

**Proteomanalyse postmortaler Hirn-und Liquorproben
von Suizidopfern versus Kontrollen**

von

Katja Schlicht

2006

Aus der Psychiatrischen Klinik
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Vorstand: Prof.Dr. H.J. Möller

**Proteomanalyse postmortalen Hirn-und Liquorproben
von Suizidopfern versus Kontrollen**

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Humanbiologie
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Katja Schlicht

aus
Hamburg

2006

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter:	Prof. Dr. med. M. Ackenheil
Mitberichterstatter:	Prof. Dr. med. H.A. Kretzschmar Prof Dr.rer.nat. R. Rupp
Mitbetreuung durch den promovierten Mitarbeiter:	Dr. rer. nat. P. Zill
Dekan:	Prof. Dr. med. D. Reinhardt
Tag der mündlichen Prüfung:	27.11.2006

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
<u>INHALTSVERZEICHNIS</u>	I
<u>VERZEICHNIS DER ABBILDUNGEN</u>	V
<u>1. EINLEITUNG</u>	1
1.1 Suizid.....	1
1.1.1 Allgemeines	1
1.1.2 Epidemiologie	2
1.1.3 Diagnose, Prävention und Behandlung	3
1.1.4 Ätiologie.....	4
1.1.5 Neurobiologie der Suizidalität	7
1.2 Proteomics	12
1.2.1 Allgemeines	12
1.2.2 Anwendung in der biologischen Psychiatrie	13
1.2.3 Methoden	15
1.3 Hirn- und Liquorproben.....	18
<u>2. ZIELSETZUNG</u>	21
2.1 Neurobiologische Fragestellung	21
2.2 Methodische Zielsetzung.....	21
<u>3. METHODEN</u>	23
3.1 Probenmaterial	24
3.1.1 Herkunft.....	24
3.1.2 Probenentnahme	25
3.2 Probenaufbereitung.....	25
3.2.1 Hirngewebe	25
3.2.2 Liquor – Optimierung der Probenaufbereitung	26
3.3 Proteinbestimmung.....	28
3.4 Zweidimensionale Gelelektrophorese	29
3.4.1. Dimension: Isoelektrische Fokussierung (IEF)	29
3.4.1.1 Prinzip.....	29
3.4.1.2 Durchführung.....	29
3.4.1.3 IEF von Hirngewebe	30
3.4.1.4 IEF von Liquor	30
3.4.2 Equilibrierung.....	32
3.4.3 2. Dimension: SDS-PAGE	32

3.4.3.1 Herstellung der SDS-Gele	33
3.4.3.2 Durchführung der SDS-Page.....	33
3.5 Färbung der 2D-Gele.....	34
3.5.1 Coomassie-Färbung nach Neuhoff (1988)	35
3.5.2 Silberfärbung	35
3.6 Bildanalyse der 2D-Gele.....	37
3.7 Identifikation der Proteine.....	38
3.7.1 Prinzip.....	38
3.7.2 In-Gel-Trypsinverdau und MALDI-TOF-MS –Messung.....	39
3.7.3 Auswertung.....	40
3.8 Reagenzien	41
3.9 Geräte	43
<u>4. ERGEBNISSE</u>	44
4.1 Allgemeines	44
4.2 Präfrontaler Cortex	45
4.2.1 Übersicht	45
4.2.2 Saures fibrilläres Gliaprotein (glial fibrillary acidic protein) (GFAP)	47
4.2.3 Mangan-Superoxid-Dismutase (SOD2)	49
4.2.4 Alpha-B-Crystallin (CRYAB)	50
4.3 Amygdala.....	53
4.3.1 Übersicht	53
4.3.2 Neurofilament Triplet L Protein (neurofilament light polypeptide (NEFL))	55
4.3.3 Beta Tubulin	56
4.3.4 Fruktose-1,6-Bisphosphat-Aldolase C (ALDC).....	60
4.3.5 Glutaminsynthetase (GLNS).....	62
4.4. Thalamus.....	66
4.4.1 Übersicht	66
4.4.2 Galectin-1 (Beta-galactoside-binding lectin L-14-I) (LEG1)	67
4.4.3 Collapsin response mediator protein 2 (CRMP2)	68
4.4.4 Alpha Enolase (ENO1)	69
4.5 Hippocampus	72
4.5.1 Übersicht	72
4.5.2 Neuropolypeptid h3 (PEBP)	72
4.5.3 Peroxiredoxin2 (PRDX2)	73
4.5.4 ATP-Synthase (ATPB).....	76

4.5.5 Gamma Enolase (ENO2).....	77
4.6 Hypophyse.....	81
4.7 Cerebellum	82
4.8 Cerebrospinale Flüssigkeit; Liquor	83
4.8.1 Übersicht	83
4.8.2 Auswertung.....	83
<u>5. DISKUSSION</u>	89
5.1 DISKUSSION DER METHODIK.....	89
5.1.1 Einleitung.....	89
5.1.2 Kritische Variablen des postmortalen Probenmaterials	90
5.1.2.1 Lateralität der Hirnregionen	90
5.1.2.2 Suizidmethode.....	90
5.1.2.3 Postmortale Liegezeit (postmortales Intervall, PMI)	91
5.1.2.4 Lebensalter.....	94
5.1.2.5 Geschlecht	94
5.1.3 Methodik.....	95
5.1.4 Zusammenfassende Bewertung.....	95
5.2 DISKUSSION DER ERGEBNISSE.....	97
5.2.1 Proteine des Intermediärstoffwechsels.....	97
5.2.1.1 Mögliche neurobiologische Folgen der veränderten Proteinexpression	99
5.2.1.1 Mögliche neurobiologische Folgen der veränderten Proteinexpression	100
a) Fructose-1,6-Bisphosphat Aldolase C (ALDC).....	100
b) Alpha Enolase (ENO1) und Gamma Enolase (ENO2)	101
c) F ₀ F ₁ -ATP-Synthase	104
d) Glutaminsynthetase (GLNS)	106
e) Galektin-1 (LEG1)	108
f) Neuropolypeptid h3 (= phosphatidylethanolamine-binding-protein) (PEBP)	108
5.2.1.2 Proteine des Intermediärstoffwechsels : Zusammenfassung und mögli...	109
che Implikation für die Pathophysiologie suizidalen Verhaltens	109
a) Glukose- und Energiestoffwechsel.....	110
b) sonstige Ergebnisse	111
c) Glia.....	111
5.2.2 Proteine des Zytoskelettes	112
5.2.2.1 Mögliche neurobiologische Folgen der Expressionsunterschiede	113
a) Beta-Tubulin.....	113

b) Beta-Aktin (ACTB).....	114
c) Neurofilament Triplet L Protein (NEFL)	114
d) Saures fibrilläres Gliaprotein (glial fibrillary acidic protein) (GFAP)	115
5.2.2.2 Proteine des Zytoskelettes. Zusammenfassung und mögliche Implikation..	117
für die Pathophysiologie suizidalen Verhaltens	117
a) Amygdala	117
b) Astroglia	117
c) Liquor.....	118
5.2.3 Antioxidationsproteine	118
5.2.3.1 Oxidativer Stress	118
5.2.3.2 Expressionsunterschiede in zwei Proteinen	119
a) Mangan-Superoxid-Dismutase (SOD2).....	119
b) Peroxiredoxin 2 (Thioredoxin-Peroxidasen) (PRDX2)	120
5.2.3.3 Proteine des Zytoskelettes: Zusammenfassung und mögliche Implikation..	121
für die Pathophysiologie suizidalen Verhaltens	121
5.2.4 Hitzeschockproteine	121
5.2.4.1 Alpha Crystallin B (CRYAB).....	121
5.2.5 Neuronenpepezifische Proteine	123
5.2.5.1 Collapsin response mediator protein 2' (CRMP2)	123
5.2.6 Hypothetisches Modell für die mögliche Implikation der veränderten.....	124
Proteinexpressionen in die Ätiopathogenese suizidalen Verhaltens	124
5.2.6.1 Einführung	124
5.2.6.2 Möglicher Einfluß von 'chronischem Streß' auf die veränderten.....	125
Proteinexpressionen.....	125
5.2.6.3 Kritikpunkte.....	128
5.2.6.4 Schlußfolgerung	129
a) Anwendung der Proteomanalyse in der neurobiologischen Suizidforschung.....	129
b) Mögliche Anwendung der Ergebnisse für die Suizidprävention und Ausblick ...	131
<u>6. ZUSAMMENFASSUNG</u>	132
<u>7. AUSBLICK</u>	134
<u>8. LITERATURVERZEICHNIS</u>	135
<u>DANKSAGUNG</u>	161
<u>CURRICULUM VITAE</u>	162

VERZEICHNIS DER ABBILDUNGEN

	Seite
Abb. 1.1	Suizidraten in Deutschland von 1980 bis 2001 im Bereich der alten und neuen Bundesländer2
Abb. 1.2	Serotonerge Synapse: Synthese, Neurotransmission und Abbau des Serotonins8
Abb. 1.3	Einwirkung von Umwelt- und intrazellulären Faktoren auf das Proteom.....12
Abb. 3.1	Versuchsablauf inklusive Vorversuchen.....22
Abb. 3.2	Optimierung der Liquoraufbereitung durch Vergleich unterschiedlicher Methoden zur Proteinaufreinigung26
Abb. 3.3	Methoden zu Proteinbestimmung im Vergleich27
Abb. 3.4	2D-Gele von Liquor; Probenauftrag per 'Cup-Loading'30
Abb. 3.5	2D-Gele von Hirngewebe (präfrontaler Cortex) nach Coomassie- und nach Silberfärbung33
Abb. 4.2.1	GFAP: Spot sp400548
Abb. 4.2.2	Bildanalyse der 2D-Gele des präfrontalen Cortex'51
Abb. 4.2.3	Präfrontaler Cortex: Spotintensitäten im Vergleich von Kontrollen und Suizidopfern52
Abb. 4.3.1	Aminosäuresequenz von NEFL.....55
Abb. 4.3.2	Positionen der Tubulin-Isoformen TUBB4 und TUBII im 2D-Gel56
Abb. 4.3.3	Proteinsequenz von TUBB457
Abb. 4.3.4	Modifikation des Spots Tubulin Beta458
Abb. 4.3.5	Bildanalyse der 2D-Gele der Amygdala59
Abb. 4.3.6	Modifikationen der Fruktose-1,6-Bisphosphat-Aldolase (ALDC).....61
Abb. 4.3.7	Modifikation der Glutaminsynthetase (GLSN)63
Abb. 4.3.8	Modifikationen der Spots von Fruktose-1,6-Bisphosphat-Aldolase (ALDC), Glutaminsynthetase (GLNS) und Beta-Tubulin (TUB).....64
Abb. 4.3.9	Amygdala: Spotintensitäten im Vergleich von Kontrollen und Suizidopfern65

Abb. 4.4.1	Bildanalyse der 2D-Gele des Thalamus	70
Abb. 4.4.2	Thalamus: Spotintensitäten im Vergleich von Kontrollen und Suizidopfern	71
Abb.4.5.1	Bildanalyse der 2D-Gele des Hippocampus	74
Abb. 4.5.2	Peroxiredoxin (PRDX2) und Neuropolypeptid h3 (PEBP)) Darstellung der Massenspektren.....	75
Abb. 4.5.3	Modifikation der ATP-Synthase (ATPB)	76
Abb. 4.5.4	Modifikation der Gamma Enolase (ENO2)	78
Abb. 4.5.5	Hippocampus: Spotintensitäten im Vergleich von Kontrollen und Suizidopfern	80
Abb. 4.6.1	Master-Gel der Hypophyse.....	81
Abb. 4.7.1	Master-Gel des Cerebellums.....	82
Abb. 4.4.1	Bildanalyse der 2D-Gele von Liquor.....	84
Abb. 5.2.1	Interaktionen zwischen Neuronen und Astrozyten im neuronalen Glukosemetabolismus	99
Abb. 5.2.2	Formation der Enolase-Untereinheiten im menschlichen Gehirn.....	102
Abb. 5.2.3	F0F1-ATP-Synthase.....	104
Abb. 5.2.4	Vergleich der Spot-Muster der ATP-Synthase	105
Abb. 5.2.5	Proteinfilamente als Komponenten des Zytoskelettes.....	112
Abb. 5.2.6.1	Möglicher Einfluß von chronischem Streß auf die Expression der identifizierten Proteine	127
Abb. 5.2.6.2	Zusammen wirken von Umweltfaktoren und prädispo- nierende Faktoren	130

ABKÜRZUNGEN

5-HTTP	Serotonin-Transporter
5-HT	Serotonin
ACTB	Beta-Aktin
ALDC	Fruktose-Bisphosphat Aldolase C
APS	Ammoniumpersulfat
ATPB	ATP-Synthase (Untereinheit B)
BSA	Bovine Serum Albumine
BTM	Betäubungsmittel
cAMP	Adenosin Monophosphat
COX	Cytochrom c Oxidase
CREB	cAMP response element binding protein
CRH	Corticotropin-Releasing-Hormon
CRMP2	Collapsin response mediator protein
CRYAB	Alpha-B-Crystallin
DTT	1,4-Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ENO1	Alpha enolase
ENO2	Gamma-Enolase, (neuronal Form)
ESI	Electrospray-Ionisation
GFAP	Saures fibrilläres Gliaprotein (glial fibrillary acidic protein)
GLNS	Glutamin-Synthetase
HIES	Hydroxyindolessigsäure
HPA-Achse	Hypothalamus-Hypophysen- Nebennieren- rinden- Achse
Hsp	Hitzeschockprotein (heat shock protein)
HVA	Homovanilinsäure
IEF	Isoelektrische Fokussierung
IPG	Immobilized pH Gradient

LEG1	Galectin-1 (Beta-galactoside-binding lectin L-14-I)
MALDI	Matrix Assisted Laser Desorption
MAO	Monoaminoxidase
MG	Molekulargewicht
MS	Massenspektrometrie
NEFL	Neurofilament Triplet L Protein
NMDA	N-methy-D-Aspartat
PAGE	Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese
PEBP	Neuropolypeptid h3 (Phosphatidyl-ethanolamine binding protein)
PFC	Präfrontaler Cortex
pI	Isoelektrischer Punkt
PMF	Peptide mass fingerprint
PMI	postmortalen Liegezeit
PRDX2	Peroxiredoxin2
PTM	posttranslationale Modifikationen
PTSD	Posttraumatische Belastungsstörung, (posttraumatic stress disorder)
ROS	Reaktive Sauerstoffverbindungen (reactive oxygen species)
SDS	Sodium dodecyl sulfat
SOD2	Mangan-Superoxid-Dismutase
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine
TOF	Time of flight
TPH	Tryptophanhydroxylase
TUBB4	Beta Tubulin
TUBII	Beta Tubulin II (class II beta tubulin isotype)
UBE2L3	Ubiquitin-konjugierendes Enzym

1. EINLEITUNG

1.1 Suizid

1.1.1 Allgemeines

Das Phänomen der Suizidalität (lat. Suizid = sui cidium = Selbsttötung) ist in allen Völkern und Kulturen und durch alle Zeitepochen hindurch bekannt (Haenel, 1989) wobei ihm unterschiedliche Stellenwerte zukamen. Erst im 19. Jahrhundert rückte der Suizid aus der rein philosophisch-religiösen Sichtweise in den medizinischen Kontext (Esquirol, 1838) und wird heute vor dem Hintergrund eines "medizinisch-psychosozialen Paradigmas" gesehen (Wolfersdorf M, 1995). Diese Sichtweise enthebt den Begriff "Freitod" seiner Bedeutung und rechtfertigt Maßnahmen zur Suizidprävention und Krisenintervention bei suizidgefährdeten Menschen.

Da es sich bei Suizidalität nicht um eine Krankheit handelt, wird sie im ICD-10-Diagnosenkatalog lediglich als potentielles Begleitsymptom bei depressiven Episoden, posttraumatischen Belastungsstörungen und emotional instabiler Persönlichkeitsstörung erwähnt. Bei dem Begriff Suizidalität handelt es sich um einen Überbegriff, der sowohl Suizidgedanken, als auch suizidale Handlungen bei Suizidversuchen (Parasuizide) und vollzogenem Suizid umfaßt. Während einige Autoren die unterschiedlichen Charakteristika zwischen versuchtem und vollzogenem Suizid betonen (Stengel, 1969), (Kreitmann, 1986), verstehen andere den Suizid als ein Kontinuum von Symptomen desselben Ursprungs (Maris, 2002). Die Begrifflichkeit ist z.T. auch international uneinheitlich, was insbesondere den Parasuizid betrifft. Nach europäischem Verständnis (Hjelmeland et al., 2002), wie auch dem der WHO (Platt et al., 1992a) handelt es sich beim Parasuizid um selbstschädigendes Verhalten ohne zwingende Notwendigkeit der Intention zur Selbsttötung, während die US-amerikanische Definition diese Intention zumindest im Ansatz voraussetzt (Mann, 1998), (Beck et al., 1976). Die Intention ist allerdings vor allem beim vollzogenen Suizid oft nicht eindeutig zu beurteilen. Es kann sich neben der beabsichtigten Selbsttötung sowohl um eine parasuizidale Geste mit appellativem Motiv handeln ("Hilfeschrei") (Feuerlein, 1971), als auch um ein primär rein autoaggressives Verhalten (z.B. Selbstverletzung bei Borderline-Patienten), wobei das Todesrisiko mehr oder minder einkalkuliert, aber nicht beabsichtigt war. Umgekehrt kann es sich bei

einem scheinbaren Suizidversuch um einen "mißlungenen" Suizid mit ursprünglich ernsthaftem Todeswunsch handeln. Indizien für einen ernsthaften Suizidversuch können die vom Suizidenten getroffenen Vorkehrungen gegen Rettungsmöglichkeiten, z.B. die Wahl eines möglichst unauffindbaren Ortes oder die Anwendung sehr letaler Methoden sein. Zu diesen sogenannten 'harten' Suizidmethoden zählen Erhängen, Erschießen, Sprünge von Brücken etc. Dagegen werden bei appellativen Suizidversuchen vornehmlich 'weiche' Methoden angewandt, zu denen in erster Linie Vergiftungen zählen. Man geht von einer hohen Dunkelziffer an Suiziden aus, bedingt durch Fälle, in denen eine ursächliche suizidale Absicht nicht mehr erkennbar ist, wie z.B. bei Überdosierung von Drogen, Medikamenten oder Alkohol, sowie bei tödlichen Autounfällen.

1.1.2 Epidemiologie

Suizid gehört weltweit zu den drei häufigsten Todesursachen bei Personen im Alter von 15-44 Jahren (WHO 2004). In Deutschland lag die Suizidrate im Jahr 2001 bei 20,4 für Männer und 7,0 für Frauen und übertraf somit die Zahl der Verkehrstoten (Statistisches Bundesamt). Während die weltweite Suizidrate in den vergangenen 45 Jahren um ca. 60% angestiegen ist (WHO 2004), sank sie in Deutschland in den letzten 21 Jahren um fast die Hälfte, bei Männern sogar um 60% (Statistisches Bundesamt, s. Abb. 1.1), wofür keine eindeutige Erklärung bekannt ist.

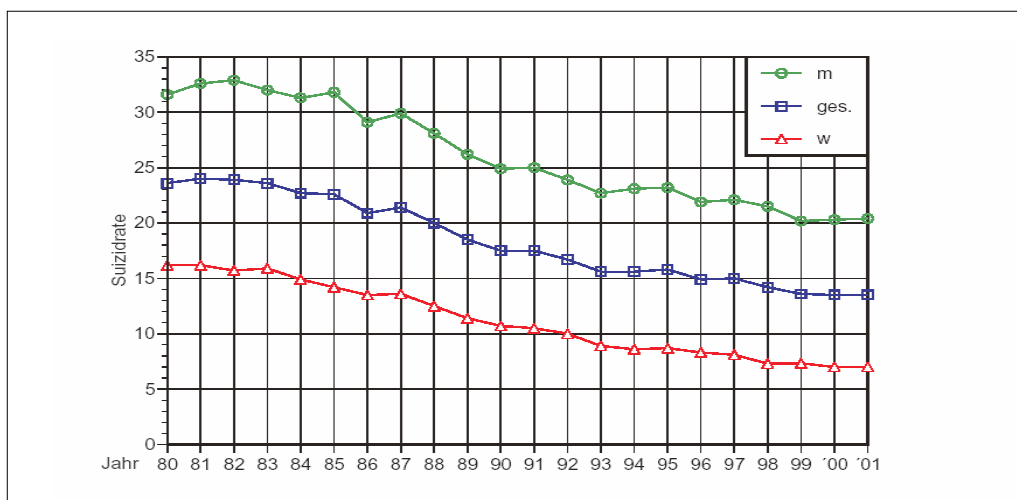


Abb.1.1: Suizidraten in Deutschland von 1980 bis 2001 im Bereich der alten und neuen Bundesländer
(Quelle: Statistisches Bundesamt)

1.1.3 Diagnose, Prävention und Behandlung

Die Suizidprävention gliedert sich in drei Ebenen: Die primären suizidpräventiven Maßnahmen zielen auf die Minimierung der ätiologischen Risikofaktoren (Möller HJ, 1994). Dazu zählen, beginnend mit der Förderung psychischer Stabilität in der Kindererziehung, die Information der Bevölkerung über Depressionen und die Fortbildung von Ärzten und Pflegepersonal hinsichtlich rechtzeitigen Erkennens und Behandlung psychischer Erkrankungen. Entscheidend ist die richtige Einschätzung suizidaler Tendenzen eines Patienten. Da Suizidalität, auch im akuten Stadium, nicht immer offensichtlich ist, muß der behandelnde Arzt gezielt versuchen, das Suizidrisiko einzuschätzen. Neben der Möglichkeit der Fremdanamnese sowie dem Einsatz von Skalen zur Erfassung von Suizidgedanken (Beck Scale for Suicidal Ideation (Beck AT, 1991) oder von Hoffnungslosigkeit (Beck Hopeless Scale (Beck et al., 1975))), scheint die valideste Informationsquelle jedoch das klinische Interview mit dem Patienten selbst zu sein (Althaus D, 2004). Es erlaubt neben der Erfassung möglicher Suizid-Prädiktoren anhand der Vorgeschichte vor allem die Thematisierung gegenwärtiger Suizidalität und die direkte Frage nach akuten Suizidabsichten. Bei Menschen mit bestehender Suizidalität kommen die sekundären Präventivmaßnahmen zum Einsatz, wobei Psychopharmakotherapie und begleitende Psychotherapie zur Behandlung psychiatrischer Grunderkrankungen im Vordergrund stehen. Als einziges Medikament mit gezielt antisuizidaler Wirkung ist bislang Lithium bekannt (Ahrens, 1997). Antidepressiva bergen Risiken durch verzögerten Wirkungseintritt und möglichen Mißbrauch durch Patienten mit suizidaler Intention. Auch könnte die antriebsteigende Wirkung, insbesondere von Serotonin-Wiederaufnahmehemmern (SSRI's), suizidales Verhalten auslösen, zu dem depressive Patienten zuvor nicht die ausreichende Kraft hatten. Hinsichtlich dieser Fragen besteht jedoch bislang noch kein Konsens (Möller and Steinmeyer, 1994). Bei akuten suizidalen Krisen ist zunächst allein der Zeitgewinn entscheidend, da die Möglichkeit eines Wiederabklingsens der Krise besteht (Althaus D, 2004). Die Nachbetreuung als tertiäre Suizidprävention ist von besonderer Bedeutung hinsichtlich der hohen Rezidivrate mit oftmals letalem Ausgang, scheitert aber häufig an zu geringer Inanspruchnahme durch die Betroffenen (Möller, 1989).

1.1.4 Ätiologie

Die Entstehung suizidalen Verhaltens ist sehr komplex, wobei bereits eine Reihe von Risikofaktoren bekannt ist. An erster Stelle stehen hier Suizidversuche in der Vorgeschichte. Es wurde berichtet, daß Suizidversuchen in 55 % aller Fälle ein vollzogener Suizid folgte (Suominen et al., 2004). Demographische Daten belegen, daß Frauen zwar 60-70% der Suizidversuche (Moscicki, 1994) begehen, daß bei Männern aber ein drei- bis vierfach höheres Risiko für vollzogenen Suizid besteht. Während in Altersgruppen zwischen 15 und 34 Jahren Jahren Suizidversuche überwiegen (Hirschfeld s.o.) findet sich vollzogener Suizid am häufigsten in Altersgruppen über 75 Jahren (Murphy 2000), Bezüglich des Familienstandes liegt das höchste Risiko bei alleinstehenden, insbesondere geschiedenen Personen (Kposowa, 2000). Eine eindeutige Zuordnung zu sozialen Schichten ist nicht vorhanden, wenngleich tendentiell mehr Suizidversuche in der 'Unterschicht' unternommen werden (Kreitmann, 1986). Erwiesen ist dagegen der Zusammenhang zwischen Suizidalität und Arbeitslosigkeit (Platt et al., 1992b) bzw. Zeiten wirtschaftlicher Rezession (Wasserman, 1984). Einfluß hat auch die Jahreszeit mit einem Peak der Suizidrate im Frühjahr und Herbst und einem Minimum im Dezember (Clayton, 1985).

In den meisten Fällen liegen psychiatrische Grunderkrankungen vor, die zum Teil erst retrospektiv mittels psychologischer Autopsien erkannt werden. Zu den wichtigsten und umfangreichsten Untersuchungen dieser Art zählt eine finnische Studie (Henriksson et al., 1993), die für einen Zeitraum von 1987-1988 die Diagnosen für 229 Suizidenten ermittelte. Vergleichbar mit anderen Studien lag in 93% der Fälle zumindest eine DSM-III-R-Diagnose vor. Dabei handelte es sich zu 59% um Depressionen unterschiedlicher Klassifikation, zu 43% um eine Suchterkrankung, zu 13% um eine Psychose und zu 9% um Persönlichkeitsstörungen. Andere Studien klassifizieren diese Diagnosen näher und nennen in erster Linie Major Depression und bipolare Störungen, Alkoholismus und Drogenabhängigkeit, Schizophrenie, sowie Borderline- und antisoziale Persönlichkeitsstörungen. 15% aller depressiven Patienten versuchen oder vollziehen Suizid, ihr Risiko wurde als 30-fach höher eingeschätzt als das der nicht-depressiven Bevölkerung (Pokorny, 1983). Eine weitere Aufschlüsselung der Daten der Henriksson-Studie ergab eine hohe Komorbidität mit anderen psychischen aber auch physischen Erkrankungen, z.B. lag bei Suizidopfern mit der Diagnose Major Depression nur in 15% der Fälle eine reine Major Depression ohne Mehrfachdiagnose vor (Isometsa et al., 1994).

Neben psychiatrischen Erkrankungen und Suizidalität spielen vermutlich bestimmte psychologische bzw. psychopathologische Merkmale eine Rolle (Isometsa et al., 1994). Bei deren Erforschung kristallisierten sich im wesentlichen drei Gruppen heraus: 1. Kurzfristige oder lebenslange Symptome von Angst, Unruhe oder Panik wurden in bis zu 80% der untersuchten Suizidversuche und Suizide gefunden (Fawcett, 1992) (Hall et al., 1999). 2. Vielfach beschreiben suizidgefährdete Menschen Gefühle von Hoffnungslosigkeit und Verzweiflung, welche die Betroffenen den Suizid als einzigen Ausweg erscheinen lassen (Collins and Cutcliffe, 2003). Die Beck Hopelessness Scale (BHS) kann daher zur klinischen Erfassung von Suizidalität beitragen (Beck and Weishaar, 1990). 3. Derartige Aspekte von Ängstlichkeit und Resignation dürfen nicht über das Höchstmaß an Aggression und Gewalt hinwegtäuschen, die letztlich an der Durchführung einer Suizidhandlung beteiligt sind. Zahlreiche Studien berichten von zum Teil langen Vorgeschichten aggressiven und impulsiven Verhaltens suizidaler Personen, (Fawcett, 1992). Die besondere Bedeutung dieser engen Assoziation wird im Abschnitt 1.1.5 'Neurobiologie der Suizidalität' deutlich.

Anhand der genannten Risikofaktoren wurden unterschiedliche Erklärungsmodelle zur Ätiologie der Suizidalität vorgeschlagen, wie soziale (Durkheim, 1997), psychologische (Freud, 1940) oder biologische (siehe Abschnitt 1.1.5), die jedoch meist zu einseitig sind, um der multifaktoriellen Entstehung suizidalen Verhaltens gerecht zu werden. Dagegen gibt es integrative Ansätze, welche das Zusammenwirken unterschiedlicher Faktoren erklären. Das 'Streß-Diathesis-Modell' von John Mann (Mann, 1998) z.B. beruht auf einer Einteilung der Risikofaktoren in 1. langfristige prädisponierende Faktoren (Diathesis, Trait-Marker), welche die Vulnerabilität eines Menschen für Suizidalität bestimmen. Sie definieren gewissermaßen eine Reizschwelle, bei deren Überschreitung, 2. die entsprechenden Stressoren (State-Marker), suizidales Verhalten auslösen. Zu diesen akuten Auslösern zählen Episoden psychischer Erkrankungen, Drogen- oder Alkoholmißbrauch sowie das plötzliche Eintreten physischer Krankheiten oder psychosozialer Krisensituationen.

Die Prädisposition manifestiert sich z.B. durch frühe, unter Umständen traumatisierende Lebensereignisse, chronischen Drogen- oder Alkoholmissbrauch, chronische psychische und physische Erkrankungen sowie genetische Faktoren. In einer der bislang umfangreichsten Metaanalysen zu Zwillingsstudien wurde gefunden, daß sich die Pathogenese der Suizidalität zu 43% durch eine genetische Prädisposition und zu 57% durch den Einfluß von Umweltfaktoren erklären ließ (McGuffin et al., 2001).

Genetische Komponenten gelten seit langem als Risikofaktoren für die Entwicklung suizidalen Verhaltens. Eine bereits 1838 von (Esquirol, 1838) beobachtete familiäre Häufung von Suizidversuchen und Suiziden wurde durch systematische Familienstudien in jüngerer Zeit bestätigt. Nach einer Studie von Roy an 243 psychiatrischen Patienten mit einer familiären Vorgeschichte von Suiziden hatte fast die Hälfte (46,6%) von ihnen selber einen Suizidversuch unternommen (Roy, 1982). In seiner Übersichtsarbeit resümierte McGuffin ein Erblighkeitsrisiko für vollzogenen Suizid von 43% (McGuffin et al., 2001). Brent konnte zeigen, daß psychiatrische Erkrankungen bei Verwandten ersten Grades zwar deutlich das Suizidrisiko erhöhen, aber nicht zwingend daran gekoppelt sind (Brent et al., 1996). Vielmehr scheint die genetische Komponente für Suizidalität unabhängig und diagnoseübergreifend zu sein. Zudem fand Brent bei Suizidversuchen eine enge Assoziation von familiärer suizidaler Vorbelastung und Aggression, was auf eine mögliche gemeinsame genetische Determinante schließen läßt. Eine Metaanalyse über Zwillingsstudien mit insgesamt 399 Zwillingspaaren, von denen sich jeweils mindestens ein Zwilling suizidiert hatte, ergab eine signifikant höhere Konkordanzrate für eineiige als für zweieiige Zwillinge (13,2% gegenüber 0,7%) (Roy et al., 1991), was eine Heredität für Suizidalität von 40% ergab (Maier M, 1995),(Wolfersdorf M, 1995). In Adoptionsstudien wurden 57 biologische Familien und Adoptivfamilien von Personen, die direkt nach ihrer Geburt von den Eltern getrennt worden waren und die sich später das Leben nahmen, verglichen mit den biologischen Familien nicht-suizidaler Adoptivkinder. Unter den biologischen Verwandten der Suizidopfer hatten sich 12 ebenfalls suizidiert, in der Kontrollgruppe zwei Personen und in den Adoptionsfamilien niemand. Zudem wies eine weitere Studie zu demselben Fallregister eine deutliche Häufung von Affektreaktionen bei den Suizidenten nach (Wender et al., 1986). Zusammenfassend scheint eine genetische Suszeptibilität für suizidales Verhalten zu existieren, die mit einem erhöhten Maß an Aggression sowie mit gestörter Impulskontrolle korreliert.

Seither zählt es zu den Herausforderungen der neurobiologischen Suizidforschung, die molekularen Mechanismen aufzudecken, die diesen Zusammenhängen zugrundeliegen.

1.1.5 Neurobiologie der Suizidalität

Die Erforschung neurobiologischer Faktoren des Suizides etablierte sich erst in der zweiten Hälfte des 20. Jahrhunderts, bahnbrechend mit der Arbeit von Marie Åsberg, die die Konzentrationen der Hydroxyindolessigsäure (HIES), dem Metaboliten des Neurotransmitters Serotonin (5HT), im Liquor von Suizidenten bestimmte (Asberg et al., 1976). Seither wird in unterschiedlichsten methodischen Ansätzen schwerpunktmäßig die zentrale Neurotransmission erforscht, mit dem Fokus auf drei Neurotransmittersystemen: Dem serotonergen, dem noradrenergen und dem dopaminergen System.

Für das 5HT-System liegen die konsistentesten Befunde vor, wonach Suizidalität assoziiert ist mit einem präsynaptischen serotonergen Defizit im präfrontalen Cortex, formuliert als 'Serotonin-Mangel-Hypothese der Suizidalität' (Arato et al., 1989). Das serotonerge System ist u.a. wesentlich an der Stabilisierung von Emotionalität und Selbstwertgefühl, sowie an der Kontrolle von Aggressivität, Impulsivität und Ängstlichkeit beteiligt (Soubrie, 1986). Dysfunktionen können somit an der Pathogenese psychiatrischer Erkrankungen beteiligt sein, die Kenntnis der zugrundeliegenden Mechanismen ermöglichte die Entwicklung geeigneter Psychopharmaka (Apter et al., 1990). Die Aktivität des serotonergen Systems kann in klinischen Studien u.a. durch 5HT- oder 5-HIES-Messung im Liquor oder Hirnstamm erfaßt werden (Shaw et al., 1967). Åsberg fand in der oben erwähnten Studie erniedrigte 5-HIES-Konzentrationen im Liquor depressiver Patienten nach Suizidversuchen. Dieser Befund konnte bei suizidalen Patienten mit anderen psychiatrischen Diagnosen repliziert werden (Schizophrenie (Cooper et al., 1992), Persönlichkeitsstörungen (Gardner et al., 1990)). Mann (Mann et al., 2001) schloss daraus auf die Unabhängigkeit der erniedrigten 5-HIES von der psychiatrischen Grunderkrankung und interpretierte dies als Hinweis auf die Existenz autonomer neurobiologischer Komponenten der Suizidalität. Roy postuliert in einer seiner Studien einen prädiktiven Charakter erniedrigter 5-HIES-Konzentrationen im Liquor für weitere Suizidversuche (Roy et al., 1989). Anhand von Messungen der 5-HIES konnte auf neurobiologischer Ebene ein Zusammenhang zwischen Aggression, Impulsivität und Suizidalität bestätigt werden. Dies geht erstens hervor aus verminderten 5-HIES-Konzentrationen bei nicht-suizidalen Personen mit impulsivem (Linnoila et al., 1983), aggressivem (Stanley et al., 2000) oder gewalttätigem Verhalten (Lidberg et al., 2000). Zweitens wurden bei suizidalen Patienten positive Korrelationen der Konzentration des Metaboliten mit

der Letalität und der Härte der Suizidmethode gefunden (Mann and Malone, 1997), (Asberg et al., 1976)].

Eine verminderte serotonerge Aktivität kann auf Dysfunktionen in potentiell allen Komponenten des serotonergen Systems beruhen (Abb. 1.2), beginnend mit dem Schlüsselenzym für die 5HT-Synthese aus der Aminosäure Tryptophan, der Tryptophanhydroxylase (TPH), über prä- und postsynaptische Rezeptoren, sowie Komponenten der Signaltransduktion, bis hin zum Abbauenzym des Serotonins, der Monoaminoxidase (MAO).

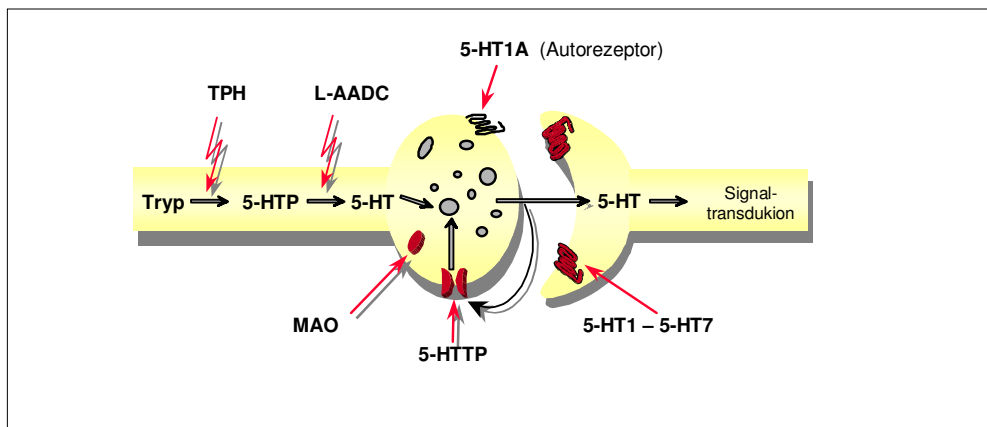


Abb. 2: Serotonerge Synapse: Synthese, Neurotransmission und Abbau des Serotonins

Im Intron 7 des TPH-Gens beschrieb Nielsen den Polymorphismus A779C (Nielsen et al., 1997) und korrelierte diesen in späteren Studien mit suizidalem Verhalten bei männlichen, alkoholabhängigen Gewaltverbrechern (Nielsen et al., 1994; Nielsen et al., 1998). Dabei fand er eine Assoziation des häufigeren L-Allels (779C) mit vorausgegangen Suizidversuchen. Dem folgten zahlreiche Untersuchungen zu TPH-Gen-Polymorphismen einschließlich dreier Meta-Analysen (Lalovic and Turecki, 2002; Rujescu et al., 2003; Bellivier et al., 2004), die aber zu sehr diskrepanten Ergebnissen kamen. Gemein ist ihnen einzig der Schluß, daß TPH eine wichtige Rolle für die Entstehung von Suizidalität zu spielen scheint. Zudem wurde jüngst eine neuronale Isoform des Enzyms entdeckt, deren genaue neurobiologische Funktion noch zu klären ist (Zill et al., 2004; Walther and Bader, 2003). Molekulargenetische Untersuchungen zum Serotonin-Transporter (5-HTT) konzentrieren sich auf einen Poly-

morphismus in der Promotor-Region des Gens, eine 44bp-Insertion/-Deletion. Obwohl auch hier diskrepante Ergebnisse vorliegen, fand Anguelova (Anguelova et al., 2003) in einer Meta-Analyse eine signifikant stärkere Assoziation des kürzeren S-Alles mit Suizidalität. Eindeutiger sind die postmortalen 5-HTTP-Bindungsstudien in präfrontalen Cortices von Suizidopfern, die überwiegend eine reduzierte Transporterdichte belegen (Übersicht: (Mann, 1998)). Auf postsynaptischer Seite wurden im wesentlichen drei Rezeptortypen untersucht: Bei Suizidenten wurde eine erhöhte Dichte des 5-HT_{2A}-Rezeptors sowohl im präfrontalen Cortex gefunden (Arora and Meltzer, 1989) als auch auf Thrombozyten als peripheren Modellen zentraler Neuronen (Pandey, 1997) in. Molekulargenetische Untersuchungen zweier Polymorphismen ergaben dagegen fast einhellig negative Befunde für eine Verbindung zum Suizid. Ähnlich gibt es für den 5HT_{1A}-Rezeptor Hinweise für eine erhöhte Dichte im präfrontalen Cortex (Übersicht: (Arango et al., 1997)) insbesondere im ventralen Bereich (Arango et al., 1995), während die bislang wenigen molekulargenetischen Studien widersprüchliche Ergebnisse aufweisen (Nishiguchi et al., 2002; Lemonde et al., 2003). Für den 5HT_{1B}-Rezeptor wurden nahezu keine Veränderungen im Zusammenhang mit Suizidalität gefunden (Huang et al., 1999), allerdings wiesen 5HT_{1B}-Knockout-Mäuse verstärkt aggressives Verhalten auf (Saudou et al., 1994). Zusammenfassend wurde eine tendentiell verminderte Anzahl an Serotonin-Transportern als Hinweis auf eine verminderte präsynaptische Aktivität gewertet. Zudem wurde aus einer erhöhten postsynaptische Rezeptordichte eine kompensatorische Hochregulation als Antwort auf das präsynaptische serotonerge Defizit geschlossen (Mann, 2003), (Arango et al., 1995). Für das Abbauenzym MAO wurde bislang kein Zusammenhang mit Suizidalität gefunden. Ein funktioneller Polymorphismus in der Promotorregion des Gens (Sabol et al., 1998) zeigte zwar Assoziationen zu Panikstörungen (Deckert et al., 1999) und Aggression (Cases et al., 1995), nicht aber zum Suizid (Ono et al., 2002).

Als weiteres Neurotransmittersystem wird das noradrenerge System hinsichtlich möglicher Implikationen für die Entstehung suizidalen Verhaltens untersucht. Hier sind die Befunde inkonsistenter und weit weniger umfangreich als die zum serotonergen System. Dennoch zeichnen sich ein erhöhter Gehalt an Tyrosin-Hydroxylase (Ordway et al., 1994) ab, dem Schlüsselenzym für die Katecholaminsynthese sowie eine reduzierte Anzahl noradrenerger Neuronen im Locus coeruleus (Arango et al.,

1996) und eine verminderte Dichte an Noradrenalin-Transportern (Klimek et al., 1997) und α 2- (Auto-)adrenerge Rezeptoren (Meana and Garcia-Sevilla, 1987). Auf postsynaptischer Seite sind post-mortem-Befunde bezüglich der α 1-Adrenozeptoren zu uneinheitlich für eine generelle Aussage, während β -adrenerge Rezeptoren tendenziell eine Dichtereduktion aufweisen. Die Kombination dieser Ergebnisse ergibt das typische Bild bei einer dauerhaft streßinduzierten Hyperaktivität des noradrenergen Systems (van Heeringen, 2003). Zu einem ähnliches Schluß kommen Untersuchungen zur Hypothalamus-Hypophysen- Nebennierenrinden- (HPA-) Achse als weiterem Streßhormonsystem. Die konsistentesten Hinweise für eine chronische Überaktivität wurden fast ausschließlich im Zusammenhang mit vollzogenem Suizid gefunden und sind im wesentlichen (1) erhöhte Cortisol- und erniedrigte Corticotropin-Releasing-Hormon- (CRH-) Plasma-Spiegel (Westrin et al., 1999), (2) eine reduzierte CRH-Rezeptordichte im frontalen Cortex (Nemeroff et al., 1988), (3) Hypertrophie der Nebennierenrinde (Szigethy et al., 1994) und (4) eine Non-Suppression von Cortisol im Dexamethason-Suppressionstest (Lester, 1992), welche als prädiktiver Parameter für weitere Suizidgefährdung nach einem Suizidversuch gewertet wird (Coryell and Schlessler, 2001).

Der Status dieser beiden Streßhormonsysteme könnte der chronische Streßsituation eines Menschen entsprechen, die er im Vorfeld seiner suizidalen Handlung erlebt. Eine dauerhafte Überaktivierung dieser Systeme, möglicherweise verbunden mit einem per se geschwächten noradrenergen System, könnte die Person außerstande setzen, weitere Belastungen angemessen zu bewältigen und daraufhin mit suizidalem Verhalten zu reagieren (Amir et al., 1999). Eine weitere Verbindung der Streßhormonsysteme und Suizidalität besteht durch deren Interaktionen mit dem serotonergen System. Beispielsweise inhibiert CRH bei direkter Applikation in die 5HT-produzierenden Raphekerne deren Aktivität (Post RM, 1980).

Für das dopaminerge System wurde im Zusammenhang mit Suizidalität von verminderten Konzentrationen des Metaboliten Homovanilinsäure (HVA) (Traskman et al., 1981), (Bowden et al., 1997) berichtet. Allerdings fällt auf, daß der überwiegende Teil der Studien an depressiven Patienten durchgeführt wurde, und bereits Traskman folgert aus seiner Studie, daß erniedrigte HVA-Konzentrationen enger mit Depression korrelieren als mit Suizidalität, enger noch als HIES (Post RM, 1980).

Für weitere Neurotransmitter, bzw. Neuropeptide (z.B. GABA, Opiode) oder exzitatorische Aminosäuren (z.B. Glutamat) gibt es vereinzelt Hinweise für eine Assoziation

mit Suizidalität (Gross-Isseroff et al., 1990; Merali et al., 2004), allerdings weisen die entsprechenden Studien für tragfähige Aussagen bislang eine zu geringe Anzahl und zu diskrepante Ergebnisse auf.

Weiterhin werden Dysfunktionen auf der Ebene der Signaltransduktion diskutiert. Hinweise dazu liefern post-mortem-Studien zum Transkriptionsfaktor cyclisches Adenosin Monophosphat (cAMP) response element binding protein (CREB), dessen DNA-Bindungskapazität reduziert (Dwivedi et al., 2003a) und die Phosphorylierung erhöht war (Young et al., 2004). Im präfrontalen Cortex von Suizidopfern wurden verminderte Aktivitäten der Proteinkinase C (Pandey et al., 2003) sowie der Proteinkinase A (Dwivedi et al., 2003b) gefunden.

Auf einen zunächst völlig anderen physiologischen Bereich bezieht sich die Hypothese einer Korrelation zwischen niedrigen Cholesterinspiegeln und Suizidalität. Es gibt dazu zahlreiche klinische Studien an psychiatrischen Patienten, die von signifikant niedrigeren Cholesterinspiegeln bei suizidalen gegenüber nicht-suizidalen Personen (Golier et al., 1995; Kunugi et al., 1997) berichten. Auch scheint ein Zusammenhang mit Aggressivität und Impulsivität zu bestehen. Möglicherweise wirkt Cholesterin dabei über eine Modulation des serotonergen Systems, denn es wurde gezeigt, daß eine Cholesterin-induzierte Abnahme der Membranfluidität die Serotoninaufnahme hemmt (Block and Edwards, 1987).

Das Verständnis neurobiologischer Grundlagen der Suizidalität ist von hoher Bedeutung für auf die Suizidprävention, da anhand biologischer Marker die Prädiktion suizidaler Handlungen und eine rechtzeitige Intervention ermöglicht werden kann. Insbesondere verspricht die Entdeckung neuer Drugtargets eine Verbesserung der pharmakotherapeutischen Behandlung suizidaler Menschen.

1.2 Proteomics

1.2.1 Allgemeines

Im Zentrum der medizinisch-biologischen Forschung der vergangenen Jahre stand die Entschlüsselung des menschlichen Erbgutes. Die Erforschung des humanen Genoms, welches die Gesamt-DNA einer Zelle und somit die vollständige Erbinformation des betreffenden Organismus umfaßt, erlaubte Einblicke in die Vererbung und Entstehung von Krankheiten. Sie stößt allerdings an ihre Grenzen, wenn es um die Erfassung des tatsächlichen Zellgeschehens geht. Dieses wird erst durch die Proteine bestimmt, welche die eigentlichen Funktionsträger der Zelle darstellen. Sie repräsentieren den Phänotyp, das heißt das Erscheinungsbild der Zelle.

Die tatsächliche Proteinzusammensetzung wird in der Genomanalyse nicht erfaßt, da nicht alle Gene gleichzeitig abgelesen werden. Besser werden die zu einem bestimmten Zeitpunkt aktivierten Gene durch das Transkriptom, das heißt die Summe der transkribierten RNA wiedergespiegelt. Da diese jedoch im Weiteren einer alternativen Prozessierung unterliegt, läßt auch das Transkriptom nicht unmittelbar auf den Proteinstatus einer Zelle schließen. Beispielsweise zeigte eine Studie von Gygi an dem sehr viel weniger komplexen Organismus der Bierhefe, daß bereits dort die RNA-Konzentrationen kaum mit der finalen Proteinmenge korreliert (Gygi et al., 1999). Die Gesamtheit aller Proteine einer Zelle, eines Organismus oder einer komplexen Körperflüssigkeit zu einem bestimmten Zeitpunkt unter genau definierten Bedingungen werden als 'Proteom' bezeichnet. Der Begriff wurde 1994 von dem Australier Marc Wilkins in Analogie zum 'Transkriptom' geprägt und bezeichnet 'das gesamte Proteinäquivalent eines Genoms' (Wilkins et al., 1996). Im Gegensatz zu dem relativ stabilen, statischen Genom ist das Proteom eine hochvariable, dynamische Einheit, die durch zahlreiche intra- und extrazelluläre Faktoren beeinflussbar ist (Abb. 1.3).

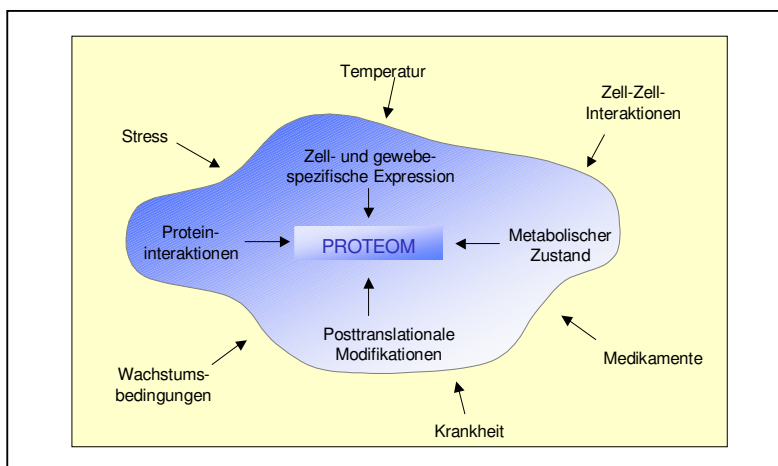


Abb. 1.3 Einwirkung von Umwelt- und intrazellulären Faktoren auf das Proteom

Diese Einflüsse spiegeln sich in einem sehr spezifischen Proteinmuster wieder, das mithilfe der Proteomanalyse erfaßt werden kann.

Erst die Methodik der Proteomanalyse ermittelt in einer Art Momentaufnahme den tatsächlichen Zustand der Proteine in dem jeweiligen Probenmaterial.

1.2.2 Anwendung in der biologischen Psychiatrie

Psychiatrische Erkrankungen sind auf neurobiologischer Ebene im wesentlichen mit beeinträchtigter Synaptogenese, gestörter Neurotransmission und neuronalen Verlusten verbunden, was sich in spezifischen Veränderungen von neuronalen und Liquor-Proteinen manifestiert. Diese lassen sich mit Methoden der Proteomforschung detektieren und identifizieren. Grundsätzlich werden zwei Forschungsansätze der Proteomanalyse unterschieden (Blackstock and Weir, 1999):

1. **'Expression Proteomics'** dient der qualitativen und quantitativen Erfassung eines Proteoms. In der medizinischen Forschung findet hier vor allem der 'subtraktive Ansatz' Anwendung, in dem das Proteom eines gesunden mit dem eines kranken Organismus verglichen wird, um pathogene Veränderungen der Proteinexpression zu ermitteln. Die auf diese Weise gefundenen krankheitsassoziierten Proteine können potentiell als neue Biomarker fungieren. Für die Diagnostik psychiatrischer Erkrankungen sind valide Biomarker von besonderer Bedeutung, um die Schwierigkeiten hoher Komorbidität und häufiger Überlappung von Symptomen (Berrettini, 2000) zu überwinden. Hier sind genetische Marker problematisch, da psychiatrische Erkrankungen nicht nur multifaktoriell, sondern meist auch polygen sind (Berrettini, 2000). Für die klinische Anwendung eines Markers bedarf es eines in-vivo-verfügbaren Probenmaterials, für das innerhalb des zentralen Nervensystems (ZNS) nur Liquor in Frage kommt. Im Proteom des menschlichen Liquors wurden bereits zahlreiche krankheitsassoziierte Veränderungen gefunden, u.a. in Neurotransmittersystemen (z.B. Serotonin- und Dopaminmetaboliten bei Schizophrenie und unipolaren Depressionen (Asberg, 1997)), bei Neuropeptiden (z.B.: Opioide, Neurotensin, Substanz P bei Depression) und synaptischen Proteinen (z.B. SNAP-25 bei Schizophrenie, N-CAM bei affektiven Störungen).

2. Der zweite Ansatz, die funktionelle Proteomanalyse ('**Functional Proteomics**'), umfaßt die Erforschung von Protein-Interaktionen, Multiproteinkomplexen und der funktionellen Verwandtschaften von Proteinen. Die neurobiologische Forschung zielt dabei auf das Verständnis zellulärer und molekularer Funktionsprinzipien des ZNS und dient somit als Grundlage für die Klärung der Pathogenese psychiatrischer Erkrankungen. Die praktische Anwendung sei am Beispiel des Glutamat-Rezeptors (N-methy-D-Aspartat- (NMDA-) Rezeptor) verdeutlicht: Proteomanalysen zeigen, daß der Rezeptor erst unter Einbindung in einen Komplex aus über 70 Proteinen seine Funktion ausübt. Die Möglichkeit dieser Methodik, alle Proteine des Clusters gleichzeitig darzustellen und ihre Interaktionen zu erfassen, trug mit zur Klärung der Funktionsweise des Rezeptors bei (Husi and Grant, 2001), (Husi et al., 2000). Für die psychiatrische Forschung spielt das Wissen über den NMDA-Rezeptor z.B. eine Rolle im Zusammenhang mit der 'Glutamat-Hypothese der Schizophrenie' (Coyle, 1996).

Für die funktionelle Proteomanalyse eignen sich am besten postmortale Hirnproben. Krankheitsassoziierte Veränderungen im Hirngewebe wurden außer in synaptischen Proteinen (z.B. SNAP-25 bei Schizophrenie (Thompson et al., 1999)) vor allem in Komponenten der Signaltransduktion gefunden (z.B. CREB bei Schizophrenie und bipolarer Depression (Knable, 1999)), MAP-Kinase bei Schizophrenie (Kyosseva et al., 1999)). Sofern methodisch zugänglich, ermöglichen Membranproteine die Untersuchung von Rezeptoren (z.B. 5-HT_{2A}-Rezeptor bei Schizophrenie (Dean et al., 1998)). Die Proteomforschung dient zudem im Teilbereich Pharmakoproteomics der Klärung der Wirkmechanismen vorhandener wie auch der Entwicklung neuer Medikamente.

Dies könnte auch neue Perspektiven für das Gebiet der Suizidologie bieten, da zunehmend neurobiologische Befunde auf funktionelle Veränderungen von Proteinen im Zusammenhang mit Suizidalität hinweisen (s.Kap.1.1.5). In Rezeptor-Bindungsstudien wurde beispielsweise für den Serotonin-Transporter, einem Polypeptid, eine deutlich stärkere Assoziation zur Suizidalität gefunden, als in molekulargenetischen Studien (Kap.1.1.5). Ähnlich schließt auch Arango aus seiner Gen-Expressions-Analyse bei Suizidenten auf stärkere funktionelle Einflüsse auf Protein- als auf DNA-Ebene (Sibille et al., 2004). Banay-Schwartz et al. fanden in post-mortem-Studien an Gehirnen von Suizidopfern signifikante Veränderungen in der Konstellation von Proteasen und schlossen daraus auf Abweichungen im Proteinmetabolismus in Verbin-

dung mit suizidalem Verhalten (Banay-Schwartz et al., 1998). Angesichts dessen und im Hinblick auf das erwähnte Potential neurobiologischer Forschung für die Suizidprävention verwundert es, daß laut verfügbarer Literatur bislang nahezu keine Ansätze im Bereich der Proteomforschung ('Proteomics') vorliegen.

1.2.3 Methoden

Der Ablauf einer Proteomanalyse gliedert sich prinzipiell in folgende Schritte:

- A) Probenvorbereitung
- B) Auftrennung und Visualisierung der Proteine
- C) Bildanalyse und Quantifizierung der Proteine
- D) Identifizierung und Charakterisierung der Proteine
- E) Datenanalyse

A) Probenvorbereitung

Das erste Ziel der Probenaufbereitung ist die Isolierung der Proteine. Ein Problem aller Aufreinigungsmethoden, der unspezifische Proteinverlust, wiegt bei der Proteomanalyse besonders schwer, da das Proteom möglichst vollständig erhalten bleiben soll. Daher ist im Einzelfall der Kosten-Nutzen-Effekt eines Aufreinigungsschrittes abzuwägen. Grundsätzlich sollte die Zahl der Reinigungsschritte weitgehend minimiert werden, da auch der Zeitfaktor eine Rolle spielt, mit dem sich die Gefahr von Modifikationen und proteolytischem Abbau der Proteine erhöht. Weiterhin müssen die Proteine möglichst vollständig in Lösung gebracht werden, indem ein entsprechend zusammengesetzter Lysepuffer die Proteine bis zur Primärstruktur abbaut.

B) Auftrennung der Proteine

Als Trennmethode der Wahl dient nach wie vor die zweidimensionale Gel-Elektrophorese, die Klose (Klose, 1975) und O' Farrell (O' Farrell, 1975) unabhängig voneinander entwickelten. Durch die effiziente Kombination zweier elektrophoretischer Trennmethoden werden Proteingemische anhand von zwei unabhängigen Parametern aufgetrennt: in der ersten Dimension durch Isoelektrische Fokussierung (IEF) anhand ihres isoelektrischen Punktes und anschließend mittels SDS-

Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese (SDS-PAGE) nach ihrem Molekulargewicht. Bei der IEF handelt es sich um eine Endpunktmethode, bei der Proteine im elektrischen Feld durch einen pH-Gradienten bis zu der Stelle wandern, die ihrem isoelektrischen Punkt entspricht, d.h. an dem ihre Nettoladung gleich Null ist. Die ursprünglich verwendeten Trägerampholyte, die sich im elektrischen Feld so arrangieren, daß sie einen pH-Gradienten erzeugen, wurden abgelöst durch immobilisierte pH-Gradienten, bei denen saure und basische Acrylamidderivate bereits in das Gel mit eingegossen werden und die eine deutliche Verbesserung der Reproduzierbarkeit brachten (Bjellqvist et al., 1982).

Das Prinzip der SDS-Page beruht auf der Wirkung des anionischen Detergenzes sodium dodecyl sulfat (SDS), das die Eigenladung der Proteine nivelliert. Wandern diese im elektrischen Feld, so werden sie nach dem 'Molekularsieb-Prinzip' ausschließlich anhand ihrer Molekülgröße getrennt. Das Ergebnis beider Trennschritte ist ein sehr spezifisches Muster aus Protein-Spots im Gel. Ihre Visualisierung erfolgt durch Anfärben, üblicherweise durch Coomassiefärbung (Dunn, 1987) für präparative oder durch die zehnfach sensitivere Silberfärbung für analytische Zwecke. Eine weitere Möglichkeit ist die Verwendung von Fluoreszenzfarbstoffen, welche die Sensitivität der Färbung um einige weitere Größenordnungen erhöhen (Steinberg et al., 1996). Die gefärbten Gele werden zur Digitalisierung eingescannt und können so der softwareunterstützten Bildanalyse zugeführt zu werden. In deren Verlauf werden die Spots mittels, je nach Software-Anbieter verschiedenen, Algorithmen detektiert, editiert und quantifiziert. Im anschließenden Vergleich einzelner Gele oder Gelgruppen lassen sich Unterschiede in der Proteinexpression detektieren. Diese Form der Bildanalyse ist nicht vollautomatisch durchführbar, da Fehler in der Spoterkennung, z.B. bei sich überschneidenden Spots, zu falschen positiven Ergebnissen führen können. Daher sind manuelle Editierarbeit und eigene Definition bestimmter Meßparameter unerlässlich.

