

Aus der
Klinik für Psychiatrie und Psychotherapie
Klinikum der Universität München
Ludwig-Maximilians-Universität München
Direktor: Prof. Dr. med. Peter Falkai

**Entwicklung von targetbasierten Sensoren und phänotypischen
Messverfahren zur Identifizierung von genetischen und chemischen
Neuromodulatoren mit Relevanz für Schizophrenie**

Habilitationsschrift

vorgelegt von

Dr. rer. nat. Michael Wehr

2018

Inhalt

1	Übersicht	3
2	Einleitung.....	5
2.1	Genetische und entwicklungsneurobiologische Ursachen der Schizophrenie	6
2.2	Schizophrenie als Signalwegserkrankung	8
2.3	Der NRG1-ERBB4 Signalweg als exemplarischer Signalweg der Schizophrenie	9
2.4	Drug Repurposing als Abkürzung der Medikamentenentwicklung	10
3	Darstellung der habilitationsrelevanten Originalarbeiten	14
3.1	Genetisch kodierte Sensoren zur Messung von Protein-Protein-Interaktionen und Target-Aktivitäten	14
3.2	Multiparametrische Profilierungsassays zur Bestimmung von Target-Selektivitäten und Signaltransduktionsprozessen.....	17
3.2.1	Multiparametrisches Profilierungstool für G-Protein gekoppelte Rezeptoren zur Bestimmung der Selektivität von Modulatoren.....	18
3.2.2	Multiparametrisches Profilierungstool zur Bestimmung von Signaltransduktionsprozessen.....	20
3.3	Identifizierung chemischer Neuromodulatoren mittels Drug Repurposing	22
3.4	Modulatoren des Hippo-Signalweges.....	24
4	Ausblick	29
4.1	Genetisch kodierte Sensoren für multiparametrische pharmakologische Assays	29
4.1.1	Etablierung eines Einheitsadapters für RTK-Split-TEV-Assays.....	29
4.1.2	Multiparametrisches Profilierungstool für Rezeptor-Tyrosin-Kinasen.....	29
4.1.3	Multiparametrisches Tool zur Profilierung von Signaltransduktionsprozessen.....	30
4.2	Wirkmechanismen des Schizophrenie-Risikogens TAOK2 in der Zellkultur und im Mausmodell.....	32
4.2.1	TAOK2 als Regulator der neuronalen Erregbarkeit	32
4.2.2	Entwicklung und Verhaltensanalyse eines TAOK2 Mausmodells.....	33
4.2.3	TAOK2 als Regulator des Hippo-Signalweges	34
5	Literaturverzeichnis.....	35
6	Anhang: habilitationsrelevante Publikationen.....	44

1 Übersicht

Die erfolgreiche Behandlung komplexer humaner Erkrankungen wie beispielsweise der Schizophrenie ist eine enorme Aufgabe für die Medizin. Eine zukunftsweisende Strategie ist die Entwicklung neuer Arzneistoffe, die im Rahmen der personalisierten Medizin auf individuelle Anforderungen eines Patienten angepasst werden können. Während der frühen Phasen der Medikamentenentwicklung ist für die Identifikation neuer Wirkstoffe der Einsatz geeigneter zellbasierter Assay-Systeme essentiell. Daher stellen targetbasierte Assays, die Aktivitäten von krankheitsrelevanten Zielmolekülen (oder auch Targets genannt) abbilden können, einen vielversprechenden Ansatz dar, um neue Medikamente zu entwickeln.

Mit der Entwicklung der genetisch kodierten Split-TEV-Assays, die u.a. Aktivitäten von Rezeptoren in lebenden Zellen messen können, haben wir eine Methode etabliert, die die Identifikation neuer Substanzen als Modulatoren von Targets, z. B. von Rezeptoren, ermöglicht. Split-TEV-Assays wurden für unterschiedliche krankheitsrelevante Rezeptoren, die auch Schizophrenie-Risikogene sind (z. B. DRD2 und ERBB4), entwickelt und auf ihre Sensitivität mit bekannten Inhibitoren getestet. Weitere Split-TEV-Assays haben wir zudem für die Validierung unterschiedlicher Protein-Protein-Interaktionen etabliert und in einem genomweiten RNAi-Screen angewandt, um neue Modulatoren des Hippo-Signalweges, der den Differenzierungsstatus und die Polarität von Zellen reguliert, zu identifizieren.

Da die Entwicklung neuer Arzneistoffe äußerst kostspielig und zeitaufwändig ist und darüber hinaus enorme Ressourcen bindet, wird zunehmend auch das Wiederverwerten von zugelassenen Medikamenten für andere Indikationen, das sog. *Drug Repurposing*, angewendet, um neue Medikamente und Therapien entwickeln zu können. In einem Show-Case-Szenario haben wir für den Rezeptor ERBB4, das als Schizophrenie-Risikogen identifiziert wurde und bei dieser Krankheit sowohl mit einer Positiv- und Negativsymptomatik als auch mit kognitiven Defiziten in Verbindung gebracht wird, einen Substanzscreen durchgeführt. Das Ziel dieses Split-TEV basierten *Drug-Repurposing*-Screens war es, aus einem Pool von zugelassenen Medikamenten ERBB4-Modulatoren zu identifizieren. Mit Spironolakton wurde ein ERBB4-Inhibitor entdeckt, der im Mausmodell eine Verbesserung der kognitiven Defizite und der Positivsymptomatik bewirkte.

