

Aus dem Laboratory for Aging and Cognitive Diseases
(Prof. Dr. rer. nat. A. Fischer)
im Deutschen Zentrum für Neurodegenerative Erkrankungen (DZNE) der
Helmholtz-Gemeinschaft Göttingen

Epigenetik in der Schizophrenie und der Einfluss von Histon-Deacetylasen auf die Arbeitsgedächtnisfunktion

INAUGURAL – DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizinischen Fakultät der
Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von

Sebastian Löns

aus

Hannover

Göttingen 2015

Dekan: Prof. Dr. rer. nat. H. K. Kroemer

I. Berichterstatter: Prof. Dr. rer. nat. A. Fischer

II. Berichterstatter: PD Dr. med. O. Wirths

III. Berichterstatter: Prof. Dr. med. M. Oppermann

Tag der mündlichen Prüfung: 13. Oktober 2015

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	11
1.1	Einleitung	11
1.2	Schizophrenie	12
1.2.1	Epidemiologie, Verlauf, Prognose	12
1.2.2	Diagnosestellung	12
1.2.3	Symptome	13
1.2.4	Neuropathologie	16
1.2.5	Ätiologie	17
1.2.6	Theorie des Neurotransmitter-Ungleichgewichts	19
1.2.7	Parallelen zur bipolaren Erkrankung	22
1.3	Gedächtnis	23
1.3.1	Langzeitgedächtnis	24
1.3.2	Kurzzeitgedächtnis	24
1.3.3	Arbeitsgedächtnis	24
1.4	Epigenetik	25
1.4.1	Histon-Acetylierung	27
1.4.2	DNA-Methylierung	29
1.4.3	DNA-Methylierung und Histon-Acetylierung kooperieren	30
1.4.4	Histon-Acetylierung und DNA-Methylierung bei Lernvorgängen und Gedächtnis	30
1.4.5	GABAerges System und epigenetische Zusammenhänge	32
1.4.6	Tiermodelle der Schizophrenie	32
1.4.7	L-Methionin-Dauerapplikation als Tiermodell der Schizophrenie	33
1.5	Fragestellung	34
2	Materialien und Methoden	35
2.1	Materialien	35
2.1.1	Laboraausstattung	35
2.1.2	Gewebeproben	35
2.1.3	Versuchstiere	35
2.1.4	Geräte	36
2.1.5	Chemikalien	37
2.1.6	Antikörper	39
2.1.7	Primer	40
2.1.8	Pufferlösungen	41

2.2	Methoden	42
2.2.1	Western Blot	42
2.2.2	<i>Real-Time Polymerase-Kettenreaktion</i> (RT-PCR)	44
2.2.3	Methylierte DNA-Immunopräzipitation (MeDIP)	46
2.3	Verhaltensversuche	49
2.3.1	Objekterkennungstest	50
2.3.2	Y-Labyrinth	51
2.3.3	Morris-Wasserlabyrinth	52
2.4	Statistische Analyse	53
3	Ergebnisse	54
3.1	Biochemie	54
3.1.1	Statistische Analysen	54
3.1.2	Histon-Acetylierung	54
3.1.3	DNA-Methylierung	58
3.1.4	DNA – Methylierung	59
3.2	Verhaltensversuche	61
3.2.1	Etablierung des Y-Labyrinths zur Überprüfung des ortsabhängigen Arbeitsgedächtnisses	62
3.2.2	Vergleich des Einflusses chronischer Applikation der HDAC-Inhibitoren Sodiumbutyrat und Phenylbutyrat auf das objektabhängige Langzeitgedäch- tnis im Objekterkennungstest und das räumliche Arbeitsgedächtnis im Y-Labyrinth	63
3.2.3	Einfluss chronischer L-Methionin-Applikation auf das objektbezogene Arbeits- und Langzeitgedächtnis im Objekterkennungstest und auf räumliches Lernen und Langzeitgedächtnis im Morris-Wasserlabyrinth	65
4	Diskussion	69
4.1	Histon-Acetylierung im präfrontalen Kortex Schizophrener	69
4.1.1	Histon-Acetylierung	69
4.1.2	Einschränkungen	70
4.1.3	HDAC1	71
4.2	Erniedrigte Expression von GluR1 und ChRM1 in Hirngewebeproben schizophrener Patienten	72
4.2.1	Glutamaterge AMPA-Rezeptoren und muskarinerge Acetylcholin-Rezeptoren sind am Erwerb von Arbeitsgedächtnisinhalten beteiligt	73
4.2.2	Die bisherigen Ergebnisse zur Expression von GluR1 und ChRM1 im präfrontalen Kortex Schizophrener sind uneinheitlich	75
4.2.3	Funktionelle Rückschlüsse	76
4.2.4	Der Promotor des Gens <i>chrn1</i> ist in Schizophrenen hypomethyliert	77

4.3	Wirkung einer Dauertherapie mit HDAC-Inhibitoren auf das Langzeit- und Arbeitsgedächtnis	78
4.3.1	Sodiumbutyrat und Phenylbutyrat führen nicht zu einer Verbesserung des Arbeits- oder Langzeitgedächtnisses	79
4.3.2	Das Methionin-Mausmodell zeigt keine Gedächtnisdefizite	80
4.3.3	Erkenntnisse aus den Studien mit Versuchstieren	80
4.4	Schlussfolgerungen	80
4.5	Klinischer Ausblick	82
5	Zusammenfassung	84
6	Literaturverzeichnis	86

Abbildungsverzeichnis

1.1	Dopaminerge Systeme im ZNS	19
1.2	Modell der neuronalen Netzwerke, relevant für die schizophrene Symptomatik	21
1.3	Modell der neuronalen Verschaltungen im präfrontalen Kortex	22
1.4	Epigenetik im Nervensystem	26
1.5	Histon-Acetylierung und -Deacetylierung	27
1.6	Transkriptionssuppression durch epigenetische Regulation	31
2.1	Schematische Darstellung des Ablaufs des Objekterkennungstests (NOR) . .	51
2.2	Schematische Darstellung des Y-Labyrinths.	52
2.3	Schematische Darstellung des Morris-Wasserlabyrinths.	53
3.1	Semiquantitative Messung der Histon-Acetylierung	55
3.2	Semiquantitative Messung der Histon-Acetylierung Schizophrener verschiedener Altersgruppen	56
3.3	Semiquantitative Messung der Expression der Klasse I-HDAC 1, 2 und 3 . . .	57
3.4	Messung der mRNA der Klasse I-Histon-Deacetylasen 1, 2 und 3	58
3.5	Messung der mRNA des ionotropen AMPA-Glutamaterezeptors, Untereinheit glur1, und des muskarinergen Acetylcholin-Rezeptors chrm1	59
3.6	Hypomethylierung der regulatorischen Region vor dem chrm1-Gen	61
3.7	Steigerung der Explorationsfreude im Y-Labyrinth	62
3.8	Chronische Applikation der HDAC-Inhibitoren	64
3.9	Chronische Applikation von L-Methionin oder L-Methionin und Natriumbutyrat	67

Tabellenverzeichnis

2.1	Geräte	36
2.2	Chemikalien	37
2.3	Antikörper	39
2.4	Primer	40

Abkürzungsverzeichnis

5mC	5-Methylcytosin
AMPA	α -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazol-Propionsäure; engl. -acid
bp	Basenpaare, engl. base pairs
BSA	bovines Serumalbumin; engl. bovine serum albumine
CBP	CREB-binding protein; siehe CREB
cDNA	codierende DNA; siehe DNA
ChIP	Chromatin-Immunopräzipitation
ChRM1-5	muskarinerge Acetylcholinrezeptor 1-5
COMT	Catechol-O-Methyltransferase
CpG	Cytosin-phosphatidyl-Guanin-Dinukleotid
CREB	cAMP response element-binding protein
DAAO	D-Amino-Acid-Oxidase
DEPC	Diethyldicarbonat; engl. diethylpyrocarbonate
DI	Diskriminationsindex
DISC 1	disrupted in schizophrenia 1
DLPFC	dorsolateraler präfrontaler Kortex
DNA	Desoxyribonukleinsäure; engl. deoxyribonucleic acid
DNMT	DNA-Methyltransferase; siehe DNA
DNTBN 1	dystrobrevin binding protein 1
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ENI	European Neuroscience Institute
fMRT	funktionelle MRT; siehe MRT
GABA	γ -Aminobuttersäure; engl. γ -aminobutyric acid
GAD ₆₇	Glutamat Decarboxylase, Molekulargewicht 67kD
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GAT1	GABA-Transporter 1; siehe GABA
GluR1-4	AMPA-Rezeptor Untereinheit 1-4; siehe AMPA. Synonym: GRIA1-4
H3K14	Histon 3, Lysin 14
H3K9	Histon 3, Lysin 9
H4K12	Histon 4, Lysin 12
H4K16	Histon 4, Lysin 16
H4K5	Histon 4, Lysin 5
H4K8	Histon 4, Lysin 8
HAT	Histon-Acetyltransferase

Abkürzungsverzeichnis

HDAC	Histon-Deacetylase
HDACi	HDAC-Inhibitoren; siehe HDAC
HMT	Histon-Methyltransferase
HPRT1	Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase-1
i.p.	intraperitoneal
IP	Immunopräzipitation
kbp	kilo bp; siehe bp
KO	Abschalten eines Gens durch Gen-Knockout; engl. knock out
LTP	Langzeit-Potenzierung; engl. long-term potentiation
MATRICS	Measurement And Treatment Research to Improve Cognition in Schizophrenia
MDB	Methylgruppen-Bindesequenz; engl. methyl binding domain protein
MeCP2	Methyl-CpG-binding-protein 2; siehe CpG
MeDIP	methylierte DNA-Immunopräzipitation
mRNA	messenger RNA; siehe RNA
MRT	Magnetresonanztomographie
MWM	Morris-Wasserlabyrinth, engl. Morris Water Maze
NMDA	<i>N</i> -Methyl-D-Aspartat
NOR	Objekterkennungstest; engl. novel object recognition test
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung; engl. phosphate buffered saline
PBST	PBS mit Tween 20; siehe PBS
PCR	Polymerase-Kettenreaktion; engl. polymerase chain reaction
PFC	präfrontaler Kortex
PPI	Präpuls-Inhibition des Schreckreflexes, engl. prepulse inhibition of startle
RNA	Ribonukleinsäure; engl. ribonucleic acid
rpm	Umdrehungen pro Minute; engl. rounds per minute
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	real-time PCR; siehe PCR
SAHA	suberoylanilide hydroxamic acid; Vorinostat (<i>N</i> -Hydroxy- <i>N'</i> -phenyloctandiamid)
SAM	<i>S</i> -Adenosylmethionin
SDS	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid; engl. sodium dodecyl sulfate polyacrylamid
SDS-PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese; engl. sodium dodecyl sulfate polyacrylamid gel electrophoresis
SPECT	Einzelphotonen-Emissionscomputertomographie, engl. single photon emission computed tomography
TAE	Tris-Acetat-EDTA; siehe EDTA
TE	TRIS-EDTA; siehe TRIS und EDTA
TEMED	<i>N,N,N',N'</i> -Tetramethylethyldiamin
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TSA	Trichostatin A
TSS	Beginn der Transkription; engl. transcription start site

Abkürzungsverzeichnis

TX	Triton X-100
UPL	Universal ProbeLibrary
UV	Ultraviolettstrahlung
VPA	Valproinsäure; engl. valproic acid (Dipropyllessigsäure)
ZNS	Zentrales Nervensystem

1 Einleitung

1.1 Einleitung

Schizophrenie ist eine chronische Erkrankung mit erheblichen Auswirkungen auf die Teilnahme am Alltag und am Erwerbsleben. Sie tritt vorwiegend im späten Jugend- oder im frühen Erwachsenenalter auf, wobei die Lebenszeitprävalenz für die Gesamtbevölkerung bei ca. 1 % liegt (Lewis und Lieberman 2000). Schizophrenie stellt für die Betroffenen und ihre Familien, aber auch volkswirtschaftlich eine erhebliche Bürde dar und ist bisher nur unvollständig und mit hohen Nebenwirkungen zu therapieren. Die Ätiologie ist bislang unvollständig geklärt.

Aus Studien über die Konkordanzraten bei Zwillingen lässt sich errechnen, dass Schizophrenie zu etwa 80 % erblich bedingt ist (Sullivan et al. 2003). Die Suche nach der neurobiologischen Grundlage der Erkrankung konzentrierte sich daher lange auf mögliche Genmutationen in Schlüsselgenen der betroffenen Neurotransmittersysteme. Zusätzlich wurden eine Reihe sozioökonomischer Faktoren ausgemacht, die das Risiko, an Schizophrenie zu erkranken, erhöhen. Die Theorie der Epigenetik im Sinne postmitotischer Veränderungen der Genexpression neuronaler Zellverbände bietet eine Plattform, die die unterschiedlichen Aspekte der bisherigen Erkenntnisse zur Ätiologie wie Vererbung, Umwelteinflüsse und Substanzmissbrauch integrieren kann.

Die kognitiven Einschränkungen in den Bereichen Aufmerksamkeit, Gedächtnis und Exekutivfunktion gelten als Kerndefizit der Schizophrenie (Elvevåg und Goldberg 2000), welche zunehmend als Grundlage der sozialen Behinderung anerkannt werden. Es konnte gezeigt werden, dass Störungen der Arbeitsgedächtnisfunktion Grundlage der kognitiven Defizite Schizophrener sind (Goldman-Rakic 1990; Silver et al. 2003). Es ist bekannt, dass epigenetische Mechanismen im Zuge der Etablierung von Langzeitgedächtnisinhalten aktiviert werden. In dieser Arbeit soll untersucht werden, ob diese Mechanismen auch im System des Arbeitsgedächtnisses eine Rolle spielen. Dafür wurde zunächst postmortales Frontalhirngewebe Schizophrener sowie bipolar Erkrankter mit nicht-psychisch erkrankten Kontrollen im Hinblick auf epigenetische Unterschiede verglichen. Im zweiten Schritt wurden etablierte Modulatoren der

epigenetischen Expressionskontrolle im Tiermodell auf ihren Einfluss auf das Arbeitsgedächtnis hin untersucht.

1.2 Schizophrenie

Die Schizophrenie gehört in die Hauptgruppe der psychotischen Störungen und umfasst eine Reihe in ihrer Ausprägung heterogener Unterformen, die durch Störungen des Denkens, des Antriebs, der Wahrnehmung, des Affekts, des Ich-Erlebens sowie durch Wahn und Halluzinationen gekennzeichnet sind. Chronische Verläufe gehen zumeist mit kognitiven und sozialen Einschränkungen einher.

1.2.1 Epidemiologie, Verlauf, Prognose

Die Lebenszeitprävalenz für Schizophrenie beträgt in Deutschland und weltweit etwa 1 %. Das mittlere Erkrankungsalter liegt zwischen 15 und 35 Jahren, wobei Männer 3 bis 4 Jahre vor Frauen erkranken, insgesamt ist die Geschlechterverteilung jedoch ausgeglichen.

Dem Vollbild der Erkrankung geht in der Regel ein initiales Prodromalstadium voraus, in dem vor allem negative Symptome wie kognitive Störungen und Störungen des sozialen Verhaltens und des Affekts auftreten. Eine lange Prodromalphase und negative Symptome gehen mit einer schlechteren Prognose einher.

Die Krankheit verläuft zumeist schubweise mit teilweise vollständiger Remission oder Ausbildung einer Restsymptomatik. Bei einem kleinen Teil der Erkrankten bildet sich eine chronisch produktive Schizophrenie aus, größtenteils manifestiert sich aber ein Residuum mit vorwiegend negativer Symptomatik (DGPPN 2006).

1.2.2 Diagnosestellung

Die in Deutschland gebräuchlichen Einteilungen der Erkrankung beruhen auf dem ICD-10 (Internationale statistische Klassifikation der Krankheiten und verwandter Gesundheitsprobleme, 10. Ausgabe (<http://www.dimdi.de/static/de/klassi/icd-10-gm/index.htm>)). Nach der Symptomatik werden verschiedene schizophrene Subtypen unterschieden. Die Diagnosestellung erfolgt nach Ausschluss anderer organisch bedingter Erkrankungen anhand der Leitsymptome. Diese sind:

1.2 Schizophrenie

1. Gedankenlautwerden, -einkerbung, -entzug, -ausbreitung
2. Kontroll- oder Beeinflussungswahn; Gefühl des Gemachten bzgl. Körperbewegungen, Gedanken, Tätigkeiten oder Empfindungen; Wahnwahrnehmungen
3. Kommentierende oder dialogische Stimmen
4. Anhaltender, kulturell unangemessener oder völlig unrealistischer Wahn (bizarrer Wahn)
5. Anhaltende Halluzinationen jeder Sinnesmodalität
6. Gedankenabreißen oder -einschiebungen in den Gedankenfluss
7. Katatone Symptome wie Erregung, Haltungstereotypien, Negativismus oder Stupor
8. Negative Symptome wie Apathie, Sprachverarmung, verflachter oder inadäquater Affekt

Erforderlich für die Diagnose Schizophrenie ist mindestens ein eindeutiges Symptom der Gruppen 1–4 oder mindestens zwei Symptome der Gruppen 5–8. Diese Symptome müssen fast ständig während eines Monats oder länger deutlich vorhanden gewesen sein (DGPPN 2006).

1.2.3 Symptome

Die Diagnose Schizophrenie wird klinisch gestellt. Die Einteilung der Symptome hat eine historische Entwicklung durchgemacht. Emil Kraepelin (1856–1926) fasste die zuvor eigenständigen Erkrankungen Hebephrenie, Katatonie und Paranoia unter dem Begriff „Dementia praecox“ zusammen. Sie beruhte auf der Beobachtung, dass sich die Erkrankung bereits in jungen Jahren manifestierte. Eugen Bleuler (1857–1939) prägte 1908 den Begriff Schizophrenie, um damit eine Gruppe von Erkrankungen zu beschreiben, deren gemeinsames Symptom, in Abgrenzung zu Kraepelin, nicht der vorzeitige Verlust geistiger Fähigkeiten war. Für Bleuler stand der Ausfall psychischer Funktionen im Vordergrund, der zum Verlust der Einheit der Persönlichkeit führt. Er nannte als gemeinsames Merkmal die vier Grundsymptome Auflockerung der Assoziation, Störung des Affekts, Ambivalenz und Autismus (Fusar-Poli und Politi 2008) und führte Grundsymptome und akzessorische Symptome ein. 1939 wurde von Kurt Schneider eine Einteilung in Symptome ersten Ranges und Symptome zweiten Ranges vorgenommen. Eine klinisch oft angewendete Klassifikation unterscheidet positive von negativen Symptomen.

Positive Symptome

Positive Symptome bezeichnen Verhaltensweisen, die bei gesunden Menschen nicht vorkommen. Sie umfassen Halluzinationen, inhaltlichen Denkstörungen, vor allem Wahnideen, oder formale Denkstörungen, die sich durch Gedankenabreißen und Zerfahrenheit der Gedanken oder der Sprache äußern. Es kommt zu inhaltlich unzusammenhängenden Äußerungen (Paralogik), zum Zerfall der Grammatik und zur Verwendung von Wortneuschöpfungen. Außerdem zählt man die Ich-Störungen hinzu. Sie umfassen Störungen, die den Patienten innere Zustände als von außen gemacht erleben lassen. Dazu gehören Gedankeneingebung, Gedankenentzug, Gedankenausbreitung und Willensbeeinflussung, ferner desorganisiertes, bizarres Verhalten.

In der akuten schizophrenen Episode überwiegen die positiven Symptome. Sie sprechen meist auf die Gabe typischer und atypischer Neuroleptika an, wobei eine kleinere Gruppe von sogenannten Non-Respondern auf diese medikamentöse Therapie nur unzureichend zu reagieren scheint (Emsley et al. 2006).

Negative Symptome

Negative Symptome sind durch die Abwesenheit normaler Hirnfunktion gekennzeichnet. Dazu gehören Armut der Sprache bis hin zum vollständigen Sprachverlust (Mutismus), Antriebsarmut, Willensschwäche und Apathie. Es kommt zur Verflachung des Affekts und zu Anhedonie, häufig finden sich auch Symptome einer Depression.

Kognitive Defizite werden klassischerweise der Negativsymptomatik zugeordnet. Einige Autoren betrachten die kognitiven Symptome dagegen als eigene Entität (Harvey et al. 2006). Dafür gibt es mehrere Gründe: Störungen der Kognition sind ein konstanter Bestandteil der schizophrenen Symptomatik, der unabhängig von psychotischen Symptomen besteht und sich im Krankheitsverlauf wenig verändert. Sie können vor Diagnosestellung und bei klinisch nicht betroffenen Verwandten nachgewiesen werden, und sie korrelieren im Gegensatz zu den klinischen Symptomen sehr gut mit den Langzeitergebnissen und dem Ausmaß der sozialen Störung (Gold 2004).

Endophänotypen

Der Begriff Endophänotyp beschreibt Merkmale, die sich im Gegensatz zum Phänotyp nicht ohne weiteres offenbaren und über zum Beispiel biochemische, histopathologische oder neu-

ropsychologische Untersuchungen festgestellt werden müssen. Diese Merkmale sollen dann im Gegensatz zu der polyätiologischen Ursache des schizophrenen Phänotyps möglichst auf die Funktion eines oder weniger Gene zurückgeführt werden und so Rückschlüsse auf zugrunde liegende Gendefekte liefern. Der Endophänotyp ist damit zwischen dem Phänotyp und dem Genotyp positioniert (Gruber et al. 2005).

Die bei Schizophrenen nachweisbaren kognitiven Defizite und neuropsychologischen Einschränkungen erfüllen die von Gottesman und Gould (2003) vorgeschlagene Definition eines als Endophänotyps geeigneten Merkmals:

1. Assoziation des Merkmals mit der Erkrankung
2. Erbllichkeit des Merkmals
3. Weitgehend unabhängig vom Krankheitsstadium (z. B. auch in der Prodromalphase oder bei Remission der Symptome nachweisbar)
4. Endophänotyp und Erkrankung kosegregieren (werden in Familien gemeinsam vererbt)
5. Der bei Erkrankten gefundene Phänotyp tritt bei nicht erkrankende Familienangehörigen häufiger auf als in der Allgemeinbevölkerung

Zu den weiteren Kandidaten-Endophänotypen der Schizophrenie gehören Okulomotorikstörungen und Defizite der sensorischen Informationsfilterung wie der Präpuls-Inhibition des Schreckreflexes (PPI). Als histopathologischer Endophänotyp eignen sich im Weiteren beschriebene Veränderungen an Gliazellen.

Arbeitsgedächtnisschwäche in der Schizophrenie

Durch die US-amerikanische Arbeitsgemeinschaft *Measurement And Treatment Research to Improve Cognition in Schizophrenia (MATRICS)* wurden die Bereiche verbales Lernen und Gedächtnis, Verarbeitungsgeschwindigkeit, Arbeitsgedächtnis, logisches Denken und Problemlösung, Aufmerksamkeit, Vigilanz und soziale Intelligenz als Kerndefizite der schizophrenen Symptomatologie ausgemacht. Dabei werden Störungen des Arbeitsgedächtnisses zunehmend als Schlüssel zum Verständnis der anderen Defizite gesehen (Silver et al. 2003). Die Defizite sind sowohl in Patienten mit antipsychotischer Medikation als auch in Neuroleptika-naiven Patienten nachweisbar, außerdem sowohl während der akuten Psychose als auch in der chronischen Phase (Barch et al. 2001) und vor Ausbruch der Erkrankung (Davidson 2001). Die

Defizite waren ebenfalls in Verwandten ersten Grades nachweisbar (Delawalla et al. 2008). Das Ausmaß der Defizite zeigte sich über den Krankheitsverlauf hinweg stabil und korrelierte mit dem Grad der sozialen Behinderung (Cervellione et al. 2007).

In neuropsychologischen Untersuchungen wurden Defizite in den Bereichen des visuellen und verbalen Arbeitsgedächtnisses festgestellt, dabei vor allem, wenn durch artikulatorische Distraction das innerliche Aufsagen (*rehearsal*) unterbunden wurde (Fleming et al. 1995, 1997). Als neuropathologisches Korrelat konnte bei Patienten mit Schizophrenie in fMRT-Studien eine Störung der Aktivierung des dorsolateralen präfrontalen Kortex (DLPFC) während Arbeitsgedächtnistests festgestellt werden (Perlstein et al. 2001; Tan et al. 2005), wobei es sich nicht um eine generelle Über- oder Unterfunktion des PFC handelte, sondern um eine Dysfunktion abhängig von der Komplexität der Aufgabe (Manoach 2003).

1.2.4 Neuropathologie

Makroskopisch finden sich Hinweise auf Unterschiede in diversen Hirnregionen. Die Ventrikel schizophrener Patienten sind im Vergleich zu altersangepassten Kontrollen vergrößert, begleitet von globaler Hirnvolumenminderung. Im Speziellen betroffen sind der Hippocampus, der präfrontale und temporale Assoziationskortex und der Thalamus (Harrison und Weinberger 2005). Diese Veränderungen wurden ebenfalls bei Erstmanifestation in nicht neuroleptisch vorbehandelten Patienten nachgewiesen (Szeszko et al. 2003). Schließlich fehlen typische histopathologische Anzeichen neurodegenerativer Erkrankungen wie der Verlust von Nervenzellen mit reaktiver Gliose (Harrison und Weinberger 2005).

Aktuelle Forschungsergebnisse stützen die Hypothese bei der Schizophrenie handele es sich um eine Erkrankung der Synapse. Histologisch finden sich in Pyramidenzellen des Hippocampus und des Neokortex kleinere Somata bei geringerer Zahl synaptischer Verknüpfungen, gemessen in Golgi-Färbungen, und insgesamt nicht veränderter Zahl der Neurone. Passend hierzu konnte in Schizophrenen weniger Synaptophysin, ein Marker für Axonterminale, nachgewiesen werden (Fallon et al. 2003; Volk und Lewis 2010). Funktionelle MRT-Untersuchungen konnten ebenfalls eine verringerte Konnektivität nachweisen (Marenco et al. 2012).

Die unter der Prämisse einer genetischen Ursache relativ späte Manifestation der Erkrankung in der frühen Adoleszenz soll auf dem natürlichen Verlust in der Pränatalperiode in Überzahl angelegter synaptischer Verbindungen, dem sogenannten *pruning*, beruhen. Die Reifung voll-

zieht sich nicht in allen Hirnregionen parallel. Sie findet im dorsolateralen präfrontalen Kortex (DLPFC) und orbitofrontalen Kortex erst gegen Ende der Pubertät statt (Gogtay et al. 2004).

1.2.5 Ätiologie

Seit den 1980er Jahren mehren sich die Erkenntnisse, dass es sich bei der Schizophrenie um eine Hirnentwicklungsstörung handelt (Lewis und Levitt 2002). Die Annahme basiert auf der Beobachtung, dass viele der nicht-genetischen, umweltbedingten Faktoren in der Pränatal-Periode auftreten. Zudem konnte in prospektiven Untersuchungen an Kindern, die später an Schizophrenie erkrankten, eine Verzögerung der Meilensteine motorischer und sozialer Entwicklung festgestellt werden (Isohanni et al. 2000). Weiter konnten in einem Teil der betroffenen Individuen geringfügige körperliche Abweichungen (*minor physical anomalies*) nachgewiesen werden (Lewis und Levitt 2002), die auf eine Entwicklungsstörung in der Embryogenese hindeuten.

Die aktuell akzeptierte Theorie zur Ätiopathogenese wird durch das multifaktorielle „Vulnerabilitäts-Stress-Modell“ beschrieben: Ein durch genetische und nicht-genetische Einflüsse vorbelastetes Individuum besitzt ein permanentes Erkrankungsrisiko, das auch vor Ausbruch des Vollbildes und im Intervall nachgewiesen werden könnte. Endogene und exogene Faktoren führen dann dazu, dass die Erkrankung klinisch auftritt. Dieses Modell steht im Einklang mit der Theorie, dass biologische oder psychosoziale Stressoren ihre Wirkung über epigenetische Mechanismen vermitteln.

Risikogene

Die Prävalenz der Schizophrenie zeigt eine eindeutige erbliche Komponente mit steigendem Erkrankungsrisiko proportional zum Anteil gemeinsamer genetischer Information mit einem Betroffenen (McGue und Gottesman 1989). Die Heritabilität, ermittelt aus Konkordanzraten homozygoter und heterozygoter Zwillinge beträgt etwa 81 % (73 % - 90 %), der Anteil von Umwelteinflüssen wird auf 11 % (3 % - 19 %) geschätzt (Sullivan et al. 2003).

Mit Kopplungsstudien und Assoziationsstudien wurden mehrere Suszeptibilitätsgene für Schizophrenie entdeckt. Die meisten dieser Gene oder Chromosomenabschnitte betreffen das glutamaterge System. Dazu gehören Veränderungen im *glur3*-Gen, einer Untereinheit des AMPA (α -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid)-Rezeptors, im Gen *grin1*, das eine Untereinheit des NMDA (*N*-Methyl-D-Aspartat)-Rezeptors kodiert, außerdem in den Genen

g72 und *daao* (D-Amino-Acid-Oxidase), die am D-Serin-Metabolismus beteiligt sind, einem Agonisten am NMDA-Rezeptor. Eine Ausnahme bildet die funktionell wirksame Mutation des *comt* (Catechol-O-Methyltransferase)-Gens als einziger Defekt im dopaminergen System (Harrison und Weinberger 2005).

Es finden sich außerdem mehrere Gene, die mit der Hirnentwicklung in Zusammenhang gebracht werden: *nrg1* kodiert mehrere Isoformen von Neuregulin 1. Neuregulin 1 ist an neuronaler Migration, synaptischer Konnektivität, Signalübermittlung und Myelinisierung beteiligt (Harrison und Weinberger 2005). Dem *disrupted in schizophrenia 1 (disc1)*-Gen wird über diverse zytoskeletale Proteine eine Rolle an so unterschiedlichen Vorgängen wie Zellmigration, Neuritenwachstum, aber auch Membrantransport von Rezeptoren zugesprochen (Harrison und Weinberger 2005). Es führt gemeinsam mit dem Gen *dysbindin 1 (dystrobrevin binding protein 1 / DNTBN 1)* eine Schlüsselrolle in der Ausbildung neuer synaptischer Verknüpfungen aus (Numakawa et al. 2004).

Die Bedeutung dieser Gene für eine reguläre Hirnentwicklung konnte im Tiermodell experimentell bestätigt werden. Durch genetische Veränderung der Gene oder der Gen-Expressionsrate konnten Schizophrenie-typische makro- und mikrohistopathologische Veränderungen hervorgerufen werden, welche mit ebenfalls typischen Verhaltensänderungen einhergingen, die zum Teil Neuroleptika-sensitiv waren (Harrison und Weinberger 2005; Lu et al. 2011).

Umweltfaktoren

Risiken werden auch aus sozialen und demographischen Faktoren abgeleitet. Diese können nach dem Zeitpunkt ihrer Einflussnahme betrachtet werden. Zu den umweltbedingten Risikofaktoren der Pränatal- und Perinatalperiode, die mit einem statistisch erhöhten Risiko für Schizophrenie einhergehen, gehören Ernährung während der Schwangerschaft, Geburts- und Schwangerschaftskomplikationen, das Alter des Vaters, virale Infektionen der Mutter, außerdem der Geburtszeitpunkt mit einer Häufung von Geburtsdaten im späten Winter und im Frühjahr (Lewis und Levitt 2002; Malaspina 2001).

Es wurden außerdem Risikofaktoren ausgemacht, die erst zum Tragen kommen, wenn die Hirnentwicklung weitgehend abgeschlossen ist. Dazu zählt Cannabis-Konsum, außerdem ein niedriger sozioökonomischer Status, ein urbanes Lebensumfeld und Lebensumstände, die mit einem höheren Stress-Level assoziiert werden, zum Beispiel als Zuwanderer oder Teil einer gesellschaftlichen Minderheit (Brown 2011; Lederbogen et al. 2011).

1.2.6 Theorie des Neurotransmitter-Ungleichgewichts

Es existieren mehrere dopaminerge Systeme im ZNS. Das *nigrostriatale System* ist an der Parkinson-Erkrankung und der Entstehung extrapyramidal-motorischer Störungen beteiligt, das *tuberoinfundibuläre System* hemmt die Ausschüttung von Prolaktin. Für das Auftreten der Positivsymptomatik wird eine Überfunktion der dopaminergen Neurotransmission im *mesolimbischen System* vermutet, das seinen Ursprung in den Zellen der Area tegmentalis ventralis nimmt und von dort auf die verschiedenen Anteile des limbischen Systems projiziert. Die Negativsymptomatik soll hingegen durch eine Unterfunktion des *mesokortikalen Systems* bedingt sein, welches von der Area tegmentalis ventralis zum PFC zieht (Kandel et al. 2000)(Siehe hierzu Abb. 1.1).

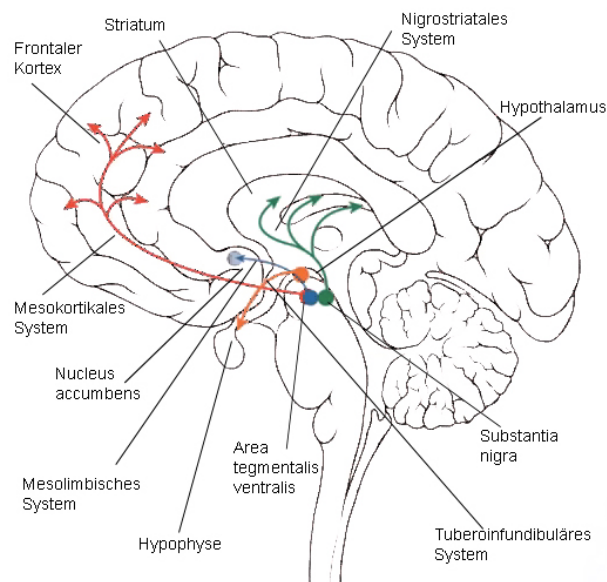


Abbildung 1.1: Dopaminerge Systeme im ZNS.