Die Identifizierung und Charakterisierung der interessierenden Proteinspots erfolgt heute überwiegend durch Massenspektrometrie (MS). Da die Gelmatrix nicht inert ist, müssen die Spots entweder auf eine immobilisierende Membran transferiert (geblottet) werden, was dann auch den Antikörpernachweis der noch intakten Proteine erlaubt (Westernblot) oder die Spots werden nach vorherigem enzymatischem Verdau aus dem Gel eluiert und dann der weiteren Analyse zugeführt. Die beiden gebräuchlichsten massenspektrometrischen Methoden sind Electrospray-Ionisation

(ESI) (Fenn et al., 1989) und Matrix Assisted Laser Desorption (MALDI) (Karas and Hillenkamp, 1988). Für die MALDI-MS werden die Probemoleküle in das Kristallgitter einer organischen Matrix eingebettet und mit einem Laserstrahl beschossen. Durch Übertragung der Energie von der Matrix auf die Probe entstehen positiv geladene Proteinmoleküle, die mittels einer Ringelektrode in einem Vakuum-Flugrohr beschleunigt werden und schließlich auf einem Detektor auftreffen. Bei einem 'time of flight'- (TOF-) Detektor beispielsweise wird dann die Masse eines Peptides aus dessen Flugzeit errechnet. Bei ESI werden die gelösten Probemoleküle durch feinste Zerstäubung ionisiert und fliegen im elektrischen Feld ebenfalls zu einem TOF-Detektor oder zu einem Quadrupol-Analysator, der die verschiedenen Ladungszustände erfaßt, aus denen sich die Peptidmassen errechnen lassen.

Durch den proteolytischen Abbau ergibt sich in Abhängigkeit der Protease für jedes Protein ein sehr spezifischer Satz von Peptiden ('peptide mass fingerprint' (PMF)) (Shevchenko et al., 1996). Diese können über das world wide web (WWW) mit Nukleotid- oder Proteindatenbanken abgeglichen werden, die für alle bislang registrierten Proteine ein theoretisches PMF berechnen. Je nach Übereinstimmung zwischen gemessenem und theoretischem PMF kann so ein bereits bekanntes Protein identifiziert werden. Differenzen dieser beiden Werte können auch Hinweis auf posttranslationale Modifikationen sein, deren Charakterisierung eine weitere bedeutende Möglichkeit der Proteomanalyse darstellt. Die meisten Modifikationen beeinflussen den pI-Wert und das Molekulargewicht eines Proteins, was im 2D-Gel als Verschiebung von Spots oder als 'Perlketten-Spots' sichtbar wird. Zusammenfassend läßt sich sagen, daß die als klassische Methode geltende 2D-Gelelektrophorese im Rahmen der Proteomforschung eine Art Revival erlebt. Durch die hocheffiziente Kombination mit der Massenspektrometrie sowie deutlichen methodischen Verbesserungen verleiht sie der Proteomanalyse bedeutende Vorteile:

1. Die hochauflösende Trennung und Visualisierung von bis zu 10.000 Proteinen gleichzeitig
2. Die Möglichkeit der Charakterisierung aller Proteine eines Proteoms
3. Die Loslösung von hypothesegeleiteten Forschungsansätzen hin zu einem Screening des gesamten Proteoms zur Identifikation neuer Proteine und Proteinfunktionen, auch als 'Schrotschußverfahren' bezeichnet.
4. Die Möglichkeit der Identifikation posttranslationaler Modifikationen

1.3 Hirn- und Liquorproben

In der vorliegenden Arbeit wurde eine Proteomanalyse von post-mortem-Proben aus sechs Hirnregionen sowie von cerebral entnommenem Liquor (Cerebrospinale Flüssigkeit) durchgeführt. Bei den Hirnregionen handelte es sich um den präfrontalen Cortex, die Amygdala, den Hippocampus, den Thalamus und die Hypophyse sowie als Referenzregion das Cerebellum. Die dabei detektierten Proteilmuster wurden im Vergleich von 20 Suizidopfern und einer Kontrollgruppe von 10 Personen mit nicht-suizidbedingten Todesursachen untersucht. Nachfolgend werden die wesentlichen Funktionen der analysierten Hirnregionen sowie des Liquors beschrieben.

Vier der untersuchten Regionen sind Bestandteile des Limbischen Systems (Hippocampus, Amygdala, anteroventraler Teil des Thalamus), bzw. sind mit diesem funktionell assoziiert (präfrontaler Cortex). Das Limbische System gilt als integratives System emotionaler Wahrnehmungen und steuert über diverse autonome und endokrine Funktionen die somatischen Reaktionen. Dieses auch als 'emotionales Gehirn' bezeichnete System regelt zudem Gedächtnisfunktionen und koordiniert das vegetative Nervensystem.

Der **Hippocampus** ist ein Teil des Limbischen Systems und befindet sich im mesialen Temporallappen des Cortex, in dem er den sogenannten Archicortex bildet. In ihm fließen Informationen verschiedener sensorischer Systeme zusammen, die verarbeitet und von dort zum Cortex zurückgesandt werden. Zu den Hauptfunktionen des Hippocampus zählen die Steuerung von Emotionen sowie die Organisation des bewußtseinsfähigen, deklarativen Gedächtnisses. Daher sind degenerative Prozesse in dieser Hirnregion an der Entstehung dementieller Erkrankungen beteiligt (Murre, 1999). Zudem wird dem Hippocampus eine zentrale Rolle für die Pathogenese der Schizophrenie zugeschrieben (Knable et al., 2004; Harrison, 2004). Im Zusammenhang mit Suizidalität wurden im Hippocampus eine erhöhte Dichte des 5-HT_{2A}-Rezeptors (Pandey et al., 2002) und eine veränderte Expression verschiedener Komponenten der Signaltransduktion gefunden (Dwivedi et al., 2002).

Die **Amygdala** (Corpus amygdaloideum, 'Mandelkern') liegt rostral des Hippocampus im anterioren Teil des Temporallappens. Die Amygdala gilt u.a. als Zentrum der furcht- und angstgeleiteten Wahrnehmungen und Reaktionen. Dysfunktionen in diesem Bereich wurden vielfach bei Angst- und Panikstörungen gefunden (Rauch et al.,

2003). Da diese häufig auch in Verbindung mit Suizidalität auftreten (s.o.) (Starcevic et al., 1999), wird die Amygdala der Suizidopfer in dieser Arbeit hinsichtlich möglicher Proteinveränderungen untersucht. Es gibt nahezu keine replizierten Studien zu einer direkten Assoziation dieser Region mit suizidalem Verhalten.

Der **präfrontale Cortex (PFC)** ist ein Teil der Großhirnrinde (Neocortex) und stellt den vorderen Bereich des Stirnlappens (Lobus frontalis) dar. Der Neocortex verleiht dem Menschen unter anderem sein Bewußtsein und wesentliche Anteile seiner Persönlichkeit. Dabei ist die präfrontale Region primär für die Bewertung, Planung und Koordination von Verhaltensweisen verantwortlich. Durch die enge Verbindung des PFC zum limbischen System, insbesondere zur Amygdala, ist er neben den kognitiven Funktionen auch an der Steuerung von Reaktionen auf emotionale Wahrnehmungen beteiligt. Dysfunktionen im PFC wurden in Verbindung mit einem breiten Spektrum psychiatrischer Erkrankungen beschrieben und stehen auch im Zentrum der neurobiologischen Suizidforschung. Insbesondere existieren konsistente Befunde zu einer serotonergen Transmission im PFC suizidaler Menschen, was bereits 1989 in der 'Serotonin-Mangel-Hypothese der Suizidalität' postuliert wurde (Arato et al., 1989).

Der **Thalamus** bildet den größten Teil des Zwischenhirns (Diencephalon), welches zwischen den beiden Großhirnhemisphären liegt. Die aus vielen Kerngebieten bestehende Hirnregion fungiert als subkortikale Sammelstelle für Signale fast aller Sinnesorgane. Hier erfolgt die erste Integration sensorischer Afferenzen ehe sie zum Cortex weitergeleitet werden. Der Thalamus wird daher auch das 'Tor zum Bewusstsein' genannt, übernimmt aber auch höhere Funktionen, z.B. im Zusammenhang mit Aufmerksamkeit und Gedächtnis (Perea Bartolome and Ladera, V, 2004).

Die **Hypophyse** ist eine dem Zwischenhirn angehörende Hirnanhangsdrüse und besteht aus einem Drüsenteil (Adenohypophyse) und einem Hirnteil (Neurohypophyse). Unter Kontrolle des Hypothalamus sezerniert die Hypophyse Releasing- und Inhibiting-Hormone und steuert somit die Funktion der meisten endokrinen Organe. In der Psychiatrie spielt sie insbesondere für die Entstehung von chronischem Streß und daraus resultierenden Erkrankungen eine Rolle. Bei suizidalen Menschen wurden Hinweise auf eine dauerhafte Hyperaktivität des Streßhormosystems HPA-Achse gefunden (Westrin et al., 1999).

Die Hauptfunktion des Kleinhirns (**Cerebellum**) besteht in der Koordination aller wesentlichen Körperbewegungen. Da für diese Hirnregion bislang nahezu keine Belege für eine Involvierung in die Pathogenese psychiatrischer Erkrankungen bekannt sind, diente es in dieser Arbeit als Referenzregion.

Bei bilateral angelegten Hirnregionen (Cortex, Thalamus Hippocampus, Cerebellum Amygdala) sind unter anderem biochemische Lateralitätsunterschiede zwischen beiden Hemisphären bekannt, wie z.B. die ungleiche Verteilung von Neurotransmittern (Glick et al., 1992). Daher wurden die Proben stets der gleichen Hemisphäre entnommen, wobei hier die rechte Seite gewählt wurde, da diese stärker an emotionalen Reaktionen und Affekthandlungen beteiligt ist (Van Lancker, 1997; Arato et al., 1991).

Der **Liquor** (Liquor cerebrospinalis, Gehirn-Rückenmarks-Flüssigkeit) kommt im zentralen Nervensystem vor und zirkuliert in einem System aus kommunizierenden Hohlräumen. Liquor wird von den Plexus choroidei in einem Volumen von 500-700 ml gebildet und stellt eine wasserklare proteinarme Flüssigkeit dar, die nur wenige Zellen enthält. Zu den Hauptfunktionen des Liquors zählen unter anderem die Polsterung des Gehirns und des Rückenmarks zum Schutz gegen mechanische Einwirkungen von außen sowie die Ernährung von Nervenzellen. Von klinischer Bedeutung ist Liquor vor allem für die Diagnostik psychiatrischer und insbesondere neurodegenerativer Erkrankungen. Wie in Kap.1.1.5 beschrieben, wurden im Zusammenhang mit Suizidalität verschiedene Neurotransmitter-Metaboliten im Liquor suizidaler Menschen bestimmt, wobei für Serotonin die konsistentesten Ergebnisse vorliegen (Pandey, 1997).

2. ZIELSETZUNG

2.1 Neurobiologische Fragestellung

Suizidales Verhalten beruht auf einer multifaktoriellen Ätiopathogenese, an der unter anderem neurobiologische Faktoren beteiligt sind. Sehr wahrscheinlich führt dabei erst das Zusammenwirken akuter Auslöser und unterschiedlicher prädisponierender, wie z.B. genetischer Faktoren letztlich zur suizidalen Handlung.

Die vorliegende Arbeit befaßt sich mit der Neurobiologie der Suizidalität. Sie basiert auf der Hypothese, daß die Vielzahl der Faktoren, die in die Pathogenese suizidalen Verhaltens involviert sind, letztlich auf Proteinebene funktionelle neurobiologische Auswirkungen haben. Diese unterschiedlichen Einflüsse münden somit gewissermaßen als gemeinsame Endstrecke in eine veränderte Proteinexpression.

Diese suizidassoziierten Proteinveränderung zu detektieren und zu identifizieren, ist Gegenstand der vorliegenden Arbeit. Dazu wird eine Proteomanalyse durchgeführt, die im subtraktiven Ansatz die Proteome postmortalen Hirn- und Liquorproben von Suizidopfern mit denen von Kontrollpersonen vergleicht.

2.2 Methodische Zielsetzung

Die zweidimensionale Polyacryl-Gelelektrophorese (2D-PAGE) gilt zwar als klassische Methode, gewann im Zuge der Proteomforschung jedoch neue Bedeutung als eine der zentralen Methoden. Damit verbunden war die Entwicklung neuer Technologien für eine Erhöhung des Probendurchsatzes sowie für die Optimierung der Proteinauftrennung und der software-gestützten Bild-Analyse der 2D-Gele. Für den Anwender erfordert dies eine z.T. vollständig neue Etablierung der Methodik für die jeweilige Studie, was auch zu den Herausforderungen der vorliegenden Arbeit zählte:

- Optimierung und Standardisierung der Probenvorbereitung für Liquor sowie für die Hirnregionen präfrontaler Cortex, Thalamus, Hippocampus, Amygdala, Hypophyse und Cerebellum als Referenzregion
- Etablierung der 2D-Gelelektrophorese für die genannten Proben
- Detektion möglicher suizidassoziiierter Proteine mittels software-gestützten Bild-Analyse der 2D-Gele
- Optimierung und Standardisierung der Probenvorbereitung für die anschließende,

vom Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried, durchgeführte, MALDI-TOF-massenspektrometrische Untersuchung der fraglichen Proteine

- Identifizierung und Charakterisierung dieser Proteine mittels Proteindatenbank-Recherche

3. MATERIAL UND METHODEN

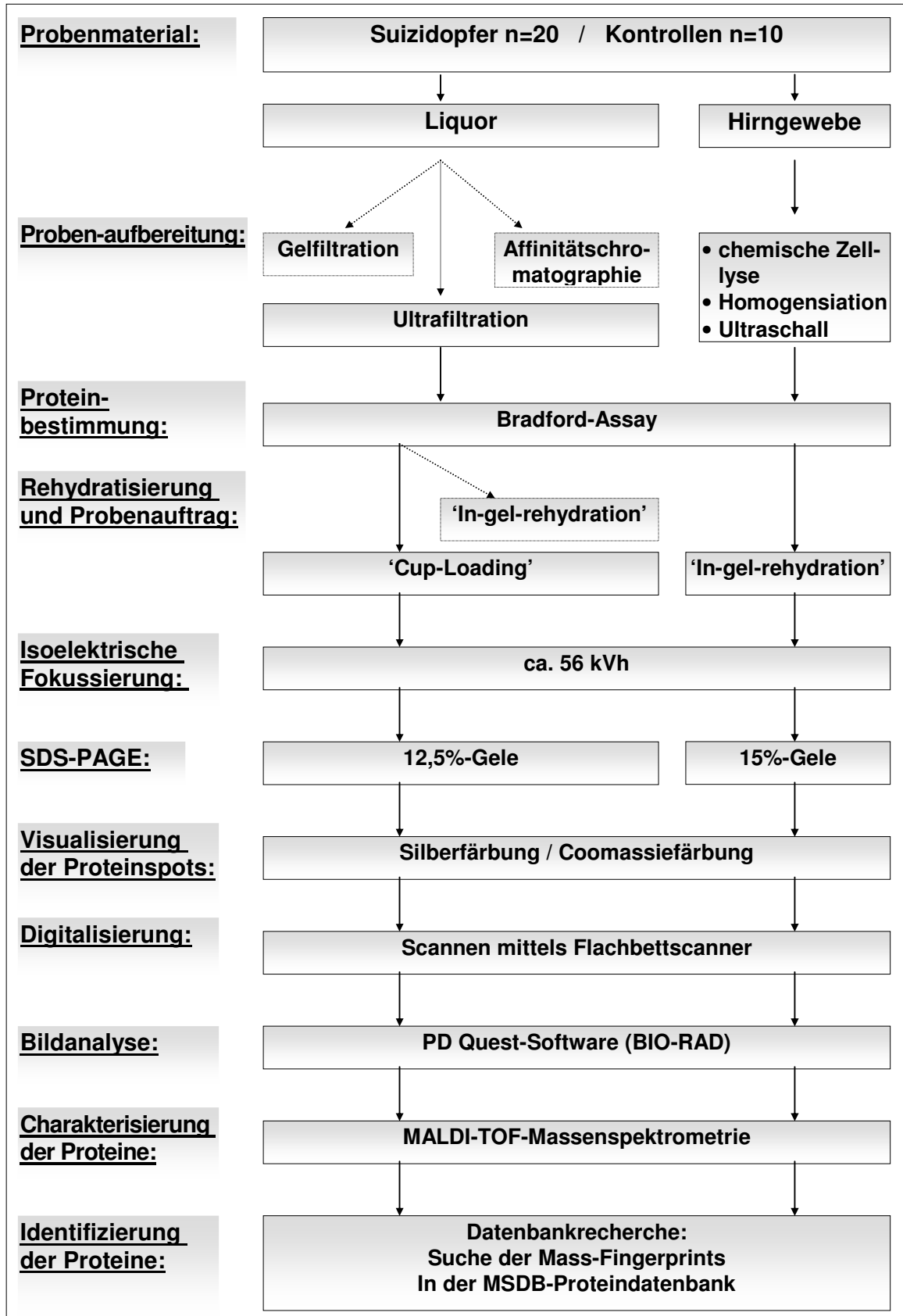


Abb. 3.1 Versuchsablauf inklusive Vorversuchen

3.1 Probenmaterial

3.1.1 Herkunft

Die vorliegenden Untersuchungen wurden von der Ethikkommission der LMU München, Vorsitzender Prof. Dr. Paumgartner, bewilligt (Projekt 164/00).

Es wurden post-mortem-Proben von Hirngewebe und Liquor von 20 Suizidopfern sowie 10 Kontrollen untersucht, deren Daten in Tab. 3.1 und 3.2 zusammengefasst sind. Dabei wurden die Suizidmethoden in harte (Erhängen, Erschießen, Sprünge vor Züge oder aus Höhen, Messerstiche und Ertrinken) und weiche Methoden (in diesen Fällen ausschließlich Tablettenintoxikation) unterteilt.

Tab. 3.1 Übersicht: Daten der Suizidopfer und Kontrollpersonen

	Fallzahl	Geschlecht w =weiblich m =männlich	mittleres Alter [Jahre]	mittlere postmortale Liegezeit [h]
Suizidopfer	n=20	w n= 9 m n=11	31,87 ± 11,28 (14,5 - 58,58)	18,38 ± 9,96 (5 - 40)
Kontrollen	n=10	w n=3 m n=7	34,87±16,69 (11,25 - 58,58)	12,3 ± 11,04 (2,5 - 40)

Tab. 3.2 Nähere Angaben zu Suizidopfern und Kontrollpersonen

	Suizidmethode bzw. Todesursache der Kontrollen	Medikation	Psychiatr. Diagnose
Suizidopfer	hart n= 2	BTM n=2	Depression n= 3
	weich n=18	Morphium n=1	Drogen-/ Alkoholmissbrauch n= 3
		Trimipramin n=1	frühere Suizidversuche n= 2
		Diphenhydramin n=1	Psychose n= 1
		Toxik. neg. n=1	Borderline Syndrom n= 1
		Unbekannt n=14	chron. Schmerzsyndrom n= 1
		unbekannt n= 9	
Kontrollen	Unfall n=3	Toxik. neg. n=1	
	Herztod n=2	Unbekannt n=9	
	Mord n=1		
	unbek. n=4		

3.1.2 Probenentnahme

Das Probenmaterial stammte aus dem Institut für Rechtsmedizin der Universität München. Die Hirnproben wurden von einem erfahrenen Neuropathologen seziiert und unmittelbar nach der Sektion bei 80°C eingefroren. Die Liquores wurden jeweils aus der Cisterna magna entnommen und zum Schutz gegen Proteolyse sofort mit dem Protease-Inhibitor Aprotinin ('Trasylol') versetzt. Dies erfolgte bei den Hirnproben erst während des Zellaufschlusses.

Die Gewebeproben wurden aus den Hirnregionen Präfrontaler Cortex (Brodmann Areal 11), Hippocampus, Thalamus, Amygdala, Hypophyse sowie dem Cerebellum als Kontrollregion entnommen, wobei zur Vermeidung von Lateralitätsunterschieden stets die rechte Hemisphäre verwendet wurde.

3.2 Probenaufbereitung

3.2.1 Hirngewebe

Für die chemische Zell-Lyse sowie die Solubilisierung der Proteine wurden ca. 300 mg Hirngewebe in 6µl/µg Lysepuffer aufgenommen, welchem unmittelbar vor der Verwendung 5% v/v Aprotinin ('Trasylol') zugesetzt wurde.

<u>Lysepuffer:</u>	Harnstoff	9	M
	CHAPS	2	%
	DTT	1	%
	IPG-Puffer	1,5	%
	(pH3-10, non-linear)		

Der mechanische Zellaufschluß erfolgte durch Homogenisation für 30 Sek. Nach Zentrifugation des Homogenisates (30 Min., 12000 g, 2°C) wurde der Überstand zu je 30µl aliquotiert und zur weiteren Solubilsierung der Proteine für 5 Min. mit Ultraschall behandelt. Die Aliquots wurden bei -80°C eingefroren.

Da sich bei der Hypophyse im weiteren Verlauf der 2D-PAGE Schwierigkeiten mit der Proteinauftrennung und der Reproduzierbarkeit ergaben, wurde versucht, dem durch Zugabe von Thio-Harnstoff zum Lysepuffer, bzw. durch Variieren der Konzentrationen entgegenzuwirken. Nachdem dadurch aber keine wesentlichen Verbesserungen erzielt werden konnten und der Thio-Harnstoff sogar zu deutlichen Verschlechterungen der Proteinauflösung führte, wurde auch für die Hypophyse der oben genannte Puffer verwendet.

3.2.2 Liquor – Optimierung der Probenaufbereitung

Beim Liquor steht ein sehr geringer Proteingehalt einer hohen Salzkonzentration gegenüber, die zu Störungen der nachfolgenden isoelektischen Fokussierung geführt hätte. Daher waren für die Liquoraufbereitung Methoden zur Entsalzung und Proteinaufkonzentration erforderlich. Zur Methodenoptimierung wurden zunächst unterschiedliche Prinzipien der Proteinaufreinigung miteinander verglichen. Die Anwendung von Affinitätschromatographie und Gelfiltration (Sephadex G25, PD-Säulen, Amersham Bioscience) erwiesen sich aufgrund zu hohen Proteinverlustes bzw. schlechter Auftrennung der Proteine bei der nachfolgenden isoelektischen Fokussierung als ungeeignet (Daten nicht gezeigt). Bessere Resultate erzielte die Dialyse mit anschließender Lyophilisation (Abb. 3.2 A). Dazu wurden die Dialyseschläuche ('Float-A-Lyzer', Roth) zunächst für 30 Minuten mit 0,2%-iger NaCl-Lösung equilibriert und mit Aqua bidest. gewaschen. Je 1 ml Probe wurde in die Schläuche gefüllt, die daraufhin verschlossen und bis zur Entsalzung der Probe in 1 Liter 0,2%-iger NaCl-Lösung über Nacht bei 4°C unter Rühren gelagert wurden. Die anschließende Lyophilisation erfolgte ebenfalls über Nacht.

Die Ultrafiltration als weitere Methode zur Proteinaufreinigung wurde mit zwei unterschiedlichen Filtrationssystemen durchgeführt: 'Centricon'-Filtrationssäulen (Millipore) faßten ein Volumen von 2,5 ml Liquor, der für 40 Min. bei 6000 g und 2°C ultrafiltriert und dann in ein Auffanggefäß rückzentrifugiert wurde (Abb. 3.2 B1). In den kleineren 'Ultrafree'-Filtersäulen (Millipore), wurden je 500 µl Liquor bei 6000 g (25 Min., 2°C) ultrafiltriert und die Überstände sechsmal mit proteasefreiem UV-behandeltem Wasser gewaschen. Die Überstände beider Ultrafiltrationsmethoden wurden für eine weitere Aufspaltung von Proteinstrukturen für 5 Min. mit Ultraschall behandelt und schließlich in 30 µl-Aliquots bei -80°C eingefroren.

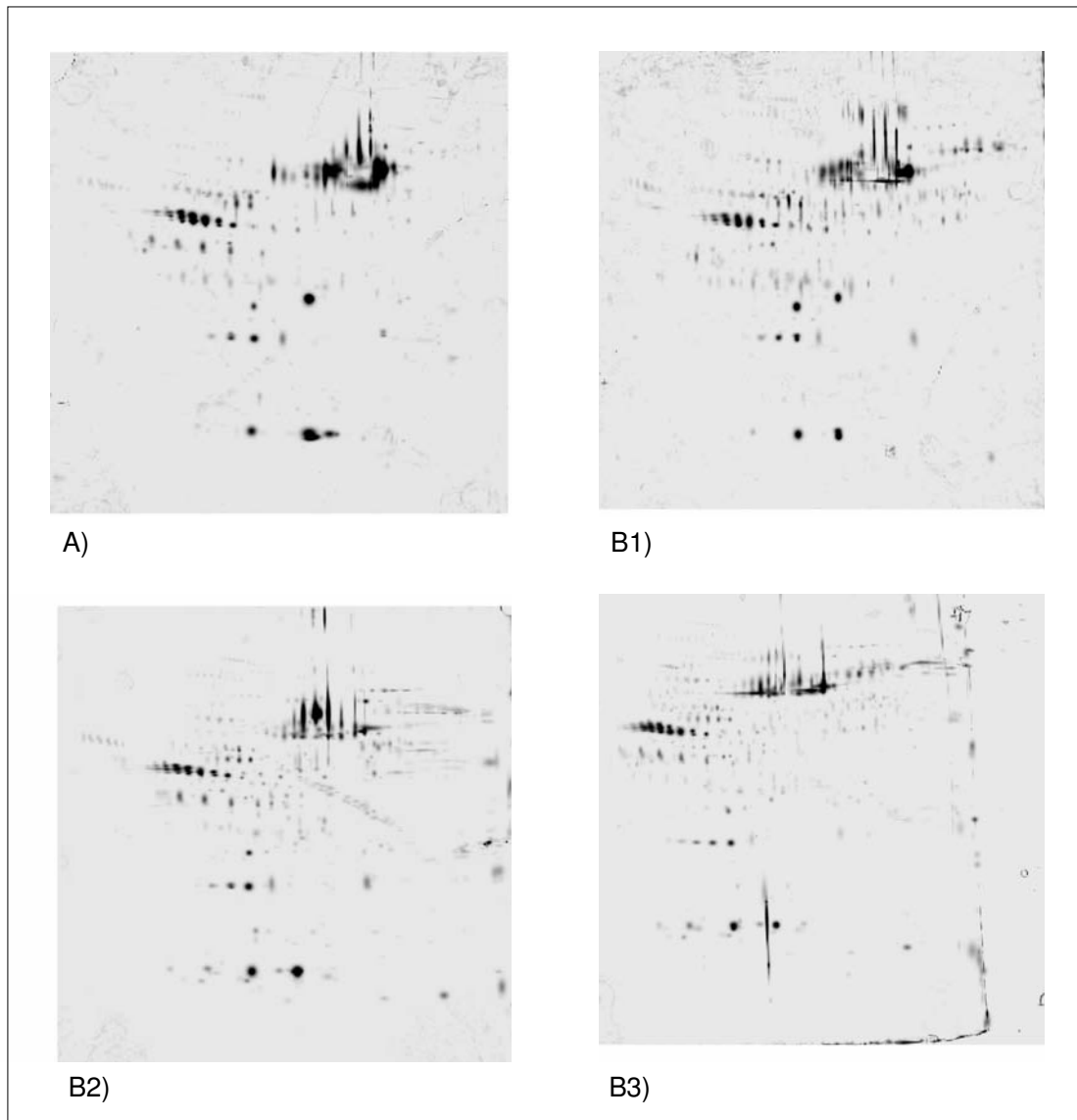


Abb. 3.2: Optimierung der Liquoraufbereitung durch Vergleich unterschiedlicher Methoden zur Proteinaufreinigung: A) Dialyse, B) Ultrafiltration mit B1) 'Centricon' (Millipore)-, B2) 'Ultrafree' (Millipore) - Filtersäulen, B3) 'Ultrafree'- Filtersäulen plus Acetonfällung

Die Verwendung der 'Ultrafree'-Filtersäulen erzielte die beste Proteinauftrennung bei der anschließenden isoelektischen Fokussierung (Abb. 3.1 B2) und wurde daher als Standardmethode gewählt. Auch die Ergänzung durch eine nachgeschaltete Aceton-Präzipitation (Inkubation des ultrafiltrierten Liquors mit dem dreifachen Volumen Aceton bei -20°C über Nacht, Zentrifugation bei 10.000 g für 30 Minuten) verbesserte die Auftrennung nicht, sondern führte lediglich zu Proteinverlusten (Abb. 3.2 B3).

3.3 Proteinbestimmung

Die Bestimmung der Proteinkonzentration der Hirn- und Liquorextrakte erfolgte auf Basis der Methode nach Bradford (Bradford M., 1976), bei der der Triphenylmethanfarbstoff Coomassie an Proteinseitenketten bindet und durch diese Komplexbildung das Absorptionsmaximum von 465 nm auf 595 nm verschiebt. Die Absorption wurde spektrometrisch erfaßt und korrelierte direkt mit der Proteinkonzentration. Die Messung erfolgte mittels eines Protein-Assays (BIO-RAD) und wurde anhand eines Bovine Serum Albumine- (BSA-) Standards kalibriert.

Um auszuschließen, daß die im Lysepuffer enthaltenen Reagenzien, insbesondere Harnstoff, die Messungen unspezifisch beeinflussten, wurde die Methode mit Hilfe eines zweiten Testprinzips validiert, das kompatibel für Harnstoff war. Es handelte sich dabei um eine nephelometrische Endpunktbestimmung, bei der nach Denaturierung der Proteine mittels einer alkalischen, Ethylendiamintetraacetat- (EDTA-) haltigen Lösung Benzethonium-chlorid zugegeben, und die entstehende Trübung bei 505 nm gemessen wurde. Die Messung erfolgte mittels des HITACHI 912-Analyseautomaten unter Verwendung des Testkits 'U/CSF Protein' der Firma Roche.

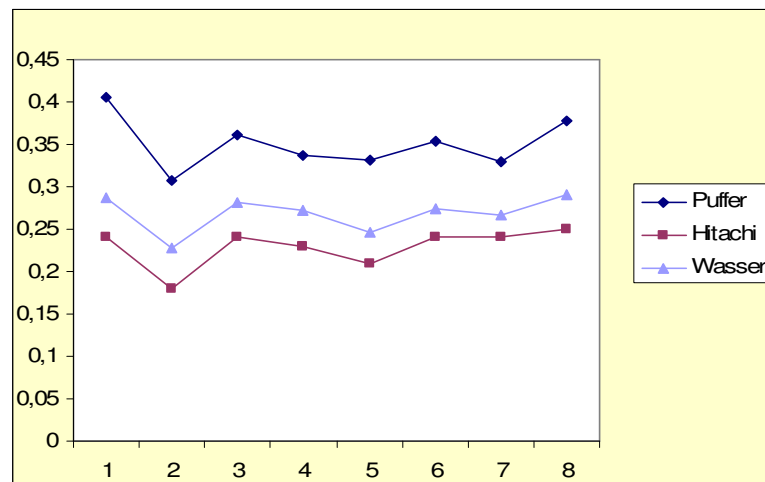


Abb. 3.3: Methoden zu Proteinbestimmung im Vergleich des Bradford-Assays unter Verwendung von Wasser und Probenpuffer sowie der Messung mittels HITACHI-Analyseautomaten

Es zeigte sich, daß die ermittelten Meßkurven zwar parallelverschoben waren, daß aber das Bezugssystem in sich stimmte (Abb. 3.3). Dies bedeutete, daß Bradford-Assay durch die verwendeten Harnstoff-Konzentrationen in der Probe nicht maßgeblich beeinflusst wurde und somit für die Anwendung in dieser Arbeit geeignet war.

3.4 Zweidimensionale Gelelektrophorese

Die zweidimensionale Polyacrylamid-Gelelektrophorese (2D-PAGE) nach O'Farrell (O'Farrell) spielt nach wie vor die zentrale Rolle in der Proteomanalyse, indem sie die hochauflösende Auftrennung eines Proteingemisches ermöglicht. Sie stellt die Kombination zweier Trennmethode dar, der Isoelektrischen Fokussierung nach Bjellqvist¹⁹⁸² und Righetti¹⁹⁹⁰ in der ersten und der SDS-PAGE (Laemmli 1970) in der zweiten Dimension. Dabei entstehen spezifische Muster von Proteinspots, die durch entsprechende Färbemethoden visualisiert werden können.

3.4.1. Dimension: Isoelektrische Fokussierung (IEF)

3.4.1.1 Prinzip

Bei der IEF basiert die Auftrennung von Proteinen darauf, daß diese sich in einem pH-Gradienten bei Anlegen eines elektrischen Feldes bis zu der Stelle bewegen, an der ihre Nettoladung gleich Null ist. Der pH-Wert an diesem Punkt ist der sogenannte isoelektrische Punkt (pI), an dem die Proteine spezifisch fokussiert werden.

3.4.1.2 Durchführung

Es wurden kommerziell erhältliche immobilisierte pH-Gradienten (IPG) (Amersham Bioscience) verwendet, die durch die Kopolymerisation von Acrylamidionen und Acrylamidderivaten mit puffernden Gruppen, den Immobilinen, entstehen. Die IPG-Gelstreifen hatten eine Länge von 24 cm und umfaßten einen nicht-linearen pH-Bereich von pH 3-10. Die Streifen werden in dehydrierter Form geliefert und werden in einem geeigneten Puffer rehydriert. Die gesamte 2D-PAGE wurde mit einem Gerätesystem der Firma Amersham Bioscience durchgeführt, d.h. in der ersten Dimension mittels der 'IPGphor'. Die von Amersham angebotenen IPG-Streifen-Halter mit integrierten Elektroden erwiesen sich sowohl für Hirn- als auch für Liquorproben als ungeeignet, so daß stattdessen die 'Universal Strip Holder' mit aufsetzbaren Elektroden verwendet wurden und die Rehydrierung der IPG-Streifen in einer separaten Kammer erfolgte.

3.4.1.3 IEF von Hirngewebe

Unter den verschiedenen Arten des Auftrages der Proben auf die IPG-Streifen wurde für Hirngewebe die beste Proteinauftrennung mittels der sog. In-Gel-Rehydratisierung erzielt. Dazu wurden die IPG-Streifen für 14 Stunden in einem Gesamtvolumen von 450 μ l rehydratisiert, bestehend aus Puffer und Proteinextrakt, dessen Volumen einer Absolutmenge von 100 μ g Protein entsprach. Die Zusammensetzung des Puffers war dabei identisch mit der des Lysepuffers. Die IPG-Streifen wurden während der anschließenden IEF mit 3,7 μ l Mineralöl ('Dry Strip Cover Fluid', Amersham Bioscience) überschichtet, um ein Austrocknen der Gelstreifen sowie das Auskristallisieren des Harnstoffs zu vermeiden.

Die IEF verlief gemäß folgendem Protokoll mit einer Limitierung bei 40 μ A pro IPG-Streifen:

Spannung	Zeit bzw. Voltstunden	Verlauf
200 V	1 h	konstant
500 V	2 h	konstant
1000 V	3 h	konstant
6000 V	3,5 h	Gradient
6000 V	40 kWh	konstant
<u>gesamt:</u>		<u>ca. 56 kWh</u>

Die fokussierten IPG-Streifen wurden bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

3.4.1.4 IEF von Liquor

Die einzige der für Liquor getesteten Methoden des Probenauftrags, die zu einer auswertbaren Proteinauftrennung führte, war das sog. Cup-loading, bei dem die Probe punktuell auf den bereits mit Puffer (Zusammensetzung entsprechend dem Lysepuffer) rehydratisierten IPG-Streifen appliziert wurde. Dabei erwies sich eine Auftragsmenge von 50 μ g Protein als optimal (s. Abb. 3.4).

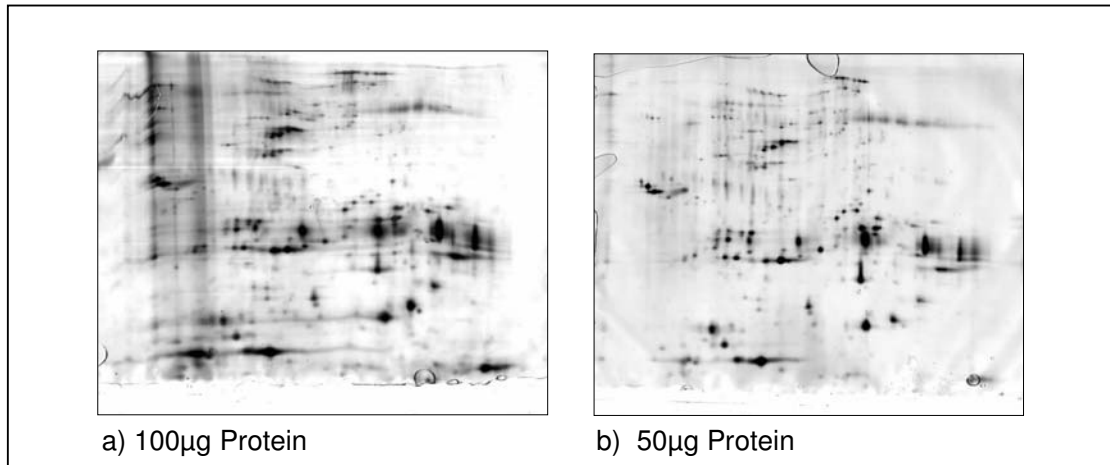


Abb. 3.4: 2D-Gele von Liquor; Probenauftrag per 'Cup-Loading' mit Auftragsmengen von 100 µg und 50 µg Protein

Das 50 µg-Protein-Äquivalent des Proteinextraktes wurde mit Auftragespuffer (ebenfalls dem Lysepufer entsprechend) in einem Gesamtvolumen von 100 µl in eine kleine Auftragskammer gefüllt, die am anionischen Ende des IPG-Streifens plaziert worden war. Die Probe wurde mit 5 µl und der gesamte IPG-Streifen mit 3,7 µl 'Dry Strip Cover Fluid' überschichtet. Bei der IEF erwies sich ein sehr langsamer Probeneintritt in das Gel als entscheidender Schritt, so daß die Fokussierung nach folgendem Protokoll durchgeführt wurde:

Spannung	Zeit bzw. Voltstunden	Verlauf
100 V	4 h	konstant
300 V	14 h	konstant
500 V	1 h	konstant
7000 V	1,5 h	Gradient
<u>7000 V</u>	<u>7 h</u>	<u>konstant</u>
<u>gesamt: ca. 56 kWh</u>		
(Limitierung bei 40 µA pro IPG-Streifen)		

Die fokussierten IPG-Streifen wurden ebenfalls bei -80 °C eingefroren.

3.4.2 Equilibrierung

Um die isoelektrisch aufgetrennten Proteine für das Puffersystem der zweiten Dimension vorzubereiten, wurden sie mit einem Puffer behandelt, der in erster Linie die Proteine mit SDS beladen sollte. Zudem sollten Glycerol und Harnstoff den Transfer in das 2D-Gel erleichtern (Görg et al., 1988). Die Equilibrierung erfolgt in zwei Schritten à 15 Minuten, wobei im ersten Schritt 10 mg/ml DTT zugefügt wurde, welches durch Aufbrechen der Disulfidbrücken zu einer vollständigen Streckung der Polypeptide führte, und somit deren Wanderung im Gel erleichterte. Die Zugabe von 250 mg/10 ml Iodacetamid im zweiten Schritt entfernte das DTT, das den Lauf der zweiten Dimension hätte beeinflussen können und verhinderte durch Alkylierung der Proteine eine Reoxidation der Sulfhydryl-Gruppen und somit die Reaggregation der Polypeptide (Görg 1987).

<u>Equilibrierungspuffer:</u>	Harnstoff	6	M
	Glycerol 87%	30	% v/v
	SDS	2	%
	Tris/HCl 1,5 M pH8,8	50	mM

3.4.3 2. Dimension: SDS-PAGE

Bei der SDS-PAGE werden die Proteine für ihre Auftrennung mit SDS beladen, einem anionischen Detergenz, dessen stark negative Ladung die Eigennettoladung der Proteine ausschaltet und dadurch ihre Ladung nivelliert. Bei Anlegen eines elektrischen Feldes werden die Proteine in dem Polyacrylamid-Gel somit ausschließlich aufgrund ihres Molekulargewichtes getrennt. Zudem denaturiert SDS Proteine, was deren Wanderungsverhalten im Gel begünstigt, da das Lösen der Quartärstrukturen Protein-Protein-Wechselwirkungen verhindert.

3.4.3.1 Herstellung der SDS-Gele

Es wurden Gele mit einer Größe von 25 x 20 x 0,1cm mittels dem 'Gel-Caster' von Amersham Bioscience gegossen, wobei die Vernetzung von Acrylamid und N,N'-Bisacrylamid durch Ammoniumpersulfat (APS) und TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine) katalysiert wurde. Um ebene Oberkanten der Gele zu erzielen, wurden sie mit ca. 3 ml wassergesättigtem n-Butanol überschichtet. Bei der Optimierung der Acrylamid-Konzentration der Gele erwiesen sich für Hirngewebe 15%-ige und für Liquor 12,5%-ige Gele als geeignet, die gemäß folgender Protokolle hergestellt wurden:

	12,5%-Gele	15%-Gele
Bis-/ Acrylamid (37,5%)	406 ml	488 ml
Tris/HCl 1,5 M pH8,8	250 ml	250 ml
Glycerol (87,5%)	41 ml	41 ml
SDS (10%)	10 ml	10 ml
Aqua bidest.	288 ml	203 ml
APS	5 ml	5 ml
TEMED	50 µl	40 ml
	1050 ml	1037 ml

Um möglichst ebene Oberkanten der Gele zu erzielen, erwies sich eine langsame Polymerisation über Nacht als optimal, bewirkt durch geringe Konzentrationen an TEMED.

Um später das Molekulargewicht der aufgetrennten Proteine einordnen zu können, wurde ein Molekulargewichtstandard ('Low Molecular Weight Calibration', 14-97kD, Amersham Bioscience) mit aufgetragen.

3.4.3.2 Durchführung der SDS-Page

Für das Zusammenfügen der ersten und zweiten Dimension wurden die oberen Kanten der SDS-Gele mit Elektrophoresepuffer (s.u.) bedeckt, durch den die equilibrierten IPG-Streifen leichter auf die Gele geschoben werden konnten. Nach Entfernung des Puffers wurden die Streifen mit einer 0,05%-igen Agarose-Lösung überschichtet, der Bromphenolblau als Tracer zugesetzt wurde. Die Elektrophorese wurde mit bis zu 12 Gelen gleichzeitig in der 'Ettan-Dalt II'-Elektrophoresekammer (Amersham Bioscience) bei 25°C und konstanter Watt-Zahl durchgeführt. Nach fünfminütigem Trans-

fer der Proteine in die SDS-Gele bei 5 W / Gel wurde der Lauf durch Erhöhung auf 18W / Gel beschleunigt und war nach ca. 5 Stunden beendet. Die Gele wurden aus den Glasplatten gelöst und über Nacht in Fixierlösung (s.u.) aufbewahrt.

<u>Elektrophoresepuffer:</u>	Glycin	M
	Tris Base	M
	SDS	10 %
<u>Fixierlösung:</u>	Methanol	1200 ml
	Essigsäure (96%)	120 ml
	Aqua bidest. ad.	3000 ml

3.5 Färbung der 2D-Gele

Hinsichtlich der Färbemethode für die Proteinspots standen die Coomassie- und die Silberfärbung zur Wahl. Dabei war abzuwägen zwischen Sensitivität, die bei der Silberfärbung um etwa Faktor 10 höher ist und Reproduzierbarkeit, was eher durch Coomassie-Färbung gewährleistet ist.

Der Vergleich beider Methoden zeigte, daß angesichts der sehr geringen Proteinmengen der Spots (im ng-Bereich) die Silberfärbung eindeutig vorzuziehen war, insbesondere um auch die schwächer exprimierten Proteine sichtbar zu machen (Abb. 3.3). Die Coomassie-Färbung eignete sich aber als relativ einfache Testfärbung während der Methodenoptimierung der 2D-PAGE.

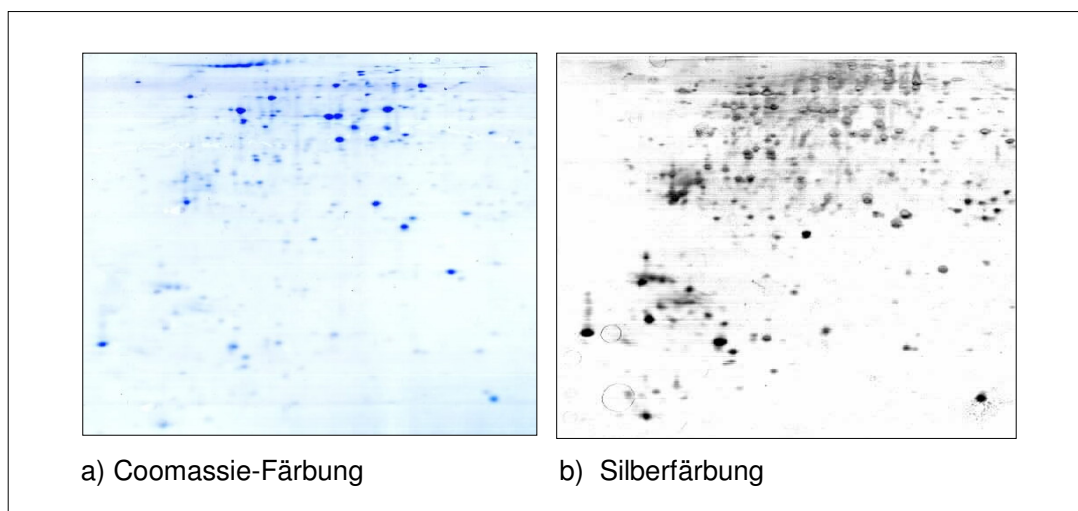


Abb. 3.5: 2D-Gele von Hirngewebe (präfrontaler Cortex) nach Coomassie- und nach Silberfärbung

3.5.1 Coomassie-Färbung nach Neuhoff (1988)

Die Gele wurden für 20 Minuten in Trichloressigsäure fixiert, für 5 Minuten in Aqua bidest. gewaschen und über Nacht bei Raumtemperatur in Färbelösung geschwenkt.

<u>Färbelösung:</u>	Methanol	50%
	(NH ₄) ₂ SO ₄	10%
	Coomassie Blue	5%
	H ₃ PO ₄	2%

3.5.2 Silberfärbung

Die bei der 2D-PAGE entstandenen spezifischen Muster aus Proteinspots wurden mittels Silberfärbung visualisiert, die – nach Fluoreszenzfärbungen u.ä.- zu den sensitivsten Färbemethoden zählt. Bei der Wahl des Färbeprotokolls war darauf zu achten, daß die Kompatibilität mit der anschließenden massenspektrometrischen Analyse gewährleistet war. Dazu wurde eine leicht modifizierte Form der Methode nach Blum (Shevchenko et al., 1996) angewandt, die auf die Verwendung des quervernetzenden Gluthardialdehydes verzichtet.

Tab. 3.3 Protokoll zur Silberfärbung nach Blum et al., 1987

<u>Silberfärbung (mod. nach Blum et al., 1987)</u>		
<u>Fixierung</u>	2-3 Std.	40% Methanol 12% Essigsäure Aqua bidest.
<u>Waschen</u>	20 Min.	30% Ethanol Aqua dest.
	20 Min.	10% Ethanol Aqua dest.
	20 Min.	Aqua dest.
<u>Sensitivierung</u>	1 Min.	0,02 % Na ₂ S ₂ O ₃ Aqua bidest.
<u>Waschen</u>	2 x 20 Sek.	Aqua dest.
	1 x 20 Sek.	Aqua bidest.
<u>Silberreaktion</u>	20 Min.	0,2 % AgNO ₃ 0,375 % Formaldehyd (37%) Aqua bidest.
<u>Waschen</u>	2 x 20 Sek.	Aqua dest.
	1 x 20 Sek.	Aqua bidest.
<u>Entwicklung</u>	ca. 5 Min.	4,5 % Na ₂ CO ₃ 0,05 % Formaldehyd (37%) 0,0005 % Na ₂ S ₂ O ₃ (10%-Lsg.) Aqua bidest.
<u>Waschen</u>	1 x kurz.	Leitungswasser
<u>Stoppen</u>	10 Min.	12 % Essigsäure Aqua bidest.
<u>Lagerung</u>	(4 °C)	1 % Essigsäure Aqua bidest.

3.6 Bildanalyse der 2D-Gele

Die gefärbten 2D-Gele wurden mittels eines Flachbett-Scanners (UMAX) und der Image Lab Scan-Software (Amersham Bioscience) digitalisiert und mit Hilfe der PD-Quest-Software (BIO-RAD) in folgender Weise bearbeitet und ausgewertet:

Zunächst wurden die Gelbilder eines Experimentes, d.h. einer Hirnregion bzw. des Liquors im PD Quest Programm aufgerufen und ihre Bildqualität automatisch optimiert, ohne dabei die Bilddaten zu verändern. Dieser Schritt ist insbesondere notwendig, da Scann- und Auswertesoftware von verschiedenen Herstellern stammten. Es folgten die Detektion und das Editieren der Spots, Prozesse nach deren Abschluß drei Versionen eines jeden Gelbildes vorlagen: Erstens das transformierte Bild mit unveränderten Daten ('raw data'), zweitens der gefilterte und prozessierte Scan ('filtered image') und drittens ein nach statistischer Berechnung konstruiertes Modell des Gels ('gaussian image'). Das Ziel dieser Bildbearbeitung war, methodenbedingte Artefakte weitmöglichst zu eliminieren. Dazu wurden die Parameter für die automatische Spotdetektion und -edition individuell für jedes Experiment festgelegt. Zunächst wurde die Detektionssensitivität definiert, indem ein als schwächster und ein als dunkelster zu detektierender Spot bestimmt wurde. Ebenso wurden ein als kleinster und ein großer, noch als einzeln zu erkennender Spot festgelegt. Für eine optimale Beseitigung von Längs- und Querstreifen wurde die maximal zulässige Streckung eines Spots bestimmt, sowie die geeigneten Parameter für die Hintergrundsubtraktion. Um die so gefilterten Spots später exakt quantifizieren zu können, wurde von der Software ein dreidimensionales 'ideales' Modell eines jeden Spots konstruiert, dessen Profil anhand der Gauß-Verteilung berechnet wurde. Für den Vergleich der Gele eines Experimentes, d.h. das Matchen ihrer Spots gegeneinander, wurde jeweils das Gel, dessen Spots die größte Anzahl und die schärfsten Konturen aufwiesen, als Master-Gel ausgewählt. Dieses diente als Vorlage für den 'MatchSet Master', einem konstruierten Gel, das die Daten aller Gele eines Experimentes enthielt und anhand dessen das Matchen durchgeführt wurde. Die Option 'automated matching' erforderte lediglich noch die Wahl von - bereits vorgegebenen - Match-Parametern. Je stringenter die Parameter gewählt wurden, desto präziser war der Spotvergleich, aber desto höher war auch die Zahl der ausgeschlossenen Spots. In dieser Arbeit wurde durchgehend die Vorgabe '50-50-classic' verwendet. Schließlich erfolgte die eigentliche Analyse, der quantitative Vergleich der Gele von den Suizidopfern mit den Kontroll-Gelen, indem die Spotintensitäten, gemessen in optischer Dichte, gegeneinander gematcht wurden.

3.7 Identifikation der Proteine

3.7.1 Prinzip

Um die in der Bildanalyse für interessant befundenen Proteinspots zu identifizieren, werden die Proteine zunächst proteolytisch (meist mittels Trypsin) in Peptide gespalten, deren Molekülmassen per matrix-assisted-laser-desorption-Massenspektrometrie MALDI-MS bestimmt werden. Dazu werden die tryptischen Peptide auf einem Metall-Target mit einer organischen Matrixsubstanz kokristallisiert und durch Beschuß mit einem Laser ionisiert. Unter Hochvakuum werden die Peptidionen im elektrischen Feld beschleunigt und im Flugzeitanalysator hinsichtlich ihres Masse/Ladungsquotienten aufgetrennt. Die Flugzeiten der Ionen bis zum Auftreffen auf einen Detektor (TOF, time of flight) werden gemessen und korrelieren mit den Massen der Ionen. Die Massenbestimmung erfolgt schließlich durch Vergleich mit einem parallel gemessenen Peptidstandardgemisch. Die Massen der Spaltpeptide liefern ein je nach verwendeter Protease spezifisches Muster, das den Fingerabdruck eines Proteins, den sogenannten peptide mass fingerprint (PMF), darstellt. Mit diesen PMF's wird in Datenbanken des world wide web (WWW) nach entsprechenden theoretischen Peptidsequenzen gesucht, die aus virtuell durchgeführten proteolytischen Spaltungen von Proteinen berechnet worden waren. Die Proteinidentifikation erfolgt durch Abgleich mit bekannten Proteinsequenzen, die zu den gemessenen Peptidsequenzen in größtmöglicher Übereinstimmung stehen. Dabei ist es nahezu unmöglich, alle Peptide eines bestimmten Proteins zu detektieren, da erstens einige Peptide, insbesondere hydrophobe und sehr große, nicht aus dem Gel eluiert werden können und zweitens, weil während der MALDI-TOF-MS Analyse nicht alle Peptide ausreichend ionisiert werden können.

3.7.2 In-Gel-Trypsinverdau und MALDI-TOF-MS –Messung

Die enzymatische Spaltung der Proteine erfolgte mittels Trypsin, einer Serin-Endopeptidase, welche Proteine spezifisch durch Hydrolyse von Peptidbindungen an der carboxyterminalen Seite von Lysin und Arginin schneidet. Die interessierenden Proteinspots wurden in Gelstücken einer Größe von 1,5mm Durchmesser manuell aus den Gelen ausgestochen und in 'Multiscreen Filter Platten' (Millipore) für den Verdau vorbereitet gemäß der Methode nach Tebbe (Tebbe et al., 2005). Dazu wurden die Gelstücke zunächst entfärbt mittels je 30 µl einer Lösung aus Kaliumferrocyanid (30 mM) und Natriumthiosulfat (100 mM). Alle Lösungen wurden nach ihrer Verwendung in untergestellte Mikrotiterplatten zentrifugiert. Nach vollständiger Entfärbung wurde die Lösung durch ein kurzes und zweimal fünfminütiges Waschen mit 100 µl Aqua bidest./Spot entfernt. In einer anschließenden Behandlung mit je 100 µl 50%-igem Acetonitril für 10 Minuten wurden die Gelstücke dehydriert und mit je 100µl Ammoniumbicarbonat rehydriert, um so für das Trypsin den optimalen pH-Bereich von pH 8-9 zu schaffen. Beide Schritte wurden einmal wiederholt. Der Trypsinverdau erfolgte mit 100ng Trypsin pro Spot, gelöst in je 25 µl Ammoniumbicarbonat, unter Schütteln bei 37°C über Nacht. Die so entstandenen Peptide wurden für jeweils 20 Minuten mit je 50µl/Spot Aqua bidest., dann mit 50%-igem Acetonitril und schließlich mit 50%-igem Acetonitril mit 0,1% Trifluoressigsäure (TFA) in eine neue Mikrotiterplatte eluiert. Die Eluate wurden in flüssigem Stickstoff gefroren und mittels Vakuumentrifuge getrocknet. Um das verbliebene Ammoniumbicarbonat zu entfernen, wurden die Pellets in Aqua bidest. suspendiert, erneut in Flüssigstickstoff gefroren und lyophilisiert. Diese Prozedur wurde einmal wiederholt, um schließlich die getrocknete Probe in 10 µl Acetonitril (33%) und TFA (0,1%) zu lösen.

Mit Hilfe des Bruker's MAP Pipettierroboters wurden jeweils 0,5 µl Probe mit dem gleichen Volumen α -cyano-4-hydroxy-cinnamid-Säure in 40% Acetonitril und 0,1% TFA auf einem Metall-Target gemischt. Für jeweils 8 Proben wurde ein intern optimiertes Peptidstandardgemisch, bestehend aus 8 Peptiden einer Größe von 1046,54 Da bis 3494,65 Da mit aufgetragen.

3.7.3 Auswertung

Die MALDI-TOF-Massenspektren wurden automatisch mittels Reflex II Spectrometer (Bruker Daltonics) aufgezeichnet und die einzelnen Peaks über Programm Xmas (Bruker Daltonics) annotiert. Mit Hilfe der daraus resultierenden Peakliste erfolgte die Datenbank-Recherche über die Oberfläche BioTools (Bruker Daltonics) mittels der Suchmaschine MASCOT (Matrix Science, Wyndham Place) [Perkins D.N. et al]. Dabei wurden die Suchparameter wie folgt festgelegt: Es wurde in der MSDB-Datenbank gegen humane Proteine gesucht und dabei maximal eine ausgelassene tryptische Schnittstelle ('missed cleavage') toleriert. Als konstante Modifikation der Peptide ('fixed modifications') wurde die Vorgabe einer Carbamidomethylierung, bedingt durch Behandlung der Proteine mit Iodacetamid während der Equilibrierung gewählt. Die Angaben zur 'peptide tolerance', legen die maximal zugelassene Differenz zwischen theoretischer und tatsächlicher Peptidmasse fest, in diesem Fall 200 ppm.

Die Eindeutigkeit der Identifikation eines Proteins wird mithilfe des 'MASCOT-Scores' beurteilt. Dieser basiert auf dem von Pappin (Pappin et al., 1993) entwickelten 'Mowse-Score', der im wesentlichen durch die Größe der Datenbank, die Anzahl der Peptide und die Größe des Proteins bestimmt wird. Der Scoring Algorithmus von MASCOT ist definiert als $-\log_{10} p$ ($p=0,05$). Der so ermittelte Wert und der damit verbundene Significance Level besagen, daß die Wahrscheinlichkeit, daß es sich bei dem identifizierten Protein um ein falsch-positives Ergebnis handelt, bei unter 5% liegt. Dieser Cut-off lag im Fall dieser Arbeit bei 63.