Die Target-Selektivität einer Wirksubstanz ist ein zentraler Parameter der Medikamentenentwicklung. Für die Bestimmung der Selektivität einer Substanz ist es nötig, auch Effekte auf verwandte Targets zu prüfen. Daher haben wir für G-Protein gekoppelte Rezeptoren (GPCRs), die als Targets eine Schlüsselposition in der modernen Pharmakotherapie einnehmen und über die etwa 30% aller verschreibungspflichtigen

Medikamente wirken, einen multiparametrischen Split-TEV-Assay entwickelt, der Aktivitäten von 19 verschiedenen GPCRs simultan messen kann (GPCRprofiler). Der Assay verwendet als Auslesesystem molekulare Barcode-Reporter (das sind kurze RNA-Moleküle), die anhand der Next-Generation-Sequencing-Methode quantifiziert werden und somit eine Analyse verschiedener Targets unter unterschiedlichen Stimulationsbedingungen (z. B. Substanz, Konzentration, Zeitpunkt) ermöglichen. Die beiden zugelassenen Neuroleptika Paliperidon und Aripiprazol wurden im GPCRprofiler getestet und neben der Reproduktion aller bereits bekannten Aktivitäten wurden erstmalig neue nachgewiesen. Dieser multiparametrische Assay wird derzeit um die Klasse der Rezeptortyrosinkinasen, die wie die GPCRs eine wichtige Bedeutung als molekulare Targets in der Medizin einnehmen, erweitert.

Genetisch komplexe Krankheiten, wie die Schizophrenie, werden auch als Signalwegserkrankungen eingestuft, da genetische Veränderungen zu gestörten Signalübertragungsprozessen führen können und somit Zellen in einen krankhaften Zustand versetzen können. Um diese Veränderungen ganzheitlich messbar zu machen, setzen wir neben dem targetorientierten Screening auch phänotypische Screening-Strategien ein, um Substanzen als Modulatoren neuronaler Aktivität zu identifizieren und deren Effekte hinsichtlich Schizophrenie-relevanter Targetproteine zu charakterisieren (siehe insbesondere den Abschnitt „Ausblick“). Phänotypische Assays basieren auf einem experimentellen Ansatz, der einen definierten Phänotyp abbilden kann, wie beispielsweise dem Messen neuronaler Aktivität in Neuronenkulturen. Wir haben ein multiparametrisches Profilierungstool entwickelt, das cisPROFILER genannt wird, mit dem anhand von genetischen Sensoren die Aktivitäten verschiedener relevanter Signalkaskaden in unterschiedlichsten Zelltypen, inklusive Neurone, zeitgleich und parallel gemessen werden können. Die Gesamtaktivität definierter Signalkaskaden kann wiederum den physiologischen Zustand der Zelle widerspiegeln. Diese Methode verwendet ebenfalls die oben beschriebenen molekularen Barcodes, die ein paralleles Auslesen verschiedenster Signalaktivitäten unter unterschiedlichsten Stimulationsbedingungen ermöglichen. Da dieses Profilierungstool mehrere Sensoren beinhaltet, kann ein aus diesem Profilierungstool optimierter Sensor für Screeningzwecke verwendet werden. Beispielsweise wurde ein optimierter Sensor entwickelt, der neuronale Aktivität abbildet, so dass dieser Sensor in einem phänotypischen Screen eingesetzt werden kann, um Modulatoren neuronaler Aktivität zu identifizieren. Anhand von Mausmodellen ausgewählter Schizophrenie-Risikogene soll in Zukunft die Effektivität der Substanzen in vivo validiert werden, wobei relevante Verhaltenstests, wie z. B. der Präpuls-Inhibitionstest (misst gestörte Filterfunktion für Reize), der Open-Field-Test (Hyperaktivität) oder Y-Maze-Test (Kognition), zum Einsatz kommen. Auf molekularer Ebene sollen die Effekte biochemisch charakterisiert und die Selektivität von Substanzen mit den multiparametrischen, zellbasierten Split-TEV-Assays adressiert werden.

2 Einleitung

Eine erfolgreiche Medikation psychiatrischer Erkrankungen wie der Schizophrenie ist eine große Herausforderung für die Medizin. Das manifestiert sich einerseits in der schweren Krankheitsbelastung von Psychosen und andererseits in den hohen Kosten, die zur Behandlung aufgewandt werden müssen. So belief sich die Behandlung von Psychosen bereits im Jahr 2010 in 30 europäischen Ländern (Europäischen Union, Schweiz, Norwegen, Island) auf enorme Ausgaben von 93,9 Mrd. Euro (Gustavsson et al., 2011). Diese heute noch gestiegenen Ausgaben beruhen größtenteils auf einer ineffizienten Behandlung und der damit in Verbindung stehenden unzureichenden Genesung der Patienten (Global Burden of Disease Study 2013 Collaborators, 2015). Daher ist es für die Forschung in der Psychiatrie von zentraler Bedeutung, sowohl die neurobiologischen Ursachen besser zu verstehen als auch neue Medikamente und zielgerichtete Therapien zu entwickeln.