Aufgrund der pharmakologischen Beobachtung, dass typische Neuroleptika ihre Wirkung über einen Antagonismus am D₂-Dopamin Rezeptor vermitteln (Carlsson und Lindqvist 1963), während D₂-Agonisten (Amphetamine, L-Dopa) die Symptome verschlimmern oder hervorrufen (Lieberman et al. 1987) wurde die ursprüngliche Dopamin-Hypothese formuliert, erstmals durch van Rossum (1966). Sie besagt, dass eine dopaminerge Hyperaktivität in subkortikalen Zentren zu den positiven Symptomen der Schizophrenie führt. Da typische Neuroleptika die Negativsymptomatik kaum beeinflussen wurde diese Theorie erweitert. Funktionelle

Bildgebung legte nahe, dass eine Unterfunktion des präfrontalen Kortex (PFC) die Ursache der negativen Symptomatik sein könnte (Weinberger et al. 1986). Daraus wurde die Hypothese formuliert, dass eine Unterfunktion des dopaminergen Systems über fehlende negative Rückkopplung zu einer konsekutiven Überfunktion im mesolimbischen System führt (Weinberger 1987; Davis et al. 1991). Da Antagonisten am NMDA-Rezeptor (Phencyclidin und Ketamin) ebenfalls psychotische Symptome, darüber hinaus aber auch eine Negativsymptomatik verursachen können (Javitt und Zukin 1991; Krystal et al. 1994) wurde schon früh eine Rolle des glutamatergen Systems in der Schizophrenie angenommen (Kornhuber et al. 1984). Die Glutamat-Hypothese wird als Unterfunktion des glutamatergen Systems formuliert. Außerdem wurden die Transmittersysteme Acetylcholin (Hyde und Crook 2001), Serotonin (Aghajanian und Marek 2000), γ -Aminobuttersäure (GABA; eng. γ -aminobutyric acid) (Benes et al. 1992) und weitere Neurotransmitter mit Schizophrenie in Verbindung gebracht.

Nach einem Modell von Carlsson moduliert der PFC die Aktivität der mesencephalen dopaminergen Neurone über einen direkten aktivierenden und einen indirekten hemmenden Pfad. Den direkten Pfad bilden dabei glutamaterge Efferenzen aus dem PFC, der hemmende Pfad verläuft ebenfalls über glutamaterge Projektion, die in GABAergen Interneuronen umgeschaltet werden. Hierbei wird dem direkten Pfad nur eine kurzfristige, phasische Aktivität zugeschrieben, während der indirekte Pfad dauerhaft tonisch innerviert (Carlsson 2006). Eine Hypofrontalität, hervorgerufen beispielsweise durch eine defekte glutamaterge und/oder dopaminerge Neurotransmission auf Ebene der Synapsen oder eine mangelhafte dopaminerge Stimulation, führt zu einem reduzierten hemmenden Tonus auf die subkortikalen Zentren und zu verminderter Pufferung phasischer aktivierender Stimuli. Bereits 1988 postulierte Carlsson ein Modell mit zwei Rückkopplungsmechanismen, in dem das Striatum und der Thalamus eine zentrale Rolle in der Entstehung positiver Symptome spielen: Einerseits projizieren Faserbahnen inhibitorischer dopaminergener Neurone der Substantia nigra und des Tectums über D_2 -Rezeptoren ins ventrale Striatum. Andererseits ziehen aus dem Kortex exzitatorische glutamaterge Faserbahnen ebenfalls ins ventrale Striatum. Das Striatum wiederum wirkt über GABAerge Interneurone hemmend auf den Thalamus. Carlsson vermutete, dass der Thalamus als Filter des sensorischen Inputs wirkt. Eine Verstärkung des dopaminergen Tonus oder ein Glutamat-Mangel führen zu einer Inhibition des inhibitorischen striatalen Einflusses auf den Thalamus. Diese Disinhibition des Thalamus resultiert in einem verstärkten sensorischen Input des Kortex. Wird die Integrationsfähigkeit des Kortex überschritten kommt es zu Halluzinationen (Carlsson 1988) (Siehe hierzu Abb. 1.2).

1.2 Schizophrenie

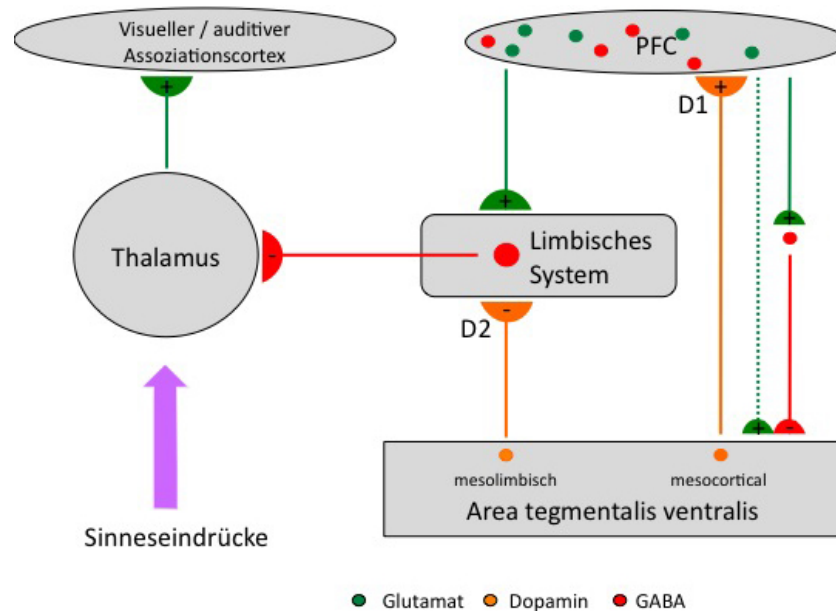


Abbildung 1.2: Modell der neuronalen Netzwerke, relevant für die schizophrene Symptomatik.

Aufgrund der Bedeutung für Arbeitsgedächtnisfunktion und der Schlüsselrolle im Zusammenspiel der Neurotransmittersysteme sind die Veränderungen der präfrontalen Verschaltungen in Schizophrenen von besonderem Interesse. Als Grundlage der Arbeitsgedächtnisfunktion wurde die synchrone Aktivität lokaler Pyramidenzell-Netzwerke (Goldman-Rakic 1990), die sogenannte γ -Band-Oszillation (30-80 Hz), festgestellt (Howard et al. 2003). Die Oszillation wird durch laterale Inhibition nicht beteiligter Neurone über GABAerge Interneurone erreicht (Rao et al. 1999). Als Grundlage der Arbeitsgedächtnisschwäche wird daher eine verminderte Synchronisation durch einen reduzierten GABAergen Tonus vermutet (Gonzalez-Burgos et al. 2011). Passend hierzu konnte im PFC Schizophrener wiederholt eine Reduktion der Glutamat-Decarboxylase GAD_{67} , einem Schlüsselenzym der GABA-Synthese, und des GABA-Transporters 1 (GAT1) nachgewiesen werden (Akbarian et al. 1995; Impagnatiello et al. 1998; Guidotti et al. 2000). Es konnte außerdem gezeigt werden, dass die Zahl synaptischer Verknüpfungen an Pyramidenzellen im DLPFC reduziert ist. Besonders ausgeprägt ist dieser Mangel im Bereich der basalen Dendriten an Pyramidenzellen der dritten Schicht, wo vor allem Axone aus dem Thalamus und aus anderen kortikalen Regionen enden. (Kolluri et al. 2005; Lewis und Sweet 2009).

Die Ätiologie der verminderten GABAergen Funktion ist noch unklar. Diskutiert wird, dass der frontale Glutamatmangel zu einer Mindererregung der Interneurone führt, in Kombination

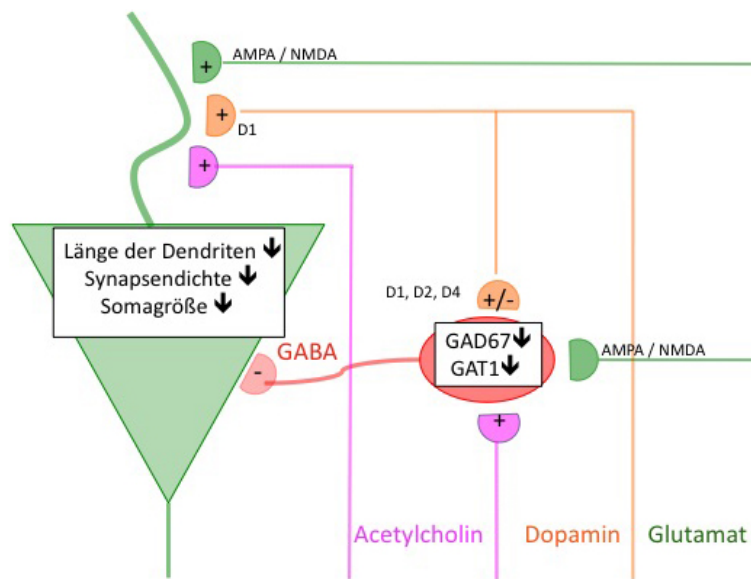


Abbildung 1.3: Modell der neuronalen Verschaltungen im präfrontalen Kortex.

mit einer verringerten dopaminergen Erregung aus dem Mesencephalon über exzitatorische D1-Rezeptoren (Gao et al. 2003; Lewis und Sweet 2009). Alternativ wird ein primärer Defekt von NMDA- und AMPA-Rezeptoren an einer Subpopulation GABAerger Interneurone diskutiert (Farber 2003; Lewis und Sweet 2009; Timofeeva und Levin 2011). Interessanterweise erhalten diese Interneurone glutamaterge Affärenzen neben NMDA-Rezeptoren vor allem über AMPA-Rezeptoren mit einem hohen GluR1-Anteil (Martin et al. 1993; Vickers et al. 1993; Fitzgerald et al. 1995; González-Albo et al. 2001). Ebenfalls hält man es für möglich, dass eine, möglicherweise genetisch und/oder epigenetisch fixierte Hypoexpression von GAD₆₇, Ursache der Funktionsstörung ist (Guidotti et al. 2010).

Auch für den Neurotransmitter Acetylcholin ist ein Einfluss speziell auf Arbeitsgedächtnisprozesse nachgewiesen (Kirrane et al. 2001; Graef et al. 2011; Croxson et al. 2011) (Siehe hierzu Abb. 1.3).

1.2.7 Parallelen zur bipolaren Erkrankung

Bei der bipolaren Störung handelt es sich primär um eine Störung des Affekts. Anhand der unterschiedlichen klinischen Symptomatik und des Langzeitverlaufs wurde die bipolare Erkrankung, von Emil Kraepelin damals als ‚manisch-depressives Irresein‘ bezeichnet, klar von der Schizophrenie unterschieden. Aktuelle Erkenntnisse stellen diese Dichotomie in Frage (Craddock und Owen 2005).

1.3 Gedächtnis

Zur Unterstützung ihrer These führen die Autoren zunächst epidemiologische Faktoren an. So weisen die beiden Erkrankungen deutliche Parallelen im Bezug auf das Alter bei Erstmanifestation, die Lebenszeitprävalenz, das Erkrankungsrisiko bei Verwandten ersten Grades und die Konkordanzraten in Zwillingspärchen auf (Berrettini 2003). Hinweise auf eine gemeinsame Ätiologie ergeben sich aus Assoziationsstudien und genetischen Untersuchungen (Craddock et al. 2006), wobei die Assoziation am stärksten für Erkrankte mit psychotischen Symptomen war (Green et al. 2005).

Klinisch weisen die Erkrankungen starke Unterschiede auf, neuropsychologisch zeigen sich hingegen vergleichbare Defizite. Patienten mit bipolaren Störungen zeigten ebenfalls schlechtere Leistungen in den Bereichen Aufmerksamkeit, visuelles und auditives Gedächtnis und Exekutivfunktionen (Schretlen et al. 2007). Hierbei zeigte sich, dass die kognitiven Defizite bipolar affektiv Erkrankter qualitativ mit den Ausfällen Schizophrener vergleichbar sind, in ihrer Ausprägung allerdings in der Regel milder. Ähnliche Beobachtungen wurden für Arbeitsgedächtnisfunktionen gemacht: Im Vergleich mit gesunden Kontrollprobanden zeigten bipolar Erkrankte schlechtere Arbeitsgedächtnisleistungen (Ferrier et al. 1999). Eine aktuelle Studie deutet dabei sogar eher in Ihrer Schwere vergleichbare Defizite an (Amann et al. 2012). Auf Ebene des DLPFC konnte ebenfalls in postmortalen Gewebeproben bipolar Erkrankter eine Reduktion der GAD₆₇-positiven GABAergen Interneurone beobachtet werden, wie sie auch in Proben Schizophrener gefunden wird (Guidotti et al. 2000).

1.3 Gedächtnis

Der Begriff Gedächtnis lässt sich nach Zeit und Inhalt weiter unterteilen. Nach dem Inhalt wird das explizite oder deklarative Gedächtnis für Fakten (semantischen Gedächtnis) und für Ereignisse (episodisches Gedächtnis) vom impliziten oder non-deklarativen Gedächtnis unterschieden. Letzteres umfasst unter anderem das prozedurale Gedächtnis für Fähigkeiten und das Gedächtnis für assoziatives Lernen (Kandel et al. 2000).

Nach dem Zeitraum kann man das sensorische Gedächtnis, das Inhalte unbewusst für Millisekunden bis Sekunden behält, das Kurzzeitgedächtnis, das die Speicherung über einen begrenzten Zeitraum erlaubt und das Langzeitgedächtnis, welches in seiner zeitlichen und inhaltlichen Ausdehnung theoretisch nicht begrenzt ist, unterscheiden. Inhalte aus dem Kurzzeitgedächtnis lassen sich im Prozess der Konsolidierung ins Langzeitgedächtnis überführen oder sie werden vergessen (Kandel et al. 2000).

1.3.1 Langzeitgedächtnis

Die Konsolidierung wird abhängig vom Inhalt über verschiedene Strukturen des ZNS vermittelt, Ort der Speicherung ist der Assoziationskortex. Das neuronale Korrelat der Langzeiterinnerung ist nach einer bereits 1949 von Hebb aufgestellten Theorie die aktivitätsabhängige Veränderung der synaptischen Plastizität mit Ausbildung neuer synaptischer Verbindungen (Martin et al. 2000). Dieser Prozess beinhaltet die Regulation einer Vielzahl von Genen und beruht auf *de-novo*-Proteinsynthese (Patterson et al. 2001).

1.3.2 Kurzzeitgedächtnis

Das Kurzzeitgedächtnis ist in seiner Kapazität begrenzt, es lässt eine Speicherung von etwa sieben Gedächtnisinhalten zu, die ohne sofortige Wiederholung vergessen werden (Lisman und Idiart 1995). Als neuronale Grundlage des Kurzzeitgedächtnisses wurden anhaltende Impulsserien einzelner Neurone ausgemacht (Fuster und Alexander 1971). Neuere Modelle gehen davon aus, dass an Stelle einzelner Neurone rhythmische Entladungen von Nervenzellverbänden die Grundlage von kurzzeitigen Erinnerungen sind (Siegel et al. 2009). Das Kurzzeitgedächtnis beruht im Gegensatz zum Langzeitgedächtnis nicht auf Transkription und Translation.

1.3.3 Arbeitsgedächtnis

Das Arbeitsgedächtnis nimmt eine Sonderrolle ein. Es erlaubt parallel zur kurzfristigen Speicherung die Manipulation des Inhalts. Eine viel beachtete Theorie von Baddeley (2003) unterscheidet drei Subsysteme, die die Arbeitsgedächtnisaufgaben übernehmen. Er unterscheidet zwei Speichersysteme: Eine auditorische Komponente, die phonologische Schleife, und eine visuelle Komponente, den visuell-räumlichen Skizzenblock, sowie die zentrale Exekutive. Diese werden durch einem Speicher ergänzt, der es erlaubt, unterschiedliche Inhalte einem Ereignis zuzuordnen, den episodischen Puffer.

Durch die Arbeit von P. Goldman-Rakic (1990) an Primaten wurden der PFC und kortikale Assoziationsgebiete als Sitz des Arbeitsgedächtnis identifiziert. Das sprachliche Arbeitsgedächtnis wird im Bereich des prämotorischen Assoziationskortexes und im Broca-Areal verortet (Paulesu et al. 1993), die räumliche Komponente im posterioren präfrontalen Kortex (Jonides et al. 1993). Als Sitz der zentralen Exekutive wurde der DLPFC postuliert

(D'Esposito et al. 1995). Eine alternative Sichtweise geht hingegen statt von einer hierarchischen Organisation des PFC von einer domänen-spezifischen Organisationsstruktur aus, die ohne ein neuroanatomisches Korrelat der zentralen Exekutive auskommt (Goldman-Rakic 1999).

Die Differenzierung zwischen Arbeits- und Kurzzeitgedächtnis wird durch den uneinheitlichen Gebrauch der Begriffe erschwert. Dass die Begriffe nicht synonym verwendet werden können wurde durch Experimente von Baddeley (2003) bewiesen: Sie zeigten, dass eine konstante Beanspruchung des Kurzzeitgedächtnisses durch Wiederholung einer Zahlenfolge die Ausführung von Aufgaben, die Verständnis und logische Schlussfolgerung voraussetzten, also Operationen des Arbeitsgedächtnisses, nicht verhindern können. Es wurde jedoch mit ansteigender Länge der zu behaltenden Zahlenfolge eine zunehmende Beeinträchtigung festgestellt, die Gedächtnisformen sind also nicht voneinander unabhängig, existieren aber nebeneinander.

1.4 Epigenetik

Der Begriff Epigenetik wurde ursprünglich im Zusammenhang mit der Vererbungslehre genutzt. Als epigenetische Modifikationen wurden Veränderungen der DNA selbst oder des Chromatins bezeichnet, die nicht mit einer Veränderung des genetischen Codes einhergehen, aber trotzdem Einfluss auf Genexpressions-Muster haben. Die Tatsache, dass durch Umwelteinflüsse erworbene epigenetische Markierungen vererbt werden können, wirft ein neues Licht auf die Mechanismen der Evolution. Eine besondere Bedeutung wird der Epigenetik außerdem in der Onkologie zugesprochen.

Eine etwas andere Definition bezeichnet als Epigenetik die Gesamtheit der Markierungen der DNA und nukleärer Proteine, die zu einem dynamischen Genexpressions-Muster führt. Hierzu zählt unter anderem die zelluläre Differenzierung in spezielle Zelltypen durch Geninaktivierung über DNA-Methylierung im Rahmen des *Imprinting* (Levenson und Sweatt 2005). Die Entdeckung, dass epigenetische Markierungen reversibel und dynamisch sind, führte zur aktuellen Erforschung epigenetischer Einflüsse in postmitotischen Zellen wie Neuronen (Siehe hierzu Abb. 1.4).

Das Nukleosom stellt die Grundeinheit des Chromatins dar. Es besteht aus einem Oktamer mit einem zentralen Heterotetramer aus jeweils zwei Histonen 3 und 4, flankiert von zwei Heterodimeren der Histone 2A und 2B. Ein jeweils 147 Basenpaare (bp) langer DNA-Abschnitt ist annähernd zweimal um dieses Oktamer gewunden. Die Nukleosome sind durch 10-60 bp

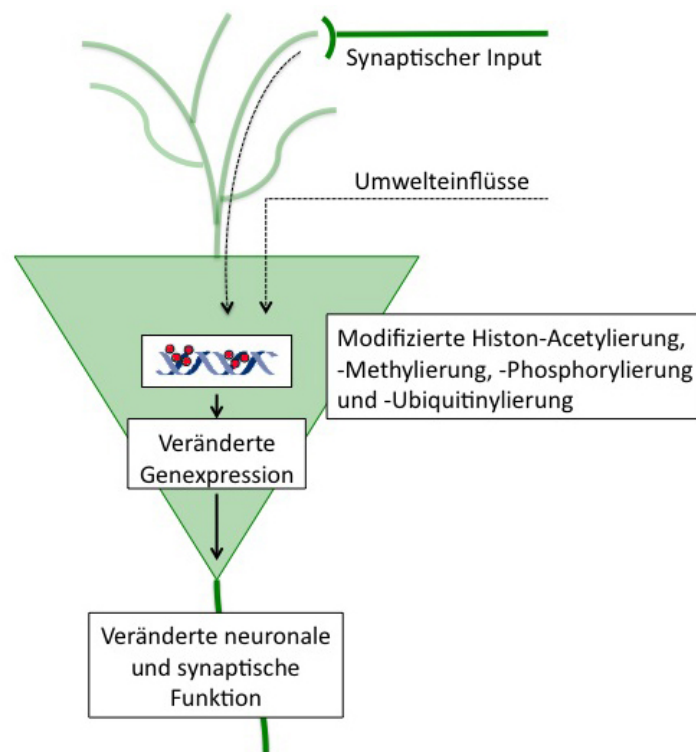


Abbildung 1.4: Die Regulation der epigenetischen Veränderungen in einem Neuron geschieht in Reaktion auf synaptische Erregung und andere äußere Einflüsse. Sie führt zu Veränderungen im Transkriptionsprofil der Zelle und damit zu einer Veränderung der neuronalen Funktion (Modifiziert nach Levenson und Sweatt (2005, S. 112) mit freundlicher Genehmigung durch Macmillan Publishers Ltd.).

sogenannter *linking-DNA* mit dem *H1-linker-Histon* voneinander getrennt. Die Aminosäuresequenz der Histone enthält jeweils einen Abschnitt hauptsächlich basischer Aminosäuren, der nicht an der Formation des Oktamers beteiligt ist. Dieser sogenannte *histone-tail* ragt über das Nukleosom hinaus und dient als regulatorisches Element. Diese perlschnurartige Organisation wird durch Histon-Histon-Interaktion in Abhängigkeit von der jeweiligen Phase des Zellzyklus weiter gefaltet (Siehe hierzu Abb. 1.4).

Die posttranslational möglichen Histon-Modifikationen umfassen die viel beachtete Acetylierung und Methylierung von Lysin, außerdem Ubiquitinylierung und Sumoylierung an Lysinen, Phosphorylierung an Serin und Threonin und Methylierung an Arginin. Außerhalb der Replikationsphase liegt die genomische DNA weitgehend kondensiert als Heterochromatin im Zellkern vor. In der Modellvorstellung bindet negativ geladene DNA an positiv geladene Histonproteine. Durch Modifikation dieser Seitenketten kann die Interaktion der Histone unterei-

einander sowie mit der DNA reguliert werden, sodass das Chromatin als gut zugängliches Euchromatin oder als stark kondensiertes Heterochromatin vorliegen kann. Über die langfristige Regulation des Kondensationsgrads wird die Zugänglichkeit für Transkriptionselemente und damit die lokale Genexpressionsrate geregelt (Levenson und Sweatt 2005).

1.4.1 Histon-Acetylierung

Histon-Acetylierung ist ein dynamischer Prozess. Histon-Acetyl-Transferasen (HAT) katalysieren die Übertragung von Acetylgruppen von Acetyl-Coenzym A auf die Amino-Gruppe von Lysin-Aminosäuren. Dieser Prozess ist durch Histon-Deacetylasen (HDAC) reversibel (Grayson et al. 2010) (Siehe hierzu Abb. 1.5).

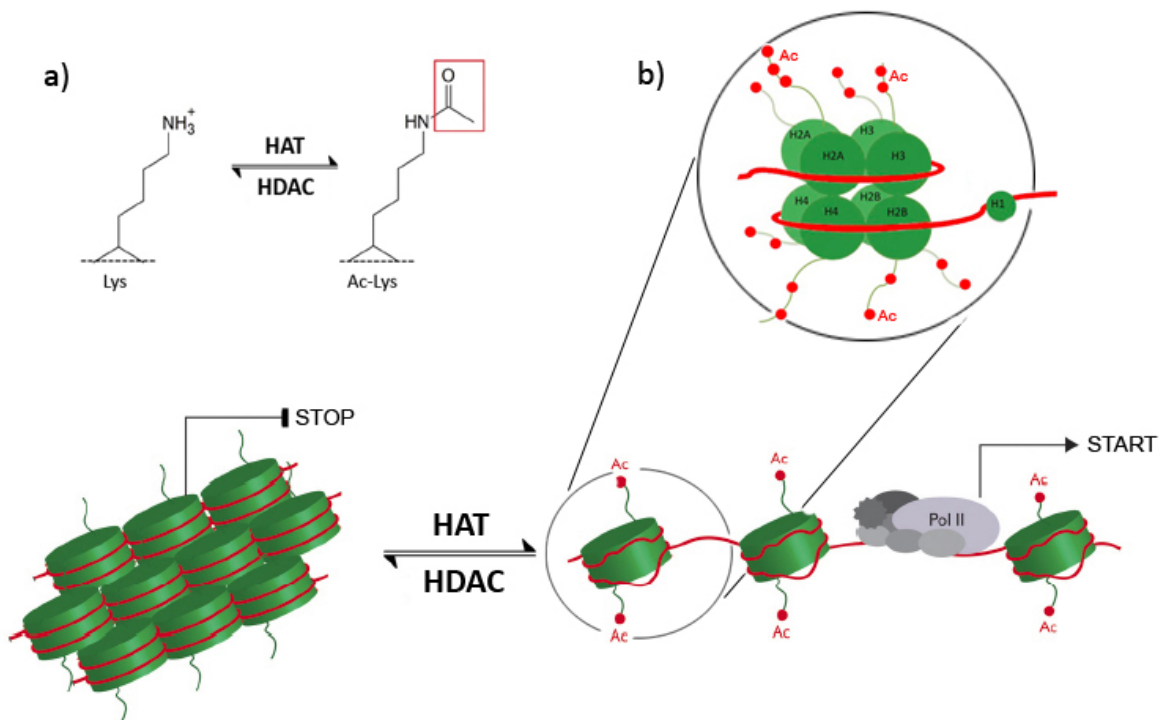


Abbildung 1.5: (a) Übertragung von Acetyl-Gruppen an die Amino-Gruppe von Lysin wird von Histon-Acetylasen (HAT) katalysiert. Dieser Vorgang ist reversibel und wird von Histon-Deacetylasen (HDAC) katalysiert. Durch Übertragung von Acetylgruppen öffnet sich das Chromatin und wird für Genexpression zugänglich. Pol II stellt den DNA-abhängigen RNA-Polymerase II-Komplex dar. (b) Histon-Oktamer mit 147 bp DNA und *linker-Histon* (Modifiziert nach Grayson et al. (2010, S. 128) mit freundlicher Genehmigung durch The American Society for Pharmacology and Experimental Therapeutics (ASPET)).

Histon-Deacetylasen

HDAC werden nach ihrer Struktur in zwei Familien und vier Klassen eingeteilt: Zur Familie der klassischen HDAC gehören die Klassen I, IIa, IIb und IV. Das hochkonservierte katalytische Zentrum in dieser Klasse ist Zn^{2+} -abhängig.

Klasse I umfasst HDAC1, 2, 3 und 8. HDAC1-3 werden ubiquitär exprimiert, HDAC8 ist muskelspezifisch. Klasse I-HDAC kommen ausschließlich im Zellkern vor. Sie bestehen hauptsächlich aus einer Deacetylierungs-Domäne und sind Teil größerer Proteinkomplexe, die über Bindungsproteine an Promotor-Regionen binden. Daher ist eine genspezifische Regulation eher anzunehmen als eine genomweite Funktion. Sie sind nicht ZNS-spezifisch, sondern werden auch in peripherem Gewebe exprimiert. Zur Klasse II gehören die Untergruppen IIa, bestehend aus HDAC4, 5, 7 und 9, sowie IIb mit HDAC6 und HDAC10. Klasse IIa-HDAC kommen sowohl im Zellkern als auch im Zytoplasma vor und können zwischen den beiden Kompartimenten pendeln, Klasse-IIb HDAC sind im Zytoplasma lokalisiert. Klasse II-HDAC sind größer als Klasse I-HDAC; Man geht davon aus, dass sie daher mit einer größeren Anzahl von non-Histon Proteinen interagieren. HDAC11 unterscheidet sich strukturell von den anderen und bildet die Klasse IV (Kazantsev und Thompson 2008).

Die *silent information regular 2-related protein*-Familie, die sogenannten Sirtuine (Klasse III-HDAC), haben einen von den klassischen HDAC verschiedenen Reaktionsmechanismus, der NAD^{+} -abhängig ist. Das katalytische Zentrum arbeitet Zn^{2+} -unabhängig (Grayson et al. 2010).

Histon-Deacetylase-Inhibitoren

In den vergangenen Jahren wurden Substanzen entwickelt, die die Deacetylierung durch HDAC verhindern. Die sogenannten HDAC-Inhibitoren (HDACi) lassen sich nach ihrer chemischen Struktur ebenfalls verschiedenen Gruppen zuordnen. Alle bisher verfügbaren HDACi antagonisieren nur die klassischen HDAC.

Zur Gruppe der Hydroxymate gehören SAHA (Vorinostat) und TSA (Trichostatin A). Sie sind hochpotent und werden als Klasse I- und II-HDAC-Inhibitoren betrachtet. SAHA wird in der onkologischen Therapie erprobt (Grayson et al. 2010). Die in dieser Arbeit verwendeten Substanzen Natrium(Sodium)butyrat und Phenylbutyrat sowie das Medikament Valproinsäure (VPA) gehören in die Gruppe der kurzkettigen Fettsäuren. Diese HDACi inhibieren ebenfalls Klasse I- und II-HDAC, VPA möglicherweise nur Klasse I. Sie sind weniger potent als Hydroxymate, entfalten ihre Wirkung im millimolaren Bereich (Grayson et al. 2005) und können

die Blut-Hirn-Schranke passieren (Kazantsev und Thompson 2008). Weiterhin genutzt werden cyclische Peptide und die HDACi der Benzamid-Gruppe mit dem Vertreter MS-275, der ebenfalls schon in der klinischen Erprobung ist. MS-275 ist ZNS-spezifisch (Simonini 2006) und zeigt eine erhöhte Affinität zu HDAC1 (Grayson et al. 2010). Es ist 30- bis 100mal potenter als VPA (Simonini 2006).

Es sollte angemerkt werden, dass neben Histonen weitere Proteine durch HAT/HDAC acetyliert und deacetyliert werden, sodass man eigentlich von Lysin-Deacetylasen sprechen müsste. Auf die Rolle von non-Histon-Protein-Acetylierung wird im Rahmen dieser Arbeit nicht weiter eingegangen.

Histon-Code und Ladungsmodell

Die ursprüngliche Sicht der Epigenetik geht davon aus, dass Acetyl- oder auch Phosphatgruppen die Ladung der Histone neutralisieren und so die Bindung zwischen Histonen und DNA abschwächen. Gegen diese Hypothese sprechen Berechnungen, nach denen durch Histon-Acetylierung nur eine Verringerung der positiven Ladung um 10 %-30 % möglich ist und dass Histon-Acetylierung *in vitro* nicht zur Freisetzung von DNA führt (Peterson und Laniel 2004). Diskutiert wird daher das Vorliegen eines Histon-Codes, bei dem eine bestimmte Konfiguration epigenetischer Modifikationen an spezifischen Bindungsstellen notwendig ist, um eine Expressionsänderung herbeizuführen (Jenuwein und Allis 2001). Bestimmte Markierungen werden mit erhöhter oder verringerter Transkription assoziiert beziehungsweise mit akuter und chronischer Aktivierung (Tsankova et al. 2007). Als Marker aktivierten Chromatins gilt allgemein Histon-Acetylierung (Peterson und Laniel 2004; Kouzarides 2007). Lysin-Methylierung wird in Abhängigkeit des betrachteten Aminosäure-Rests als restriktiv oder aktivierend gewertet, als restriktiv gilt mono- di- oder trimethyliertes Histon3 an Lysin9 (H3K9) (Kouzarides 2007). Weiterhin stellte sich heraus, dass bestimmte DNA-Bereiche an „ihren“ epigenetischen Markierungen zu erkennen sind, beispielsweise als Promotor-, Enhancer- oder Exonbereich (Schones und Zhao 2008). Ebenso wurden Transkriptionsfaktoren identifiziert, die spezielle Acetylierungsmuster anhand einer oder mehrerer Bromodomain-Bindungsstellen erkennen können (Peterson und Laniel 2004).

1.4.2 DNA-Methylierung

DNA-Methylierung findet in eukaryotischen Zellen als Methylierung der Cytosin-Base zum 5-Methylcytosin statt. Die Cytosine liegen dabei meist als Cytosin-phosphatidyl-Guanin-

Dinukleotide vor (CpG). CpG-Dinukleotide sind im Genom wesentlich seltener als sie statistisch auftreten müssten. Kommen sie vereinzelt vor, liegen sie meist außerhalb der Promotor- und Exon-Regionen und sind überwiegend methyliert. Methylierung von mehreren aufeinanderfolgenden CpG-Sequenzen (engl. *CpG-islands*) ist eine Form der epigenetischen Modifizierung. Takai und Jones (2002) definieren eine CpG-Insel als einen Bereich länger als 500 bp mit einem Anteil von CpG-Dinukleotiden $> 55\%$. CpG-Sequenzen kommen in bis zu 40 % aller Promotor-Regionen vor und sind meistens nicht methyliert.

Die Übertragung von Methyl-Gruppen von *S*-Adenosylmethionin (SAM) auf den Pyrimidin-Ring von Cytosin-Basen wird von DNA-Methyltransferasen (DNMT) katalysiert (Tsankova et al. 2007). Man unterscheidet die *de-novo*-DNMT3a und 3b, die die Übertragung auf bisher unmethylierte Cytosin-Basen katalysieren, von der DNMT1, die bei Vorliegen einer Methyl-Gruppe die entsprechende Base am komplementären Strang methyliert (Klose und Bird 2006). DNA-Methylierung ist ebenfalls ein reversibler Prozess, dessen enzymatische Abläufe bisher nur partiell verstanden werden (Bhutani et al. 2011).

1.4.3 DNA-Methylierung und Histon-Acetylierung kooperieren

Die Mechanismen zur Repression von Genexpression interagieren auf Chromatinebene. So können DNMT HDAC direkt rekrutieren (Fuks et al. 2000). Ebenso dient methylierte DNA als Bindungsstelle für Proteine mit Methylgruppen-Bindesequenz (MDB; engl. *methyl binding domain proteins*) wie zum Beispiel Methyl-CpG-binding-protein 2 (MeCP2). Über diese Proteine werden dann wiederum Histon-Deacetylasen und weitere Repressoren rekrutiert, darunter DNMT und Histon-Methyl-Transferasen (HMT) (Klose und Bird 2006; Kundakovic et al. 2009) (Siehe Abb. 1.6). Dieser Prozess ist umkehrbar: Über die pharmakologische HDAC-Inhibition konnte eine DNA-Demethylierung erreicht werden (Dong et al. 2008).