3.8 Reagenzien

<u>Reagenz</u>	<u>Hersteller</u>
Agarose	BIO-RAD, California, USA
Albumin Standard	BIO-RAD, California, USA
Ammoniumbicarbonat	Fluka, Deutschland
Ammoniumpersulfat	Amersham Bioscience, Schweden
Aprotinin ('Trasylol')	Bayer, Deutschland
Bis-/ Acrylamid-Fertiglösung, 30% (2,6%C)	BIO-RAD, California, USA
Bradford-Reagenz	BIO-RAD, California, USA
Bromphenolblau	Sigma, Deutschland
Butanol	Merck, Deutschland
CHAPS	Amersham Bioscience, Schweden
Cleaning Solution	Amersham Bioscience, Schweden
Coomassie	Serva, Deutschland
Dry Strip Coverfluid	Amersham Bioscience, Schweden
DTT	Amersham Bioscience, Schweden
Essigsäure (96%)	Merck, Deutschland
Ethanol	Merck, Deutschland
Formaldehyd	Merck, Deutschland
Glycerol 87%	Amersham Bioscience, Schweden
Glycin	Merck, Darmstadt
Harnstoff	Amersham Bioscience, Schweden
Iodacetamid	Sigma, Deutschland
IPG-Puffer	Amersham Bioscience, Schweden
Kaliumferrocyanid	Sigma, Deutschland

Low Molecular Weight Calibration, 14-97kD	Amersham Bioscience, Schweden
Methanol	Merck, Deutschland
Natriumcarbonat	Merck, Deutschland
Natriumthiosulfat Pentahydrat	Merck, Deutschland
Salzsäure	Merck, Deutschland
SDS	Amersham Bioscience, Schweden
Silbernitrat	Sigma, Deutschland
TEMED	Amersham Bioscience, Schweden
Tris	Amersham Bioscience, Schweden
Tris	Sigma, Deutschland

3.9 Geräte

<u>Gerät</u>	<u>Modell</u>	<u>Hersteller</u>
Elektrophorese-Einheit	Ettan DALT II System	Amersham Biosciences
Gefrierschrank -20 °C	Comfort no-frost	Liebherr
Gefrierschrank -80 °C	HFU 86	Heraeus
Gel-Scanner	Image Scanner	Amersham Biosciences
IEF-Einheit	IPGphor	Amersham Biosciences
IEF-Zubehör	IEF-Sample-Cups	Amersham Biosciences
	IEF-DryStrip-Holder, 24cm	Amersham Biosciences
	IEF-Dry-Strips, NL pH3-10, 24cm	Amersham Biosciences
	Cup- Loading-Strip-Holder, 24cm	Amersham Biosciences
Homogenisierer	Ultra-Turrax T25	IKA®
MALDI-Massenspektrometer	Reflex III	Bruker-Daltonics
MALDI-Präparationsroboter	Map II	Bruker-Daltonics
Magnetrührer	IKAMAG® RCT	IKA®
Mikrowellen-Gerät	Quickchef 650	Moulinex
pH-Meter	pH 523	WTW
Photometer	GENESYS 10 UV	Spectronic Unicam
Schüttler	KL 2	Edmund Bühler
	Aqua Shake	Adolf Kühner
Vortexer	K-550-GE	Bender & Hobein
Waage	440-33	KERN
Zentrifuge	ROTIXA 120 R	Hettich
Zentrifuge	Omnifuge 2.0 RS	Heraeus

4. ERGEBNISSE

4.1 Allgemeines

Es wurden Hirn- und Liquorproben von insgesamt 20 Suizidopfern und 10 Kontrollpersonen mittels hochauflösender 2D-Elektrophorese untersucht. Bei den Hirnregionen handelte es sich um den präfrontalen Cortex, die Amygdala, den Thalamus, den Hippocampus und die Hypophyse sowie als Referenzregion das Cerebellum. Mittels software-gestützter Bildanalyse wurden Expressionsunterschiede zwischen Suizidenten und Kontrollen detektiert und die Proteine der betreffenden Spots per MALDI-MS-Analyse und Proteindatenbank-Recherche identifiziert. Obwohl die gegebene Methodik in erster Linie für die Detektion und Identifikation von Proteinen ausgelegt war, ließen die Ergebnisse darüber hinaus auch Annahmen über mögliche Proteinmodifikationen zu. Hinweise darauf gaben z.B. Diskrepanzen zwischen den theoretischen und den tatsächlichen Positionen einzelner Proteinspots im 2D-Gel oder auch Massenunterschiede zwischen identifizierten und zusätzlichen nicht identifizierten Peaks der MALDI-Massenspektren. Diese Peaks konnten zum Teil selber identifiziert werden, z.B. als angelagerte Proteine oder andere Molekülgruppen.

Da bei humanen postmortalen Gewebe- und Flüssigkeitsproben mit möglichen Degradierungsprozessen zu rechnen ist, wurden jeweils drei Faktoren überprüft: Mögliche Korrelationen der postmortalen Liegezeit (PMI) mit den Spotintensitäten, die Anzahl nicht detektierter C- und N-terminaler Sequenzen sowie die mögliche Identifikation von Ubiquitin anhand der Massenspektren als Hinweis für beginnende Proteolyse.

In der folgenden Ergebnisdarstellung für die einzelnen Hirnregionen wird jeweils zunächst das Master-Gel zur Übersicht gezeigt sowie in Detailbildern die qualitativen Unterschiede einzelner Spots zwischen Suizidopfern und Kontrollen. Quantitative Expressionsunterschiede werden in Diagrammen anhand der Intensitäten der betreffenden Spots dargestellt. Als Abkürzungen für die einzelnen Proteine werden stets die Gen-Namen verwendet. Hinsichtlich der Validität der Methode werden erstens zur Beurteilung der Reproduzierbarkeit der 2D-PAGE die Korrelationskoeffizienten nach Pearson angegeben, die von der PD Quest-Software berechnet wurden. Sie stellen ein Maß für den Erfolg des Matchings der Spots gegen das jeweilige Master-Gel für jede Hirnregion dar. Zweitens werden die Ergebnisse der Korrelation der Spot-Intensitäten mit den Faktoren Alter und Geschlecht der Personen sowie der

postmortalen Liegezeit und der Suizidmethode angegeben, um den möglichen Einfluß dieser Faktoren auf die Gesamtergebnisse zu bewerten.

Da die Anzahl der Proben von 20 Suizidopfern und 10 Kontrollen fast nie vollständig gegeben war und zudem nicht immer alle Gele auswertbar waren, ergab sich für jede Hirnregion bzw. den Liquor, jeweils eine unterschiedliche Zusammensetzung der Probengruppen.

4.2 Präfrontaler Cortex

4.2.1 Übersicht

In der PD-Quest-Software unterstützten Bildanalyse von insgesamt 26 2D-Gelen der Cortices von 17 Suizidopfern und 9 Kontrollpersonen (Tab. 4.2.1) wurden durchschnittlich 1200 Spots detektiert, von denen ca. 820 Spots gematcht werden konnten.

Tab. 4.2.1 Präfrontaler Cortex: Daten der Suizidopfer und Kontrollen

	Geschlecht	Alter [Durchschnitt in Jahren]	postmortale Liegezeit [Durchschnitt in Stunden]	Suizidmethode
Suizidopfer (n=17)	Männer n=10 Frauen n= 7	31.7 ± 11.7 14.5 - 58.6	18.4 ± 10.0 5 - 40	<i>hart:</i> Männer n=9 Frauen n=5 <i>weich:</i> Männer n=0 Frauen n=3
Kontrollen (n=9)	Männer n=7 Frauen n=2	30.5 ± 11.6 14.1 - 50.0	9.2 ± 5.5 2.5 - 17	
Statistik mittels oneway ANOVA (P- Wert mit 95% Signi- fikanz)	df = 1 F = 0,427 P = 0.52	df = 1 F = 0,065 P = 0.80	df = 1 F = 6,460 P = 0.02	

Im Vergleich der Spotintensitäten zeigten sechs Spots auffällige Unterschiede (Spots sp4005, sp7823, sp7824, sp7621 und sp9401) zwischen beiden Gruppen, die laut Chi-Quadrat-Test in keiner Korrelation zu den Faktoren Alter, Geschlecht, postmortale Liegezeit oder Suizidmethode standen (Tab. 4.2.3). Die Spots sp4005 und sp7828 erschienen ausschließlich bei den Suizidopfern und konnten mittels MALDI-MS-Analyse und MSDB-Datenbankrecherche als saures fibrilläres Gliaprotein und Alpha-

B-Crystallin identifiziert werden (Tab. 4.2.2). Die Spots sp7823 und sp7824 waren eng miteinander assoziiert und konnten beide dem Enzym Mangan-Superoxid-Dismutase zugeordnet werden, wobei sp7824 bei den Suizidopfern signifikant stärker und sp7823 ausschließlich in dieser Gruppe exprimiert waren. Bei vier der fünf Suizidopfer (Nr. 19, 20, 22, 23), die Spot sp7823 aufwiesen, war auch der GFAP-Spot vorhanden, und zählte hier zu den Spots mit den höchsten Intensitäten (Abb. 4.2.3 (s.S. 52)).

Die Spots sp7621 und sp9401 waren in beiden Gruppen vertreten, zeigten aber bei den Suizidenten eine um mindestens Faktor 2 geringere Expression als bei den Kontrollen (Abb. 4.2.3 (s.S. 52)). Beide Spots konnten nicht eindeutig identifiziert werden.

Tab. 4.2.2 Präfrontaler Cortex: Identifikation der ausgewählten Proteine mittels MALDI-Massenspektrometrie und MSDB-Datenbank Suche

Spot ID	Proteinidentität	MG [kD] (theoret.)	pl (theoret.)	Spotintensitäten bei Suizidopfern im Vergleich zu Kontrollen	
	Name	Access. Nr. (MSDB)			
sp4005	saures fibrilläres Gliaprotein (glial fibrillary acidic protein) (GFAP)	Q96P18	49.88	5,42	nur bei Suizid- opfern präsent
sp7824	Mangan Super- oxid-dismutase (SOD2) - Mutante Q143N	1QNMA	22.29	6,86	signifikant erhöht
sp7823	'SOD2-Fragment'	Q7Z7M4	23,77	6,86	nur bei Suizid- opfern präsent
sp7828	alpha crystallin chain B (CRYAB)	P02511	20,16	6,76	nur bei Suizid- opfern präsent
sp7621	-----nicht identifiziert-----				mind. 1,5-fache Verminderung
sp9401	-----nicht identifiziert-----				mind. 1,5-fache Verminderung

Tab. 4.2.3 Präfrontaler Cortex: Die Berechnung mittels Chi-Quadrat-Test zeigt keine Korrelationen zwischen den Spot-intensitäten und den Faktoren Alter, Geschlecht, postmortaler Liegezeit (PMI) oder Suizidmethode

Gruppe	Spot-Nr.	Protein	Alter	Geschlecht	PMI	Suizid-methode
Suizid-opfer	sp4005	GFAP	p=0,242	p=0,386	p=0,242	p=0,386
	sp7823	SOD2	p=0,263	p=0,319	p=0,083	p=0,559
	sp7828	CRYAB	p=0,242	p=0,386	p=0,242	p=0,386
	sp7621	n.i.	p=0,263	p=0,319	p=0,083	p=0,559
	sp9401	n.i.	p=0,263	p=0,319	p=0,083	p=0,559
Kontrollen	sp4005	GFAP	-	-	-	
	sp7823	SOD2	-	-	-	
	sp7828	CRYAB	-	-	-	
	sp7621	n.i.	p=0,243	p=0,342	p=0,230	
	sp9401	n.i.	p=0,243	p=0,342	p=0,230	

4.2.2 Saures fibrilläres Gliaprotein (glial fibrillary acidic protein) (GFAP)

GFAP zählt zu den intermediären filamentären Proteinen der Klasse III, das spezifisch in Astrozyten exprimiert wird. Es dient der Stabilisierung des glären Zytoskeletts (Fuchs and Weber, 1994) und ist notwendig für die langfristige Aufrechterhaltung der Myelinisierung des ZNS (Liedtke et al., 1996). Astrozyten reagieren auf neuronale Schädigungen unter anderem durch verstärkte Expression intermediärer Filamente (Mucke and Eddleston, 1993), weshalb GFAP als Marker für diese als reaktive Astroglisis bezeichnete Astrozytenaktivierung gilt (Pekny and Pekna, 2004). Spot sp4005 erschien ausschließlich bei den Suizidopfern und war offensichtlich Teil einer Kette aus 3 Proteinen (Abb. 4.2.2a,b (s.S. 51); Abb. 4.2.3a (s.S. 52)). Die beiden benachbarten Spots sp4001 und sp4003, die auch bei den Kontrollen vorkamen, hatten unterschiedliche pI's bei etwa den gleichen molekularen Massen und konnten ebenfalls als GFAP identifiziert werden. Die Position des Spots sp4005 im 2D-Gel deutet auf eine Phosphorylierung des Proteins hin, da dieses erstens eine Verschiebung in den sauren pH-Bereich zeigt und zweitens eine leichte Erniedrigung des MG's aufweist.

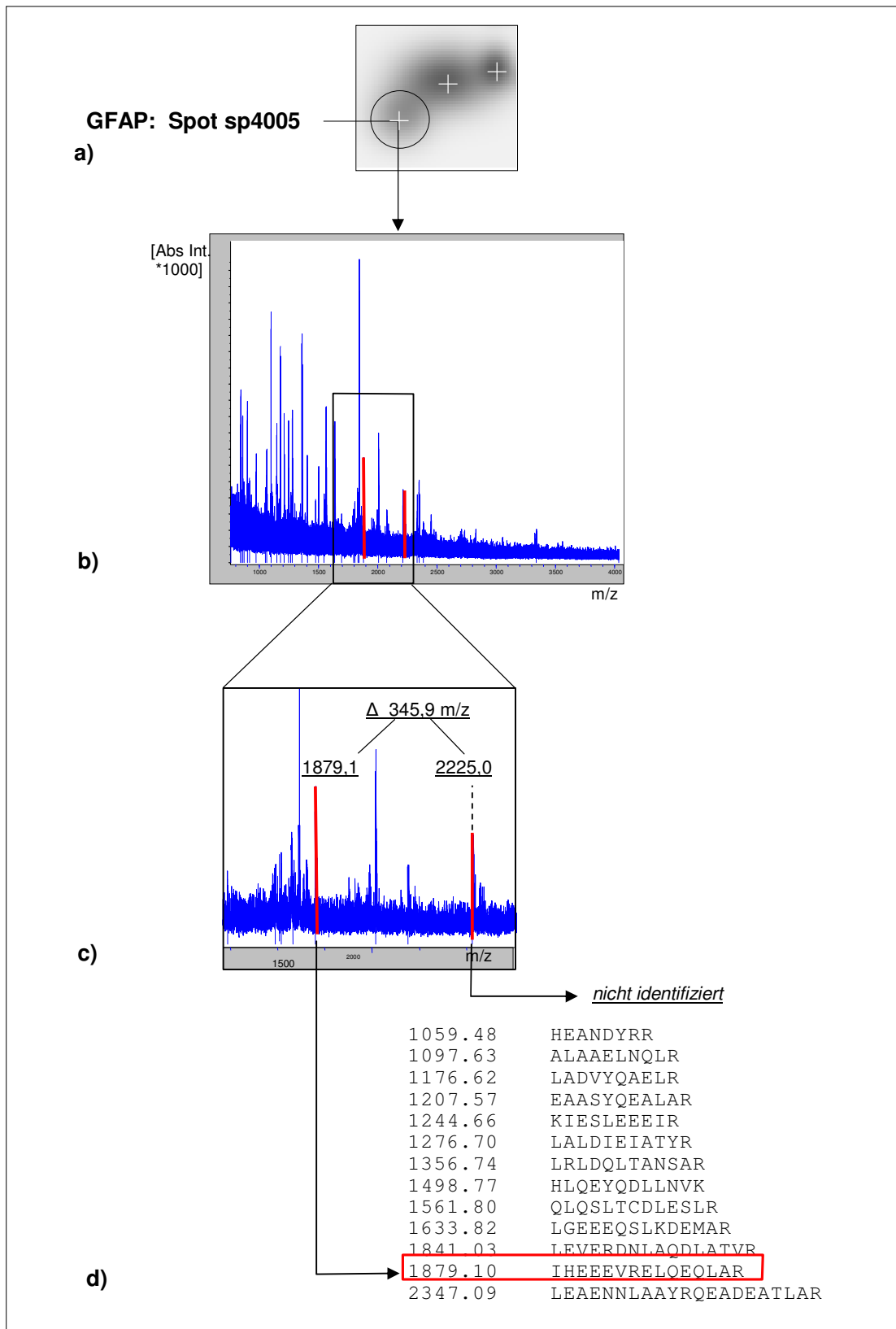
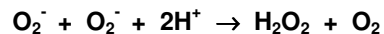


Abb. 4.2.1 GFAP: Spot sp4005 trat nur bei Suizidopfern auf (a) und zeigte im MALDI-Massenspektrum (b,c) einen nicht identifizierten Peak bei 2225,0 m/z mit einer Differenz von 345 m/z zum Peak bei 1879,1 m/z. Dieser zählt zu den als GFAP identifizierten Peaks (d). Eine Massendifferenz von 345 weist auf die Anlagerung eines 5'phos-Guanosyl-Restes hin.

Diese kann trotz der zusätzlichen angelagerten Molekülmassen auftreten, da die Negativladung der Phosphatgruppen die des SDS' während der Elektrophorese überlagert und somit den Spot quasi nach unten zieht. Darüber hinaus ist für Intermediärfilamente diese Kettenbildung von Spots bekannt, die durch Disaggregation des Proteins infolge dieser Modifikation auftritt (Johnston-Wilson et al., 2000). Eine reine Phosphorylierung lässt sich im Vergleich der Massenspektren der drei GFAP-Spots allerdings nicht eindeutig durch die entsprechenden Massendifferenzen von 80Da belegen. Jedoch fällt bei Spot 4005 ein nicht identifizierter Peak bei 1879,1 m/z auf, dessen Massendifferenz zum Peak bei 2225 m/z 345,9 m/z beträgt, was der Masse eines 5'phospho-Guanosyl-Restes entspricht Abb. 4.2.1. Die Bedeutung dieser Modifikation wird zu diskutieren sein.

4.2.3 Mangan-Superoxid-Dismutase (SOD2)

Die Spots sp7823 und sp7824 wurden als Mangan-Superoxid-Dismutase (**SOD2**) identifiziert. Diese mitochondriale Isoform der Superoxid-Dismutase zählt zu den wichtigsten Antioxidationsenzymen und katalysiert den Abbau des zytotoxischen Superoxidanions, einem Produkt vornehmlich aus der Atmungskette, in der Reaktion:



Das Enzym schützt dadurch die Zelle vor oxidativen Schäden, die insbesondere zur Zerstörung der Zellmembran führen.

Spot sp7823, der ausschließlich bei den Suizidopfern auftrat, war eng mit dem deutlich größeren Spot sp7824 von niedrigerem MG und gleichem pI assoziiert, der in dieser Gruppe signifikant stärker exprimiert war (Abb. 4.2.2f, Abb. 4.2.3d (s.S. 51, 52)). Das Vorkommen dieser zwei Varianten läßt sich vermutlich anhand der Ergebnisse der Datenbankrecherche erklären. Es wurde zwar für beide Spots mit dem jeweils höchsten Score die 'SOD2-Mutante Q143N' (22,29 kD) identifiziert, aber für sp7823 wurde mit dem beinahe gleichen Score das 'SOD2-Fragment' mit der Masse 23,77 kD und der MSDB Acces-Nr. Q7Z7M4 gefunden (Tab. 4.2.2) Möglicherweise stellt sp7823 diese höhermolekulare Variante des Enzyms dar. Die Möglichkeit, daß es sich bei diesem Spot um eine Modifikation von sp7824 handelt, ist unwahr scheinlich, da sich weder aus den Spektren noch aus den Peptidsequenzen Hinweise auf eine Abwandlung des Enzyms ergeben.

4.2.4 Alpha-B-Crystallin (CRYAB)

Die Alpha-Crystalline zählen zu den Hauptkomponenten der menschlichen Augenlinse. Neben ihrer Funktion als Strukturproteine wirken sie auch als molekulare Chaperone, indem sie unspezifische Aggregation und Denaturierung nicht-nativer Polypeptide verhindern. Alpha-Crystalline gehören zur Gruppe der kleinen Hitzeschockproteine (small heat shock proteins, Hsp's) und schützen die Zelle vor Schäden, insbesondere der Zellmembran, bedingt durch verschiedenartige Stressfaktoren. Alpha-B-Crystallin (CRYAB) wird außer im Auge auch in anderen Organen exprimiert, so z.B. in der Astroglia des Gehirns (Horwitz, 2003).

In der vorliegenden Arbeit wurde CRYAB ausschließlich in Cortices von Suizidopfern nachgewiesen (Abb. 4.2.2 g, Abb. 4.2.3 b (s.S. 51, 52)).

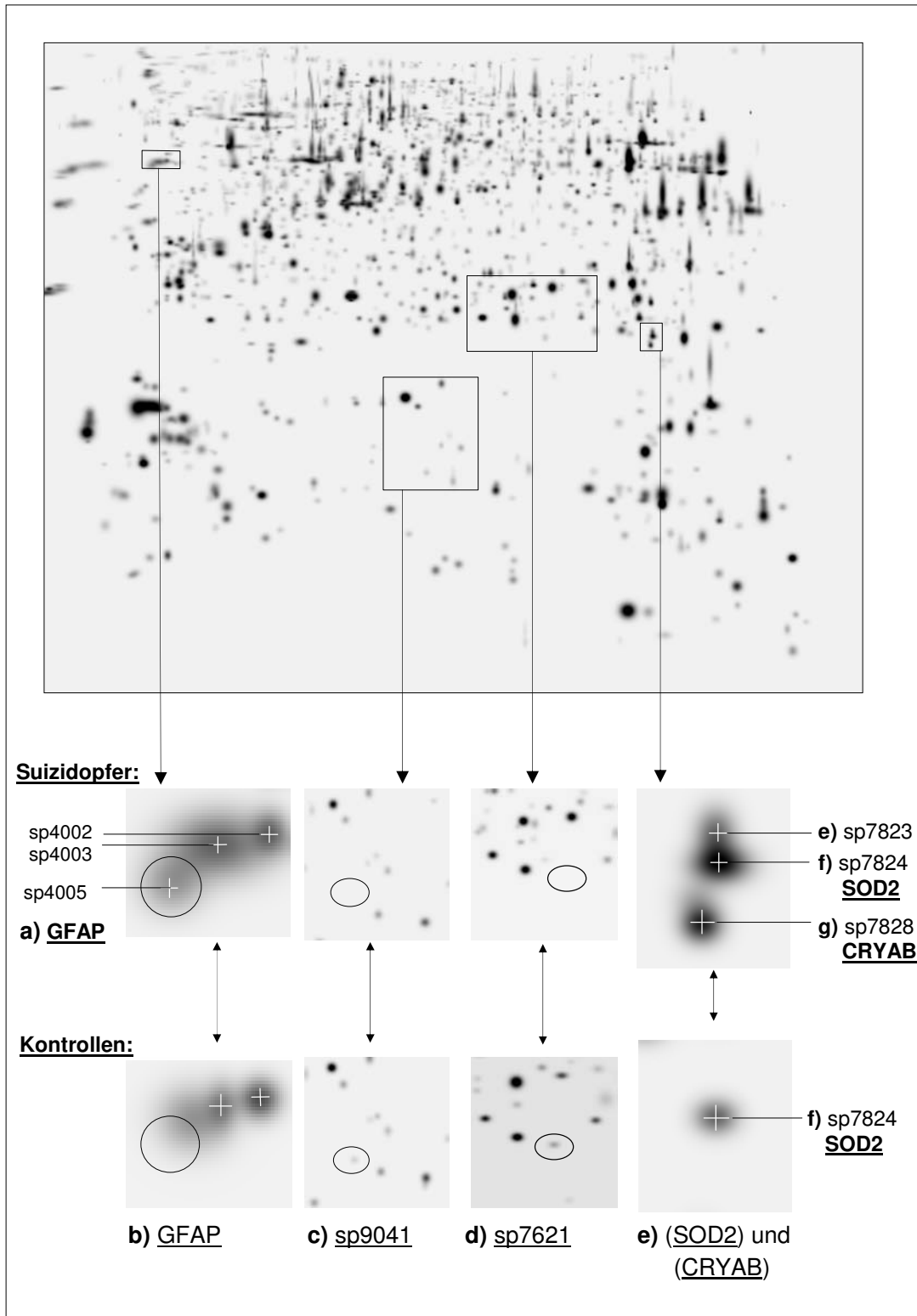


Abb. 4.2.2 Bildanalyse der 2D-Gele des präfrontalen Cortex'

Das Master-Gel dient der Übersicht. Die Detailbilder zeigen die Spots, die signifikante Veränderungen zwischen Suizidopfern und Kontrollen aufwiesen: **a), b)** Saures fibrilläres Gliofilament (GFAP); nicht identifiziert: Spots **c) sp9041** und **d) sp7621**; **e), f)** Mangan Superoxid-Dismutase (SOD2) und **e), g)** Alpha-B-Crystallin (CRYAB)

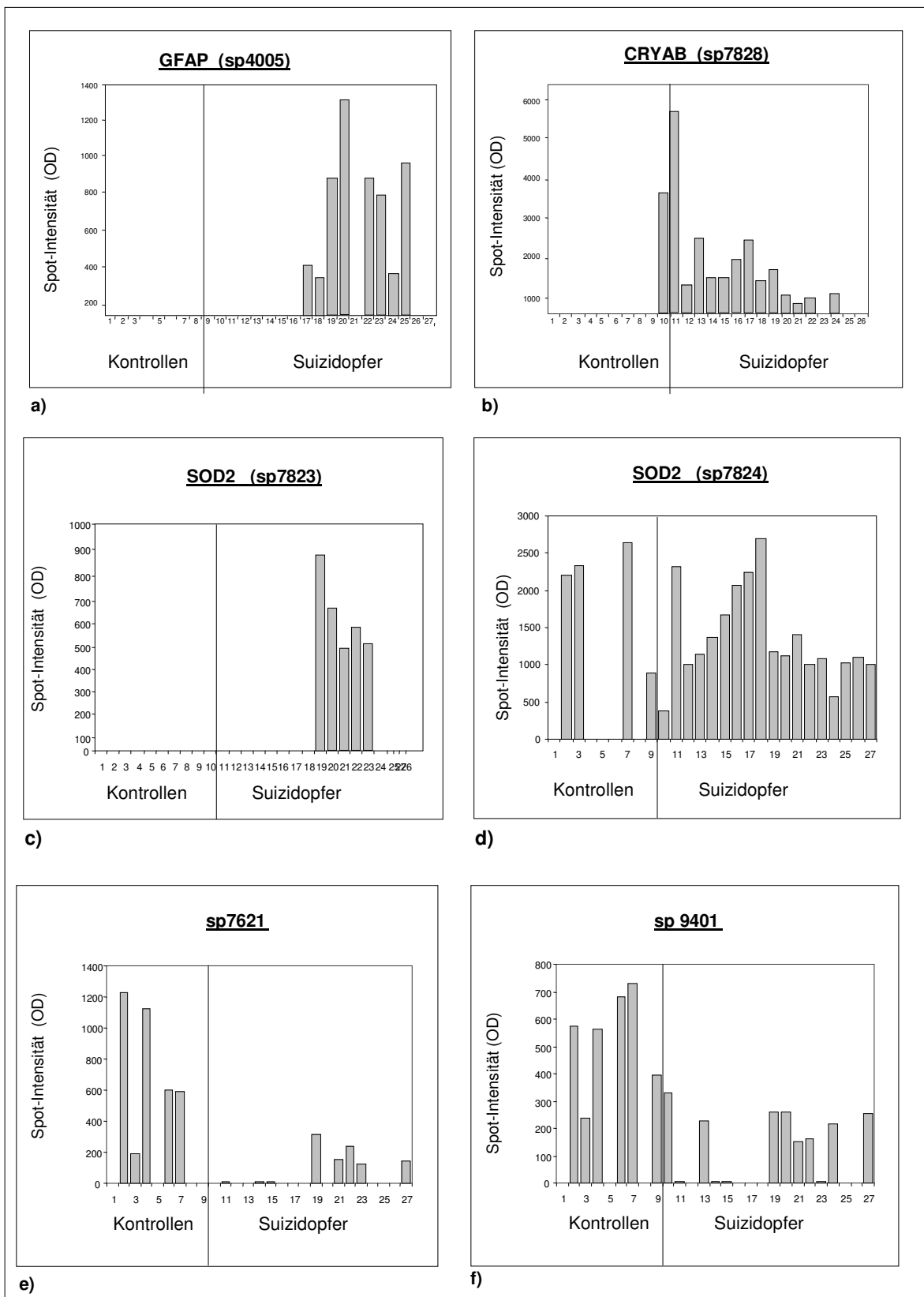


Abb. 4.2.3 Präfrontaler Cortex: Spotintensitäten im Vergleich von Kontrollen (n=9) und Suizidopfern (n=19): **a)** GFAP (sp4005), **b)** CRYAB (sp7828), **c)** SOD2 (sp7823), **d)** SOD2 (7824), nicht identifiziert: **e)** (sp7621) und **f)** (sp9401) (Detektion der Spotintensitäten mittels PD-Quest Software)

4.3 Amygdala

4.3.1 Übersicht

Für die Auswertung der 2D-PAGE der Amygdala wurden insgesamt 21 2D-Gele von 14 Suizidopfern und 7 Kontrollen der Bildanalyse zugeführt (Tab. 4.3.1). Dabei wurden sechs Spots detektiert, die signifikante Unterschiede zwischen beiden Gruppen aufwiesen und die eindeutig identifiziert werden konnten (Tab. 4.3.2). Die differentielle Expression dieser Proteine im 2D-Gel ist in Abb. 4.3.5 (s.S. 59) und die Verteilung ihrer Spotintensitäten in Abb. 4.3.9 (s.S. 65) dargestellt. Drei der sechs Proteine waren bei den Suizidopfern vermindert exprimiert und wurden als Strukturelemente des Zytoskelettes im ZNS identifiziert: Das Neurofilament Triplet L Protein sowie zwei Isoformen des Tubulins. Zwei weitere Spots traten ausschließlich bei den Suizidopfern auf und konnten den Enzymen Glutaminsynthetase und Fruktose-1,6-Bisphosphat-Aldolase C zugeordnet werden. Die statistische Berechnung zeigte keine Korrelationen zwischen den Intensitäten der untersuchten Spots und den Faktoren Alter, Geschlecht oder PMI. Hinsichtlich der Suizidmethode bestand dagegen eine Assoziation der Intensitäten von NEFL ($p=0,016$), GLNS1 ($p=0,030$) und TUBII ($p=0,051$) mit harten Methoden (Tab. 4.3.3).

Tab. 4.3.1 Daten der Suizidopfer und Kontrollen

	Geschlecht	Alter [Durchschnitt in Jahren]	postmortale Liegezeit [Durchschnitt in Stunden]	Suizidmethode
Suizidopfer (n=14)	Männer n = 9 Frauen n = 5	30,5 ± 8,7 14,5 – 46,8	22,8 ± 18,8 4,2 – 77,5	<u>hart</u> : Männer n = 9 Frauen n = 4 <u>weich</u> : Männer n = 0 Frauen n = 1
Kontrollen (n=7)	Männer n = 5 Frauen n = 2	34,8 ± 16,7 11,3 – 51,6	14,7 ± 12,2 2,5 – 40,0	
Statistik mittels oneway ANOVA (P-Wert mit 95% Signifikanz)	df = 1 F = 0,602 P = 0,447	df = 1 F = 0,373 P = 0,549	df = 1 F = 1,070 P = 0,314	

Tabl. 4.3.2 Identifikation der ausgewählten Proteine mittels MALDI-Massenspektrometrie und MSDB-Datenbank Suche

Spot Nr.	Name	Accession Nr. (MSDB)	MG [kD] (theor.)	pI (theor.)	Spotintensitäten bei Suizidopfern im Vergleich zu Kontrollen
sp0107	Neurofilament Triplet L Protein (NEFL)	Q8IU72	61,54	4,64	mind. 2-fache Verminderung
sp3513	Beta Tubulin (TUBB4)	T08726	50,38	4,78	mind. 1,5-fache Verminderung
sp3509	Beta Tubulin II (class II beta tubulin isotype) (TUBII)	Q8IWR2	50,28	4,82	mind. 2-fache Verminderung
sp3706	Glutamin-Synthetase (GLNS)	Q7Z3W4	44,63	6,43	nur bei Suizidopfern präsent
sp4708, sp4709	Fruktose-Bisphosphat Aldolase C (ALDC)	P15104	39,70	6,46	nur bei Suizidopfern präsent

Tab. 4.3.3 Die Berechnung mittels Chi-Quadrat-Test zeigt Korrelationen zwischen den Spot-Intensitäten der Proteine NEFL, GLNS, TUBII und der Suizidmethode. Im übrigen wurden keine Korrelationen gefunden. (postmortale Liegezeit = PMI)

Gruppe	Protein	Alter	Geschlecht	PMI	Suizidmethode
Suizidopfer	NEFL	p=0,084	p=0,425	p=0,314	p=0,016
	GLNS	p=0,345	p=0,386	p=0,301	p=0,030
	ALDC1	p=0,270	p=0,226	p=0,279	p=0,999
	ALDC2	p=0,426	p=0,381	p=0,279	p=0,082
	TUBB4	p=0,185	p=0,386	p=0,301	p=0,992
	TUBII	p=0,274	p=0,429	p=0,289	p=0,051
Kontrollen	NEFL	p=0,227	p=0,321	p=0,227	
	GLNS	-	-	-	
	ALDC1	-	-	-	
	ALDC2	-	-	-	
	TUBB4	p=0,227	p=0,321	p=0,227	
	TUBII	p=0,227	p=0,321	p=0,227	

4.3.2 Neurofilament Triplet L Protein (neurofilament light polypeptide (NEFL))

NEFL ist die kleinste von drei Proteinuntereinheiten, die zusammen die heteropolymere Struktur der Neurofilamente bilden (Lee et al., 1993). Diese zählen, ebenso wie das im Cortex gefundene GFAP (s. Kap 4.2.2), zur Familie der Intermediärfilamente, werden jedoch im Gegensatz zu dem astrozytären GFAP spezifisch in Neuronen exprimiert. Neurofilamente sind für die mechanische Integrität von Neuronen notwendig und sind beteiligt am radialen Wachstum der Axone, was insbesondere für deren Leitungsgeschwindigkeit von Bedeutung ist (Straube-West et al., 1996). NEFL erschien als relativ kleiner Spot und lag im niederen pI-Bereich, was auf die hohe Anzahl von Glutaminsäureresten am C-terminalen Ende zurückzuführen ist (Abb. 4.3.1).

```

1      M.....
      .....
      .....
461    AKAEAAKDEP PSEGAEEEE KDKAEAEAE
491    AAEEEEAAKE ESEAAKEEEE GGEAEAEAE
521    KEAEAEKKV EGAGEEAQAA KKD

```

Abb. 4.3.1:

Aminosäuresequenz von
NEFL (543AS)
(E = Glutaminsäurereste)

Das Protein kommt bei den Suizidopfern nicht, bzw. mindestens um Faktor zwei vermindert vor. Ein N- oder C-terminaler proteolytischer Abbau kann weitgehend ausgeschlossen werden, da sowohl bei den Suizidenten als auch bei den Kontrollen Peptide im Bereich der Anfangs- bzw. Enddomäne identifiziert wurden. Während für GFAP im präfrontalen Cortex mehrere Spots detektiert worden waren (Abb. 4.2.2a,b), erschien NEFL als ein einzelner isolierter Spot (Abb. 4.3.5b (s.S. 59)). Da horizontale Spot-Ketten bei Intermediärfilamenten ein typisches Merkmal von Disaggregation der Proteine infolge von Phosphorylierung sind, gibt es somit keinen Hinweis auf diese Modifikation und deren funktionale Konsequenzen für NEFL.

4.3.3 Beta Tubulin

Die Beta-Untereinheiten des Tubulins bilden mit Alpha-Tubulin Proteinfilamente, die sich zu Mikrotubuli zusammenfügen und als solche neben den erwähnten Intermediärfilamenten zu den Hauptkomponenten des Zytoskelettes zählen. Beta Tubulin wurde in den beiden Isoformen Beta Tubulin (TUBB4) und Beta Tubulin II (tubulin beta class II isotype) (TUBII) detektiert. TUBB4 erschien in Form von zwei eng aneinandergrenzenden Spots (Abb. 4.3.5c (s. S. 59)), von denen der höhermolekulare bei den Kontrollen um mindestens den Faktor 1,5 vermindert exprimiert war, während der tiefer liegende größere Spot zwischen beiden Gruppen etwa gleich verteilt war (Abb. 4.3.9e (s. S. 65)). TUBII hatte bei den Suizidopfern die mindestens 2-fach geringeren Spotintensitäten (Abb. 4.3.5d, Abb. 4.3.9f (s. S. 59, 65)).

Die beiden Tubulin-Isoformen TUBB4 und TUBII unterscheiden sich in ihren Aminosäuresequenzen an den Positionen 191, 201 und 387. Dies führt zu Differenzen der molekularen Massen und des pI's der Proteine, wonach rechnerisch das MG von TUBB4 um 100 Da höher und der pI um 0,04 tiefer liegt als bei TUBII. Die tatsächlichen Positionen der beiden Spots im 2D-Gel wichen jedoch von den theoretischen, aus MG und pI berechneten Positionen ab (Abb. 4.3.2).

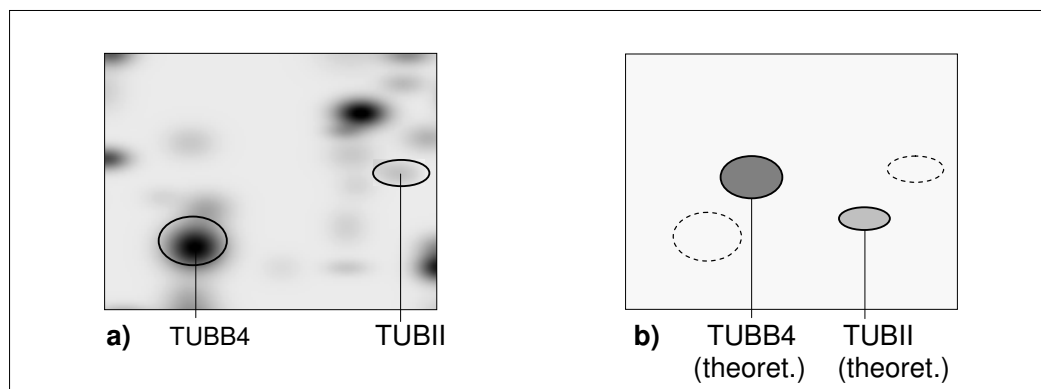


Abb. 4.3.2 Positionen der Tubulin-Isoformen TUBB4 und TUBII im 2D-Gel

a) tatsächliche Positionen von TUBB4 und TUBII und **b)** theoretische Positionen, schematisch dargestellt und berechnet anhand der molekularen Massen (TUBB4 50,38kD / TUBII 50,28kD) und pI-Werte (TUBB4 4,78 / TUBII 4,82)

Eine Erklärung für diese Verschiebung könnten die identifizierten Peptide innerhalb der Proteinsequenz von TUBB4 geben, denn hier fallen unidentifizierte C- und N-terminalen Bereichen von bis zu 127 AS Länge (Abb. 4.3.3) auf. Dies könnte auf

einen möglichen proteolytischen Abbau hinweisen, was einen Shift des Spots nach unten, d.h. in den niedermolekularen Bereich zur Folge hätte. Dabei sind bei den Suizidopfern größere Bereiche nicht identifiziert als bei den Kontrollen, so daß die Proteolyse dort weiter fortgeschritten sein könnte.

```

1 MREIVHIQAG QCGNQIGAKF WEVISDEHGI DPTGSYHGDS DLQLERINVY
51 YNEAAGNKYV PRAILVDLEP GTMDSVRSGP FGQIFRPDNF VFGQSGAGNN
101 WAKGHYTEGA ELVDSVLDVV RKESESCDCL QGFQLTHSLG GGTGSGMGTL
151 LISKIREEYP DRIMNTFSVM PSPKVSDTVV EPYNATLSVH QLVENTDETY
201 CIDNEALYDI CFRTLKLTPP TYGDLNHLVS ATMSGVTTCL RFPGQLNADL
251 RKLAVNMVPE PRLHFFMPGE APLTSRGSQQ YRALTVPELT QQMFDSKNMM
301 AACDPRHGRY LTVAAIFRGR MSMKEVDEQM LNVQNKNSY FVEWIPNNVK
351 TAVCDIPPRG LKMSATFIGN STAIQELFKR ISEQFTTMFR RKAFLHWYTG
401 EGMDEMEFTE AESNMNDLVS EYQQYQDATA DEQGEFEEEE GEDEA

```

Abb. 4.3.3: Proteinsequenz von TUBB4 (unterstrichen: identifizierte Peptide) Bei den Suizidopfern wurden in C- und N-terminalen Abschnitten von bis zu 127 Aminosäuren keine Peptide identifiziert, was auf einen proteolytischen Abbau hinweisen könnte.

Dies könnte auch das Auftreten von zwei Spots für TUBB4 erklären, da es sich bei dem oberen Spot (TUBB4a) um ein weniger weit proteolysiertes Protein handeln könnte. Auf der anderen Seite fallen bei diesem Spot zwei weitere Veränderungen in den Massenspektren auf (Abb. 4.3.4): Zum einen erschien hier ein zusätzlicher, nicht identifizierter Peak bei 3323,6 m/z, dessen Massendifferenz zum nächstliegenden identifizierten Peak 616,3 m/z betrug. Dies weist auf die posttranslationale Anlagerung eines Häms hin, das die prosthetische Gruppe verschiedener Proteine bildet. Zugleich wurde ein nicht zur Sequenz des Tubulins gehörende Peak bei 833,3 m/z als Porphobilinogen Deaminase (Fragment) identifiziert, einem Enzym der Häm biosynthese. Das Gesamtmolekulargewicht von Häm und dem Enzym beträgt ca. 1580kD, was der Größendifferenz der beiden TUBB4-Spots entsprechen könnte. Häm ist beim Menschen vor allem Bestandteil des Hämoglobins. Sein Auftreten könnte auf eine Verunreinigung der Probe mit Blut während der Hirnsektion oder der Probenverareitung zurückzuführen sein. In diesem Fall würde es sich bei diesen Proteinmodifikation um ein Artefakt handeln.

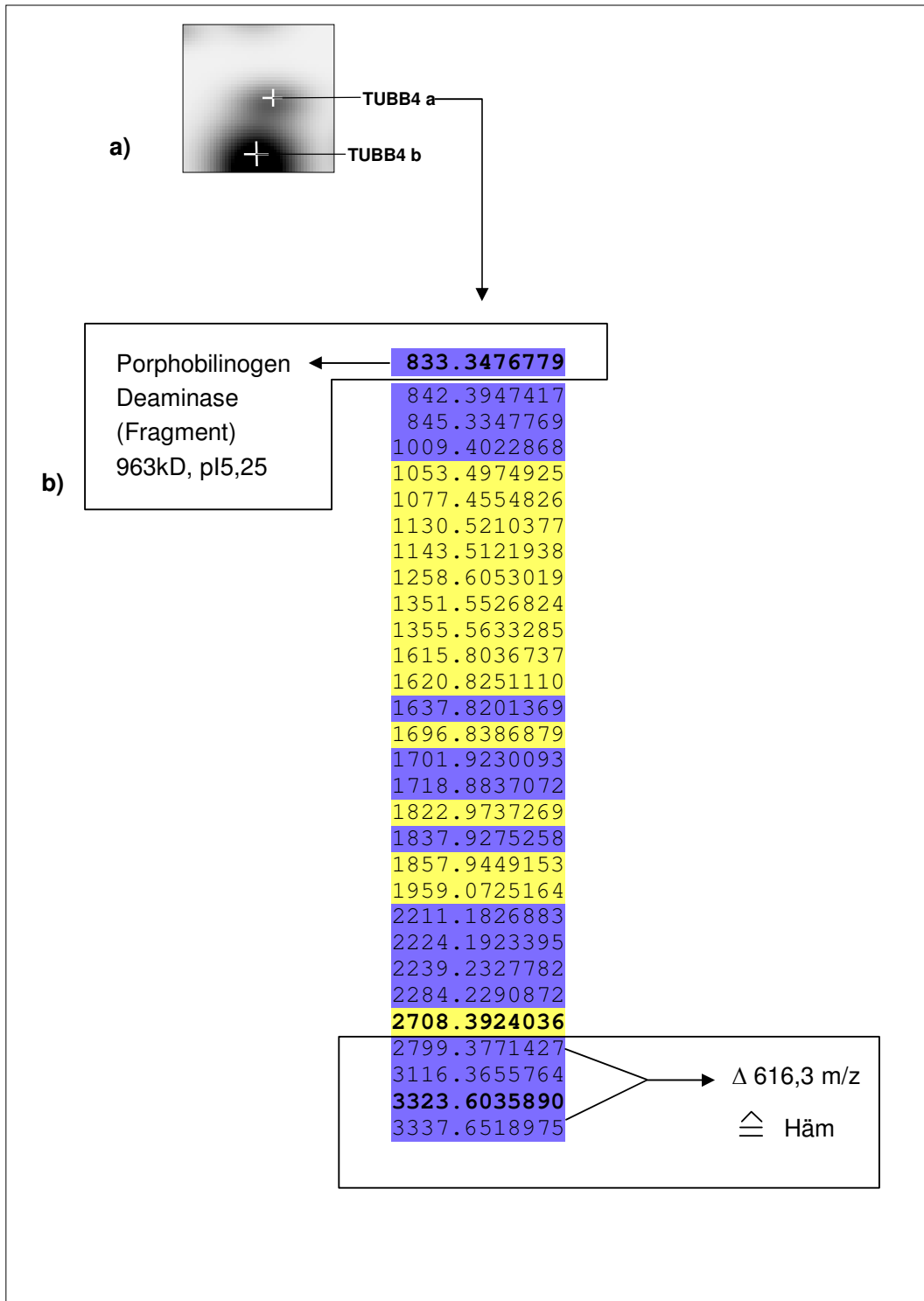
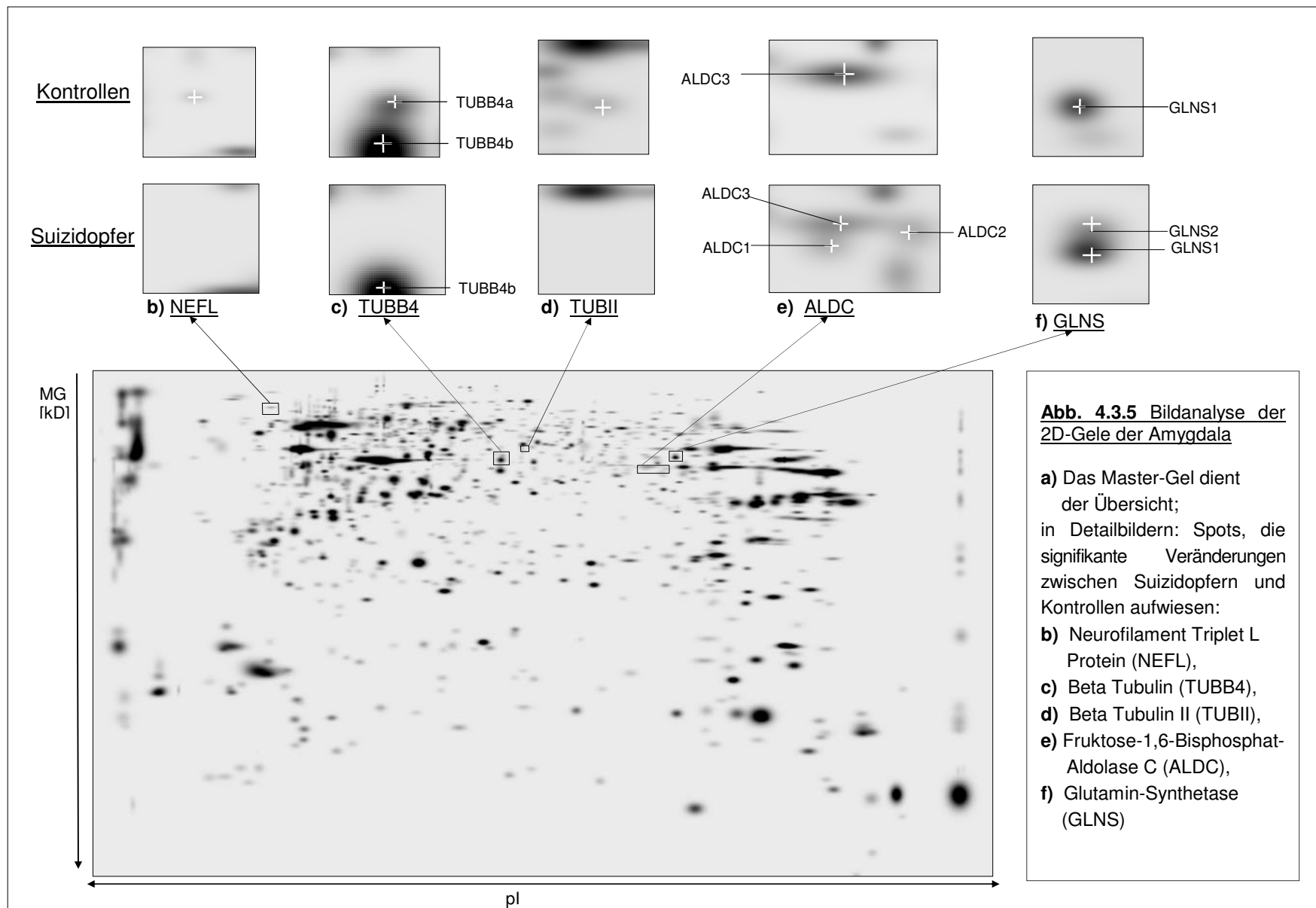
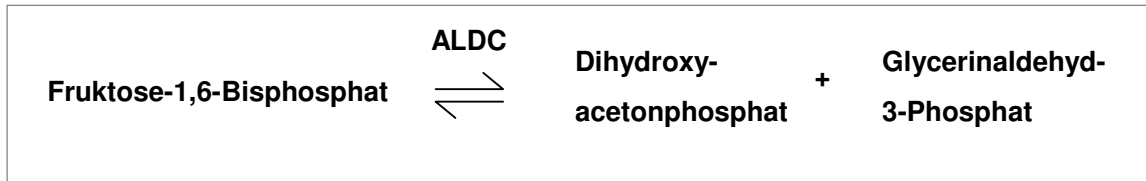


Abb. 4.3.4 Modifikation des Spots Tubulin Beta4 **a)** Bei den Suizidopfern erscheint ein zweiter höhermolekularer Spot für TUBB4 (TUBB4a). **b)** Bei diesem wurde ein nicht zu TUBB4 gehörender Peak (833,3 m/z) als Porphobilinogen Deaminase (Fragment) (963kD, pI 5,25) identifiziert. Ein weiterer nicht identifizierter Peak bei 3323,6 m/z weist auf die Anlagerung einer Häm-Gruppe hin.



4.3.4 Fruktose-1,6-Bisphosphat-Aldolase C (ALDC)

Zwei Spots, die ausschließlich bei Suizidopfern vorkamen, stellten das Enzym Fruktose-1,6-Bisphosphat-Aldolase in ihrer hirnspezifischen Isoform C dar (**ALDC1** und **ALDC2**). Als Enzym der Glykolyse katalysiert ALDC die reversible Spaltung von Fruktose-1,6-Bisphosphat:



ALDC1 war in einigen Fällen mit einem weiteren höhermolekularen Spot assoziiert (Abb. 4.3.8a), der ebenfalls als ALDC identifiziert wurde (**ALDC3**). Dieser kam in nicht statistischer Verteilung sowohl in der Suizidenten- als auch in der Kontrollgruppe vor. Dieses Muster für ALDC im 2D-Gel entspricht prinzipiell den Befunden publizierter Proteomanalysen, in denen das Enzym zumeist ebenfalls als eine horizontale Kette mehrerer Spots auftritt.

Bei Betrachtung der Proteinsequenzen von ALDC1 und ALDC2 fällt auf, daß C- bzw. N-terminale Abschnitte von bis zu 110 Aminosäuren Länge nicht identifiziert werden konnten (Abb. 4.3.6). Dies könnte auf einen mehr oder weniger limitierten proteolytischen Abbau in der Gruppe der Suizidopfer hinweisen, der unter Umständen zur Inaktivierung des Enzyms führen könnte. Für ALDC sind mindestens sechs Aminosäurepositionen bekannt, die entscheidende Funktionen für die katalytische Aktivität des Enzyms haben (Koeck et al., 2004) (Abb. 4.3.6). Drei davon sind bei den Kontrollen in ALDC3 nachweislich vorhanden (Arg55, Lys146, Asn319), während bei den Suizidopfern die entsprechenden Peptide nicht identifiziert wurden, so daß über das Vorhandensein dieser Stellen im Protein keine Aussage getroffen werden konnte. Um aber auszuschließen, daß ihr Fehlen darauf basierte, daß die Längen der entsprechenden Peptide außerhalb des MALDI-MS-Meßfensters von 800-4000 m/z lagen, wurde ein virtueller Trypsin-Verdau durchgeführt. Dieser zeigte, daß potentiell alle tryptischen Peptide hätten gemessen werden können.

Es war daher denkbar, daß die nicht identifizierten Peptide von proteolytischem Abbau betroffen waren. Dabei könnte insbesondere ein Ausfall des Tyrosins an Position 363 von Bedeutung sein, welcher eine verminderte Substratbindung zur Folge hätte (Koeck et al., 2004). Wie Abb. 4.3.6 zeigt, schien diese mögliche Degradierung bei ALDC1 und ALDC2 und somit bei den Suizidopfern weiter fortgeschritten zu sein als bei den Kontrollen.

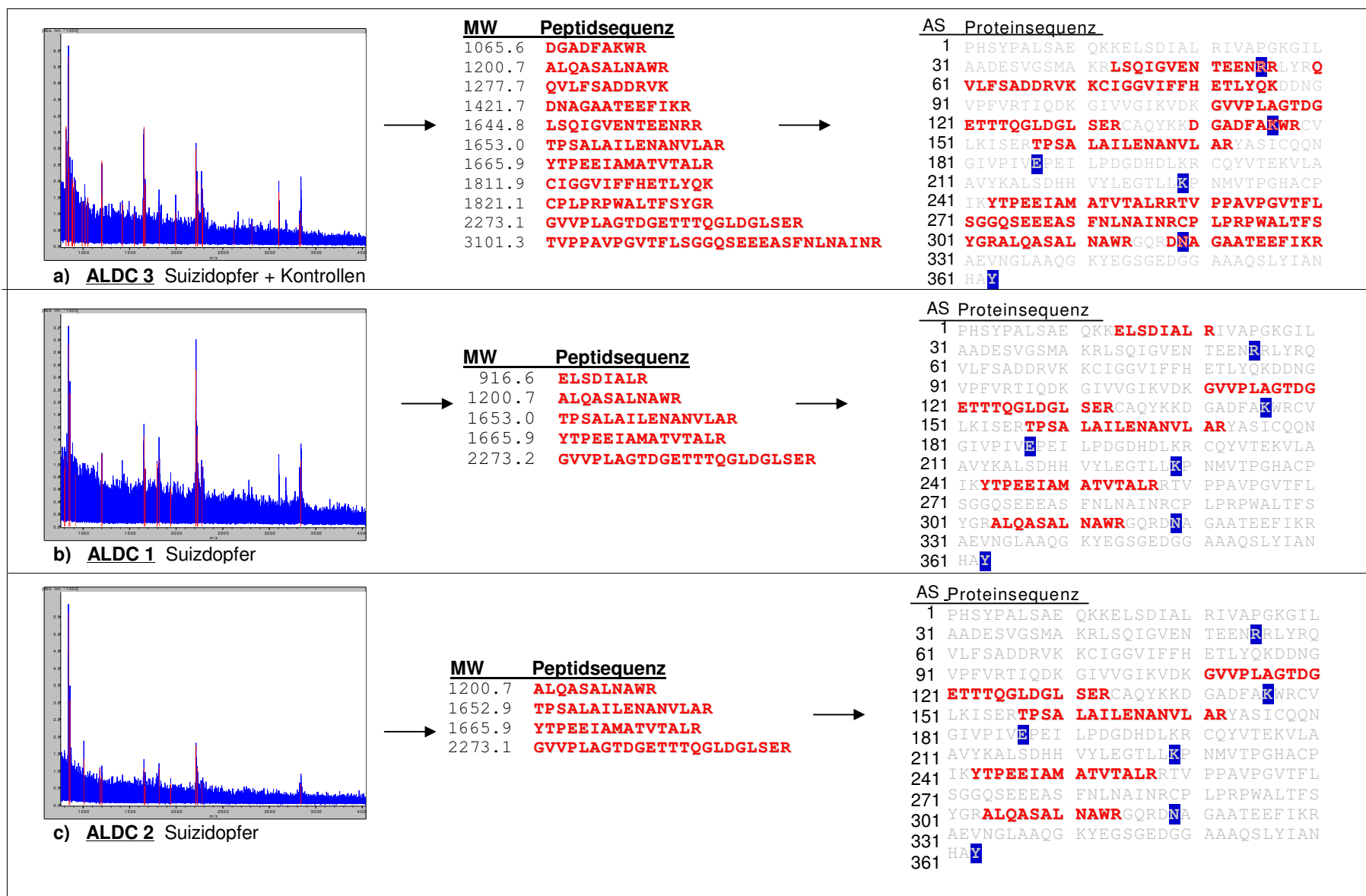
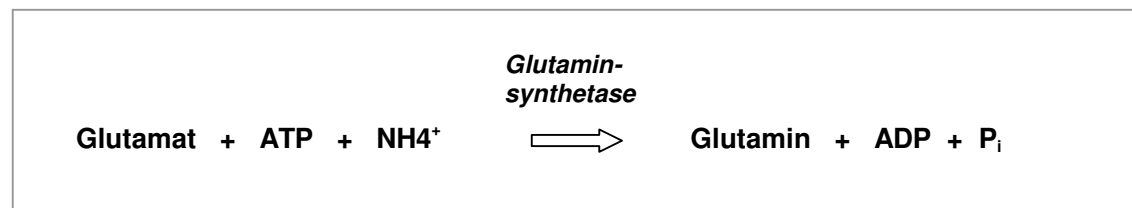


Abb. 4.3.6: Modifikationen der Fruktose-1,6-Bisphosphat-Aldolase (ALDC) Massenspektren, identifizierte Peptide (rot) sowie deren Positionen innerhalb der Proteinsequenzen; ALDC1 und ALDC2 waren nur bei den Suizidopfern vorhanden, ALDC3 zudem auch bei den Kontrollen. Ein möglicher proteolytischer Abbau schien bei ALDC1 und ALDC2 weiter fortgeschritten zu sein als bei ALDC3. dunkel unterlegt: Die Sequenz-Stellen mit Relevanz für die Enzym-Funktion (s.Text)

Je nach pK-Wert der fehlenden Aminosäuren kann ein proteolytischer Abbau unter Umständen weniger Auswirkungen auf die molekulare Masse als vielmehr auf den pI des Proteins haben, was die unterschiedlichen pI's von ALDC1 und ALDC2 erklären könnte.

4.3.5 Glutaminsynthetase (GLNS)

Ein weiteres Enzym, das suizidassoziierte Veränderungen aufwies, war die Glutaminsynthetase (GLNS). Diese ist am Stickstoff- und Aminosäurenmetabolismus beteiligt, indem sie unter ATP-Verbrauch den Einbau von Ammonium-Ionen in Glutamat katalysiert, wobei Glutamin entsteht:



Die Glutaminsynthetase reguliert folglich den Turnover des Neurotransmitters Glutamat sowie die Fixierung von Ammoniak im Organismus.

