van Kammen D P: Schizophrenia at the crossroads: a blueprint for the 80s. Compr.Psychiatry, 26: 217-240 (1985)

Anhang

Tabelle 4: Ergebnisse der Proteinidentifikation bei der Datenbanksuche (Swiss-Prot)

a: Mascot protein Score aus dem Peptid-Massen-Fingerprint. Signifikanzlimit: 56

b: Mascot MS/MS-Ionenscore der einzelnen Peptide.

Protein	**Swiss-Prot accession**	**MW [kDa]**	**pI**	**PMF Sequenz-abdeckung [%]**	**PMF score[a]**	**Sequenziertes Peptid**	**MS/MS ion score[b]**
Apolipoprotein A4	P06727	45,3	5,2	52	154		
Apolipoprotein A1	P02647	30,8	5,6	44	109	KVQPYLDDFQKK RTHLAPYSDELRQ RQGLLPVLESFKV	12 25 23
Haptoglobin	P00738	45,9	6,1	33	99	(RVGYVSGWGRN) KYVMLPVADQDQCIRH	(1) 48
Apolipoprotein A-IV Haptoglobin	P06727 P00738	55,3 45,9	5 6,1	52 31	154 84	 K.YVMLPVADQDQCIR.H	 38
Alpha-1-Antitrypsin	P01009	46,9	5,3	51	261	RDTVFALVNYIFFKG KTDTSHHDQDHPTFNKI KLYHSEAFTVNFGDTEEAKKQ	97 62 97

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen danken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben:

Herrn **Prof. Dr. Markus Otto,** der mir die Möglichkeit gegeben hat, die Arbeit in seinem Labor durchzuführen. Vor allem für die kontinuierliche und zuverlässige Betreuung sowie Motivation und Ermutigung während der Entstehung dieser Arbeit gilt ihm mein besonderer Dank.

Meinem Betreuer **Dr. Stefan Lehnert**, der mit seinem Engagement, seiner Geduld und Erfahrung maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat, möchte ich ebenfalls besonders danken.

Der **gesamten Arbeitsgruppe** danke ich für die offene Art, mit der ich aufgenommen wurde und für die große Hilfsbereitschaft bei der täglichen Arbeit im Labor.

Meinen Dank möchte ich außerdem **Dr. Nenad Vasic** aussprechen, der mich mit seiner klinischen Erfahrung tatkräftig bei der Auswahl der psychiatrischen Patienten unterstützt hat.

Herrn **Dr. Olaf Jahn** vom Max-Planck-Institut für Experimentelle Medizin in Göttingen danke ich für die massenspektrometrischen MALDI-TOF-Messungen und Identifikation der Proteinproben.

Ein großer Dank geht auch an alle **Mitarbeiter des Liquorlabores** für ihre Unterstützung bei der Probensuche.

Der Lebenslauf wurde aus Gründen des Datenschutzes entfernt.