1.4.4 Histon-Acetylierung und DNA-Methylierung bei Lernvorgängen und Gedächtnis

Histon-Acetylierung ist an der Ausbildung von Langzeit-Gedächtnisinhalten beteiligt. CBP (*CREB (cAMP-response-element-binding-protein)-binding-protein*) ist ein Transkriptions-Koaktivator mit intrinsischer HAT-Aktivität. Ein *CBP-knockout-Mausmodell* zeigte wiederholt schlechtere Leistungen in Langzeitgedächtnis-Versuchen, die sich durch Gabe eines HDACi ausgleichen ließen (Korzus et al. 2004; Alarcón et al. 2004). In weiteren Experimenten wurde gezeigt, dass HADCi auch in gesunden Tieren die Langzeitgedächtnisleistungen verbessern

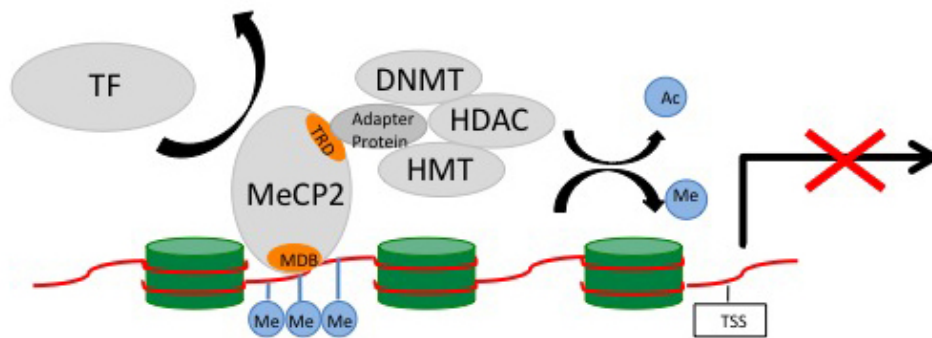


Abbildung 1.6: DNA-Methylierung und Histon-Acetylierung verstärken sich gegenseitig in der Inhibition von Transkription. Das Methyl-CpG-binding-Protein2 (MeCP2) bindet mit einer Erkennungssequenz für methylierte DNA (MDB, *methyl binding domain proteins*) an methylierte Cytosin-phosphatidyl-Guanin-Dinukleotide. Über eine Transkriptions-Regulations-Sequenz (TRD, *transcription regulatory domain*) werden weitere regulatorische Elemente rekrutiert, darunter Histon-Deacetylasen (HDAC), Histon-Methyltransferasen (HMT) und DNA-Methyltransferasen (DNMT). Dies verhindert einerseits die Bindung von Transkriptionsfaktoren (TF), andererseits fördert es die stärkere Kondensation der DNA über die Lösung von Acetylgruppen (Ac) und die Übertragung von Methylgruppen (Me) auf Histone. TSS = Beginn der Transkription, *transcription start site* (Modifiziert nach Sweatt (2009, S. 192) mit freundlicher Genehmigung durch Elsevier).

können und dass dies mit Histon-Hyperacetylierung einhergeht (Levenson et al. 2004; Fontán-Lozano et al. 2008). Fischer et al. (2007) konnten schließlich zeigen, dass die Gabe von HDACi sogar verloren gegangene Gedächtnisinhalte wieder zugänglich macht.

Neben Histon-Acetylierung ist DNA-Methylierung Teil des Konsolidierungsprozesses. Unspezifische Inhibition von DNMT führte zu Blockade der Langzeit-Potenzierung (LTP, engl. *long-term potentiation*) *in vitro* (Levenson et al. 2006) und behinderten die Langzeitgedächtnisfunktion *in vivo* (Miller und Sweatt 2007; Monsey et al. 2011). Letzteres führen Miller und Sweatt (2007) auf eine Blockade DNMT1-vermittelter Histon3-Acetylierung zurück. Obwohl verstärkte DNA-Methylierung zunächst zu verringerter Expression führt, ist der Einfluss auf Gedächtnisprozesse dynamisch zu betrachten, insofern als wider Erwarten auch verstärkte Methylierung zu erhöhter Gedächtnisleistung führen kann. Im Detail konnte gezeigt werden, dass während der Gedächtnisbildung das erinnerungsunterdrückende Gen *pp1* (Koshibu et al. 2009) verstärkt methyliert wird, während das *reelin*-Gen, ein Faktor für synaptische Plastizität, demethyliert wird (Miller und Sweatt 2007).

Levenson et al. (2004) beobachteten während der Angstkonditionierung (engl. *fear-conditioning*) eine Acetylierung von Histon3, während Histon4-Acetylierung bei der sogenannten

latentem Inhibition erhöht war, einem Versuchsprozedere, dem eine längere Gewöhnungsphase an den neuen Versuchskontext vorausgeht und so eine Assoziation des Schocks mit der neuen Umgebung verhindert. Beide Vorgänge wurden über unterschiedliche Signalkaskaden vermittelt und schienen sich gegenseitig zu blockieren.

Studien, die den Einfluss von HDAC- und DNMT-Inhibierung auf das Kurzzeitgedächtnis (innerhalb der ersten Stunde) untersuchten, konnten keinen Effekt nachweisen (Levenson et al. 2004; Monsey et al. 2011).

1.4.5 GABAerges System und epigenetische Zusammenhänge

In den letzten Jahren wurde die epigenetische Regulation der Genexpression von Reelin (einem Extrazellulärmatrix-Protein, das an synaptischer Plastizität beteiligt ist (Grayson et al. 2006)) und GAD₆₇ in Schizophrenen untersucht. Die Promotoren des für Reelin codierenden *reln*-Gens und des für GAD₆₇ codierende Gens *gad1* weisen große CpG-Inseln auf, und es wurde wiederholt eine signifikante DNA-Hypermethylierung des *reln*-Promotors nachgewiesen (Abdolmaleky et al. 2005; Grayson et al. 2005). *In vitro*-Studien belegen, dass die Reelin-Expression über Promotor-Methylierung reguliert wird (Chen et al. 2002).

Es wurde außerdem eine Assoziation von erniedrigter GAD₆₇-Expression mit erhöhter Expression von DNMT1 (Veldic et al. 2004) und HDAC1 (Sharma et al. 2008) nachgewiesen. Es konnte gezeigt werden, dass HDAC1 mit DNMT1, DNMT3a, DNMT3b und MeCP2 einen Repressor-Komplex bildet, der die Expression von sowohl Reelin als auch GAD₆₇ negativ beeinflusst. Die Gabe von HDACi oder DNMT-Inhibitoren führte zur Dissoziation dieses Repressor-Komplexes und steigerte die Reelin- und GAD₆₇-Expression *in vitro* (Kundakovic et al. 2009). Auf Promotorebene wurde dabei eine verringerte DNA-Methylierung und eine gesteigerte Histon-Acetylierung nachgewiesen (Mitchell et al. 2005).

1.4.6 Tiermodelle der Schizophrenie

Tiermodelle sind ein in Biologie und Medizin etabliertes Forschungsinstrument sowohl zur Erforschung zugrundeliegender Pathomechanismen und Krankheitsverläufe als auch zur Erprobung und Überprüfung von Therapien. Ein ideales Tiermodell würde strukturelle Aspekte der zu untersuchenden Erkrankung und einen klassischen Phänotyp mit einer adäquaten Antwort auf eine etablierte Therapie vereinen (Jones et al. 2011).

Die psychiatrische Forschung steht in dieser Hinsicht vor einer besonderen Herausforderung,

da Kernsymptome wie Veränderungen von Affekt, kognitiven Leistungen oder psychotischen Symptomen im Tiermodell nur schwierig und indirekt charakterisierbar und messbar sind. Ersatzweise werden diese in Verhaltenstests erfasst, bei denen man davon ausgeht, dass sie die zu untersuchende Leistung abbilden. Alternativ wird auf die Untersuchung klassischer Endophänotypen zurückgegriffen (Jones et al. 2011).

Tiermodelle der Schizophrenie lassen sich in vier Kategorien einteilen: Genetische Manipulation (1), Entwicklungsstörungen (2), pharmakologische Intervention (3) Setzen anatomischer Läsionen (4). Zu den untersuchten Verhaltensänderungen gehören verstärkte lokomotorische Aktivität, verändertes Sozialverhalten, Defizite der sensorischen Informationsfilterung und die Untersuchung kognitiver Leistungen, insbesondere des Langzeit- und Arbeitsgedächtnisses (Powell und Miyakawa 2006).

Der schizophrenen Symptomatologie vergleichbare kognitive Defizite lassen sich durch neonatal gesetzte Läsionen des ventralen Hippocampus erreichen. Pharmakologisch erzeugt die Anwendung von Amphetaminen oder des nicht-kompetitiven NMDA-Antagonisten Phencyclidin Defizite in Arbeitsgedächtnistests (Castner et al. 2004). Die genetisch basierten Modelle zeigen unterschiedliche Leistungen in Kognitionstests. Mutationen im *dtbpl1*-Gen (Dysbindin) führen zu Langzeit- und Arbeitsgedächtnisdefiziten, ebenso im *grin2*-Gen, das für eine NMDA-Rezeptor-Untereinheit codiert. Die Befunde zu *disc1* und *nrg1* sind hingegen nicht eindeutig (Arguello und Gogos 2010; Jones et al. 2011).

1.4.7 L-Methionin-Dauerapplikation als Tiermodell der Schizophrenie

Ausgehend von der Beobachtung, dass die Gabe von Methionin als Zusatztherapeutikum in Schizophrenen zu einer Verschlechterung der Symptome führte (Wyatt et al. 1971), wurde in der Arbeitsgruppe um E. Costa (1924–2009) die Hypothese entwickelt, dass dieser Effekt auf die verstärkte DNA-Methylierung des *reln*-Gens zurückzuführen sei. In einem Mausmodell wurde durch tägliche Injektion von L-Methionin eine Hypermethylierung der *reln*- und *gad1*-Promotoren erreicht, die in einer verringerten Expression von Reelin und GAD₆₇ resultierte, wie sie in postmortalen Gewebeproben Schizophrener gefunden wird. Dies ging mit einer verminderten Präpuls-Inhibition des Schreckreflexes (PPI), eines Schizophrenie-typischen Endophänotyps, einher. Durch Hyperacetylierung an Histon3 mittels der HDACi VPA oder MS-275 waren diese Veränderungen reversibel (Tremolizzo et al. 2002; Dong et al. 2005).

1.5 Fragestellung

Die aktuellen Theorien zu Gedächtnisbildung gehen von einer Markierung und Aktivierung einzelner Synapsen aus. Entscheidend ist dafür scheinbar, dass ausreichend Protein-Material in der Synapse zur Verfügung steht (Frey und Frey 2008). Für Prozesse des Langzeitgedächtnisses wurde eine Verbesserung durch Applikation von HDACi nachgewiesen, die die Genexpression und damit verbundene Produktion bestimmter Proteine erhöhen. Unsere Hypothese besagt, dass auch die verschlechterte Arbeitsgedächtnisleistung Schizophrener unter anderem auf eine verringerte Synthese für die neuronale Verknüpfung benötigter Proteine, beispielsweise Rezeptoren, zurückzuführen ist, und dass sich dieser Vorgang durch die Gabe von HDACi positiv beeinflussen lässt. Die vorliegende Arbeit soll daher folgende Fragestellungen beantworten:

1. Existiert in den vorliegenden Proben eine Veränderung der Histon-Acetylierung und der HDAC-Expression? Lässt sich ein Schizophrenie-typisches Muster erkennen?
2. Besteht eine epigenetische Regulation der Expression Arbeitsgedächtnis-relevanter Proteine?
3. Lässt sich durch die chronische Applikation von L-Methionin im Tiermodell ein Arbeitsgedächtnisdefizit hervorrufen, und ist dieses durch HDACi reversibel?

2 Materialien und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Laborausstattung

Alle Versuche wurden mit Pipetten der Firma *Eppendorf* (Hamburg, Deutschland) in den Größen 0,1-2,5 μl , 0,5-10 μl , 2-20 μl , 10-100 μl , 20-200 μl , 100-1000 μl oder dem *Easypet Pipetboy* durchgeführt. Die Pipettenspitzen wurden von *Star Lab* (Ahrensburg, Deutschland) oder *Eppendorf* bezogen. Sterile Mikro Reaktionsgefäße, sogenannte Eppendorf Tubes, wurden in den Größen 1,5 ml und 2 ml (*Nerbe Plus Winsen/Luhe*, Deutschland) verwendet, 15 ml und 50 ml Tubes wurden von *SARSTEDT* (Nürnbrecht, Deutschland) bezogen. Für die Zentrifugation standen eine Tischzentrifuge (Mini Zentrifuge; *Carl Roth*, Karlsruhe, Deutschland) und die Mikrozentrifuge 5424 (*Eppendorf*) zur Verfügung. Zentrifugation bei 4 °C wurde in der Mikrozentrifuge 5417R (*Eppendorf*) durchgeführt. Inkubationen fanden im *Thermomixer Comfort* (*Eppendorf*) statt, weiterhin wurden bei Bedarf ein *Unimax 1010* und ein *Polymax 1040 Shaker* (*Heidolph Instruments* Schwabach, Deutschland), und der *Rotator sb3* (*Stuart7*) sowie der Magnetrührer *MR30* (*Heidolph Instruments*) und der *Vortex Genie2* genutzt.

2.1.2 Gewebeproben

Es lagen anonymisierte Hirngewebeproben aus dem dorsolateralen präfrontalen Kortex (Brodmann-Areal 9) von 14 Verstorbenen mit der Diagnose Schizophrenie, von 15 Patienten mit bipolarer Erkrankung sowie 21 Proben von Verstorbenen ohne psychiatrische Erkrankung vor. Die Proben wurden vom *Harvard Brain Tissue Resource Center* zur Verfügung gestellt und bei -80 °C aufbewahrt.

2.1.3 Versuchstiere

Alle Versuche wurden unter Einhaltung des Tierschutzgesetzes an drei bis sechs Monate alten männlichen Mäusen des Stamms C57BL/6 durchgeführt. Die Tiere wurden im Tierhaus

2.1 Materialien

des ENI-Göttingen aufgezogen und versorgt. Das verwendete Käfigsystem bestand aus transparenten 16x32x14 cm großen Käfigen (*ICV, TECNIPLAST*, Buguggiate, Italien). Alle Tiere wurden bis zum Beginn der Versuche in Gruppen gehalten. Einige Tage vor Beginn der Experimente lebten die Tiere in Einzelkäfigen bei unbegrenztem Zugang zu Nahrung und Wasser. Der Tag/Nacht-Zyklus betrug zwölf Stunden (Fischer et al. 2007), Experimente wurden während der Tagphase ausgeführt.

2.1.4 Geräte

Tabelle 2.1: Geräte

Produktname	Hersteller
Agarosegel System	VWR international, Darmstadt, Deutschland
BioPhotometer	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Bioruptor	Diagenode, Lüttich, Belgien
Easypet Pipetboy	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Elektrosealboy 235 SBM	Audion, Kleve, Deutschland
Feinwaage extend	Sartorius, Göttingen, Deutschland
Light-Cycler 480 Real-Time PCR System	Roche, Mannheim, Deutschland
LightCycler 480 Multiwell Plate 96	Roche, Mannheim, Deutschland
Magnetrührer MR 3000	Heidolph Instruments, Schwabach, Deutschland
Magnetic Rack	invitrogen, Carlsbad, CA, USA
Mastercycler Gradient PCR	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Mini-Protean 3 Cell Gel System	Bio-Rad, Hercules, CA, USA
Mini Zentrifuge	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
NanoDrop ND-1000 Spektrophotometer	Thermo Scientific, Langenselbold, Deutschland
Odyssey Infrared Imaging System	Li-Cor Bioscience, Lincoln, NE, USA
Pipettenspitzen	Star Lab, Ahrensburg, Deutschland
Pipettenspitzen	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Polymax 1040 Shaker	Heidolph Instruments, Schwabach, Deutschland
Reaktionsgefäße 1,5 ml	Nerbe Plus, Winsen/Luhe, Deutschland

2.1 Materialien

Produktname	Hersteller
Reaktionsgefäße 15 ml und 50 ml	SARSTEDT, Nürnberg, Deutschland
Reinstwassersystem Arium 611	Sartorius, Göttingen, Deutschland
Rotator sb3	Stuart (Bibby Scientific Ltd.), Stone, UK
SDS-PAGE Stromquelle EV 231	Consort bvba, Turnhout, Belgien
SevenEasy pH-Meter	Mettler Toledo, Greifensee, Schweiz
Sonicator ultrasonic cleaner	VWR international, Darmstadt, Deutschland
Thermomixer Comfort	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Unimax 1010 Shaker	Heidolph, Schwabach, Deutschland
Gel iX Imager	Intas Science Imaging Instruments GmbH, Göttingen, Deutschland
Vortex Genie 2	Scientific Industries, Bohemia, NY, USA
Waage TE 1502 S	Sartorius, Göttingen, Deutschland
Zentrifuge 5417R	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Zentrifuge 5424	Eppendorf, Hamburg, Deutschland

2.1.5 Chemikalien

Tabelle 2.2: Chemikalien

Reagenz	Hersteller
Agarose (MEEEO ultra quality)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Albumin Fraktion V (BSA)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ammoniumperoxodisulfat	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Bromphenol Blau Natriumsalz	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Chloroform	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
complete EDTA-free Proteaseinhibitor	Roche, Mannheim, Deutschland
Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTP) Mix	Bioline Reagents Ltd, London, UK
Dinatriumhydrogenphosphat	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
1,4 Dithiothreitol (DTT)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
DNA Loading Dye (6x)	Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland
Dream Taq DNA Polymerase	Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland
Dream Taq DNA Polymerase-Puffer	Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland

2.1 Materialien

Reagenz	Hersteller
Dynabeads	invitrogen, Carlsbad, CA, USA
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	VWR international, Darmstadt, Deutschland
Ethanol 99 % (vergällt)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Forene Isoflurane	Abbott Laboratories, Chicago, IL, USA
GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder	Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland
Glycerin	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Glycin	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Isopropylalkohol	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
iScript cDNA Synthesis Kit	Bio-RAD, Hercules, CA, USA
Kaliumchlorid	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Kaliumdihydrogenphosphat	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Magnesiumchlorid für PCR	Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland
MeDNA-IP Precipitant	Diagenode, Lüttich, Belgien
MeDNA-IP co-Precipitant	Diagenode, Lüttich, Belgien
Methanol 99 %	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
LightCycler 480 Probe Master(2X)	Roche, Mannheim, Deutschland
L-Methionin	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Natriumacetat	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Natriumbutyrat 98 %	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Natriumchlorid	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Natriumhydroxid 99 %	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natriumphosphat	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
PageRuler Prestained Protein Ladder	Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland
Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol 25:24:1	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Phenylbutyrat	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Proteinase K	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Proteinase Nitrocellulose Transfer Membran	Whatman, Dassel, Deutschland
RNase-free H_2O for PCR	usb (Affymetrix), Santa Clara, CA, USA
Rotiphorese Gel 30 (37,5:1)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Roti-Quant for Bradford	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Salzsäure 37 %	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland

2.1 Materialien

Reagenz	Hersteller
Sodium dodecyl sulfate polyacrylamid (SDS) Pellets	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
TRIS ultrapure	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Triton X-100 (TX)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
TRIZOL Reagent	invitrogen, Carlsbad, CA, USA
Trockenmilchpulver	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Tween 20	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland

2.1.6 Antikörper

Tabelle 2.3: Antikörper

Antikörper	Hersteller
HDAC1 (H-51): sc-7872	Santa Cruz Biotechnologie
HDAC2 (H-54): sc-.7899	Santa Cruz Biotechnologie
HDAC3 (H-99): sc-11417	Santa Cruz Biotechnologie
Anti-acetyl Histone H3(Lys9)	Upstate Biotechnology Inc.
Anti-acetyl Histone H3(Lys14)	Upstate Biotechnology Inc.
Anti-acetyl Histone H4(Lys5)	Upstate Biotechnology Inc.
Anti-acetyl Histone H4(Lys8)	Upstate Biotechnology Inc.
Anti-acetyl Histone H4(Lys12)	Upstate Biotechnology Inc.
Anti-acetyl Histone H4(Lys16)	Upstate Biotechnology Inc.
mouse anti-GAPDH monoclonal antibody	Chemicon International
IRDye 800CW Goat-anti-Rabbit Antibody	Li-COR Bioscience Lincoln, NE, USA
IRDye 800CW Goat-anti-Mouse Antibody	Li-COR Bioscience Lincoln, NE, USA
5-Methylcytidine Antibody	Eurogentec, Seraing, Belgien

2.1 Materialien

2.1.7 Primer

Die Primer und Sonden wurden über das *Assay Design Center* der Firma *Roche* ausgewählt und durch *Sigma Genosys* synthetisiert (www.roche-applied-science.com/sis/rtpcr/upl/index.jsp?id=uplct_030000).

Tabelle 2.4: Primer

Gen/ Accession No.	Sequenz
<i>amp1</i> , Transkriptionsvariante 1/ NM_000827.3	Amplikon 5' → 3' cagcgacagctttgagatgacctatagattctgttcccagttctc- caaaggagtctatgccatc forward primer: 5'cagcgacagctttgagatga reverse primer: 5'gatggcatagactcctttgga UPL #48 (ttcccagt)
<i>chrml</i> / NM_000738.2	Amplikon 5' → 3' 5'ggacctacagaccctcttcagccccgtggtgatgactttccct- gaggaagccctgtagcgtgcctggaggaa forward primer: 5'ggacctacagaccctctt reverse primer: 5'tcctccaggcagctac UPL #9 (tggtgatg)
<i>gapdh</i> / (Glycerinaldehyd- 3-Phosphat- Dehydrogenase) NM_002046.3	Amplikon 5' → 3' 5'agccacatcgctcagacacatggggaaggtgaaggtcggagt- caacggatttggtcgtattgggc forward primer: 5'agccacatcgctcagacac reverse primer: 5'gcccaatacaccacaaatcc UPL #60 (tggggaag)
<i>chrml</i> / CpG-Insel NM_000738	Amplikon 5' → 3' 5'gcccaatgtgtcatttccaacagaaggaatctagctctct- cacagcagggaggaagagcaggggtgtgtagttgggtgggtgggtgcgt forward primer: 5'gcagaggcgggtgggagaagag reverse primer: 5'cctccacgctcaacatccattcc

2.1.8 Pufferlösungen

- **TX-Puffer**
 - 50 mM TRIS, pH 7,5
 - 150 mM Natriumchlorid · 2 mM EDTA
 - 1 % TX
 - dd H_2O
- **PBS (5l 10x)(Phosphate Buffered Saline)**
 - 400 g $NaCl$ (137 mM)
 - 10 g KCl (2,7 mM)
 - 88,5 g Na_2HPO_4 (10 mM dihydrate)
 - 12 g KH_2PO_4 (2 mM)
- **Lämmli-Puffer**
 - 200 mM TRIS (pH 6,8)
 - 400 mM DTT
 - 8 % SDS
 - 0,2 % Bromphenol Blau
 - 20 % Glycerin
- **Sammelgel (5 %, 4 ml)**
 - 2,7 ml dd H_2O
 - 4,0 ml 30 % Acrylamidmix
 - 2,5 ml 1,0 M TRIS pH 8,8
 - 100 μl 10 % SDS
 - 100 μl 10 % Ammoniumperoxodisulfat
 - 4 μl TEMED
- **Laufgel (12 %, 10 ml)**
 - 3,3 ml dd H_2O
 - 670 μl 30 % Acrylamidmix
 - 500 μl 1,0 M TRIS pH 6,8
- 40 μl 10 % SDS
- 40 μl 10 % Ammoniumperoxodisulfat
- 4 μl TEMED
- **Laufpuffer (5l 5x, pH 8,3)**
 - 75,5 g TRIS
 - 360 g Glycin
 - 25 g SDS
- **Laufpuffer (5l 5x, pH 8,3)**
 - 75,5 g TRIS
 - 360 g Glycin
 - 25 g SDS
- **Transferpuffer (5l 10x , pH 8,3)**
 - 151,25 g TRIS
 - 720 g Glycin
 - dd H_2O
 - vor Gebrauch als 1x Transferpuffer 20 % Methanol hinzufügen
- **TE (TRIS-EDTA)-Puffer**
 - 10 mM TRIS
 - 1 mM EDTA
- **Lyse-Puffer**
 - 20 mM TRIS
 - 4 mM EDTA
 - 20 mM Natriumchlorid
 - 1 % SDS, direkt vor Gebrauch zugeben

2.2 Methoden

- **10x IP (Immunpräzipitations)-Puffer**
 - 100 mM Natriumphosphat
 - 1,4 M Natriumchlorid
 - 0,5 % Triton X-100
- **Proteinase-K-Verdau-Puffer**
 - 50 mM TRIS pH 8,0
 - 10 mM EDTA
- 0,5 % SDS, direkt vor Gebrauch zugeben
- **TAE (Tris-Acetat-EDTA)-Puffer**
 - 0,40 M TRIS pH 8,0
 - 0,20 M Natriumacetat
 - 0,02 M EDTA

2.2 Methoden

2.2.1 Western Blot

Das Western Blot-Verfahren zur Auftrennung von Proteinen nach Molekulargewicht mittels Gelelektrophorese und Nachweis spezifischer Protein-Antikörper-Bindungen wurde nach Lämmler (Laemmli 1970) durchgeführt.

Antikörper

Die relative Acetylierung regulatorisch wirksamer Lysin-Seitenreste an Histonen wurde mit SDS-PAGE (*sodium dodecyl sulfate polyacrylamid gel electrophoresis*) untersucht. An Histon3 (MG 17 kDa) wurde die Acetylierung mit den Antikörpern anti-H3K9 und anti-H3K14 in einer Verdünnung 1:1000 mit PBST (PBS mit Tween 20) mit 0,5 % Milch gemessen. Die Acetylierung an Histon4 (MG 10 kDa) wurde mit den Antikörpern anti-H4K5, anti-H4K8, anti-H4K12 und anti-H4K16 in einer Verdünnung 1:500 mit PBST mit 0,5 % Milch untersucht. Bei allen zur Messung der Histon-Acetylierung genutzten primären Antikörper handelt es sich um polyklonale Antikörper, die aus Kaninchenserum gewonnen wurden. Sie wurden nach Gebrauch aufgefangen und wieder verwendet. Als Ladungskontrolle wurde das Haushaltsgen *gapdh* eingesetzt. *Gapdh* ist ein Enzym des Citratzyklus und wird im Zytosol aller Zellen des menschlichen Körpers ubiquitär exprimiert. Es wurde ein monoklonaler, in der Maus gewonnener anti-GAPDH Antikörper in einer Verdünnung 1:15 000 mit PBST mit 0,5 % Milch eingesetzt und mehrfach verwendet. Die primären Antikörper anti-HDAC1, anti-HDAC2, anti-HDAC3 (ebenfalls polyklonale Kaninchenantikörper) wurden in einer Verdünnung 1:500 mit PBST mit 0,5 % Milch eingesetzt.

Die sekundären Fluorophor-gekoppelten Antikörper *goat-anti-rabbit* und *goat-anti-mouse* wurden in einer Verdünnung 1:15 000 mit PBST mit 0,5 % Milch eingesetzt. Die sekundären Antikörper wurden nach Gebrauch verworfen.

Vorbereitung der Zellysate

Die Proben wurden mit 400 μl TX-Puffer mit 0,5 % SDS, 5 % Sodiumbutyrat als unspezifischem Histon-Deacetylase-Inhibitor in der Konzentration 2,5 M und *Complete* Proteaseinhibitor 1 Tablette / 10 ml Puffer gemischt und manuell homogenisiert. Nach 10 min Inkubation bei 4 °C wurde die Zellstruktur mittels Ultraschall im *Bioruptor* (Einstellungen High; On/Off-Zyklus 30 s; 15 min; 4 °C) aufgeschlossen. Dabei wurde auf eine permanente Kühlung der Proben durch Eiswasser geachtet. Das Homogenisat wurde zentrifugiert (10 min; 12 000 rpm (engl. *rounds per minute*); 4 °C) und der Überstand in ein neues Tube überführt.

Der Proteingehalt des Überstands wurde mit der Methode nach *BRADFORD* bestimmt (Bradford 1976). Fünffach konzentriertes *Roti-Quant* wurde mit PBS pH 7,0 im Verhältnis 1:5 verdünnt. Das Photometer wurde vor jeder Messung mit BSA (*bovine serum albumine*) im Verhältnis 1 μg / ml - 32 μl / ml kalibriert: 60 μl einer 1,28 μg / μl BSA Lösung wurden seriell in je 60 μl PBS pH 7,0 verdünnt. Jeweils 50 μl der Lösungen wurden zu 950 μl *Roti-Quant* in eine 1 ml Küvette gegeben, kurz gemischt und exakt 5 min bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. Aus einem Leerwert ml *Roti-Quant* 1:5 und den Standardverdünnungen wurde eine Standardkurve erstellt. 3 μl der zu messenden Proben wurden in je 1 ml *Roti-Quant* 1:5 verdünnt und entsprechend inkubiert, um den Proteingehalt in μg / μl zu erhalten.

Die Lysate wurden mit TX-Puffer zu einer Endkonzentration von 1 μg / μl eingestellt, die Ladungen wurde mit 5x Lämmli-Puffer neutralisiert. (Laemmli 1970). Die Proben wurden für 3 min bei 99 °C inkubiert und bei -20 °C aufbewahrt.

SDS-PAGE und Immunblot

Zum Erstellen der SDS-Gele wurden zwei Glasplatten mit Ethanol gereinigt und bündig in das *Bio-RAD*-System eingespannt. Die Laufgel-Lösung (12 %) wurde wie oben beschrieben vorbereitet, TEMED wurde zugegeben und das Gel sofort in das vorbereitete System eingegossen. Zur Egalisierung der Oberfläche wurde Ethanol auf die Laufgel-Lösung gegeben. Nach erfolgreicher Polymerisation nach etwa 30 min wurde das Ethanol entfernt und das Sammelgel (5 %)

nach demselben Verfahren appliziert. Durch Einsetzen von 10er-Kämmen in das Sammelgel wurden zehn Taschen geformt, in die anschließend die Zellysate pipettiert wurden.

Nach Überführen der vollständig polymerisierten Gele in die Laufkammer wurden $20 \mu\text{g}$ Zellysate in etwa 1 h bei 80-150 V in Laufpuffer aufgetrennt. Als Kontrolle für eine erfolgreiche Elektrophorese und Transfer diente der vorgefärbte Größenstandard *PageRuler*. Der Transfer auf eine Nitrocellulose-Membran erfolgte über Nacht im *Wetblot*-Verfahren in Transferpuffer bei 60 V / 150 mA / Gel. Es wurde das *Mini-Protean 3 Cell Gel System* verwendet.

Die Membranen wurden für 1 h bei RT getrocknet, freie Bindungsstellen wurden durch Inkubation in 5 %er Milch in PBST für 1 h gesättigt. Die Inkubation mit dem primären Antikörper erfolgte über Nacht bei 4 °C, anschließend wurden die Membranen dreimal für 10 min in 0,01 M PBST gewaschen. Die Inkubation mit dem sekundären Fluoreszenz-markierten Antikörper erfolgte für 45 min bei RT und Dunkelheit. Daran schlossen sich drei weitere Waschgänge mit PBST für 10 min sowie abschließend 5 min mit PBS ohne Tween an.

Entwicklung und Analyse

Die Fluoreszenzdetektion und Auswertung erfolgte im *LI-COR Odyssey Infrared Imaging System* bei einer Wellenlänge von 800 nm. Als Ladungskontrolle diente GAPDH. Unter Berücksichtigung der Herstellerempfehlungen wurde die integrierte Intensität gemessen und das *median background-Verfahren* zur Kalkulation der Hintergrund-Fluoreszenz verwendet. Für die statistische Analyse wurde der ermittelte Wert ins Verhältnis zur Ladungskontrolle gesetzt.

2.2.2 Real-Time Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR)

Alle RT-PCR-Versuche wurden an einem *roche 480 light-cycler* System durchgeführt. Zur Messung der Amplifikation wurden Sonden der *Universal Probe Library* (UPL) der Firma *roche* verwendet.

Bei der RT-PCR wird die Amplifizierung während der Reaktion mittels Fluoreszenz quantifiziert. Während des *annealings* bindet eine kurze Oligonukleotid-Sonde der UPL an eine innere Sequenz des Amplikons. Die Sonde ist am 5' Ende mit dem „Reporter“-Farbstoff Fluorescein markiert, am 3' Ende ist sie mit einem *Quencher* konjugiert, der durch Energieübertragung in der intakten Sonde die Reporter-Fluoreszenzemission unterdrückt. Durch die 5'-3'-Exonuclease Aktivität der Taq-Polymerase wird die Sonde hydrolysiert, sodass der Fluoreszenzfarbstoff vom *Quencher* getrennt und die Reporter-Fluoreszenz freigesetzt wird.

Im Gegensatz zu konventioneller Polymerase-Kettenreaktion (PCR) lässt die RT-PCR Rückschlüsse auf die ursprünglich eingesetzte DNA Menge zu. In Kombination mit der Reverse Transkriptase-Reaktion kann so der mRNA-Gehalt einer Probe quantifiziert werden.

RNA Isolierung

Es wurde RNA aus etwa 20 μg kortikalen Gewebes der unter Kapitel 2.1.3 beschriebenen Proben isoliert. Dafür wurden zwei alters- und geschlechtsangepasste Gruppen mit $n=10$ gebildet. Zur Gewinnung von mRNA aus den Kortex-Gewebeproben wurde das *TRIZOL* RNA-Isolationsprotokoll der Firma *Invitrogen* genutzt. Es wurden ausschließlich autoklavierte Eppendorf-Tubes und Pipettenspitzen mit Filter genutzt.

Die Gewebeprobe wurde mit 1 ml *TRI*-Reagenz homogenisiert. Nach 5 min bei RT wurden 0,2 ml Chloroform dazu gegeben. Nach weiteren 3 min bei RT wurden die Proben zentrifugiert (15 min, 4 °C, 12 000 G). Dadurch teilte sich die Flüssigkeit in eine rote Phenol-Chloroform-Phase, die Zelltrümmer enthielt, eine DNA-haltige Interphase und eine wässrige Phase mit RNA.