Die Schizophrenie als eine schwere psychiatrische Erkrankung weist eine Prävalenz von 0.3 bis 0.7 % in der Weltbevölkerung auf, bricht größtenteils im jungen Erwachsenenalter aus und besteht meist während des restlichen Lebens eines Patienten fort (van Os and Kapur, 2009). Die Erkrankung lässt sich deskriptiv in eine Positivsymptomatik (Sinnestäuschungen, Wahn, Ich-Störungen), Negativsymptomatik (Apathie, Affektverflachung, Anhedonie, sozialer Rückzug) und kognitive Defizite (Störungen des Arbeitsgedächtnisses, der Aufmerksamkeitssteuerung und der Reaktionshemmung) klassifizieren. Insbesondere eine persistierende Negativsymptomatik und kognitive Defizite führen oft zu einer sozialen Beeinträchtigung oder gar Isolation und verursachen die eingangs erwähnten hohen direkten Kosten für das Gesundheitssystem und die indirekten sozioökonomischen Kosten, die auf dem Ausfall von Arbeitskraft beruhen (Gustavsson et al., 2011; Saha et al., 2007). Trotz zahlreicher wissenschaftlicher Erkenntnisse und Fortschritte lassen sich insbesondere die Negativsymptomatik und die kognitiven Defizite noch immer nicht zufriedenstellend behandeln, so dass insbesondere für die Behandlung dieser Symptome ein hoher medizinischer Bedarf besteht.

Die fehlenden Behandlungsoptionen sind u.a. der ineffizienten Medikamentenentwicklung für psychiatrische Erkrankungen und dem Rückzug vieler Pharmafirmen aus diesem Bereich geschuldet (Insel, 2012). Eine Option, mit der neue Therapien schneller entwickelt werden können, stellt das Wiederverwenden von zugelassenen Medikamenten für andere Indikationen dar, das sog. *Drug Repurposing*. Diese Strategie wird seit geraumer Zeit verstärkt im Bereich der psychiatrischen Erkrankungen befürwortet (Insel, 2012; Lencz and Malhotra, 2015), zumal sie auch für andere Indikationen, wie z. B. Krebs (Jahchan et al.,

2013), Erfolge vorweisen kann. Zudem soll das angesammelte Wissen um molekulare Targets und den damit assoziierten Signalwegen, die bei der Schizophrenie eine Rolle spielen, dazu beitragen, neue Arzneien schneller zu entwickeln und damit assoziierte Wirkmechanismen besser zu verstehen (Insel, 2012).

2.1 Genetische und entwicklungsneurobiologische Ursachen der Schizophrenie

Die Ursachen der Schizophrenie liegen sowohl in der komplexen Genetik als auch in der wechselseitigen Interaktion von Risikogenen und Umweltfaktoren begründet. Anhand dieses Wissens wurden verschiedene neurobiologische Theorien entwickelt, um diese schwere Erkrankung mit ihrem heterogenen Krankheitsbild zu erklären (z. B. Dopamin- bzw. Glutamat-Hypothese, siehe unten). Eine weitere zentrale Theorie vertritt, dass Psychosen durch Veränderung von entwicklungsneurobiologischen Faktoren und Umwelteinflüssen hervorgerufen werden, wobei diese Faktoren das sich entwickelnde Gehirn innerhalb kritischer Zeitfenster treffen (sog. *Two-Hit*-Hypothese der Schizophrenie) (Insel, 2010; Rapoport et al., 2012). Beispielsweise kann eine fehlerhafte Entwicklung des Gehirns in der Kindheit aufgrund genetischer Prädisposition zu dünneren kortikalen Strukturen (Shaw et al., 2007) oder einer verminderten Konnektivität führen (Schmitt et al., 2011).

Mit Hinblick auf die Genetik wurden im Jahr 2014 in der bislang größten genomweiten Assoziationsstudie (*genome-wide association study*, GWAS) 108 genetische Loci für Schizophrenie-Risikogene identifiziert (Schizophrenia Working Group of the Psychiatric Genomics Consortium, 2014). Diese Studie schloss 36.989 Patienten und 113.075 Kontrollen ein. Vor kurzem wurden in einer weiteren GWAS-Analyse, die 11.260 Patienten und 24.542 Kontrollen beinhaltete, 50 weitere Loci identifiziert, so dass derzeit 145 Loci für Schizophrenie-Risikogene beschrieben sind (Pardiñas et al., 2018). Innerhalb dieser Loci sind neben vielen neuen potentiellen Risikogenen auch bereits bekannte Targets zu finden, die mit der Ätiologie von Schizophrenie in Zusammenhang gebracht werden, wie z. B. der Dopamin-D₂-Rezeptor (DRD2) und der N-Methyl-D-Aspartat-(NMDA)-Rezeptor 2A (*Glutamate Ionotropic Receptor NMDA Type Subunit 2A*, GRIN2A). Beide Gene stellen als Rezeptoren leicht zugängliche und modulierbare Targets dar und sind zentrale Bestandteile zweier Erklärungsmodelle für verschiedene Symptomdomänen der Schizophrenie (vgl. Dopamin- bzw. Glutamat-Hypothese). Beide Hypothesen wurden aufgrund der pharmakologischen Wirkung von Dopamin- bzw. Glutamatrezeptor-Antagonisten entwickelt.