Der detektierte Spot (**GLNS1**) stellt eine 44,6-kD-Untereinheit des homooctameren Enzyms dar. Bei den Suizidopfern, nicht jedoch bei den Kontrollen, lag unmittelbar oberhalb von GLNS1 ein zweiter schwächerer Spot (**GLNS2**), der ebenfalls als Glutaminsynthetase identifiziert wurde (Abb. 4.3.5f (s.S. 59)). In der 3D-Darstellung erscheint GLNS2 als leichte Auswölbung von GLNS1 (Abb. 4.3.8b). Im Vergleich der zugehörigen Massenspektren fallen bei GLNS2 drei nicht identifizierte Peaks (1824,8, 1841,8, 2298 m/z) auf (Abb. 4.3.7). Ihre Massendifferenzen zu den nächsten identifizierten Peaks wiesen auf Oxidationen von Methioninresten ($\Delta 16$ und $\Delta 32$ m/z) sowie auf eine zusätzliche oxidierte Methionylgruppe ($\Delta 148$ m/z) hin.

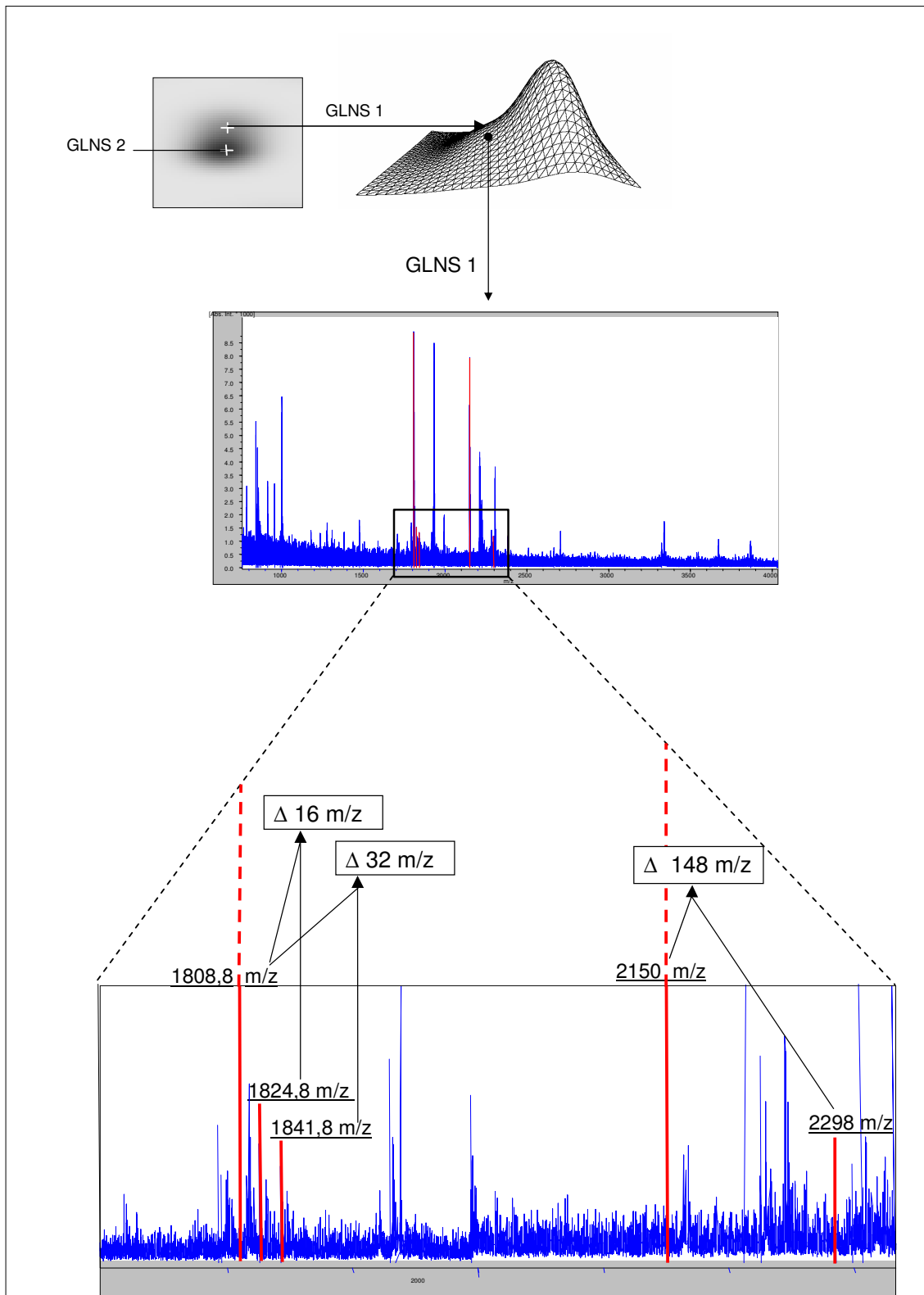
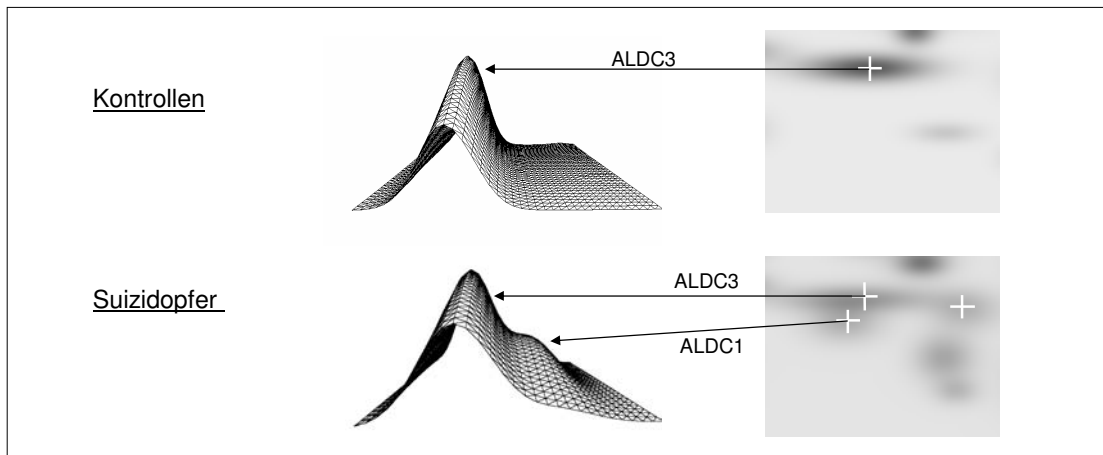
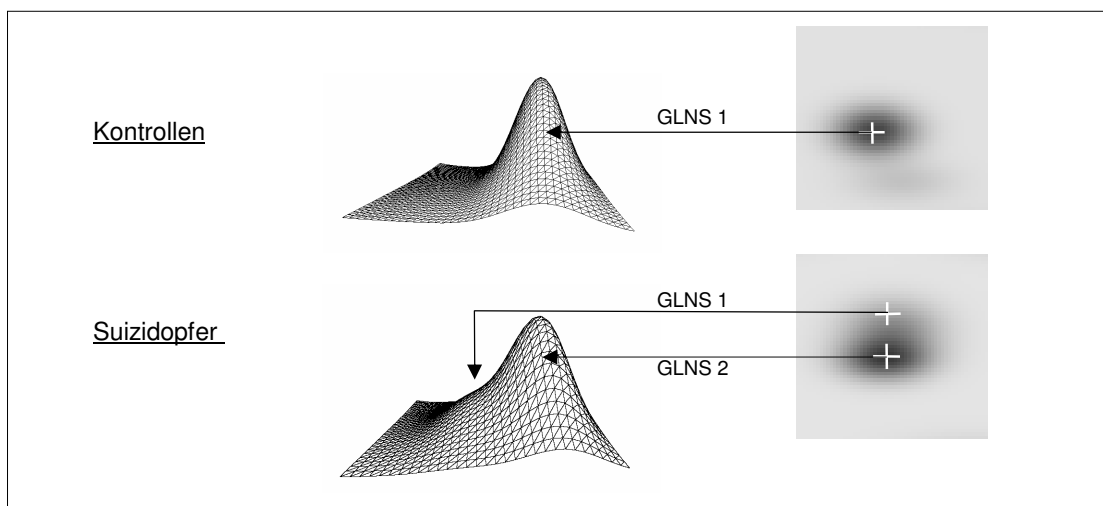


Abb. 4.3.7: Modifikation der Glutaminsynthetase (GLSN)

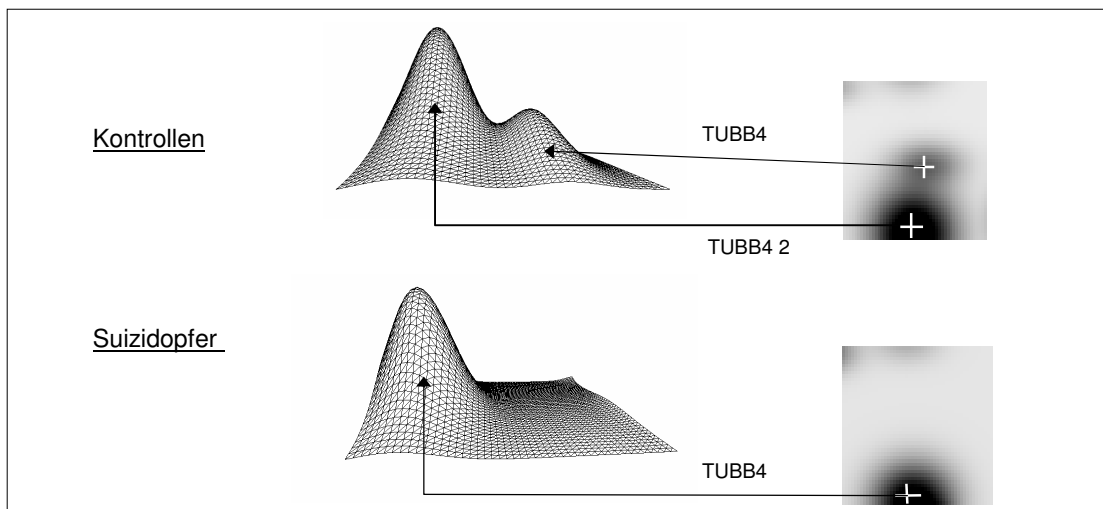
2 Spots wurden als GLSN identifiziert (GLNS1, GLNS2): GLNS 1 trat ausschließlich bei Suizidopfern auf und zeigte im Massenspektrum drei nicht identifizierten Peaks (1824,8, 1841,8, 2298 m/z). Ihre Massendifferenzen zu den nächsten identifizierten Peaks wiesen auf Oxidationen von Methioninresten ($\Delta 16$, $\Delta 32$ m/z) bzw. auf eine zusätzliche oxidierte Methionylgruppe ($\Delta 148$ m/z) hin.



a)

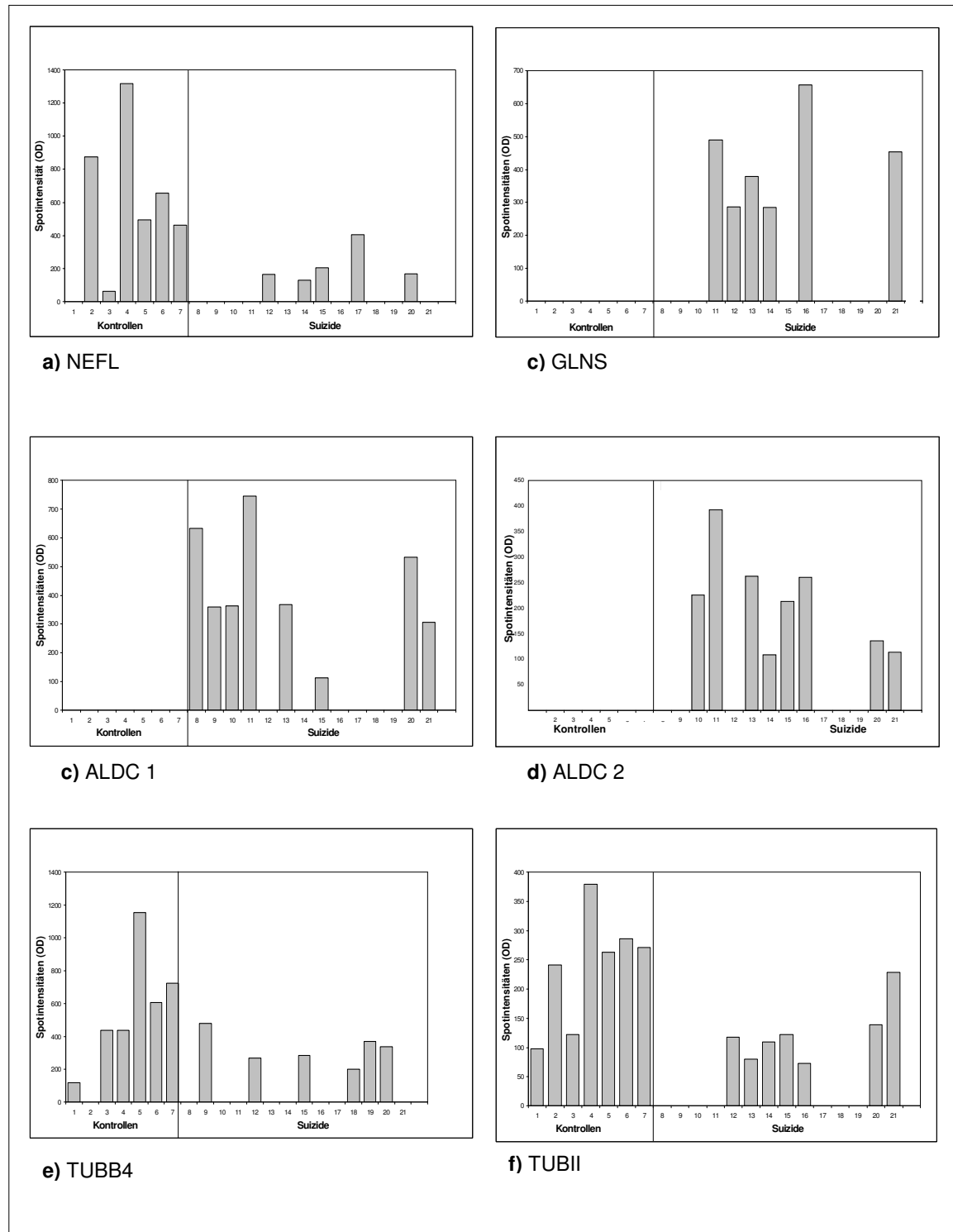


b)



c)

Abb. 4.3.8 : Modifikationen der Spots von **a)** Fruktose-1,6-Bisphosphat-Aldolase (ALDC), **b)** Glutaminsynthetase (GLNS) und **c)** Beta-Tubulin (TUB) in 2D-Gelen und in 3D-Darstellung, jeweils für Kontrollen und für Suizidopfer gezeigt

**Abb. 4.3.9 Amygdala:**

Spotintensitäten im Vergleich von Kontrollen (n=7) und Suizidopfern (n=14)

Die Detektion der Spotintensitäten erfolgte mittels PD-Quest Software.

a) NEFL (sp0107), b) GLNS (sp3706), c) ALDC (sp4708), d) ALDC (sp4709),

e) TUBB4 (sp3513), f) TUBII (sp3509)

4.4. Thalamus

4.4.1 Übersicht

Bei 2D-PAGE von Proben des Thalamus ergaben sich unerwartete methodische Schwierigkeiten in Form schlechter Proteinauftrennung sowohl in der ersten als auch in der zweiten Dimension. Als mögliche Ursachen hierfür können Degradierungsvorgänge in sofern ausgeschlossen werden, als die 2D-Gele vom Thalamus im Vergleich mit Gelen anderer Hirnregionen keine auffällige Akkumulation von Spots im niederen Molekularbereich zeigen. Dies wäre ein typischer Hinweis auf Abbauprozesse von Proteinen. Da sich die Qualität der 2D-Gele auch bei wiederholter Versuchsdurchführung nicht verbessern ließ, konnten letztendlich nur 16 von 31 Gelen zuverlässig in der Bildanalyse ausgewertet werden (Tab. 4.4.1). Dabei wurden sechs Spots detektiert, die bei den Suizidopfern doppelt so hoch exprimiert waren wie bei den Kontrollen und von denen zwei als die Proteine 'Collapsin response mediator protein 2' und Galectin-1 identifiziert werden konnten. Ein weiterer Spot trat ausschließlich in der Gruppe der Suizidopfer auf und konnte dem Enzym Alpha-Enolase zugeordnet werden, während drei weitere Spots, die in dieser Gruppe eine mindestens doppelt so hohe Intensität aufwiesen wie bei den Kontrollen, nicht eindeutig identifiziert werden konnten. In Abb. 4.4.1 (s. S. 69) fällt auf, daß sich diese sechs Spots alle in einem ähnlichen pH-Bereich zwischen pH 5,34 und 6,20 befanden. Die Intensitäten dieser Spots korrelierten weder mit dem Alter oder dem Geschlecht der Personen noch mit der postmortalen Liegezeit oder der Suizidmethode (Tab. 4.4.3).

Tab. 4.4.1 Daten der Suizidopfer und Kontrollen

	Geschlecht	Alter [Durchschnitt in Jahren]	postmortale Liegezeit [Durchschnitt in Stunden]	Suizidmethode
Suizidopfer (n=10)	Männer n= 7 Frauen n= 3	32,41 ± 8,96 21,92 – 46,75	22,09 ± 21,24 4,20 – 77,50	<i>hart:</i> Männer n= 7 Frauen n= 3 <i>weich:</i> Männer n= 0 Frauen n= 0
Kontrollen (n=6)	Männer n= 4 Frauen n=2	35,48 ± 16,12 14,08 – 58,58	8,27 ± 6,61 2,50 – 17,00	
Statistik mittels oneway ANOVA (P-Wert mit 95% Signifikanz)	df = 1 F = 0,062 p = 0,806	df = 1 F = 0,628 P = 0,245	df = 1 F = 0,148 P = 2,344	

Tab. 4.4.2 Identifikation der ausgewählten Proteine mittels MALDI-TOF-MS und MSDB-Datenbank-Recherche

Spot ID	Proteinidentität	MW [kD] (theoret.)	pI (theoret.)	Spotintensitäten <u>bei Suizidopfern</u> im Vergleich zu Kontrollen	
Spot Nr.	Name	Accession Nr. (MSDB)			
sp8705	Galectin-1 (Beta-galactoside-binding lectin L-14-I) (LEG1)	P09382	14,92	5,34	2-fache Erhöhung
sp1420	Collapsin response mediator protein (CRMP2)	JC5317	62,71	5,95	2-fache Erhöhung
sp3204	alpha enolase (ENO1)	A39183	47,10	6,20	nur bei Suizidopfern präsent
sp0613	-- nicht identifiziert --				2-fache Erhöhung
sp2515	-- nicht identifiziert --				2-fache Erhöhung
sp6411	-- nicht identifiziert --				2-fache Erhöhung

4.4.2 Galectin-1 (Beta-galactoside-binding lectin L-14-I) (LEG1)

Die Klasse der Galectine umfaßt Proteine, die spezifisch an N-Acetyllactosamine (Gal β 1-nGlcNAc-R) binden. Galectin-1 (LEG1) wirkt in einer Reihe von Organen sowohl intra- als auch extrazellulär und ist in verschiedene Zellfunktionen involviert, wie z.B. Zellwachstum, Zelldifferenzierung, Apoptose, Zelladhäsion und Immunreaktionen (Yang and Liu, 2003). Zudem fungiert Galectin-1 als Spleiß-Faktor für prä-mRNA (Liu et al., 2002). Das 14,9 kD-Protein mit einem pI von 5,34 war in dieser Arbeit bei den Suizidopfern um mindestens Faktor 2 höher exprimiert als bei den Kontrollen (Tab. 4.4.2, Abb. 4.4.1b (s. S. 69), Abb. 4.4.2a (s. S. 70)).

Tab. 4.4.3 Die Berechnung mittels Chi-Quadrat-Test zeigt keine Korrelationen zwischen den Spotintensitäten und den Faktoren Alter, Geschlecht, postmortaler Liegezeit (PMI) oder Suizidmethode bei einem Signifikanzniveau für p von 95% * in allen Fällen 'harte' Suizidmethoden, daher keine Statistik

Gruppe	Spot-Nr.	Protein	Alter	Geschlecht	PMI	Suizid- methode
Suizid- opfer	sp1420	DHP2	p=0,231	p=0,350	p=0,231	- *
	sp2515	PIAS2	p=0,231	p=0,350	p=0,231	- *
	sp3506	CKB	p=0,254	p=0,406	p=0,254	- *
	sp8705	LEG1	p=0,231	p=0,350	p=0,231	- *
	sp3204	ENO1	p=0,242	p=0,265	p=0,242	- *
	sp0613	sp0613	p=0,231	p=0,350	p=0,231	- *
	sp6411	sp6411	p=0,231	p=0,350	p=0,231	- *
Kon- trollen	sp1420	DHP2	p=0,224	p=0,306	p=0,224	
	sp2515	PIAS2	p=0,242	p=0,199	p=0,242	
	sp3506	CKB	p=0,285	p=0,472	p=0,285	
	sp8705	LEG1	p=0,224	p=0,306	p=0,224	
	sp3204	ENO1	-	-	-	
	sp0613	sp0613	p=0,224	p=0,306	p=0,224	
	sp6411	sp6411	p=0,285	p=0,269	p=0,285	

4.4.3 Collapsin response mediator protein 2 (CRMP2)

Die gleiche Differenz zwischen beiden Gruppen wie bei LEG1 zeigte das 'Collapsin response mediator protein 2' (CRMP2), auch bekannt unter dem Synonym 'Dihydropyrimidinase-related protein 2', das eine molekulare Masse von 62,7 kD und einen pI von 5,95 aufwies (Tab. 4.4.2, Abb. 4.4.1e (s. S. 69), Abb. 4.4.2b (s. S. 70)). Es vermittelt und moduliert die Wirkung bestimmter repulsiver Signalstoffe (Semaphorine) auf Neuronen. CRMP2 ist somit vor allem in der Embryonalphase an der Regulation des neuronalen Wachstums und der Navigation der Axone beteiligt (Quinn et al., 1999).

4.4.4 Alpha Enolase (ENO1)

Das glykolytische Enzym Enolase – oder auch Phosphopyruvat Hydratase - katalysiert die Bildung von Phosphoenolpyruvat, der Vorstufe des Pyruvates, welches das Endprodukt des Glukoseabbaus darstellt.



Die aktive Enolase liegt als Homo- oder Heterodimer vor, wobei die Untereinheiten Alpha, Beta und Gamma existieren. In der vorliegenden Arbeit wurde im Thalamus ausschließlich von Suizidopfern die Alpha-Untereinheit (ENO1) gefunden, die in Neuronen als Alpha-Gamma-Heterodimer vorkommt, während sie als Homodimer ubiquitär verteilt ist und im Muskel als Alpha-Beta-Dimer exprimiert wird. (Tab. 4.4.2, Abb. 4.4.1f (s. S. 69), Abb. 4.4.2c (s. S. 70)).

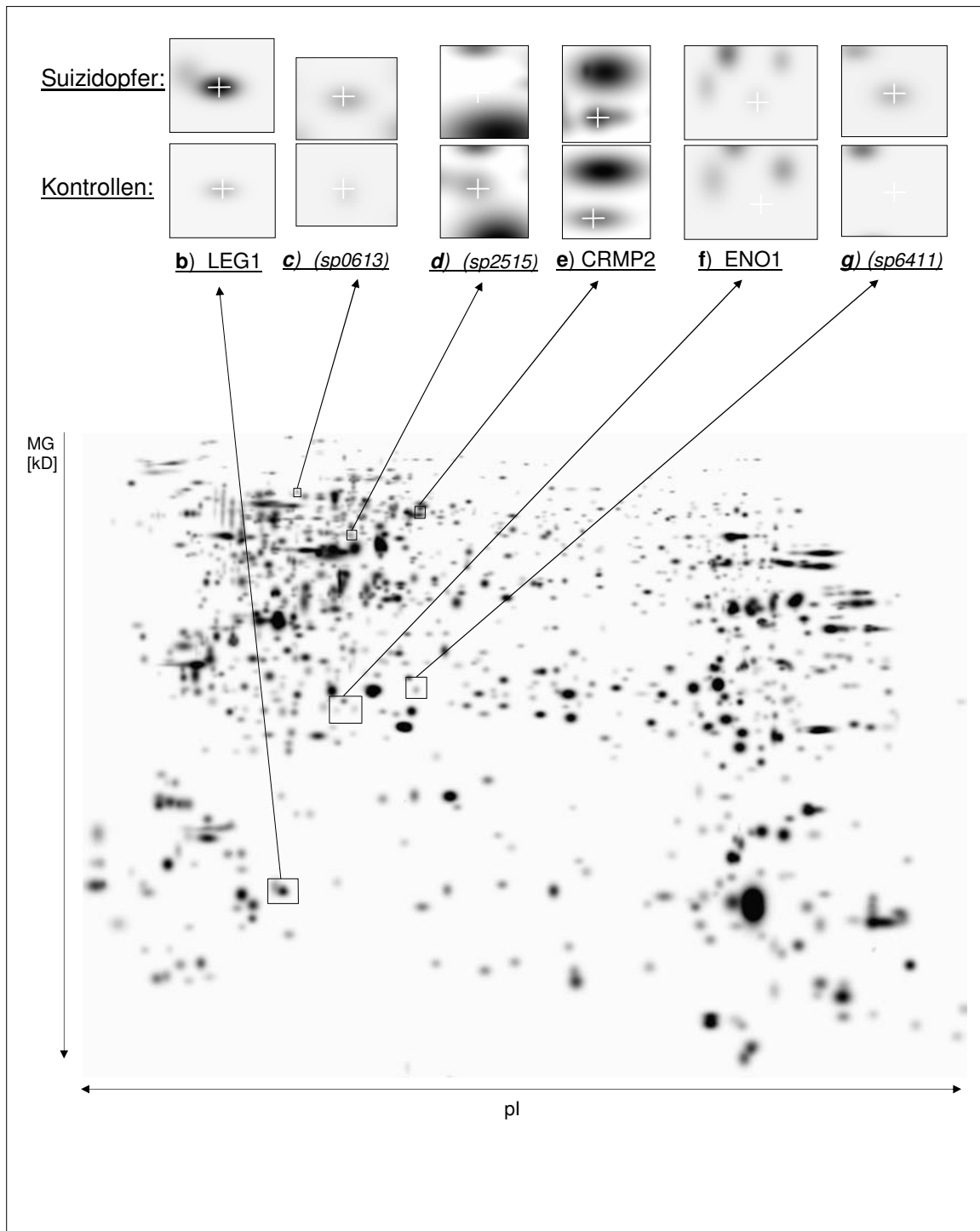
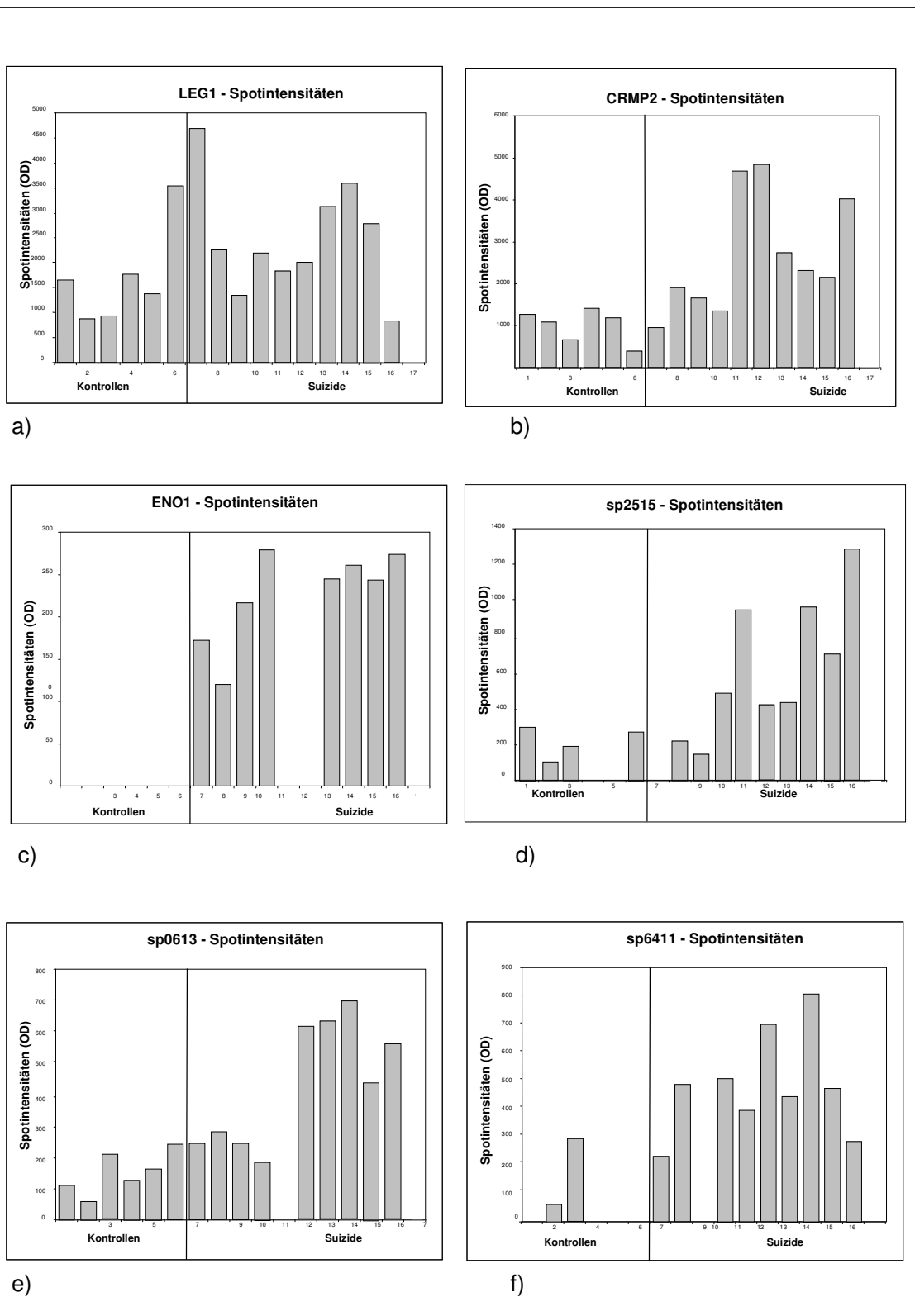


Abb. 4.4.1: Bildanalyse der 2D-Gele des Thalamus

a) Das Master-Gel dient der Übersicht;

Die Detailbilder zeigen die Spots, die signifikante Veränderungen zwischen Suizidopfern und Kontrollen aufwiesen: **b)** Galectin (LEG1), **c)** (Spot sp0613), **d)** (Spot sp2515); nicht identifiziert: **e)** Collapsin response mediator protein (CRMP2), **f)** Alpha-Enolase (ENO1) und **g)** (Spot sp6411)

**Abb. 4.4.2: Thalamus**

Spotintensitäten im Vergleich von Kontrollen (n=6) und Suizidopfern (n=10)

Die Detektion der Spotintensitäten erfolgte mittels PD-Quest Software.

a) Galectin (LEG1), **b)** Collapsin response mediator protein (CRMP2), **c)** alpha-Enolase (ENO1); nicht identifizierte Spots: **d)** (sp2515), **e)** (sp0613), **f)** (sp6411)

4.5 Hippocampus

4.5.1 Übersicht

In der Bildanalyse von insgesamt 28 2D-Gelen des Hippocampus (Suizidopfer n=18, Kontrollen n=10 (Tab. 4.5.1)) wurden 929 Spots detektiert, und das anschließende Matchen erzielte einen Korrelationskoeffizienten von 0,582. Dabei zeigten 6 Spots signifikante Unterschiede zwischen beiden Gruppen. Mittels MSDB-Datenbank-Recherche konnte ein Protein als Neuropolypeptid h3 (phosphatidyl ethanolamine binding protein) identifiziert werden, drei weitere Proteine als die Enzyme Gamma-Enolase (neuronale Form), Adenosin-Triphosphat-Synthase (ATP-Synthase) und Peroxiredoxin, während für zwei Proteine keine eindeutigen Ergebnisse erzielt wurden (Tab. 4.5.2, Abb. 4.5.1 (s. S. 74)). Im Chi-Quadrat-Test zeigten sich keine Korrelationen zwischen den Intensitäten dieser Spots und den Faktoren Alter, Geschlecht, postmortale Liegezeit oder Suizidmethode.

4.5.2 Neuropolypeptid h3 (PEBP)

Die Expression von PEBP wurde bei den Suizidopfern gegenüber den Kontrollen um den Faktor 1,5 vermindert gefunden (Tab. 4.5.2, Abb. 4.5.1c, Abb. 4.5.2b), Abb. 4.5.5d). Es sind vielseitige biologische Funktionen für PEBP bekannt, wie z.B. die Inhibition von Serin-Proteasen (ausgenommen Trypsin), die Bindung von Opioiden und dem Membran-Phospholipid Phosphatidylethanolamin, Einfluß auf die Signaltransduktion und die Funktion eines Precursors für bioaktive Neuropeptid im Gehirn (Banfield et al., 1998).

Tab. 4.5.1 Daten der Suizidopfer und Kontrollen

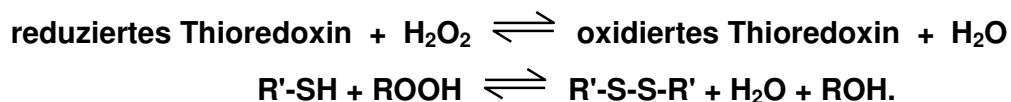
	Geschlecht	Alter [Durchschnitt in Jahren]	postmortale Liegezeit [Durchschnitt in Stunden]	Suizidmethode
Suizidopfer (n=18)	Männer n=11 Frauen n= 7	29,9 ± 9,9 14,5 – 48,9	20,4 ± 17,4 4,2 – 77,5	<i>hart:</i> Männer n=11 Frauen n=6 <i>weich:</i> Männer n= 0 Frauen n= 1
Kontrollen (n=10)	Männer n= 7 Frauen n= 3	34,9 ± 16,7 11,3 – 58,6	12,3 ± 11,0 2,5 – 40,0	
Statistik mittels oneway ANOVA (P- Wert mit 95% Signi- fikanz)	df = 1 F = 0,533 P = 0,472	df = 1 F = 1,002 P = 0,326	df = 1 F = 1,749 P = 0,198	

Tab. 4.5.2 Identifikation der ausgewählten Proteine mittels MALDI-Massenspektrometrie und MSDB-Datenbank Suche

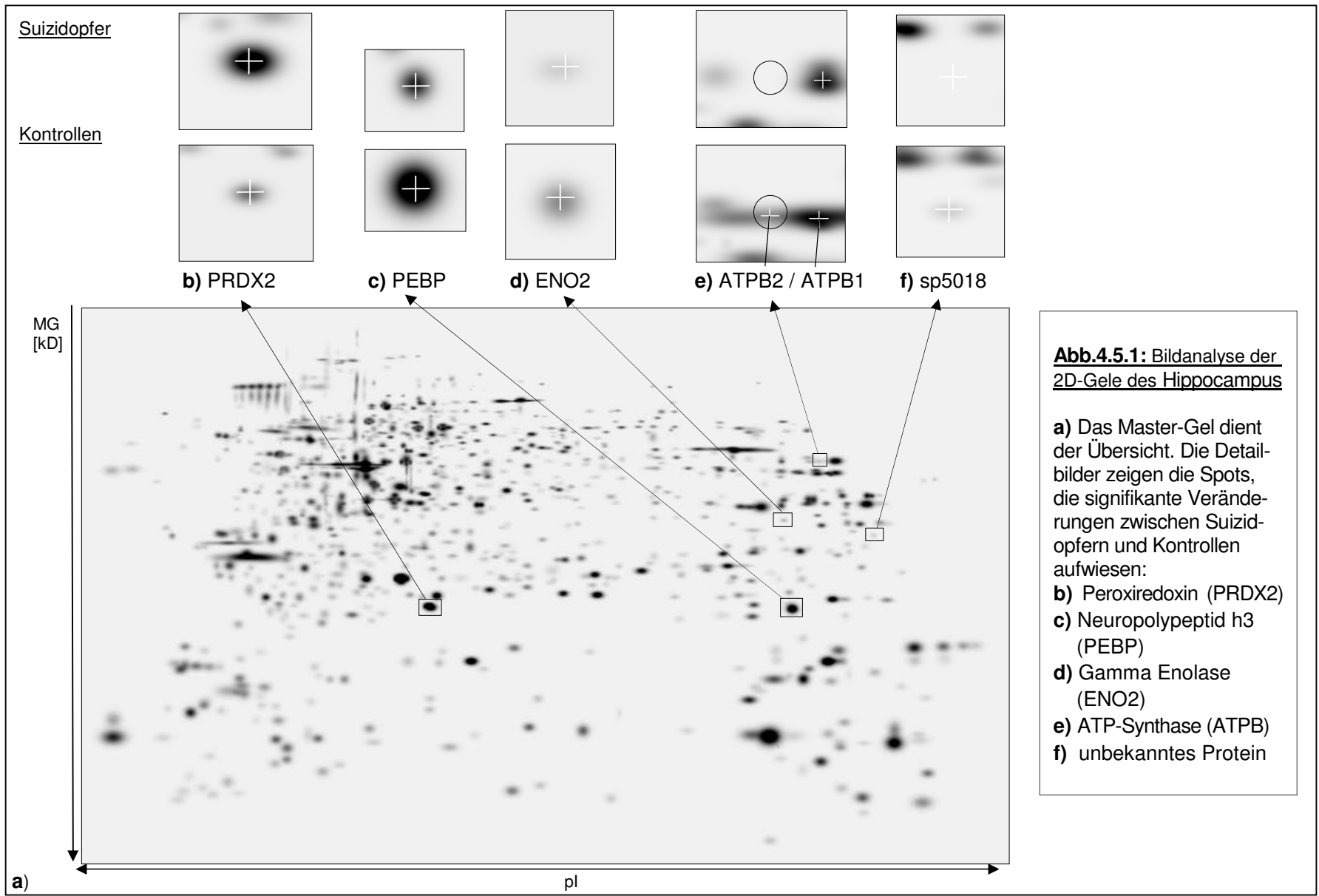
Proteinidentität			MW [kD] (theor.)	pI	Spotintensitäten bei Suizidopfern im Vergleich zu Kontrollen
Spot Nr.	Name	Accession Nr. (MSDB)			
sp7407	Peroxiredoxin2 (PRDX2)	AAH00452	22,05	5,66	mind. 1,5-fache Erhöhung
sp7111	Neuropolypeptid h3 (Phosphatidyl- ethanolamine binding protein) (PEBP)	1BD9A	20,44	7,18	mind. 1,5-fache Verminderung
sp5110	Gamma-Enolase, (neuronale Form) (ENO2)	AAA52388	44,57	4,94	mind. 1,5-fache Verminderung
sp3003, sp3004	ATP-Synthase (Untereinheit B) (ATPB)	A33370	56,53	5,26	mind. 2-fache Verminderung
sp5018	- nicht identifiziert -				mind. 1,5-fache Verminderung

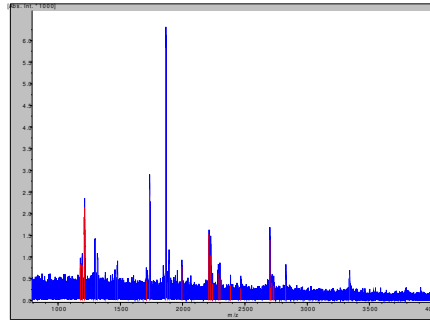
4.5.3 Peroxiredoxin2 (PRDX2)

PRDX2 wies bei den Suizidopfern eine 1,5-fach höhere Expression auf als bei den Kontrollen (Tab. 4.5.2, Abb. 4.5.1b, Abb. 4.5.2a, Abb. 4.5.5.c). Die Peroxiredoxine stellen eine Familie antioxidativer Proteine mit Peroxidase-Aktivität dar. Ihre Hauptfunktion ist die reduktive Detoxifikation verschiedener Arten von Peroxiden, die als schädliche Nebenprodukte metabolischer Prozesse in der Zelle anfallen (Rabilloud et al., 2002). Sie reduzieren die Peroxide unter Verwendung von Thioredoxin als Elektronendonator:



Bei dem in dieser Arbeit gefundenen Isoenzym 2 handelt es sich um die zytosolische Form von PRDX.





a)

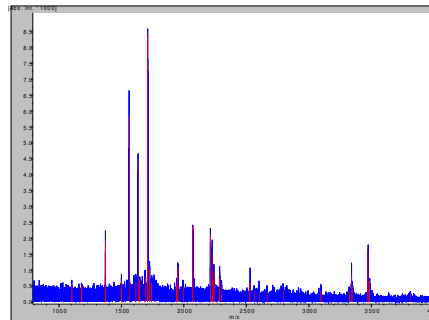
PRDX2

MG [kD] Peptidsequenz

1179.48	RLSEYGVLK
1211.57	QITVNDLPVGR
1863.07	KEGGLGPLNIPLLADVTR
1891.06	EGGLGPLNIPLLADVTRR
2827.32	LGCEVLGVSVDSQFTHLAWINTPRK

AS Proteinsequenz

1	MASGNARIGK	PAPDFKATAV
21	VDGAFKEVKL	SDYKGYVVL
41	FFYPLDFTFV	CPTEIIAFSN
61	RAEDFRKLGK	EVLGVSVDSQ
81	FTHLAWINTP	RKEGGLGPLN
101	IPLLADVTRR	LSEYGVLKT
121	DEGIAYRGLF	IIDGKGVLRQ
141	ITVNDLPVGR	SVDEALRLVQ
161	AFQYTDHGE	VCPAGWKPGS
181	DTIKPNVDDS	KEYFSKHN



b)

PEBP

MG [kD] Peptidsequenz

1102.51	0	CDEPILSNR
1631.91	0	NRPTSISWDGLDSGK
1687.96	1	LYTLVLTDPDAPSRK
1949.08	0	GNDISSGTVLSDYVGSPPK
2069.05	0	APVAGTCYQAEWDDYVPK
2792.51	1	YVWLVYEQDRPLKCDEPILSNR
3470.61	0	WSGPLSLQEVDEQPQHP LHVTYAGAAVDELGK

AS Proteinsequenz

1	LSKWSGPLSL	QEVDEQPQHP
21	LHVTYAGAAV	DELGKVLTPPT
41	QVKNRPTSIS	WDGLDSGKLY
61	TLVLTDPDAP	SRKDPKYREW
81	HHFLVVMKMG	NDISSGTVLS
101	DYVGSPPK	TGLHRYVWL
121	YEQDRPLKCD	EPILSNRSGD
141	HRGKFKVASF	RKKYELRAPV
161	AGTCYQAEWD	DYVPKLYEQL

Abb. 4.5.2: a) Peroxiredoxin (PRDX2) und b) Neuropeptid h3 (PEBP)) Darstellung der Massenspektren, der daraus identifizierten Peptide sowie deren Positionen im entsprechenden Protein

4.5.4 ATP-Synthase (ATPB)

Die ATP-Synthase ist als ein Enzym des zellulären Energiestoffwechsels in der inneren Mitochondrienmembran lokalisiert und synthetisiert ATP aus ADP und Phosphat. Die Reaktion verläuft unter Verwendung der Energie des in der Atmungskette aufgebauten Protonengradienten. Die ATP-Synthase besteht aus zwei Einheiten, der transmembranen F_0 -Domäne, die als Protonentunnel dient und der katalytisch aktiven F_1 -Domäne, die in den Matrixraum ragt. In dieser Arbeit wurde die Beta-Untereinheit der F_1 -Domäne identifiziert (ATPB), die für die Bindung von ADP und ATP zuständig ist.

Zwei Spots mit gleichem MG aber unterschiedlichem pI wurden als ATPB identifiziert (ATPB1 und ATPB2), während ein dritter Spot (sp3002), der sich auf gleichem MG-Niveau einzureihen schien, nicht eindeutig zugeordnet werden konnte (Abb. 4.5.3).

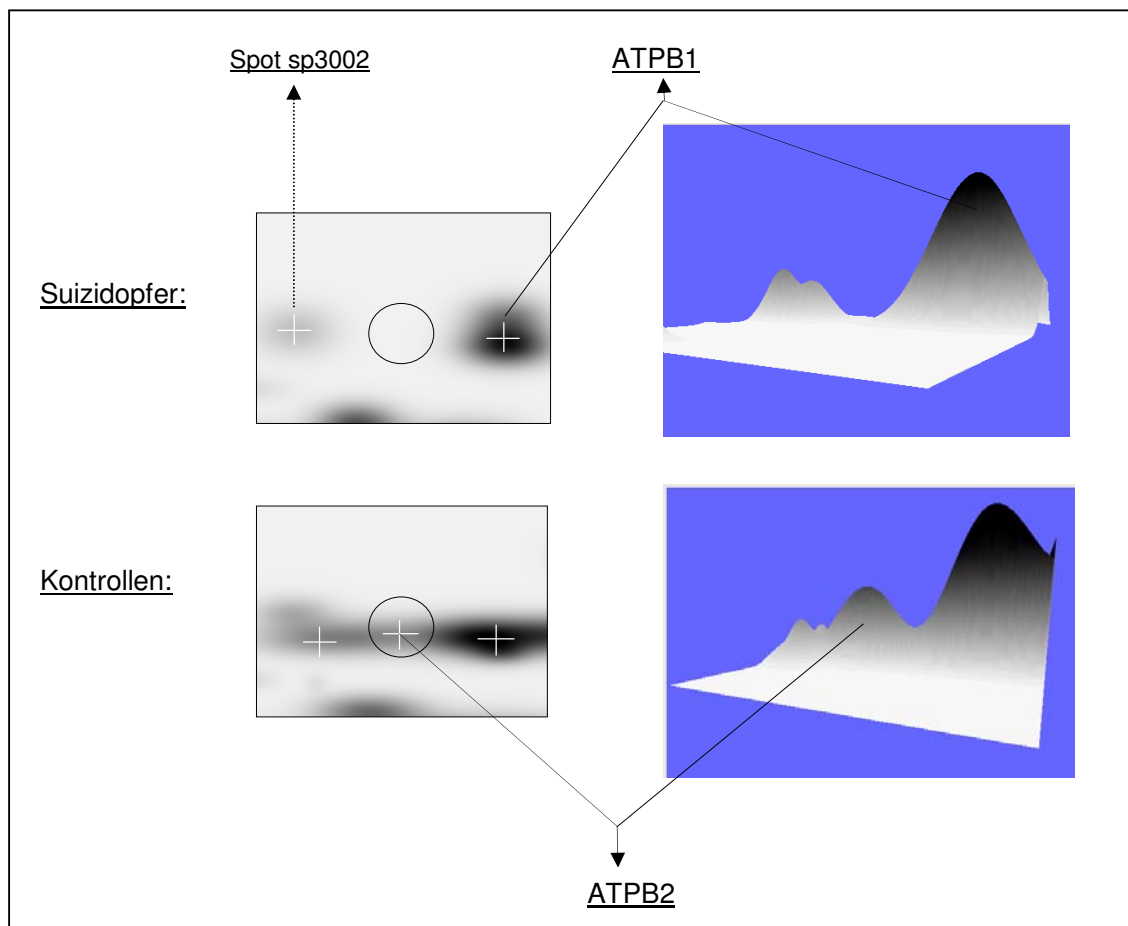


Abb. 4.5.3 Modifikation der ATP-Synthase (ATPB), F_1 -Domäne, Untereinheit Beta links: Ausschnitte aus 2D-Gelen von Kontrollen und Suizidopfern, rechts: 3D-Darstellung der mittels PD Quest-Software detektierten Spots. Zwei Spots wurden als ATPB identifiziert, während für sp3002 keine eindeutigen Ergebnisse gefunden wurden. ATPB2 war bei den Suizidopfern um mindestens Faktor 2 vermindert exprimiert oder fehlte ganz.

ATPB2 war bei den Suizidopfern maximal halb so stark exprimiert wie bei den Kontrollen oder fehlte vollständig (Abb. 4.5.5f). Angesichts der Funktion des Enzyms sowie des niedrigeren pI's könnte ATPB2 auf die Bindung eines ADP oder ATP schließen lassen, allerdings fanden sich für diese Annahme keine direkten Belege in den Massenspektren. Ähnlich der Gamma Enolase wurde ATPB im weitaus alkalischen Bereich detektiert als es aufgrund des pI's zu erwarten gewesen wäre. Um eine mögliche Ursache für diese Verschiebung zu finden, wurde eine erneute Datenbankrecherche mit den nicht identifizierten Peaks durchgeführt. Darin wurden die fraglichen Peptide der Untereinheit 8 der Cytochrom c Oxidase zugeordnet, einem Komplex der Atmungskette (COX8C; MG 8,18 kD, pI 12,08; MSDB-ID: AAO26193). Mithilfe des Serviceprogrammes <http://au.expasy.org/tools/protparam.html> wurde für die hypothetische Gesamtsequenz aus ATPB plus zwei der COX-Untereinheiten 8 ein MG von 72,78 kD und ein pI von 9,11 berechnet, was den tatsächlichen Positionen von ATPB1 bzw. ATPB2 im 2D-Gel nahe kommt. Ein Komplex aus ATPB und COX8C, die beide in der inneren Mitochondrienmembran lokalisiert sind, wäre auch im Blick auf die Funktion der beiden Proteine plausibel. Denn die Cytochrom c Oxidase bildet das letzte Element der Elektronentransportkette, das molekularen Sauerstoff zu Wasser reduziert und somit die Energie liefert, die über Bildung eines Protonengradienten letztendlich die ATP-Synthase antreibt.

4.5.5 Gamma Enolase (ENO2)

Die Funktion der Enolase wurde bereits im Zusammenhang mit der im Thalamus gefundenen Alpha-Untereinheit des Enzyms beschrieben (Kap. 4.4.3). Im Hippocampus wurde die neuronenspezifische Gamma-Isoform (ENO2) mit einem MG von 44,57 kD und einem pI von 4,94 gefunden, die im Gehirn die Dimere Gamma-Gamma oder Gamma-Alpha bildet.

ENO2 war bei den Suizidopfern um Faktor 1,5 geringer exprimiert als bei den Kontrollen (Abb. 4.5.5). Der Vergleich der tatsächlichen Positionen des Spots im 2D-Gel mit dem theoretisch berechneten, bzw. mit den virtuellen Gelen des Proteomics-Server 'ExPasy' (<http://au.expasy.org>) zeigte eine erhebliche Verschiebung des Proteins in den alkalischen Bereich. Es fiel ebenfalls auf, daß die Gesamt-Peak-Liste eine relativ hohe Anzahl von Peptiden aufwies, die nicht der ENO2 zugeordnet werden konnte (Abb. 4.5.4). Eine gezielte MSDB-Datenbankrecherche dieser Peaks identifizierte daraus das Protein Ubiquitin-Ligase (MG 7,65kD, pI 9,82; MSDB-ID: AAF19600). Eine mögliche Anlagerung dieses alkalischen Proteins an ENO2 könnte den erhöhten pI des Spots erklären.

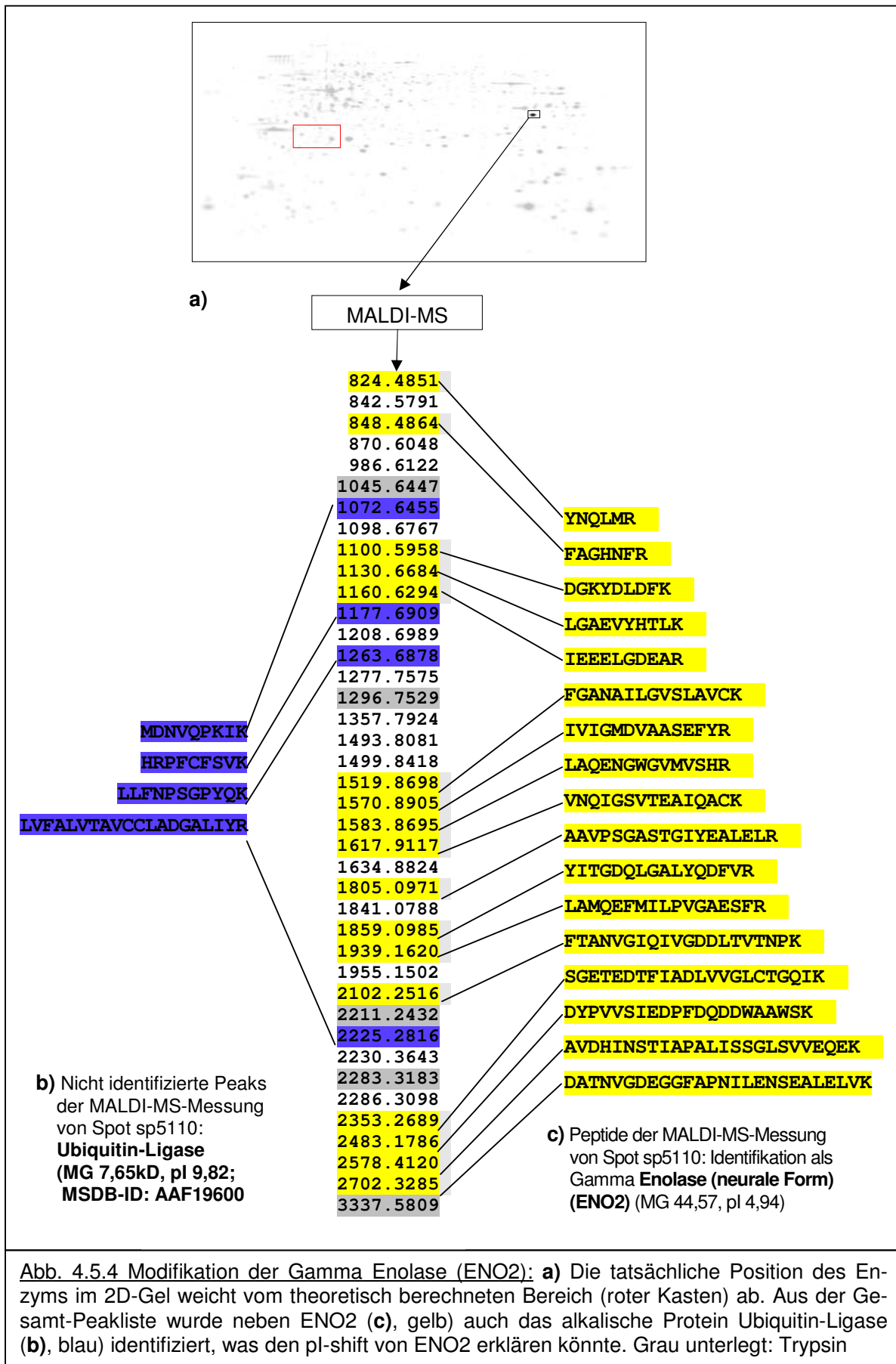
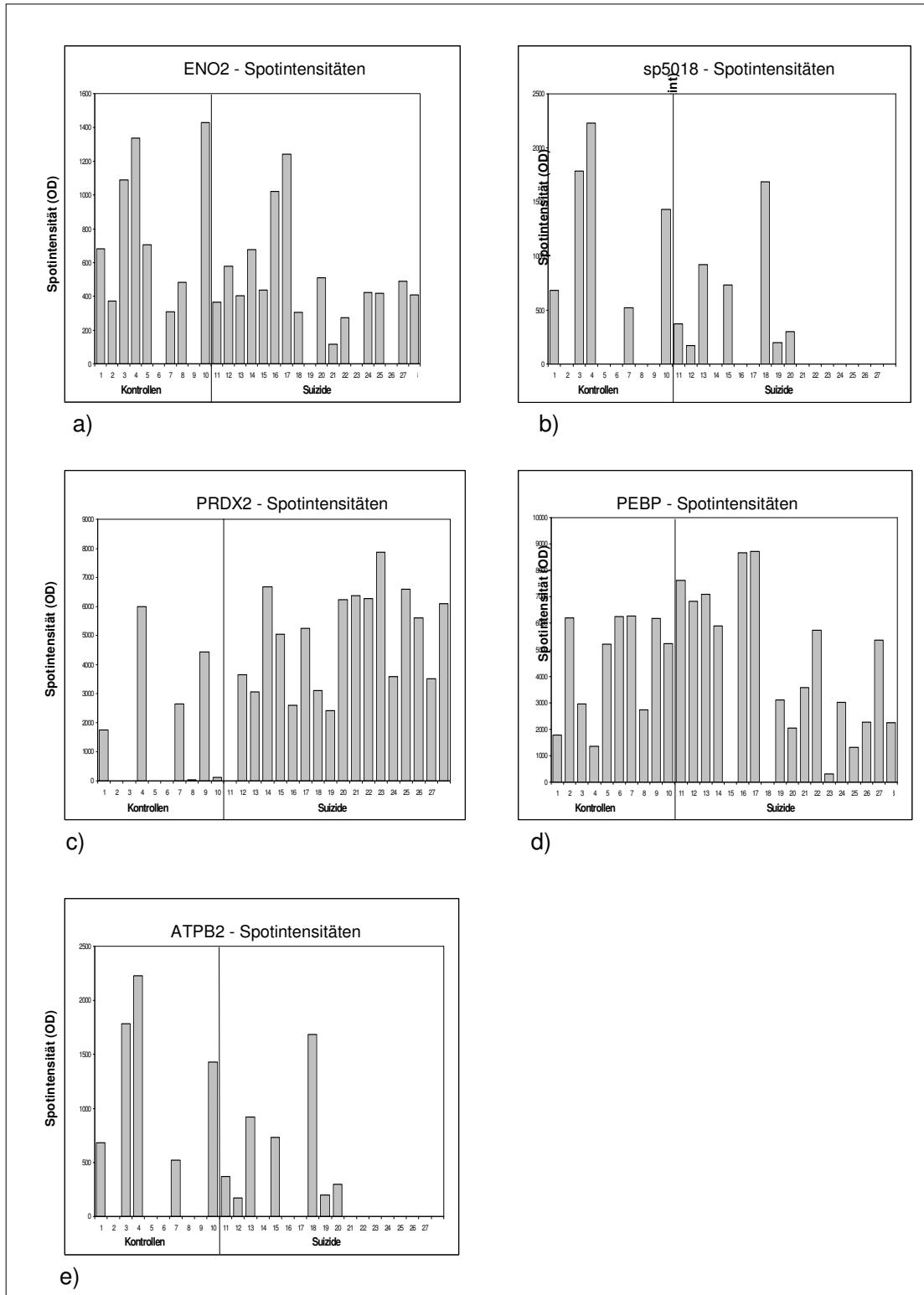


Abb. 4.5.4 Modifikation der Gamma Enolase (ENO2): **a)** Die tatsächliche Position des Enzyms im 2D-Gel weicht vom theoretisch berechneten Bereich (roter Kasten) ab. Aus der Gesamt-Peakliste wurde neben ENO2 (**c**), gelb) auch das alkalische Protein Ubiquitin-Ligase (**b**), blau) identifiziert, was den pI-shift von ENO2 erklären könnte. Grau unterlegt: Trypsin

Tab. 4.5.3 Laut Berechnung mittels Chi-Quadrat-Test lagen keine Korrelationen vor zwischen den Spotintensitäten und den Faktoren Alter, Geschlecht, postmortaler Liegezeit (PMI) oder Suizidmethode bei einem Signifikanzniveau für p von 95%. n.i. = nicht identifiziert

Gruppe	Spot-Nr.	Protein	Alter	Geschlecht	PMI	Suizid- methode
Suizide	sp7407	PRDX2	p=0,248	p=0,389	p=0,242	p=0,389
	sp5110	ENO2	p=0,089	p=0,324	p=0,262	p=0,324
	sp7111	PEBP	p=0,285	p=0,455	p=0,204	p=0,324
	sp3003	ATPB	p=0,127	p=0,406	p=0,282	p=0,519
	sp5018	n.i.	p=0,179	p=0,302	p=0,533	p=0,021
Kon- trollen	sp7407	PRDX2	p=0,267	p=0,377	p=0,267	
	sp5110	ENO2	p=0,254	p=0,189	p=0,254	
	sp7111	PEBP	p=0,231	p=0,350	p=0,231	
	sp3003	ATPB	p=0,333	p=0,585	p=0,333	
	sp5018	n.i.	p=0,333	p=0,240	p=0,333	

**Abb. 4.5.5: Hippocampus**

Spotintensitäten im Vergleich von Kontrollen (n=10) und Suizidopfern (n=18)

Die Detektion der Spotintensitäten erfolgte mittels PD-Quest Software.

a) Gamma Enolase (ENO2), **b)** sp5018 (nicht identifiziert), **c)** Peroxiredoxin (PRDX), **d)** Neuropolypeptid h3 (PEBP), **e)** ATP-Synthase (ATPB)

4.6 Hypophyse

Da die Hypophysen nicht von allen Suizidopfern bzw. Kontrollen vorhanden waren, wurden letztendlich nur 18 2D-Gele der Bilanalyse zugeführt (Suizidopfer n=13, Kontrollen n=5) (Tab. 4.6.1). Dabei wurden insgesamt 987 Spots detektiert und das Matchen erfolgte mit einem Korrelationskoeffizienten von 0,67. Kein Spot zeigte eine signifikante Expressionserhöhung zwischen den Gruppen der Suizidopfer und der Kontrollen.