Die wässrige Phase wurde in ein neues Tube überführt. Zur Fällung der RNA wurden 0,5 ml Isopropanol hinzugegeben. Nach 10 min RT wurde die RNA durch Zentrifugation (10 min, 4 °C, 12 000 G) pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit 75 % Ethanol gewaschen und erneut zentrifugiert. Das Ethanol wurde dekantiert und das Pellet für 10 min getrocknet. Anschließend wurde das Pellet in 50 μl Diethyldicarbonat (DEPC)- Wasser gelöst und für 10 min bei 55 °C inkubiert, Die RNA-Konzentration wurde in einem *NanoDrop* Spektral-Photometer gemessen. Die Proben wurden bei -20 °C aufbewahrt.

Reverse Transkriptase-Reaktion

Zur Erstellung von codierender DNA (cDNA) aus der gewonnenen mRNA wurde das *iScript cDNA Synthesis Kit* der Firma *BIO-RAD* entsprechend den Hersteller-Angaben benutzt. 1 μg RNA wurde mit 4 μl *5x iScript Reaction Mix* und 1 μl *iScript Reverse Transcriptase* sowie mit einer von der RNA-Konzentration abhängigen Menge Nuklease-freien DEPC Wassers zu einem Reaktionsvolumen von 20 μl eingesetzt. Die Aktivierung der reversen Transkriptase erfolgte durch Inkubation für 5 min bei 25 °C. Durch Inkubation für 30 min bei 42 °C wurde die cDNA erstellt, durch Inkubation für 5 min bei 85 °C wurde die Reverse Transkriptase-Reaktion beendet. Die Reaktion erfolgte im *Mastercycler gradient* PCR-Gerät.

RT-PCR

In einem Reaktionsvolumen von 15 μl wurden 5,05 μl autoklaviertes PCR H₂O, 0,15 μl *forward primer* in einer 1:5 Verdünnung, 0,15 μl *backward primer* in einer 1:5 Verdünnung, 7,50 μl *LightCycler 480 Probe MasterMix* (2x konzentriert) und 0,15 μl *UPL Probe* (10 μM) eingesetzt. Die Ansätze wurden für das Zielgen und das Referenzgen *gapdh* mit den jeweiligen Primern und der entsprechenden *UPL Probe* als MasterMix angesetzt. Für jede Probe wurden 13 μl MasterMix und 2 μl Probe verwendet. Die Reaktion bestand aus Denaturierung (5 min, 95 °C), 40 Zyklen Amplifikation (10 sec, 95 °C; 30 sec, 60 °C; 1 sec, 72° C) und Abkühlungsphase (30 sec, 40 °C). Alle Versuche wurden als Triplikate durchgeführt und die Ergebnisse gemittelt.

Quantifizierung

Die Quantifizierung erfolgte anhand der Standardkurven-Methode. Es wurden 2 μl cDNA aller Kontrollproben vermischt und in den Verdünnungen 1:5, 1:10, 1:50 und 1:100 eingesetzt und die Cp-Werte für das Zielgen und das Referenzgen bestimmt. Der Cp-Wert entspricht der Anzahl Zyklen, ab der die Reaktion in die exponentielle Phase eintritt. Dabei übersteigt die Fluoreszenz erstmalig die Hintergrund-Fluoreszenz, den sogenannten *threshold*. Weiterhin wurden ein positiver Kalibrator in der Verdünnung 1:10 des Standards sowie eine Negativkontrolle eingesetzt.

Die Expression des Zielgens wurde relativ zur Expression des Haushaltgens *hprt1* (Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase), eines ubiquitär exprimierten Enzyms des Purinstoffwechsels (Foss et al. 1994), ins Verhältnis gesetzt. Die relative Expression wurde nach folgender Formel berechnet:

$$\text{normalized ratio} = \frac{(\text{Zielgen}/\text{gapdh})_{\text{Probe}}}{(\text{Zielgen}/\text{gapdh})_{\text{Positiver Kalibrator}}}$$

Die ermittelten Werte werden als n-fache Differenz zum Positiv-Kalibrator angegeben.

2.2.3 Methylierte DNA-Immunopräzipitation (MeDIP)

DNA-Inaktivierung einzelner Gene über Methylierung von Cytosin-Basen kann durch MeDIP nachgewiesen werden. Die DNA wird per Ultraschall in kleine Abschnitte zerteilt und mit

einem monoklonalen Maus-Antikörper gegen 5-Methylcytosin-Antikörper (5mC) präzipitiert. Die so markierten DNA-Abschnitte bilden mit anti-Maus-Antikörpern beschichteten Metallkugeln (*Dynabeads*) Komplexe. Die DNA-*Dynabeads*-Komplexe können durch Einbringen der Tubes in ein starkes Magnetfeld extrahiert werden und die DNA kann mit PCR amplifiziert werden.

Analyse des CpG-Gehalts der Promotoren

Transkriptions-Regulation über DNA-Methylierung wird durch kovalente Bindung von Methylgruppen an Cytosinbasen in Cytosin-phosphatidyl-Guanin-Dinukleotiden (CpG) vermittelt. Bereiche hoher CpG-Dichte (CpG-Inseln, definiert als Bereich >400 bp und einem CpG Anteil >60 % (Takai und Jones 2002)) finden sich meist im Bereich des Promotors (etwa -500 bis -1500 bp oberhalb des Transkriptionsstarts (TSS) (Ioshikhes und Zhang 2000)), können sich aber auch im Gen oder in *Enhancer/Silencer* Regionen mehrere *kilobasepairs* (kbp) von der TSS entfernt befinden. Die Promotorsequenzen der fraglichen Gene wurden auf das Vorhandensein von CpG-Inseln überprüft. Die in der *Promoter-Database* hinterlegte DNA-Sequenz (<http://rulai.cshl.edu/cgi-bin/TRED/tred.cgi?process=home>) wurde mit der in der NCBI Datenbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>) hinterlegten Sequenz über die *BLAST*-Funktion der NCBI-Datenbank verglichen (Zhang et al. 2000). In diesem Bereich wurden mit der *MethPrimer* Software CpG-Inseln identifiziert (<http://www.urogene.org/methprimer/index1.html>). Mit der *Primer3* Software (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>) generierte Primersequenzen gegen diese DNA Abschnitte wurden durch die Firma *Sigma* synthetisiert.

DNA Isolierung

Es wurde DNA aus etwa 20 μg kortikalem Gewebe der unter Kapitel 2.1.3 beschriebenen Proben von je 10 Patienten und 10 Kontrollen isoliert. Die Gruppen wurden nach Alter und Geschlecht passend zusammengestellt. Die Gewebeproben wurden mit 300 μl TE-Puffer, 300 μl Lyse-Puffer mit 1 % SDS sowie 11 μl Proteinase K (20 mg / μl) über Nacht bei 55 °C, 800 rpm verdaut. DNA wurde mit 600 μl Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol 25:24:1 extrahiert. Die Proben wurden für 10 min RT unter Bewegung inkubiert und anschließend zentrifugiert (10 min, 12 000 rpm, RT). Die untere Phenol-Phase wurde verworfen, die DNA aus der oberen wässrigen Phase wurde mit 60 μl 3 M Natriumacetat und 1500 μl 99 % Ethanol über Nacht bei -20 °C ausgefällt. Das Präzipitat wurde durch Zentrifugieren (10 min, 12 000 rpm, RT)

pelletiert, der Überstand verworfen. Das Pellet wurde einmalig mit Ethanol 70 % gewaschen und für 30 min bei RT getrocknet. Abschließend wurde das Pellet in 100 μ l TE-Puffer gelöst und 2 h bei RT im Shaker gelöst. Die DNA Konzentration und Qualität wurde im *NanoDrop* Spektral-Photometer bestimmt.

Shearing

7 μ g DNA wurden in 200 μ l TE-Puffer gelöst und im *Sonicator* per Ultraschall (Einstellungen: Low; On/Off-Zyklus 15 sec; 25 min; 4 °C) in DNA Fragmente der Größe 300-500 bp zerkleinert. Der Erfolg wurde mittels Agarosegel-Elektrophorese überprüft, dann wurden aus jeder Gruppe die fünf Proben mit der besten Qualität für den weiteren Verlauf ausgewählt.

Immunopräzipitation

160 μ l der ultraschallbehandelten DNA wurden für 10 min bei 99 °C denaturiert und sofort darauf im Eisbad heruntergekühlt. Dann wurden 51 μ l IP-Puffer und 10 μ l des 5mC-Antikörpers zugegeben und zwei h bei 4 °C im Rotator inkubiert.

In der Zwischenzeit wurden 40 μ l *Dynabeads* in 800 μ l PBS-BSA 0,1 % gewaschen und nach 5 min in 40 μ l IP-Puffer resuspendiert. Die präparierten *Dynabeads* wurden der antikörpermarkierten DNA zugegeben und für 2 h bei 4 °C in Bewegung inkubiert. Die *Dynabead*-DNA-Komplexe wurden im Magnetfeld pelletiert, der Überstand verworfen und die Pellets dreimalig für 10 min bei RT in 700 μ l IP-Puffer gewaschen.

Durch Proteinase-K-Verdau mit 250 μ l Proteinase-K-Verdau-Puffer und 3,5 μ l Proteinase-K (20 μ g/ml) für drei h bei 50 °C und 800 rpm im *Thermoshaker* wurden die Komplexe wieder gelöst. Mittels Magnetfeld wurden die *Dynabeads* entfernt und die auf RT abgekühlte Suspension wurde mit 250 μ l Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol im Verhältnis 25:24:1 versetzt. Die Proben wurden für 10 min in Bewegung inkubiert, dann zentrifugiert (2 min, 13 000 rpm, RT). Die wässrige Phase wurde in ein neues Tube überführt und die enthaltene DNA mit 30 μ l *meDNA-IP precipitant* und 3 μ l *meDNA-IP co-precipitant* sowie 500 μ l 99 % Ethanol bei -20 °C über Nacht ausgefällt. Das Präzipitat wurde durch Zentrifugation pelletiert (25 min, 13 000 rpm, 4 °C), mit 70 % Ethanol gewaschen, erneut zentrifugiert (10 min, 13 000 rpm, 4 °C) und für 30 min an der Luft getrocknet. Die Überstände wurden jeweils verworfen. Anschließend wurde das Pellet in 40 μ l TE-Puffer gelöst und bei -20 °C aufbewahrt.

PCR

Das durch Temperaturgradienten-PCR ermittelte Temperaturoptimum für die Amplifikationsphase der synthetisierten Primer lag bei 61,1 °C. Optimale PCR-Ergebnisse wurden in einem Reaktionsvolumen von 25 μ l erzielt, dieses bestand aus 2,5 μ l *Green Dream Taq Buffer*, 2 μ l Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTP), 0,1 μ l *Dream Taq*, 0,5 μ l forward primer und 0,5 μ l reverse primer in einer 1:10 Verdünnung, 5 μ l Template und 14,4 μ l PCR-grade H_2O . Die Reaktion umfasste Denaturierung (5 min, 95 °C), 40 Zyklen Amplifikation (30 sec, 95 °C; 30 sec, 61,1 °C; 45 sec, 45 °C), einmalig 7 min bei 72 °C, Abkühlung bei 4 °C. Zusätzlich wurde eine Input-Kontrolle durchgeführt. Je 1 μ l unbehandelte DNA-Fragmente jeder Probe wurden unter den oben genannten Bedingungen amplifiziert. Alle PCR-Reaktionen wurden am *Mastercycler Gradient PCR*-Gerät durchgeführt.

Entwicklung und Analyse

Die Analyse der amplifizierten DNA Abschnitte erfolgte durch Ethidiumbromid-Interkalierung auf 1 % Agarosegel. 0,5 g Agarose wurden in 55 ml TAE-Puffer gelöst, aufgeköcht, mit 2 μ l Ethidiumbromid versetzt und in das Agarosegel-Set gegeben. Die Elektrophorese wurde in 30 min bei 120 V durchgeführt, als Größenstandard diente die *GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder*, als Laufpuffer diente TAE-Puffer. Die Banden wurden unter Ultraviolettstrahlung (UV) sichtbar gemacht. Für die Entwicklung und Dokumentation der Gele wurde der *iX Gel Imager* genutzt. Die Quantifizierung der Banden erfolgte mit der frei verfügbaren Software *ImageJ*.

2.3 Verhaltensversuche

Alle Verhaltenstests fanden bei indirekter Beleuchtung von oben statt, der Raum war schallisoliert. Zwischen den einzelnen Versuchen oder Phasen eines Versuchs wurden die Versuchsaapparaturen mit Ethanol 70 % gereinigt. Die Versuche wurden mit einer an der Decke angebrachten Kamera aufgezeichnet und mit der *Video Mot2 Software* (Version 5.72 TSE, Berlin) ausgewertet.

2.3.1 Objekterkennungstest

Der Objekterkennungstest (engl. *Novel Object Recognition Test*, NOR) wurde von Ennaceur und Delacour (1988) als Test für Aufmerksamkeit, Gedächtnis und Neugierde konzipiert. Im Gegensatz zu anderen Verhaltenstests kommt er ohne Belohnung oder Bestrafung aus.

Zur Testung des Langzeitgedächtnisses wurde das Versuchstier an fünf aufeinander folgenden Tagen an die leere Versuchsbox gewöhnt. Anschließend wurde die Maus an zwei Tagen mit zwei identischen Objekten trainiert. Der Test bestand aus einer fünfminütigen Trainingsphase mit den zwei identischen Objekten, einem fünfminütigen *intertrial*-Intervall im Käfig sowie der dreiminütigen Testphase, in der eines der Objekte durch ein unbekanntes Objekt ersetzt wurde.

Zur Testung des Arbeitsgedächtnisses wurde der Testablauf dahingehend modifiziert, dass vor dem Test kein Kontakt zu den identischen Objekten bestand. Das objektbezogene Langzeitgedächtnis wurde in einem zweiten Schritt getestet. Dabei wurde die Maus 24 Stunden später in einem Transfer-Test mit einem dritten, völlig unbekanntem Objekt konfrontiert und musste zwischen diesem und einem der identischen Objekte unterscheiden, ohne vorher erneut mit den bekannten Objekten zu trainieren (siehe Abb.2.1).

Die Versuche fanden in einer 80 x 80 cm großen Box mit grauem Boden und transparenten Wänden statt, der sogenannten *Open-Field-Box*. Die Objekte wurden nach Vergleichbarkeit in Größe und Komplexität ausgewählt. Es wurde darauf geachtet, dass sie der Größe des Versuchstiers entsprachen und für dieses erklimmbar waren. Damit wurde ausgeschlossen, dass allein die Wahl des Objekts ausschlaggebend für die Aufmerksamkeit des Versuchstiers war (Bevins und Besheer 2006). Zudem wurden die Objekte am Boden fixiert.

In diesem Fall waren die bekannten Objekte zwei weiße Plastikboxen von ca. 4,5 x 6,5 x 4 cm Kantenlänge, das unbekannte Objekt war ein grauer Pflastersteinwürfel von ca. 5 cm Kantenlänge mit rauer Oberfläche. Bei dem dritten Objekt handelte es sich um einen schwarzen Quader aus Acryl mit einer Kantenlänge von ca. 4 x 4 x 2 cm. Die mit den Objekten verbrachte Zeit und die Anzahl der Nase-Objekt-Kontakte (Entfernung vom Objekt <1 cm) (Silvers et al. 2007) wurden manuell durch den Untersucher unter Zuhilfenahme des Videosystems erfasst.

2.3 Verhaltensversuche

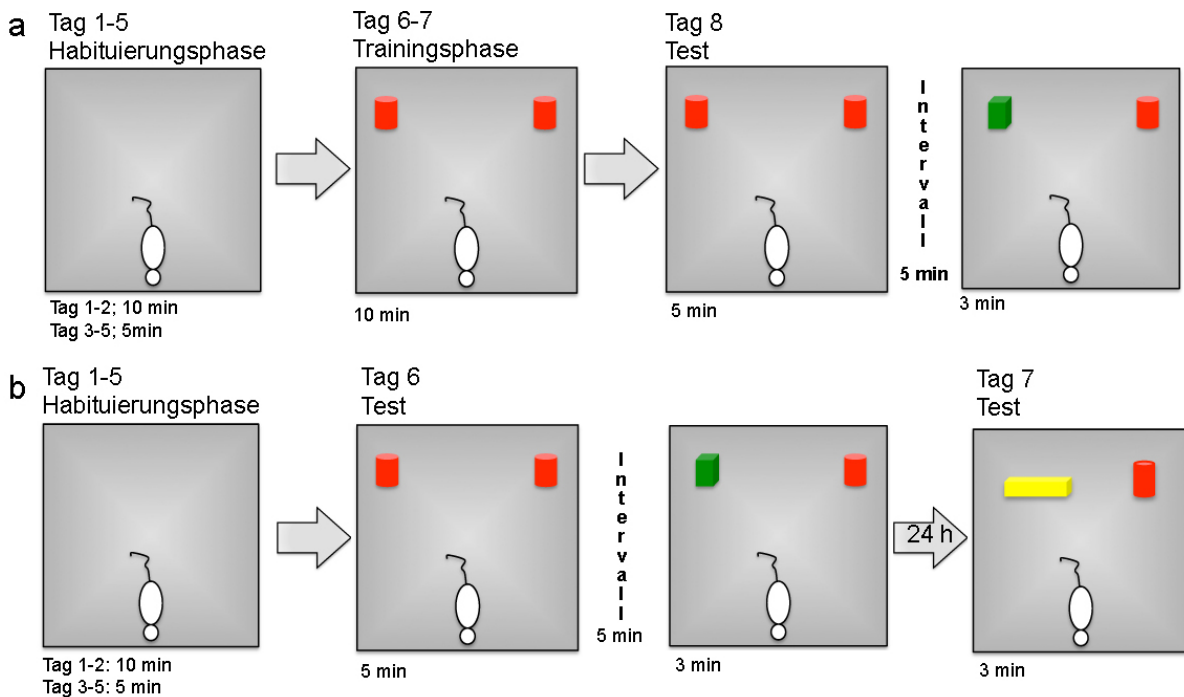


Abbildung 2.1: Schematische Darstellung des Ablaufs des Objekterkennungstests (NOR) (a) als Test des deklarativen Langzeitgedächtnisses und (b) als Test des deklarativen Kurzzeitgedächtnisses mit Transfer-Test nach 24 h (Modifiziert nach Bevins und Besheer (2006, S. 1308) mit freundlicher Genehmigung durch Macmillan Publishers Ltd.).

2.3.2 Y-Labyrinth

Im Y-Labyrinth wurde das deklarative ortsabhängige Arbeitsgedächtnis getestet. Ähnlich dem NOR beruht der Test auf der natürlichen Präferenz der Maus für Unbekanntes.

Das Y-Labyrinth besteht aus drei Armen von 30 cm Länge und 8 cm Breite mit 20 cm hohen Wänden, die in einer Y-Form angeordnet sind, Wände und Boden waren grau und nicht transparent (Bannerman et al. 2008). Der Fuß des Y bildet den Startarm, die anderen Arme werden im Folgenden als „anderer Arm“ und „neuer Arm“ bezeichnet (siehe Abb.2.2). Das Y-Labyrinth wurde ohne darin platzierte Objekte oder optische Hinweise verwendet. Es gab keine Trainingseinheit vor dem Test. Die Enden des Apparats waren mit Falltüren verschlossen, um die Befreiung des Versuchstiers nach den einzelnen Testphasen zu erleichtern und so den Stress für das Versuchstier zu reduzieren.

Während der ersten Phase des Tests war der „neue Arm“ verschlossen. Die Maus wurde am Ende des Startarms im Versuchsapparat platziert und konnte diesen und den „anderen Arm“ für

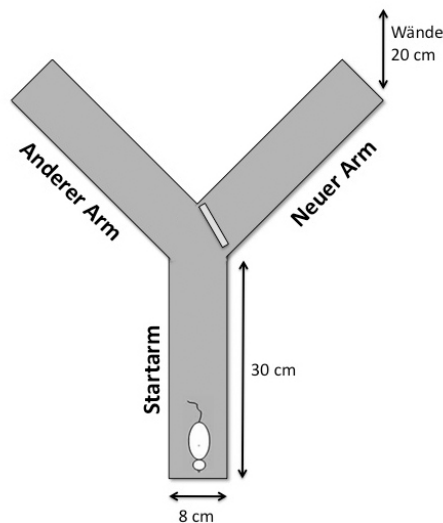


Abbildung 2.2: Schematische Darstellung des Y-Labyrinths.

fünf Minuten erkunden (beginnend als die Maus den „anderen Arm“ zum ersten Mal betrat). Dann wurde sie für ein zweiminütiges *intertrial*-Intervall in ihren Käfig zurückgesetzt. Für die Testphase wurde der Zugang zum „neuen Arm“ eröffnet und die Maus erneut am Beginn des Startarms platziert. Ab dem ersten Verlassen des Startarms wurden die in den einzelnen Armen verbrachte Zeit und die Anzahl der Besuche während zwei Minuten registriert. Als Besuch wurde gewertet, wenn die Maus vollständig von einem Arm in einen anderen wechselte.

2.3.3 Morris-Wasserlabyrinth

Das Morris-Wasserlabyrinth (engl. *Morris Water Maze*, MWM) (Morris 1984) diente der Untersuchung des räumlichen Lernens. In einem runden, mit trübem Wasser (ca. 21 °C) gefüllten Becken von ca. 120 cm Durchmesser wurde 1 cm unterhalb der Wasseroberfläche eine Plattform von 10 x 10 cm installiert. Das Becken wurde virtuell in vier Quadranten eingeteilt, jeder Quadrant war durch eine extern angebrachte deutliche Markierung gekennzeichnet (siehe Abb. 2.3).

Das Versuchstier wurde in variierender Position ins Wasser gesetzt und hatte in jeder Trainingseinheit vier Versuche à 60 Sekunden, die Plattform schwimmend zu erreichen. Antrieb hierfür war die aversive Reaktion gegenüber Wasser. Die Position der Plattform änderte sich während des Versuchs nicht, die Maus musste sich an den extern angebrachten Markierungen orientieren. Gelang dies in der vorgegebenen Zeit nicht, wurde ihr durch den Untersucher der

Weg gewiesen. Bei Erreichen der Plattform verblieb die Maus dort für 15 Sekunden. Die zum Erreichen der Plattform benötigte Zeit wurde in der Aquisitionsphase über neun Tage registriert. Bei Erreichen einer durchschnittlichen Latenz von 10 Sekunden bis zum Erreichen der Plattform wurde ein Transfer-Test, der sogenannte *probe-trial* durchgeführt: Die Plattform wurde aus dem Becken entfernt, anschließend wurde die Maus gegenüber der Plattform ins Wasser gesetzt und die Aufenthaltsdauer in den verschiedenen Quadranten registriert. Der Transfer-Test überprüft, ob es tatsächlich anhand der Markierungen zur Ausbildung einer räumlichen Landkarte kommt, mithin die Integrität des räumlichen Langzeitgedächtnisses.

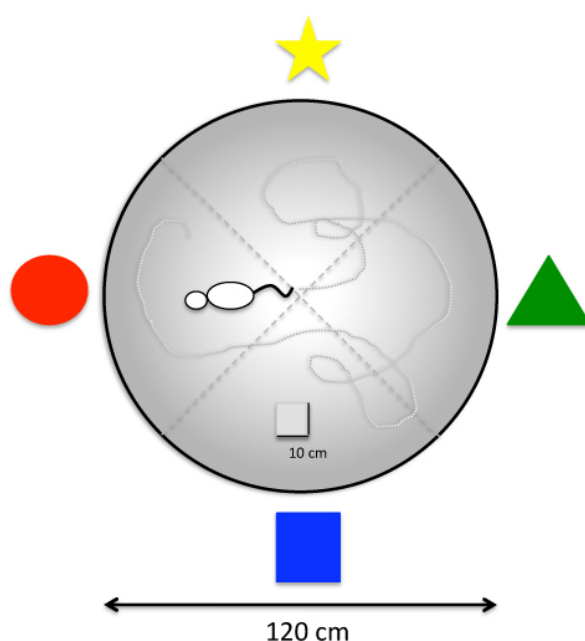


Abbildung 2.3: Schematische Darstellung des Morris-Wasserlabyrinths.

2.4 Statistische Analyse

Alle Analysen wurden mit der Software *Prism 4.0* (Graphpad Inc.) durchgeführt. Alle Daten wurden mit dem Zweistichproben t-Test analysiert. Die Ergebnisse werden als Mittelwert \pm Standardabweichung vom Mittelwert dargestellt, das Signifikanzniveau beträgt * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$.

3 Ergebnisse

3.1 Biochemie

3.1.1 Statistische Analysen

Die in dieser Arbeit verwendeten Ergebnisse wurden jeweils im Vergleich zu alters- und geschlechtsangepassten Kontrollen erhoben. Die Gruppen als Ganze wiesen keine statistisch signifikanten Unterschiede in den Kategorien Alter oder postmortales Intervall, das heißt vom Tod bis zur Kryokonservierung, auf.

3.1.2 Histon-Acetylierung

Messung der Histon-Acetylierung an regulatorisch wirksamen Lysin-Seitenketten an Histon3 und 4 mittels Western Blot

Acetylierungen an den untersuchten N-terminalen Amino-Gruppen an Lysin9 und 14 an Histon3 (H3K9, H3K14) sowie Lysin5, 8, 12 und 16 an Histon4 (H4K5, H4K8, H4K12 und H4K16) werden mit einer Aktivierung der Gentranskription assoziiert (Peterson und Laniel 2004). Zunächst wurde untersucht, ob sich das Genom in einem generellen Hyper- oder Hypoacetylierungsstatus befindet und ob einzelne Lysin-Seitenreste selektiv reguliert werden. Dadurch sollte die Frage nach einem möglichen spezifischen Muster der Veränderungen der Histon-Acetylierung beantwortet werden, das sich eventuell auch zu diagnostischen Zwecken oder zur Therapiekontrolle einsetzen ließe.

Im Vergleich der Histon-Acetylierung der Proben schizophrener Patienten mit den Kontrollen zeigte sich die Acetylierung an H4K8 und H4K12 im t-Test statistisch signifikant erhöht (H4K8 SZ $18,90 \pm 3,770$ n=14 vs. Ktr $11,77 \pm 0,8887$ n=20, p=0,0389; H4K12 SZ $18,07 \pm 1,570$ n=14 vs. Ktr $12,35 \pm 0,9199$ n=20, p=0,0021), die Acetylierung an H4K5 und H4K16 war ebenfalls tendenziell erhöht. Die Acetylierung an Histon3 war gegenüber den Kontrollen nur geringfügig verändert.

Die Gewebeproben von Patienten mit bipolarer Erkrankung wurden entsprechend den Proben

3.1 Biochemie

Schizophrener untersucht. Es fanden sich keine statistisch signifikanten Differenzen der Histon-Acetylierung (Siehe Abb. 3.1).

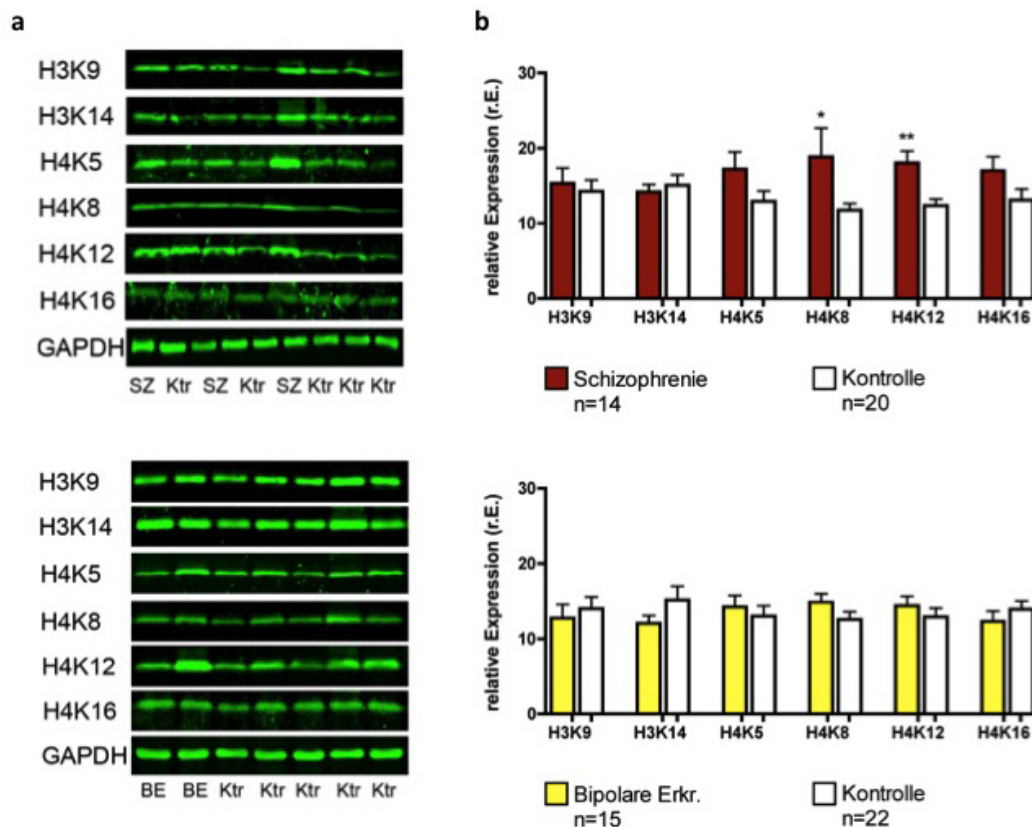


Abbildung 3.1: Semiquantitative Messung der Histon-Acetylierung (a) repräsentative Immunoblots der Histon-Acetylierung in Hirngewebeproben schizophrener Patienten (SZ) und nicht-psychisch erkrankter Kontrollen (Ktr) sowie bipolar erkrankter Patienten (BE) und Kontrollen wurden mit TX-Puffer lysiert. 20 μ g Zelllysate wurden mit dem Western-Blot-Verfahren aufgetrennt, anschließend wurden H3K9, H3K14, und H4K5, H4K8, H4K12 und H4K16 mit spezifischen Antikörpern markiert und mit dem *Odysee Infrared Scanner* detektiert. Die Ladungskontrolle erfolgte mit GAPDH. **(b)** Quantifizierung von (a): In den Gewebeproben Schizophrener zeigte sich eine statistisch signifikante Erhöhung der Acetylierung an H4K8 und H4K12 im Vergleich mit der Kontrollgruppe. In Gewebeproben bipolarer Patienten fand sich keine statistisch signifikante Erhöhung der Acetylierung, * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$ (r.E. = relative Einheiten).

Eine Subgruppenanalyse der Ergebnisse zeigte, dass die erhöhte Acetylierung in Schizophrenen insbesondere die Altersgruppe der <55 Jahre alten Patienten betrifft. In dieser Altersgruppe fand sich im Verhältnis zu altersangepassten gesunden Kontrollen eine statistisch sig-

3.1 Biochemie

nifkante Hyperacetylierung an H4K12 (SZ $19,64 \pm 2,573$ n=8 vs. Ktr $12,12 \pm 1,437$ n=9, $p=0,0189$). Die Acetylierung an Histon3 war auch unter besonderer Beachtung des Alters nicht speziell reguliert. Eine gesonderte statistische Auswertung in der Gruppe der <30jährigen, also dem primären Manifestationsalter der Schizophrenie, war aufgrund mangelnden Probenmaterials dieser Altersgruppe nicht möglich (Siehe Abb. 3.2).

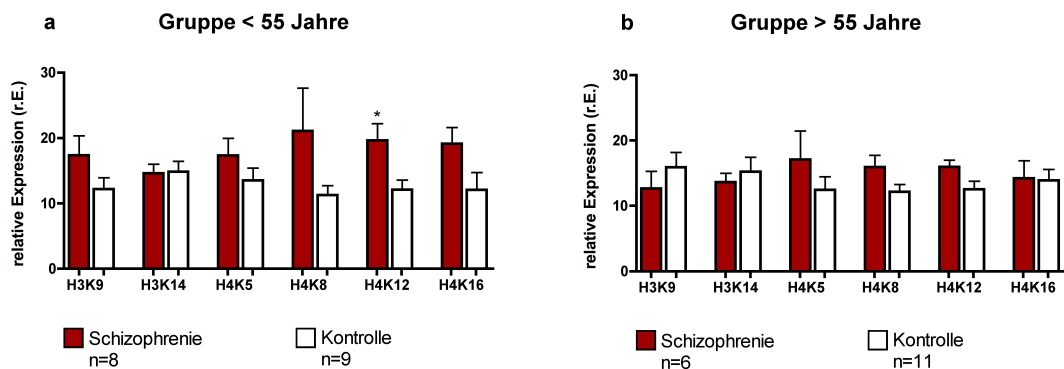


Abbildung 3.2: Semiquantitative Messung der Histon-Acetylierung Schizophrener verschiedener Altersgruppen (a) Eine Analyse der in Abb. 3.1 vorgestellten Daten in Hinblick auf das Alter der Patienten zeigte eine statistisch signifikante Hyperacetylierung an H4K12 im Vergleich zu altersangepassten Kontrollen in der Gruppe der <55 Jahre alten Patienten. (b) In der Gruppe der >55 Jahre alten Patienten fand sich keine signifikante Erhöhung der Histon-Acetylierung, $*p \leq 0,05$ (r.E. = relative Einheiten).

Semiquantitative Messung der Klasse I-Histon-Deacetylasen 1, 2 und 3 in Hirngewebe von Schizophrenen, bipolar Erkrankten sowie nicht-psychisch erkrankten Kontrollen mittels Western Blot

Im nächsten Schritt wurde untersucht, ob die in Schizophrenen beobachtete Hyperacetylierung durch eine veränderte Expression von Histon-Deacetylasen der Klasse I erklärbar ist. Zusätzlich wurde die Proteinexpression der Klasse I-HDAC in n=15 Proben bipolar Erkrankter gemessen. Dabei ließ sich sowohl zwischen Schizophrenen und Kontrollen als auch zwischen den Proben bipolar Erkrankter und denselben Kontrollen kein Unterschied der Genexpression der Klasse I-HDAC feststellen (Siehe Abb. 3.3).