Nach dem bekanntesten und vor mehr als 50 Jahren zuerst beschriebenen Modell, der Dopamin-Hypothese, führen Dopaminantagonisten (D₂-Antagonisten, ursprünglich

Chlorpromazin und Haloperidol) zu einer Verbesserung der Positivsymptomatik aufgrund einer Reduzierung der D₂-Aktivität (Baumeister, 2013; Carlsson and Lindqvist, 1963). Eine Negativsymptomatik oder kognitive Defizite konnten mit dieser Theorie allerdings nicht erklärt werden, so dass eine revidierte Dopamin-Hypothese aufgestellt wurde, die unterschiedlich verschaltete Hirnregionen berücksichtigt. Nach diesem Modell kommt es in Schizophrenie-Patienten einerseits zu einer hyperaktiven über D₂-Rezeptoren vermittelten Dopamin-Transmission in subkortikalen Bereichen, die zu positiven Symptomen führen, und andererseits zu einer über D₁-Rezeptoren vermittelten hypoaktiven Dopamin-Transmission im präfrontalen Kortex, die negative Symptome und kognitive Defizite hervorrufen (Brisch et al., 2014; da Silva Alves et al., 2008). Anhand des sich kontinuierlich verbessernden Verständnisses der Komplexität, die der Schizophrenie zugrunde liegt, und den damit beobachteten Diskrepanzen bzgl. der Dopamin-Hypothese (z. B. für Amphetamin, das eine Dopamin-Freisetzung induziert, aber auch die Symptome bei Schizophrenie-Patienten verschlechterte (Angrist et al., 1980)) wurde schnell ersichtlich, dass außer Dopamin auch weitere Neurotransmitter bei der Entstehung von Schizophrenie eine Rolle spielen (Brisch et al., 2014). Dieser Entwicklung trägt die Glutamat-Hypothese Rechnung.

Die Glutamat-Hypothese (oder auch NMDA-Rezeptor Hypofunktionshypothese) wurde anhand von Glutamatantagonisten (z. B. Ketamin, Phencyclidin) aufgestellt, da diese Substanzen Positiv- und Negativsymptomatiken sowie kognitive Defizite hervorrufen können (Coyle, 2012; Javitt, 2010). Nach diesem Modell wird die Aktivität dopaminerger Neurotransmission durch das Zusammenspiel von Glutamat und GABA reguliert. Es wird postuliert, dass hypoaktive NMDA-Rezeptoren auf kortikalen GABAergen (*gamma-aminobutyric acid*) Interneuronen zu einer Disinhibition der nachgeschalteten Pyramidalneurone führen und somit aus diesen Pyramidalneuronen vermehrt Glutamat freigesetzt wird. Dies wiederum überaktiviert dopaminerge Neuronen, so dass es zu erhöhter Dopamin-Ausschüttung im Nucleus accumbens kommt, was die Positivsymptomatik hervorruft. Andererseits werden parallel zu den nachgeschalteten dopaminergen Neuronen auch GABAerge Interneuronen überaktiviert, was in dopaminergen Neuronen eine verringerte Dopamin-Freisetzung im präfrontalen Kortex verursacht, so dass negative Symptome und kognitive Defizite ausgelöst werden (Elert, 2014). Den kortikalen GABAergen Interneuronen, die für die wiederholte Inhibition von Pyramidalneuronen verantwortlich sind, kommt eine kritische Aufgabe innerhalb dieses Schaltkreises zu, zumal die Anzahl von parvalbuminergen Interneuronen in Schizophrenie-Patienten reduziert ist (Beasley and Reynolds, 1997). Die koordinierte Regulation von Aktivitäten aus kortikalen exzitatorischen glutamatergen Pyramidenzellen und kortikalen inhibitorischen GABAergen Interneuronen ist daher für eine ausgewogene Balance zwischen Erregung und Hemmung (E/H-Balance,

excitation/inhibition balance) essentiell, um eine funktionelle Konnektivität und somit korrektes Prozessieren von Informationen zu gewährleisten (Eichler and Meier, 2008).

Auf zellulärer Ebene ist die neuronale Plastizität, also die Fähigkeit von Neuronen, auf Stimuli mit kurz oder langanhaltenden phänotypischen Veränderungen zu reagieren, essentiell für eine funktionelle Konnektivität (Eichler and Meier, 2008). Insbesondere Proteinkomplexe in der Postsynapse und Calcium-vermittelte sowie Mitogen-aktivierte Protein-Kinasen-(MAPK)-vermittelte Signalaktivitäten spielen für die neuronale Plastizität eine zentrale Rolle (Hagenston and Bading, 2011). Anhand der GWAS-Daten wurde ersichtlich, dass viele Schizophrenie-Risikogene Elementen zugeordnet werden können, die bei der funktionellen und strukturellen synaptischen Plastizität eine Rolle spielen. So sind beispielsweise Gene, die für spannungsabhängige Calcium-Kanäle (z. B. *Calcium Voltage-Gated Channel Subunit Alpha1 C*, CACNA1C; *Calcium Voltage-Gated Channel Subunit Alpha1 I*, CACNA1I; *Calcium Voltage-Gated Channel Auxiliary Subunit Beta 2*, CACNB2) oder MAPK (z. B. *Mitogen-Activated Protein Kinase 3*, MAPK3) kodieren, aber auch das Gen *Synaptosome Associated Protein 91* (SNAP91), das für ein Strukturprotein kodiert, unter den Risikogenen vertreten (Schizophrenia Working Group of the Psychiatric Genomics Consortium, 2014). Ein weiterer Regulator der synaptischen Plastizität ist die Serin/Threonin-Kinase *Thousand And One Amino Acid Protein Kinase 2* (TAOK2), die in der Postsynapse lokalisiert ist und dessen Maturierung fördert (Maillard et al., 2015; Yadav et al., 2016). Zurzeit analysieren wir die Funktionen von TAOK2 im Hinblick auf Schizophrenie-relevante Endophänotypen im Mausmodell und TAOK2-assoziierte molekulare Mechanismen (siehe Abschnitt „Ausblick“).