Tab. 4.6.1: Daten der Suizidopfer und Kontrollen

	Geschlecht	Alter [Durchschnitt in Jahren]	postmortale Liegezeit [Durchschnitt in Stunden]	Suizidmethode
Suizidopfer (n=13)	Männer n = 8 Frauen n = 5	30,67 ± 17,8 15,5 – 42,33	23,8 ± 17,3 14,2 – 77,5	<u>hart:</u> Männer n= 8 Frauen n= 5 <u>weich:</u> Männer n= 0 Frauen n= 0
Kontrollen (n=5)	Männer n = 4 Frauen n = 1	32,72 ± 18,3 11,25 – 51,58	13,3 ± 9,7 1,7 – 40	
Statistik mittels oneway ANOVA (P-Wert mit 95% Signifikanz)	df = 1 F = 0,980 p = 0,337	df = 1 F = 0,056 P = 0,816	df = 1 F = 0,282 P = 0,603	

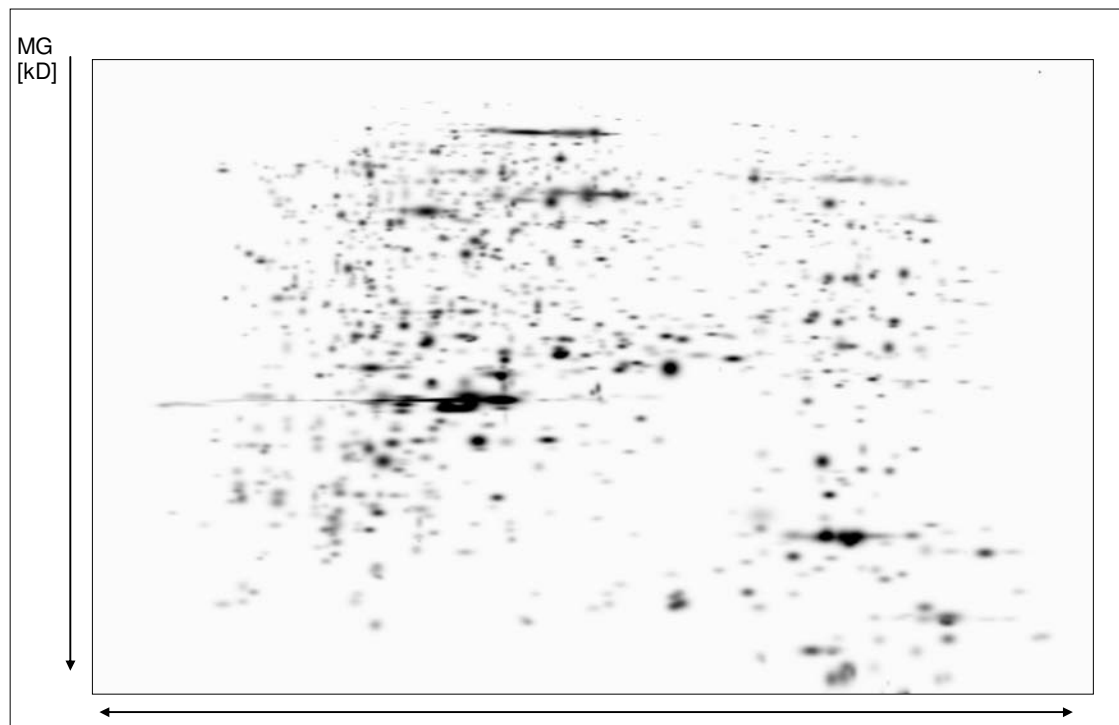


Abb. 4.6.1: Master-Gel der Hypophyse

4.7 Cerebellum

Aus der 2D-PAGE des Cerebellums, das als Referenzregion diente, flossen 28 2D-Gele (Suizidopfer n=18, Kontrollen n=10) in die Bildauswertung ein (Tab. 4.7.1). Es wurden keine signifikanten Unterschiede in den Spotintensitäten zwischen Suizidopfern und Kontrollen gefunden.

Tab. 4.7.1 Daten der Suizidopfer und Kontrollen

	Geschlecht	Alter [Durchschnitt in Jahren]	postmortale Liegezeit [Durchschnitt in Stunden]	Suizidmethode
Suizidopfer (n=18)	Männer n=11 Frauen n= 7	29,9 ± 9,9 14,5 – 48,9	20,4 ± 17,4 4,2 – 77,5	<u>hart:</u> Männer n=11 Frauen n=6 <u>weich:</u> Männer n= 0 Frauen n= 1
Kontrollen (n=10)	Männer n= 7 Frauen n= 3	34,9 ± 16,7 11,3 – 58,6	12,3 ± 11,0 2,5 – 40,0	
Statistik mittels oneway ANOVA (P- Wert mit 95% Signi- fikanz)	df = 1 F = 0,533 P = 0,472	df = 1 F = 1,002 P = 0,326	df = 1 F = 1,749 P = 0,198	

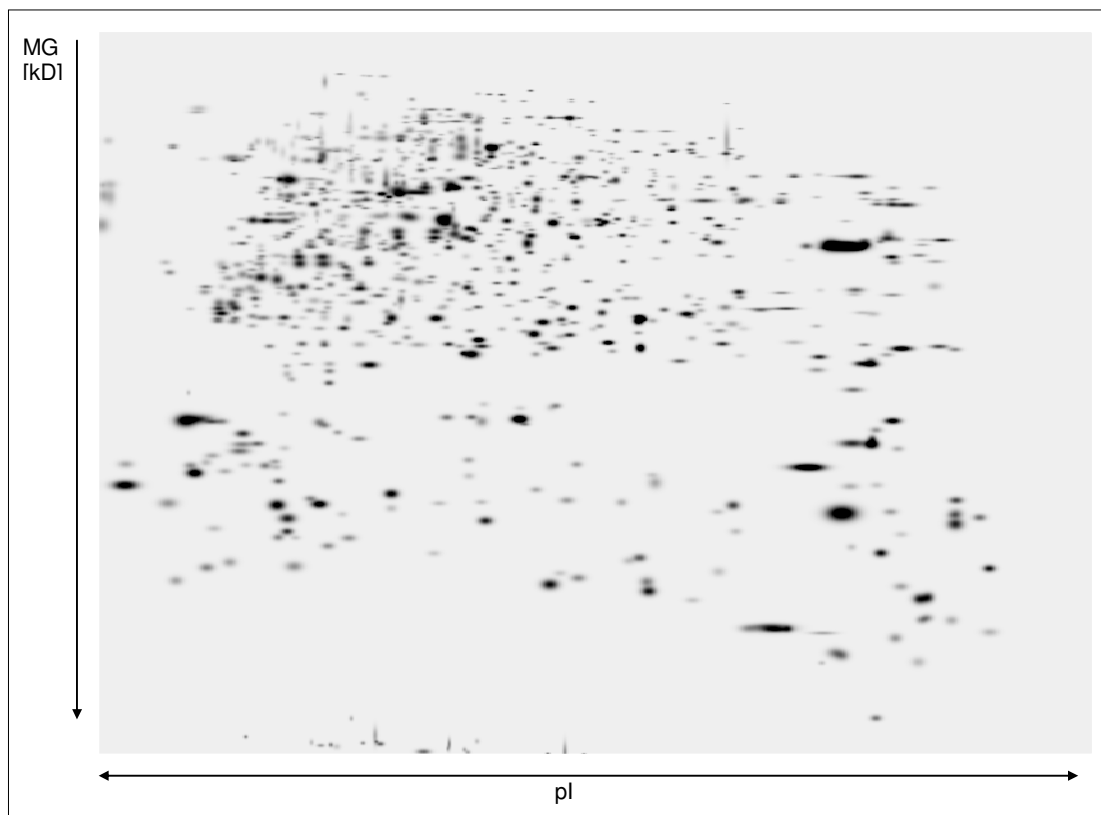


Abb. 4.7.1: Master-Gel des Cerebellums

4.8 Cerebrospinale Flüssigkeit; Liquor

4.8.1 Übersicht

Bei der Auswertung von 25 2D-Gelen der Liquores wurde, im Vergleich zu den 2D-Gelen der einzelnen Hirnregionen, eine hohe mittlere Gesamt-Spot-Zahl von 1511 gefunden. Allerdings zeigte sich hier das Problem einer sehr schlechten Reproduzierbarkeit des Spotmusters, die sich in einem mittleren Korrelationskoeffizienten von nur 0,47 widerspiegelt. Diese Gele zeigen im Vergleich zu den Gelen der untersuchten Hirnregionen eine Häufung von Spots im niedermolekularen Bereich, was auf mögliche degenerative Prozesse hindeuten könnte. Ein weiteres Problem schien die Überlagerung mit Albumin zu sein, das mit einem Anteil von über 60% die Hauptkomponente des humanen Liquors darstellt. So wurden vier von fünf Spots, die signifikante Unterschiede zwischen Suizidopfern und Kontrollen aufwiesen, als Albumin identifiziert, wobei nicht deutlich wird, ob es sich bei den Spots um reines Albumin handelt oder ob dieses ein weiteres Protein überlagert.

4.8.2 Auswertung

Im Liquor der Suizidopfer, nicht jedoch der Kontrollen, wurden Fragmente des Beta-Aktins (ACTB) identifiziert. ACTB polymerisiert zu Aktinfilamenten, welche die kleinsten Elemente ('Mikrofilamente') des Zytoskelettes darstellen.

Tab. 4.8.1. Daten der Suizidopfer und Kontrollen

	Geschlecht	Alter [Durchschnitt in Jahren]	postmortale Liegezeit [Durchschnitt in Stunden]	Suizidmethode
Suizidopfer (n=19)	Männer n= 10 Frauen n= 9	38,9 ± 15,0 21,0 - 76,0	25,6 ± 15,9 5 - 77,5	<i>hart:</i> Männer n=10 Frauen n=7 <i>weich:</i> Männer n=0 Frauen n=2
Kontrollen (n=6)	Männer n=5 Frauen n=1	40,05 ± 17,6 14,0 - 58,6	14,7 ± 13,2 2,8 - 40,0	
Statistik mittels oneway ANOVA (P-Wert mit 95% Signifikanz)	df = 1 F = 2,435 P = 0,132	df = 1 F = 0,023 P = 0,882	df = 1 F = 2,306 P = 0,142	

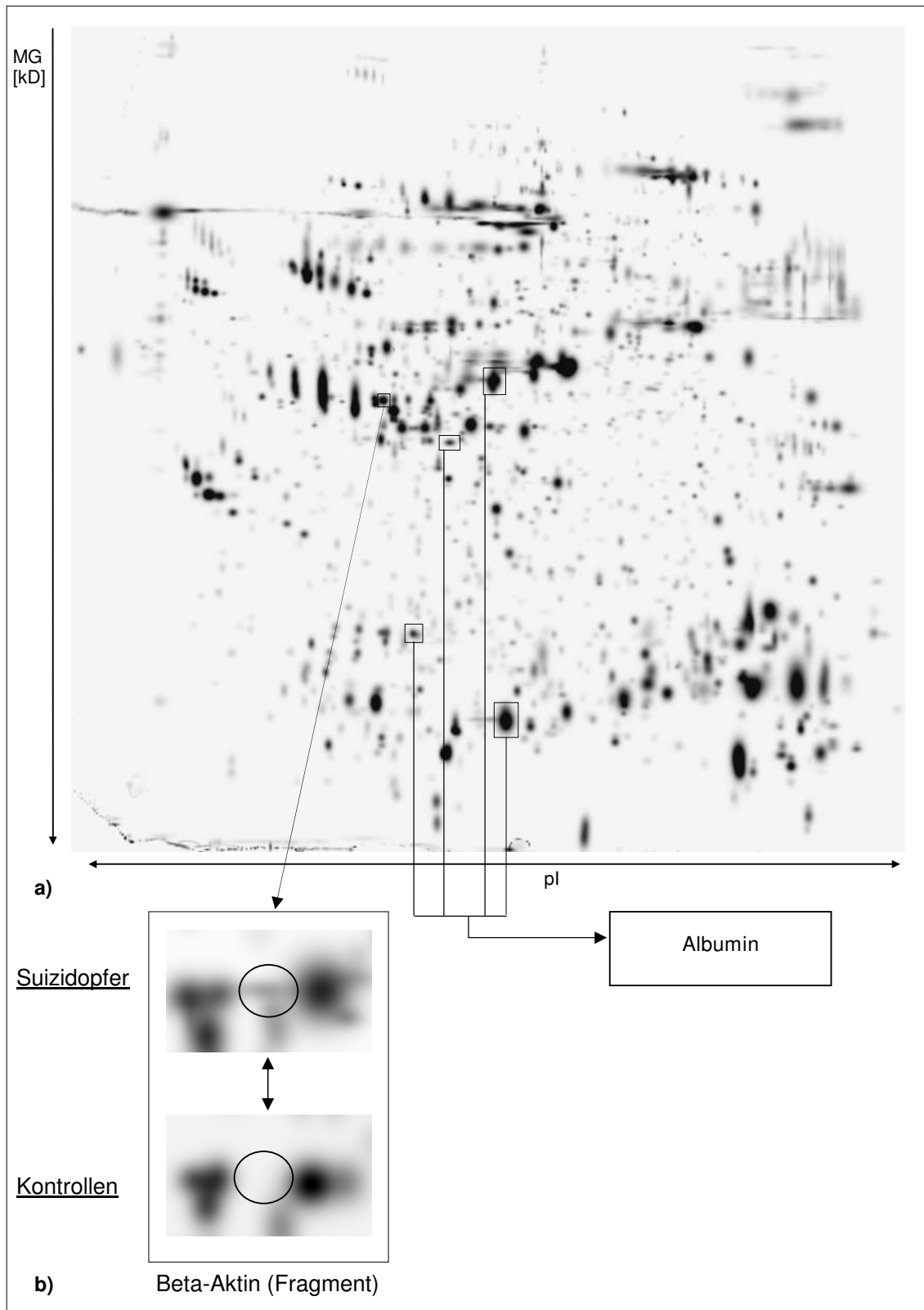


Abb. 4.4.1: Bildanalyse der 2D-Gele von Liquor

a) Das Master-Gel dient der Übersicht; b) Die Detailbilder zeigen ein Beta-Aktin-Fragment (ACTB), das ausschließlich bei den Suizidopfern auftrat

Tab. 4.8.2 Identifikation von Beta-Aktin im Liquor mittels MALDI-Massenspektrometrie und MSDB-Datenbank Suche

Proteinidentität		MW [kD] (theor.)	pI	Spotintensitäten bei Suizidopfern im Vergleich zu Kontrollen	
Spot Nr.	Name	Accession Nr. (MSDB)			
sp 3201	Beta-Aktin (ACTB)	Q96HG5	41,0	5,56	nur bei Suizidopfern

Tab. 4.8.3 Laut Berechnung mittels Chi-Quadrat-Test lagen keine Korrelationen vor zwischen den Spotintensitäten und den Faktoren Alter, Geschlecht, postmortaler Liegezeit (PMI) oder Suizidmethode bei einem Signifikanzniveau für p von 95% .

Gruppe	Protein	Alter	Geschlecht	PMI	Suizidmethode
Suizidopfer	ACTB	p=0,267	p=0,399	p=0,321	p=0,123
Kontrollen	ACTB	p=0,306	p=0,624	p=0,306	

4.9 Tabellen

Tab. 4.9.1 Zusammenfassung der differentiell exprimierten Proteine, unterteilt nach ihrer Lokalisation in den Hirnregionen

Hirnregion	Proteinidentität			MG [kD] (theor.)	pI (theor.)	Spotintensitäten bei Suizidopfern im Vergleich zu Kontrollen
	Protein-Name	Gen-Name	Acc. Nr. (MSDB)			
Präfrontaler Cortex	saures fibrilläres Gliaprotein	GFAP	Q96P18	49,88	5,42	nur bei Suizidopfern
	Mangan Superoxid Dismutase Mutante Q143N	SOD2	1QNMA	22,29	6,86	mind. 2-fach erhöht
	SOD2-Fragment	SOD2	Q7Z7M4	23,77	6,86	nur bei Suizidopfern
	Alpha Crystallin B	CRYAB	P02511	20,16	6,76	nur bei Suizidopfern
	-- nicht identifiziert --					mind. 1,5-fach erniedrigt
	-- nicht identifiziert --					mind. 1,5-fach erniedrigt
Amygdala	Neurofilament Trip-let L Protein	NEFL	Q8IU72	61,54	4,64	mind. 2 -fach erniedrigt
	Beta Tubulin	TUBB4	T08726	50,38	4,78	mind.1,5-fach erniedrigt
	Beta Tubulin II (class II beta tubulin isotype)	TUBII	Q8IWR2	50,28	4,82	mind. 2-fach erniedrigt
	Glutamin-Synthetase	GLNS	Q7Z3W4	44,63	6,43	nur bei Suizidopfern
	Fruktose-Bisphosphat Aldolase C	ALDC	P15104	39,70	6,46	nur bei Suizidopfern
Thalamus	Galectin-1 (Beta-galactoside-binding lectin)	LEG1	P09382	14,92	5,34	mind. 2-fach erhöht
	Collapsin response mediator protein	CRMP2	JC5317	62,71	5,95	mind. 2-fach erhöht
	Alpha Enolase	ENO1	A39183	47,10	6,20	nur bei Suizidopfern
	-- nicht identifiziert --					mind. 2-fach erhöht
	-- nicht identifiziert --					mind. 2-fach erhöht
	-- nicht identifiziert --					mind. 2-fach erhöht

Fortsetzung: Tab. 4.9.1

Hirnregion	Proteinidentität			MG [kD] (theoret.)	pI (theoret.)	Spotintensitäten <u>bei Suizidopfern</u> im Vergleich zu Kontrollen
	Protein-Name	Gen-Name	Acc. Nr. (MSDB)			
Hippocampus	Peroxiredoxin2	PRDX2	AAH00452	22,05	5,66	mind.1,5-fach erhöht
	Neuropolypeptid h3 (Phosphatidylethanolamine binding protein)	PEBP	1BD9A	20,44	7,18	mind.1,5-fach erniedrigt
	Gamma-Enolase, (neuronal Form)	ENO2	AAA52388	44,57	4,94	mind.1,5-fach erniedrigt
	ATP-Synthase (Untereinheit B)	ATPB	A33370	56,53	5,26	mind. 2-fach erniedrigt
	<i>- nicht identifiziert -</i>					mind.1,5-fach erniedrigt
Hypophyse	keine signifikanten Unterschiede vorhanden					
Cerebellum	<u>Referenzregion:</u> keine signifikanten Unterschiede vorhanden					
Liquor	Beta-Aktin	ACTB	Q96HG5	41,0	5,56	nur bei Suizidopfern

Tab. 4.9.2 Mittlere Gesamt-Spotanzahl und mittlerer Korrelationskoeffizient (Konfidenzintervall 0,5-1) aller 2D-Gele der sechs untersuchten Hirnregionen sowie des Liquors

Hirnregion	Mittlere Gesamt-Spotanzahl	Mittlerer Korrelationskoeffizient (Konfidenzintervall 0,5-1)
präfrontaler Cortex	1228	0,594
Amygdala	783	0,650
Thalamus	948	0,620
Hippocampus	929	0,582
Hypophyse	987	0,670
Cerebellum	936	0,562
Mittel der Hirnregionen	975	0,623
Liquor	1511	0,470

5. DISKUSSION

Zwei Ziele wurden für die vorliegende Arbeit formuliert: 1. die Etablierung der vergleichenden Proteomanalyse postmortalen Hirn- und Liquorproben von Suizidopfern und Kontrollen und 2. die Detektion und Identifikation suizidassoziierter Proteine. Analog dazu wird auch die Diskussion unterteilt in die Beurteilung der Validität der Methodik und die Interpretation der Ergebnisse.

5.1 DISKUSSION DER METHODIK

5.1.1 Einleitung

Die Validität der Methodik wurde durch eine Reihe von Faktoren bestimmt, unter denen die Qualität der Hirn- und Liquorproben sicherlich das höchste Risiko barg.

Dabei konnten Proteinveränderungen der Proben, die während der Probenaufbereitung und der 2D-Elektrophorese entstanden, weitgehend minimiert werden. Nicht beeinflussbar war dagegen die Biovariabilität des Probenmaterials, die in der Regel bei humanen, insbesondere bei postmortalen humanen Geweben und Flüssigkeiten sehr hoch ist. Die möglichen Einflüsse auf die beschriebenen Unterschiede in der Proteinexpression müssen daher näher beleuchtet werden.

Zur Medikation und psychiatrischen Diagnose lagen nur bei etwa der Hälfte der Suizidopfer Angaben vor, so daß hierzu keine aussagefähige Statistik erhoben werden konnte. Dagegen waren die Faktoren Alter, Geschlecht, postmortale Liegezeit und Todesart für alle Suizidenten und Kontrollen bekannt. Somit konnte ihre mögliche Korrelation mit den ermittelten Intensitäten der Protein-Spots statistisch berechnet werden. Dabei wurde einzig in einer Hirnregion ein Zusammenhang zwischen Suizidmethode und Proteinexpression gefunden. Inwieweit die Summe der methodischen sowie prä- und postmortalen Faktoren Einfluß auf das Proteom ausübte, zeigte sich letztendlich in Unterschieden der Proteinmuster in den 2D-Gelen.

Durch den Vergleich ('Matchen') der Gele mittels digitaler Bildanalyse ließen sich diese Unterschiede erfassen. Als Maß der Übereinstimmung diente der Korrelationskoeffizient nach Pearson, der bei den Gelen der Hirnproben jeweils mittlere Werte zwischen 0,58 und 0,67 einnahm und somit zumindest im unteren Bereich des Konfidenzintervalles (0,5-1,0) lag. Beim Liquor dagegen variierten die 2D-Gele zum Teil erheblich, was sich in einem mittleren Korrelationskoeffizienten von 0,47 nieder-

schlug. Im Folgenden wird erstens versucht, die Ursachen dieser Differenzen zu klären, und zweitens, die möglichen Einflüsse der beschriebenen Faktoren auch auf das Hirngewebe zu beurteilen.

5.1.2 Kritische Variablen des postmortalen Probenmaterials

5.1.2.1 Lateralität der Hirnregionen

Die Asymmetrie der beiden Hirnregionen zeigt sich auf biochemischer Ebene unter anderem in der ungleichen Verteilung von Neurotransmittern (Glick et al., 1992). Im Zusammenhang mit der 'Serotonin-Hypothese der Suizidalität' (s. Kap.1 Einleitung) sind insbesondere die Befunde erhöhter Dichte von Serotonin (5HT)-Transportern im rechten orbitofrontalen Cortex (Arato et al., 1991) sowie von Beta-2-Rezeptoren im Hippocampus von Suizidopfern verglichen mit der jeweils linken Hirnregion (Joyce et al., 1992) von Bedeutung. Zur Vermeidung derartiger Unterschiede wurde für die vorliegende Untersuchung bei lateral angelegten Hirnregionen stets die jeweils rechte Hemisphäre entnommen.

5.1.2.2 Suizidmethode

Die Suizidmethode und somit die Todesart lassen auf die zeitliche Länge der Agonie schließen, d.h. jenes Stadiums unmittelbar vor dem Tod, in dem alle Lebensvorgänge stark vermindert sind. Diese Phase ist bei den so genannten weichen 'Suizidmethoden' wie Tabletten-Intoxikation oder Kohlenmonoxid-Vergiftung länger als bei 'harten' Methoden wie Erhängen oder Erschießen. Bei den vorliegenden Kontrollen trat der Tod stets relativ schnell ein, da es sich um Unfälle oder um Herztod handelte. Im Stadium der Agonie kommt es im Gehirn und im Liquor zu Hypoxie (verminderte Sauerstoffversorgung) und zum Anstieg der Laktatkonzentration, welches beides zu einem Absinken des pH-Wertes führt (Hardy et al., 1985). Hier ist von Bedeutung, daß sich diese Vorgänge sowohl im Gehirn als auch im Liquor als unabhängig von der postmortalen Liegezeit erwiesen haben (Harrison et al., 1995; Ravid et al., 1992). Die azidischen Bedingungen und das neurotoxische Laktat können zu Schäden auf DNA-, RNA- und Proteinebene führen (Hynd et al., 2003).

In den Untersuchungen, die dieser Arbeit zugrunde liegen, wurden Korrelationen zwischen Suizidmethode und den Intensitäten von drei Protein-Spots in der Amygdala gefunden. Dabei handelt es sich um die beiden zytoskelettalen Proteine Neurofilament Triplet L Protein und Beta-Tubulin sowie um das Enzym Glutaminsynthetase. Gegen einen tatsächlichen Einfluß der Suizidmethode auf die Protein-stabilität spricht aber erstens, daß in der Amygdala bei einem weiteren Enzym (Fructose-Bisphosphat-Aldolase C) und einer zweiten Isoform des Beta-Tubulins (class II beta tubulin isotype) kein Zusammenhang mit der Suizidmethode auftrat und zweitens, daß diese Korrelation weder in einer anderen Hirnregion noch im Liquor gefunden wurde. Da in einer Studie von Harrison (Harrison et al., 1995) gezeigt werden konnte, daß eine agonale Azidose das gesamte Gehirn betrifft, konnten für die vorliegenden Befunde aus methodischer Sicht Einflüsse der Todesart auf die Proteinexpression weitgehend ausgeschlossen werden. Vielmehr könnten psychopathologische und neurobiologische Faktoren beteiligt sein.

5.1.2.3 Postmortale Liegezeit (postmortales Intervall, PMI)

Zu den Parametern mit den stärksten Einflüssen auf die postmortale Stabilität von Proteinen zählt die Phase zwischen dem Zeitpunkt des Todes und des Einfrierens der Proben. Während der postmortalen Liegezeit (PMI) kommt es zumeist zur Abnahme der Konzentrationen einzelner Proteine, bedingt durch unterschiedliche biochemische Degradierungsprozesse, aber auch zu Proteinmodifikationen und vereinzelt zu Konzentrationserhöhungen (Fountoulakis et al., 2001).

Das PMI ist in der Regel bei Suizidopfern höher als bei Personen mit anderer Todesursache, da Menschen mit ernsthaften suizidalen Absichten die Suizidhandlung zumeist an versteckten Orten vollziehen, um nicht gestört zu werden. Entsprechend später werden sie aufgefunden. Daher war das Matchen (s. Kap.3 'Methoden') der beiden Gruppen in Bezug auf das PMI besonders wichtig. Dabei fanden sich mit Ausnahme des präfrontalen Cortex' keine signifikanten Unterschiede zwischen Kontrollpersonen und Suizidopfern. Wie bereits in der Ergebnisbeschreibung erwähnt (Kap. 4.1), floß nicht bei jeder Hirnregion die gleiche Anzahl von 2D-Gelen in die Auswertung ein. Aufgrund dessen war die Gruppe, in der die präfrontalen Cortices untersucht wurden, so zusammengesetzt, daß das mittlere PMI bei den Suizidenten doppelt so hoch war wie bei den Kontrollen. Die Proteine dieser Region, die in der

Bildanalyse detektiert wurden, hätten daher verminderte Spotintensitäten erwarten lassen. Dies gilt insbesondere für das saure fibrilläre Gliaprotein (glial fibrillary acidic protein, GFAP), das in einer systematischen Proteomanalyse mit Rattenhirn ab 12 Stunden nach der Sektion abgeschwächt und nach 72 Stunden nicht mehr detektierbar war (Fountoulakis et al., 2001). In der vorliegenden Arbeit waren dagegen trotz postmortalen Liegezeiten von bis zu 40 Stunden zwei der drei GFAP-Isoformen bei den Suizidopfern tendenziell stärker exprimiert (Daten nicht gezeigt) und ein dritter GFAP-Spot trat ausschließlich in dieser Gruppe auf. Bei diesem Spot könnte es sich um eine phosphorylierte Isoform des Proteins handeln (s. Kap. 5.1, Diskussion der Ergebnisse). Auch dies spräche gegen degenerative Prozesse des Proteins, denn Phosphorylierung dient unter anderem dem Schutz von Proteinen gegen Proteolyse, bzw. Dephosphorylierung gilt als ein vorbereitender Schritt zum proteolytischen Abbau (Tallant et al., 1988). Auch das Hitzeschockprotein (Hsp) Alpha Crystallin B (CRYAB) wurde ausschließlich bei Suizidopfern identifiziert, während Fountoulakis die Expression zweier Hsp's (Hsp70 und Hsp71) mit zunehmendem PMI als vermindert nachwies (Fountoulakis et al., 2001). In einer Studie mit humanem Hirngewebe von schizophrenen Patienten wurde dagegen kein Zusammenhang zwischen der Expression des Hsp's CRP40 und dem PMI gefunden (Gabriele et al., 2005). Das dritte Protein, das im präfrontalen Cortex identifiziert wurde, war die Mangan-Superoxid Dismutase (SOD2), für die zwei Spots detektiert wurden. Beide Spots waren in der Gruppe der Suizidenten erhöht, bzw. ausschließlich dort exprimiert. Obwohl zwei weitere, nicht identifizierte Spots bei den Kontrollen höhere Intensitäten aufwiesen, schien doch insgesamt die postmortale Liegezeit keinen signifikanten Einfluß auf die Proteinexpression im präfrontalen Cortex ausgeübt zu haben.

In allen anderen Hirnregionen sowie im Liquor zeigten sich keine Korrelationen zwischen PMI und den Spotintensitäten. Dennoch können mögliche Auswirkungen des PMI für die Proteininstabilität nicht ohne weiteres ausgeschlossen werden. Es wurden daher stets zwei weitere Hinweise auf verstärkte Proteindegeneration überprüft: 1. die Anzahl nicht detektierter C- und N-terminaler Sequenzen als Folge möglichen proteolytischen Abbaus sowie 2. die Identifikation von Ubiquitin anhand der Massenspektren als Hinweis für beginnende Proteolyse. Mittels N-terminaler Konjugation mit dem Polypeptid Ubiquitin wird ein Protein markiert für den anschließenden Abbau durch einen proteolytischen Komplex (Proteasom). Bei den hier untersuchten Proteinen wurde Ubiquitin selber nicht gefunden, allerdings konnte die neuronenspezifi-

sche Gamma-Enolase (ENO2) im Komplex mit der Ubiquitin-Ligase identifiziert werden, einem Enzym, das an der Ubiquitin-Bindung beteiligt ist. Bei der ENO2, die zwar eindeutig mit einem sehr hohen Score von 203 identifiziert wurde, führt die Komplexbildung jedoch zu einer solch erheblichen Verschiebung des pI's sowie der molekularen Masse, daß dieses Protein nur bedingt auswertbar war.

Bei drei Proteinen der Amygdala (Beta-Tubulin (TUBB4), Neurofilament Triplet L Protein (NEFL) und Fructose-Bisphosphat-Aldolase C (ALDC)) fiel auf, daß in den größeren C-, bzw. N-terminalen Bereichen keine Peptide identifiziert werden konnten. Für NEFL stimmt dieser Befund mit der erwähnten Studie von Fountoulakis überein, in der das Protein im Rattenhirn bereits nach wenigen Stunden PMI degradierte (Fountoulakis et al., 2001). In einer anderen Studie an humanen frontalen Cortices wurde dagegen kein Zusammenhang zwischen PMI und der Expression von NEFL gefunden (Garcia-Sevilla et al., 1997). Auch für TUBB4 wäre ein proteolytischer Abbau plausibel, denn Tubulin gilt als sehr instabil, (Kosik et al., 1982) während für ALDC bislang keine systematischen post-mortem-Studien bekannt sind. Die nicht identifizierten C- und N-terminalen Abschnitte sind bei den Suizidopfern sichtlich größer als bei den Kontrollen, so daß mögliche proteolytische Prozesse dort weiter fortgeschritten sein könnten. Dabei bleibt offen, ob dieses Ergebnis auf das, wenngleich nicht signifikant, so doch längere PMI zurückzuführen ist, ob die betreffenden Proteine schon prä mortal geschädigt waren, oder ob sie aus anderen Gründen bei den Suizidopfern grundsätzlich anfälliger für Proteasen waren.

Die Tatsache, daß nur einzelne Proteine Anzeichen postmortaler Degradierung aufweisen, ist nicht ungewöhnlich. Das nicht-lineare Auftreten von post-mortem-Effekten, sogar innerhalb einer Gehirnschicht (Lewis and Akil, 1997), wurde bereits mehrfach beschrieben (David A, 2002). Für eine weitgehende Integrität des Proteoms der Hirnproben spricht auch die Gesamt-Spotverteilung in den zugehörigen 2D-Gelen, da sich stets der Großteil der Spots im höhermolekularen Bereich befand.

Beim Liquor hingegen waren deutlich mehr niedermolekulare Spots vorhanden. Ob es sich bei diesen Proteinen um Degradationsprodukte oder um Immunglobuline handelte, die im Liquor in hoher Anzahl vorhandenen sind und geringe molekulare Massen aufweisen, bleibt offen. Gegen einen stärkeren proteolytischen Abbau als in den Hirnproben spricht allerdings die Zugabe eines Proteaseinhibitors unmittelbar nach der Sektion. Dies war wegen der schlechten Diffundierbarkeit des Hirngewebes erst während der Probenaufbereitung sinnvoll. Ein Vergleich mit entsprechenden

Vorbefunden ist kaum möglich, da es nur wenige Studien über postmortale Proteinveränderungen im Liquor gibt, die zudem überwiegend quantitative Veränderungen von Neurotransmittern untersuchen.

5.1.2.4 Lebensalter

Das Lebensalter spielt insofern eine Rolle, als daß Proteine im Zuge des Alterungsprozesses zahlreiche qualitative und quantitative Veränderungen erfahren (Chen et al., 2003). Zudem wurde eine altersabhängige Senkung des pH-Wertes im menschlichen Gehirn beschrieben (Harrison et al., 1995).

Die beiden Gruppen der Suizidopfer und Kontrollen waren im Bezug auf das Lebensalter zum Todeszeitpunkt gematcht und keiner der untersuchten Proteinspots zeigte Korrelationen zwischen der Spotintensität und dem Alter der Personen. Da dies beim Liquor allerdings nur für ein Protein (Actin) überprüft werden konnte, bleibt es möglich, daß für die schlechte Reproduzierbarkeit der Liquor-Gele auch altersbedingte Einflüsse eine Rolle spielen. Dafür spricht z.B. eine aktuelle Liquor-Studie, in der an 10% der untersuchten Proteine quantitative altersabhängige Veränderungen von mehr als 20% festgestellt wurden (Zhang et al., 2005). Erklären ließe sich dies durch eine erhöhte Durchlässigkeit der Blut-Hirn-Schranke mit zunehmendem Alter (Garton et al., 1991).

5.1.2.5 Geschlecht

Es gibt zunehmend Belege für eine Implikation geschlechtsspezifischer Faktoren für die Entstehung psychiatrischer Erkrankungen (Rao and Kolsch, 2003). Dennoch existieren nur relativ wenige post-mortem Studien zu Veränderungen von Proteinen in Abhängigkeit vom Geschlecht (Hynd et al., 2003). Im Zusammenhang mit suizidalem Verhalten sind insbesondere Untersuchungen serotonerger Parameter von Bedeutung wie z.B. unterschiedliche Bindungskapazitäten von 5HT_{1A}- (Parsey et al., 2002) und von 5HT₂-Rezeptoren (Biver et al., 1996).

Ebenso wie beim Lebensalter waren alle Suizidopfer und Kontrollen auch in Bezug auf das Geschlecht gematcht und es fanden sich keine Korrelationen zwischen Geschlecht und Spotintensitäten. Dennoch können auch Einflüsse dieses prämortalen Faktors auf die Proteine des Liquors und somit auf die Qualität der entsprechenden 2D-Gele nicht ausgeschlossen werden.

5.1.3 Methodik

Bei der zweidimensionalen SDS-Gel-Elektrophorese (2D-PAGE) handelt es sich um eine sehr sensitive und somit auch anfällige Methode gegenüber verschiedensten Einflüssen. Daher war es elementar wichtig für die geplanten Untersuchungen, die Methodik zur Schaffung konstanter Versuchsbedingungen zu standardisieren. Dazu dienten Maßnahmen wie die sofortige Lagerung der Proben nach der Sektion bei -80°C , die Zugabe eines Proteinaseinhibitors, die Verwendung von Chemikalien des jeweils gleichen Herstellers, Beachtung der gleichen Wasserqualitäten für die unterschiedlichen Arbeitsschritte, Einhaltung konstanter Zeiten u.v.m.

Die Validierung der Protein-Identifikationen erfolgte in erster Linie mit Hilfe des Scoring Algorithmus von MASCOT und dem damit verbundenen Significance Level. Durch Anlegen des MASCOT-Scores reduziert sich die Wahrscheinlichkeit, daß es sich bei den identifizierten Proteinen um falsch-positive Ergebnisse handelt auf unter fünf Prozent (Näheres dazu im Methodenteil auf Seite 40). Um die Zuverlässigkeit der Ergebnisse zu erhöhen, wurden ferner die MALDI-TOF-Messungen aller Spots mehrfach wiederholt. Zudem wurde dabei, soweit möglich, jeder Spot in unterschiedlichen Hirnregionen bestimmt. Da die massenspektrometrische Identifikation von Proteinen mittels MALDI-TOF außerdem als insgesamt sehr zuverlässig gilt, wurde auf die Durchführung einer Validierungsmethode wie zum Beispiel des Western-Blots verzichtet.

5.1.4 Zusammenfassende Bewertung

Bei einer kritischen Beurteilung der Methodik sind sicherlich zwei Mängel in Bezug auf das Probenmaterial zu nennen: 1. das unausgewogene Verhältnis von Suizidopfern zu Kontrollen von 20:10 und 2. die unzureichenden Informationen zur Medikation und psychiatrischen Diagnose der Suizidenten. Positiv steht dem eine statistisch ausgewogene Verteilung zwischen den beiden Gruppen bezüglich der Faktoren: Alter, Geschlecht, Suizidmethode und postmortale Liegezeit gegenüber.

Durch die Optimierung von Probenaufbereitung und Durchführung der 2D-PAGE konnte eine gute Proteinauftrennung sowohl in der ersten als auch in der zweiten Dimension erzielt werden. Allein beim Thalamus gab es in dieser Hinsicht Probleme,

deren Ursache nicht geklärt werden konnten, und die sich auch bei wiederholter Versuchsdurchführung nicht beseitigen ließen. Daher flossen hier nur 16 2D-Gele in die Auswertung ein.

Als Maß für die Reproduzierbarkeit der Methode galt der Korrelations-Koeffizient, der aus den Ergebnissen des Matches der 2D-Gele in der Bildanalyse berechnet wurde. Dieser lag bei den sechs Hirnregionen innerhalb des Konfidenzintervalles und untermauerte somit die Befunde von Proteinunterschieden zwischen Suizidopfern und Kontrollen. Die Korrelation der Liquor-2D-Gele lag dagegen unterhalb der Signifikanzgrenze, so daß letztlich nur für ein Protein eindeutige Expressionsunterschiede zwischen beiden Gruppen detektiert werden konnten. Für die Ursachen der zum Teil erheblichen Differenzen zwischen den einzelnen Liquor-Gelen gab es keine Hinweise auf verstärkte Einflüsse der Faktoren: Alter, Geschlecht, Suizidmethode oder PMI. Wahrscheinlicher sind Interferenzen mit Albumin, das naturgemäß in hohen Konzentrationen im Liquor vorkommt, sowie mit Blut in einer Reihe hämolytischer Liquorproben. Sowohl Albumin als auch Hämoglobin wirken störend auf die Proteinauftrennung und überlagern zum Teil große Bereiche anderer Spots im 2D-Gel. Es wäre daher zu empfehlen, kommerziell angebotene Verfahren der Affinitätschromatographie zur Albuminentfernung anzuwenden und dabei mögliche unspezifische Proteinverluste in Kauf zu nehmen.

Insgesamt wurde für die Untersuchung von Hirngewebe das methodische Ziel der Optimierung der Probenaufbereitung sowie der Etablierung der 2D-PAGE erreicht. Die suizidassoziierten Expressionsunterschiede der identifizierten Proteine können somit vorbehaltlos diskutiert werden im Hinblick auf ihre mögliche Implikation für suizidales Verhalten. Für Liquor-Proben müsste die Methode noch durch ein zusätzliches Verfahren modifiziert werden.

5.2 Diskussion der Ergebnisse

In der Bildanalyse der 2D-Gele wurden im Vergleich von Suizidopfern und Kontrollen insgesamt 22 Proteine detektiert, die signifikante Unterschiede zwischen beiden Gruppen aufwiesen. 16 dieser Proteine konnten mittels Protein-Datenbank-Recherche identifiziert werden. Obgleich die Methodik in erster Linie für die Detektion und Identifikation von Proteinen ausgelegt war, erlauben doch die jeweiligen Massenspektren Annahmen über mögliche posttranslationale Modifikationen (PTM) oder über weitere Proteine, die an die bereits identifizierten angelagert sind. Die Auswertung der Ergebnisse kann anhand zweier Kriterien erfolgen: 1. hinsichtlich der möglichen Ursachen und Folgen der differentiellen Proteinexpressionen für die jeweilige Hirnregion, oder 2. unter dem Aspekt der gemeinsamen neurobiologischen Funktionen der betreffenden Proteine. Im Folgenden werden schwerpunktmäßig die funktionellen Zusammenhänge der Proteine besprochen, um mögliche gemeinsame neurobiologische Merkmale für die Entstehung suizidalen Verhaltens aufzudecken. Die identifizierten Proteine lassen sich dabei gemäß ihrer biologischen Funktion in sechs Gruppen einteilen, wie in Tab. 5.1 zur Übersicht gezeigt ist.

5.2.1 Proteine des Intermediärstoffwechsels

Es wurden sieben Proteine des Intermediärstoffwechsels identifiziert, von denen fünf als Enzyme mittel- oder unmittelbar in den Glukose- und Energiemetabolismus involviert sind. Nach früheren Vorstellungen erfolgte die Energieversorgung des Gehirns ausschließlich durch die direkte Glukoseaufnahme aus der Blutbahn. Heute dagegen ist bekannt, daß Neuronen zusätzlich oder sogar obligat über Astrozyten versorgt werden, in denen die Glukose nach Aufnahme aus dem Blut zu Laktat und Pyruvat abgebaut wird und in dieser Form über spezifische Transportmechanismen in die Neuronen gelangt (Pellerin, 2004; Magistretti, 1999). Die fünf an diesem Metabolismus beteiligten Enzyme aus dieser Arbeit und ihre jeweiligen Funktionen werden zur Übersicht in Abb. 5.2.1 dargestellt.

Tab. 5.2.1: Proteine, die signifikante Unterschied zwischen Suizidopfern und Kontrollen aufwiesen, gruppiert nach ihrer biologischen Funktion; zudem drei Proteine, die vermutlich an ATPB (COX8), ENO2 (UBE2L3) und TUBB (PBGD) angelagert waren.

Protein-Gruppe	Proteinidentität		
	Protein-Name	Gen-Name	Hirnregion
5.2.1 Proteine des Intermediär- Stoffwechsels	Alpha Enolase	ENO1	Thalamus
	Gamma-Enolase; neuronale Form	ENO2	Hippocampus
	Fructose-Bisphosphat Aldolase C	ALDC	Amygdala
	ATP-Synthase (Untereinheit B)	ATPB	Hippocampus
	Glutamin-Synthetase	GLNS	Amygdala
	Galectin-1	LEG1	Thalamus
	Neuropolypeptid h3	PEBP	Hippocampus
5.2.2 Proteine des Zytoskelettes	saures fibrilläres Gliaprotein	GFAP	Präfront. Cortex
	Neurofilament Triplet L Protein	NEFL	Amygdala
	Beta Tubulin	TUBB4	Amygdala
	'Class II beta tubulin isotype'	TUBII	Amygdala
	Beta Aktin	ACTB	Liquor
5.2.3 Antioxidations- Proteine	Mangan Superoxid Dismutase: - Mutante Q143N - SOD2-Fragment	SOD2	Präfront. Cortex
	Peroxiredoxin2	PRDX2	Hippocampus
5.2.4 Hitzeschock- Proteine	Alpha Crystallin B	CRYAB	Präfront. Cortex
5.2.5 Neuronen- spezifische Proteine	'Collapsin response mediator protein'	CRMP2	Thalamus
	Gamma-Enolase; (s.5.2.1)	ENO2	Hippocampus
	Neurofilament Triplet L Protein (s.5.2.2)	NEFL	Amygdala

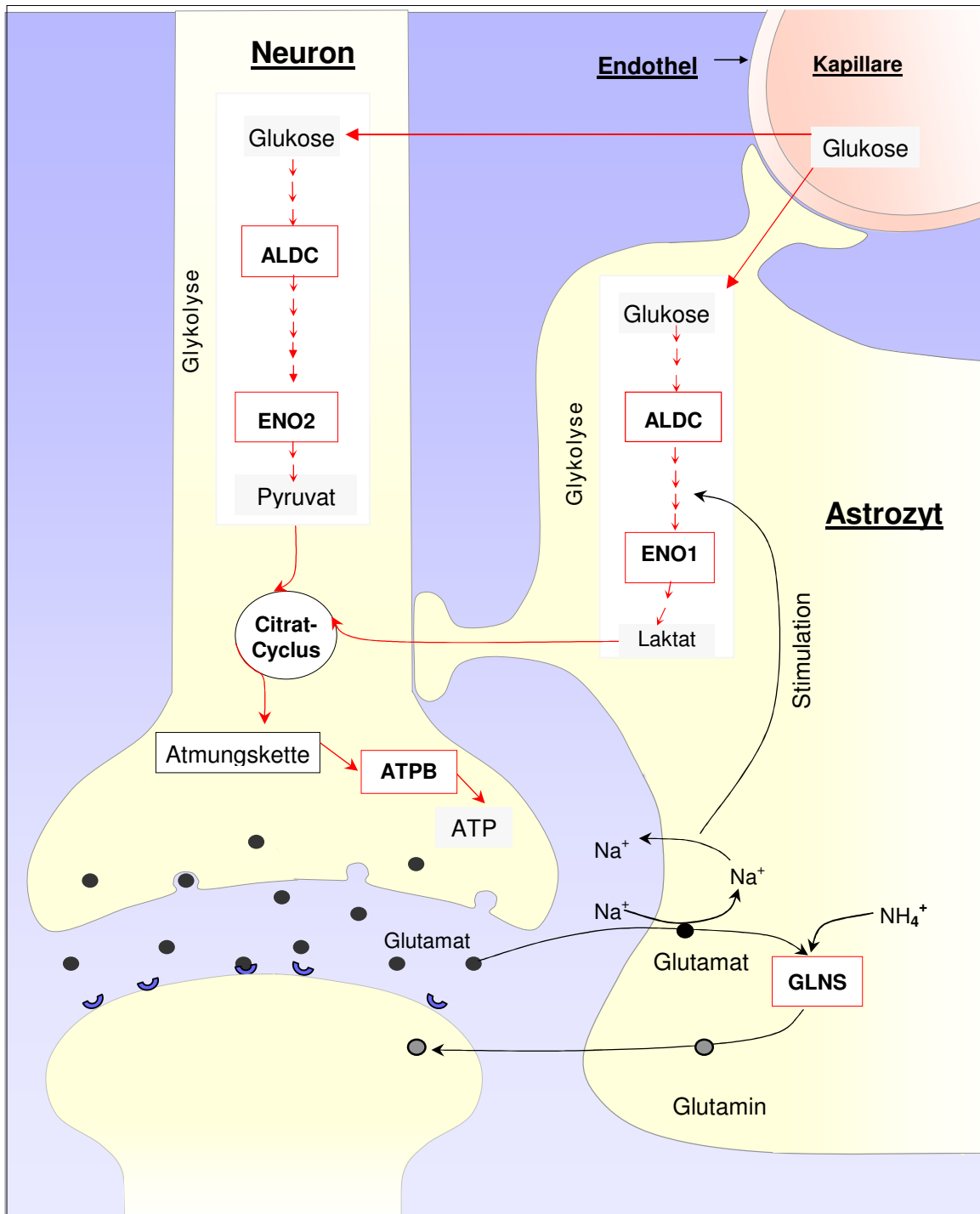


Abb.5.2.1 Interaktionen zwischen Neuronen und Astrozyten im neuronalen Glukosemetabolismus

Neuronen nehmen Glukose direkt auf oder erhalten sie über Astrozyten nach glykolytischem Abbau zu Laktat. Die in Citratcyclus und Atmungskette gewonnene Energie wird zur ATP-Synthese genutzt. Bei neuronaler Aktivität wird Glutamat in den synaptischen Spalt freigesetzt, das von Astrozyten aufgenommen wird und dabei den Ablauf der Glykolyse stimuliert. Dadurch wird der neuronale Energiebedarf mit dem astrozytären Glukoseabbau gekoppelt.

Rote Kästen: Enzyme, die bei den Suizidopfern Hinweise auf reduzierte Aktivität zeigten (ALDC = Fructose-Bisphosphat-Aldolase; ENO1 = ubiquitäre, ENO2 = neuronenspezifische Enolase; ATPB = ATP-Synthase; GLNS = Glutaminsynthetase (in Anlehnung an Magistretti (Magistretti, 1999)))

5.2.1.1 Mögliche neurobiologische Folgen der veränderten Proteinexpression

a) Fructose-1,6-Bisphosphat Aldolase C (ALDC)

Das Enzym Fructose-1,6-Bisphosphat Aldolase, hier in seiner hirnspezifischen Isoform 'C' (ALDC), ist ein Enzym der Glykolyse, dem aeroben Glukoseabbauprozess im Zytoplasma der Zelle (Abb. 5.2.1). ALDC katalysiert im vierten Schritt der Glykolyse die Spaltung von Fructose-1,6-Bisphosphat in Dihydroxyacetonphosphat und Glycerinaldehyd-3-Phosphat, welches als Ausgangssubstrat für die nachfolgenden, energieliefernden Schritte dient. In dieser Arbeit wurde das Enzym in der Amygdala identifiziert und erschien in den 2D-Gelen der Suizidopfer in drei benachbarten Spots, von denen in der Kontrollgruppe nur ein Spot vorhanden war. Die beiden der bei den Suizidenten vorhandenen Spots wiesen geringere molekulare Massen auf als der gemeinsame Spot, so daß es sich dabei um Proteolyseprodukte handeln könnte. Diese Vermutung findet Bestätigung in den Proteinsequenzen des Enzyms. Sie zeigen, daß die identifizierten Peptide der beiden zusätzlichen Spots in den C- bzw. N-terminalen Abschnitten der Längen von bis zu 110 Aminosäuren nicht vertreten waren, was auf eine Proteolyse hindeutet. Diese mögliche Degradierung schien bei diesen beiden Spots um mehr als doppelt so weit fortgeschritten wie bei dem gemeinsamen Spot und somit bei den Suizidopfern weiter als bei den Kontrollen. Die Folge könnte in der Suizidentengruppe eine Inaktivierung des Enzyms sein, wie es z.B. für das Isoenzym Fructose-1,6-Bisphosphat-Aldolase A beschrieben wurde (Pontremoli et al., 1982). Eine genauere Betrachtung der Proteinsequenzen bestätigt diese Annahme, da in der Gruppe der Suizidopfer keine derjenigen Aminosäurestellen identifiziert wurde, die nachweislich ((Koeck et al., 2004); (Bairoch et al., 1997)) von besonderer Relevanz für die Funktion des Enzyms sind (z.B. für Substratbindung oder katalytische Aktivität). Da methodische Faktoren als Ursachen für diese Ergebnisse weitgehend ausgeschlossen werden konnten (s. Kap. 5.1), lassen sie auf eine zumindest reduzierte katalytische Aktivität von ALDC schließen, was für die betreffenden Neuronen in einer verminderten Bereitstellung des Glykolyseproduktes Pyruvat als Substrat für den nachfolgenden energieliefernden Citratcyclus resultieren würde. Daneben stellt sich die Frage nach der Ursache für die bei den Suizidopfern weiter fortgeschrittene Proteolyse als bei den Kontrollen. Eine Erklärung wäre eine erhöhte Vulnerabilität von ALDC gegen den Angriff von Proteasen. Diese wird z.B.

durch Glutathion-Disulfid verursacht, der oxidierten Form des Radikalfängers Glutathion (Offermann et al., 1984).

Es sind bislang keine Vorbefunde für eine Assoziation von ALDC und Suizidalität bekannt. Zu diesem Enzym gibt es insgesamt in der biologischen Psychiatrie nur wenige Arbeiten neueren Datums. Dazu zählen zwei Proteomanalysen, von denen die eine erhöhte Expressionen von ALDC in präfrontalen Cortices von 89 Patienten mit Schizophrenie, Depression oder bipolarer Störung fand (Johnston-Wilson et al., 2000). In der zweiten Studie wurden Ratten als Modell für Schizophrenie mit einem NMDA-Rezeptor-Antagonisten behandelt, in deren Gehirnen ALDC nach langfristiger Behandlung stärker exprimiert war als nach kurzfristiger (Paulson et al., 2004). Beide Ergebnisse bestätigen eine Reihe von Studien aus den 60-er und 70-er Jahren, in denen von erhöhten Serumkonzentrationen bzw. verstärkter Aktivität von ALDC bei schizophrenen Patienten berichtet wurde (Coffey et al., 1970; Meltzer, 1968). Bei neurodegenerativen Erkrankungen wurden zumeist keine Veränderungen des Enzyms festgestellt (Bigl et al., 1999; Iwangoff et al., 1980). Entgegen diesen Befunden weisen die vorliegenden Ergebnisse in der Gruppe der Suizidopfer auf eine eher reduzierte Enzymaktivität hin. Die Folge könnte eine Unterversorgung der betroffenen Neuronen mit Energie in Form von ATP sein.

b) Alpha Enolase (ENO1) und Gamma Enolase (ENO2)

Die Enolase katalysiert im vorletzten Schritt der Glykolyse die Umwandlung von 2-Phosphoglycerat zu Phosphoenolpyruvat, der Vorstufe von Pyruvat. Das aktive Enzym liegt als Homo- oder Heterodimer vor, das sich jeweils aus den Untereinheiten alpha (ubiquitär), beta (muskulär) und/oder gamma (neuronal) zusammensetzt. Im Gehirn werden drei Varianten exprimiert, bestehend aus den Alpha- und Gamma-Untereinheiten (Abb. 5.2.2). Dabei ist die homodimere Alpha-Alpha-Enolase hauptsächlich in Gliazellen (Deloulme et al., 1997; Abdelhamid S., 1992) und insbesondere in Astrozyten (Keller et al., 1994) lokalisiert, während die Dimere Alpha-Gamma und Gamma-Gamma überwiegend in Neuronen und neuroendokrinen Zellen vorkommen und als neuronenspezifische Enolase (NSE) bezeichnet werden (Sterk et al., 1999; Deloulme et al., 1997). NSE gilt als Marker für neuronale Schäden unterschiedlichster Ursache, wie Tumore (Cooper, 1994), Hirnverletzungen (Berger et al., 2002), Ischämien (Johnsson, 1996) und andere.

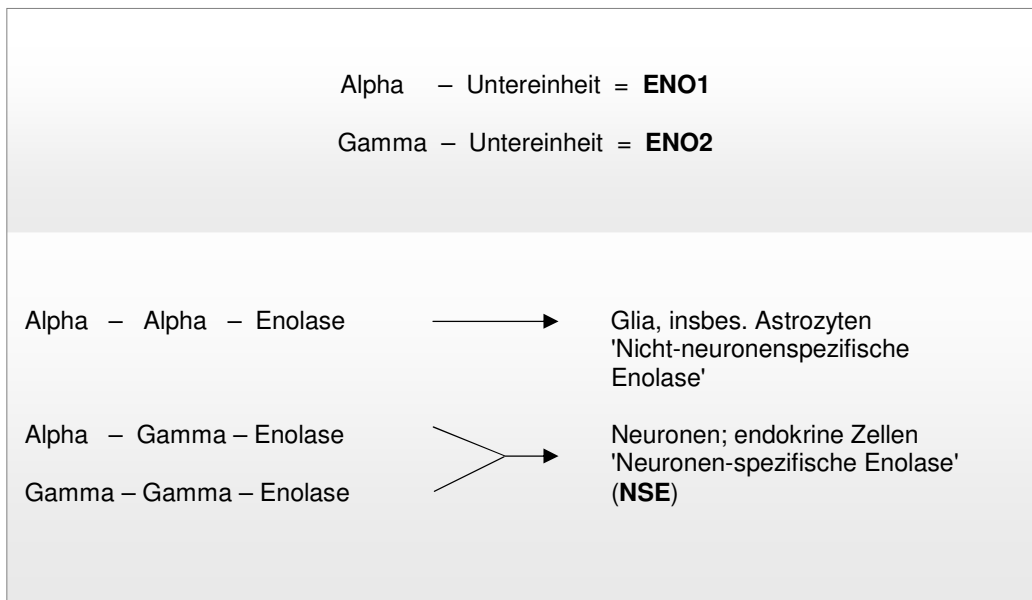


Abb. 5.2.2 : Formation der Enolase-Untereinheiten im menschlichen Gehirn

In dieser Arbeit wurden im Thalamus die Alpha-Untereinheit (ENO1) und im Hippocampus die Gamma-Untereinheit (ENO2) identifiziert. Bei der Position des ENO2-Spots im 2D-Gel fielen eine erhebliche Verschiebung des pI's in den basischen Bereich sowie eine Erhöhung des Molekulargewichtes auf, was auf die Anlagerung eines weiteren Proteins hinwies. Diese Vermutung wurde durch die Auswertung der Massenspektren von ENO2 bestätigt, in denen neben den als ENO2 identifizierten Peptiden auch das 'Ubiquitin-konjugierende Enzym' (UBE2L3) gefunden wurde. Dieses ist involviert in die Markierung eines für den Abbau vorgesehenen Proteins mit Ubiquitin, welches somit von Proteasen erkannt und der Proteolyse zugeführt wird (Hatakeyama and Nakayama, 2003). Der Spot für ENO2 ist daher nicht nur durch die Komplexbildung mit UBE2L3 massiv verändert, sondern möglicherweise ist das Protein selbst bereits durch beginnende Degradation modifiziert. ENO2 kann daher nur bedingt in die Auswertung für mögliche Assoziationen mit Suizidalität einbezogen werden.