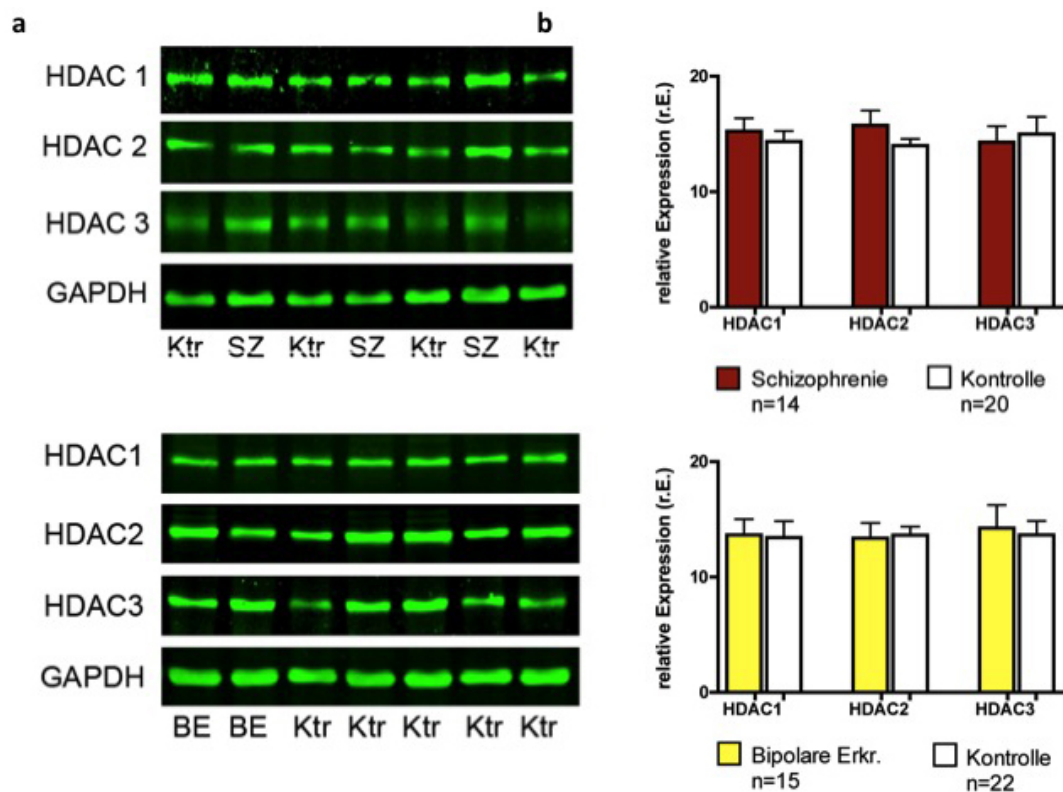


Abbildung 3.3: Semiquantitative Messung der Expression der Klasse I-HDAC 1, 2 und 3 (a) repräsentative Immunoblots der Klasse I-HDAC 1, 2 und 3. Hirngewebe von Schizophrenen (SZ), bipolaren Erkrankten (BE) und Kontrollen (Ktr) wurden mit TX-Puffer lysiert. 20 μ g Zelllysat wurden mit dem Western-Blot-Verfahren aufgetrennt, anschließend wurden HDAC 1, 2 und 3 mit spezifischen Antikörpern gefärbt und per Fluoreszenzdetektion quantifiziert. Die Ladungskontrolle erfolgte mit GAPDH. (b) Quantifizierung von (a): Auf Proteinebene findet sich kein Unterschied der Expression der Klasse I-HDAC 1, 2 und 3 (r.E. = relative Einheiten).

Messung der mRNA der Klasse I-Histon-Deacetylasen 1, 2 und 3

Zusätzlich wurden in denselben Proben die mRNA-Level der intranukleären Klasse I-HDAC 1-3 bestimmt. Die Untersuchungen ergaben eine statistisch signifikante Erhöhung der *hdac1* mRNA in den Proben schizophrener Patienten gegenüber der Kontrollgruppe ($3,364 \pm 0,9287$ n=9 vs $1,167 \pm 0,1478$ n=9, p=0,0328). Die Expression von *hdac2* und *hdac3* wies keine signifikante Veränderung gegenüber den Kontrollen auf (Siehe Abb. 3.4).

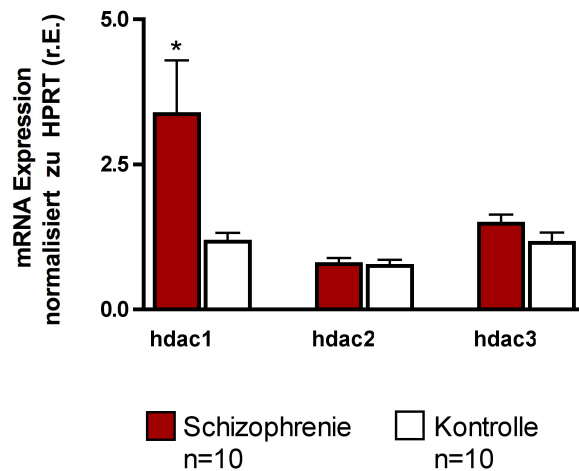


Abbildung 3.4: Die RT-PCR Analyse der Klasse I-HDAC ergab in Proben Schizophrener eine signifikante Erhöhung der HDAC1-mRNA. Für HDAC2 und 3 wurde kein Unterschied festgestellt, * $p \leq 0,05$ (r.E. = relative Einheiten).

3.1.3 DNA-Methylierung

Messung der mRNA des ionotropen AMPA-Glutamatrezeptors, Untereinheit GluR1, und des muskarinergen Acetylcholinrezeptors ChRM1

Die zur Untersuchung der Histon-Acetylierung verwendeten Lysate wurden durch Homogenisierung und Prozessierung ganzer Kortex-Biopsate erzeugt, daher spiegeln die gezeigten Ergebnisse den Acetylierungszustand des gesamten Genoms aller in der Probe des dorsolateralen präfrontalen Kortex befindlichen Zellen wider. Um festzustellen, ob es sich bei der gezeigten Veränderung um eine unspezifische reaktive Hyperacetylierung oder eine pathologische Hyperacetylierung im Bereich einzelner Gene oder Genpromotor handelt, waren weitere Untersuchungen notwendig, die epigenetische Veränderungen auf der Ebene einzelner Gene analysierten.

Zu Beginn wurde untersucht, ob die Expression zweier Gedächtnis-relevanter Proteine, der Untereinheit GluR1 des metabotropen AMPA-Glutamatrezeptors und des muskarinergen Acetylcholinrezeptors ChRM1, in den zur Verfügung stehenden Proben Schizophrener gegenüber den Kontrollen verändert war. Dafür wurde von elf männlichen Schizophrenen (46.50 ± 3.462 Jahre (31-80)) und elf nicht-psychisch erkrankten Kontrollpatienten (39.60 ± 2.286 Jahre (29-84)) mRNA isoliert und mittels RT-PCR verglichen. Die Ergebnisse wurden zu *hpri1* ins Verhältnis gesetzt. Dabei konnten in den Proben Schizophrener signifikant weniger *glur1*-mRNA nachgewiesen werden ($0,7167 \pm 0,07461$ n=11 vs. $1,143 \pm 0,09827$ n=11, relative Einheiten,

$p=0,0025$). In denselben Proben wurde außerdem eine signifikante Erniedrigung der *chrml*-mRNA-Level gefunden (0.6147 ± 0.09354 $n=11$ vs. 1.260 ± 0.1404 $n=11$, relative Einheiten, $p=0,0011$) (Siehe Abb. 3.5).

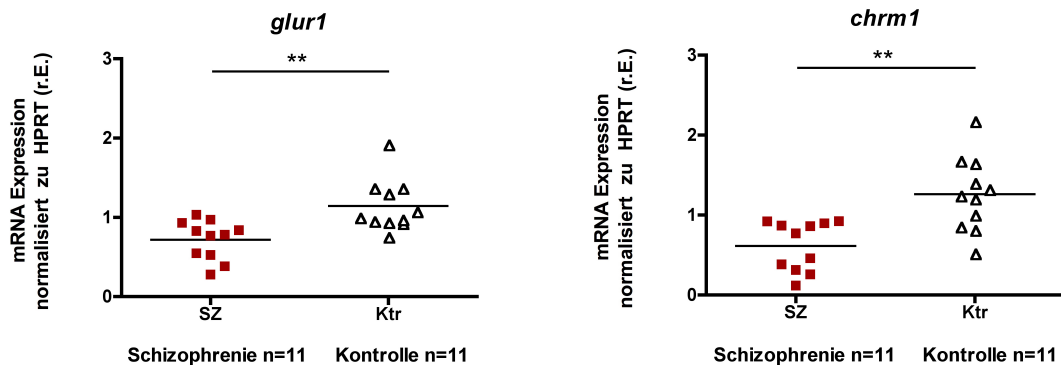


Abbildung 3.5: In Frontalhirngewebe Schizophrener (SZ) wurde mittels RT-PCR die Expression von *glur1* und *chrml* im Vergleich zu gesunden Kontrollen (Ktr) gemessen. Es zeigte sich eine signifikant verringerte Expression beider Rezeptoren. $**p \leq 0,01$ (r.E. = relative Einheiten).

3.1.4 DNA – Methylierung

Die zur Untersuchung der Histon-Acetylierung notwendige Technik der Chromatin-Immunopräzipitation (ChIP) war zum Zeitpunkt der Arbeit für humanes postmortal gewonnenes Gewebe nicht verfügbar. Daher wurden die Promotoren der Gene *chrml* und *glur1* mit der im Labor etablierten Methode der methylierte DNA-Immunopräzipitation (MeDIP) untersucht. Dabei wurden die zugehörigen Promotoren auf eine Veränderung in der Methylierung der Cytosin-Guanin-Sequenzen untersucht, wobei eine Zunahme der Methylierung mit einer Inaktivierung der Genexpression in Zusammenhang gebracht wird (Levenson und Sweatt 2005).

Analyse der Promotoren

Die Analyse der Promotorsequenzen der beiden Rezeptoren mit *MethPrimer* ergab für *chrml* eine CpG-Insel im regulatorisch wirksamen Bereich oberhalb des Transkriptionsstarts. Obwohl die Primer eine Sequenz etwa 100 bp abwärts (in 3' Richtung) der CpG-Insel amplifizieren, findet sich auch in diesem Bereich eine höherer Anteil von CpG-Sequenzen als im Durchschnitt des Genoms. Zudem erzeugt der *shearing*-Prozess DNA-Abschnitte von 300-500 bp Länge, sodass davon ausgegangen werden kann, dass die Bindung transkriptionsregulierender Proteine an diesen Genpromotern durch DNA-Methylierung beeinflusst wird, und

dass die Primer sensitiv für eine Veränderung der Methylierung in diesem DNA-Bereich sind. Für *glur1* hingegen wurde in dem untersuchten Bereich keine erhöhte Konzentration von CpG-Sequenzen gefunden, daher ist eine direkte Kontrolle der Transkription durch Veränderung der DNA-Methylierung des *glur1*-Gens unwahrscheinlich. Es ist allerdings bekannt, dass durch Schleifenbildung auch DNA-Bereiche mehrere kbp von dem eigentlichen Promotor entfernt Einfluss auf die Transkriptionskontrolle haben. Daher ist eine epigenetische Regulation dieses Promotors durch DNA-Methylierung möglich, sie ist durch diesen Ansatz aber nicht zu untersuchen.

MeDIP der CpG-Insel im Bereich des *chrm1*-Promotors

Aus fünf altersangepassten Proben Schizophrener (SZ $46,60 \pm 4,611$ Jahre (35-63)) und fünf Proben nicht-psychisch erkrankter Kontrollen (Ktr $43,80 \pm 6,719$ Jahre (29-67)) wurde DNA isoliert. Dabei wurde die Integrität der extrahierten DNA mittels Spektralphotometrie überprüft. Der mRNA-Gehalt aus dem Bereich des *chrm1*-Promotors wurde (nach Fällung mit einem Antikörper gegen 5mC der durch *shearing* erhaltenen DNA-Abschnitte) mit spezifischen Primern gegen eine DNA-Sequenz aus dem Bereich der CpG-Insel amplifiziert. Das PCR-Ergebnis wurde durch Agarosegel-Elektrophorese sichtbar gemacht. Die Intensität der Banden wurde zu ebenfalls amplifizierten Input-Kontrollen derselben Proben ins Verhältnis gesetzt, Differenzen in den Quotienten wurden als Unterschiede in der Menge der durch den 5mC-Antikörper markierten DNA gewertet. Dabei wurde in der Kontrollgruppe signifikant mehr DNA als in den Proben Schizophrener amplifiziert. Dies lässt den Schluss zu, dass die CpG-Insel stromaufwärts des *chrm1*-Promotors in der Gruppe der Schizophrenen gegenüber der Kontrollgruppe signifikant hypomethyliert ist (SZ $0,8705 \pm 0,02209$ vs Ktr $0,9750 \pm 0,02591$, $p=0,0154$). Damit ist ein Hinweis auf eine epigenetische Regulation durch DNA-Methylierung des muskarinergen Acetylcholinrezeptors ChRM1 gegeben (Siehe Abb. 3.6).

3.2 Verhaltensversuche

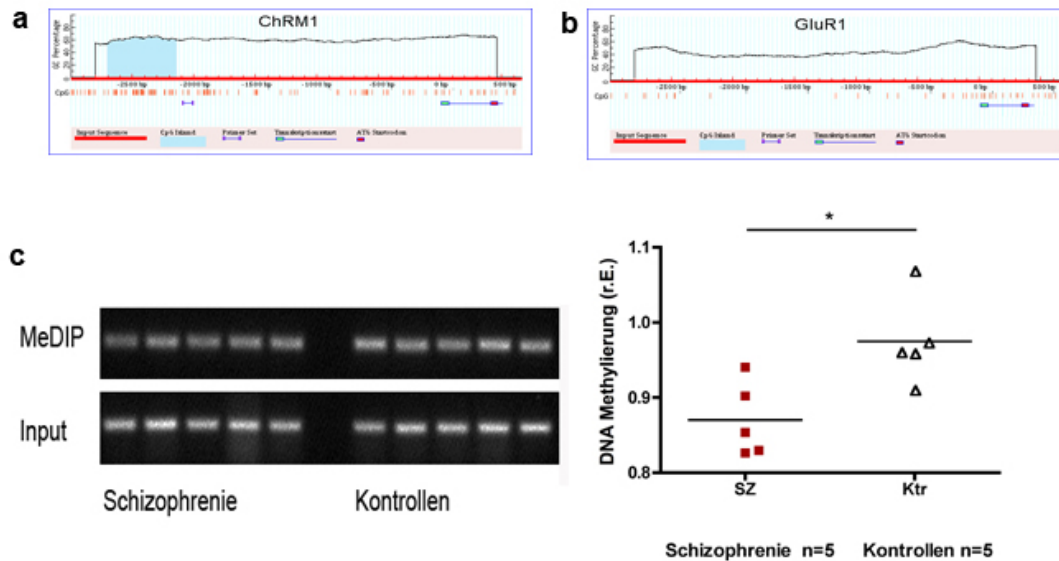


Abbildung 3.6: Hypomethylierung der regulatorischen Region vor dem *chrm1*-Gen (a) Nach Analyse der Promotor Sequenz laut Promotor Database durch *MethPrimer* fand sich eine CpG-Inselle im Bereich des *chrm1*-Promotors ca. 2150-2700 bp aufwärts des Transkriptionsstarts. **(b)** Der *glur1*-Promotor weist keine CpG-Insellen auf. Gewertet wurden Bereiche >400 bp mit einem CG-Gehalt >60 %. **(c)** Nach Fällung mit einem Antikörper gegen methylierte Cytosinbasen (anti-5mC) und Amplifikation der gewonnenen DNA-Abschnitte mit konventioneller PCR (MeDIP) konnte im Verhältnis zu nicht per Antikörper selektierter DNA (input) in den Proben Schizophrener (SZ) signifikant weniger DNA aus dem Bereich der *chrm1*-CpG-Inselle nachgewiesen werden als in altersangepassten Kontrollen (Ktr). * $p \leq 0,05$ (r.E. = relative Einheiten).

3.2 Verhaltensversuche

In den vorangegangenen Kapiteln wurden Belege für eine Deregulation gedächtnisbildender Proteine in Patienten mit Schizophrenie gezeigt sowie mögliche epigenetische Mechanismen, die an dieser Deregulation beteiligt sein könnten. Da es sich bei den biochemischen Untersuchungen an postmortalem Gewebe um eine Endpunktstudie handelt, wollten wir den Zusammenhang von Epigenetik und Gedächtnisbildung im Tierversuch prospektiv erforschen. Ein Zusammenhang von Langzeitgedächtnisbildung und posttranslationaler Histonmodifikation beziehungsweise dem Einsatz von HDAC-Inhibitoren ist bekannt (Levenson et al. 2004; Fischer et al. 2007). Im nächsten Schritt sollen zwei epigenetische Mechanismen in ihrem Einfluss auf das Arbeitsgedächtnis untersucht werden.

3.2.1 Etablierung des Y-Labyrinths zur Überprüfung des ortsabhängigen Arbeitsgedächtnisses

Das Y-Labyrinth wurde nach dem Modell und Protokoll des *spontaneous spatial novelty preference test* nach Bannerman et al. (2008) konzipiert und war zuvor im Labor Fischer nicht etabliert. In der ersten Phase des Tests waren der Maus nur zwei Arme des Y-förmigen Versuchsapparates zugänglich, nach einem kurzen Intervall außerhalb des Apparats wurde der dritte Arm eröffnet. Da vor dem eigentlichen Test keine Habitierungsphase an den Versuchsapparat vorgesehen war, stellte sich die geringe Explorationsfreude der Tiere als Problem dar, messbar an der total zurückgelegten Strecke, der Anzahl der Besuche im „anderen“ und im „neuen“ Arm sowie dem Anteil der Testphase, den die Maus ausschließlich im Startarm verbrachte.

Zunächst wurde versucht, den durch den Versuchsablauf produzierten Stress zu reduzieren, indem das *intertrial*-Intervall im eigenen Käfig zwischen den beiden Phasen des Tests von einer auf zwei Minuten verlängert wurde. Diese Maßnahme führte zu einer leichten Steigerung der Besuche in den Armen, der Effekt auf die anderen Parameter war weniger ausgeprägt.

Um den durch die Testsituation entstehenden Stress weiter zu verringern wurde versucht, die Tiere vor Versuchsbeginn an das Handling durch den Untersucher zu gewöhnen. Nach Bevins und Besheer (2006) sollte das Versuchstier für mindestens drei Tage an den Untersucher und die Transportprozedur gewöhnt werden. Durch diese Maßnahme konnte eine signifikante Steigerung der Explorationsfreude erzielt werden (Siehe Abb. 3.7).

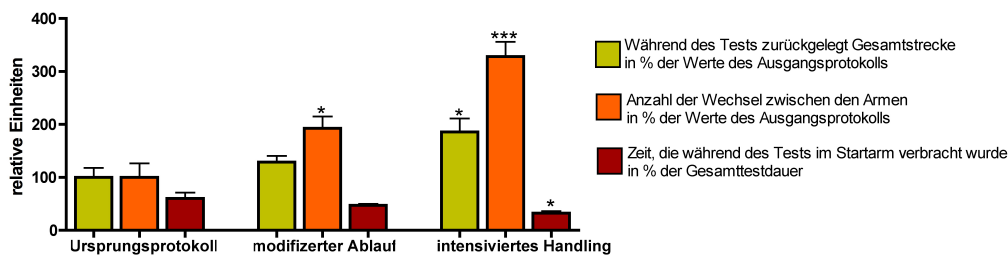


Abbildung 3.7: Steigerung der Explorationsfreude im Y-Labyrinth Durch Verlängerung des *intertrial*-Intervalls und Umbau des Apparats konnte eine signifikante Erhöhung der Besuchszahl in den Armen erreicht werden (modifizierter Ablauf). Durch Gewöhnung an den Untersuchungsstress vor dem Test wurde eine signifikante Steigerung bzw. Reduktion aller Parameter erreicht (intensiviertes Handling). Signifikanz wird im Bezug auf die jeweiligen Ausgangswerte angegeben, * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,001$

3.2.2 Vergleich des Einflusses chronischer Applikation der HDAC-Inhibitoren Sodiumbutyrat und Phenylbutyrat auf das objektabhängige Langzeitgedächtnis im Objekterkennungstest und das räumliche Arbeitsgedächtnis im Y-Labyrinth

Aus der Krebsforschung sind die kurzkettigen Fettsäuren Sodiumbutyrat und Phenylbutyrat schon seit den 1980er Jahren als Inhibitoren von Histon-Deacetylasen bekannt (Kruh 1982). Eine intraperitoneale Applikation ist geeignet, Effekte im ZNS auszulösen (Levenson et al. 2004; Fischer et al. 2007). Der Objekterkennungstest wurde nach dem in der Arbeitsgruppe etablierten Protokoll durchgeführt und entspricht weitgehend dem Protokoll von Silvers et al. (2007). Da neben den Objekten auch eine räumliche Komponente besteht wird in diesem Versuch Kortex- aber auch Hippocampus-abhängige Gedächtnisfunktion getestet (Brown und Aggleton 2001).

25 C57 Black6J-Mäuse wurden in drei Gruppen geteilt. Gruppe 1 (n=7) erhielt täglich über drei Wochen eine intraperitoneale (i.p.) Injektion mit 30 mg Sodiumbutyrat (1,2 g/kg Körpergewicht (Fischer et al. 2007)) in 200 μ l ultrafiltriertem NaCl 0,9 % (SB). Gruppe 2 erhielt 5 mg Phenylbutyrat (200 mg/kg Körpergewicht (Ryu et al. 2005)) in 200 μ l NaCl 0,9 % (PB), die Kontrollgruppe erhielt einmal täglich 200 μ l NaCl 0,9 % (Ktr). An Tag 15 wurde mit der Habituation begonnen. An fünf aufeinanderfolgenden Tagen wurden die Versuchstiere an den leeren Versuchsapparat gewöhnt, anschließend wurden sie an zwei aufeinanderfolgenden Tagen mit zwei identischen Objekten trainiert. Der Test erfolgte an Tag 22. Die Ergebnisse werden als Diskriminationsindex $DI = (n_{eu} - b_{ekannt}) / (n_{eu} + b_{ekannt})$ dargestellt. Ein Wert von >0 indiziert Präferenz für das neue Objekt, ein $DI = 0$ zeigt ein gleichmäßiges Interesse an den beiden präsentierten Objekten.

Während des Trainings zeigte keine der Gruppen eine Präferenz für eines der Objekte. In der Testphase hingegen zeigten alle drei Gruppen eine statistisch signifikante Präferenz für das unbekannte Objekt verglichen mit dem Ausgangswert aus der Trainingsphase. Zwischen den Gruppen bestand kein Unterschied in der Präferenz für das neue Objekt (DI SB:0,50 vs. 0,02; PB:0,58 vs. 0,00; Ktr:0,57 vs. 0,14). Die Berechnung des DI anhand der Anzahl der Kontakte des Versuchstiers mit den Objekten ergab geringfügig veränderte Werte, die aber in der Tendenz mit den oben genannten Werten übereinstimmen. Damit kann in allen drei Gruppen eine stabile Funktion des Langzeitgedächtnisses angenommen werden.

Zusammengefasst konnte durch Zugabe eines Histon-Deacetylase-Inhibitors in therapeutischer Dosis in gesunden Versuchstieren keine Steigerung der Diskriminationsfähigkeit gegenüber der Placebo Kontrolle erreicht werden. Ein Effizienzunterschied in der Steigerung der Lang-

3.2 Verhaltensversuche

zeitgedächtnis-Leistung zwischen den HDACi Sodiumbutytrat und Phenylbutytrat konnte nicht beobachtet werden (Siehe Abb. 3.8).

Der Y-Labyrinth-Test zur Überprüfung des deklarativen ortsbezogenen Arbeitsgedächtnisses wurde an Tag 25 durchgeführt, die täglichen Injektionen wurden fortgeführt. In der Testphase zeigten alle drei Gruppen eine Präferenz für den zuvor nicht zugänglichen Teil des Apparats (DI: SB 0,23; PB 0,26, Ktr 0,38). Mit Ausnahme der SB-injizierten Gruppe waren die Ergebnisse signifikant gegenüber der Nullhypothese $DI=0$. Zwischen den Gruppen bestanden keine signifikanten Unterschiede. Die Auswertung der Anzahl der Besuche in den einzelnen Armen zeigte keine Präferenz für den neuen Arm an. Im Zusammenhang betrachtet kann man daraus schließen, dass die Dauer der Besuche im neuen Arm verglichen mit den Besuchen im bekannten Arm im Durchschnitt länger waren. Die Aussagekraft dieses Parameters ist damit in Frage zu stellen.

Die chronische Applikation der HDAC-Inhibitoren Sodiumbutytrat oder Phenylbutytrat führte in gesunden Versuchstieren nicht zu einer verbesserten Arbeitsgedächtnisleistung im Y-Labyrinth-Versuch. Weiterhin konnte auch in diesem Versuch kein Unterschied in der Wirkung der beiden Präparate festgestellt werden (Siehe Abb. 3.8).

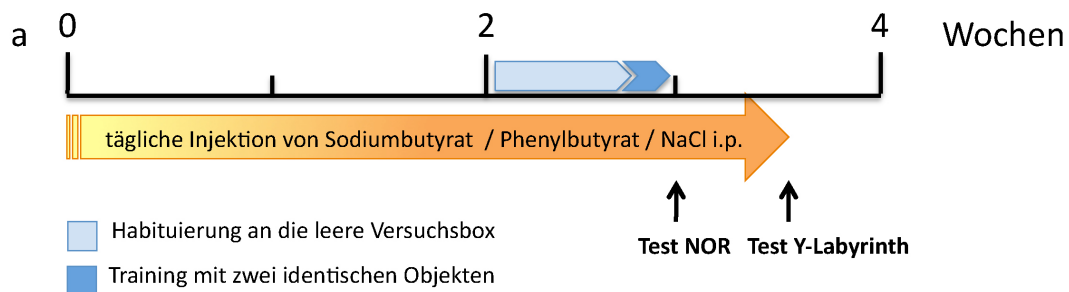


Abbildung 3.8: Chronische Applikation der HDAC-Inhibitoren Sodiumbutytrat (SB) oder Phenylbutytrat (PB) führt nicht zu veränderten Leistungen im Objekterkennungstest (NOR) oder im Y-Labyrinth (a) Zeitlicher Ablauf des Experiments.

3.2 Verhaltensversuche

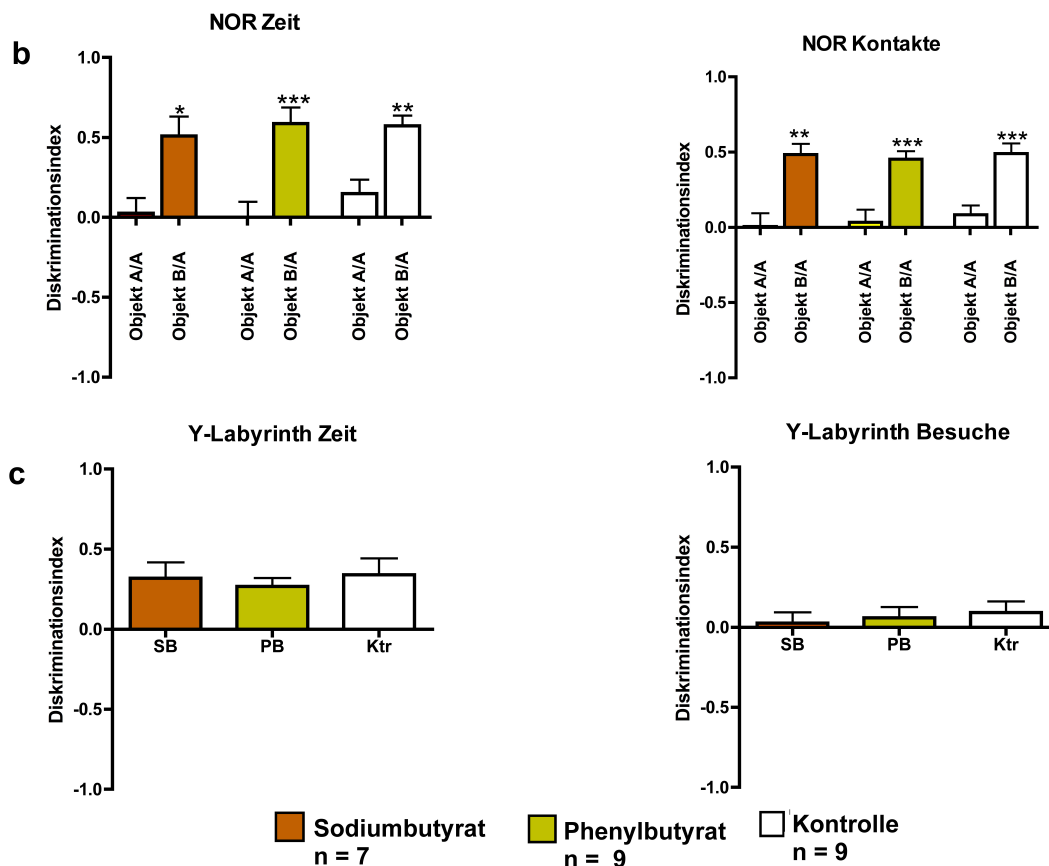


Abbildung 3.8: (b) Während der Trainingsphase des NOR wurden die identischen Objekte gleichmäßig erkundet (Objekt A/A), in der Testphase zeigten alle Gruppen eine Präferenz für das unbekannte Objekt (Objekt B/A), die Unterschiede zwischen Trainings- und Testphase waren in allen Gruppen signifikant (A/A zu B/A). Ein Unterschied in der Langzeitgedächtnisfunktion war nicht feststellbar. (c) Im Y-Labyrinth zeigten alle Gruppen eine Präferenz für den neuen Arm gegenüber dem unbekanntem Arm. Gemessen an der Dauer des Aufenthalts sind die Unterschiede für die Gruppen PB und Ktr signifikant gegenüber der Nullhypothese. Eine Veränderung des räumlichen Kurzzeitgedächtnisses durch HDAC-Inhibitoren war nicht nachweisbar. Diskriminationsindex $DI = (n_{eu} - b_{ekannt}) / (n_{eu} + b_{ekannt})$, ein $DI > 0$ zeigt eine Präferenz für den neuen Stimulus, $*p \leq 0,05$, $**p \leq 0,01$, $***p \leq 0,001$

3.2.3 Einfluss chronischer L-Methionin-Applikation auf das objektbezogene Arbeits- und Langzeitgedächtnis im Objekterkennungstest und auf räumliches Lernen und Langzeitgedächtnis im Morris-Wasserlabyrinth

In gesunden Tieren konnte durch die chronische Applikation der HDAC-Inhibitoren Sodiumbutyrat oder Phenylbutyrat in orts- und objektbezogenen Tests keine Steigerung der Langzeit- und Arbeitsgedächtnisleistung nachgewiesen werden. Daher wurde im nächsten Experiment

versucht, ein medikamentös induziertes Mausmodell für DNA-Hypermethylierung zu generieren. Dieses Modell sollte auf Veränderungen im Arbeitsgedächtnis sowie auf einen möglichen protektiven Effekt von HDACi getestet werden. Zu diesem Zweck wurde ein in der Arbeitsgruppe um E.Costa entwickeltes Modell der chronischen L-Methionin Applikation repliziert (Dong et al. 2005).

Zur Charakterisierung der Gedächtnisfunktion dieses Mausmodells entschieden wir uns, die im Labor etablierten Verhaltenstests NOR und Morris-Wasserlabyrinth (MWM) einzusetzen. Zu diesem Zweck wurde das Arbeitsgedächtnis in einer modifizierten Version des NOR getestet, die keine Trainingsphase mit den identischen Objekten vor dem Test vorsah. Das objektabhängige Langzeitgedächtnis wurde in einem Transfer-Test 24 Stunden später mit einem dritten unbekanntem Objekt überprüft. Das MWM erlaubt, den Einfluss chronischer Methioningabe über einen längeren Zeitraum auf die Lernkurve der Versuchstiere zu untersuchen. Mit dem Transfer-Test bestand eine Möglichkeit, die Ergebnisse der Langzeitgedächtnismessung in einem veränderten, ortsabhängigen Kontext zu überprüfen.

21 Wildtyp-Mäuse wurden in drei Gruppen eingeteilt: Gruppe 1 erhielt zweimal täglich eine Injektion mit 17,5 mg L-Methionin (700 mg / kg KG) in 375 μ l ultrafiltriertem NaCl 0,9 % intraperitoneal (M), Gruppe zwei erhielt täglich zwei Injektionen L-Methionin in derselben Konzentration und zusätzlich Natriumbutyrat in der Konzentration 1,2 mg / kg KG (M+SB). Die Kontrollgruppe erhielt zwei Injektionen NaCl 0,9 % (Ktr) (Siehe Abb. 3.9).

In Phase 1 des Tests wurde keinerlei Präferenz für eines der identischen Objekte beobachtet. In Phase 2 zeigte jede Gruppe eine Präferenz für das unbekannte Objekt. Der beobachtete Unterschied ist in keiner der Gruppen signifikant, weder in der Auswertung der mit den Objekten verbrachten Zeit noch in der Auswertung der Kontakte, zeigt aber eine deutliche Tendenz. Die relative Stärke der Präferenz wurde als Diskriminationsindex DI dargestellt. Zwischen den Gruppen ließ sich keine Veränderung in der Stärke der Diskrimination erheben (DI M: 0,02 vs. 0,34; M+SB: 0,05 vs. 0,35; Ktr: 0,02 vs. 0,34). Damit konnte durch zweimal tägliche Injektion von L-Methionin keine Veränderung der Arbeitsgedächtnisleistung im Vergleich zur Kontrollgruppe festgestellt werden. Auch die zusätzliche Gabe des HDAC-Inhibitors Natriumbutyrat in therapeutischer Dosis rief keine messbare Veränderung hervor (Siehe Abb. 3.9).