2.2 Schizophrenie als Signalwegserkrankung

Diverse Ergebnisse aus der Grundlagenforschung zeigen, dass viele Genprodukte aus den unterschiedlichsten Signalkaskaden an der Entstehung komplexer Erkrankungen beteiligt sind (Chang et al., 2015; Gilman et al., 2012; Network and Pathway Analysis Subgroup of Psychiatric Genomics Consortium, 2015). Dies gilt insbesondere für neurodegenerative und psychiatrische Krankheiten wie der Schizophrenie, aber auch für Krebserkrankungen. Die Annahme hier ist, dass die De-Regulierung einzelner Komponenten oft subtil ausfällt, so dass erst die Gesamtheit aller Veränderungen Zellen in einen krankhaften Zustand versetzt. Gestörte Signalübertragungswege verhindern eine normale Zellfunktion bzw. Entwicklung (z. B. bei neuronalen Erkrankungen) oder verursachen eine unkontrollierte Proliferation wie bei Krebs. In diesem Zusammenhang definiert man Krankheiten immer häufiger als sogenannte Signalwegserkrankungen (*pathway diseases*), die durch kritische Veränderungen in ganzen Signalkaskaden verursacht werden.

Die in den GWAS identifizierten Schizophrenie-Risikogene wurden dementsprechend hinsichtlich ihrer Zugehörigkeit zu zellulären Signalaktivitäten analysiert (Network and Pathway Analysis Subgroup of Psychiatric Genomics Consortium, 2015). Verschiedene neuronale Signalwege wurden als assoziiert identifiziert, wie beispielsweise Signalwege in der postsynaptischen *density*, Calcium-vermittelte Signalaktivitäten und der MAPK-Signalweg (siehe vorheriger Abschnitt 2.1 für Beispiele von Schizophrenie-Risikogenen, die diesen Signalwegen zugeordnet werden). Diese Aktivitäten lassen sich neurotrophen Signalwegen zuordnen, die Signale von der Synapse bis zum Zellkern weiterleiten (diese sind unter dem englischen Oberbegriff *synapse-to-nucleus signaling* zusammengefasst) und auf Änderungen der synaptischen Plastizität reagieren. Weiterhin wurden auch Immunsignalwege mit der Schizophrenie assoziiert, wobei der bekannteste Vertreter bislang das Komplement-Protein C4 ist, das die Eliminierung von Synapsen fördert (Sekar et al., 2016). Für uns besonders interessant ist zudem der Neuregulin-1-(NRG1)-ERBB4-Signalweg, der in mehreren Studien bereits frühzeitig als Schizophrenie-Signalweg klassifiziert wurde (Balu and Coyle, 2011). Als Rezeptor ist ERBB4 (*Erb-b2-Receptor-Tyrosine-Kinase-4*) prinzipiell für pharmakologische Manipulation leicht zugänglich und stellt somit ein modulierbares Target dar.

2.3 Der NRG1-ERBB4 Signalweg als exemplarischer Signalweg der Schizophrenie

Der NRG1-ERBB4 Signalweg war einer der ersten Signalwege, der mit der Schizophrenie assoziiert wurde. In der GWAS-Analyse aus dem Jahr 2014 waren jedoch unerwarteterweise weder der membranständige Ligand NRG1 noch der Rezeptor ERBB4 als Risikogen vertreten. Allerdings zeigen aktualisierte und bislang unveröffentlichte GWAS-Daten, die noch mehr Patienten und Kontrollen umfassen, dass die Signifikanz für NRG1 und ERBB4 als Risikogene auf genomweitem Niveau tatsächlich gegeben ist (pers. Kommunikation mit Dr. Sergi Papiol, Klinik für Psychiatrie und Psychotherapie, LMU). Studien mit Patientenproben belegen, dass der NRG1-ERBB4 Signalweg in seiner Aktivität erhöht vorliegt und sowohl der Ligand NRG1 als auch der Rezeptor ERBB4 mit Schizophrenie assoziiert waren (Harrison and Law, 2006; Law et al., 2012; Li et al., 2006; Nicodemus et al., 2006; Stefansson et al., 2002). Daraufhin wurden Tiermodelle entwickelt, die der Situation bei Patienten nachempfunden sind und den Liganden NRG1 überexprimieren. Diese Überexpression von NRG1 bedingt eine erhöhte Aktivität (d.h. eine vermehrte Phosphorylierung) des ERBB4-Rezeptors und die NRG1-transgenen Mäuse zeigen Schizophrenie-relevante Phänotypen wie gesteigerte lokomotorische Aktivität und eine verminderte Filterfähigkeit nicht-relevanter Informationen (reduziertes sensomotorisches *Gating* im Präpuls-Inhibitions-Test) sowie Defizite im