ENO1 wurde ausschließlich bei Suizidopfern gefunden und könnte im nativen Zustand sowohl als Homodimer als auch in Form der heterodimeren neuronenspezifischen Enolase vorgelegen haben. Im zweiten Fall entspräche das vorliegende Ergebnis der Mehrzahl der Befunde zu NSE bei psychiatrischen Erkrankungen, die überwiegend eine erhöhte Expression des Enzyms beschreiben z.B. bei Schizophrenie

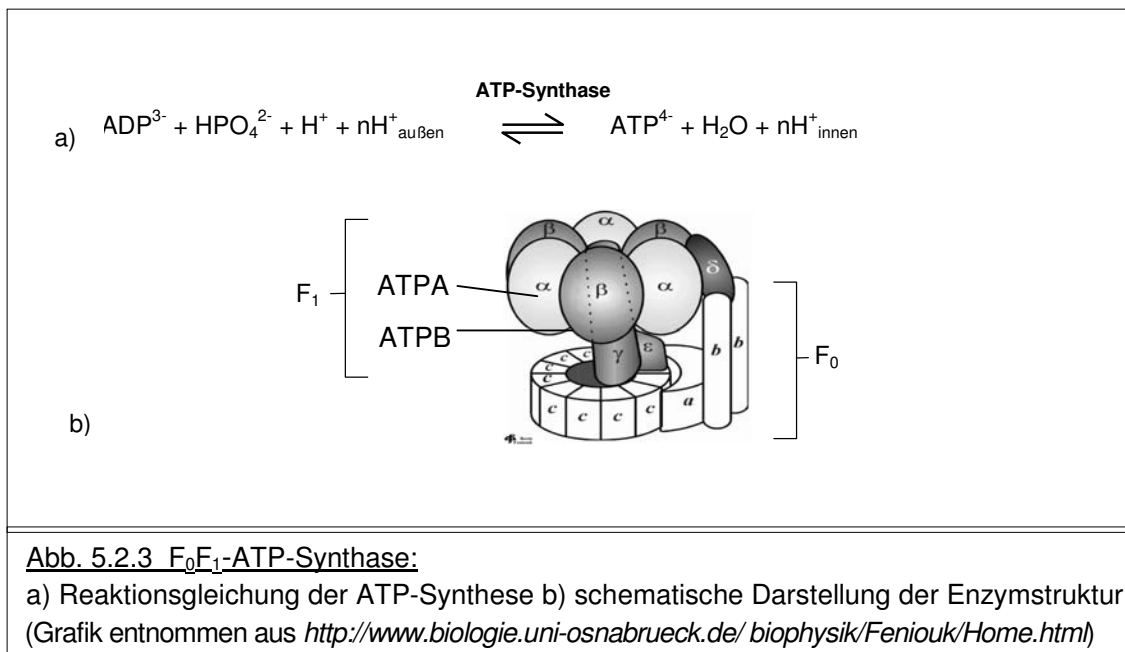
(Vermuyten et al., 1990). Es stünde allerdings im Gegensatz zu den Ergebnissen zweier post-mortem-Studien an Suizidopfern, in denen NSE weder in der Proteinexpression im Locus coeruleus (Ordway et al., 1994) noch auf RNA-Ebene in der Brodmann Areal 9 und im Hippocampus (Dwivedi et al., 2003) Unterschiede im Vergleich zu Kontrollen aufwies. Die Ursache der diskrepanten Befunde könnte auf die unterschiedliche Natur der untersuchten Hirnregionen zurückzuführen sein (Selemon, 2001). Bei neurodegenerativen Erkrankungen sind die Ergebnisse relativ inkonsistent (Pollak et al., 2003; Preobrazhenskaia et al., 2001).

Für die Möglichkeit, daß ENO1 im Thalamus als Homodimer, also in der nicht neurosenspezifischen Form vorlag, spricht unter anderem eine Studie von Zaiko et al., die das Enzym mittels Immunoassays identifizierte. Darin wurden die maximalen Konzentrationen der homodimeren ENO1-Form im Thalamus und die der NSE im Hippocampus ermittelt (Zaiko and Burbaeva, 1986). Diese Verteilung entspricht auch dem Auftreten der Isoenzyme in dieser Arbeit. Da sowohl die homodimere Enolase (Deloulme et al., 1997), als auch die einzelne Alpha-Untereinheit (Keller et al., 1994) vornehmlich in der Astroglia lokalisiert sind, könnte die vorliegende Veränderung der Proteinexpression von ENO1 ein Hinweis auf eine mögliche Implikation der Astroglia für die Entstehung suizidalen Verhaltens sein. Im Gegensatz zu NSE zeigte ENO1 sowohl bei psychiatrischen (Paulson et al., 2004; Schonberger et al., 2001) als auch bei neurodegenerativen Erkrankungen (Schonberger et al., 2001) relativ einheitlich erhöhte Expressionen. Als Ursache wurde unter anderem ein reduzierter Glukose-Metabolismus genannt, der in einer kompensatorischen Hochregulation des Enzyms resultierte (Messier and Gagnon, 1996; Huang et al., 1990). Auf der anderen Seite wurden schon 1986 Hinweise dafür gefunden, daß die Akkumulation von ENO1 neben einer verstärkten mRNA-Synthese auch einer posttranslationalen Regulation unterliegt (Forss-Petter et al., 1986). Diese Annahme wurde in den letzten Jahren unter anderem durch eine Proteomanalyse bestätigt, die in Gehirnen von Alzheimer-Patienten oxidative Veränderungen von ENO1 fand (Castegna et al., 2002). Derart modifizierte Proteine wiederum können von den meisten Proteasen nicht abgebaut werden und aggregieren infolgedessen in der Zelle (Butterfield D.A., 1997).

Demzufolge könnten sowohl die durch oxidativen Streß induzierte Proteinakkumulation als auch die Hochregulation der mRNA infolge verminderten Glukose-Umsatzes Ursache für das ausschließliche Auftreten von ENO1 im Thalamus der Suizidopfer sein.

c) F₀F₁-ATP-Synthase

Das Enzym F₀F₁-ATP-Synthase ist in der inneren Mitochondrienmembran lokalisiert und steht im Dienst der Zellatmung, deren Hauptfunktion die Bereitstellung von Energie in chemisch gebundener Form als Adenosin-Triphosphat (ATP) ist. Diese Energie entsteht, indem der in der Glykolyse gewonnene und im Citratcyclus an NAD⁺ bzw. FAD⁺ gebundene Wasserstoff auf Sauerstoff übertragen wird. Diese sehr exotherme Reaktion erfolgt durch schrittweisen Transport von Elektronen über eine Reihe von Enzymkomplexen, die Atmungskette, unter gleichzeitigem Aufbau eines Protonengradienten. Der Rückstrom der Protonen sowie der Elektronengradient werden von der am Ende der Atmungskette stehenden F₀F₁-ATP-Synthase genutzt, um schließlich die oxidative Phosphorylierung von ATP aus ADP und Phosphat zu katalysieren (Abb. 5.2.3a). Die F₀F₁-ATP-Synthase besteht aus der membranständigen F₀-Domäne, die als Protonenkanal dient, sowie der in den Matrix-Raum ragenden F₁-Domäne, welche die ATP-Synthese durchführt (Abb. 5.2.3b).



Sowohl die Alpha (ATPA)- als auch die Beta (ATPB)-Untereinheit der F₁-Domäne binden ATP bzw. ADP, aber nur ATPB ist an der eigentlichen katalytischen Aktivität des Enzyms beteiligt. Diese ATPB-Einheit wurde in der vorliegenden Proteomanalyse identifiziert.

ATPB wurde in zwei Spots mit etwa der gleichen molekularen Masse gefunden, von denen ein Spot bei den Suizidopfern um mindestens den Faktor zwei vermindert exprimiert war, bzw. vollständig fehlte. Es stellt sich die Frage nach dem Ursprung der zweiten Isoform des Enzyms. Der unterschiedliche pI der beiden Spots läßt dabei zwar an eine mögliche Phosphorylierung denken, allerdings finden sich in den MALDI-Spektren keine Belege in Form der dazu erforderlichen Massendifferenzen von exakt 80 Da. Dennoch zeigen sich auffallende Parallelen zu den Befunden einer Proteomstudie am humanen Skelettmuskel von Diabetikern des Typs 2 (Hojlund et al., 2003) wie in Abb. 5.2.4 vergleichend dargestellt. In der genannten Arbeit wurden vier Isoenzyme der ATPase identifiziert, für die jeweils eine phosphorylierte Form nachgewiesen werden konnte. Die Autoren schlossen daraus auf eine mögliche regulatorische Funktion posttranslationaler Phosphorylierungen für die katalytische Aktivität des Enzyms. Ähnlich den Befunden einer früheren Studie (Bunney et al., 2001) wurden inhibitorische Effekte dieser Modifikation vermutet. Demnach könnten auch die vorliegenden Ergebnisse auf eine reduzierte Aktivität der ATP-Synthase hindeuten.

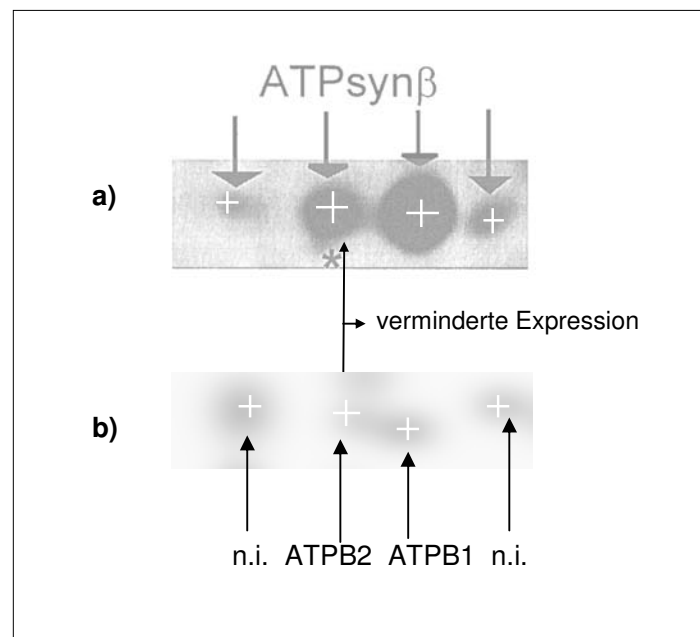


Abb. 5.2.4 Vergleich der Spot-Muster der ATP-Synthase

a) in einer Proteomanalyse humanen Muskelgewebes bei Diabetes Typ2 (Hojlund et al., 2003)

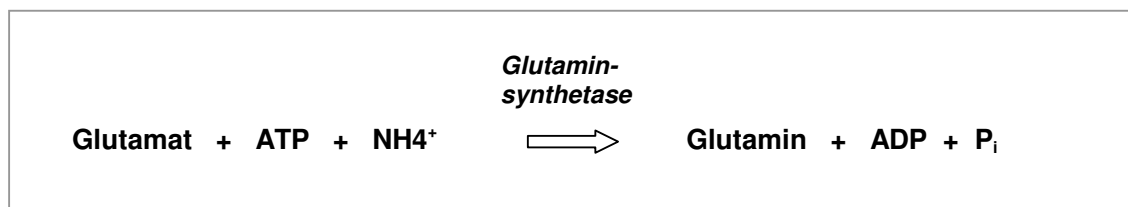
b) in den 2D-Gelelektrophoresen des Hippocampus in der vorliegenden Arbeit.

Zwei Spots in **b)** konnten nicht eindeutig identifiziert werden, bzw. wurden nicht untersucht (n.i. = nicht identifiziert). In **a)** wurden alle vier Spots als phosphorylierte Isoformen des Enzyms nachgewiesen. In beiden Arbeiten war der zweite Spot von links vermindert exprimiert.

Im Vergleich der Proteomstudie von Hojlund mit der vorliegenden zeigte sich zum einen eine ähnliche Positionierung der als ATPB identifizierten Spots in den 2D-Gelen. Zudem wurde in beiden Arbeiten eine verminderte Expression zweier sich entsprechender Spots gefunden (jeweils der zweite Spot von links). Hojlund wertete sein Ergebnis als möglichen Hinweis auf eine reduzierte Enzymaktivität. Wie beschrieben, wurde in der genannten Studie muskuläres Gewebe untersucht, doch auch in einer post-mortem-Proteomstudie an Gehirnen von Ratten als Modelle für Schizophrenie konnte eine herabregulierte Expression der ATP-Synthase in Assoziation mit der Krankheit sowohl im Cortex (Paulson et al., 2003) als auch im Thalamus (Paulson et al., 2004) nachgewiesen werden. Diese beiden Arbeiten liefern, soweit bekannt, die ersten und bisher einzigen Befunde für Veränderungen der ATP-Synthase bei psychiatrischen Störungen. Dagegen gibt es eine Reihe von Hinweisen auf eine Implikation des Enzyms für neurodegenerative Erkrankungen. Beispielsweise sind in Studien zur Alzheimer-Erkrankung reduzierte Konzentrationen der ATP-Synthase (Schagger and Ohm, 1995) sowie der RNA von ATPB (Chandrasekaran et al., 1997) belegt. Eine defizitäre Funktion der ATP-Synthase resultiert in einer verminderten Energieversorgung der Zelle in Form von ATP. Dies kann zum Absterben des Neurons beitragen und somit zum Neuronenverlust der betroffenen Hirnregion, in diesem Fall des Hippocampus, in der Gruppe der Suizidopfer führen.

d) Glutaminsynthetase (GLNS)

Das Enzym Glutaminsynthetase (GLNS) ist in einer Reihe von Organen und Geweben wie Leber, Niere, Gehirn und Muskulatur lokalisiert. Es katalysiert unter ATP-Verbrauch den Einbau von Ammonium-Ionen in Glutamat, wobei Glutamin entsteht.



Damit übernimmt die GLNS mindestens drei bedeutende Funktionen für das Zentralnervensystem: 1. Fixierung und Transport neurotoxischen Ammoniaks in Form des

nichttoxischen Glutamins (Suarez et al., 2002); 2. Umwandlung des exzitatorischen Neurotransmitters Glutamat in die neutrale Aminosäure Glutamin nach Aufnahme aus dem synaptischen Spalt zum Schutz des Neurons gegen exzitotoxische Degeneration (Ramonet et al., 2004); 3. Bereitstellung von Glutamin als Vorstufe für diverse Biosynthesen, unter anderem von Glutamat (Glutamat-Glutamin-Zyklus). Zudem ist GLNS, die im Gehirn spezifisch in Astrozyten exprimiert wird, involviert in die astrozytäre Versorgung von Neuronen mit Glukose. Wie Abb. 5.2.1 zeigt, aktiviert Glutamat den glykolytischen Kreislauf durch seine Aufnahme in die Astrogliazelle. Dadurch wird die Glukoseaufnahme aus den Kapillaren stimuliert sowie die Produktion von Laktat als Substrat für die Neuronen (Pellerin, 2003). Nach Umwandlung des Glutamats mittels GLNS in Glutamin wird dieses in das Neuron zurücktransportiert und steht für die neue Neurotransmittersynthese zur Verfügung. Auf diese Weise verbindet der Glutamat-Glutamin-Zyklus die neuronale Aktivität mit der dazu erforderlichen Glukoseversorgung über die Astroglia (Pellerin, 2004; Magistretti, 1999).

In dieser Arbeit trat in der Gruppe der Suizidopfer eine Modifikation der GLNS in der Amygdala auf, bei der es sich, wie es sich in den zugehörigen Massenspektren darstellte, vermutlich um die Oxidation von Methioninresten zu Methionin-Sulfoxid, bzw. –Sulfon handelte. In diesem Fall wäre die funktionelle Konsequenz für das modifizierte Enzym sehr wahrscheinlich eine Reduktion, wenn nicht gar ein Verlust der katalytischen Aktivität. Denn GLNS gilt als äußerst anfällig für oxidative Inaktivierung (Martin et al., 1997) und speziell Methionin-Sulfoxid kann zu einer bis zu 50%-igen Aktivitätsminderung des Enzyms führen (Haghighi and Maples, 1996). Derartige Veränderungen der GLNS wurden vielfach bei neurodegenerativen Erkrankungen beschrieben und insbesondere in Studien zur Alzheimer-Erkrankung wurden sowohl das Auftreten von Proteinoxidationen der GLNS wie auch reduzierte Enzymaktivitäten gefunden (Boyd-Kimball et al., 2005; Castegna et al., 2002). Die daraus resultierenden exzitotoxischen Effekte durch Glutamat und die Neurotoxizität durch Ammoniak tragen zur Neurodegeneration und somit vermutlich zur Pathogenese der Alzheimer-Erkrankung bei (Butterfield, 2002; Robinson, 2001). Zu den wenigen Befunden für GLNS im Zusammenhang mit psychiatrischen Störungen zählt der Befund einer erhöhten GLNS-mRNA-Expression im Thalamus schizophrener Patienten als Beleg für die Glutamat-Hypothese der Schizophrenie (Bruneau et al., 2005). Es sind bislang keine Untersuchungen der GLNS im Zusammenhang mit Suizidalität bekannt, die vorliegenden Ergebnisse könnten jedoch auf eine verminderte Aktivität des Enzyms bei den Suizidopfern schließen lassen.

e) Galektin-1 (LEG1)

Galektin-1 (LEG1) ist im Organismus in verschiedenen Organen und Muskelgeweben lokalisiert und ist sowohl intra- als auch extrazellulär aktiv (Hsu and Liu, 2004). LEG1 zählt zur Familie der β -Galaktosid-bindenden-Lektine, deren Charakterisierung historisch anhand ihrer kohlenhydratbindenden Eigenschaften erfolgte. Eine große Vielzahl membrangebundener Oligosaccharide kann für LEG1 als Liganden dienen, was sich in der multifunktionellen Wirkungsweise des Proteins widerspiegelt (Ford et al., 2003). LEG1 ist unter anderem in Prozesse wie Zellwachstum und –Differenzierung sowie die Induktion der Zell-Apoptose involviert (Hsu and Liu, 2004).

In dieser Arbeit war LEG1 im Thalamus der Suizidopfer mindestens doppelt so stark exprimiert wie bei den Kontrollen. Eine Recherche von Vorbefunden zeigt, daß das Protein zwar häufig in Proteomanalysen von humanem Hirngewebe identifiziert wurde (Lubec et al., 2003; Langen et al., 1999), daß aber relativ wenig Informationen über seine spezifische Funktion im Gehirn vorliegen und daß es nur sehr vereinzelt in Studien zu psychiatrischen Erkrankungen erwähnt wird. Gut belegt ist dagegen, daß LEG1-mRNA in geschädigten Neuronen verstärkt exprimiert wird (Akazawa et al., 2004) und daß LEG1 in der oxidierten Form deren Regeneration unterstützt (Kadoya et al., 2005). Da auch die vorliegenden Ergebnisse eine erhöhte Expression des Proteins aufweisen, könnte dies ein Hinweis sein für vorangegangene oder noch bestehende Nervenzellschädigungen oder neurodegenerative Prozesse, in diesem Fall im Thalamus der Suizidopfer.

f) Neuropolypeptid h3 (= phosphatidylethanolamine-binding-protein) (PEBP)

Das Neuropolypeptid h3 (PEBP) war im Hippocampus in der Gruppe der Suizidopfer um einen Faktor von mindestens 1,5 schwächer exprimiert als bei den Kontrollen. PEBP ist ein zytoplasmatisches Protein, das in verschiedenen Organen, unter anderem im Gehirn und dort insbesondere in den Oligodendrozyten lokalisiert ist. Die Anzahl von mindestens sechs Synonymen für das Protein korreliert mit der Vielzahl seiner Funktionen, von denen hier nur die zwei für diese Arbeit wichtigen genannt werden.

Eine der Bezeichnungen für PEBP lautet 'Hippocampal cholinergic neurostimulating peptide precursor protein (HCNP-pp)', dessen erste elf N-terminalen Aminosäuren

nach Abspaltung das im Hippocampus identifizierte Peptid HCNP bilden. Die Funktion des Peptids ist die Stimulation der Cholin-Acetyltransferase, dem Schlüsselenzym für die Synthese des Neurotransmitters Acetylcholin. Die Herabregulation von HCNP-pp (PEBP), wie hier in der Gruppe der Suizidopfer, könnte somit in einer verminderten cholinergen Transmission resultieren. Ein weiteres Synonym für dieses Protein ist 'phosphatidylethanolamine binding protein (PEBP)'. Phosphatidylethanolamin ist ein Phospholipid, das als Bestandteil der Zellmembran von Bedeutung ist für die Aufrechterhaltung der Integrität der Membran. In der Myelinschicht von Neuronen wird die Organisation der Phospholipide insbesondere von PEBP übernommen (Moore et al., 1996). Somit könnte eine verminderte Expression des Proteins, wie sie in dieser Arbeit gefunden wurde, die Funktionsfähigkeit der Nervenzellen wesentlich beeinträchtigen. Es wurde bislang kein Zusammenhang zwischen PEBP oder Phosphatidylethanolamin und Suizidalität beschrieben, wohl aber wurden reduzierte Konzentrationen des Phospholipids bei psychiatrischen (Schmitt et al., 2001) und neurodegenerativen (Pettegrew et al., 2001) Erkrankungen gefunden.

5.2.1.2 Proteine des Intermediärstoffwechsels : Zusammenfassung und mögliche Implikation für die Pathophysiologie suizidalen Verhaltens

In der Gruppe der Proteine, die eine Rolle im Intermediärmetabolismus spielen, wiesen in den Hirnregionen Thalamus, Hippocampus und Amygdala insgesamt sieben Proteine deutliche Expressionsunterschiede zwischen Suizidopfern und Kontrollen auf. Es liegen bislang nahezu keine Vorbefunde zu den einzelnen Proteinen im Zusammenhang mit Suizidalität vor. Daher wurden ihre jeweiligen neurobiologischen Funktionen aufgezeigt, um Hinweise für mögliche gemeinsame Mechanismen zu finden, die in die Pathophysiologie suizidalen Verhaltens involviert sein könnten.

a) Glukose- und Energiestoffwechsel

Es stellte sich heraus, daß fünf der Proteine Enzyme waren, die direkt (ENO1, ENO2, ALDC, ATPB) oder indirekt (GLNS) am Glukose- und Energiestoffwechsel der Zelle beteiligt sind. Abb. 5.2.1 stellt die Glukoseversorgung eines Neurons sowohl durch direkte Aufnahme aus der Kapillare wie auch über Astrozyten nach Abbau der Glukose zu Laktat dar. Die Abbildung dient der Übersicht und Lokalisation dieser Proteine im Stoffwechselgeschehen, nicht zum Aufzeigen direkter Interaktionen, da die Proteine in unterschiedlichen Hirnregionen identifiziert wurden. In der Gruppe der Suizidopfer gab es für alle fünf Enzyme Hinweise auf reduzierte oder gar fehlende Aktivitäten, bedingt durch proteolytischen Abbau oder oxidative Modifikationen. Die Folgen für die betroffenen Nervenzellen wären eine Verminderung des aeroben glykolytischen Glukoseabbaus (ENO1, ENO2, ALDC, GLNS), eine reduzierte Synthese von ATP (ATPB) und somit eine Minderversorgung der Zelle mit Energie. Dieser quasi hypoglykämische Zustand kann zahlreiche Zellfunktionen beeinträchtigen und schließlich zur Degeneration des Neurons führen (Auer and Siesjo, 1993). Da die Energieversorgung des Gehirns nahezu ausschließlich auf den Abbau von Glukose angewiesen ist, gibt der Glukosestoffwechsel Informationen über die Intaktheit regionaler Hirnfunktionen (Grafton, 2000) und könnte daher bei den Suizidopfern auf eine verminderte neuronale Aktivität im Thalamus, Hippocampus und in der Amygdala hindeuten.

Die in Form von ATP gewonnene Energie wird in Neuronen unter anderem zur Neurotransmittersynthese genutzt, die daher in den jeweiligen Hirnregionen der Suizidopfer vermindert sein könnte. Dies wird in den bislang existierenden Studien zwar nicht durch ein generelles suizidassoziiertes Defizit von Neurotransmittern bestätigt, da die Befunde sehr inkonsistent sind, wohl aber gilt ein Mangel an Serotonin im Gehirn und Liquor von Suizidopfern als weitgehend erwiesen (Arango et al., 2002). Dabei können die Komponenten des serotonergen Systems sowohl durch zerebrale Hypoglykämie beeinträchtigt werden, als auch ihrerseits den Glukosestoffwechsel beeinflussen, z.B. über 5HT-2C-Rezeptoren (Giorgetti and Tecott, 2004). Diesbezüglich existieren weniger Befunde zur Suizidalität direkt, als vielmehr zu intermittierenden Faktoren wie Aggressivität (Virkkunen and Linnoila, 1990), Impulsivität (Goethals et al., 2005) und gewalttätigem Verhalten (George et al., 2004).

b) sonstige Ergebnisse

Neben der Annahme eines reduzierten Energiestoffwechsels gibt es Hinweise auf mögliche exzitotoxische und neurotoxische Effekte in der Amygdala. Ursache ist die möglicherweise reduzierte Aktivität der Glutaminsynthetase mit konsekutivem Überschuß des exzitatorischen Neurotransmitters Glutamat und des toxischen Ammoniaks (s.Abb. 5.2.1). Die dadurch entstehenden neuronalen Schäden könnten ebenfalls durch einen verminderten Glukosemetabolismus verstärkt werden, da mehrfach gezeigt wurde, daß dieser die Vulnerabilität von Neuronen gegenüber Exzitotoxizität erhöht (Ikonomidou and Turski, 1995). Einige Studien, die die glutamaterge Neurotransmission bei Suizidopfern untersuchten, fanden eine verminderte Dichte an NMDA-Rezeptoren, was ebenfalls auf erhöhte Glutamatkonzentrationen hinwies (Nudmamud-Thanoi and Reynolds, 2004; Petrie et al., 2000).

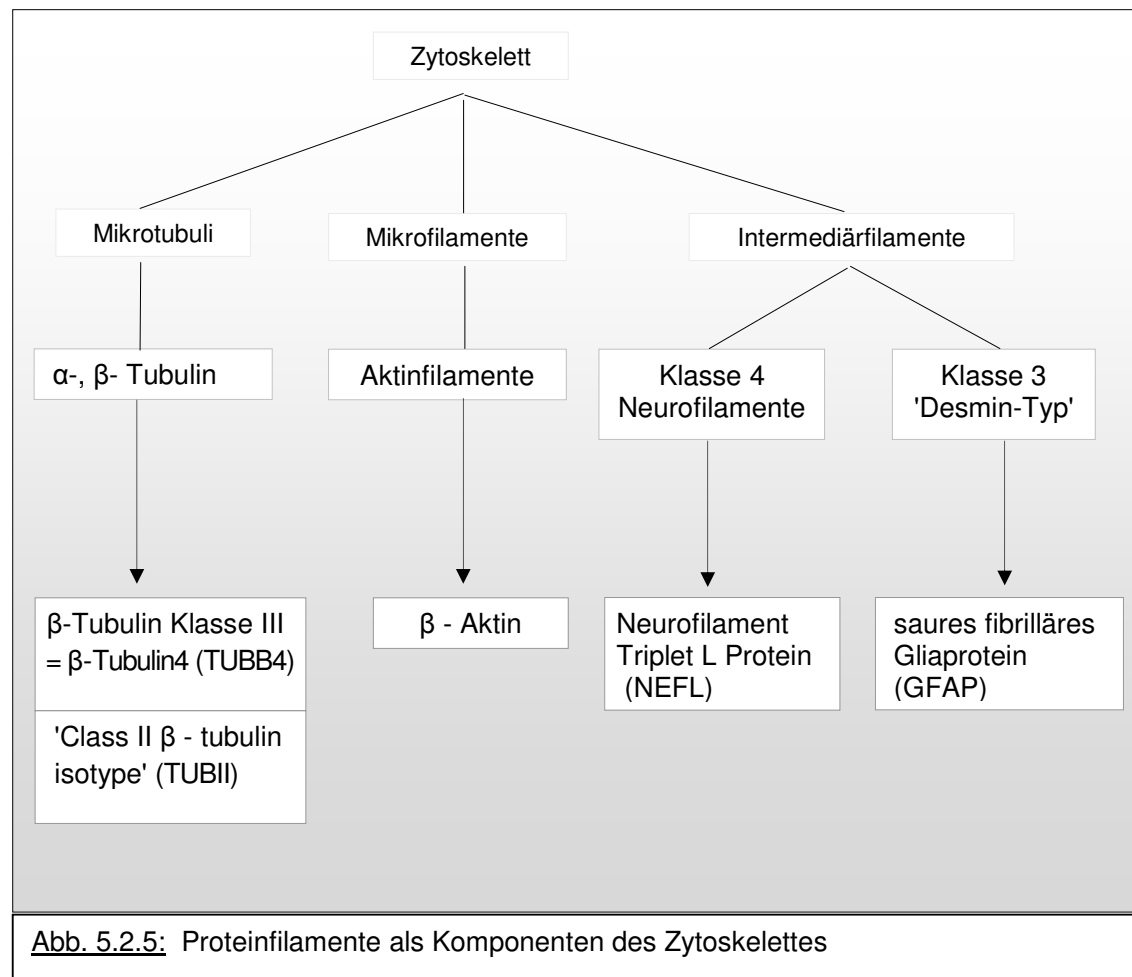
Weiterhin könnte die Herabregulation von PEBP im Hippocampus der Suizidopfer in einer verminderten cholinergen Transmission resultieren. Dieses Ergebnis widerspricht allerdings zwei Bindungsstudien an cholinergen Rezeptoren in Cortices von Suizidopfern, die verminderte (Katerina et al., 2004) oder unveränderte (Gonzalez-Maeso et al., 2002) Rezeptordichten beschrieben.

c) Glia

Unter den sieben Proteinen dieser Gruppe werden zwei vornehmlich (ENO1) bzw. ausschließlich (GLNS) in Astrozyten exprimiert und ein Protein (PEBP) ist überwiegend in Oligodendrozyten lokalisiert. Die Astroglia spielt, wie Abb. 5.2.1 zeigt, eine entscheidende Rolle für die Glukose- bzw. Laktat-Versorgung von Neuronen sowie für deren Prävention gegen exitotoxische Konzentrationen an Glutamat und gegen neurotoxisches Ammoniak. Beide Substanzen werden mittels der astrozytenspezifischen GLNS in nicht-toxische Formen umgewandelt. Zudem dient die Astroglia auch der Versorgung der Oligodendrozyten mit Laktat. Auf diese Weise ist sie auch von Relevanz für die Myelinisierung der Neuronen und somit für die Aufrechterhaltung der Integrität ihrer Funktion. Es liegt daher die Vermutung nahe, daß neben den neuronalen auch die gliären Zellen in die pathophysiologischen Mechanismen der Suizidalität involviert sind. Dies würde die zunehmende Zahl von Befunden bestätigen, die eine größere Bedeutung der Glia für die biologische Psychiatrie postulieren als bislang angenommen.

5.2.2 Proteine des Zytoskelettes

Das Zytoskelett stellt ein komplexes Netzwerk von Proteinfilamenten dar, das unter anderem die Architektur des Zytoplasmas aufrecht erhält und dadurch die Zellform maßgeblich bestimmt. Zudem ermöglichen sie den intrazellulären Transport verschiedenster Moleküle, zu denen bei neuronalen Zellen unter anderem Neurotransmitter und –rezeptoren zählen. Bei Neuronen ist das Zytoskelett insbesondere auch am axonalen Wachstum beteiligt. Die zytoskelettalen Proteine unterscheiden sich in ihrem Aufbau und ihrer Funktion und umfassen hauptsächlich drei Klassen: Mikrofilamente, Mikrotubuli und Intermediärfilamente. In dieser Arbeit wurden Vertreter aller drei Klassen identifiziert:



5.2.2.1 Mögliche neurobiologische Folgen der Expressionsunterschiede

a) Beta-Tubulin

Die Beta-Einheiten des Tubulins bilden mit Alpha-Tubulin unter Hydrolyse von je einem GTP-(Guanosin 5'-triphosphat-)-Molekül Heterodimere. Aus diesen polymerisieren Protofilamente, von denen sich je 13 zu einem Mikrotubulus zusammenfügen. Mikrotubuli fungieren quasi als 'Schienen' für den Vesikeltransport in der Zelle, sind als Komponenten der mitotischen Spindel für die Koordination der Verteilung der Chromosomen während der Mitose verantwortlich und sind maßgeblich am axonalen Wachstum des Neurons beteiligt (Asai and Remolona, 1989; Hoffman, 1988).

Beta Tubulin wurde in den beiden neuronenspezifischen Isoformen Beta Tubulin (TUBB4) und Beta Tubulin II (tubulin beta class II isotype) (TUBII) detektiert, die beide insbesondere in den Axonen von Nervenzellen lokalisiert sind (Hoffman et al., 1992). An den TUBB4-Spot grenzte ein zweiter höhermolekularer Spot, der bei den Suizidopfern eine um mindestens Faktor 1,5 geringere Intensität hatte als bei den Kontrollen. Die Massenspektren des zweiten Spots wiesen einen nicht zu Tubulin gehörenden Peak auf, der als Häm identifiziert wurde, sowie ein zusätzliches Peptid, das zur Sequenz der Porphobilinogen Deaminase zählt, einem Enzym, das an der Biosynthese des Häms beteiligt ist. Die Summe der Massen beider Moleküle entspricht in etwa der Massendifferenz des höhermolekularen TUBII-Spots. Da Häm die prosthetische Gruppe des Hämoglobins darstellt, könnte bei diesem Spot eine Verunreinigung mit Blut, also ein Artefakt vorliegen. Festzustellen ist aber unabhängig davon, daß es bei beiden TUBB4-Spots Anzeichen von proteolytischem Abbau zu geben schien, der bei den Suizidopfern weiter fortgeschritten war als bei den Kontrollen. Dies gibt für den TUBII-Spot, der bei den Suizidenten mindestens 2-fach geringere Intensitäten aufwies, Grund zu der Annahme, daß dieses Protein nicht schwächer exprimiert wurde, sondern daß es einer zum Teil vollständigen Proteolyse unterlag.

Da Tubulin als sehr instabiles Protein gilt (Fountoulakis et al., 2001), lassen sich die Ursachen für die Tubulin-Verminderung an dieser Stelle nicht bestimmen, während die Konsequenz dagegen sehr wahrscheinlich die Destabilisierung von Mikrotubuli ist (Nogales, 1999). Diese wiederum kann in verminderter Neurotransmission resultieren, wie es zum Beispiel bei psychiatrischen Erkrankungen beschrieben wurde (Benitez-King et al., 2004; Andrieux et al., 2004), oder kann zum Zusammenbruch des neuronalen Zytoskelettes und somit zum Absterben der Zelle führen, was inbe-

sondere für die Pathophysiologie der Alzheimer Erkrankung von Bedeutung ist (Feinstein and Wilson, 2005).

b) Beta-Aktin (ACTB)

Aktinfilamente sind die kleinsten Elemente des Zytoskelettes und bilden netzartige Strukturen aus. Neben ihrer Stützfunktion stellen sie die Basis für Bewegungen in allen eukaryontischen Zellen dar und spielen eine wichtige Rolle bei der Zellteilung und der Muskelkontraktion. Die Mikrofilamente entstehen durch Polymerisation von globulärem Aktin unter Hydrolyse von ATP.

In dieser Arbeit wurden ACTB-Fragmente ausschließlich im Liquor von Suizidopfern identifiziert. In diesem Probenmaterial war Aktin aufgrund der in Kapitel 5.1 erwähnten methodischen Schwierigkeiten das einzige Protein, das valide Ergebnisse für Expressionsunterschiede zwischen Suizidenten und Kontrollen aufwies. Erhöhte Aktin-Konzentrationen wurden im Liquor von Patienten mit Multiple Sklerose gefunden und gelten als ein Marker für die Zerstörung von Axonen (Semra et al., 2002). Im Gehirn wurde die Fragmentierung von Aktin durch Proteolyse infolge exzitotoxischer Effekte detektiert, was ebenfalls das Vorkommen von Aktinfragmenten im Liquor erklären könnte (Tomioka et al., 2002).

c) Neurofilament Triplet L Protein (NEFL)

Neurofilamente zählen zu einer der fünf Klassen der Intermediärfilamente und stellen eine der Hauptkomponenten des neuronalen Zytoskelettes dar. Diese Filamente werden spezifisch in Neuronen exprimiert (Portier, 1992) und dienen neben der Stabilisierung der Zelle auch dem intrazellulären Stofftransport sowie dem radialen Wachstum des Axons, das den axonalen Durchmesser und somit die Leitungsgeschwindigkeit des Neurons bestimmt (Kesavapany et al., 2003). Es sind drei verschiedene Neurofilament-Polypeptide bekannt, die nach ihren molekularen Massen klassifiziert werden: 68 kDa (NEFL), 160 kDa (NF-M) und 200 kDa (NF-H). Neurofilamente sind obligate Heteropolymere, da NF-M und NF-H ohne NEFL nicht in der Lage sind, sich zu Filamenten zusammenzufügen (Carter et al., 1998). Deren normale Funktionalität wird in erheblichem Ausmaß durch Phosphorylierungs- und Dephosphorylierungs-Reaktionen reguliert (Grant and Pant, 2000), während Hy-

perphosphorylierung zur pathologischen Akkumulation von Neurofilamenten führt, wie sie bei verschiedenen neurodegenerativen Erkrankungen beobachtet wurden (Kesavapany et al., 2003).

In der vorliegenden Proteomstudie wurde NEFL (Neurofilament Triplet L Protein) in der Amygdala identifiziert und wies in dieser Hirnregion bei den Suizidopfern eine höchstens halb so hohe Spot-Intensität auf wie bei den Kontrollen. Dieser Befund kann mehrere Ursachen haben: 1. könnte die Expression von NEFL herabreguliert sein, wie es z.B. in Gehirnen von Alzheimer-Patienten gefunden wurde (Kittur et al., 1994); 2. war NEFL möglicherweise von proteolytischem Abbau vor allem durch die Protease Calpain betroffen, wie es insbesondere bei der oxidierten Form von NEFL gefunden wurde (Troncoso et al., 1995); 3. könnte auch eine Glutamat-induzierte Exzitotoxizität zur Degradation des Neurofilamentes beigetragen haben (Chung et al., 2005). In dieser Arbeit spricht für diese dritte Möglichkeit unter anderem der Hinweis auf eine erhöhte synaptische Glutamat-Konzentration, bedingt durch eine möglicherweise reduzierte Aktivität der Glutamin-Synthetase, wie sie ebenfalls in der Amygdala gefunden wurde (Kap. 5.2.1.1).

d) Saures fibrilläres Gliaprotein (glial fibrillary acidic protein) (GFAP)

Das saure fibrilläre Gliaprotein (GFAP) bildet Proteinmonomere, die zu Intermediärfilamenten der Klasse 3 polymerisieren, welche ausschließlich in Astrozyten exprimiert werden. GFAP ist von Bedeutung für die strukturelle Stabilität, die Form und die Motilität der Astrozyten und ist zudem beteiligt an der Aufrechterhaltung der Myelinisierung der Neuronen (Eng et al., 2000; Liedtke et al., 1996). Das Protein findet in der Forschung weithin Verwendung als Marker für die Astroglia und insbesondere auch für die reaktive Astroglia, da die Expression von GFAP in aktivierten Astrozyten stark erhöht ist (Eng et al., 2000; Jacque, 1991).

In dieser Arbeit wurden in den präfrontalen Cortices der Suizidopfer drei Spots und in denen der Kontrollen zwei Spots als GFAP identifiziert. Bei etwa gleichen molekularen Massen wiesen die Spots unterschiedliche pI's auf. Dabei lag der bei den Suizidopfern zusätzlich erscheinende Spot am weitesten im sauren Bereich. Dieses kettenförmige Auftreten verschiedener Isoformen wurde auch in anderen Proteomstudien beschrieben und wurde zumeist auf den Einfluß posttranslationaler Modifikationen zurückgeführt. Zu denjenigen chemischen Veränderungen, die eben-

falls eine Erniedrigung des pI's bewirken, zählen Azetylierung und Glykosylierung sowie die Phosphorylierung zu den häufigsten Modifikationen (Inagaki et al., 1990). Die einer Phosphatgruppe entsprechende Massendifferenz von 80 Da konnte in dem Massenspektrum zwar nicht gefunden werden, allerdings erschien ein nicht identifizierter Peak, der auf die Bindung einer GTP- (Guanosin-5'-triphosphat-) Gruppe hinwies. Für dieses Nukleotid wiederum wurde eine stimulierende Wirkung für die Phosphorylierung von GFAP beschrieben (Kosako et al., 1997). Zudem wies der zusätzliche dritte Spot neben dem erniedrigten pI auch die typische leichte Verminderung des Molekulargewichtes auf, mit dem die Anlagerung einer Phosphatgruppe einhergeht. Daher könnte es sich bei diesem Spot dennoch um die phosphorylierte Form von GFAP handeln. Eine biologische Bedeutung kommt den Phosphorylierungs- / Dephosphorylierungs-Reaktionen bei der Umstrukturierung der Filamente während der Mitose zu (Matsuoka et al., 1992). Da eine Phosphorylierung zur Auflösung dieser Intermediärfilamente führt (Nakamura et al., 1992), könnte die zusätzliche GFAP-Isoform in den Cortices der Suizidopfer auf eine Instabilisierung der Filamentstruktur in dieser Gruppe hinweisen.

Während die Expressionsrate des Gesamtproteins relativ häufig bei psychiatrischen und neurodegenerativen Erkrankungen beschrieben wurde, liegen nur wenige Befunde für die Phosphorylierung von GFAP im Zusammenhang mit diesen Erkrankungen vor. Zu diesen Studien zählt eine Proteomanalyse der frontalen Cortices von 89 Patienten mit Schizophrenie, Depression oder bipolarer Störung, in der vier der GFAP-Isoformen bei jeweils mindestens einer dieser Erkrankungen verminderte Intensitäten aufwiesen (Johnston-Wilson et al., 2000). Ähnlich wurde in einer darauffolgenden immunohistochemischen Studie an präfrontalen Cortices schizophrener und depressiver Patienten ein geringerer Phosphorylierungsgrad gefunden als bei gesunden Kontrollen (Webster et al., 2001). Die Diskrepanz zwischen diesen Befunden und den vorliegenden Ergebnissen für Suizidopfer könnte die Hypothese bestätigen, daß für Suizidalität eigenständige, von psychiatrischen Störungen unabhängige Komponenten existieren.

5.2.2.2 Proteine des Zytoskelettes. Zusammenfassung und mögliche Implikation für die Pathophysiologie suizidalen Verhaltens

Insgesamt fünf Proteine des Zytoskelettes wiesen signifikante Expressionsunterschiede zwischen Suizidopfern und Kontrollen auf. Eine entsprechende Literaturrecherche ergab keine Vorbefunde für eine direkte Assoziation zwischen Suizidalität und Defekten des Zytoskelettes.

a) Amygdala

In der Amygdala zeigten drei Proteine (Neurofilament Triplet L Protein und zwei Isoformen des Tubulins) bei den Suizidenten Anzeichen für Degradationsprozesse z.B. durch proteolytischen Abbau. Eine der gravierenden Folgen dysfunktionaler Zytoskelettproteine ist die Störung des intrazellulären Stofftransportes, unter anderem von Neurotransmittern und -rezeptoren. Dies kann zu Verminderungen der Neurotransmission und der synaptischen Plastizität führen (Benitez-King et al., 2004; Andrieux et al., 2004). Zudem kommt es zu einer strukturellen Destabilisierung des Zytoskelettes, und beides kann letztendlich in der Degeneration des Neurons resultieren.

Wie in Abschnitt 5.2.1 beschrieben, waren in der Amygdala auch Hinweise auf zelluläre Unterversorgung mit Energie sowie auf Glutamat-induzierte Exzitotoxizität gefunden worden. Beides könnte zu den beobachteten Veränderungen der drei genannten Proteine beigetragen haben (Chung et al., 2005; Dutta et al., 2002). Insgesamt lassen diese Ergebnisse vermuten, daß in der Amygdala suizidaler Personen keine intakte Funktionalität mehr gegeben ist. Die Amygdala ist maßgeblich beteiligt an der Verarbeitung von Emotionen und an der Aktivierung affektiver Zustände. Daher sind Menschen mit Defiziten in dieser Hirnregion möglicherweise außerstande, emotionalen Streß angemessen zu bewältigen, so daß ihnen die Suizidhandlung der einzige Ausweg zu sein scheint (Antai-Otong, 2003).

b) Astroglia

Das Intermediärfilament GFAP, ein Biomarker für Astrozyten, zeigte in den präfrontalen Cortices der Suizidopfer eine Modifikation, bei der es sich um eine Phosphorylierung oder evtl. auch um eine andere posttranslationale Veränderung handeln könnte.

Es sind weder die genauen neurobiologischen Mechanismen, noch die Konsequenzen dieser Modifikation für die Funktionalität der betroffenen Hirnregion bekannt. Dennoch gibt dieses Ergebnis, neben den Befunden zu den Proteinen des Intermediärmetabolismus', einen weiteren Hinweis auf eine mögliche Implikation der Astroglia für die Entstehung suizidalen Verhaltens.

c) Liquor

Im Liquor wurde ausschließlich in der Gruppe der Suizidenten ein Fragment des Mikrofilamentes Beta-Aktin identifiziert. Das Vorkommen erhöhter Konzentrationen zytoskelettaler Proteine, wie unter anderem auch Aktin, wurde mehrfach in Verbindung mit zerstörten Axonen gefunden und wurde als mögliche Marker für neurodegenerative Erkrankungen diskutiert (Semra et al., 2002).

5.2.3 Antioxidationsproteine

5.2.3.1 Oxidativer Stress

Unter freien Radikalen versteht man Atome oder Moleküle, die durch ein oder mehrere ungepaarte Elektronen auf der äußeren Schale charakterisiert sind, und somit äußerst reaktive, instabile Verbindungen darstellen. Freie Radikale greifen daher schnell Zellbestandteile an und schädigen Makromoleküle wie Proteine, Lipide und Nukleinsäuren zum Teil irreversibel (Djordjevic, 2004). Im Zentrum stehen dabei reaktive Sauerstoffverbindungen ('reactive oxygen species', 'ROS') wie Superoxidanionen-Radikale ($O_2^{\bullet-}$) und Hydroxyl-Radikale ($^{\bullet}OH$) und auch Stickstoff-basierte Oxidantien wie Peroxynitrit ($ONOO^-$). ROS werden im Organismus sowohl unter physiologischen als auch unter pathologischen Bedingungen gebildet und entstehen überwiegend als Nebenprodukte der mitochondrialen Atmungskette, aber auch bei der Aktivierung von Immunzellen und durch zahlreiche exogene Faktoren (Kang and Hamasaki, 2003; Gougerot-Podicalo et al., 1996; Savoure, 1993). Kommt es zu einem Ungleichgewicht zwischen Auf- und Abbau von ROS in Richtung ROS-Produktion, so entsteht oxidativer Streß für die Zelle.

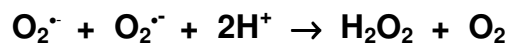
Das Gehirn ist in besonderem Maße empfindlich gegenüber oxidativem Streß. Dies ist darauf zurückzuführen, daß ein sehr hoher Sauerstoffverbrauch und eine hohe metabolische Aktivität einem relativ gering ausgeprägten Antioxidationssystem gegenüberstehen (Rokyta et al., 1996). Bei Proteinen kann oxidativer Streß über die Modifikation von Aminosäuren zur Bildung von Aggregaten führen, die nicht abgebaut werden können und infolgedessen in der Zelle akkumulieren (siehe auch Kap. 5.2.1.1). Die Schädigung von Membranlipiden kann zur Zerstörung von Zellmembranen führen (Remita, 2001). Beides kann letztendlich das Absterben von Neuronen und Gliazellen bewirken, wie es unter anderem häufig bei neurodegenerativen Erkrankungen beschrieben wurde (Grune et al., 2004; Kitamura et al., 1999). Daher ist die antioxidative Protektion des Gehirns von großer Bedeutung.

In dieser Arbeit wurden zwei Antioxidationsproteine identifiziert: Die Mangan-Superoxid-Dismutase im präfrontalen Cortex und Peroxiredoxin 2 im Hippocampus.

5.2.3.2 Expressionsunterschiede in zwei Proteinen

a) Mangan-Superoxid-Dismutase (SOD2)

Die Superoxid-Dismutase stellt die erste Barriere in der Abwehr des Superoxidanion-Radikals ($O_2^{\bullet-}$) dar und katalysiert dessen Umsetzung zu Wasserstoffperoxid (H_2O_2):

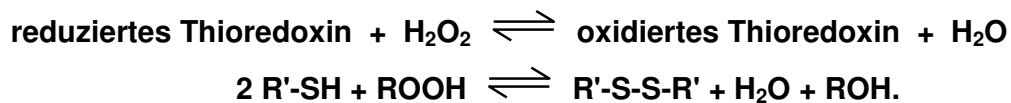


SOD2 stellt die mitochondriale Isoform des Enzyms dar mit einem Molekulargewicht von 23 kD. In der Gruppe der Suizidopfer wurde eng angrenzend an den SOD2-Spot ein zweiter Spot mit etwas höherer molekularer Masse detektiert. Bei diesem könnte es sich um die 23,77 kD große Isoform 'SOD2-Fragment' (MSDB Access-Nr. Q7Z7M4) handeln. Plausibel ist aber auch die Möglichkeit, daß das höhermolekulare Protein durch Spaltung von Disulfidbrücken infolge der reduktiven Bedingungen während der SDS-PAGE entstanden ist. Dadurch hätte sich die Peptidkette gestreckt und sein Laufverhalten im Gel hätte sich dahingehend verändert, daß es oberhalb des Ausgangsproteins liegengeblieben wäre. Diese Vermutung entspricht auch ei-

nem Befund einer SDS-PAGE von Matsuda et al. (Matsuda et al., 1990). Aber auch in diesem Fall von methodisch bedingten Veränderungen bleibt die Frage, warum SOD2 nur bei den Suizidopfern betroffen war. Eine mögliche Erklärung wäre, daß das Protein bereits vorgeschädigt war und infolgedessen eine höhere Suszeptibilität für chemische Modifikationen hatte. Möglicherweise war das Enzym daher schon in vivo nicht voll funktionsfähig. Vergleichbare Befunde zu SOD2 gibt es im Bereich der biologischen Psychiatrie nicht. Dagegen wurden veränderte Expressions-Niveaus des Enzyms sowohl bei neurodegenerativen (De Leo et al., 1998) als auch bei psychiatrischen (Ranjekar et al., 2003) Erkrankungen nachgewiesen.

b) Peroxiredoxin 2 (Thioredoxin-Peroxidasen) (PRDX2)

Das durch die Superoxid-Dismutase generierte Hydrogenperoxid (H_2O_2) zählt ebenfalls zu den ROS's. H_2O_2 ist ein nicht-radikales O_2 -Derivat, das aber ebenfalls zellschädigend wirkt und daher ebenfalls der Kontrolle des Antioxidationsystems unterliegt. Zu den Enzymen, die hierfür zuständig sind, gehört die Familie der Peroxiredoxine, die neben H_2O_2 ein breites Spektrum an Peroxiden (Lipidhydroperoxide, Peroxinitrit u.a.) reduktiv entgiften. Als Elektronendonator dient dabei Thioredoxin:



Die im Zytosol lokalisierte Isoform Peroxiredoxin2 (PRDX2), die in dieser Arbeit identifiziert wurde, wies im Hippocampus der Suizidopfer eine mindestens 1,5-fach höhere Expression auf als bei den Kontrollen. Dieser Befund stimmt überein mit den Ergebnissen zweier Proteomstudien an Gehirnen von Patienten mit neurodegenerativen (Morbus Pick, Morbus Alzheimer) oder mit neurodegeneration-assoziierten Erkrankungen (Down's Syndrom) (Krapfenbauer et al., 2003; Kim et al., 2001b). Hier wurde die Hochregulation von PRDX2 als kompensatorische Antwort auf den Angriff von ROS gewertet. Ebenso könnte auch die vorliegende Expressionserhöhung von PRDX2 eine Reaktion auf ein vermehrtes Auftreten oxidativen Stresses sein.

5.2.3.3 Proteine des Zytoskelettes: Zusammenfassung und mögliche Implikation für die Pathophysiologie suizidalen Verhaltens

Während die Ergebnisse für SOD2 nur sehr spekulativ eine neurobiologische Bedeutung vermuten lassen, scheint die verstärkte Expression von PRDX2 plausibel auf erhöhten oxidativen Stress in den Gehirnen der Suizidopfer hinzudeuten. Dies wäre eine Bestätigung der bereits zuvor beschriebenen Anzeichen auf oxidative Schäden an Proteinen in der Gruppe der Suizidenten (s. Kap.5.2.1 und 5.2.2). Auf eine mögliche Implikation von oxidativem Streß für die Pathophysiologie der Suizidalität wird im letzten Abschnitt der Diskussion näher eingegangen.

5.2.4 Hitzeschockproteine

Hitzeschockproteine (heat shock proteins, Hsp's) zählen zur Gruppe der Streßproteine, die beim Auftreten von Streßbedingungen zum Schutz der Zelle verstärkt aktiviert werden. Als mögliche Stressoren gelten Hitze, Kälte, Schwermetalle, UV-Licht, Trockenheit, Salzkonzentrationen, pH-Wert-Veränderungen und oxidativer Stress. Hsp's fungieren als Chaperone (Hilfsproteine), d.h. sie unterstützen Polypeptidketten bei der korrekten Faltung während der Biosynthese. Unter Streßbedingungen tragen sie zur Vermeidung von Proteindenaturierung und -aggregation bei, indem sie an Polypeptidketten binden und durch diese Komplexbildung eine bereits begonnene Denaturierung stoppen. Auch die Wiederherstellung von geschädigten Proteinen wird somit ermöglicht (Rokutan et al., 1998).

5.2.4.1 Alpha Crystallin B (CRYAB)

Alpha Crystalline stellen eine der Hauptkomponenten der Augenlinse dar und fungieren darüber hinaus auch als Hsp's. Während die Untereinheit A ausschließlich in der Augenlinse exprimiert wird, kommt Alpha Crystallin B (CRYAB) zudem in anderen Organen wie dem Gehirn vor. Mit einer Größe von 20kD zählt CRYAB zu den niedermolekularen Hsp's (small Hsp's, sHsp's), die zwischen 15-30 kD liegen (Ito et al., 2003). In dieser Arbeit wurde CRYAB ausschließlich in präfrontalen Cortices von Suizidopfern identifiziert. In derselben Hirnregion und ebenfalls nur in der Gruppe der Suizidenten wur-

de auch GFAP, ein Marker für aktivierte Astrozyten, gefunden (Kap. 5.2.2.1d). Diese Parallele ist insofern interessant, als auch CRYAB vielfach in erhöhten Konzentrationen in aktivierten Gliazellen nachgewiesen wurde, und somit ein weiterer Hinweis auf eine Aktivierung der Astroglia in den Gehirnen von Suizidopfern existiert. Als diejenigen Streßfaktoren, welche die Expression von CRYAB induzieren, erwiesen sich vornehmlich Hitze und oxidativer Streß (Goldbaum and Richter-Landsberg, 2001; Iwaki et al., 1993). Somit tritt oxidativer Streß erneut als möglicherweise relevanter Faktor für die hier beobachteten Protein-Expressionsunterschiede auf. Auch in einer Reihe von neurodegenerativen Erkrankungen wiesen Astrozyten signifikant erhöhte Konzentrationen an CRYAB auf, wie z.B. Morbus Alzheimer (Shinohara et al., 1993), Morbus Parkinson (Jellinger, 2000) und Multiple Sklerosis (van Noort et al., 1995). Bei einer Übersicht über die Vorbefunde zu Hsp' in der biologischen Psychiatrie fällt auf, daß die sHsp's quasi ausschließlich bei neurodegenerativen Erkrankungen eine Rolle spielten, während die höhermolekularen Hsp's auch bei psychiatrischen Störungen Veränderungen zeigten, z.B. bei Schizophrenie ((Wang et al., 2003) (Hsp60) und (Kim et al., 2001a) (Hsp70 und Hsp90)).

Bei Suizidopfern wurde eine Erhöhung von Hsp60 gefunden, was als kompensatorische Antwort auf chronischen, in diesem Fall psychischen, Streß (Bown et al., 2000) interpretiert wurde.

Zusammengefaßt gibt der vorliegende Befund einer ausschließlichen Expression von CRYAB in präfrontalen Cortices von Suizidenten ein weiteres Indiz für die Beteiligung von aktivierten Astrozyten und oxidativem Streß an den Pathomechanismen in der Entstehung suizidalen Verhaltens.

5.2.5 Neuronenspezifische Proteine

In dieser Proteomanalyse wurden drei neuronenspezifische Proteine identifiziert: Gamma-Enolase (ENO2), Neurofilament Triplet L Protein (NEFL) und 'Collapsin response mediator protein 2' (CRMP2). ENO wurde bereits bei den Proteinen des Intermediärmetabolismus (Kap.5.2.1) und NEFL in der Gruppe der Zytoskelett-Proteine beschrieben (Kap. 5.2.2).

5.2.5.1 Collapsin response mediator protein 2' (CRMP2)

Das 'Collapsin response mediator protein 2' (CRMP2), auch unter dem Synonym 'dihydropyrimidinase-related protein' bekannt, wird im Gehirn in besonders hohen Konzentrationen in der Embryonalphase exprimiert. Es vermittelt dort die Wirkung des Signalmoleküls Semaphorin (Collapsin). Dieses ist an der Zielfindung wachsender Axone involviert, indem es repulsive Wirkung auf dessen apikales Ende ausübt und somit seine Wachstumsrichtung steuert. Zudem sind Semaphorine an der Induktion der Apoptose beteiligt. Im adulten Gehirn ist deutlich weniger CRMP2 vorhanden, welches hier in die Regeneration und Reparatur verletzter Neuronen involviert ist. Insgesamt weisen Untersuchungen zu CRMP2 in der biologischen Psychiatrie ausgesprochen inkonsistente Ergebnisse auf, was insbesondere für Studien auf Proteinebene gilt.

In dieser Arbeit war die Expression von CRMP2 bei den Suizidopfern gegenüber den Kontrollen mindestens um das Doppelte erhöht. Dies könnte auf eine verstärkte Wirkung von Semaphorinen hinweisen. Dies könnte vergleichbare neurobiologische Konsequenzen haben, wie die Ergebnisse einer Untersuchung an Gehirnen von Alzheimer-Patienten zeigen, in der eine Akkumulation von Semaphorinen gefunden wurde. Die Autoren vermuteten, daß diese den Kollaps von Neuronen induziert haben könnten (Good et al., 1998). Ebenso wäre jedoch auch denkbar, daß CRMP2 auf genetischer Ebene hochreguliert wurde. Im Hinblick auf die Funktion des Proteins bei der Regeneration von Neuronen könnte die Expressionserhöhung in diesem Fall auf das Vorliegen neuronaler Schädigungen hinweisen.