24 Stunden später wurden die Tiere auf Veränderungen in der Ausbildung von Langzeitgedächtnisinhalten in einem weiteren NOR-Test untersucht. Die Versuchstiere mussten ohne erneutes Training zwischen einem der identischen Objekte und einem dritten vollständig unbekanntem Objekt unterscheiden, sie sollten sich also an das vor 24 Stunden erstmals gesehene

3.2 Verhaltensversuche

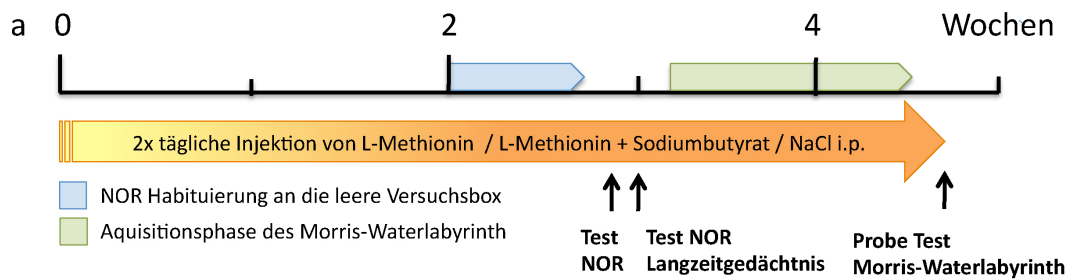


Abbildung 3.9: Chronische Applikation von L-Methionin (M) oder L-Methionin und Sodiumbutyrat (M+SB) führt nicht zu veränderten Arbeits- und Langzeitgedächtnisleistungen im Objekterkennungstest (NOR) oder im Morris-Wasserlabyrinth (MWM) (a) Zeitlicher Ablauf des Experiments.

Objekt erinnern. Die Ergebnisse wurden ins Verhältnis gesetzt zu den Ergebnissen aus Phase 1 vom Vortag, in der zwei identische Objekte angeboten wurden. In diesem Teil des Experiments konnte in keiner der experimentellen Gruppen eine statistisch signifikante Präferenz für das unbekannte Objekt festgestellt werden (Siehe Abb. 3.9).

Im Morris-Wasserlabyrinth wurde beobachtet, wie rasch die Versuchstiere erlernen, sich an externen Objekten zu orientieren, um schwimmend eine unter der Wasseroberfläche versteckte Plattform zu erreichen. Die Injektionen wurden während des MWM fortgesetzt. In der Aquisitionsphase konnte in allen drei Gruppen eine vergleichbare Lernkurve gemessen werden. Die tägliche Gabe von L-Methionin über einen Zeitraum von vier Wochen führte nicht zu einem veränderten Erwerb von ortsbezogenen Lerninhalten. Ebenso wenig konnte ein Einfluss durch die zusätzliche Gabe von Sodiumbutyrat gemessen werden. An Tag 33 wurde der Transfer-Test durchgeführt. Nachdem die Plattform aus dem Wasser entfernt worden war wurde für 60 Sekunden der Aufenthalt in den virtuellen vier Quadranten des MWM aufgezeichnet. In diesem Test zeigten alle Gruppen eine Präferenz für den Quadranten, in dem sich die Plattform zuvor befunden hatte.

Es bestanden keine signifikanten Unterschiede zwischen den experimentellen Gruppen. Damit kann angenommen werden, dass die täglichen L-Methionin Injektionen nicht zu Veränderungen im deklarativen, ortsabhängigen Langzeitgedächtnis führten (Siehe Abb. 3.9).

3.2 Verhaltensversuche

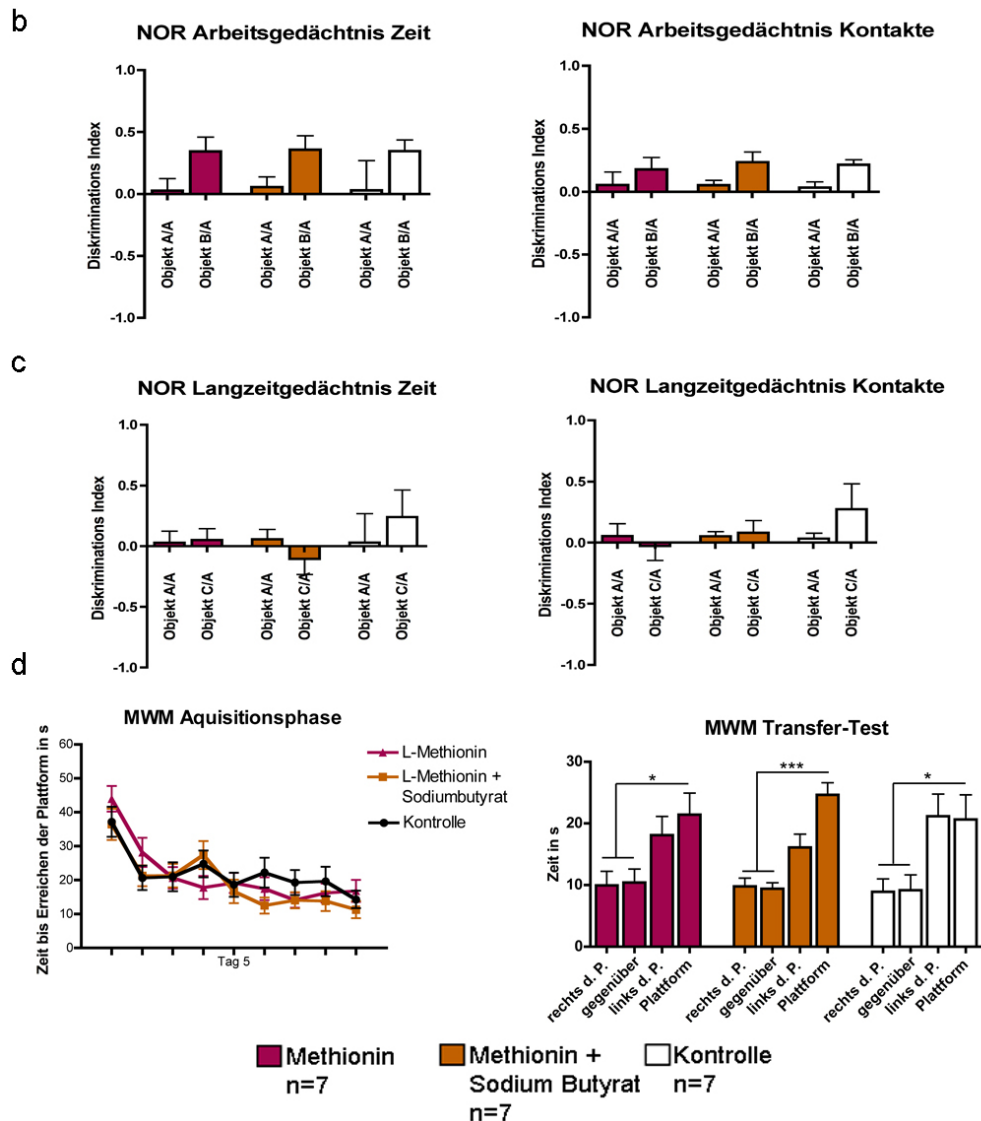


Abbildung 3.9: (b) In Phase 1 des NOR war keine Präferenz für eines der identischen Objekte messbar (Objekt A/A), in Phase 2 des Tests zeigten alle Gruppen eine Präferenz für das unbekannte Objekt (Objekt B/A). Ein Unterschied im deklarativen Kurzzeitgedächtnis konnte nicht nachweisen werden. (c) Im Transfer-Test des NOR war in keiner der Gruppen eine eindeutige Präferenz für das neue Objekt nachzuweisen (Objekt A/C), nur die Kontrollgruppe zeigte eine Tendenz zu verbesserter objektabhängiger Langzeiterinnerung. (d) Im MWM bestand zwischen den experimentellen Gruppen kein Unterschied im räumlichen Lernen. Im Transfer-Test war kein Unterschied in der räumlichen Langzeiterinnerung feststellbar. Diskriminationsindex $DI = (n_{neu} - b_{bekannt}) / (n_{neu} + b_{bekannt})$, ein $DI > 0$ zeigt eine Präferenz für den neuen Stimulus.

4 Diskussion

4.1 Histon-Acetylierung im präfrontalen Kortex Schizophrener

4.1.1 Histon-Acetylierung

Initial wurde eine statistisch signifikante Erhöhung der Acetylierung an Histon4 Lysin8 (H4K8) und Histon4 Lysin 12 (H4K12) in der Gruppe der Schizophrenen festgestellt, während sich die Acetylierung in der bipolaren Gruppe nicht von den Kontrollen unterschied. Es muss beachtet werden, dass Histon-Markierungen in postmortalem Gewebe erhalten bleiben (Stadler et al. 2005). Die Untersuchungsergebnisse zur Histon-Acetylierung widersprechen damit den Daten, die durch Akbarian et al. (2005) an vergleichbaren Patientenproben erhoben wurden. Hier konnte kein Unterschied in der Acetylierung an H3K9/14, H4K8 und H4K12 festgestellt werden. Eine neuere Untersuchung hat die Acetylierung an H3K9/K14 an einzelnen Promotoren untersucht. Hier wurde in Gesunden und bipolar Erkrankten eine Abnahme der Histon3-Acetylierung mit zunehmendem Alter beobachtet, eine Korrelation, die so in Schizophrenen nicht auftrat. Dies führte stattdessen zu einer signifikanten Hypoacetylierung in jungen Schizophrenen, assoziiert mit reduzierter Genexpression (Tang et al. 2011). Eine nach Alter gestaffelte Subgruppen-Analyse der in dieser Arbeit erhobenen Daten ergab, dass sich die beobachtete Hyperacetylierung an Histon4 hingegen auf eine gesteigerte Acetylierung in jüngeren Patienten zurückführen lässt (<55 Jahre). Eine Veränderung der Histon3-Acetylierung wurde auch in der Subgruppen-Analyse nicht gefunden. Möglicherweise in Zusammenhang mit diesem Befund altersabhängiger Hyperacetylierung stehen Erkenntnisse aus der Arbeitsgruppe Fischer, die fehlende Histon-Acetylierung an H4K12 in gealterten Mäusen mit Verschlechterung in Lernversuchen assoziierten (Peleg et al. 2010). Man könnte also spekulieren, dass es sich um eine kompensatorische Hyperacetylierung handelt.

Es wurden mehrere Studien zur Histon-Acetylierung in Lymphozyten schizophrener Patienten durchgeführt, die den Einfluss von HDAC-Inhibition durch Valproat *in vivo* und anderer Inhibitoren *in vitro* feststellen sollten. Vor Beginn der medikamentösen Intervention war die Histon3-Acetylierung in Schizophrenen im Vergleich zu einer Gruppe bipolar Erkrankter

erniedrigt, der Unterschied war nicht signifikant. Die Histon4-Acetylierung zeigte keinen Unterschied. Die vierwöchige Gabe von Valproat resultierte in einer signifikanten Zunahme der Histon3- und Histon4-Acetylierung in beiden Gruppen, prozentual zum Ausgangswert war der Anstieg in der bipolaren Gruppe stärker (Sharma et al. 2006). In einer *In vitro-Studie* wurde derselbe Effekt im Vergleich von Lymphozyten Schizophrener mit gesunden Kontrollen unter Einsatz des HDACi Trichostatin (TSA) erzielt: Schizophrene zeigten eine erniedrigte Histon3-Acetylierung zu Beginn und einen geringeren Anstieg unter TSA (Gavin et al. 2008). Dieselbe Arbeitsgruppe zeigte außerdem eine Erhöhung des restriktiven Parameters dimethyliertes Histon3 an Lysin9 (Gavin et al. 2009). Diese Untersuchungen zeigen also eher eine Tendenz zu Hypoacetylierung, die sich in jüngeren und nicht-therapierten Patientengruppen manifestiert. Es zeigt sich außerdem ein insgesamt weniger reaktives Chromatin.

Die oben beschriebenen Arbeiten legen einen Medikamenteneinfluss nahe. Die bisherigen Erkenntnisse zum Einfluss von Psychopharmaka auf die Histon-Acetylierung sind gering. Haloperidol führte in einer Studie zu einem signifikanten Anstieg der Phospho-Acetylierung an Histon3, der prozentuale Effekt auf die reine Histon3-Acetylierung war dagegen kaum messbar (Li et al. 2004). Eine weitere Studie, die den Effekt von Haloperidol und Risperidon auf die Histon-Methylierung und Phospho-Acetylierung maß, blieb ohne Nachweis von Änderungen (Akbarian et al. 2005). Eine weitere Studie konnte einen geringen dosisabhängigen Anstieg der Histon3-Acetylierung unter Clozapin und Sulpirid, nicht jedoch unter Haloperidol und Olanzapin, beobachten. Interessanterweise konnte hier allerdings durch die adjuvante Gabe von Valproat ein synergistischer Effekt auf die Histon3-Acetylierung erreicht werden (Dong et al. 2008).

4.1.2 Einschränkungen

Bei der Frage nach der Bedeutung der erhöhten Acetylierung an Histon4 muss beachtet werden, dass die in dieser Arbeit gezeigten Ergebnisse an Lysaten erhoben wurden, die nicht zellspezifisch sind, sondern alle in diesem Kortexabschnitt enthaltenen Zellen repräsentieren. Die Arbeit an durch Mikrodissektion gewonnenen Proben hat dagegen gezeigt, dass die epigenetischen Veränderungen in Schizophrenen zell- und sogar kortexschichtspezifisch sind. Ebenso sind nicht alle Bereiche des Genoms betroffen, sondern im Gegenteil nur einzelne Gene und zugehörige Promotor-Bereiche involviert. Die Tatsache, dass trotz der unselektiven Untersuchungsmethode im Western Blot signifikante Unterschiede nachgewiesen wurde spricht für

dramatische Veränderungen. Die Ergebnisse weisen im Gegensatz zur Theorie einer verminderten Aktivierung des DLPFC Schizophrener eher auf eine langfristige Steigerung der Aktivierung hin, sie sagen aber nichts über die Acetylierung an einzelnen Promotoren aus. Die Bewertung der Ergebnisse muss weiterhin unter der Einschränkung gesehen werden, dass die medikamentöse Historie der verwendeten Proben nicht evaluiert werden konnte.

Eine Fortführung der hier begonnenen Charakterisierung der Veränderung der Histon-Acetylierung in Schizophrenen und bipolar Erkrankten müsste diese Einschränkungen berücksichtigen und gezielt Acetylierungsmuster an einzelnen Promotoren untersuchen. Interessant wäre ebenfalls, die Ergebnisse mit Proben aus nicht Arbeitsgedächtnis-relevanten Hirnarealen zu vergleichen.

4.1.3 HDAC1

Im Vergleich der Expression von Klasse I-Histon-Deacetylasen 1-3 (HDAC1-3) zeigte sich eine erhöhte Expression von *hdac1*-mRNA im DLPFC Schizophrener. Mittels Western Blot wurde festgestellt, dass die Überexpression von *hdac1*-mRNA nicht zu erhöhten HDAC1-Proteinlevel führt. Damit besteht eine Dissoziation zwischen den Ergebnissen der RT-PCR und der Western Blot-Analyse.

Die in dieser Arbeit gezeigte *hdac1*-mRNA-Erhöhung ist kongruent mit einer Auswertung von Microarray-Daten, erhoben an Proben von n=16 Schizophrenen und n=27 Kontrollen, die ebenfalls aus der National Brain Databank des *Harvard Brain Tissue Resource Center* stammen, und einer RT-PCR-Studie an einer australischen Kohorte (Narayan et al. 2008). Hier wurde entsprechend eine signifikante Erhöhung der *hdac1*-mRNA in Schizophrenen gegenüber Kontrollen festgestellt, die Werte für *hdac2* und *hdac3* zeigten keine Veränderung (Sharma et al. 2008). Auch eine Untersuchung der *hdac1*-Expression im Hippocampus Schizophrener zeigte eine Überexpression (Benes et al. 2007). Vergleichswerte zur HDAC1-Protein-Expression waren nicht verfügbar.

Der Nutzen von HDAC-Inhibitoren für Gedächtnisfunktionen konnte mehrfach gezeigt werden (Levenson et al. 2004; Fischer et al. 2007). In Bezug auf HDAC1 im Speziellen führte die Hemmung einer Signaltransduktionskette, die HDAC1 involviert, zu einer Deacetylierung an H3K14 und H4K5 und zu verbesserter Langzeitgedächtnisfunktion (Koshibu et al. 2009). Unpublizierte Daten aus dem Labor Fischer zeigen, dass eine selektive Überexpression mittels

4.2 Erniedrigte Expression von GluR1 und ChRM1 in Hirngewebeproben schizophrener Patienten

viralen Vektors von HDAC1 im PFC, nicht aber im Hippocampus (Bahari-Javan et al. 2012), zu einer Verschlechterung in Arbeitsgedächtnistests und einer verringerten Präpuls-Inhibition des Schreckreflexes führt. Durch Anwendung von Umweltstressoren in der Heranwachenden-Periode konnten die gleichen Effekte herbeigeführt werden, ebenfalls begleitet von HDAC1-Überexpression und H3K9-Hypoacetylierung. Durch Anwendung des HDAC1-selektiven HDACi MS-275 (Khan et al. 2008) waren diese Veränderungen reversibel. Diese Ergebnisse konnten von einer weiteren Gruppe repliziert werden (Jakovcevski et al. 2013). Die generelle neuronale Überexpression von HDAC1 in einem genetischen Mausmodell hingegen führte nicht zu Veränderungen kognitiver Leistungen in Langzeit- und Arbeitsgedächtnistests (Guan et al. 2009).

Die Arbeitsgruppe um E. Costa und A. Guidotti sieht eine Erhöhung von DNMT1 im Zentrum der Pathogenese GABAerger Interneurone (Guidotti et al. 2010). Die pharmakologische Inhibition von HDAC1 mit MS-275 führte zu einer gesteigerten Expression von Reelin und GAD₆₇. Dieser Effekt konnte ebenfalls durch die Inhibition von DNMT1 erreicht werden (Kundakovic et al. 2009). Da DNMT1 HDAC1 im Zuge der genetischen Repression rekrutiert (Kundakovic et al. 2009), könnte die Erhöhung der *hdac1*-mRNA also eine Folgereaktion der DNMT1-Erhöhung darstellen.

Die oben geschilderten Untersuchungen zeigen einen Zusammenhang erhöhter HDAC1-Expression im PFC mit reduzierter Arbeitsgedächtnisfunktion auf. Die Überexpression von HDAC1 führt zu Histon-Hypoacetylierung (Guan et al. 2009; Bahari-Javan et al. 2012), sodass die beobachtete Histon4-Hyperacetylierung nicht Folge einer gesteigerten HDAC1-Rekrutierung sein könnte

4.2 Erniedrigte Expression von GluR1 und ChRM1 in Hirngewebeproben schizophrener Patienten

Wie weiter oben beschrieben stellt die Untersuchung epigenetischer Veränderungen auf genomischer Ebene eine zu grobe Annäherung dar, wenn man Veränderungen im Bereich einzelner Gene vermutet. Im nächsten Schritt konzentrierten wir uns daher auf Arbeitsgedächtnisrelevante Gene und dort wirksame epigenetische Veränderungen. Es konnte gezeigt werden, dass Rezeptoren zweier unterschiedlicher Neurotransmittersysteme im dorsolateralen präfrontalen Kortex (DLPFC) Schizophrener weniger stark exprimiert werden als in den Proben

4.2 Erniedrigte Expression von GluR1 und ChRM1 in Hirngewebebeobachten schizophrener Patienten

altersangepasster Kontrollen. Diese Befunde sollen im Folgenden auf ihre Bedeutung für die Bildung von Arbeitsgedächtnisinhalten hin beleuchtet werden. Es erfolgt ein Vergleich der Ergebnisse mit den bisherigen Erkenntnissen zu diesen Rezeptoren bezogen auf das Krankheitsbild der Schizophrenie. Schließlich folgt eine Interpretation der Ergebnisse mit Bezug auf ein aktuelles Modell der Verschaltungen im DLPFC.

4.2.1 Glutamaterge AMPA-Rezeptoren und muskarinerge Acetylcholin-Rezeptoren sind am Erwerb von Arbeitsgedächtnisinhalten beteiligt

GluR1

Glutamat vermittelt seine exzitatorische Wirkung über metabotrope und ionotrope Rezeptoren. Die ionotropen Rezeptoren lassen sich nach ihren chemischen Agonisten weiter unterteilen in Kainat-, NMDA- und AMPA-Rezeptoren. Die Tatsache, dass die Gabe von NMDA-Rezeptor-Antagonisten wie Phencyclidin und Ketamin in gesunden Patienten psychotische Symptome sowie eine Verschlechterung des Arbeitsgedächtnisses hervorruft (Javitt und Zukin 1991; Krysstal et al. 1994), führte zu der Theorie einer Hypofunktionalität des postsynaptischen glutamatergen Systems als Ursache der Negativsymptomatik.

AMPA-Rezeptoren setzen sich aus den vier Untereinheiten GluR1-4 zusammen. Sie übermitteln schnelle, kurz-anhaltende Veränderungen der synaptischen Plastizität (Mosbacher et al. 1994). Ihre Aktivierung erzeugt eine initiale Depolarisation der Postsynapse, die zu einer spannungsabhängigen Deblockade von NMDA-Rezeptoren führt (Lynch 2002). Da die Literatur über die mögliche Rolle der diversen Rezeptoren in der Pathophysiologie der Schizophrenie bereits sehr umfassend ist, beschränkt sich die Diskussion auf die Studienlage zu dem ionotropen AMPA-Glutamaterezeptor, speziell auf die Untereinheit GluR1.

Sanderson et al. (2010) charakterisierten die Gedächtnisfunktion einer *glur1-knockout* (KO)-Maus. In verschiedenen Tests wurde die Ausbildung des räumlichen Kurzzeitgedächtnisses sowie des räumlichen Langzeitgedächtnisses mit Wildtyp-Mäusen verglichen. Dabei stellte sich heraus, dass der Verlust der GluR1-Untereinheit die Ausbildung des räumlichen Langzeitgedächtnisses nicht verhindert sondern zum Teil sogar verbessert. In Kurzzeitgedächtnistests hingegen zeigten die KO-Tiere eine signifikant schlechtere Leistung. Entsprechende Resultate wurden zudem in einer KO-Maus für eine Untereinheit des NMDA-Rezeptors gefunden (Bannerman et al. 2008). Damit gibt es Hinweise auf eine Beteiligung des glutamatergen Systems im Allgemeinen und der GluR1-Untereinheit im Speziellen an Prozessen des Arbeitsgedächtnisses in Hippocampus-abhängigen Versuchsanordnungen.

ChRM1

Auch die Acetylcholinrezeptoren werden nach ihren kompetitiven Agonisten weiter unterteilt in die nikotineren ACh-Rezeptoren (ionotrop) und die Familie der muskarineren ACh-Rezeptoren (metabotrop), auch ChRM genannt, von denen nach aktueller Studienlage die Subtypen ChRM1-5 bekannt sind. ChRM1 und ChRM4 sind die dominierenden Rezeptoren im Kortex und in den Basalganglien (Graef et al. 2011). Weiterhin scheint ein Synergismus der nikotineren und muskarineren Rezeptoren in der Beeinflussung des Arbeitsgedächtnisses zu bestehen (Graef et al. 2011).

Die Vermutung einer Beteiligung des cholinergen Systems an der schizophrenen Symptomatik wurde aufgrund der Bedeutung für andere kognitive Prozesse wie Gedächtnis, Motorik, Schlaf und Informationsverarbeitung angenommen (Robinson et al. 2011). Es wurde gezeigt, dass bei Menschen eine unselektive Blockade der muskarineren Rezeptoren durch den Antagonisten Scopolamin zu einer Verschlechterung von Arbeitsgedächtnisprozessen führt (Ellis et al. 2006). Durch das Anticholinergikum Biperiden konnte darüber hinaus in Schizophrenen eine Zunahme der psychotischen Symptomatik hervorgerufen werden (Tandon et al. 1990), während Acetylcholinesterase-Hemmer in der Behandlung optischer Halluzinationen Erfolge zeigten (Patel et al. 2010). Diese Daten sprechen für eine Hypofunktionalität des cholinergen Systems. Die Gabe von Acetylcholinesterase-Hemmern führte jedoch trotz einzelner positiver Ergebnisse (Kirrane et al. 2001), zu keiner reproduzierbaren Verbesserung schizophrener Negativsymptomatik (Voss et al. 2008), sodass ein rein quantitativer Acetylcholinmangel nicht wahrscheinlich erscheint.

Um die funktionelle Bedeutung der einzelnen Subtypen zu untersuchen, wurden für die einzelnen Rezeptoren defizitäre Versuchstiere entwickelt. Eine *chrm1*-KO-Maus zeigte schwere Defizite in Arbeitsgedächtnistests, während die Langzeitgedächtnisfunktion unbeeinflusst blieb (Anagnostaras et al. 2003). Iwata et al. (2000) konnten durch den ChRM1-selektiven Agonisten CS-932 Scopolamin-induzierte Arbeitsgedächtnisdefizite rückgängig machen. Der positive Effekt ChRM1-selektiver Agonisten auf das Arbeitsgedächtnis wurde mehrfach bestätigt (Graef et al. 2011). Zudem ein Effekt im Menschen bereits bei therapierefraktären Schizophrenen durch Applikation des ChRM1/M4-selektiven Agonisten Xanomelin bestätigt werden: Es wurde eine Verbesserung der kognitiven Leistungen, speziell des Kurzzeitgedächtnisses und des verbalen Lernens erreicht (Shekhar et al. 2008).

4.2.2 Die bisherigen Ergebnisse zur Expression von GluR1 und ChRM1 im präfrontalen Kortex Schizophrener sind uneinheitlich

GluR1

Die bisherigen Erkenntnisse zu veränderter Expression glutamaterger NMDA- und AMPA-Rezeptoren im Hippocampus und PFC in Schizophrenen, gewonnen anhand verschiedener Techniken (Liganden-Bindungsstudien, RT-PCR Untersuchungen, Analyse auf Proteinebene) kommen zu keinem einheitlichen Ergebnis (Scarr et al. 2013). In Schizophrenen wurden Verringerungen der GluR1-Expression im Thalamus (Ibrahim et al. 2000) und im Temporallappen (Eastwood et al. 1995) beschrieben. Die Befunde den DLPFC betreffend sind uneinheitlich: Mehrere Studien konnten keine Veränderung der Expression feststellen (Healy et al. 1998; O'Connor et al. 2007; Hammond et al. 2012), während in anderen Studien eine Erhöhung der GluR1-mRNA nachgewiesen werden konnte (Dracheva et al. 2005; O'Connor und Hemby 2007). Eine weitere Studie fand erniedrigte GluR1-Proteinlevel im Brodmann-Areal 10, dem anterioren Teil des präfrontalen Kortex (Corti et al. 2011).

Einen Interpretationsansatz für diese Dissonanz bietet die Hypothese eines quantitativen Zusammenhangs zwischen antipsychotischer Medikation und Höhe der GluR1-Expression: In Proben Schizophrener, deren Medikation vor mehr als 26 Wochen abgesetzt wurde, konnte eine signifikante Erniedrigung der GluR1-Rezeptoren gemessen werden, während eine Therapie bis zum Tod zu Expressionslevel führte, die denen gesunder Kontrollen entsprachen (Sokolov 1998). Gegen diese These spricht allerdings der Befund von Healy et al. (1998) und O'Connor et al. (2007), die auch in postmortalem Gewebe „Neuroleptika-freier“ Patienten (mindestens 6 Wochen) keinen Unterschied in der GluR1-Expression feststellen konnten. Der Vergleich der AMPA-Rezeptor-Dichte in postmortalem PFC-Gewebe therapierter Schizophrener, gesunder Kontrollen und nicht-Schizophrenie-erkrankter Patienten unter Neuroleptika-Therapie konnte ebenfalls keinen einfachen Effekt antipsychotischer Medikation zeigen: In Schizophrenen unter Medikation kam es zu einem Anstieg der Rezeptorbindung, während es in der Neuroleptika-therapierten Gruppe ohne Schizophrenie zu einem Abfall der Bindungsintensität im Vergleich zu gesunden Kontrollen kam (Noga et al. 2001).

Auch die Datenlage aus Tierstudien ist uneinheitlich: In mehreren Untersuchungen wurde sowohl durch Haloperidol als auch durch Clozapin eine Erhöhung von GluR1 erzielt (Fitzgerald et al. 1995; Spurney et al. 1999). Andere Studien konnten hingegen keinen Effekt nachweisen (Healy und Meador-Woodruff 1997) oder stellten sogar eine Verringerung der Rezeptordichte fest (O'Connor et al. 2007).

4.2 Erniedrigte Expression von GluR1 und ChRM1 in Hirngewebeproben schizophrener Patienten

Die einander widersprechenden Ergebnisse lassen keinen eindeutigen Rückschluss auf einen Medikamenten-induzierten Effekt zu. Die Literatur zur veränderten Verteilung von AMPA-Rezeptoren in Schizophrenen deutet eher auf eine reduzierte Expression im Temporallappen hin, während die kortikale und striatale Rezeptordichte weniger beeinflusst scheint (Meador-Woodruff und Healy 2000). Auskunft über den Einfluss von Histon-Acetylierung auf die Expression von GluR1 gibt eine Studie an einem Tiermodell der Alzheimerschen Erkrankung: Hier konnte durch die Applikation von Phenylbutyrat eine Steigerung der Histon4-Acetylierung am *glur1*-Promotor sowie eine Steigerung der GluR1-Rezeptor-Expression erzielt werden (Ricobaraza et al. 2009).

ChRM1

Die erniedrigte Expression von ChRM1-mRNA in postmortalem Gewebe des DLPFC schizophrener Patienten ist kongruent mit den Ergebnissen mehrerer Liganden-Bindungsstudien (Crook et al. 2001; Dean et al. 2002) sowie einer *in vivo*-Bindungsstudie mittels SPECT an nicht-antipsychotisch therapierten Schizophrenen (in diesem Fall Patienten die seit mindestens 8 Tagen keine antipsychotische Medikation erhalten hatten) (Raedler et al. 2003b) und einer RT-PCR Studie (Mancama et al. 2003).

Tierversuche zeigten eine erhöhte ChRM1- /ChRM4-Rezeptordichte nach dauerhafter Gabe von Haloperidol und Clozapin (Crook et al. 2001). Weiterhin wurde in einem Tiermodell für Schizophrenie eine Erniedrigung des ChRM1-Rezeptors im Kortex durch Clozapin normalisiert (Malkoff et al. 2008). Raedler et al. (2003b) gehen hingegen davon aus, dass die Expression von ChRM1 nicht maßgeblich durch die Einnahme antipsychotischer Medikation beeinflusst wird. Sie argumentieren, dass sich keine Korrelation zwischen der gemessenen Veränderung und der Dauer und Höhe der Medikation ermitteln ließ, ein Rückschluss, der so auch aus Untersuchungen an postmortalem Gewebe gezogen wurde (Dean et al. 2002). Daraus lässt sich ableiten, dass die Minderexpression Teil der Pathophysiologie sein könnte und nicht sekundärer Effekt der medikamentösen Therapie.

4.2.3 Funktionelle Rückschlüsse

Die Heterogenität der Datenlage spricht nicht für eine eindeutige Über- oder Unterfunktion eines einzelnen Neurotransmittersystems. Stattdessen kann man die Hypothese aufstellen,

4.2 Erniedrigte Expression von GluR1 und ChRM1 in Hirngewebeproben schizophrener Patienten

dass es sich um von einander abhängige Rückkopplungsmechanismen handelt, anhand derer das ZNS versucht, ein Gleichgewicht erregender und hemmender Einflüsse aufrechtzuerhalten. Pathophysiologisch ist der Befund erniedrigter GluR1-Rezeptor-Expression im PFC mit der Theorie einer funktionellen Unterfunktion des AMPA/NMDA-Systems und daraus folgender Dysregulation GABAerger Interneurone vereinbar (Timofeeva und Levin 2011).

In Betrachtung der funktionellen Konsequenzen verminderter ChRM1-Expression spielt die regionale Rezeptor-Verteilung eine Rolle: Der dominierende Zelltyp im Striatum sind GABAerge Interneurone, die Interaktionen zwischen dem dopaminergen und cholinergen System vermitteln (Havekes et al. 2011). Der vorherrschende muskarinerge Rezeptor-Subtyp im Striatum ist ChRM1 (Weiner et al. 1990). Im PFC bilden cholinerge Efferenzen Synapsen sowohl an Pyramidenzellen als auch an GABAergen Interneuronen (Mrzljak et al. 1995), sodass Acetylcholin hier teils exzitatorisch, teils inhibitorisch wirken kann. Ein Mangel an ChRM1 könnte nach dem in Kapitel 1.2.6 vorgestellten Modell an der Hypoaktivität des Striatums und auch an der Reduktion synaptischer Verknüpfungen im PFC beteiligt sein.

Über die pharmakologische Historie der in dieser Arbeit verwendeten Proben liegen keine Informationen vor. Damit ist die Frage, ob die festgestellte Erniedrigung der Rezeptor-mRNA-Level mit einem bestimmten Therapieregime korreliert, nicht zu beantworten. Im weiteren Fokus stand die Charakterisierung einer epigenetischen Regulation der Expression der oben beschriebenen Rezeptoren.

4.2.4 Der Promotor des Gens *chrm1* ist in Schizophrenen hypomethyliert

Durch RT-PCR wurde in der vorliegenden Arbeit eine verminderte Expression des ChRM1-Rezeptors in Proben Schizophrener festgestellt. Eine Analyse der DNA-Methylierung im Promotorbereich des betreffenden Gens zeigte wider Erwarten eine Hypomethylierung. Bisherige Arbeiten zeigten eine Hypermethylierungen der Schizophrenie-assoziierten Gene *reelin* (Abdolmaleky et al. 2005), *sox10* (Iwamoto et al. 2005), und des Serotonin-Rezeptors *htr2a* (Abdolmaleky et al. 2011), die jeweils mit reduzierter mRNA Expression assoziiert waren. Umgekehrt war eine Hypomethylierung des *comt*-Promotors mit verstärkter Expression assoziiert (Abdolmaleky et al. 2006). Der erwartete Zusammenhang zwischen verringerter Gen-Expression und korrespondierender DNA-Hypermethylierung gilt im Falle des *chrm1*-Gens nicht.