Arbeitsgedächtnis und der sozialen Interaktion (Agarwal et al., 2014; Deakin et al., 2009, 2012; Kato et al., 2010; Luo et al., 2014; Yin et al., 2013). Nach dem bislang gängigen Modell wurde angenommen, dass NRG1 in exzitatorischen Pyramidenzellen und ERBB4 in inhibitorischen Interneuronen im Präfrontalen Kortex exprimiert sind und bei der E/H-Balance im Präfrontalen Kortex und somit bei der Entstehung der Schizophrenie eine wichtige regulatorische Rolle spielen würden (Mei and Nave, 2014). Dabei wurde angenommen, dass NRG1 an der Präsynapse lokalisiert ist, wobei diese Lokalisation allerdings nie eindeutig nachgewiesen werden konnte und Immunfärbungen für eine perinukleäre Lokalisation sprachen (Agarwal et al., 2014). Daher wird derzeit angenommen, dass sowohl ERBB4 als auch dessen Liganden NRG1 bzw. Neuregulin-2 (NRG2) in inhibitorischen Interneuronen im präfrontalen Kortex exprimiert werden und somit die E/H-Balance über aktiviertes ERBB4 beeinflussen (Vullhorst et al., 2015 und M. Schwab, nicht publizierte Daten). Eine Erklärung könnte in der Desensibilisierung von Interneuronen liegen, die durch eine erhöhte Internalisierung von NMDA-Rezeptoren verursacht werden kann, wobei dieser Prozess durch aktiviertes ERBB4 vermittelt wird (Vullhorst et al., 2015). Beide Modelle sehen jedoch übereinstimmend vor, dass eine erhöhte ERBB4-Aktivität zu einer verringerten Aktivität von Interneuronen führt. In NRG1-transgenen Tieren konnte dementsprechend eine unausgeglichene exzitatorische und inhibitorische Neurotransmission in Kombination mit veränderter Spine-Größe beobachtet werden (Agarwal et al., 2014). Weiterhin sind diese Endophänotypen in NRG1-transgenen Mäusen reversibel (Yin et al., 2013), so dass angenommen werden kann, dass der NRG1/ERBB4-Signalweg ein valides Target für pharmakologische Interventionen durch Wirksubstanzen darstellt. Daher erscheint es plausibel, dass Substanzen, die die Ausbalancierung der neuronalen Aktivität ermöglichen, geeignete Kandidaten für therapeutische Behandlungen von Schizophrenie, auch über die Positivsymptomatik hinaus, darstellen könnten.

2.4 Drug Repurposing als Abkürzung der Medikamentenentwicklung

Die Entwicklung von Medikamenten ist ein sehr langwieriger (20 – 25 Jahre) und kostenintensiver Prozess (> 4 Mrd. EUR pro zugelassenem Medikament) (Eder et al., 2014). Insbesondere in den klinischen Phasen der Medikamentenentwicklung steigen die Kosten überproportional an und somit sind Ausfälle in diesen Phasen mit großen finanziellen Verlusten verbunden. Zulassungen für Antipsychotika im Bereich der Schizophrenie gab es bislang nur für Medikamente, die die vorrangig Positivsymptomatik adressieren (Elert, 2014). Nichtsdestotrotz gab es auch in jüngster Vergangenheit verschiedenste Bemühungen der Pharmaindustrie, Medikamente gegen die Negativsymptomatik zu entwickeln. Allerdings schlugen die letzten groß angelegten und durchaus vielversprechenden Ansätze fehl. So

konnte der Pharma-Gigant Roche für den als Bitopertin genannten Glycin-Transporter-1-Inhibitor im Jahre 2010 in einem Test der klinischen Phase II zunächst eine Verbesserung der Negativsymptomatik feststellen (Dolgin, 2014; Umbricht et al., 2014). Der Glycin-Transporter-1 befindet sich auf Astrozyten und wenn dieser Transporter inhibiert wird, befindet sich mehr Glycin im synaptischen Spalt (Bergeron et al., 1998). Glyzin selbst koaktiviert NMDA-Rezeptoren, deren Funktion bei Patienten mit Negativsymptomatik defizitär ist (Javitt et al., 1994; Kleckner and Dingledine, 1988; Moghaddam and Javitt, 2012). Eine Erhöhung der Glyzin-Konzentration soll daher zu einer Erhöhung und somit Normalisierung der NMDA-Rezeptor-Aktivität führen. Allerdings konnten die initial vielversprechenden Ergebnisse in einem Test der klinischen Phase III im Jahre 2014 nicht bestätigt werden, da im Vergleich zu Kontrollen die Negativsymptomatik in Patienten nicht signifikant reduziert wurde, so dass die weitere Entwicklung des Medikamentes eingestellt wurde (Dolgin, 2014). Ein weiteres Beispiel für eine in der klinischen Phase gescheitete Substanz ist DMXB-A, ein partieller Agonist des Alpha-7-Nicotin-Acetylcholin-Rezeptors, entwickelt von der Firma Targacept (Winston-Salem, North Carolina, USA). Schizophrenie-Patienten weisen eine Reduktion dieses Rezeptors im präfrontalen Kortex auf und eine Aktivierung des Rezeptors durch DMXB-A bewirkte eine Verbesserung negativer Symptome und kognitiver Defizite in einer kleinen klinischen Studie (Lieberman et al., 2013). Diese Ergebnisse konnten jedoch nicht in der nächstgrößeren Studie (Phase III) bestätigt werden, so dass die Entwicklung ebenfalls eingestellt wurde (Dolgin, 2014).