5.2.6 Hypothetisches Modell für die mögliche Implikation der veränderten Proteinexpressionen in die Ätiopathogenese suizidalen Verhaltens

5.2.6.1 Einführung

Insgesamt wurden in den Hirnregionen präfrontaler Cortex, Amygdala, Thalamus und Hippocampus sowie in den Liquores von Suizidopfern und Kontrollen 16 Proteine mit signifikanten Expressionsunterschieden zwischen beiden Gruppen gefunden. In der Hypophyse sowie im Cerebellum, das als Referenzregion diente, wurden keine eindeutigen Differenzen festgestellt. Die jeweiligen MALDI-Massenspektren und Proteinsequenzen lieferten Hinweise auf mögliche Ursachen für die beobachteten Proteinveränderungen. Diese beruhten vermutlich neben Regulationsverschiebungen auf RNA- und DNA-Ebene vor allem auf Modifikationen der Proteine selber, verursacht z.B. durch Oxidation von Aminosäureresten, durch Proteolyse, Phosphorylierung und Guanylierung. Betroffen waren in erster Linie Proteine, zumeist Enzyme, des Intermediärmetabolismus', Proteine des Zytoskelettes und Antioxidationsproteine. Aus den jeweiligen Proteinfunktionen konnten Schlüsse über mögliche Konsequenzen für die betroffenen Neuronen gezogen werden. Demnach könnte in den betroffenen Neuronen ein reduzierter Glukose- und Energiemetabolismus vorgelegen haben sowie glutamaterge Exzitotoxizität (Kap. 5.2.1) und eine Instabilisierung des Zytoskelettes (Kap. 5.2.2).

Die Summe dieser Faktoren könnte zu einer verminderten Neurotransmission geführt und letztendlich in der Degeneration von Neuronen resultiert haben.

Dieses Bild stimmt auffallend überein mit den Ergebnissen einer Studie von Prabakaran et al. an post-mortalen präfrontalen Cortices schizophrener Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollen (Prabakaran et al., 2004). Hierin wurden parallele Untersuchungen der Transkriptome, Proteome sowie zahlreicher Metaboliten ('Metabolics') durchgeführt. Auf allen drei Ebenen fanden sich eindeutige Hinweise für eine Herabregulation des Energiestoffwechsels sowie für erhöhtes Aufkommen von oxidativem Streß.

Zusammengefaßt gab es in den Gehirnzellen der Suizidopfer Anzeichen von oxidativem, exzitotoxischem, proteolytischem und Energie-Mangel-Streß. Dies legt die Hypothese nahe, daß diesen suizidassoziierten Streßfaktoren möglicherweise Formen von psychischem Streß als gemeinsame Komponenten zugrunde liegen. Eine ähnliche Möglichkeit sieht Bown (Bown et al., 2000), der die Hochregulation von Streßproteinen in Gehirnen von Suizidopfern ebenfalls mit psychischem Streß in Verbindung bringt.

Die genannte Hypothese wird im Folgenden überprüft und diskutiert.

5.2.6.2 Möglicher Einfluß von 'chronischem Streß' auf die veränderten Proteinexpressionen

Das Syndrom 'Streß' kann durch verschiedenste psychische, soziale und physische Faktoren ausgelöst werden (Zimbardo, 1995). Dabei wird unter anderem zwischen akutem und chronischem Streß unterschieden. Beide Formen weisen neben den psychologischen auch verschiedene biologische Charakteristika auf, die als endokrinologische, immunologische und diverse biochemische Parameter meßbar sind (Flugge et al., 2004; Van den, 2002; Cacioppo et al., 1998). Chronischer Streß kann z.B. durch nicht bewältigte traumatische Erlebnisse (Posttraumatische Belastungsstörung, 'posttraumatic stress disorder', PTSD), durch permanente Belastungssituationen oder, bei entsprechender psychischer oder physischer Prädisposition des Betroffenen, auch bereits durch nahezu unbedeutende tägliche Ereignisse entstehen (Bartolomucci et al., 2005; Carstensen et al., 1999).

In akuten Streßsituationen dienen die körpereigenen Streßabwehrmechanismen dem Schutz des Organismus' vor streßbedingten Schäden und zur Wiederherstellung des homöostatischen Gleichgewichtes (Allostase). Bei dauerhafter Aktivierung der Streßsysteme können diese jedoch selbst schädliche Wirkungen entwickeln (allostatische Last) (McEwen and Lasley, 2003). Die Gefahr eines chronifizierten Streßzustandes liegt darin, daß dieser, entgegen dem akuten Streß, nicht mehr bewußt wahrgenommen wird. Dadurch kann sich Dauerstreß unterschwellig in einer Vielzahl psychischer und somatischer Störungen manifestieren (Maddock and Pariante, 2001). Zu den besonders fatalen Folgen zählt das Entstehen suizidalen Verhaltens. Dies zeigte sich z.B. in einer erhöhten Suizidgefahr bei Patienten mit PTSD (Sher, 2005). Umgekehrt wiesen suizidale Menschen typische Merkmale von chronischem Streß auf, der daher als einer der Prädiktoren für suizidales Verhalten gilt (Phillips et al., 2002; Kelly et al., 2001). Dabei wurde insbesondere eine verstärkte Aktivierung biologischer Streßhormonsysteme in Verbindung mit Suizidalität nachgewiesen. Im Vordergrund standen die Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden- (HPA-) Achse und das noradrenerge System. Befunde wie z.B. die eines erhöhten Cortisol- und erniedrigten Corticotropin-Releasing-Hormon- (CRH-) Plasma-Spiegels (Westrin et al., 1999) sowie die Ergebnisse aus Untersuchungen zu verschiedenen Komponenten des noradrenergen Systems (van Heeringen, 2003) wiesen auf eine dauerhaft streßinduzierte Hyperaktivität beider Systeme hin.

Es ist denkbar, daß chronischer Streß auch durch Beeinflussung anderer Funktionen im Organismus zur Entstehung suizidalen Verhaltens beiträgt und möglicherweise auch für die differentielle Proteinexpression in dieser Arbeit eine Rolle spielt.

In Abb. 5.2.6.1 werden mögliche Mechanismen aufgezeigt, über die chronischer Streß zu den beobachteten Expressionsunterschieden beigetragen haben könnte. Zugleich dient die Abbildung der Übersicht über die in Kap. 5.2.1 bis 5.2.7 beschriebenen Ergebnisse. Es zeigte sich, daß anhaltende psychische Überbelastung durch Modifikation einzelner Proteine auch auf zellulärer Ebene gewissermaßen eine Streßsituation herbeiführen kann. Dabei wiesen die vorliegenden Ergebnisse im wesentlichen auf drei Formen von zellulärem Streß hin: auf oxidativen, proteolytischen und exzitotoxischen Streß. Diese werden nachfolgend kurz erläutert.

Permanente psychische Anspannung kann zur Entstehung freier Radikale im Organismus führen, die oxidativen Streß auf Zellen ausüben. Der Konzentrationsanstieg des Super-oxidanionen-Radikals ($O_2^{\bullet-}$) könnte zum Beispiel die veränderte Expression der Antioxidationsproteine SOD2 und PRDX2 erklären (Kap. 5.2.3). Freie Radikale können auch direkt Aminosäurereste von Proteinen angreifen und auf diese Weise unter anderem Enzyme inaktivieren, wie es z.B. bei GLNS der Fall sein kann (Kap. 5.2.1.1d). Ferner hemmen bestimmte Formen von oxidativem Streß den proteolytischen Proteinabbau und führen so zu unerwünschter Akkumulation von Proteinen (evtl. bei ENO1 (Kap. 5.2.1.1b)), während andere Formen die Proteolyse aktivieren und somit proteolytische Schäden verursachen können (z.B. bei ALDC, NEFL, TUBB4, TUBII (Kap. 5.2.1.1 und 5.2.2.1)). Für diesen psychisch bedingten 'proteolytischen Streß' gibt es zudem Hinweise in Form einer generellen Erhöhung der Proteaseaktivität in Tierversuchen (Tarasenko et al., 2000). Chronischer Streß kann weiterhin die Glutamatkonzentrationen im Nervensystem auf ein exzitotoxisches Maß erhöhen, was fatale Folgen für Neuronen haben kann, bis hin zu ihrer Degeneration (Smith, 1996). Ferner ist bekannt, daß ein Überschuß an Glutamat verschiedene Proteine des Zellskelettes massiv schädigen kann (Ankarcrona et al., 1996) und eventuell auch für die reduzierte Expression von NEFL verantwortlich sein kann (Chung et al., 2005). Das Heatshock-Protein CRYAB (Kap. 5.2.4) wurde ausschließlich in präfrontalen Cortices von Suizidopfern gefunden. Dieser Befund geht konform mit den Ergebnissen einer Studie, in der erhöhte Konzentrationen von Streßproteinen in temporalen Cortices von Suizidenten gefunden wurden (Bown et al., 2000). Die Autoren sehen die Ursache dafür ebenfalls in der Einwirkung von chronischem Streß und interpretieren die Expressionserhöhungen als kompensatorische Reaktion auf Streß-induzierte toxische Effekte.

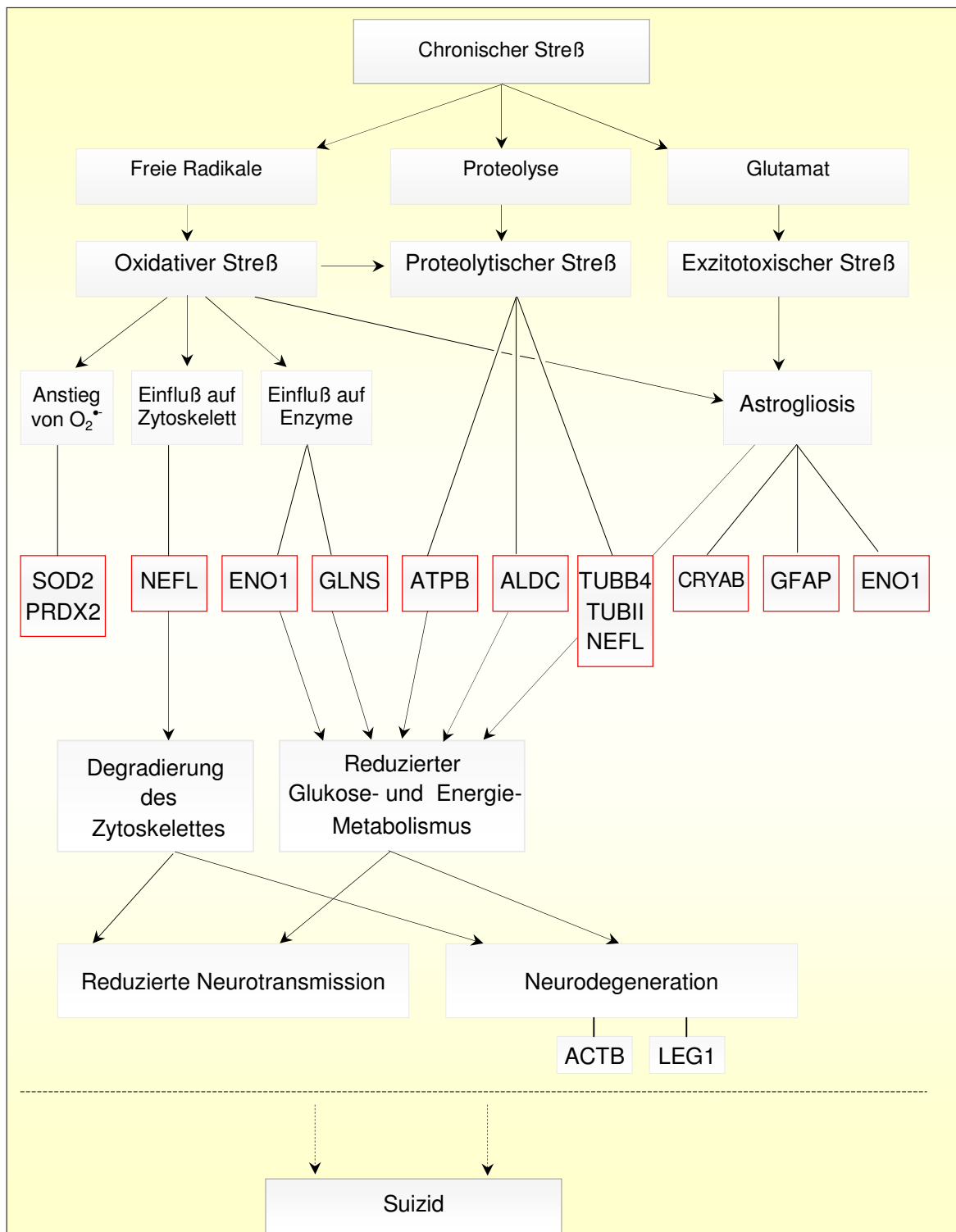


Abb. 5.2.6.1 Möglicher Einfluß von chronischem Streß auf die Expression der identifizierten Proteine

Abkürzungen für die Proteine:

SOD2 (Mangan Superoxid Dismutase), NEFL (Neurofilament Triplet L Protein), ENO1 (Alpha Enolase), GLNS (Glutamin-Synthetase), ATPB (ATP-Synthase), ALDC (Fructose-Bisphosphat-Aldolase C), TUBB4 (Beta Tubulin), TUBII ('Class II beta tubulin isotype'), CRYAB (Alpha Crystallin B), GFAP (saures fibrilläres Gliaprotein), ACTB (Beta Aktin), LEG1 (Galectin-1)

Die möglichen Folgen der veränderten Proteinmodifikationen für die betroffenen neuronalen Zellen konzentrieren sich im wesentlichen auf einen reduzierten Glukose- und Energiemetabolismus, bedingt durch verminderte Aktivitäten der beteiligten Enzyme sowie auf Defekte des Zytoskelettes. Beides kann zu Einschränkungen der Neurotransmission und letztendlich zum Untergang von Neuronen führen. Für eine verstärkte Neurodegeneration bei den Suizidopfern sprechen auch die erhöhte Expression von LEG1 (Kap. 5.2.1.1e) sowie das ausschließliche Auftreten von Aktin-Fragmenten (Kap. 5.2.2.1b) in dieser Gruppe.

Interessant könnte auch der mehrfach gefundene Hinweis auf eine Implikation der Astroglia anhand der astrozytenspezifischen Proteine GFAP, CRYAB, ENO1 und GLNS sein (Kap. 5.2.1, 5.2.2, 5.2.4). Dies stimmt mit den Ergebnissen einer zunehmenden Anzahl von Studien überein, die eine weitaus größere Bedeutung der Astroglia für die Pathogenese psychiatrischer Erkrankungen postulieren als bisher angenommen (Übersicht: (Cotter et al., 2001)).

5.2.6.3 Kritikpunkte

Bei der Literaturrecherche zu den in dieser Arbeit identifizierten Proteinen fiel auf, daß in allen Fällen deutlich mehr Vorbefunde für einen Zusammenhang mit degenerativen Erkrankungen als mit psychiatrischen Störungen vorlagen. Daher lag die Vermutung nahe, daß methodische Faktoren zur Degradierung von Proteinen geführt haben, und auf diese Weise für die hier detektierten Expressionsunterschiede verantwortlich gewesen sein könnten. In diesem Zusammenhang ist es daher von besonderer Bedeutung, daß methodische Ursachen in fast allen Fällen weitgehend ausgeschlossen werden konnten (Kap.5.1).

Ein weiterer Kritikpunkt wird durch die Hypothese einer Implikation von chronischem Streß für die vorliegenden Ergebnisse im Kontext mit Depression aufgeworfen. Denn erstens ist ein Zusammenhang zwischen Streß und Depression gut belegt (Strohle and Holsboer, 2003; Holsboer, 2001) und zweitens besteht eine hohe Komorbidität von Suizidalität mit verschiedenen psychiatrischen Erkrankungen, wie insbesondere mit Depression und Schizophrenie (Bertolote et al., 2004). Es ist daher nicht auszuschließen, daß auch bei den hier untersuchten Suizidopfern die Grunderkrankung einer Depression zur Auslösung der Suizidhandlung beigetragen hat, zumal nur wenige Informationen über psychiatrische Diagnosen der Suizidenten vorliegen. Andererseits ist zu bedenken, daß für die in dieser Arbeit identifizierten suizidassoziierten

Proteine wie erwähnt, nur sehr wenige Vorbefunde zu psychiatrischen Störungen vorliegen, im Gegensatz zu den zahlreichen Ergebnissen zu degenerativen Erkrankungen. Daher ist es möglich, daß chronischer Streß über biochemische Mechanismen, die vielleicht bisher in diesem Zusammenhang noch nicht untersucht wurden, neuronale Schäden verursacht, die schließlich zur Pathogenese der Suizidalität beitragen. Dies könnte unter Umständen zusätzlich oder sogar verstärkend wirksam werden zu der bereits bekannten Aktivierung biologischer Streßabwehrsysteme wie das der HPA-Achse und des noradrenergen Systems geschehen.

Bisher ist nahezu keine gezielte Anwendung der Proteomanalyse in der neurobiologischen Suizidforschung bekannt und auch für die in dieser Arbeit identifizierten Proteine gibt es bislang fast keine Untersuchungen im Zusammenhang mit Suizidalität. Daher könnten die vorliegenden Ergebnisse möglicherweise Hinweise auf eigenständige Pathomechanismen geben, über die chronischer Streß in die Entstehung suizidalen Verhaltens involviert ist. Für diese Annahme spricht weiterhin eine Reihe von Studien, die belegen, daß psychiatrische Erkrankungen trotz der hohen Komorbidität nicht zwingend die Basis für die Pathogenese der Suizidalität sind, sondern, daß dieser auch autonome Komponenten zugrunde liegen könnten (McGuffin et al., 2001; Mann et al., 2001; Gross-Isseroff et al., 1998).

5.2.6.4 Schlußfolgerung

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, daß die in der vorliegenden Proteomanalyse gefundenen Expressionsunterschiede in Hirn- und Liquor-Proteinen zwischen Suizidenten und Kontrollen, Hinweise geben könnten für das Vorliegen einer chronischen Streßsituation bei den Suizidopfern im Vorfeld ihrer Suizidhandlung. Diese Hypothese läßt folgende Schlußfolgerungen zu:

a) Anwendung der Proteomanalyse in der neurobiologischen Suizidforschung

Die Daten der MALDI-MS-Analyse ergaben für die überwiegende Zahl der identifizierten Proteine Anzeichen für posttranslationale Modifikationen. In anderen Fällen scheint die Regulation der Proteinexpression auf DNA- oder RNA-Ebene erfolgt zu sein. Demnach könnten sowohl genetische als auch diverse äußere Faktoren für die Expressi-

onsunterschiede verantwortlich sein. Diese Annahme stimmt überein mit den bisher bekannten Befunden zur Pathogenese sowohl der Suizidalität als auch des chronischen Stresses. Insbesondere bei der multifaktoriellen Entstehung suizidalen Verhaltens werden die vielfältigen Risikofaktoren zunehmend nur noch in zwei bzw. drei Gruppen eingeteilt. Dies sind Umweltfaktoren und genetische Faktoren sowie Interaktionen der beiden Komponenten (Balazic and Marusic, 2005; Marusic and Farmer, 2001). In einer der bislang umfangreichsten Metaanalysen über Zwillingsstudien wurde berechnet, daß sich die Pathogenese der Suizidalität zu 43% durch eine genetische Prädisposition und zu 57% durch den Einfluß von Umweltfaktoren erklären ließ (McGuffin et al., 2001). Bereits 1989 wurde ein 'Streß-Diathesis-Modell' vorgeschlagen (Mann, 1998). Demzufolge wird durch eine entsprechende, unter anderem genetische Prädisposition gewissermaßen eine Reizschwelle festgelegt, bei deren Überschreitung durch diverse äußere Faktoren suizidales Verhalten ausgelöst wird. Ein ähnliches Modell besteht auch für die Entstehung von chronischem Streß und der daraus resultierenden Manifestation psychischer oder physischer Erkrankungen. Auch hier geht man davon aus, daß bei den betroffenen Menschen eine erhöhte Vulnerabilität für Streßbelastungen vorliegt, welche unter anderem auch genetisch determiniert ist (Veenema et al., 2003; Hellhammer and Wade, 1993; McEwen and Stellar, 1993). Es könnte demnach ein Zusammenhang zwischen Suizidalität und chronischem Streß bestehen, wie er in Abb. 5.2.6.2 dargestellt ist.

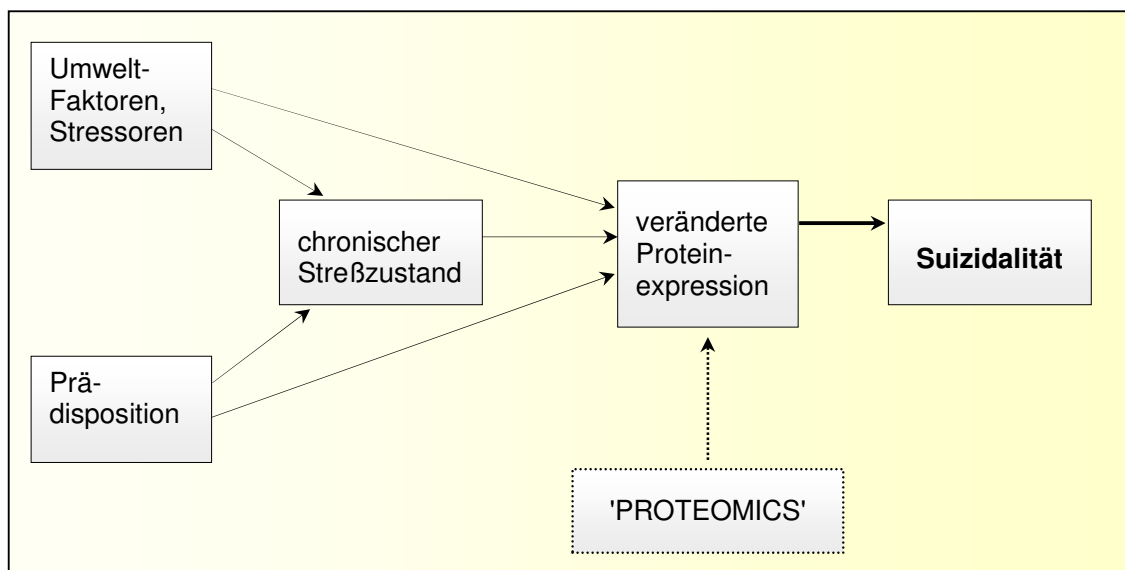


Abb. 5.2.6.2 Zusammen wirken von Umweltfaktoren und prädisponierende Faktoren (Genetik, Alter, u.a.) und daraus entstehendem chronischem Streß können zu suizidasoziierten Veränderungen der Proteinexpression führen, die durch Methoden der Proteomforschung identifiziert werden können.

Entscheidend ist dabei, daß sowohl Umweltfaktoren und genetische Komponenten als auch dadurch verursachter Dauerstreß ihre funktionellen Konsequenzen im Organismus letztendlich auf Proteinebene haben. Das komplexe Zusammenspiel der beteiligten Faktoren mündet somit quasi als gemeinsame Endstrecke in eine veränderte Proteinexpression. Diese läßt sich optimal mit Hilfe der Proteomanalyse erfassen. Ein besonderer Vorteil dieser Methodik ist ihr nicht-Hypothesen-gesteuerter Ansatz, auch 'Schrotschuß-Verfahren' genannt, der erlaubt, neue krankheitsassoziierte Proteine und Proteininteraktionen zu identifizieren und dadurch neue Hypothesen zu erstellen. Ein Beispiel hierfür gibt der Hinweis auf eine mögliche Implikation von chronischem Streß für die Pathogenese der Suizidalität, der in diese Arbeit gefunden wurde. Somit kann die Proteomanalyse eine probate Methode für die neurobiologische Suizidforschung sein.

b) Mögliche Anwendung der Ergebnisse für die Suizidprävention und Ausblick

Im Hinblick auf die vorliegenden Ergebnisse kann es von Interesse sein, den Einfluß von chronischem Streß auf suizidales Verhalten noch eingehender zu untersuchen. Sollte sich dieser Zusammenhang weiter bestätigen, so könnte es zur Prävention von Suizidhandlungen beitragen, erstens bei Patienten mit diagnostiziertem Streß-Syndrom verstärkt auf Hinweise für das Vorliegen von Suizidalität zu achten, und zweitens bei suizidalen Menschen gezielt Therapiemaßnahmen gegen chronischen Streß anzuwenden. Zu diesen zählen neben der Beseitigung permanenter äußerer Streßfaktoren auch die Bearbeitung möglicher posttraumatischer Belastungen mittels psychotherapeutischer Verfahren sowie der Einsatz entsprechender Psychopharmaka. Angesichts der hohen Komorbidität von Suizidalität und Depression kann ein Ziel nachfolgender Studien sein, die in dieser Arbeit identifizierten Proteine hinsichtlich einer möglichen Assoziation mit depressiven Erkrankungen zu untersuchen.

6. ZUSAMMENFASSUNG

Die Ätiopathogenese der Suizidalität ist multifaktoriell. Sie umfaßt unter anderem neurobiologische Komponenten, wobei im Zentrum der Forschung bislang das serotonerge System steht. Da insgesamt die konsistentesten Ergebnisse auf Proteinebene gefunden wurden, war es von Interesse, weitere suizidassoziierte Proteine zu identifizieren. Als geeignete Methodik bot sich dazu die Proteomanalyse an, da diese auf einem nicht-Hypothese-geleiteten Ansatz beruht. Die zentrale Methode der Proteomanalyse stellt die hochauflösende zweidimensionale SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese (2D-PAGE) zur Auftrennung von Proteingemischen dar. Differentiell exprimierte Proteine werden mit Hilfe massenspektrometrischer Verfahren, in diesem Fall MALDI-TOF-MS, und anschließender Proteindatenbank-Recherche identifiziert.

Die beiden Ziele der vorliegenden Arbeit waren 1. die Etablierung der subtraktiven Proteomanalyse zu Untersuchung von Hirn- und Liquorproben sowie 2. die Identifikation möglicher suizidassoziiertes Proteine. Im Vergleich von insgesamt 20 Suizidopfern mit 10 Kontrollen wurden dazu neben dem Liquor die Hirnregionen präfrontaler Cortex, Amygdala, Hippocampus, Thalamus und die Hypophyse sowie als Referenzregion das Cerebellum untersucht.

Ergebnisse für differentiell exprimierte Proteine

Es wurden insgesamt 15 Proteine in den Hirnregionen präfrontaler Cortex, Amygdala, Hippocampus, Thalamus sowie ein Protein im Liquor identifiziert, deren Expression sich signifikant zwischen Suizidopfern und Kontrollen unterschied. Weder im Cerebellum noch in der Hypophyse zeigten sich eindeutige Proteinveränderungen. Obwohl die Methodik primär für die Erfassung quantitativer Expressionsunterschiede sowie für die Proteinidentifikation ausgelegt war, erlaubten zudem die Massenspektren und die identifizierten Peptidsequenzen Annahmen über mögliche posttranslationale Modifikationen.

Sieben der 16 Proteine waren Komponenten des Intermediärmetabolismus', insbesondere des Glukose- und Energiestoffwechsels. Es handelte sich dabei um die Enzyme Fruktose-Bisphosphat-Aldolase C, ATP-Synthase, Alpha Enolase und die Neuronen-spezifische Gamma Enolase sowie die Astrozyten-spezifische Glutaminsynthetase. Nicht enzymatisch waren Galectin-1 und Neuropolypeptid h3. Die Art der Proteinveränderungen ließ auf mögliche Verluste der enzymatischen Aktivitäten

schließen. Dies könnte in verminderter Astrozyten-vermittelter Glukoseversorgung, in reduziertem Energieumsatz sowie in einer exzitotoxischen Erhöhung der Glutamatkonzentration resultieren. Alle drei Faktoren können letztlich zur Degeneration von Neuronen führen.

Fünf Proteine waren Bestandteile des Zytoskelettes: Das Neuronen-spezifische Neurofilament Triplet L Protein, zwei Tubulin-Isoformen, das als Astrozyten-Marker geltende saure fibrilläre Gliaprotein sowie das im Liquor identifizierte Beta Aktin Fragment. Die modifizierten Proteine könnten zu einer Instabilisierung des Zytoskelettes, zu vermindertem axonalem Transport und ebenfalls zum Zelltod führen. Die Expressionsunterschiede in zwei Antioxidationsproteinen (Mangan Superoxid Dismutase und Peroxiredoxin2) sowie die Hochregulation des Hitzeschockproteins Alpha Crystallin wiesen auf ein erhöhtes Aufkommen von oxidativem Streß in den Zellen hin.

Zusammengefaßt gaben diese Proteinmodifikationen in den Gehirnen der Suizidopfer Anzeichen von exzitotoxischem, proteolytischem, oxidativem und von Energie-Mangel-Streß. Gestützt durch entsprechende Hinweise aus der Literatur wurde daraus die Hypothese formuliert, daß diesen suizidassoziierten zellulären Streßfaktoren eine Form von psychischem Streß, insbesondere in chronischer Form zugrunde lag. Hierzu wurden Mechanismen vorgeschlagen, über die dauerhafter Streß zu den beschriebenen Expressionsveränderungen beigetragen haben könnte. Bislang wurden diese Mechanismen im Zusammenhang mit Suizidalität nicht untersucht und es ist denkbar, daß sie zusätzlich zu den bekannten Streßsystemen wirksam geworden sind.

Zu bedenken ist ferner die hohe Komorbidität sowohl der Suizidalität als auch des chronischen Stresses mit Depressionen. Daher ist nicht auszuschließen, daß eine depressive Grunderkrankung zum Auslösen der Suizidhandlung beigetragen haben könnte.

7. AUSBLICK

- a) Die vorliegenden Ergebnisse könnten zur Suizidprävention beitragen, indem erstens bei Menschen in akuten oder chronischen Stresssituationen verstärkt auf Anzeichen von Suizidalität geachtet wird und zweitens bei suizidgefährdeten Personen Therapiemaßnahmen zur Stressverminderung angewandt werden wie z.B. durch Psychopharmaka.
- b) Angesichts der hohen Komorbidität mit Depression könnte es interessant sein, die in dieser Arbeit beschriebenen Proteine bei depressiven Patienten zu untersuchen.
- c) Am Beispiel des chronischen Stresses konnte gezeigt werden, wie genetische und Umweltfaktoren letztlich in einer veränderten Proteinexpression resultieren und dadurch in die Ätiopathogenese der Suizidalität involviert sein könnten. Somit verspricht die Proteomanalyse eine probate Methode zur Identifikation neuer Proteine und Kandidaten-Gene in der neurobiologischen Suizidforschung zu sein.

8. LITERATURVERZEICHNIS

Abdelhamid S. (1992). (NSE) Neuronen-spezifische Enolase. In Labor und Diagnose, Thomas L., ed. Med Verl Ges), pp. 1202-1211.

Ahrens,B. (1997). Mortality studies and the effectiveness of drugs in long-term treatment. *Pharmacopsychiatry* 30, 57-61.

Akazawa,C., Nakamura,Y., Sango,K., Horie,H., and Kohsaka,S. (2004). Distribution of the galectin-1 mRNA in the rat nervous system: its transient upregulation in rat facial motor neurons after facial nerve axotomy. *Neuroscience* 125, 171-178.

Allani,P.K., Sum,T., Bhansali,S.G., Mukherjee,S.K., and Sonee,M. (2004). A comparative study of the effect of oxidative stress on the cytoskeleton in human cortical neurons. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 196, 29-36.

Althaus D, Hegerl U. Hintergründe, Diagnose und Therapie von Suizidalität. *Nervenarzt* . 2004.

Ref Type: Magazine Article

Amir,M., Kaplan,Z., Efroni,R., and Kotler,M. (1999). Suicide risk and coping styles in posttraumatic stress disorder patients. *Psychother. Psychosom.* 68, 76-81.

Andrieux,A., Salin,P.A., and Job,D. (2004). [A role for microtubules in mental diseases?]. *Pathol. Biol. (Paris)* 52, 89-92.

Anguelova,M., Benkelfat,C., and Turecki,G. (2003). A systematic review of association studies investigating genes coding for serotonin receptors and the serotonin transporter: II. Suicidal behavior. *Mol. Psychiatry* 8, 646-653.

Ankarcrona,M., Zhivotovsky,B., Holmstrom,T., Diana,A., Eriksson,J.E., Orrenius,S., and Nicotera,P. (1996). Lamin and beta-tubulin fragmentation precede chromatin degradation in glutamate-induced neuronal apoptosis. *Neuroreport* 7, 2659-2664.

Antai-Otong,D. (2003). Suicide: life span considerations. *Nurs. Clin. North Am.* 38, 137-150.

Apter,A., van Praag,H.M., Plutchik,R., Sevy,S., Korn,M., and Brown,S.L. (1990). Interrelationships among anxiety, aggression, impulsivity, and mood: a serotonergically linked cluster? *Psychiatry Res.* 32, 191-199.

Arango,V., Underwood,M.D., Boldrini,M., Tamir,H., Kassir,S.A., Hsiung,S., Chen,J.J., and Mann,J.J. (2001). Serotonin 1A receptors, serotonin transporter binding and serotonin transporter mRNA expression in the brainstem of depressed suicide victims. *Neuropsychopharmacology* 25, 892-903.

Arango,V., Underwood,M.D., Gubbi,A.V., and Mann,J.J. (1995). Localized alterations in pre- and postsynaptic serotonin binding sites in the ventrolateral prefrontal cortex of suicide victims. *Brain Res.* 688, 121-133.

Arango,V., Underwood,M.D., and Mann,J.J. (1996). Fewer pigmented locus coeruleus neurons in suicide victims: preliminary results. *Biol. Psychiatry* 39, 112-120.

- Arango,V., Underwood,M.D., and Mann,J.J. (1997). Postmortem findings in suicide victims. Implications for in vivo imaging studies. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* *836*, 269-287.
- Arango,V., Underwood,M.D., and Mann,J.J. (2002). Serotonin brain circuits involved in major depression and suicide. *Prog. Brain Res.* *136*, 443-453.
- Arato,M., Banki,C.M., Bissette,G., and Nemeroff,C.B. (1989). Elevated CSF CRF in suicide victims. *Biol. Psychiatry* *25*, 355-359.
- Arato,M., Frecska,E., Tekes,K., and MacCrimmon,D.J. (1991). Serotonergic inter-hemispheric asymmetry: gender difference in the orbital cortex. *Acta Psychiatr. Scand.* *84*, 110-111.
- Arato,M., Tekes,K., Tothfalusi,L., Magyar,K., Palkovits,M., Demeter,E., and Falus,A. (1987). Serotonergic split brain and suicide. *Psychiatry Res.* *21*, 355-356.
- Arias,B., Gasto,C., Catalan,R., Gutierrez,B., Pintor,L., and Fananas,L. (2001). The 5-HT(2A) receptor gene 102T/C polymorphism is associated with suicidal behavior in depressed patients. *Am. J. Med. Genet.* *105*, 801-804.
- Arora,R.C. and Meltzer,H.Y. (1989). Serotonergic measures in the brains of suicide victims: 5-HT₂ binding sites in the frontal cortex of suicide victims and control subjects. *Am. J. Psychiatry* *146*, 730-736.
- Asai,D.J. and Remolona,N.M. (1989). Tubulin isotype usage in vivo: a unique spatial distribution of the minor neuronal-specific beta-tubulin isotype in pheochromocytoma cells. *Dev. Biol.* *132*, 398-409.
- Asberg,M. (1997). Neurotransmitters and suicidal behavior. The evidence from cerebrospinal fluid studies. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* *836*, 158-181.
- Asberg,M., Traskman,L., and Thoren,P. (1976). 5-HIAA in the cerebrospinal fluid. A biochemical suicide predictor? *Arch. Gen. Psychiatry* *33*, 1193-1197.
- Auer,R.N. and Siesjo,B.K. (1993). Hypoglycaemia: brain neurochemistry and neuropathology. *Baillieres Clin. Endocrinol. Metab* *7*, 611-625.
- Bairoch,A., Bucher,P., and Hofmann,K. (1997). The PROSITE database, its status in 1997. *Nucleic Acids Res.* *25*, 217-221.
- Balazic,J. and Marusic,A. (2005). The completed suicide as interplay of genes and environment. *Forensic Sci. Int.* *147 Suppl*, S1-S3.
- Banay-Schwartz,M., DeGuzman,T., Faludi,G., Lajtha,A., and Palkovits,M. (1998). Alteration of protease levels in different brain areas of suicide victims. *Neurochem. Res.* *23*, 953-959.
- Banfield,M.J., Barker,J.J., Perry,A.C., and Brady,R.L. (1998). Function from structure? The crystal structure of human phosphatidylethanolamine-binding protein suggests a role in membrane signal transduction. *Structure.* *6*, 1245-1254.
- Barnham,K.J., Masters,C.L., and Bush,A.I. (2004). Neurodegenerative diseases and oxidative stress. *Nat. Rev. Drug Discov.* *3*, 205-214.

- Bartolomucci,A., Palanza,P., Sacerdote,P., Panerai,A.E., Sgoifo,A., Dantzer,R., and Parmigiani,S. (2005). Social factors and individual vulnerability to chronic stress exposure. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 29, 67-81.
- Beck AT,S.R. (1991). Manual for Beck Scale for Suicidal Ideation. (New York: Psychological Corporation).
- Beck,A.T., Kovacs,M., and Weissman,A. (1975). Hopelessness and suicidal behavior. An overview. *JAMA* 234, 1146-1149.
- Beck,A.T. and Weishaar,M.E. (1990). Suicide risk assessment and prediction. *Crisis* 11, 22-30.
- Beck,A.T., Weissman,A., Lester,D., and Trexler,L. (1976). Classification of suicidal behaviors. II. Dimensions of suicidal intent. *Arch. Gen. Psychiatry* 33, 835-837.
- Bellivier,F., Chaste,P., and Malafosse,A. (2004). Association between the TPH gene A218C polymorphism and suicidal behavior: a meta-analysis. *Am. J. Med. Genet.* 124B, 87-91.
- Benes,F.M., Davidson,J., and Bird,E.D. (1986). Quantitative cytoarchitectural studies of the cerebral cortex of schizophrenics. *Arch. Gen. Psychiatry* 43, 31-35.
- Benitez-King,G., Ramirez-Rodriguez,G., Ortiz,L., and Meza,I. (2004). The neuronal cytoskeleton as a potential therapeutical target in neurodegenerative diseases and schizophrenia. *Curr. Drug Targets. CNS. Neurol. Disord.* 3, 515-533.
- Berger,R.P., Pierce,M.C., Wisniewski,S.R., Adelson,P.D., Clark,R.S., Ruppel,R.A., and Kochanek,P.M. (2002). Neuron-specific enolase and S100B in cerebrospinal fluid after severe traumatic brain injury in infants and children. *Pediatrics* 109, E31.
- Bernardo,A., Patrizio,M., Levi,G., and Petrucci,T.C. (1994). Human immunodeficiency virus protein gp120 interferes with beta-adrenergic receptor-mediated protein phosphorylation in cultured rat cortical astrocytes. *Cell Mol. Neurobiol.* 14, 159-173.
- Berrettini,W.H. (2000). Susceptibility loci for bipolar disorder: overlap with inherited vulnerability to schizophrenia. *Biol. Psychiatry* 47, 245-251.
- Bertolote,J.M., Fleischmann,A., De Leo,D., and Wasserman,D. (2004). Psychiatric diagnoses and suicide: revisiting the evidence. *Crisis* 25, 147-155.
- Bigl,M., Bruckner,M.K., Arendt,T., Bigl,V., and Eschrich,K. (1999). Activities of key glycolytic enzymes in the brains of patients with Alzheimer's disease. *J. Neural Transm.* 106, 499-511.
- Biver,F., Lotstra,F., Monclus,M., Wikler,D., Damhaut,P., Mendlewicz,J., and Goldman,S. (1996). Sex difference in 5HT2 receptor in the living human brain. *Neurosci. Lett.* 204, 25-28.
- Bjellqvist,B., Ek,K., Righetti,P.G., Gianazza,E., Gorg,A., Westermeier,R., and Postel,W. (1982). Isoelectric focusing in immobilized pH gradients: principle, methodology and some applications. *J. Biochem. Biophys. Methods* 6, 317-339.
- Blackstock,W.P. and Weir,M.P. (1999). Proteomics: quantitative and physical mapping of cellular proteins. *Trends Biotechnol.* 17, 121-127.

- Blair-West,G.W. and Mellsop,G.W. (2001). Major depression: does a gender-based down-rating of suicide risk challenge its diagnostic validity? *Aust. N. Z. J. Psychiatry* 35, 322-328.
- Block,E.R. and Edwards,D. (1987). Effect of plasma membrane fluidity on serotonin transport by endothelial cells. *Am. J. Physiol* 253, C672-C678.
- Bosetti,F., Brizzi,F., Barogi,S., Mancuso,M., Siciliano,G., Tendi,E.A., Murri,L., Rapoport,S.I., and Solaini,G. (2002). Cytochrome c oxidase and mitochondrial F1F0-ATPase (ATP synthase) activities in platelets and brain from patients with Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging* 23, 371-376.
- Bottcher,T., Goiny,M., Bering,J., Domhof,S., Nau,R., and Ungerstedt,U. (2003). Regional differences in glutamine synthetase inhibition by L-methionine sulfoximine: a microdialysis study in the rabbit brain. *Exp. Brain Res.* 150, 194-200.
- Bowden,C., Cheetham,S.C., Lowther,S., Katona,C.L., Crompton,M.R., and Horton,R.W. (1997). Reduced dopamine turnover in the basal ganglia of depressed suicides. *Brain Res.* 769, 135-140.
- Bown,C., Wang,J.F., MacQueen,G., and Young,L.T. (2000). Increased temporal cortex ER stress proteins in depressed subjects who died by suicide. *Neuropsychopharmacology* 22, 327-332.
- Boyd-Kimball,D., Sultana,R., Fai,P.H., Lynn,B.C., Casamenti,F., Pepeu,G., Klein,J.B., and Butterfield,D.A. (2005). Proteomic identification of proteins specifically oxidized by intracerebral injection of amyloid beta-peptide (1-42) into rat brain: Implications for Alzheimer's disease. *Neuroscience* 132, 313-324.
- Brent,D.A., Bridge,J., Johnson,B.A., and Connolly,J. (1996). Suicidal behavior runs in families. A controlled family study of adolescent suicide victims. *Arch. Gen. Psychiatry* 53, 1145-1152.
- Bruneau,E.G., McCullumsmith,R.E., Haroutunian,V., Davis,K.L., and Meador-Woodruff,J.H. (2005). Increased expression of glutaminase and glutamine synthetase mRNA in the thalamus in schizophrenia. *Schizophr. Res.* 75, 27-34.
- Bunney,T.D., van Walraven,H.S., and de Boer,A.H. (2001). 14-3-3 protein is a regulator of the mitochondrial and chloroplast ATP synthase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 98, 4249-4254.
- Butterfield D.A., Stadtman E. R. Protein Oxidation Processes in Aging Brain. *Adv.Cell Aging Gerontol.* 2, 161-191. 1997.
Ref Type: Magazine Article
- Butterfield,D.A. (2002). Amyloid beta-peptide (1-42)-induced oxidative stress and neurotoxicity: implications for neurodegeneration in Alzheimer's disease brain. A review. *Free Radic. Res.* 36, 1307-1313.
- Cacioppo,J.T., Berntson,G.G., Malarkey,W.B., Kiecolt-Glaser,J.K., Sheridan,J.F., Poehlmann,K.M., Bureson,M.H., Ernst,J.M., Hawkey,L.C., and Glaser,R. (1998). Autonomic, neuroendocrine, and immune responses to psychological stress: the reactivity hypothesis. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 840, 664-673.

- Carstensen,O., Rasmussen,K., Hansen,O.N., and Lauritsen,J.M. (1999). [Development of post-traumatic stress following severe work-related accidents]. *Ugeskr. Laeger* 161, 1249-1253.
- Carter,J., Gragerov,A., Konvicka,K., Elder,G., Weinstein,H., and Lazzarini,R.A. (1998). Neurofilament (NF) assembly; divergent characteristics of human and rodent NF-L subunits. *J. Biol. Chem.* 273, 5101-5108.
- Cases,O., Seif,I., Grimsby,J., Gaspar,P., Chen,K., Pournin,S., Muller,U., Aguet,M., Babinet,C., Shih,J.C., and . (1995). Aggressive behavior and altered amounts of brain serotonin and norepinephrine in mice lacking MAOA. *Science* 268, 1763-1766.
- Castegna,A., Aksenov,M., Thongboonkerd,V., Klein,J.B., Pierce,W.M., Booze,R., Markesbery,W.R., and Butterfield,D.A. (2002). Proteomic identification of oxidatively modified proteins in Alzheimer's disease brain. Part II: dihydropyrimidinase-related protein 2, alpha-enolase and heat shock cognate 71. *J. Neurochem.* 82, 1524-1532.
- Cernak,I., Savic,V., Kotur,J., Prokic,V., Kuljic,B., Grbovic,D., and Veljovic,M. (2000). Alterations in magnesium and oxidative status during chronic emotional stress. *Magnes. Res.* 13, 29-36.
- Chandrasekaran,K., Hatanpaa,K., Rapoport,S.I., and Brady,D.R. (1997). Decreased expression of nuclear and mitochondrial DNA-encoded genes of oxidative phosphorylation in association neocortex in Alzheimer disease. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 44, 99-104.
- Chen,W., Ji,J., Xu,X., He,S., and Ru,B. (2003). Proteomic comparison between human young and old brains by two-dimensional gel electrophoresis and identification of proteins. *Int. J. Dev. Neurosci.* 21, 209-216.
- Chow,T.W. (2000). Personality in frontal lobe disorders. *Curr. Psychiatry Rep.* 2, 446-451.
- Chung,R.S., McCormack,G.H., King,A.E., West,A.K., and Vickers,J.C. (2005). Glutamate induces rapid loss of axonal neurofilament proteins from cortical neurons in vitro. *Exp. Neurol.* 193, 481-488.
- Clayton,P.J. (1985). Suicide. *Psychiatr. Clin. North Am.* 8, 203-214.
- Coffey,J.W., Heath,R.G., and Guschwan,A.F. (1970). Serum creatine kinase, aldolase, and copper in acute and chronic schizophrenics. *Biol. Psychiatry* 2, 331-339.
- Collins,S. and Cutcliffe,J.R. (2003). Addressing hopelessness in people with suicidal ideation: building upon the therapeutic relationship utilizing a cognitive behavioural approach. *J. Psychiatr. Ment. Health Nurs.* 10, 175-185.
- Conner,K.R., Duberstein,P.R., Conwell,Y., Seidlitz,L., and Caine,E.D. (2001). Psychological vulnerability to completed suicide: a review of empirical studies. *Suicide Life Threat. Behav.* 31, 367-385.
- Cooper,E.H. (1994). Neuron-specific enolase. *Int. J. Biol. Markers* 9, 205-210.
- Cooper,S.J., Kelly,C.B., and King,D.J. (1992). 5-Hydroxyindoleacetic acid in cerebrospinal fluid and prediction of suicidal behaviour in schizophrenia. *Lancet* 340, 940-941.

Correa, H. Research on serotonin and suicidal behaviour: neuroendocrine and molecular approaches. *Dialogues in Clinical Neuroscience* 4[4], 408-416. 2002.

Ref Type: Generic

Correa,H., Duval,F., Mokrani,M.C., Bailey,P., Tremeau,F., Staner,L., Diep,T.S., Crocq,M.A., and Macher,J.P. (2002). Serotonergic function and suicidal behavior in schizophrenia. *Schizophr. Res.* 56, 75-85.

Coryell,W. and Schlessner,M. (2001). The dexamethasone suppression test and suicide prediction. *Am. J. Psychiatry* 158, 748-753.

Cotter,D., Mackay,D., Landau,S., Kerwin,R., and Everall,I. (2001a). Reduced glial cell density and neuronal size in the anterior cingulate cortex in major depressive disorder. *Arch. Gen. Psychiatry* 58, 545-553.

Cotter,D.R., Pariante,C.M., and Everall,I.P. (2001b). Glial cell abnormalities in major psychiatric disorders: the evidence and implications. *Brain Res. Bull.* 55, 585-595.

Coyle,J.T. (1996). The glutamatergic dysfunction hypothesis for schizophrenia. *Harv. Rev. Psychiatry* 3, 241-253.

Coyle,J.T. and Schwarcz,R. (2000). Mind glue: implications of glial cell biology for psychiatry. *Arch. Gen. Psychiatry* 57, 90-93.

Cui,K., Luo,X., Xu,K., and Ven Murthy,M.R. (2004). Role of oxidative stress in neurodegeneration: recent developments in assay methods for oxidative stress and nutraceutical antioxidants. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* 28, 771-799.

Dakhale,G., Khanzode,S., Khanzode,S., Saoji,A., Khobragade,L., and Turankar,A. (2004). Oxidative damage and schizophrenia: the potential benefit by atypical antipsychotics. *Neuropsychobiology* 49, 205-209.

Damasio,H., Grabowski,T., Frank,R., Galaburda,A.M., and Damasio,A.R. (1994). The return of Phineas Gage: clues about the brain from the skull of a famous patient. *Science* 264, 1102-1105.

Das,A.M. (2003). Regulation of the mitochondrial ATP-synthase in health and disease. *Mol. Genet. Metab* 79, 71-82.

Dave,V. and Kimelberg,H.K. (1994). Na(+)-dependent, fluoxetine-sensitive serotonin uptake by astrocytes tissue-printed from rat cerebral cortex. *J. Neurosci.* 14, 4972-4986.

David A. The Human Brain Revisited: Opportunities and Challenges in Postmortem Studies of Psychiatric Disorders. *Neuropsychopharmacology* 26[2], 143-154. 2002.

Ref Type: Magazine Article

De Leo,M.E., Borrello,S., Passantino,M., Palazzotti,B., Mordente,A., Daniele,A., Filippini,V., Galeotti,T., and Masullo,C. (1998). Oxidative stress and overexpression of manganese superoxide dismutase in patients with Alzheimer's disease. *Neurosci. Lett.* 250, 173-176.

- Dean,B., Hayes,W., Hill,C., and Copolov,D. (1998). Decreased serotonin_{2A} receptors in Brodmann's area 9 from schizophrenic subjects. A pathological or pharmacological phenomenon? *Mol. Chem. Neuropathol.* *34*, 133-145.
- Deckert,J., Catalano,M., Syagailo,Y.V., Bosi,M., Okladnova,O., Di Bella,D., Nothen,M.M., Maffei,P., Franke,P., Fritze,J., Maier,W., Propping,P., Beckmann,H., Bellodi,L., and Lesch,K.P. (1999). Excess of high activity monoamine oxidase A gene promoter alleles in female patients with panic disorder. *Hum. Mol. Genet.* *8*, 621-624.
- Deloulme,J.C., Helies,A., Ledig,M., Lucas,M., and Sensenbrenner,M. (1997). A comparative study of the distribution of alpha- and gamma-enolase subunits in cultured rat neural cells and fibroblasts. *Int. J. Dev. Neurosci.* *15*, 183-194.
- Dinan,T.G. (1996). Serotonin and the regulation of hypothalamic-pituitary-adrenal axis function. *Life Sci.* *58*, 1683-1694.
- Djordjevic,V.B. (2004). Free radicals in cell biology. *Int. Rev. Cytol.* *237*, 57-89.
- Dunn (1987). *Advances in electrophoresis.*, D.R.Chrambach , ed. (Weinheim: VCH).
- Durkheim (1997). *Der Selbstmord (Original: Le suicide, 1897).* Suhrkamp Verlag, Frankfurt).
- Dutta,S., Chiu,Y.C., Probert,A.W., and Wang,K.K. (2002). Selective release of calpain produced alphaII-spectrin (alpha-fodrin) breakdown products by acute neuronal cell death. *Biol. Chem.* *383*, 785-791.
- Dwivedi,Y., Rao,J.S., Rizavi,H.S., Kotowski,J., Conley,R.R., Roberts,R.C., Tamminga,C.A., and Pandey,G.N. (2003a). Abnormal expression and functional characteristics of cyclic adenosine monophosphate response element binding protein in post-mortem brain of suicide subjects. *Arch. Gen. Psychiatry* *60*, 273-282.
- Dwivedi,Y., Rizavi,H.S., Conley,R.R., Roberts,R.C., Tamminga,C.A., and Pandey,G.N. (2002). mRNA and protein expression of selective alpha subunits of G proteins are abnormal in prefrontal cortex of suicide victims. *Neuropsychopharmacology* *27*, 499-517.
- Dwivedi,Y., Rizavi,H.S., Conley,R.R., Roberts,R.C., Tamminga,C.A., and Pandey,G.N. (2003b). Altered gene expression of brain-derived neurotrophic factor and receptor tyrosine kinase B in postmortem brain of suicide subjects. *Arch. Gen. Psychiatry* *60*, 804-815.
- Eng,L.F. and Ghirnikar,R.S. (1994). GFAP and astrogliosis. *Brain Pathol.* *4*, 229-237.
- Eng,L.F., Ghirnikar,R.S., and Lee,Y.L. (2000). Glial fibrillary acidic protein: GFAP-thirty-one years (1969-2000). *Neurochem. Res.* *25*, 1439-1451.
- Escriba,P.V., Ozaita,A., and Garcia-Sevilla,J.A. (2004). Increased mRNA expression of alpha_{2A}-adrenoceptors, serotonin receptors and mu-opioid receptors in the brains of suicide victims. *Neuropsychopharmacology* *29*, 1512-1521.
- Esquirol,J.E.D. (1838). *Des maladies mentales (Deutsch: Von den Geisteskrankheiten).* (Paris: Bern: Huber, 1968).

- Fawcett, J. (1992). Suicide risk factors in depressive disorders and in panic disorder. *J. Clin. Psychiatry* *53 Suppl*, 9-13.
- Feinstein, S.C. and Wilson, L. (2005). Inability of tau to properly regulate neuronal microtubule dynamics: a loss-of-function mechanism by which tau might mediate neuronal cell death. *Biochim. Biophys. Acta* *1739*, 268-279.
- Fenn, J.B., Mann, M., Meng, C.K., Wong, S.F., and Whitehouse, C.M. (1989). Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. *Science* *246*, 64-71.
- Ferrer-Alcon, M., Garcia-Sevilla, J.A., Jaquet, P.E., La Harpe, R., Riederer, B.M., Walzer, C., and Guimon, J. (2000). Regulation of nonphosphorylated and phosphorylated forms of neurofilament proteins in the prefrontal cortex of human opioid addicts. *J. Neurosci. Res.* *61*, 338-349.
- Feuerlein, W. (1971). [Attempted suicide or parasuicidal action? Tendency of suicidal behavior]. *Nervenarzt* *42*, 127-130.
- Flugge, G., Van Kampen, M., and Mijster, M.J. (2004). Perturbations in brain monoamine systems during stress. *Cell Tissue Res.* *315*, 1-14.
- Fontella, F.U., Siqueira, I.R., Vasconcellos, A.P., Tabajara, A.S., Netto, C.A., and Dalmaz, C. (2005). Repeated restraint stress induces oxidative damage in rat hippocampus. *Neurochem. Res.* *30*, 105-111.
- Ford, M.G., Weimar, T., Kohli, T., and Woods, R.J. (2003). Molecular dynamics simulations of galectin-1-oligosaccharide complexes reveal the molecular basis for ligand diversity. *Proteins* *53*, 229-240.
- Forss-Petter, S., Danielson, P., and Sutcliffe, J.G. (1986). Neuron-specific enolase: complete structure of rat mRNA, multiple transcriptional start sites, and evidence suggesting post-transcriptional control. *J. Neurosci. Res.* *16*, 141-156.
- Fountoulakis, M., Hardmeier, R., Hoger, H., and Lubec, G. (2001). Postmortem changes in the level of brain proteins. *Exp. Neurol.* *167*, 86-94.
- Fuchs, E. and Weber, K. (1994). Intermediate filaments: structure, dynamics, function, and disease. *Annu. Rev. Biochem.* *63*, 345-382.
- Fuller, R.W. (1992). The involvement of serotonin in regulation of pituitary-adrenocortical function. *Front Neuroendocrinol.* *13*, 250-270.
- Gabriele, J.P., Chong, V.Z., Pontoriero, G.F., and Mishra, R.K. (2005). Decreased expression of a 40-kDa catecholamine-regulated protein in the ventral striatum of schizophrenic brain specimens from the Stanley Foundation Neuropathology Consortium. *Schizophr. Res.* *74*, 111-119.
- Garcia-Sevilla, J.A., Ventayol, P., Busquets, X., La Harpe, R., Walzer, C., and Guimon, J. (1997). Marked decrease of immunolabelled 68 kDa neurofilament (NF-L) proteins in brains of opiate addicts. *Neuroreport* *8*, 1561-1565.
- Gardner, D.L., Lucas, P.B., and Cowdry, R.W. (1990). CSF metabolites in borderline personality disorder compared with normal controls. *Biol. Psychiatry* *28*, 247-254.

- Garton,M.J., Keir,G., Lakshmi,M.V., and Thompson,E.J. (1991). Age-related changes in cerebrospinal fluid protein concentrations. *J. Neurol. Sci.* 104, 74-80.
- George,D.T., Rawlings,R.R., Williams,W.A., Phillips,M.J., Fong,G., Kerich,M., Momenan,R., Umhau,J.C., and Hommer,D. (2004). A select group of perpetrators of domestic violence: evidence of decreased metabolism in the right hypothalamus and reduced relationships between cortical/subcortical brain structures in position emission tomography. *Psychiatry Res.* 130, 11-25.
- Gershon,E.S. (2000). Bipolar illness and schizophrenia as oligogenic diseases: implications for the future. *Biol. Psychiatry* 47, 240-244.
- Giorgetti,M. and Tecott,L.H. (2004). Contributions of 5-HT(2C) receptors to multiple actions of central serotonin systems. *Eur. J. Pharmacol.* 488, 1-9.
- Glick,S.D., Merski,C., Steindorf,S., Wang,S., Keller,R.W., and Carlson,J.N. (1992). Neurochemical predisposition to self-administer morphine in rats. *Brain Res.* 578, 215-220.
- Goethals,I., Audenaert,K., Jacobs,F., Van den,E.F., Bernagie,K., Kolindou,A., Vervaet,M., Dierckx,R., and Van Heeringen,C. (2005). Brain perfusion SPECT in impulsivity-related personality disorders. *Behav. Brain Res.* 157, 187-192.
- Goldbaum,O. and Richter-Landsberg,C. (2001). Stress proteins in oligodendrocytes: differential effects of heat shock and oxidative stress. *J. Neurochem.* 78, 1233-1242.
- Golier,J.A., Marzuk,P.M., Leon,A.C., Weiner,C., and Tardiff,K. (1995). Low serum cholesterol level and attempted suicide. *Am. J. Psychiatry* 152, 419-423.
- Gonzalez-Maeso,J., Rodriguez-Puertas,R., Meana,J.J., Garcia-Sevilla,J.A., and Guimon,J. (2002). Neurotransmitter receptor-mediated activation of G-proteins in brains of suicide victims with mood disorders: selective supersensitivity of alpha(2A)-adrenoceptors. *Mol. Psychiatry* 7, 755-767.
- Good,P.F., Hsu,A., Werner,P., Perl,D.P., and Olanow,C.W. (1998). Protein nitration in Parkinson's disease. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 57, 338-342.
- Gougerot-Podicalo,M.A., Elbim,C., and Chollet-Martin,S. (1996). [Modulation of the oxidative burst of human neutrophils by pro- and anti-inflammatory cytokines]. *Pathol. Biol. (Paris)* 44, 36-41.
- Grafton,S.T. (2000). PET: activation of cerebral blood flow and glucose metabolism. *Adv. Neurol.* 83, 87-103.
- Grant,P. and Pant,H.C. (2000). Neurofilament protein synthesis and phosphorylation. *J. Neurocytol.* 29, 843-872.
- Greber,S., Lubec,G., Cairns,N., and Fountoulakis,M. (1999). Decreased levels of synaptosomal associated protein 25 in the brain of patients with Down syndrome and Alzheimer's disease. *Electrophoresis* 20, 928-934.
- Gross-Isseroff,R., Biegon,A., Voet,H., and Weizman,A. (1998). The suicide brain: a review of postmortem receptor/transporter binding studies. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 22, 653-661.