4.3 Wirkung einer Dauertherapie mit HDAC-Inhibitoren auf das Langzeit- und Arbeitsgedächtnis

Eine genomweite Untersuchung von CpG-Insel-Methylierung in Frontalhirn-Gewebeproben ergab eine Vielzahl von DNA-Methylierungs-Abweichungen für Schizophrenie- und Bipolar-Erkrankte, darunter einige Gene, die im GABA- und Glutamat-System relevant sind. Die Veränderungen umfassten Hyper- und Hypomethylierungen zu gleichen Teilen, eine These der generellen Hypermethylierung wurde nicht bestätigt. Es fanden sich zudem mehrere Beispiele, in denen eine Hypomethylierung entgegen der Theorie von einer verringerten Gen-Expression begleitet wurde (Mill et al. 2008). In peripherem Gewebe wurde sogar eine generelle Tendenz zur Hypomethylierung in Schizophrenen berichtet (Shimabukuro et al. 2007; Melas et al. 2012). Die Befunde sind auch an einzelnen Promotoren uneinheitlich: Eine Hypermethylierung des *reelin*-Promotors konnte nicht in allen Studien repliziert werden (Tochigi et al. 2008; Mill et al. 2008), ebenso wenig die Hypomethylierung des *comt*-Promotors (Mill et al. 2008; Melas et al. 2012). Die Befunde zu einer generellen Alters- und Geschlechtsabhängigkeit der DNA-Methylierung sind ebenfalls nicht übereinstimmend (Shimabukuro et al. 2007; Siegmund et al. 2007; Mill et al. 2008).

Auch auf DNA-Methylierung konnte ein Effekt antipsychotischer Medikation festgestellt werden (Shimabukuro et al. 2006; Mill et al. 2008; Melas et al. 2012). Dieser konnte ebenfalls durch die Gabe von Valproat potenziert werden (Dong et al. 2008). Es gibt damit Belege, dass die DNA-Methylierung schon durch heute eingesetzte Medikamente verändert wird.

Im Promotor-Bereich des *chrml*-Rezeptors wurde in keiner der Arbeiten ein signifikant verändertes Methylierungsmuster berichtet, ebenso wenig im Bereich des *glur1*-Rezeptors.

4.3 Wirkung einer Dauertherapie mit HDAC-Inhibitoren auf das Langzeit- und Arbeitsgedächtnis

Die in Kapitel 1.4.5 dargestellten Zusammenhänge zeigen, wie eine epigenetische Deregulation möglicherweise die Arbeitsgedächtnisfunktion in Schizophrenen stört und dass diese durch die Gabe von HDACi korrigierbar ist. Ausgehend von dieser Basis wurden die HDACi Natriumbutyrat und Phenylbutyrat auf ihre Fähigkeit, Arbeitsgedächtnisfunktionen in gesunden und in epigenetisch veränderten Versuchstieren zu verbessern, getestet. Bisher wurde kein direkter Zusammenhang von Histon-Acetylierung und Veränderungen der Arbeitsgedächtnisfunktion festgestellt.

4.3 Wirkung einer Dauertherapie mit HDAC-Inhibitoren auf das Langzeit- und Arbeitsgedächtnis

4.3.1 Natriumbutyrat und Phenylbutyrat führen nicht zu einer Verbesserung des Arbeits- oder Langzeitgedächtnisses

Arbeitsgedächtnis

In der Versuchsanordnung des Y-Labyrinths wurde die Erkundung eines bisher nicht zugänglichen Arms des Testapparats als Arbeitsgedächtnisleistung gewertet. In dieser Versuchsanordnung wurde weder durch Natriumbutyrat noch durch Phenylbutyrat eine Steigerung der Arbeitsgedächtnisfunktion in gesunden Versuchstieren erreicht.

Abhängig von der Definition wurde Einigkeit darüber erzielt, dass nur etwa 3-5 Informationen gleichzeitig im Arbeitsgedächtnis gehalten werden können (Cowan 2010), sodass eine Steigerung von Arbeitsgedächtnisleistung lange für unmöglich gehalten wurde. Die bisherigen Erkenntnisse über Medikamenteneffekte auf das Arbeitsgedächtnis beziehen sich in der Regel auf die Revision ebenfalls pharmakologisch oder genetisch induzierter Arbeitsgedächtnisdefizite (Castner et al. 2000; Rios Valentim Saavedra José et al. 2009). Als gesichert gilt mittlerweile eine Verbesserung durch Training (Olesen et al. 2004), eine Steigerung, auch in gesunden Versuchstieren, wurde allerdings auch durch dopaminerge Stimulation erreicht (Tarantino et al. 2011).

Langzeitgedächtnis

In Bezug auf den Einfluss auf das Langzeitgedächtnis ist zu bemerken, dass die Verum-Gruppe in den Langzeitgedächtnistests keine verbesserte Testleistung zeigte, obwohl diese in anderen Studien nachgewiesen wurde (Stefanko et al. 2009): Dort wurde unter Einsatz von Natriumbutyrat ein Lernvorgang beobachtet, der unter natürlichen Bedingungen nicht zur Ausbildung einer Erinnerung geführt hätte, gemessen durch Objekterkennung im NOR. Der Unterschied zu dem in dieser Arbeit angewendeten Testprotokoll liegt in der Intensität des Trainings. Stefanko und Kollegen setzten die Versuchstiere nach einer Habituerungsphase ohne Objekte nur einer einzigen Trainingssitzung von drei Minuten aus, gefolgt von einem Erinnerungstest 24 Stunden später. In der vorliegenden Arbeit hingegen wurden die Tiere an zwei aufeinander folgenden Tagen für jeweils zehn Minuten an die Objekte gewöhnt. Es ist also möglich, dass die Länge der Trainingssitzungen im Sinne eines *ceiling*-Effekts zu einem Lernerfolg geführt hat, der durch die Gabe von HDACi nicht weiter zu steigern war.

4.3.2 Das Methionin-Mausmodell zeigt keine Gedächtnisdefizite

Die durch Tremolizzo et al. (2002) vorgenommene Charakterisierung des L-Methionin-Mausmodells, welches auf einer reduzierten Reelin-Expression durch Hypermethylierung des *reelin*-Promotors basiert, ergab eine Verschlechterung der Präpuls-Inhibition des Schreckreflexes, wie sie auch in Schizophrenen gefunden wird, zudem ein eingeschränktes Sozialverhalten. Untersuchungen des Langzeit- und Arbeitsgedächtnisses wurden nicht durchgeführt. In einem anderen Ansatz wurde der Effekt reduzierter Reelin-Expression über den Einsatz von *anti-sense* DNA erzeugt. In diesem Kontext ließ sich in jugendlichen Tieren ein Arbeitsgedächtnisdefizit induzieren, in adulten Tieren hingegen nicht (Brosda et al. 2011). Die Untersuchung des Langzeit- und Arbeitsgedächtnisses in dieser Arbeit zeigte, dass durch die tägliche Gabe von L-Methionin in gesunden, adulten Versuchstieren keine Einschränkung des Arbeitsgedächtnisses hervorgerufen wird.

4.3.3 Erkenntnisse aus den Studien mit Versuchstieren

Die Ergebnisse zeigen, dass (1) durch die Gabe von L-Methionin in adulten Tieren keine Veränderung der Langzeit- oder Arbeitsgedächtnisleistung hervorgerufen wird und dass (2) in gesunden Tieren durch die Dauergabe von Natriumbutyrat keine Steigerung des Langzeit- oder Arbeitsgedächtnisses erzielt wird. Damit spiegelt das von E.Costa und A.Guidotti entwickelte Tiermodell nur einen Teilaspekt der schizophrenen Symptomatik wider. Weitere Forschungen müssen zeigen, ob sich durch die Gabe von L-Methionin in heranwachsenden Mäusen auch die für die Schizophrenie typischen kognitiven Defizite hervorrufen lassen und ob diese durch die Gabe von HDACi zu beeinflussen sind. Außerdem könnte der Effekt von HDACi in etablierten Tiermodellen mit bekanntem Arbeitsgedächtnisdefizit untersucht werden.

4.4 Schlussfolgerungen

Die wissenschaftlichen Erkenntnisse bezüglich des GABAergen Systems im PFC ergeben, mit Ausnahmen, ein schlüssiges Bild, wie epigenetische Fehlregulationen zu Arbeitsgedächtniseinbußen führen. Die Studien zur Histon-Hypoacetylierung (Gavin et al. 2008) und Überexpression des restriktiven Parameters dimethyliertes H3K9 (Gavin et al. 2009) in Lymphozyten sowie ein Großteil der Befunde zur Hypermethylierung an Schizophrenie-relevanten Promotoren weisen auf ein hypoaktives Chromatin hin, das zudem weniger flexibel auf HDAC-Inhibition reagiert.

4.4 Schlussfolgerungen

In dieses Bild der Schizophrenie als epigenetische Erkrankung passt eine Überexpression von HDAC1 und der DNA-Methyltransferasen DNMT1 und DNMT3a (Veldic et al. 2004; Zhubi et al. 2009). In den in dieser Arbeit untersuchten Proben waren DNMT1, DNMT3a und DNMT3b ebenfalls überexprimiert, die Unterschiede zur Kontrollgruppe waren aber nicht signifikant (Daten nicht abgebildet). Die in dieser Arbeit gezeigte signifikante Hyperacetylierung an Histon4, die fehlende Überexpression von HDAC1 auf Proteinebene und die Hypomethylierung des ChRM1-Promotors passen nicht zu dieser Hypothese. In der Literatur finden sich weitere Befunde, die der Theorie einer generellen DNA-Hypermethylierung im frontalen Kortex widersprechen: Die erniedrigte Expression von GAD₆₇ war mit einer Hypomethylierung des betreffenden Promotors assoziiert (Huang und Akbarian 2007), andere Schizophrenie-assoziierte Gene waren ebenfalls hypomethyliert (Mill et al. 2008). Die Untersuchungen Genom-weiter epigenetischer Veränderungen zeigten, dass relevante geschlechtsspezifische (Mill et al. 2008) und altersabhängige Unterschiede (Siegmond et al. 2007; Tang et al. 2011) unabhängig vom Erkrankungsbild der Schizophrenie bestehen. Es wurden zudem direkte und indirekte Hinweise gefunden, dass bereits durch aktuell eingesetzte Medikamente Veränderungen der epigenetischen Information hervorgerufen werden. Diese Fakten müssen in der Planung und Auswertung zukünftiger Experimente berücksichtigt werden.

Ein Einfluss von Histon-Acetylierung auf das Arbeitsgedächtnis konnte nicht gezeigt werden. In gesunden Versuchstieren war durch den Einsatz von HDACi keine Verbesserung der Arbeitsgedächtnisleistung zu erreichen. Das in dieser Arbeit genutzte Tiermodell zur Schizophrenie zeigte im Objekterkennungstest keine Einbußen in der Arbeitsgedächtnisfunktion, sodass keine Aussage darüber getroffen werden kann, ob HDACi möglicherweise trotzdem eine bestehende Schwäche des Arbeitsgedächtnisses verbessern könnten.

Obwohl sich kein einheitliches Bild zeigt lässt sich annehmen, dass epigenetische Mechanismen Teil der Pathophysiologie der Schizophrenie sind. Es wurden mehrere Hinweise gefunden, dass die epigenetische Signaltransduktion in Schizophrenen gestört ist, die Veränderungen waren in ihrer Ausprägung jedoch häufig gering und nicht einheitlich. Möglicherweise ist das auf die Auswahl des untersuchten Materials zurückzuführen. Durch eine zell- und genspezifische Analyse sowie durch Berücksichtigung äußerer Faktoren wie des Alters bei Auftreten der Erkrankung, der Erkrankungsphase, des speziellen schizophrenen Subtyps und der stattgehabten Therapie könnte sich die Bedeutung epigenetischer Faktoren erhärten. Die in dieser Arbeit präsentierten Ergebnisse leisten einen Beitrag zu der Theorie, dass in der Schizophrenie eine epigenetische Dysregulation Teil der Pathophysiologie ist. Ob die

dargestellten epigenetischen Veränderungen ursächlich an Arbeitsgedächtniseinbußen beteiligt sind, einer physiologischen Kompensation entsprechen oder sogar pharmakologisch induziert wurden, lässt sich anhand der vorliegenden Daten nicht beantworten.

4.5 Klinischer Ausblick

Die Schizophrenie zeichnet sich durch einen langjährigen Krankheitsverlauf aus, der möglicherweise auf einer Entwicklungsstörung beruht. Eine Monotherapie mit HDAC-Inhibitoren wird daher vermutlich nicht hinreichend effektiv auf alle betroffenen Systeme wirken. Es besteht aber die Option, HDACi als zusätzliche Therapie einzusetzen. Dabei erhoffen sich einige Autoren einen „Weichmacher“-Effekt auf die DNA, der die Wirkung neuroleptischer Medikamente verstärkt. Einzelne HDACi werden aktuell im Rahmen onkologischer Studien auf ihre Wirksamkeit und Verträglichkeit im Menschen geprüft.

Da HDACi so verschiedene Funktionen wie Zellzyklus, Apoptose und Angiogenese (Bolden et al. 2006), aber auch Lernen und Gedächtnis beeinflusst, besteht die Gefahr relevanter Nebenwirkungen beim Einsatz unselektiver HDACi. Untersuchungen in Tumorzelllinien haben allerdings ergeben, dass nur etwa 2 %-10 % aller Gene durch Histon-Acetylierung beeinflusst werden (Glaser et al. 2003). In Neuronen wurde ein Einfluss auf etwa 8 % aller Gene beobachtet (Fukuchi et al. 2009). Die Erfahrungen im Tiermodell zeigen, dass bei systemischer Anwendung keine schwerwiegenden Nebenwirkungen auftreten (Fischer et al. 2007).

Ziel der pharmakologischen Forschung ist es, Substanzen zu entwickeln, die Klassen-selektiv wirken oder sogar nur einzelne HDAC inhibieren, um sich die unterschiedlichen Expressionsmuster der HDAC in verschiedenen Geweben zu Nutze zu machen. Da das aktive Zentrum der unterschiedlichen HDAC eine nahezu homologe Struktur aufweist und zu den evolutionär hoch konservierten Bereichen gehört, ist diese Entwicklung kompliziert. Um diese Substanzen sinnvoll als Medikamente in der Psychiatrie einsetzen zu können, müssen besondere Voraussetzungen erfüllt werden: Das ZNS ist durch die Blut-Hirn-Schranke geschützt und die Pharmakokinetik ist speziell. Es gilt, die besonderen Mechanismen der Verteilung, des Abbaus und der Elimination zu berücksichtigen. Am Beispiel der Schizophrenie wird zudem deutlich, dass ein Effekt nur in bestimmten Hirnregionen und sogar Zelltypen wünschenswert wäre, um die Nebenwirkungen zu minimieren. Von Interesse könnte hier der HDAC1-selektive HDACi MS-275 sein (Khan et al. 2008), der aktuell in der Onkologie in klinischer Erprobung ist. MS-275

zeigte eine bis zu 100fach höhere Wirkung auf die Histon3-Acetylierung an den Promotor-Regionen von *gad1* und *reln* im PFC als Valproat (Simonini 2006).

Eine epigenetische Komponente wird bereits den Medikamenten Clozapin und Valproat zugesprochen. In klinischen Studien konnten in Schizophrenen Aufmerksamkeit und Sprachflüssigkeit durch Clozapin verbessert werden, der Effekt auf Arbeitsgedächtnisprozesse war gering (Meltzer und McGurk 1999). Durch die Gabe von Valproat als Zusatztherapeutikum konnte kein Effekt festgestellt werden (Casey et al. 2008). In Mäusen führte eine Medikation mit Clozapin zu einer Erhöhung des aktivierenden Markers trimethyliertes H3K4 am *gad1*-Promotor (Huang et al. 2007). Weiterhin konnte Clozapin eine L-Methionin-induzierte DNA-Hypermethylierung am *gad1*-Promotor über eine Histon3-Hyperacetylierung rückgängig machen. Bemerkenswerterweise wurde dieser Effekt durch Valproat potenziert (Dong et al. 2008). Durch das typische Neuroleptikum Haloperidol hingegen konnte dieser Effekt nicht erzeugt werden. Interessanterweise vermittelt Clozapin seine Wirkung unter anderem über den ChRM1-Rezeptor (Raedler et al. 2003a).

Ein weiterer klinisch interessanter Aspekt ist die Entwicklung epigenetischer Biomarker. Diese könnten einerseits diagnostisch eingesetzt werden, zudem könnte der Therapieeffekt von HDACi überwacht werden. Biomarker könnten gegebenenfalls auch die Selektion eines Patientenguta ermöglichen, dass von einer epigenetisch wirksamen Therapie profitiert. Die bisherigen Erfahrungen zeigen, dass in Schizophrenen eine Reaktion auf eine HDACi-Therapie in Lymphozyten nachzuweisen ist (Sharma et al. 2006; Gavin et al. 2008). Statt absoluter Werte ist dabei möglicherweise eher die relative Veränderung als Maß der Anpassungsfähigkeit des Chromatins ausschlaggebend.

5 Zusammenfassung

Schizophrenie ist eine chronische Erkrankung, die zu schweren Einschränkungen des Sozial- und Erwerbslebens führt. Die Ätiologie ist noch nicht vollständig geklärt. Aktuelle Konzepte gehen von einer genetischen Prädisposition aus, die in Kombination mit umweltbedingten Einflüssen zum Vollbild der Erkrankung führt. Als Kerndefizite gelten kognitive Einschränkungen, insbesondere des Arbeitsgedächtnisses. Als Sitz des Arbeitsgedächtnisses gilt der präfrontale Kortex (PFC). Epigenetik im neurowissenschaftlichen Sinn beschreibt, wie äußere Faktoren die Genexpression postmitotischer Zellen im Nervensystem beeinflussen, hierbei sind die Funktionen der Histon-Acetylierung und der DNA-Methylierung besonders gut untersucht. Nachdem gezeigt werden konnte, dass epigenetische Prozesse an der Langzeitgedächtnisbildung beteiligt sind, soll in dieser Arbeit der Frage nach epigenetischer Regulation des Arbeitsgedächtnisses nachgegangen werden.

In postmortalen Proben des dorsolateralen PFC Schizophrener zeigte sich eine signifikante Hyperacetylierung an Histon4 und eine Überexpression von *hdac1* bei normaler Expression anderer nukleärer HDAC im Vergleich zu nicht-psychisch erkrankten Kontrollen. Die Untersuchung Arbeitsgedächtnis-relevanter Rezeptoren zeigte eine Minderexpression des muskarinergen Acetylcholinrezeptors1 (ChRM1) und der Untereinheit 1 des AMPA-Glutamaterezeptors (GluR1) in Schizophrenen. Die Untersuchung epigenetischer Faktoren zeigte eine DNA-Hypomethylierung der Promotor-Region von *chrml1*. Zur prospektiven Untersuchung epigenetischer Einflüsse auf Arbeitsgedächtnisprozesse wurde der Effekt der Histon-Deacetylase-Inhibitoren Natriumbutyrat und Phenylbutyrat in einem L-Methionin-induzierten Schizophrenie-Mausmodell untersucht. Dauerhafte L-Methionin-Applikation führte zu keiner Verschlechterung des Arbeitsgedächtnisses im Objekterkennungstest. Zudem konnte in nicht behandelten Tieren durch die chronische Gabe von HDAC-Inhibitoren keine Steigerung des Arbeitsgedächtnisses im Y-Labyrinth-Versuch erreicht werden.

Die Ergebnisse weisen auf eine mögliche globale epigenetische Deregulation als Teil der schizophrenen Pathophysiologie sowie auf eine epigenetische Regulation Arbeitsgedächtnis-relevanter Rezeptoren hin. Eine Beeinflussung des Arbeitsgedächtnisses durch HDAC-Inhibition konnte im Tiermodell nicht nachgewiesen werden.

Abstract

Schizophrenia is a chronic disease leading to impairment in social and occupational functioning. The etiology remains elusive. Current concepts presume a genetic susceptibility, which in combination with environmental stimuli leads to the clinical manifestation. Cognitive dysfunction, especially deficits in working memory are regarded core deficits in schizophrenia. Working memory function is thought to be located in the prefrontal cortex. Epigenetics in a neuroscientific definition describes the mechanisms in which external stimuli change gene expression in postmitotic brain cells. The mechanisms of histone acetylation and DNA methylation are especially well characterized. It is known, that the formation of long-term memory involves epigenetic processes. The present thesis deals with the question, whether epigenetic mechanisms also regulate working memory processes.

Postmortal brain samples from the dorsolateral PFC showed significant hyperacetylation at histone 4 in schizophrenics and overexpression of *hdac1* while other nuclear HDAC were normally expressed. Determination of working memory-related receptors showed a reduction of muscarinic acetylcholine-receptor 1 (ChRM1) and of AMPA glutamate receptor, subunit 1 (GluR1) in schizophrenics. Investigation of epigenetic processes showed a hypomethylation of the *chrm1*-promotor region. To further determine the epigenetic influence on working memory processes in a prospective manner we examined the effect of the histone deacetylase inhibitors (HDACi) sodiumbutyrate and phenylbutyrate in a methionine-induced mouse model for schizophrenia. Chronic application of intraperitoneal methionine did not result in reduced working memory performance in the novel object recognition task. Furthermore chronic application of HDACi intraperitoneal did not enhance working memory performance in untreated mice in the Y-maze task.

These results indicate a possible global epigenetic deregulation in the schizophrenic pathophysiology and an epigenetic regulation of working memory-relevant receptors. Nevertheless HDAC inhibition did not result in altered working memory function.

6 Literaturverzeichnis

- Abdolmaleky HM, Cheng KH, Faraone SV, Wilcox M, Glatt SJ, Gao F, Smith CL, Shafa R, Aeali B, Carnevale J et al. (2006): Hypomethylation of MB-COMT promoter is a major risk factor for schizophrenia and bipolar disorder. *Human molecular genetics* 15, 3132–3145
- Abdolmaleky HM, Cheng Kh, Russo A, Smith CL, Faraone SV, Wilcox M, Shafa R, Glatt SJ, Nguyen G, Ponte JF et al. (2005): Hypermethylation of the reelin (RELN) promoter in the brain of schizophrenic patients: a preliminary report. *American journal of medical genetics Part B, Neuropsychiatric genetics: the official publication of the International Society of Psychiatric Genetics* 134B, 60–66
- Abdolmaleky HM, Yaqubi S, Papageorgis P, Lambert AW, Ozturk S, Sivaraman V und Thiagalingam S (2011): Epigenetic dysregulation of HTR2A in the brain of patients with schizophrenia and bipolar disorder. *Schizophrenia research* 129, 183–190
- Aghajanian GK und Marek GJ (2000): Serotonin model of schizophrenia: emerging role of glutamate mechanisms. *Brain research Brain research reviews* 31, 302–312
- Akbarian S, Kim JJ, Potkin SG, Hagman JO, Tafazzoli A, Bunney J W E und Jones EG (1995): Gene expression for glutamic acid decarboxylase is reduced without loss of neurons in prefrontal cortex of schizophrenics. *Archives of general psychiatry* 52, 258–266
- Akbarian S, Ruehl MG, Bliven E, Luiz LA, Peranelli AC, Baker SP, Roberts RC, Bunney Jr WE, Conley RC, Jones EG et al. (2005): Chromatin alterations associated with down-regulated metabolic gene expression in the prefrontal cortex of subjects with schizophrenia. *Archives of general psychiatry* 62, 829
- Alarcón JM, Malleret G, Touzani K, Vronskaya S, Ishii S, Kandel ER und Barco A (2004): Chromatin acetylation, memory, and LTP are impaired in CBP+/- mice. *Neuron* 42, 947–959
- Amann B, Gomar JJ, Ortiz-Gil J, McKenna P, Sans-Sansa B, Sarr S, Moro N, Madre M, Landin-Romero R, Vieta E et al. (2012): Executive dysfunction and memory impairment

- in schizoaffective disorder: a comparison with bipolar disorder, schizophrenia and healthy controls. *Psychological medicine* 42, 2127–2135
- Anagnostaras SG, Murphy GG, Hamilton SE, Mitchell SL, Rahnama NP, Nathanson NM und Silva AJ (2003): Selective cognitive dysfunction in acetylcholine m1 muscarinic receptor mutant mice. *Nature neuroscience* 6, 51–58
- Arguello PA und Gogos JA (2010): Cognition in mouse models of schizophrenia susceptibility genes. *Schizophrenia bulletin* 36, 289–300
- Baddeley A (2003): Working memory: looking back and looking forward. *Nature reviews Neuroscience* 4, 829–839
- Bahari-Javan S, Maddalena A, Kerimoglu C, Wittnam J, Held T, Bähr M, Burkhardt S, Delalle I, Kügler S, Fischer A et al. (2012): HDAC1 regulates fear extinction in mice. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience* 32, 5062–5073
- Bannerman DM, Niewoehner B, Lyon L, Romberg C, Schmitt WB, Taylor A, Sanderson DJ, Cottam J, Sprengel R, Seeburg PH et al. (2008): NMDA receptor subunit NR2A is required for rapidly acquired spatial working memory but not incremental spatial reference memory. *Journal of Neuroscience* 28, 3623
- Barch DM, Carter CS, Braver TS, Sabb FW, MacDonald 3rd A, Noll DC und Cohen JD (2001): Selective deficits in prefrontal cortex function in medication-naive patients with schizophrenia. *Archives of general psychiatry* 58, 280–288
- Benes FM, Lim B, Matzilevich D, Walsh JP, Subburaju S und Minns M (2007): Regulation of the GABA cell phenotype in hippocampus of schizophrenics and bipolars. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104, 10164–10169
- Benes FM, Vincent SL, Alsterberg G, Bird ED und SanGiovanni JP (1992): Increased GABAA receptor binding in superficial layers of cingulate cortex in schizophrenics. *The Journal of neuroscience* 12, 924–929
- Berrettini W (2003): Evidence for shared susceptibility in bipolar disorder and schizophrenia. *American journal of medical genetics Part C, Seminars in medical genetics* 123C, 59–64

- Bevins RA und Besheer J (2006): Object recognition in rats and mice: a one-trial non-matching-to-sample learning task to study 'recognition memory'. *Nature Protocols* 1, 1306–1311
- Bhutani N, Burns DM und Blau HM (2011): DNA demethylation dynamics. *Cell* 146, 866–872
- Bolden JE, Peart MJ und Johnstone RW (2006): Anticancer activities of histone deacetylase inhibitors. *Nature reviews Drug discovery* 5, 769–784
- Bradford MM (1976): A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72, 248–254
- Brosda J, Dietz F und Koch M (2011): Impairment of cognitive performance after reelin knockdown in the medial prefrontal cortex of pubertal or adult rats. *Neurobiology of disease* 44, 239–247
- Brown AS (2011): The environment and susceptibility to schizophrenia. *Progress in neurobiology* 93, 23–58
- Brown MW und Aggleton JP (2001): Recognition memory: what are the roles of the perirhinal cortex and hippocampus? *Nature reviews Neuroscience* 2, 51–61
- Carlsson A (1988): The current status of the dopamine hypothesis of schizophrenia. *Neuropsychopharmacology: official publication of the American College of Neuropsychopharmacology* 1, 179–186
- Carlsson A (2006): The neurochemical circuitry of schizophrenia. *Pharmacopsychiatry* 39 Suppl 1, S10–14
- Carlsson A und Lindqvist M (1963): Effect of chlorpromazine or haloperidol on formation of 3-methoxytyramine and normetanephrine in mouse brain. *Acta pharmacologica et toxicologica* 20, 140–144
- Casey DE, Daniel DG, Tamminga C, Kane JM, Tran-Johnson T, Wozniak P, Abi-Saab W, Baker J, Redden L, Greco N et al. (2008): Divalproex ER combined with olanzapine or risperidone for treatment of acute exacerbations of schizophrenia. *Neuropsychopharmacology* 34, 1330–1338

- Castner SA, Goldman-Rakic PS und Williams GV (2004): Animal models of working memory: insights for targeting cognitive dysfunction in schizophrenia. *Psychopharmacology* 174, 111–125
- Castner SA, Williams GV und Goldman-Rakic PS (2000): Reversal of antipsychotic-induced working memory deficits by short-term dopamine d1 receptor stimulation. *Science* 287, 2020–2022
- Cervellione KL, Burdick KE, Cottone JG, Rhinewine JP und Kumra S (2007): Neurocognitive deficits in adolescents with schizophrenia: longitudinal stability and predictive utility for short-term functional outcome. *Journal of the American Academy of Child and Adolescent Psychiatry* 46, 867–878
- Chen Y, Sharma RP, Costa RH, Costa E und Grayson DR (2002): On the epigenetic regulation of the human reelin promoter. *Nucleic Acids Research* 30, 2930–2939
- Corti C, Xuereb JH, Crepaldi L, Corsi M, Michielin F und Ferraguti F (2011): Altered levels of glutamatergic receptors and na^+/k^+ atpase- $\alpha 1$ in the prefrontal cortex of subjects with schizophrenia. *Schizophrenia Research* 128, 7–14
- Cowan N (2010): The magical mystery four: How is working memory capacity limited, and why? *Current directions in psychological science* 19, 51–57
- Craddock N, O'Donovan MC und Owen MJ (2006): Genes for schizophrenia and bipolar disorder? implications for psychiatric nosology. *Schizophrenia Bulletin* 32, 9–16
- Craddock N und Owen MJ (2005): The beginning of the end for the kraepelinian dichotomy. *The British Journal of Psychiatry* 186, 364–366
- Crook JM, Tomaskovic-Crook E, Copolov DL und Dean B (2001): Low muscarinic receptor binding in prefrontal cortex from subjects with schizophrenia: a study of brodmann's areas 8, 9, 10, and 46 and the effects of neuroleptic drug treatment. *The American journal of psychiatry* 158, 918–925
- Croxson PL, Kyriazis DA und Baxter MG (2011): Cholinergic modulation of a specific memory function of prefrontal cortex. *Nature neuroscience* 14, 1510–1512

- Davidson M (2001): Can premorbid and prodromal markers associated with psychosis be utilized for early detection and secondary prevention of schizophrenia? *Dialogues in clinical neuroscience* 3, 138–143
- Davis KL, Kahn RS, Ko G und Davidson M (1991): Dopamine in schizophrenia: a review and reconceptualization. *The American journal of psychiatry* 148, 1474–1486
- Dean B, McLeod M, Keriakous D, McKenzie J und Scarr E (2002): Decreased muscarinic1 receptors in the dorsolateral prefrontal cortex of subjects with schizophrenia. *Molecular psychiatry* 7, 1083–1091
- Delawalla Z, Csernansky JG und Barch DM (2008): Prefrontal cortex function in nonpsychotic siblings of individuals with schizophrenia. *Biological psychiatry* 63, 490–497
- D’Esposito M, Detre JA, Alsop DC, Shin RK, Atlas S und Grossman M (1995): The neural basis of the central executive system of working memory. *Nature* 378, 279–281
- DGPPN (2006): *S3-Behandlungsleitlinie Schizophrenie, Band I; hrsg. Deutsche Gesellschaft für Psychiatrie, Psychotherapie und Nervenheilkunde*. Steinkopff Verlag Darmstadt 2006, Darmstadt. ISBN 3798515980 9783798515987
- Dong E, Agis-Balboa RC, Simonini MV, Grayson DR, Costa E und Guidotti A (2005): Reelin and glutamic acid decarboxylase 67 promoter remodeling in an epigenetic methionine-induced mouse model of schizophrenia. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 102, 12578
- Dong E, Nelson M, Grayson DR, Costa E und Guidotti A (2008): Clozapine and sulpiride but not haloperidol or olanzapine activate brain DNA demethylation. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105, 13614–13619
- Dracheva S, McGurk SR und Haroutunian V (2005): mRNA expression of AMPA receptors and AMPA receptor binding proteins in the cerebral cortex of elderly schizophrenics. *Journal of neuroscience research* 79, 868–878
- Eastwood SL, McDonald B, Burnet PW, Beckwith JP, Kerwin RW und Harrison PJ (1995): Decreased expression of mRNAs encoding non-NMDA glutamate receptors GluR1 and GluR2 in medial temporal lobe neurons in schizophrenia. *Brain research Molecular brain research* 29, 211–223

- Ellis JR, Ellis KA, Bartholomeusz CF, Harrison BJ, Wesnes KA, Erskine FF, Vitetta L und Nathan PJ (2006): Muscarinic and nicotinic receptors synergistically modulate working memory and attention in humans. *The international journal of neuropsychopharmacology / official scientific journal of the Collegium Internationale Neuropsychopharmacologicum (CINP)* 9, 175–189
- Elvevåg B und Goldberg T (2000): Cognitive impairment in schizophrenia is the core of the disorder. *Critical reviews in neurobiology* 14, 1
- Emsley R, Rabinowitz J und Medori R (2006): Time course for antipsychotic treatment response in first-episode schizophrenia. *The American journal of psychiatry* 163, 743–745
- Ennaceur A und Delacour J (1988): A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats. 1: Behavioral data. *Behavioural Brain Research* 31, 47–59
- Fallon JH, Opole IO und Potkin SG (2003): The neuroanatomy of schizophrenia: circuitry and neurotransmitter systems. *Clinical Neuroscience Research* 3, 77–107
- Farber NB (2003): The NMDA receptor hypofunction model of psychosis. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1003, 119–130
- Ferrier IN, Stanton BR, Kelly TP und Scott J (1999): Neuropsychological function in euthymic patients with bipolar disorder. *The British journal of psychiatry: the journal of mental science* 175, 246–251
- Fischer A, Sananbenesi F, Wang X, Dobbin M und Tsai LH (2007): Recovery of learning and memory is associated with chromatin remodelling. *Nature* 447, 178–182
- Fitzgerald LW, Deutch AY, Gasic G, Heinemann SF und Nestler EJ (1995): Regulation of cortical and subcortical glutamate receptor subunit expression by antipsychotic drugs. *The Journal of neuroscience* 15, 2453–2461
- Fleming K, Goldberg TE, Binks S, Randolph C, Gold JM und Weinberger DR (1997): Visuospatial working memory in patients with schizophrenia. *Biological psychiatry* 41, 43–49
- Fleming K, Goldberg TE, Gold JM und Weinberger DR (1995): Verbal working memory dysfunction in schizophrenia: use of a brown-peterson paradigm. *Psychiatry research* 56, 155–161