Diese beiden Beispiele illustrieren, dass die Medikamentenentwicklung von Antipsychotika, die vor allem die Negativsymptomatik und kognitive Defizite verbessern sollen, äußerst kompliziert ist und sehr hohe Kosten verursachen kann. Dies trifft insbesondere zu, wenn die Entwicklung von Wirkstoffen erst in späten Phasen der Medikamentenentwicklung eingestellt wird. Eine Möglichkeit, diese Kosten zu senken und die Entwicklung effizienter zu gestalten, besteht in der Identifikation und Wiederverwertung von bereits zugelassenen Medikamenten für neue Einsatzmöglichkeiten, einem Prozess, der als *Drug Repurposing*, oder auch *Drug Repositioning*, bezeichnet wird (Ashburn and Thor, 2004). In einer derartigen Strategie werden bereits zugelassene Substanzen in zell- und/oder targetbasierten Assays auf die Aktivitätsveränderung von Sekundärtargets getestet, für die die Substanzen ursprünglich nicht entwickelt wurden. Sobald eine Substanz identifiziert und in einem Tiermodell validiert wird, kann dieses Medikament direkt in einer klinischen Studie eingesetzt werden, da für diese Medikamente bereits passende Parameter zu Pharmakodynamik und Pharmakokinetik beschrieben und Nebenwirkungen definiert sind. Zulassungen mit der Strategie des *Drug Repurposings* können bereits nach 5-7 Jahren Entwicklungszeit erreicht werden (Abb. 1A).

Es existiert bereits eine Vielzahl von Neuzulassungen, die mit Hilfe des *Drug Repurposings* realisiert wurden – allerdings trifft das bislang hauptsächlich für Therapien gegen Krebs zu.

Bekannte Beispiele sind Itraconazol (zunächst als Antimykotikum, dann als Hemmer der Angiogenese und gegen Prostatakrebs zugelassen) (Kim et al., 2010) und Nelfinavir (zunächst Hemmer gegen *human immunodeficiency virus* (HIV), dann zur Behandlung gegen Multiples Myelom, Prostatakrebs und Brustkrebs zugelassen) (Shim et al., 2012). Im Bereich der Schizophrenie wurde vorgeschlagen, Medikamente, die mit Hilfe des *Drug Repurposing* identifiziert wurden, primär als sog. Add-on-Therapie anzuwenden (Bumb et al., 2013; Elis et al., 2013). Für existierende Medikamente müssen ebenfalls die biologischen und pharmakologischen Mechanismen sowie Substanz-Target-Interaktionen für neue Anwendungsbereiche adressiert werden. Daher wird potentiellen und leicht zugänglichen molekularen Targets, die in der Schizophrenie eine Rolle spielen, wie beispielsweise den Dopaminrezeptoren und Serotoninrezeptoren, aber auch anderen Targets wie den Nikotinrezeptoren (vgl. oben, Alpha-7-Nicotin-Acetylcholin-Rezeptor) und dem ERBB4 Rezeptor, eine besondere Aufmerksamkeit bei der Entwicklung neuer Wirkstoffen zuteil.

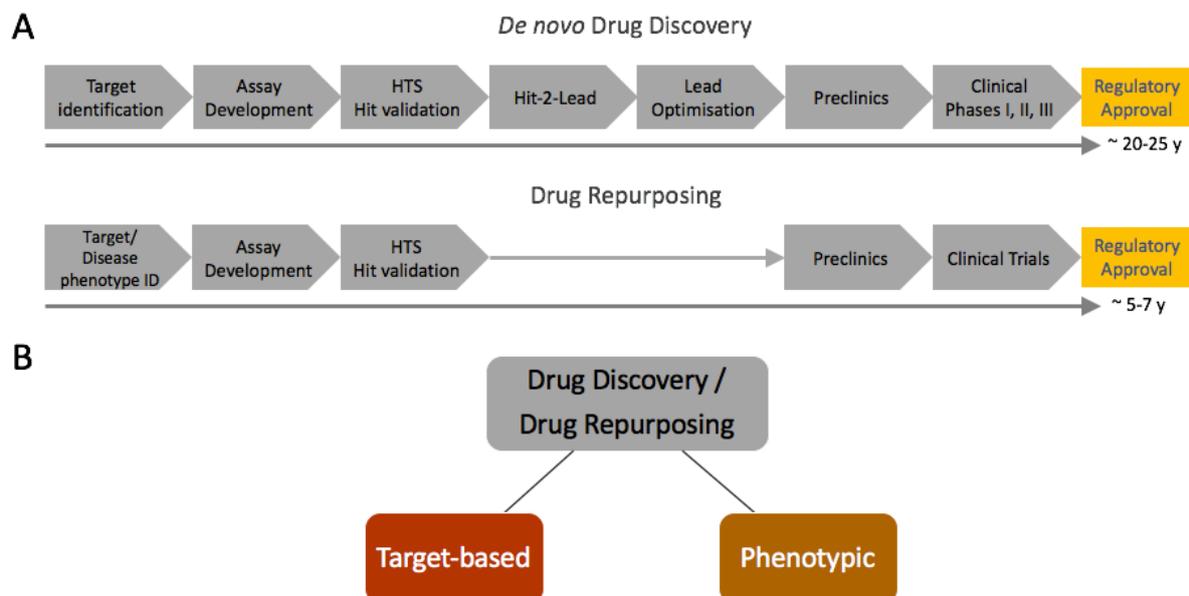


Abb. 1 (A) Vergleich von klassischer Medikamentenentwicklung (*de novo drug discovery*) und des *Drug Repurposing*, d. h. der Wiederverwertung zugelassener Medikamente. Die Entwicklungszeiten des *Drug Repurposing* sind mit 5 – 7 Jahren wesentlich schneller als die der klassischen Medikamentenentwicklung (20 – 25 Jahre), da auf bereits vorhandene Pharmakokinetik-Daten zurückgegriffen werden kann. Zu den bereits bekannten Parametern gehören die Aufnahme eines Arzneistoffes (*Resorption*), die Verteilung im Körper (*Distribution*), der biochemische Um- und Abbau (*Metabolisierung*) sowie die Ausscheidung (*Exkretion*). (B) Die Medikamentenentwicklung bzw. das *Drug Repurposing* kann sowohl mit targetbasiertem Screening als auch mit phänotypischem Screening erfolgen.