- Gross-Isseroff, R., Dillon, K.A., Israeli, M., and Biegon, A. (1990). Regionally selective increases in mu opioid receptor density in the brains of suicide victims. *Brain Res.* *530*, 312-316.
- Grune, T., Jung, T., Merker, K., and Davies, K.J. (2004). Decreased proteolysis caused by protein aggregates, inclusion bodies, plaques, lipofuscin, ceroid, and 'aggresomes' during oxidative stress, aging, and disease. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* *36*, 2519-2530.
- Gygi, S.P., Rochon, Y., Franza, B.R., and Aebersold, R. (1999). Correlation between protein and mRNA abundance in yeast. *Mol. Cell Biol.* *19*, 1720-1730.
- Haghighi, A.Z. and Maples, K.R. (1996). On the mechanism of the inhibition of glutamine synthetase and creatine phosphokinase by methionine sulfoxide. *J. Neurosci. Res.* *43*, 107-111.
- Hall, R.C., Platt, D.E., and Hall, R.C. (1999). Suicide risk assessment: a review of risk factors for suicide in 100 patients who made severe suicide attempts. Evaluation of suicide risk in a time of managed care. *Psychosomatics* *40*, 18-27.
- Hardy, J.A., Wester, P., Winblad, B., Gezelius, C., Bring, G., and Eriksson, A. (1985). The patients dying after long terminal phase have acidotic brains; implications for biochemical measurements on autopsy tissue. *J. Neural Transm.* *61*, 253-264.
- Harrison, P.J. (2004). The hippocampus in schizophrenia: a review of the neuropathological evidence and its pathophysiological implications. *Psychopharmacology (Berl)* *174*, 151-162.
- Harrison, P.J., Heath, P.R., Eastwood, S.L., Burnet, P.W., McDonald, B., and Pearson, R.C. (1995). The relative importance of premortem acidosis and postmortem interval for human brain gene expression studies: selective mRNA vulnerability and comparison with their encoded proteins. *Neurosci. Lett.* *200*, 151-154.
- Hatakeyama, S. and Nakayama, K.I. (2003). Ubiquitylation as a quality control system for intracellular proteins. *J. Biochem. (Tokyo)* *134*, 1-8.
- Hellhammer, D.H. and Wade, S. (1993). Endocrine correlates of stress vulnerability. *Psychother. Psychosom.* *60*, 8-17.
- Henriksson, M.M., Aro, H.M., Marttunen, M.J., Heikkinen, M.E., Isometsa, E.T., Kuopasalmi, K.I., and Lonnqvist, J.K. (1993). Mental disorders and comorbidity in suicide. *Am. J. Psychiatry* *150*, 935-940.
- Hirst, W.D., Cheung, N.Y., Rattray, M., Price, G.W., and Wilkin, G.P. (1998). Cultured astrocytes express messenger RNA for multiple serotonin receptor subtypes, without functional coupling of 5-HT₁ receptor subtypes to adenylyl cyclase. *Brain Res. Mol. Brain Res.* *61*, 90-99.
- Hjelmeland, H., Hawton, K., Nordvik, H., Bille-Brahe, U., De Leo, D., Fekete, S., Grad, O., Haring, C., Kerkhof, J.F., Lonnqvist, J., Michel, K., Renberg, E.S., Schmidtke, A., van Heeringen, K., and Wasserman, D. (2002). Why people engage in parasuicide: a cross-cultural study of intentions. *Suicide Life Threat. Behav.* *32*, 380-393.
- Hoffman, P.N. (1988). Distinct roles of neurofilament and tubulin gene expression in axonal growth. *Ciba Found. Symp.* *138*, 192-204.

- Hoffman,P.N., Lopata,M.A., Watson,D.F., and Luduena,R.F. (1992). Axonal transport of class II and III beta-tubulin: evidence that the slow component wave represents the movement of only a small fraction of the tubulin in mature motor axons. *J. Cell Biol.* *119*, 595-604.
- Hojlund,K., Wrzesinski,K., Larsen,P.M., Fey,S.J., Roepstorff,P., Handberg,A., Dela,F., Vinten,J., McCormack,J.G., Reynet,C., and Beck-Nielsen,H. (2003). Proteome analysis reveals phosphorylation of ATP synthase beta -subunit in human skeletal muscle and proteins with potential roles in type 2 diabetes. *J. Biol. Chem.* *278*, 10436-10442.
- Horie,H. and Kadoya,T. (2004). Galectin-1 plays essential roles in adult mammalian nervous tissues. Roles of oxidized galectin-1. *Glycoconj. J.* *19*, 479-489.
- Horwitz,J. (2003). Alpha-crystallin. *Exp. Eye Res.* *76*, 145-153.
- Hsiung,S.C., Adlersberg,M., Arango,V., Mann,J.J., Tamir,H., and Liu,K.P. (2003). Attenuated 5-HT1A receptor signaling in brains of suicide victims: involvement of adenyl cyclase, phosphatidylinositol 3-kinase, Akt and mitogen-activated protein kinase. *J. Neurochem.* *87*, 182-194.
- Hsu,D.K. and Liu,F.T. (2004). Regulation of cellular homeostasis by galectins. *Glycoconj. J.* *19*, 507-515.
- Huang,J., Kato,K., Shibata,E., Hisanaga,N., Ono,Y., and Takeuchi,Y. (1990). Effects of subacute toluene exposure on neuronal and glial marker proteins in rat brain. *Toxicology* *61*, 109-117.
- Huang,Y.Y., Grailhe,R., Arango,V., Hen,R., and Mann,J.J. (1999). Relationship of psychopathology to the human serotonin1B genotype and receptor binding kinetics in postmortem brain tissue. *Neuropsychopharmacology* *21*, 238-246.
- Husi,H. and Grant,S.G. (2001). Isolation of 2000-kDa complexes of N-methyl-D-aspartate receptor and postsynaptic density 95 from mouse brain. *J. Neurochem.* *77*, 281-291.
- Husi,H., Ward,M.A., Choudhary,J.S., Blackstock,W.P., and Grant,S.G. (2000). Proteomic analysis of NMDA receptor-adhesion protein signaling complexes. *Nat. Neurosci.* *3*, 661-669.
- Hynd,M.R., Lewohl,J.M., Scott,H.L., and Dodd,P.R. (2003). Biochemical and molecular studies using human autopsy brain tissue. *J. Neurochem.* *85*, 543-562.
- Ikonomidou,C. and Turski,L. (1995). Excitotoxicity and neurodegenerative diseases. *Curr. Opin. Neurol.* *8*, 487-497.
- Inagaki,M., Gonda,Y., Nishizawa,K., Kitamura,S., Sato,C., Ando,S., Tanabe,K., Kikuchi,K., Tsuiki,S., and Nishi,Y. (1990). Phosphorylation sites linked to glial filament disassembly in vitro locate in a non-alpha-helical head domain. *J. Biol. Chem.* *265*, 4722-4729.
- Inagaki,M., Nakamura,Y., Takeda,M., Nishimura,T., and Inagaki,N. (1994). Glial fibrillary acidic protein: dynamic property and regulation by phosphorylation. *Brain Pathol.* *4*, 239-243.

- Isometsa,E.T., Henriksson,M.M., Aro,H.M., Heikkinen,M.E., Kuoppasalmi,K.I., and Lonnqvist,J.K. (1994). Suicide in major depression. *Am. J. Psychiatry* *151*, 530-536.
- Ito,H., Inaguma,Y., and Kato,K. (2003). [Small heat shock proteins participate in the regulation of cellular aggregates of misfolded protein]. *Nippon Yakurigaku Zasshi* *121*, 27-32.
- Iwaki,T., Iwaki,A., Tateishi,J., Sakaki,Y., and Goldman,J.E. (1993). Alpha B-crystallin and 27-kd heat shock protein are regulated by stress conditions in the central nervous system and accumulate in Rosenthal fibers. *Am. J. Pathol.* *143*, 487-495.
- Iwangoff,P., Armbruster,R., Enz,A., and Meier-Ruge,W. (1980). Glycolytic enzymes from human autoptic brain cortex: normal aged and demented cases. *Mech. Ageing Dev.* *14*, 203-209.
- Jacque,C.M. (1991). [The glial fibrillary acidic protein]. *Presse Med.* *20*, 1384-1390.
- Jellinger,K.A. (2000). Cell death mechanisms in Parkinson's disease. *J. Neural Transm.* *107*, 1-29.
- Johnsson,P. (1996). Markers of cerebral ischemia after cardiac surgery. *J. Cardiothorac. Vasc. Anesth.* *10*, 120-126.
- Johnston-Wilson,N.L., Sims,C.D., Hofmann,J.P., Anderson,L., Shore,A.D., Torrey,E.F., and Yolken,R.H. (2000). Disease-specific alterations in frontal cortex brain proteins in schizophrenia, bipolar disorder, and major depressive disorder. The Stanley Neuropathology Consortium. *Mol. Psychiatry* *5*, 142-149.
- Joyce,J.N., Lexow,N., Kim,S.J., Artymyshyn,R., Senzon,S., Lawrence,D., Cassanova,M.F., Kleinman,J.E., Bird,E.D., and Winokur,A. (1992). Distribution of beta-adrenergic receptor subtypes in human post-mortem brain: alterations in limbic regions of schizophrenics. *Synapse* *10*, 228-246.
- Kadoya,T., Oyanagi,K., Kawakami,E., Hasegawa,M., Inagaki,Y., Sohma,Y., and Horie,H. (2005). Oxidized galectin-1 advances the functional recovery after peripheral nerve injury. *Neurosci. Lett.* *380*, 284-288.
- Kamali,M., Oquendo,M.A., and Mann,J.J. (2001). Understanding the neurobiology of suicidal behavior. *Depress. Anxiety.* *14*, 164-176.
- Kang,D. and Hamasaki,N. (2003). Mitochondrial oxidative stress and mitochondrial DNA. *Clin. Chem. Lab Med.* *41*, 1281-1288.
- Karas,M. and Hillenkamp,F. (1988). Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons. *Anal. Chem.* *60*, 2299-2301.
- Katerina,Z., Andrew,K., Filomena,M., and Xu-Feng,H. (2004). Investigation of m1/m4 muscarinic receptors in the anterior cingulate cortex in schizophrenia, bipolar disorder, and major depression disorder. *Neuropsychopharmacology* *29*, 619-625.
- Keller,A., Berod,A., Dussailant,M., Lamande,N., Gros,F., and Lucas,M. (1994). Coexpression of alpha and gamma enolase genes in neurons of adult rat brain. *J. Neurosci. Res.* *38*, 493-504.

- Kelly,T.M., Lynch,K.G., Donovan,J.E., and Clark,D.B. (2001). Alcohol use disorders and risk factor interactions for adolescent suicidal ideation and attempts. *Suicide Life Threat. Behav.* *31*, 181-193.
- Kerkhof (1994). Attempted suicide in Europe. Findings from the multicenter study in parasuicide by the WHO regional office for Europe. (Leiden University/Niederlande: DSWO Press).
- Kesavapany,S., Li,B.S., and Pant,H.C. (2003). Cyclin-dependent kinase 5 in neurofilament function and regulation. *Neurosignals.* *12*, 252-264.
- Kim,J.J., Lee,S.J., Toh,K.Y., Lee,C.U., Lee,C., and Paik,I.H. (2001a). Identification of antibodies to heat shock proteins 90 kDa and 70 kDa in patients with schizophrenia. *Schizophr. Res.* *52*, 127-135.
- Kim,S.H., Fountoulakis,M., Cairns,N., and Lubec,G. (2001b). Protein levels of human peroxiredoxin subtypes in brains of patients with Alzheimer's disease and Down syndrome. *J. Neural Transm. Suppl* 223-235.
- Kitamura,Y., Taniguchi,T., and Shimohama,S. (1999). Apoptotic cell death in neurons and glial cells: implications for Alzheimer's disease. *Jpn. J. Pharmacol.* *79*, 1-5.
- Kittur,S., Hoh,J., Endo,H., Tourtellotte,W., Weeks,B.S., Markesbery,W., and Adler,W. (1994). Cytoskeletal neurofilament gene expression in brain tissue from Alzheimer's disease patients. I. Decrease in NF-L and NF-M message. *J. Geriatr. Psychiatry Neurol.* *7*, 153-158.
- Klimek,V., Stockmeier,C., Overholser,J., Meltzer,H.Y., Kalka,S., Dilley,G., and Ordway,G.A. (1997). Reduced levels of norepinephrine transporters in the locus coeruleus in major depression. *J. Neurosci.* *17*, 8451-8458.
- Klose,J. (1975). Protein mapping by combined isoelectric focusing and electrophoresis of mouse tissues. A novel approach to testing for induced point mutations in mammals. *Humangenetik.* *26*, 231-243.
- Knable,M.B. (1999). Schizophrenia and bipolar disorder: findings from studies of the Stanley Foundation Brain Collection. *Schizophr. Res.* *39*, 149-152.
- Knable,M.B., Barci,B.M., Webster,M.J., Meador-Woodruff,J., and Torrey,E.F. (2004). Molecular abnormalities of the hippocampus in severe psychiatric illness: postmortem findings from the Stanley Neuropathology Consortium. *Mol. Psychiatry* *9*, 609-20, 544.
- Koeck,T., Levison,B., Hazen,S.L., Crabb,J.W., Stuehr,D.J., and Aulak,K.S. (2004). Tyrosine nitration impairs mammalian aldolase A activity. *Mol. Cell Proteomics.* *3*, 548-557.
- Kosako,H., Amano,M., Yanagida,M., Tanabe,K., Nishi,Y., Kaibuchi,K., and Inagaki,M. (1997). Phosphorylation of glial fibrillary acidic protein at the same sites by cleavage furrow kinase and Rho-associated kinase. *J. Biol. Chem.* *272*, 10333-10336.
- Kosik,K.S., Gilbert,J.M., Selkoe,D.J., and Strocchi,P. (1982). Characterization of postmortem human brain proteins by two-dimensional gel electrophoresis. *J. Neurochem.* *39*, 1529-1538.

- Kposowa,A.J. (2000). Marital status and suicide in the National Longitudinal Mortality Study. *J. Epidemiol. Community Health* *54* , 254-261.
- Krapfenbauer,K., Engidawork,E., Cairns,N., Fountoulakis,M., and Lubec,G. (2003). Aberrant expression of peroxiredoxin subtypes in neurodegenerative disorders. *Brain Res.* *967*, 152-160.
- Kreitmann (1986). Die Epidemiologie des Suizids und Parasuizids. In *Psychiatrie der Gegenwart, Band 2. Krisenintervention. Suizid, Konsiliarpsychiatrie.*, P.e.al.KISKER, ed. (Berlin, Heidelberg: Springer), pp. 87-106.
- Kuloglu,M., Atmaca,M., Tezcan,E., Ustundag,B., and Bulut,S. (2002a). Antioxidant enzyme and malondialdehyde levels in patients with panic disorder. *Neuropsychobiology* *46*, 186-189.
- Kuloglu,M., Ustundag,B., Atmaca,M., Canatan,H., Tezcan,A.E., and Cinkilinc,N. (2002b). Lipid peroxidation and antioxidant enzyme levels in patients with schizophrenia and bipolar disorder. *Cell Biochem. Funct.* *20*, 171-175.
- Kunugi,H., Takei,N., Aoki,H., and Nanko,S. (1997). Low serum cholesterol in suicide attempters. *Biol. Psychiatry* *41*, 196-200.
- Kyosseva,S.V., Elbein,A.D., Griffin,W.S., Mrak,R.E., Lyon,M., and Karson,C.N. (1999). Mitogen-activated protein kinases in schizophrenia. *Biol. Psychiatry* *46*, 689-696.
- Lalovic,A. and Turecki,G. (2002). Meta-analysis of the association between tryptophan hydroxylase and suicidal behavior. *Am. J. Med. Genet.* *114*, 533-540.
- Langen,H., Berndt,P., Roder,D., Cairns,N., Lubec,G., and Fountoulakis,M. (1999). Two-dimensional map of human brain proteins. *Electrophoresis* *20*, 907-916.
- Lee,M.K., Xu,Z., Wong,P.C., and Cleveland,D.W. (1993). Neurofilaments are obligate heteropolymers in vivo. *J. Cell Biol.* *122*, 1337-1350.
- Lemond,S., Turecki,G., Bakish,D., Du,L., Hrdina,P.D., Bown,C.D., Sequeira,A., Kushwaha,N., Morris,S.J., Basak,A., Ou,X.M., and Albert,P.R. (2003). Impaired repression at a 5-hydroxytryptamine 1A receptor gene polymorphism associated with major depression and suicide. *J. Neurosci.* *23*, 8788-8799.
- Lester,D. (1992). The dexamethasone suppression test as an indicator of suicide: a meta-analysis. *Pharmacopsychiatry* *25*, 265-270.
- Levi,G., Patrizio,M., Bernardo,A., Petrucci,T.C., and Agresti,C. (1993). Human immunodeficiency virus coat protein gp120 inhibits the beta-adrenergic regulation of astroglial and microglial functions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *90*, 1541-1545.
- Lewis,D.A. and Akil,M. (1997). Cortical dopamine in schizophrenia: strategies for postmortem studies. *J. Psychiatr. Res.* *31*, 175-195.
- Leyva,J.A., Bianchet,M.A., and Amzel,L.M. (2003). Understanding ATP synthesis: structure and mechanism of the F1-ATPase (Review). *Mol. Membr. Biol.* *20*, 27-33.

- Li,X.Y., Xu,D., Phillips,M., Ji,H.Y., Xu,Y.C., and He,F.S. (2003). [Comparison of the characteristics of suicide attempters treated in general hospitals with and without prior suicide attempts]. *Zhonghua Nei Ke. Za Zhi.* 42, 861-864.
- Lidberg,L., Belfrage,H., Bertilsson,L., Evenden,M.M., and Asberg,M. (2000). Suicide attempts and impulse control disorder are related to low cerebrospinal fluid 5-HIAA in mentally disordered violent offenders. *Acta Psychiatr. Scand.* 101, 395-402.
- Liedtke,W., Edelman,W., Bieri,P.L., Chiu,F.C., Cowan,N.J., Kucherlapati,R., and Raine,C.S. (1996). GFAP is necessary for the integrity of CNS white matter architecture and long-term maintenance of myelination. *Neuron* 17, 607-615.
- Linnoila,M., Virkkunen,M., Scheinin,M., Nuutila,A., Rimon,R., and Goodwin,F.K. (1983). Low cerebrospinal fluid 5-hydroxyindoleacetic acid concentration differentiates impulsive from nonimpulsive violent behavior. *Life Sci.* 33, 2609-2614.
- Liu,F.T., Patterson,R.J., and Wang,J.L. (2002). Intracellular functions of galectins. *Biochim. Biophys. Acta* 1572, 263-273.
- Lubec,G., Krapfenbauer,K., and Fountoulakis,M. (2003). Proteomics in brain research: potentials and limitations. *Prog. Neurobiol.* 69, 193-211.
- Maddock,C. and Pariante,C.M. (2001). How does stress affect you? An overview of stress, immunity, depression and disease. *Epidemiol. Psychiatr. Soc.* 10, 153-162.
- Magistretti,P.J. (1999). Astrocytes Couple Synaptic Activity to Glucose Utilization in the Brain. *News Physiol Sci.* 14, 177-182.
- Maier M (1995). Genetik. In *Suizidalität-Die biologische Dimension*, Wolfersdorf M and Kaschka WP, eds. (Berlin Heidelberg NewYork: Springer).
- Mann,J.J. (1995). Violence and aggression. In *Psychopharmacology: The Fourth Generation of Progress*, F.E.Bloom and D.J.Kupfer, ed. (New York: Raven Press), pp. 1919-1928.
- Mann,J.J. (1998). The neurobiology of suicide. *Nat. Med.* 4, 25-30.
- Mann,J.J. (2003). Neurobiology of suicidal behaviour. *Nat. Rev. Neurosci.* 4, 819-828.
- Mann,J.J. and Arango,V. (1992). Integration of neurobiology and psychopathology in a unified model of suicidal behavior. *J. Clin. Psychopharmacol.* 12, 2S-7S.
- Mann,J.J., Brent,D.A., and Arango,V. (2001). The neurobiology and genetics of suicide and attempted suicide: a focus on the serotonergic system. *Neuropsychopharmacology* 24, 467-477.
- Mann,J.J. and Malone,K.M. (1997). Cerebrospinal fluid amines and higher-lethality suicide attempts in depressed inpatients. *Biol. Psychiatry* 41, 162-171.
- Mann,J.J., Waternaux,C., Haas,G.L., and Malone,K.M. (1999). Toward a clinical model of suicidal behavior in psychiatric patients. *Am. J. Psychiatry* 156, 181-189.
- Maris,R.W. (2002). Suicide. *Lancet* 360, 319-326.

- Martin,G., Haehnel,W., and Boger,P. (1997). Oxidative inactivation of glutamine synthetase from the cyanobacterium *Anabaena variabilis*. *J. Bacteriol.* *179*, 730-734.
- Massana,G., Serra-Grabulosa,J.M., Salgado-Pineda,P., Gasto,C., Junque,C., Massana,J., Mercader,J.M., Gomez,B., Tobena,A., and Salamero,M. (2003). Amygdalar atrophy in panic disorder patients detected by volumetric magnetic resonance imaging. *Neuroimage.* *19*, 80-90.
- Matsuda,Y., Higashiyama,S., Kijima,Y., Suzuki,K., Kawano,K., Akiyama,M., Kawata,S., Tarui,S., Deutsch,H.F., and Taniguchi,N. (1990). Human liver manganese superoxide dismutase. Purification and crystallization, subunit association and sulfhydryl reactivity. *Eur. J. Biochem.* *194*, 713-720.
- Matsuoka,Y., Nishizawa,K., Yano,T., Shibata,M., Ando,S., Takahashi,T., and Inagaki,M. (1992). Two different protein kinases act on a different time schedule as glial filament kinases during mitosis. *EMBO J.* *11*, 2895-2902.
- McEwen,B. and Lasley,E.N. (2003). Allostatic load: when protection gives way to damage. *Adv. Mind Body Med.* *19*, 28-33.
- McEwen,B.S. (2004). Protection and damage from acute and chronic stress: allostasis and allostatic overload and relevance to the pathophysiology of psychiatric disorders. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* *1032*, 1-7.
- McEwen,B.S. and Stellar,E. (1993). Stress and the individual. Mechanisms leading to disease. *Arch. Intern. Med.* *153*, 2093-2101.
- McGraw,J., McPhail,L.T., Oschipok,L.W., Horie,H., Poirier,F., Steeves,J.D., Ramer,M.S., and Tetzlaff,W. (2004). Galectin-1 in regenerating motoneurons. *Eur. J. Neurosci.* *20*, 2872-2880.
- McGuffin,P., Marusic,A., and Farmer,A. (2001). What can psychiatric genetics offer suicidology? *Crisis* *22*, 61-65.
- Meana,J.J., Barturen,F., and Garcia-Sevilla,J.A. (1992). Alpha 2-adrenoceptors in the brain of suicide victims: increased receptor density associated with major depression. *Biol. Psychiatry* *31*, 471-490.
- Meana,J.J. and Garcia-Sevilla,J.A. (1987). Increased alpha 2-adrenoceptor density in the frontal cortex of depressed suicide victims. *J. Neural Transm.* *70*, 377-381.
- Medina,J.M. and Taberner,A. (2005). Lactate utilization by brain cells and its role in CNS development. *J. Neurosci. Res.* *79*, 2-10.
- Meltzer,H. (1968). Creatine kinase and aldolase in serum: abnormality common to acute psychoses. *Science* *159*, 1368-1370.
- Merali,Z., Du,L., Hrdina,P., Palkovits,M., Faludi,G., Poulter,M.O., and Anisman,H. (2004). Dysregulation in the suicide brain: mRNA expression of corticotropin-releasing hormone receptors and GABA(A) receptor subunits in frontal cortical brain region. *J. Neurosci.* *24*, 1478-1485.
- Messier,C. and Gagnon,M. (1996). Glucose regulation and cognitive functions: relation to Alzheimer's disease and diabetes. *Behav. Brain Res.* *75*, 1-11.

- Messing,A., Head,M.W., Galles,K., Galbreath,E.J., Goldman,J.E., and Brenner,M. (1998). Fatal encephalopathy with astrocyte inclusions in GFAP transgenic mice. *Am. J. Pathol.* 152, 391-398.
- Mobley,P.L. and Combs,D.L. (1992). Norepinephrine-mediated protein phosphorylation in astrocytes. *Brain Res. Bull.* 29, 289-295.
- Möller HJ (1994). *Ambulante Betreuung von Patienten nach Suizidversuch.* (Regensburg: S. Roderer), p. 7.
- Moller,H.J. (1989). Efficacy of different strategies of aftercare for patients who have attempted suicide. *J. R. Soc. Med.* 82, 643-647.
- Möller,H.J. and Steinmeyer,E.M. (1994). Are serotonergic reuptake inhibitors more potent in reducing suicidality? An empirical study on paroxetine. *Eur. Neuropsychopharmacol.* 4, 55-59.
- Moore,C., Perry,A.C., Love,S., and Hall,L. (1996). Sequence analysis and immunolocalisation of phosphatidylethanolamine binding protein (PBP) in human brain tissue. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 37, 74-78.
- Moscicki,E.K. (1994). Gender differences in completed and attempted suicides. *Ann. Epidemiol.* 4, 152-158.
- Moscicki,E.K. (1997). Identification of suicide risk factors using epidemiologic studies. *Psychiatr. Clin. North Am.* 20, 499-517.
- Mucke,L. and Eddleston,M. (1993). Astrocytes in infectious and immune-mediated diseases of the central nervous system. *FASEB J.* 7, 1226-1232.
- Mueller,H.T., Haroutunian,V., Davis,K.L., and Meador-Woodruff,J.H. (2004). Expression of the ionotropic glutamate receptor subunits and NMDA receptor-associated intracellular proteins in the substantia nigra in schizophrenia. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 121, 60-69.
- Mukerjee,S., Mahadik,S.P., Scheffer,R., Correnti,E.E., and Kelkar,H. (1996). Impaired antioxidant defense at the onset of psychosis. *Schizophr. Res.* 19, 19-26.
- Murre,J.M. (1999). Interaction of cortex and hippocampus in a model of amnesia and semantic dementia. *Rev. Neurosci.* 10, 267-278.
- Nakamura,Y., Takeda,M., Aimoto,S., Hojo,H., Takao,T., Shimonishi,Y., Hariguchi,S., and Nishimura,T. (1992). Assembly regulatory domain of glial fibrillary acidic protein. A single phosphorylation diminishes its assembly-accelerating property. *J. Biol. Chem.* 267, 23269-23274.
- Neely,M.D., Sidell,K.R., Graham,D.G., and Montine,T.J. (1999). The lipid peroxidation product 4-hydroxynonenal inhibits neurite outgrowth, disrupts neuronal microtubules, and modifies cellular tubulin. *J. Neurochem.* 72, 2323-2333.
- Nemeroff,C.B., Owens,M.J., Bissette,G., Andorn,A.C., and Stanley,M. (1988). Reduced corticotropin releasing factor binding sites in the frontal cortex of suicide victims. *Arch. Gen. Psychiatry* 45, 577-579.

Nielsen,D.A., Goldman,D., Virkkunen,M., Tokola,R., Rawlings,R., and Linnoila,M. (1994). Suicidality and 5-hydroxyindoleacetic acid concentration associated with a tryptophan hydroxylase polymorphism. *Arch. Gen. Psychiatry* 51, 34-38.

Nielsen,D.A., Jenkins,G.L., Stefanisko,K.M., Jefferson,K.K., and Goldman,D. (1997). Sequence, splice site and population frequency distribution analyses of the polymorphic human tryptophan hydroxylase intron 7. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 45, 145-148.

Nielsen,D.A., Virkkunen,M., Lappalainen,J., Eggert,M., Brown,G.L., Long,J.C., Goldman,D., and Linnoila,M. (1998). A tryptophan hydroxylase gene marker for suicidality and alcoholism. *Arch. Gen. Psychiatry* 55, 593-602.

Nishiguchi,N., Shirakawa,O., Ono,H., Nishimura,A., Nushida,H., Ueno,Y., and Maeda,K. (2002). Lack of an association between 5-HT1A receptor gene structural polymorphisms and suicide victims. *Am. J. Med. Genet.* 114, 423-425.

Nogales,E. (1999). A structural view of microtubule dynamics. *Cell Mol. Life Sci.* 56, 133-142.

Nudmamud-Thanoi,S. and Reynolds,G.P. (2004). The NR1 subunit of the glutamate/NMDA receptor in the superior temporal cortex in schizophrenia and affective disorders. *Neurosci. Lett.* 372, 173-177.

Offermann,M.K., McKay,M.J., Marsh,M.W., and Bond,J.S. (1984). Glutathione disulfide inactivates, destabilizes, and enhances proteolytic susceptibility of fructose-1,6-bisphosphate aldolase. *J. Biol. Chem.* 259, 8886-8891.

Ono,H., Shirakawa,O., Kitamura,N., Hashimoto,T., Nishiguchi,N., Nishimura,A., Nushida,H., Ueno,Y., and Maeda,K. (2002). Tryptophan hydroxylase immunoreactivity is altered by the genetic variation in postmortem brain samples of both suicide victims and controls. *Mol. Psychiatry* 7, 1127-1132.

Ordway,G.A., Smith,K.S., and Haycock,J.W. (1994). Elevated tyrosine hydroxylase in the locus coeruleus of suicide victims. *J. Neurochem.* 62, 680-685.

O'Farrell, P. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J.Biol.Chem.* 250, 4007-4021. 1975.

Ref Type: Magazine Article

Pandey,G.N. (1997). Altered serotonin function in suicide. Evidence from platelet and neuroendocrine studies. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 836, 182-200.

Pandey,G.N., Dwivedi,Y., Ren,X., Rizavi,H.S., Roberts,R.C., Conley,R.R., and Tamminga,C. (2003). Altered expression and phosphorylation of myristoylated alanine-rich C kinase substrate (MARCKS) in postmortem brain of suicide victims with or without depression. *J. Psychiatr. Res.* 37, 421-432.

Pandey,G.N., Dwivedi,Y., Rizavi,H.S., Ren,X., Pandey,S.C., Pesold,C., Roberts,R.C., Conley,R.R., and Tamminga,C.A. (2002). Higher expression of serotonin 5-HT(2A) receptors in the postmortem brains of teenage suicide victims. *Am. J. Psychiatry* 159, 419-429.

Parsey,R.V., Oquendo,M.A., Simpson,N.R., Ogden,R.T., Van Heertum,R., Arango,V., and Mann,J.J. (2002). Effects of sex, age, and aggressive traits in man on brain sero-

- tonin 5-HT_{1A} receptor binding potential measured by PET using [C-11]WAY-100635. *Brain Res.* *954*, 173-182.
- Paulson,L., Martin,P., Nilsson,C.L., Ljung,E., Westman-Brinkmalm,A., Blennow,K., and Davidsson,P. (2004). Comparative proteome analysis of thalamus in MK-801-treated rats. *Proteomics.* *4*, 819-825.
- Paulson,L., Martin,P., Persson,A., Nilsson,C.L., Ljung,E., Westman-Brinkmalm,A., Eriksson,P.S., Blennow,K., and Davidsson,P. (2003). Comparative genome- and proteome analysis of cerebral cortex from MK-801-treated rats. *J. Neurosci. Res.* *71*, 526-533.
- Pekny,M. and Pekna,M. (2004). Astrocyte intermediate filaments in CNS pathologies and regeneration. *J. Pathol.* *204*, 428-437.
- Pellerin,L. (2003). Lactate as a pivotal element in neuron-glia metabolic cooperation. *Neurochem. Int.* *43*, 331-338.
- Pellerin,L. (2004). Neuroenergetics: calling upon astrocytes to satisfy hungry neurons. *Neuroscientist.* *10*, 53-62.
- Perea Bartolome,M.V. and Ladera,F., V (2004). [Neurofunctional aspects of the thalamus]. *Rev. Neurol.* *38*, 687-693.
- Perry,G., Cash,A.D., and Smith,M.A. (2002). Alzheimer Disease and Oxidative Stress. *J. Biomed. Biotechnol.* *2*, 120-123.
- Petrie,R.X., Reid,I.C., and Stewart,C.A. (2000). The N-methyl-D-aspartate receptor, synaptic plasticity, and depressive disorder. A critical review. *Pharmacol. Ther.* *87*, 11-25.
- Pettegrew,J.W., Panchalingam,K., Hamilton,R.L., and McClure,R.J. (2001). Brain membrane phospholipid alterations in Alzheimer's disease. *Neurochem. Res.* *26*, 771-782.
- Phillips,M.R., Yang,G., Zhang,Y., Wang,L., Ji,H., and Zhou,M. (2002). Risk factors for suicide in China: a national case-control psychological autopsy study. *Lancet* *360*, 1728-1736.
- Platt,S., Bille-Brahe,U., Kerkhof,A., Schmidtke,A., Bjerke,T., Crepet,P., De Leo,D., Haring,C., Lonqvist,J., Michel,K., and . (1992a). Parasuicide in Europe: the WHO/EURO multicentre study on parasuicide. I. Introduction and preliminary analysis for 1989. *Acta Psychiatr. Scand.* *85*, 97-104.
- Platt,S., Micciolo,R., and Tansella,M. (1992b). Suicide and unemployment in Italy: description, analysis and interpretation of recent trends. *Soc. Sci. Med.* *34*, 1191-1201.
- Pokorny,A.D. (1983). Prediction of suicide in psychiatric patients. Report of a prospective study. *Arch. Gen. Psychiatry* *40*, 249-257.
- Pollak,D., Cairns,N., and Lubec,G. (2003). Cytoskeleton derangement in brain of patients with Down syndrome, Alzheimer's disease and Pick's disease. *J. Neural Transm. Suppl* 149-158.

- Poltorak, M., Wright, R., Hemperly, J.J., Torrey, E.F., Issa, F., Wyatt, R.J., and Freed, W.J. (1997). Monozygotic twins discordant for schizophrenia are discordant for N-CAM and L1 in CSF. *Brain Res.* *751*, 152-154.
- Pontremoli, S., Melloni, E., Michetti, M., Salamino, F., Sparatore, B., and Horecker, B.L. (1982). Characterization of the inactive form of fructose-1,6-bisphosphate aldolase isolated from livers of fasted rabbits. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *79*, 5194-5196.
- Portier, M.M. (1992). [Neuronal cytoskeleton: structural, functional and dynamic aspects]. *Rev. Neurol. (Paris)* *148*, 1-19.
- Post RM, B.J.G.F. (1980). Cerebrospinal fluid studies of neurotransmitter function in manic and depressive illness. Wood JH (ed.), ed. New York, Plenum Press), pp. 685-717.
- Preobrazhenskaia, I.S., Chekhonin, V.P., and Iakhno, N.N. (2001). [Permeability of hemato-encephalic barrier in Alzheimer's disease and parkinsonism with cognitive disorders]. *Zh. Nevrol. Psikiatr. Im S. S. Korsakova* *101*, 39-42.
- Price, M.L., Curtis, A.L., Kirby, L.G., Valentino, R.J., and Lucki, I. (1998). Effects of corticotropin-releasing factor on brain serotonergic activity. *Neuropsychopharmacology* *18*, 492-502.
- Quinn, C.C., Gray, G.E., and Hockfield, S. (1999). A family of proteins implicated in axon guidance and outgrowth. *J. Neurobiol.* *41*, 158-164.
- Rabilloud, T., Heller, M., Gasnier, F., Luche, S., Rey, C., Aebersold, R., Benahmed, M., Louisot, P., and Lunardi, J. (2002). Proteomics analysis of cellular response to oxidative stress. Evidence for in vivo overoxidation of peroxiredoxins at their active site. *J. Biol. Chem.* *277*, 19396-19401.
- Rajkowska, G., Miguel-Hidalgo, J.J., Makkos, Z., Meltzer, H., Overholser, J., and Stockmeier, C. (2002). Layer-specific reductions in GFAP-reactive astroglia in the dorso-lateral prefrontal cortex in schizophrenia. *Schizophr. Res.* *57*, 127-138.
- Ramonet, D., Rodriguez, M.J., Fredriksson, K., Bernal, F., and Mahy, N. (2004). In vivo neuroprotective adaptation of the glutamate/glutamine cycle to neuronal death. *Hippocampus* *14*, 586-594.
- Ranjekar, P.K., Hinge, A., Hegde, M.V., Ghate, M., Kale, A., Sitasawad, S., Wagh, U.V., Debsikdar, V.B., and Mahadik, S.P. (2003). Decreased antioxidant enzymes and membrane essential polyunsaturated fatty acids in schizophrenic and bipolar mood disorder patients. *Psychiatry Res.* *121*, 109-122.
- Rao, M.L. and Kolsch, H. (2003). Effects of estrogen on brain development and neuroprotection--implications for negative symptoms in schizophrenia. *Psychoneuroendocrinology* *28 Suppl 2*, 83-96.
- Ratan, R.R. and Baraban, J.M. (1995). Apoptotic death in an in vitro model of neuronal oxidative stress. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol* *22*, 309-310.
- Rauch, S.L., Shin, L.M., and Wright, C.I. (2003). Neuroimaging studies of amygdala function in anxiety disorders. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* *985*, 389-410.

- Ravid,R., Van Zwieten,E.J., and Swaab,D.F. (1992). Brain banking and the human hypothalamus--factors to match for, pitfalls and potentials. *Prog. Brain Res.* 93, 83-95.
- Remita,S. (2001). [Radiation induced lipid peroxidation: factors which determine the oxidizability of lipids]. *Can. J. Physiol Pharmacol.* 79, 144-153.
- Robinson,S.R. (2001). Changes in the cellular distribution of glutamine synthetase in Alzheimer's disease. *J. Neurosci. Res.* 66 , 972-980.
- Rokutan,K., Hirakawa,T., Teshima,S., Nakano,Y., Miyoshi,M., Kawai,T., Konda,E., Morinaga,H., Nikawa,T., and Kishi,K. (1998). Implications of heat shock/stress proteins for medicine and disease. *J. Med. Invest* 44, 137-147.
- Rokyta,R., Racek,J., and Holecek,V. (1996). [Free radicals in the central nervous system]. *Cesk. Fysiol.* 45, 4-12.
- Roy,A. (1982). Risk factors for suicide in psychiatric patients. *Arch. Gen. Psychiatry* 39, 1089-1095.
- Roy,A., De Jong,J., and Linnoila,M. (1989). Cerebrospinal fluid monoamine metabolites and suicidal behavior in depressed patients. A 5-year follow-up study. *Arch. Gen. Psychiatry* 46, 609-612.
- Roy,A., Segal,N.L., Centerwall,B.S., and Robinette,C.D. (1991). Suicide in twins. *Arch. Gen. Psychiatry* 48, 29-32.
- Rujescu,D., Giegling,I., Sato,T., Hartmann,A.M., and Moller,H.J. (2003). Genetic variations in tryptophan hydroxylase in suicidal behavior: analysis and meta-analysis. *Biol. Psychiatry* 54, 465-473.
- Sabol,S.Z., Hu,S., and Hamer,D. (1998). A functional polymorphism in the monoamine oxidase A gene promoter. *Hum. Genet.* 103, 273-279.
- Saggu,H., Cooksey,J., Dexter,D., Wells,F.R., Lees,A., Jenner,P., and Marsden,C.D. (1989). A selective increase in particulate superoxide dismutase activity in parkinsonian substantia nigra. *J. Neurochem.* 53, 692-697.
- Saudou,F., Amara,D.A., Dierich,A., LeMeur,M., Ramboz,S., Segu,L., Buhot,M.C., and Hen,R. (1994). Enhanced aggressive behavior in mice lacking 5-HT1B receptor. *Science* 265, 1875-1878.
- Savoure,N. (1993). [Free radicals]. *Allerg. Immunol. (Paris)* 25, 404-407.
- Schagger,H. and Ohm,T.G. (1995). Human diseases with defects in oxidative phosphorylation. 2. F1F0 ATP-synthase defects in Alzheimer disease revealed by blue native polyacrylamide gel electrophoresis. *Eur. J. Biochem.* 227, 916-921.
- Schmitt,A., Maras,A., Braus,D.F., Petroianu,G., Jatzko,A., and Gattaz,W.F. (2001). [Antipsychotics and phospholipid metabolism in schizophrenia]. *Fortschr. Neurol. Psychiatr.* 69, 503-509.
- Schonberger,S.J., Edgar,P.F., Kydd,R., Faull,R.L., and Cooper,G.J. (2001). Proteomic analysis of the brain in Alzheimer's disease: molecular phenotype of a complex disease process. *Proteomics.* 1, 1519-1528.

- Schulsinger, F. (1980). Biological psychopathology. *Annu. Rev. Psychol.* *31*, 583-606.
- Selemon, L.D. (2001). Regionally diverse cortical pathology in schizophrenia: clues to the etiology of the disease. *Schizophr. Bull.* *27*, 349-377.
- Semra, Y.K., Seidi, O.A., and Sharief, M.K. (2002). Heightened intrathecal release of axonal cytoskeletal proteins in multiple sclerosis is associated with progressive disease and clinical disability. *J. Neuroimmunol.* *122*, 132-139.
- Shallice, T. and Burgess, P. (1996). The domain of supervisory processes and temporal organization of behaviour. *Philos. Trans. R. Soc. Lond B Biol. Sci.* *351*, 1405-1411.
- Sharma, H.S., Olsson, Y., and Cervos-Navarro, J. (1993). p-Chlorophenylalanine, a serotonin synthesis inhibitor, reduces the response of glial fibrillary acidic protein induced by trauma to the spinal cord. An immunohistochemical investigation in the rat. *Acta Neuropathol. (Berl)* *86*, 422-427.
- Shaw, D.M., Camps, F.E., and Eccleston, E.G. (1967). 5-Hydroxytryptamine in the hind-brain of depressive suicides. *Br. J. Psychiatry* *113*, 1407-1411.
- Sher, L. (2005). The concept of post-traumatic mood disorder. *Med. Hypotheses* *65*, 205-210.
- Sherrin, T., Heng, K.Y., Zhu, Y.Z., Tang, Y.M., Lau, G., and Tan, C.H. (2004). Cholecystokinin-B receptor gene expression in cerebellum, pre-frontal cortex and cingulate gyrus and its association with suicide. *Neurosci. Lett.* *357*, 107-110.
- Shevchenko, A., Wilm, M., Vorm, O., Jensen, O.N., Podtelejnikov, A.V., Neubauer, G., Shevchenko, A., Mortensen, P., and Mann, M. (1996a). A strategy for identifying gel-separated proteins in sequence databases by MS alone. *Biochem. Soc. Trans.* *24*, 893-896.
- Shevchenko, A., Wilm, M., Vorm, O., and Mann, M. (1996b). Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels. *Anal. Chem.* *68*, 850-858.
- Shimon, H., Sobolev, Y., Davidson, M., Haroutunian, V., Belmaker, R.H., and Agam, G. (1998). Inositol levels are decreased in postmortem brain of schizophrenic patients. *Biol. Psychiatry* *44*, 428-432.
- Shinohara, H., Inaguma, Y., Goto, S., Inagaki, T., and Kato, K. (1993). Alpha B crystallin and HSP28 are enhanced in the cerebral cortex of patients with Alzheimer's disease. *J. Neurol. Sci.* *119*, 203-208.
- Si, X., Miguel-Hidalgo, J.J., O'Dwyer, G., Stockmeier, C.A., and Rajkowska, G. (2004). Age-dependent reductions in the level of glial fibrillary acidic protein in the prefrontal cortex in major depression. *Neuropsychopharmacology* *29*, 2088-2096.
- Sibille, E., Arango, V., Galfalvy, H.C., Pavlidis, P., Erraji-Benchekroun, L., Ellis, S.P., and John, M.J. (2004). Gene expression profiling of depression and suicide in human prefrontal cortex. *Neuropsychopharmacology* *29*, 351-361.
- Singh, R., Nielsen, A.L., Johansen, M.G., and Jorgensen, A.L. (2003). Genetic polymorphism and sequence evolution of an alternatively spliced exon of the glial fibrillary acidic protein gene, GFAP. *Genomics* *82*, 185-193.

- Smith, M.A. (1996). Hippocampal vulnerability to stress and aging: possible role of neurotrophic factors. *Behav. Brain Res.* 78, 25-36.
- Soubrie, P. Reconciling the role of central serotonin neurones in human and animal behaviour. *Behav. Brain Sci.* 9, 319-364. 1986.
Ref Type: Magazine Article
- Stanley, B., Molcho, A., Stanley, M., Winchel, R., Gameroff, M.J., Parsons, B., and Mann, J.J. (2000). Association of aggressive behavior with altered serotonergic function in patients who are not suicidal. *Am. J. Psychiatry* 157, 609-614.
- Starcevic, V., Bogojevic, G., Marinkovic, J., and Kelin, K. (1999). Axis I and axis II comorbidity in panic/agoraphobic patients with and without suicidal ideation. *Psychiatry Res.* 88, 153-161.
- Steinberg, T.H., Jones, L.J., Haugland, R.P., and Singer, V.L. (1996). SYPRO orange and SYPRO red protein gel stains: one-step fluorescent staining of denaturing gels for detection of nanogram levels of protein. *Anal. Biochem.* 239, 223-237.
- Stengel, E.1. (1969). *Selbstmord und Selbstmordversuch.* (Frankfurt a. M.: Fischer).
- Sterk, M., Oenings, A., Eymann, E., and Roos, W. (1999). Development of a new automated enzyme immunoassay for the determination of neuron-specific enolase. *Anti-cancer Res.* 19, 2759-2762.
- Straube-West, K., Loomis, P.A., Opal, P., and Goldman, R.D. (1996). Alterations in neural intermediate filament organization: functional implications and the induction of pathological changes related to motor neuron disease. *J. Cell Sci.* 109 (Pt 9), 2319-2329.
- Strohle, A. and Holsboer, F. (2003). Stress responsive neurohormones in depression and anxiety. *Pharmacopsychiatry* 36 Suppl 3, S207-S214.
- Suarez, I., Bodega, G., and Fernandez, B. (2002). Glutamine synthetase in brain: effect of ammonia. *Neurochem. Int.* 41, 123-142.
- Suominen, K., Isometsa, E., Suokas, J., Haukka, J., Achte, K., and Lonqvist, J. (2004). Completed suicide after a suicide attempt: a 37-year follow-up study. *Am. J. Psychiatry* 161, 562-563.
- Szigethy, E., Conwell, Y., Forbes, N.T., Cox, C., and Caine, E.D. (1994). Adrenal weight and morphology in victims of completed suicide. *Biol. Psychiatry* 36, 374-380.
- Tagliaferro, P., Ramos, A.J., Lopez, E.M., Pecci, S.J., and Brusco, A. (1997). Neural and astroglial effects of a chronic parachlorophenylalanine-induced serotonin synthesis inhibition. *Mol. Chem. Neuropathol.* 32, 195-211.
- Tallant, E.A., Brumley, L.M., and Wallace, R.W. (1988). Activation of a calmodulin-dependent phosphatase by a Ca²⁺-dependent protease. *Biochemistry* 27, 2205-2211.
- Tarasenko, L.M., Neporada, K.S., Vakulenko, S.V., Skrypnyk, I.M., and Korol'ova, V.V. (2000). [The dependence of blood and tissue proteolytic activity during acute stress from A type of the organism reaction]. *Fiziol. Zh.* 46, 75-78.

- Tebbe,A., Klein,C., Bisle,B., Siedler,F., Scheffer,B., Garcia-Rizo,C., Wolfertz,J., Hickmann,V., Pfeiffer,F., and Oesterheld,D. (2005). Analysis of the cytosolic proteome of *Halobacterium salinarum* and its implication for genome annotation. *Proteomics*. 5, 168-179.
- Thompson,P.M., Egbufoama,S., and Vawter,M.P. (2003). SNAP-25 reduction in the hippocampus of patients with schizophrenia. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* 27, 411-417.
- Thompson,P.M., Rosenberger,C., and Qualls,C. (1999). CSF SNAP-25 in schizophrenia and bipolar illness. A pilot study. *Neuropsychopharmacology* 21, 717-722.
- Tomioka,M., Shirotani,K., Iwata,N., Lee,H.J., Yang,F., Cole,G.M., Seyama,Y., and Saido,T.C. (2002). In vivo role of caspases in excitotoxic neuronal death: generation and analysis of transgenic mice expressing baculoviral caspase inhibitor, p35, in post-natal neurons. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 108, 18-32.
- Traskman,L., Asberg,M., Bertilsson,L., and Sjostrand,L. (1981). Monoamine metabolites in CSF and suicidal behavior. *Arch. Gen. Psychiatry* 38, 631-636.
- Van den,B.G. (2002). Neuroendocrine pathobiology of chronic critical illness. *Crit Care Clin.* 18, 509-528.
- Van Heeringen,C. (2001). Suicide, serotonin, and the brain. *Crisis* 22, 66-70.
- van Heeringen,K. (2003). The neurobiology of suicide and suicidality. *Can. J. Psychiatry* 48, 292-300.
- Van Lancker,D. (1997). Rags to riches: our increasing appreciation of cognitive and communicative abilities of the human right cerebral hemisphere. *Brain Lang* 57, 1-11.
- van Noort,J.M., van Sechel,A.C., Bajramovic,J.J., el Ouagmiri,M., Polman,C.H., Lassmann,H., and Ravid,R. (1995). The small heat-shock protein alpha B-crystallin as candidate autoantigen in multiple sclerosis. *Nature* 375, 798-801.
- Veenema,A.H., Meijer,O.C., de Kloet,E.R., and Koolhaas,J.M. (2003). Genetic selection for coping style predicts stressor susceptibility. *J. Neuroendocrinol.* 15, 256-267.
- Vermuyten,K., Lowenthal,A., and Karcher,D. (1990). Detection of neuron specific enolase concentrations in cerebrospinal fluid from patients with neurological disorders by means of a sensitive enzyme immunoassay. *Clin. Chim. Acta* 187, 69-78.
- Virkkunen,M. and Linnoila,M. (1990). Serotonin in early onset, male alcoholics with violent behaviour. *Ann. Med.* 22, 327-331.
- Walther,D.J. and Bader,M. (2003). A unique central tryptophan hydroxylase isoform. *Biochem. Pharmacol.* 66, 1673-1680.
- Wang,X.F., Wang,D., Zhu,W., Delrahim,K.K., Dolnak,D., and Rapaport,M.H. (2003). Studies characterizing 60 kda autoantibodies in subjects with schizophrenia. *Biol. Psychiatry* 53, 361-375.
- Wasserman,I.M. (1984). The influence of economic business cycles on United States suicide rates. *Suicide Life Threat. Behav.* 14, 143-156.

- Webster,M.J., Knable,M.B., Johnston-Wilson,N., Nagata,K., Inagaki,M., and Yolken,R.H. (2001). Immunohistochemical localization of phosphorylated glial fibrillary acidic protein in the prefrontal cortex and hippocampus from patients with schizophrenia, bipolar disorder, and depression. *Brain Behav. Immun.* 15, 388-400.
- Wender,P.H., Kety,S.S., Rosenthal,D., Schulsinger,F., Ortmann,J., and Lunde,I. (1986). Psychiatric disorders in the biological and adoptive families of adopted individuals with affective disorders. *Arch. Gen. Psychiatry* 43, 923-929.
- Westrin,A., Ekman,R., and Traskman-Bendz,L. (1999). Alterations of corticotropin releasing hormone (CRH) and neuropeptide Y (NPY) plasma levels in mood disorder patients with a recent suicide attempt. *Eur. Neuropsychopharmacol.* 9, 205-211.
- Wilkins,M.R., Sanchez,J.C., Gooley,A.A., Appel,R.D., Humphery-Smith,I., Hochstrasser,D.F., and Williams,K.L. (1996). Progress with proteome projects: why all proteins expressed by a genome should be identified and how to do it. *Biotechnol. Genet. Eng Rev.* 13, 19-50.
- Willenberg,H.S., Bornstein,S.R., Dumser,T., Ehrhart-Bornstein,M., Barocka,A., Chrousos,G.P., and Scherbaum,W.A. (1998). Morphological changes in adrenals from victims of suicide in relation to altered apoptosis. *Endocr. Res.* 24, 963-967.
- Williams,L.R. (1995). Oxidative stress, age-related neurodegeneration, and the potential for neurotrophic treatment. *Cerebrovasc. Brain Metab Rev.* 7, 55-73.
- Wofchuk,S.T. and Rodnight,R. (1995). Age-dependent changes in the regulation by external calcium ions of the phosphorylation of glial fibrillary acidic protein in slices of rat hippocampus. *Brain Res. Dev. Brain Res.* 85, 181-186.
- Wolfersdorf M (1995). Suizidalität. Die biologische Dimension. (Berlin Heidelberg New York: Springer-Verlag), p. 7.
- Xu,T. and Pandey,S.C. (2000). Cellular localization of serotonin(2A) (5HT(2A)) receptors in the rat brain. *Brain Res. Bull.* 51, 499-505.
- Yang,R.Y. and Liu,F.T. (2003). Galectins in cell growth and apoptosis. *Cell Mol. Life Sci.* 60, 267-276.
- Yao,J.K., Reddy,R.D., and van Kammen,D.P. (2001). Oxidative damage and schizophrenia: an overview of the evidence and its therapeutic implications. *CNS. Drugs* 15, 287-310.
- Young,L.T., Bezchlibnyk,Y.B., Chen,B., Wang,J.F., and MacQueen,G.M. (2004). Amygdala cyclic adenosine monophosphate response element binding protein phosphorylation in patients with mood disorders: effects of diagnosis, suicide, and drug treatment. *Biol. Psychiatry* 55, 570-577.
- Yu,W., Gong,J.S., Ko,M., Garver,W.S., Yanagisawa,K., and Michikawa,M. (2005). Altered cholesterol metabolism in Niemann-Pick type C1 mouse brains affects mitochondrial function. *J. Biol. Chem.* 280, 11731-11739.
- Zaiko,S.D. and Burbaeva,G.S. (1986). [Content of neuron-specific and non-neuron-specific enolase isoenzymes in human brain structures]. *Biull. Eksp. Biol. Med.* 102, 21-23.

Zhang,J., Goodlett,D.R., Peskind,E.R., Quinn,J.F., Zhou,Y., Wang,Q., Pan,C., Yi,E., Eng,J., Aebersold,R.H., and Montine,T.J. (2005). Quantitative proteomic analysis of age-related changes in human cerebrospinal fluid. *Neurobiol. Aging* 26, 207-227.

Zill,P., Buttner,A., Eisenmenger,W., Moller,H.J., Bondy,B., and Ackenheil,M. (2004). Single nucleotide polymorphism and haplotype analysis of a novel tryptophan hydroxylase isoform (TPH2) gene in suicide victims. *Biol. Psychiatry* 56, 581-586.

Zimbardo,P. (1995). *Psychologie*. Springer Verlag; Berlin, Heidelberg, New York).

DANKSAGUNG

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

Herrn Prof. Dr. med. M. Ackenheil und Frau Prof. Dr. med. B. Bondy für die Möglichkeit, diese Arbeit in der Abteilung für Neurochemie der Psychiatrischen Klinik der LMU München durchzuführen. Ich danke ihnen sehr für Ihre Betreuung meiner Promotion sowie für vielerlei Hilfestellungen.

Herrn Dr. Andreas Büttner vom Institut für Rechtsmedizin für die Bereitstellung der Liquorproben und der äußerst sorgfältig seziierten Hirnproben sowie für die sehr gute Zusammenarbeit auf ganzer Linie.

Herrn Dr. Peter Zill und Herrn Dr. Markus Schwarz für alle fachliche und menschliche Unterstützung, zudem für ihre stete Diskussionsbereitschaft insbesondere über das Pro und Contra der Proteomforschung in der biologischen Psychiatrie ...

Frau Sylvia de Jonge, Frau Karin Neumeier und Frau Stefanie Behrens, die jederzeit ausgesprochen hilfsbereit für labortechnische Fragen zu Verfügung standen und somit manch ein Problem im Vorfeld verhinderten.

Herrn Dr. Frank Siedler und Frau Beatrix Scheffer vom Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried für die massenspektrometrischen MALDI-TOF-Messungen und Identifikationen der Proteinproben sowie für die hervorragende Kooperationsarbeit.

Frau A. Liebers für ihr außerordentlich sorgfältiges Korrekturlesen meiner Arbeit.

Meinen Eltern, die mir mein Studium ermöglicht haben und mir auch während meiner Promotion stets zur Seite standen.

Meinen Freunden aus der Freien Evangelischen Gemeinde München-Nord für alle Ermutigung und für ihre anhaltenden Gebete.

CURRICULUM VITAE

Persönliche Daten:

Name: Katja Schlicht
Geburtsdatum: 28.11.1968
Geburtsort: Hamburg

Schulbildung:

1975-1979 Grundschole, Lage/Lippe (Ostwestfalen)
1979-1988 Städtisches Gymnasium Lage/Lippe
Abschluß: Allgemeine Hochschulreife

Berufliche Ausbildung:

07/1988-01/1991 Gärtner-Ausbildung
Abschluß: Gehilfenbrief

Hochschulstudium:

11/1992-05/1998 Studium der Biologie an der Technischen Universität München
06/1998-08/1999 Diplomarbeit in der 'Klinischen Kooperationsgruppe für Umwelt-
dermatologie und Allergologie' der Technischen Universität München
unter der Betreuung von Prof. Dr. med. H. Behrendt
Thema: "Untersuchungen zum Einfluß verkehrsbedingter Luftschad-
stoffe auf das allergene Potential von *Phleum pratense L.*-Pollen"
Abschluß: Diplom

Promotion

06/2000-06/Juni 2005 Anfertigung der Dissertation in der Abteilung für Neurochemie der
Psychiatrischen Klinik der Ludwig-Maximilians-Universität München
Thema: "Proteomanalyse postmortaler Hirn- und Liquorproben
von Suizidopfern versus Kontrollen "
Publikation: 'Comparative proteomic analysis with postmortem
prefrontal cortex tissues of suicide victims versus controls',
Journal of Psychiatric Research (in press)

München, den 16.06.2005