- Fontán-Lozano A, Romero-Granados R, Troncoso J, Múnera A, Delgado-García J und Carrión AM (2008): Histone deacetylase inhibitors improve learning consolidation in young and in KA-induced-neurodegeneration and SAMP-8-mutant mice. *Molecular and cellular neurosciences* 39, 193–201
- Foss RD, Guha-Thakurta N, Conran RM und Gutman P (1994): Effects of fixative and fixation time on the extraction and polymerase chain reaction amplification of RNA from paraffin-embedded tissue. comparison of two housekeeping gene mRNA controls. *Diagnostic Molecular Pathology: The American Journal of Surgical Pathology, Part B* 3, 148–155
- Frey S und Frey JU (2008): 'Synaptic tagging' and 'cross-tagging' and related associative reinforcement processes of functional plasticity as the cellular basis for memory formation. *Progress in brain research* 169, 117–143
- Fuks F, Burgers WA, Brehm A, Hughes-Davies L und Kouzarides T (2000): DNA methyltransferase dnmt1 associates with histone deacetylase activity. *Nature genetics* 24, 88–91
- Fukuchi M, Nii T, Ishimaru N, Minamino A, Hara D, Takasaki I, Tabuchi A und Tsuda M (2009): Valproic acid induces up- or down-regulation of gene expression responsible for the neuronal excitation and inhibition in rat cortical neurons through its epigenetic actions. *Neuroscience research* 65, 35–43
- Fusar-Poli P und Politi P (2008): Paul eugen bleuler and the birth of schizophrenia (1908). *American Journal of Psychiatry* 165, 1407–1407
- Fuster JM und Alexander GE (1971): Neuron activity related to short-term memory. *Science* 173, 652–654
- Gao WJ, Wang Y und Goldman-Rakic PS (2003): Dopamine modulation of perisomatic and peridendritic inhibition in prefrontal cortex. *The Journal of neuroscience* 23, 1622–1630
- Gavin DP, Kartan S, Chase K, Grayson DR und Sharma RP (2008): Reduced baseline acetylated histone 3 levels, and a blunted response to HDAC inhibition in lymphocyte cultures from schizophrenia subjects. *Schizophrenia Research* 103, 330–332
- Gavin DP, Rosen C, Chase K, Grayson DR, Tun N und Sharma RP (2009): Dimethylated lysine 9 of histone 3 is elevated in schizophrenia and exhibits a divergent response to histone

- deacetylase inhibitors in lymphocyte cultures. *Journal of Psychiatry & Neuroscience: JPN* 34, 232–237
- Glaser KB, Staver MJ, Waring JF, Stender J, Ulrich RG und Davidsen SK (2003): Gene expression profiling of multiple histone deacetylase (HDAC) inhibitors: defining a common gene set produced by HDAC inhibition in t24 and MDA carcinoma cell lines. *Molecular cancer therapeutics* 2, 151–163
- Gogtay N, Giedd JN, Lusk L, Hayashi KM, Greenstein D, Vaituzis AC, Nugent 3rd TF, Herman DH, Clasen LS, Toga AW et al. (2004): Dynamic mapping of human cortical development during childhood through early adulthood. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 101, 8174–8179
- Gold JM (2004): Cognitive deficits as treatment targets in schizophrenia. *Schizophrenia Research* 72, 21–28
- Goldman-Rakic PS (1990): Cellular and circuit basis of working memory in prefrontal cortex of nonhuman primates. *Progress in brain research* 85, 325–335; discussion 335–336
- Goldman-Rakic PS (1999): The physiological approach: functional architecture of working memory and disordered cognition in schizophrenia. *Biological Psychiatry* 46, 650–661
- Gonzalez-Burgos G, Fish KN und Lewis DA (2011): GABA neuron alterations, cortical circuit dysfunction and cognitive deficits in schizophrenia. *Neural plasticity* 2011, 723184
- González-Albo MC, Elston GN und DeFelipe J (2001): The human temporal cortex: characterization of neurons expressing nitric oxide synthase, neuropeptides and calcium-binding proteins, and their glutamate receptor subunit profiles. *Cerebral cortex* 11, 1170–1181
- Gottesman II und Gould TD (2003): The endophenotype concept in psychiatry: etymology and strategic intentions. *The American journal of psychiatry* 160, 636–645
- Graef S, Schönknecht P, Sabri O und Hegerl U (2011): Cholinergic receptor subtypes and their role in cognition, emotion, and vigilance control: An overview of preclinical and clinical findings. *Psychopharmacology* 215
- Grayson DR, Chen Y, Costa E, Dong E, Guidotti A, Kundakovic M und Sharma RP (2006): The human reelin gene: Transcription factors (+), repressors (–) and the methylation switch (+/–) in schizophrenia. *Pharmacology & Therapeutics* 111, 272–286

- Grayson DR, Jia X, Chen Y, Sharma RP, Mitchell CP, Guidotti A und Costa E (2005): Reelin promoter hypermethylation in schizophrenia. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 102, 9341–9346
- Grayson DR, Kundakovic M und Sharma RP (2010): Is there a future for histone deacetylase inhibitors in the pharmacotherapy of psychiatric disorders? *Molecular pharmacology* 77, 126–135
- Green EK, Raybould R, Macgregor S, Gordon-Smith K, Heron J, Hyde S, Grozeva D, Hamshere M, Williams N, Owen MJ et al. (2005): Operation of the schizophrenia susceptibility gene, neuregulin 1, across traditional diagnostic boundaries to increase risk for bipolar disorder. *Archives of general psychiatry* 62, 642–648
- Gruber O, Gruber E und Falkai P (2005): [neural correlates of working memory deficits in schizophrenic patients. ways to establish neurocognitive endophenotypes of psychiatric disorders]. *Der Radiologe* 45, 153–160
- Guan JS, Haggarty SJ, Giacometti E, Dannenberg JH, Joseph N, Gao J, Nieland TJF, Zhou Y, Wang X, Mazitschek R et al. (2009): HDAC2 negatively regulates memory formation and synaptic plasticity. *Nature* 459, 55–60
- Guidotti A, Auta J, Chen Y, Davis JM, Dong E, Gavin DP, Grayson DR, Matrisciano F, Pinna G, Satta R et al. (2010): Epigenetic GABAergic targets in schizophrenia and bipolar disorder. *Neuropharmacology* 60
- Guidotti A, Auta J, Davis JM, Gerevini VD, Dwivedi Y, Grayson DR, Impagnatiello F, Pandey G, Pesold C, Sharma R et al. (2000): Decrease in reelin and glutamic acid decarboxylase₆₇ (GAD67) expression in schizophrenia and bipolar disorder: a postmortem brain study. *Archives of general psychiatry* 57, 1061
- Hammond JC, Meador-Woodruff JH, Haroutunian V und McCullumsmith RE (2012): Ampa receptor subunit expression in the endoplasmic reticulum in frontal cortex of elderly patients with schizophrenia. *PLoS ONE* 7
- Harrison PJ und Weinberger DR (2005): Schizophrenia genes, gene expression, and neuropathology: on the matter of their convergence. *Molecular psychiatry* 10, 40–68

- Harvey PD, Koren D, Reichenberg A und Bowie CR (2006): Negative symptoms and cognitive deficits: What is the nature of their relationship? *Schizophrenia Bulletin* 32, 250–258
- Havekes R, Abel T und Van der Zee EA (2011): The cholinergic system and neostriatal memory functions. *Behavioural brain research* 221, 412–423
- Healy DJ, Haroutunian V, Powchik P, Davidson M, Davis KL, Watson SJ und Meador-Woodruff JH (1998): AMPA receptor binding and subunit mRNA expression in prefrontal cortex and striatum of elderly schizophrenics. *Neuropsychopharmacology: official publication of the American College of Neuropsychopharmacology* 19, 278–286
- Healy DJ und Meador-Woodruff JH (1997): Clozapine and haloperidol differentially affect AMPA and kainate receptor subunit mRNA levels in rat cortex and striatum. *Brain Research Molecular Brain Research* 47, 331–338
- Howard MW, Rizzuto DS, Caplan JB, Madsen JR, Lisman J, Aschenbrenner-Scheibe R, Schulze-Bonhage A und Kahana MJ (2003): Gamma oscillations correlate with working memory load in humans. *Cerebral cortex* 13, 1369–1374
- Huang HS und Akbarian S (2007): GAD1 mRNA expression and DNA methylation in prefrontal cortex of subjects with schizophrenia. *PloS one* 2, e809
- Huang HS, Matevosian A, Whittle C, Kim SY, Schumacher A, Baker SP und Akbarian S (2007): Prefrontal dysfunction in schizophrenia involves mixed-lineage leukemia 1-regulated histone methylation at GABAergic gene promoters. *The Journal of neuroscience* 27, 11254–11262
- Hyde TM und Crook JM (2001): Cholinergic systems and schizophrenia: primary pathology or epiphenomena? *Journal of chemical neuroanatomy* 22, 53–63
- Ibrahim HM, Hogg J A J, Healy DJ, Haroutunian V, Davis KL und Meador-Woodruff JH (2000): Ionotropic glutamate receptor binding and subunit mRNA expression in thalamic nuclei in schizophrenia. *The American journal of psychiatry* 157, 1811–1823
- Impagnatiello F, Guidotti AR, Pesold C, Dwivedi Y, Caruncho H, Pisu MG, Uzunov DP, Smalheiser NR, Davis JM, Pandey GN et al. (1998): A decrease of reelin expression as a putative vulnerability factor in schizophrenia. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 95, 15718–15723

- Ioshikhes IP und Zhang MQ (2000): Large-scale human promoter mapping using CpG islands. *Nature Genetics* 26, 61–63
- Isohanni M, Jones P, Kemppainen L, Croudace T, Isohanni I, Veijola J, Räsänen S, Wahlberg KE, Tienari P und Rantakallio P (2000): Childhood and adolescent predictors of schizophrenia in the northern finland 1966 birth cohort—a descriptive life-span model. *European archives of psychiatry and clinical neuroscience* 250, 311–319
- Iwamoto K, Bundo M, Yamada K, Takao H, Iwayama-Shigeno Y, Yoshikawa T und Kato T (2005): DNA methylation status of SOX10 correlates with its downregulation and oligodendrocyte dysfunction in schizophrenia. *The Journal of Neuroscience* 25, 5376–5381
- Iwata N, Kozuka M, Hara T, Kanek T, Tonohiro T, Sugimoto M, Niitsu Y, Kondo Y, Yamamoto T, Sakai J et al. (2000): Activation of cerebral function by CS-932, a functionally selective m1 partial agonist: neurochemical characterization and pharmacological studies. *Japanese journal of pharmacology* 84, 266–280
- Jakovcevski M, Bharadwaj R, Straubhaar J, Gao G, Gavin DP, Jakovcevski I, Mitchell AC und Akbarian S (2013): Prefrontal cortical dysfunction after overexpression of histone deacetylase 1. *Biological psychiatry* 74, 696–705
- Javitt DC und Zukin SR (1991): Recent advances in the phencyclidine model of schizophrenia. *The American journal of psychiatry* 148, 1301–1308
- Jenuwein T und Allis CD (2001): Translating the histone code. *Science (New York, NY)* 293, 1074–1080
- Jones CA, Watson DJG und Fone KCF (2011): Animal models of schizophrenia. *British journal of pharmacology* 164, 1162–1194
- Jonides J, Smith EE, Koeppe RA, Awh E, Minoshima S und Mintun MA (1993): Spatial working memory in humans as revealed by PET. *Nature* 363, 623–625
- Kandel ER, Schwartz JH und Jessell TM (2000): *Principles of neural science*. McGraw-Hill, Health Professions Division 2000, New York, 4th ed edition. ISBN 0838577016
- Kazantsev AG und Thompson LM (2008): Therapeutic application of histone deacetylase inhibitors for central nervous system disorders. *Nature Reviews Drug Discovery* 7, 854–868

- Khan N, Jeffers M, Kumar S, Hackett C, Boldog F, Khramtsov N, Qian X, Mills E, Berghs SC, Carey N et al. (2008): Determination of the class and isoform selectivity of small-molecule histone deacetylase inhibitors. *The Biochemical journal* 409, 581–589
- Kirrane RM, Mitropoulou V, Nunn M, Silverman J und Siever LJ (2001): Physostigmine and cognition in schizotypal personality disorder. *Schizophrenia Research* 48, 1–5
- Klose RJ und Bird AP (2006): Genomic dna methylation: the mark and its mediators. *Trends in Biochemical Sciences* 31, 89–97
- Kolluri N, Sun Z, Sampson AR und Lewis DA (2005): Lamina-specific reductions in dendritic spine density in the prefrontal cortex of subjects with schizophrenia. *The American journal of psychiatry* 162, 1200–1202
- Kornhuber HH, Kornhuber J, Kim JS und Kornhuber ME (1984): A biochemical theory of schizophrenia. *Der Nervenarzt* 55, 602–606
- Korzus E, Rosenfeld MG und Mayford M (2004): CBP histone acetyltransferase activity is a critical component of memory consolidation. *Neuron* 42, 961–972
- Koshibu K, Gräff J, Beullens M, Heitz FD, Berchtold D, Russig H, Farinelli M, Bollen M und Mansuy IM (2009): Protein phosphatase 1 regulates the histone code for long-term memory. *The Journal of neuroscience* 29, 13079–13089
- Kouzarides T (2007): Chromatin modifications and their function. *Cell* 128, 693–705
- Kruh J (1982): Effects of sodium butyrate, a new pharmacological agent, on cells in culture. *Molecular and cellular biochemistry* 42, 65–82
- Krystal JH, Karper LP, Seibyl JP, Freeman GK, Delaney R, Bremner JD, Heninger GR, Bowers J M B und Charney DS (1994): Subanesthetic effects of the noncompetitive NMDA antagonist, ketamine, in humans. psychotomimetic, perceptual, cognitive, and neuroendocrine responses. *Archives of general psychiatry* 51, 199–214
- Kundakovic M, Chen Y, Guidotti A und Grayson DR (2009): The reelin and GAD67 promoters are activated by epigenetic drugs that facilitate the disruption of local repressor complexes. *Molecular pharmacology* 75, 342

- Laemmli UK (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage t4. *Nature* 227, 680
- Lederbogen F, Kirsch P, Haddad L, Streit F, Tost H, Schuch P, Wüst S, Pruessner JC, Rietschel M, Deuschle M et al. (2011): City living and urban upbringing affect neural social stress processing in humans. *Nature* 474, 498–501
- Levenson JM, O’Riordan KJ, Brown KD, Trinh MA, Molfese DL und Sweatt JD (2004): Regulation of histone acetylation during memory formation in the hippocampus. *The Journal of Biological Chemistry* 279, 40545–40559
- Levenson JM, Roth TL, Lubin FD, Miller CA, Huang IC, Desai P, Malone LM und Sweatt JD (2006): Evidence that DNA (cytosine-5) methyltransferase regulates synaptic plasticity in the hippocampus. *The Journal of Biological Chemistry* 281, 15763–15773
- Levenson JM und Sweatt JD (2005): Epigenetic mechanisms in memory formation. *Nature Reviews Neuroscience* 6, 108–118
- Lewis DA und Levitt P (2002): Schizophrenia as a disorder of neurodevelopment. *Annual review of neuroscience* 25, 409–432
- Lewis DA und Lieberman JA (2000): Catching up on schizophrenia: natural history and neurobiology. *Neuron* 28, 325–334
- Lewis DA und Sweet RA (2009): Schizophrenia from a neural circuitry perspective: advancing toward rational pharmacological therapies. *The Journal of clinical investigation* 119, 706–716
- Li J, Guo Y, Schroeder FA, Youngs RM, Schmidt TW, Ferris C, Konradi C und Akbarian S (2004): Dopamine d2-like antagonists induce chromatin remodeling in striatal neurons through cyclic AMP-protein kinase a and NMDA receptor signaling. *Journal of neurochemistry* 90, 1117–1131
- Lieberman JA, Kane JM und Alvir J (1987): Provocative tests with psychostimulant drugs in schizophrenia. *Psychopharmacology* 91, 415–433
- Lisman JE und Idiart MA (1995): Storage of 7 +/- 2 short-term memories in oscillatory subcycles. *Science* 267, 1512–1515

- Lu L, Mamiya T, Koseki T, Mouri A und Nabeshima T (2011): Genetic animal models of schizophrenia related with the hypothesis of abnormal neurodevelopment. *Biological & pharmaceutical bulletin* 34, 1358–1363
- Lynch G (2002): Memory enhancement: the search for mechanism-based drugs. *Nature neuroscience* 5 Suppl, 1035–1038
- Malaspina D (2001): Paternal factors and schizophrenia risk: de novo mutations and imprinting. *Schizophrenia bulletin* 27, 379–393
- Malkoff A, Weizman A, Gozes I und Rehavi M (2008): Decreased m1 muscarinic receptor density in rat amphetamine model of schizophrenia is normalized by clozapine, but not haloperidol. *Journal of neural transmission* 115, 1563–1571
- Mancama D, Arranz MJ, Landau S und Kerwin R (2003): Reduced expression of the muscarinic 1 receptor cortical subtype in schizophrenia. *American journal of medical genetics Part B, Neuropsychiatric genetics: the official publication of the International Society of Psychiatric Genetics* 119B, 2–6
- Manoach DS (2003): Prefrontal cortex dysfunction during working memory performance in schizophrenia: reconciling discrepant findings. *Schizophrenia research* 60, 285–298
- Marenco S, Stein JL, Savostyanova AA, Sambataro F, Tan HY, Goldman AL, Verchinski BA, Barnett AS, Dickinson D, Apud JA et al. (2012): Investigation of anatomical thalamo-cortical connectivity and FMRI activation in schizophrenia. *Neuropsychopharmacology* 37, 499–507
- Martin LJ, Blackstone CD, Levey AI, Haganir RL und Price DL (1993): AMPA glutamate receptor subunits are differentially distributed in rat brain. *Neuroscience* 53, 327–358
- Martin SJ, Grimwood PD und Morris RG (2000): Synaptic plasticity and memory: an evaluation of the hypothesis. *Annual review of neuroscience* 23, 649–711
- McGue M und Gottesman II (1989): Genetic linkage in schizophrenia: Perspectives from genetic epidemiology. *Schizophrenia Bulletin* 15, 453–464
- Meador-Woodruff JH und Healy DJ (2000): Glutamate receptor expression in schizophrenic brain. *Brain research Brain research reviews* 31, 288–294

- Melas PA, Rogdaki M, Ösby U, Schalling M, Lavebratt C und Ekström TJ (2012): Epigenetic aberrations in leukocytes of patients with schizophrenia: association of global DNA methylation with antipsychotic drug treatment and disease onset. *FASEB journal* 26, 2712–2718
- Meltzer HY und McGurk SR (1999): The effects of clozapine, risperidone, and olanzapine on cognitive function in schizophrenia. *Schizophrenia bulletin* 25, 233–255
- Mill J, Tang T, Kaminsky Z, Khare T, Yazdanpanah S, Bouchard L, Jia P, Assadzadeh A, Flanagan J, Schumacher A et al. (2008): Epigenomic profiling reveals DNA-methylation changes associated with major psychosis. *American journal of human genetics* 82, 696–711
- Miller CA und Sweatt JD (2007): Covalent modification of DNA regulates memory formation. *Neuron* 53, 857–869
- Mitchell CP, Chen Y, Kundakovic M, Costa E und Grayson DR (2005): Histone deacetylase inhibitors decrease reelin promoter methylation in vitro. *Journal of Neurochemistry* 93, 483–492
- Monsey MS, Ota KT, Akingbade IF, Hong ES und Schafe GE (2011): Epigenetic alterations are critical for fear memory consolidation and synaptic plasticity in the lateral amygdala. *PloS one* 6, e19958
- Morris R (1984): Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. *Journal of Neuroscience Methods* 11, 47–60
- Mosbacher J, Schoepfer R, Monyer H, Burnashev N, Seeburg PH und Ruppertsberg JP (1994): A molecular determinant for submillisecond desensitization in glutamate receptors. *Science* 266, 1059–1062
- Mrzljak L, Pappy M, Leranth C und Goldman-Rakic PS (1995): Cholinergic synaptic circuitry in the macaque prefrontal cortex. *The Journal of comparative neurology* 357, 603–617
- Narayan S, Tang B, Head SR, Gilmartin TJ, Sutcliffe JG, Dean B und Thomas EA (2008): Molecular profiles of schizophrenia in the CNS at different stages of illness. *Brain research* 1239, 235–248

- Noga JT, Hyde TM, Bachus SE, Herman MM und Kleinman JE (2001): AMPA receptor binding in the dorsolateral prefrontal cortex of schizophrenics and controls. *Schizophrenia research* 48, 361–363
- Numakawa T, Yagasaki Y, Ishimoto T, Okada T, Suzuki T, Iwata N, Ozaki N, Taguchi T, Tatsumi M, Kamijima K et al. (2004): Evidence of novel neuronal functions of dysbindin, a susceptibility gene for schizophrenia. *Human molecular genetics* 13, 2699–2708
- O'Connor JA und Hemby SE (2007): Elevated GRIA1 mRNA expression in layer II/III and v pyramidal cells of the DLPFC in schizophrenia. *Schizophrenia research* 97, 277–288
- O'Connor JA, Muly EC, Arnold SE und Hemby SE (2007): AMPA receptor subunit and splice variant expression in the DLPFC of schizophrenic subjects and rhesus monkeys chronically administered antipsychotic drugs. *Schizophrenia research* 90, 28–40
- Olesen PJ, Westerberg H und Klingberg T (2004): Increased prefrontal and parietal activity after training of working memory. *Nature neuroscience* 7, 75–79
- Patel SS, Attard A, Jacobsen P und Shergill S (2010): Acetylcholinesterase inhibitors (AChEI's) for the treatment of visual hallucinations in schizophrenia: a case report. *BMC psychiatry* 10, 68
- Patterson SL, Pittenger C, Morozov A, Martin KC, Scanlin H, Drake C und Kandel ER (2001): Some forms of cAMP-mediated long-lasting potentiation are associated with release of BDNF and nuclear translocation of phospho-MAP kinase. *Neuron* 32, 123–140
- Paulesu E, Frith CD und Frackowiak RS (1993): The neural correlates of the verbal component of working memory. *Nature* 362, 342–345
- Peleg S, Sananbenesi F, Zovoilis A, Burkhardt S, Bahari-Javan S, Agis-Balboa RC, Cota P, Wittnam JL, Gogol-Doering A, Opitz L et al. (2010): Altered histone acetylation is associated with age-dependent memory impairment in mice. *Science (New York, NY)* 328, 753–756
- Perlstein WM, Carter CS, Noll DC und Cohen JD (2001): Relation of prefrontal cortex dysfunction to working memory and symptoms in schizophrenia. *The American journal of psychiatry* 158, 1105–1113

- Peterson CL und Laniel MA (2004): Histones and histone modifications. *Current biology: CB* 14, R546–551
- Powell CM und Miyakawa T (2006): Schizophrenia-relevant behavioral testing in rodent models: a uniquely human disorder? *Biological psychiatry* 59, 1198–1207
- Raedler TJ, Knable MB, Jones DW, Urbina RA, Egan MF und Weinberger DR (2003a): Central muscarinic acetylcholine receptor availability in patients treated with clozapine. *Neuropsychopharmacology: official publication of the American College of Neuropsychopharmacology* 28, 1531–1537
- Raedler TJ, Knable MB, Jones DW, Urbina RA, Gorey JG, Lee KS, Egan MF, Coppola R und Weinberger DR (2003b): In vivo determination of muscarinic acetylcholine receptor availability in schizophrenia. *The American journal of psychiatry* 160, 118–127
- Rao SG, Williams GV und Goldman-Rakic PS (1999): Isodirectional tuning of adjacent interneurons and pyramidal cells during working memory: evidence for microcolumnar organization in PFC. *Journal of neurophysiology* 81, 1903–1916
- Ricobaraza A, Cuadrado-Tejedor M, Pérez-Mediavilla A, Frechilla D, Del Río J und García-Osta A (2009): Phenylbutyrate ameliorates cognitive deficit and reduces tau pathology in an alzheimer's disease mouse model. *Neuropsychopharmacology: Official Publication of the American College of Neuropsychopharmacology* 34, 1721–1732
- Rios Valentim J Saavedra José, Gontijo AVL, Peres MD, Rodrigues LCdM und Nakamura-Palacios EM (2009): D1 dopamine and NMDA receptors interactions in the medial prefrontal cortex: modulation of spatial working memory in rats. *Behavioural brain research* 204, 124–128
- Robinson L, Platt B und Riedel G (2011): Involvement of the cholinergic system in conditioning and perceptual memory. *Behavioural brain research* 221, 443–465
- van Rossum JM (1966): The significance of dopamine-receptor blockade for the mechanism of action of neuroleptic drugs. *Archives internationales de pharmacodynamie et de thérapie* 160, 492–494
- Ryu H, Smith K, Camelo SI, Carreras I, Lee J, Iglesias AH, Dangond F, Cormier KA, Cudkovicz ME, Brown RH et al. (2005): Sodium phenylbutyrate prolongs survival and regulates

- expression of anti-apoptotic genes in transgenic amyotrophic lateral sclerosis mice. *Journal of Neurochemistry* 93, 1087–1098
- Sanderson DJ, McHugh SB, Good MA, Sprengel R, Seeburg PH, Rawlins JNP und Bannerman DM (2010): Spatial working memory deficits in GluA1 AMPA receptor subunit knockout mice reflect impaired short-term habituation: evidence for wagner's dual-process memory model. *Neuropsychologia* 48, 2303–2315
- Scarr E, Gibbons AS, Neo J, Udawela M und Dean B (2013): Cholinergic connectivity: it's implications for psychiatric disorders. *Frontiers in cellular neuroscience* 7, 55
- Schones DE und Zhao K (2008): Genome-wide approaches to studying chromatin modifications. *Nature reviews Genetics* 9, 179–191
- Schretlen DJ, Cascella NG, Meyer SM, Kingery LR, Testa SM, Munro CA, Pulver AE, Rivkin P, Rao VA, Diaz-Asper CM et al. (2007): Neuropsychological functioning in bipolar disorder and schizophrenia. *Biological psychiatry* 62, 179–186
- Sharma RP, Grayson DR und Gavin DP (2008): Histone deacetylase 1 expression is increased in the prefrontal cortex of schizophrenia subjects: analysis of the national brain databank microarray collection. *Schizophrenia Research* 98, 111–117
- Sharma RP, Rosen C, Kartan S, Guidotti A, Costa E, Grayson DR und Chase K (2006): Valproic acid and chromatin remodeling in schizophrenia and bipolar disorder: preliminary results from a clinical population. *Schizophrenia Research* 88, 227–231
- Shekhar A, Potter WZ, Lightfoot J, Lienemann J, Dubé S, Mallinckrodt C, Bymaster FP, McKinzie DL und Felder CC (2008): Selective muscarinic receptor agonist xanomeline as a novel treatment approach for schizophrenia. *The American Journal of Psychiatry* 165, 1033–1039
- Shimabukuro M, Jinno Y, Fuke C und Okazaki Y (2006): Haloperidol treatment induces tissue- and sex-specific changes in DNA methylation: a control study using rats. *Behavioral and brain functions: BBF* 2, 37
- Shimabukuro M, Sasaki T, Imamura A, Tsujita T, Fuke C, Umekage T, Tochigi M, Hiramatsu K, Miyazaki T, Oda T et al. (2007): Global hypomethylation of peripheral leukocyte DNA

- in male patients with schizophrenia: a potential link between epigenetics and schizophrenia. *Journal of Psychiatric Research* 41, 1042–1046
- Siegel M, Warden MR und Miller EK (2009): Phase-dependent neuronal coding of objects in short-term memory. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106, 21341–21346
- Siegmund KD, Connor CM, Campan M, Long TI, Weisenberger DJ, Biniszkiwicz D, Jaenisch R, Laird PW und Akbarian S (2007): DNA methylation in the human cerebral cortex is dynamically regulated throughout the life span and involves differentiated neurons. *PloS one* 2, e895
- Silver H, Feldman P, Bilker W und Gur RC (2003): Working memory deficit as a core neuropsychological dysfunction in schizophrenia. *The American journal of psychiatry* 160, 1809–1816
- Silvers JM, Harrod SB, Mactutus CF und Booze RM (2007): Automation of the novel object recognition task for use in adolescent rats. *Journal of neuroscience methods* 166, 99–103
- Simonini MV (2006): The benzamide MS-275 is a potent, long-lasting brain region-selective inhibitor of histone deacetylases. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103, 1587–1592
- Sokolov BP (1998): Expression of NMDAR1, GluR1, GluR7, and KA1 glutamate receptor mRNAs is decreased in frontal cortex of "neuroleptic-free" schizophrenics: evidence on reversible up-regulation by typical neuroleptics. *Journal of Neurochemistry* 71, 2454–2464
- Spurney CF, Baca SM, Murray AM, Jaskiw GE, Kleinman JE und Hyde TM (1999): Differential effects of haloperidol and clozapine on ionotropic glutamate receptors in rats. *Synapse* 34, 266–276
- Stadler F, Kolb G, Rubusch L, Baker SP, Jones EG und Akbarian S (2005): Histone methylation at gene promoters is associated with developmental regulation and region-specific expression of ionotropic and metabotropic glutamate receptors in human brain. *Journal of Neurochemistry* 94, 324–336
- Stefanko DP, Barrett RM, Ly AR, Reolon GK und Wood MA (2009): Modulation of long-term memory for object recognition via HDAC inhibition. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106, 9447–9452

- Sullivan PF, Kendler KS und Neale MC (2003): Schizophrenia as a complex trait: evidence from a meta-analysis of twin studies. *Archives of general psychiatry* 60, 1187–1192
- Sweatt JD (2009): Experience-dependent epigenetic modifications in the central nervous system. *Biological psychiatry* 65, 191–197
- Szeszko PR, Goldberg E, Gunduz-Bruce H, Ashtari M, Robinson D, Malhotra AK, Lencz T, Bates J, Crandall DT, Kane JM et al. (2003): Smaller anterior hippocampal formation volume in antipsychotic-naive patients with first-episode schizophrenia. *The American journal of psychiatry* 160, 2190–2197
- Takai D und Jones PA (2002): Comprehensive analysis of CpG islands in human chromosomes 21 and 22. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 99, 3740–3745
- Tan HY, Choo WC, Fones CSL und Chee MWL (2005): fMRI study of maintenance and manipulation processes within working memory in first-episode schizophrenia. *The American journal of psychiatry* 162, 1849–1858
- Tandon R, Mann NA, Eisner WH und Coppard N (1990): Effect of anticholinergic medication on positive and negative symptoms in medication-free schizophrenic patients. *Psychiatry research* 31, 235–241
- Tang B, Dean B und Thomas EA (2011): Disease- and age-related changes in histone acetylation at gene promoters in psychiatric disorders. *Translational Psychiatry* 1, e64
- Tarantino IS, Sharp RF, Geyer MA, Meves JM und Young JW (2011): Working memory span capacity improved by a D2 but not D1 receptor family agonist. *Behavioural brain research* 219, 181–188
- Timofeeva OA und Levin ED (2011): Glutamate and nicotinic receptor interactions in working memory: importance for the cognitive impairment of schizophrenia. *Neuroscience* 195, 21–36
- Tochigi M, Iwamoto K, Bundo M, Komori A, Sasaki T, Kato N und Kato T (2008): Methylation status of the reelin promoter region in the brain of schizophrenic patients. *Biological Psychiatry* 63, 530–533

- Tremolizzo L, Carboni G, Ruzicka WB, Mitchell CP, Sugaya I, Tueting P, Sharma R, Grayson DR, Costa E und Guidotti A (2002): An epigenetic mouse model for molecular and behavioral neuropathologies related to schizophrenia vulnerability. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 99, 17095–17100
- Tsankova N, Renthal W, Kumar A und Nestler EJ (2007): Epigenetic regulation in psychiatric disorders. *Nature Reviews Neuroscience* 8, 355–367
- Veldic M, Caruncho HJ, Liu WS, Davis J, Satta R, Grayson DR, Guidotti A und Costa E (2004): Dna-methyltransferase 1 mRNA is selectively overexpressed in telencephalic GABAergic interneurons of schizophrenia brains. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 101, 348–353
- Vickers JC, Huntley GW, Edwards AM, Moran T, Rogers SW, Heinemann SF und Morrison JH (1993): Quantitative localization of AMPA/kainate and kainate glutamate receptor subunit immunoreactivity in neurochemically identified subpopulations of neurons in the prefrontal cortex of the macaque monkey. *The Journal of neuroscience* 13, 2982–2992
- Volk DW und Lewis DA (2010): Prefrontal cortical circuits in schizophrenia. *Current Topics in Behavioral Neurosciences* 4, 485–508
- Voss B, Thienel R, Leucht S und Kircher T (2008): [therapy of cognitive deficits in schizophrenia with acetylcholinesterase inhibitors. a systematic overview]. *Der Nervenarzt* 79, 47–48, 50–52, 54–59
- Weinberger DR (1987): Implications of normal brain development for the pathogenesis of schizophrenia. *Archives of general psychiatry* 44, 660–669
- Weinberger DR, Berman KF und Zec RF (1986): Physiologic dysfunction of dorsolateral prefrontal cortex in schizophrenia. i. regional cerebral blood flow evidence. *Archives of general psychiatry* 43, 114–124
- Weiner DM, Levey AI und Brann MR (1990): Expression of muscarinic acetylcholine and dopamine receptor mRNAs in rat basal ganglia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 87, 7050–7054
- Wyatt RJ, Termini BA und Davis J (1971): Biochemical and sleep studies of schizophrenia: A review of the literature-1960-1970. part i. biochemical studies. *Schizophrenia Bulletin* 1, 10–44

Zhang Z, Schwartz S, Wagner L und Miller W (2000): A greedy algorithm for aligning DNA sequences. *Journal of Computational Biology: A Journal of Computational Molecular Cell Biology* 7, 203–214

Zhubi A, Veldic M, Puri NV, Kadriu B, Caruncho H, Loza I, Sershen H, Lajtha A, Smith RC, Guidotti A et al. (2009): An upregulation of DNA-methyltransferase 1 and 3a expressed in telencephalic GABAergic neurons of schizophrenia patients is also detected in peripheral blood lymphocytes. *Schizophrenia research* 111, 115–122

Danksagung

Ich möchte mich bei meinem Doktorvater und Betreuer Prof. Dr. rer. nat. André Fischer bedanken, da er mir das wissenschaftliche Arbeiten nahegebracht und mir jederzeit mit Ratschlägen, Kritik und motivierenden Gesprächen zur Seite gestanden hat. Des Weiteren möchte ich mich bei allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe Fischer bedanken, hier insbesondere Susanne Burkhardt, Roberto Carlos Agis-Balboa, Farahnaz Sananbenesi, Sanaz Bahari Javan, Nambirajan Govindarajan, Shahaf Peleg, Tanja Kuczera.

Ich möchte mich außerdem bei der medizinischen Fakultät der Universität Göttingen für die Förderung im Rahmen des Gö4med-Stipendiums bedanken.