Sowohl für die klassische Medikamentenentwicklung als auch für die alternative Strategie des *Drug Repurposing* bedarf es zunächst der Entwicklung von zellulären Assays, mit denen Wirksubstanzen aus Substanzbibliotheken auf die gewünschte Modulation getestet werden können. In Hochdurchsatz-Substanz-Screenings, die zelluläre Assays verwenden, wird zwischen targetbasierten und phänotypischen Screens unterschieden (Abb. 1B).

Targetbasierte Assays messen Aktivitätsänderungen von definierten Zielmolekülen (meist Rezeptoren, da diese pharmakologisch gut zugänglich sind), während phänotypische Screens möglichst nah am physiologischen Readout orientiert sind und die Modulation eines krankheitsrelevanten Phänotyps messen können, auch ohne das verantwortliche Target vorab zu kennen. Für phänotypische Screens wurden drei essentielle Assay-Kriterien aufgestellt, die sogenannten „3 rules of phenotypic screening“ (Vincent et al., 2015): (1) Ein physiologisches Assay-System, das das Krankheitsbild reflektiert und beispielsweise in primären Zelltypen, Ko-Kultur-Systemen, 3D-Kulturen oder aus induzierten pluripotenten Stammzellen (iPS) abgeleiteten Zellen abgebildet werden kann; (2) einen relevanten Stimulus (z. B. ein physiologisch relevanter oder System-intrinsischer Stimulus, z. B. durch Mutation(en) in aus Patienten gewonnen iPS-abgeleiteten Zellen hervorgerufen); (3) ein physiologisch relevanter Readout, der beispielsweise modulierbare Target-Aktivitäten oder synaptische Aktivität in Neuronenkulturen widerspiegeln kann.

Anhand des phänotypischen Screenings können bereits zugelassene Medikamente insbesondere auf neue Wirkweisen getestet werden und somit neue Wege für optimierte Behandlungstherapien eingeschlagen werden. So war der Ansatz des phänotypischen Screenings im Zeitraum von 1999 bis 2008 am erfolgreichsten bei der Identifikation von *First-in-class drugs*, also der ersten Substanz einer neuen Substanzklasse (Swinney and Anthony, 2011). Bei der Entwicklung von Nachfolgesubstanzen, sog. *follower drugs*, war dagegen das targetbasierte Screening vielversprechender. Zudem sind targetbasierte Assays erfolgsversprechend, wenn die Assays sowohl den Target-Mechanismus als auch eine physiologische Relevanz abbilden, wie beispielsweise bei einem Ko-Kultur-Assay, der entweder unterschiedliche Zelltypen berücksichtigt oder es erlaubt, Liganden und Rezeptoren in unterschiedlichen Zellpopulationen zu exprimieren. Die zuletzt beschriebene Option wurde beispielsweise für die Assay-Entwicklung des NRG1-ERBB4-Signalwegs angewandt, um mit Hilfe des *Drug Repurposings* Modulatoren von ERBB4 zu identifizieren (Wehr et al., 2017). Diese Studien zeigen, dass beide Assay- und Screening-Strategien zur erfolgreichen Identifikation und Entwicklung von Medikamenten führen können.

3 Darstellung der habilitationsrelevanten Originalarbeiten

Sowohl das targetorientierte Screening als auch phänotypische Screening-Strategien (siehe Ausblick) werden bzw. wurden von mir angewandt, um Wirksubstanzen auf ihre Effektivität und Selektivität zu testen. Für die Etablierung von Screening-Assays bedarf es der Entwicklung von passenden zellulären Auslese-Technologien. Die Mehrzahl der relevanten Originalarbeiten basiert entweder auf der Entwicklung dieser Assay-Technologien oder wenden diese in Screening- und Validierungsstudien an. Weitere Arbeiten befassen sich mit der Identifikation und Charakterisierung von Komponenten von Signalwegen, die eine Relevanz bei komplexen humanen Krankheiten besitzen.

3.1 Genetisch kodierte Sensoren zur Messung von Protein-Protein-Interaktionen und Target-Aktivitäten

Für die Messung von Target-Aktivitäten in zellbasierten Assays können verschiedene genetisch kodierte Assay-Systeme verwendet werden. Insbesondere sogenannte Split-Protein-Strategien, die auf der funktionellen Komplementation zweier zuvor inaktiver Fragmente basieren, werden oft in zellbasierten Assays für pharmakologische Studien angewandt. Eine Übersicht und Einschätzung der möglichen Strategien und deren Anwendungen haben wir publiziert (Wehr and Rossner, 2016). Viele der beschriebenen Strategien basieren auf dem grünen fluoreszierenden Protein (*green fluorescent protein*, GFP) oder auf der *Firefly*-Luziferase aus dem amerikanischen Leuchtkäfer *Photinus pyralis*. Diese Assays erlauben es, regulierte Protein-Protein-Interaktionen – und somit auch aktivitätsabhängige Interaktionen zwischen Rezeptoren und Adapter- und Effektorproteinen – robust und präzise in lebenden Zellen zu messen. Eine dieser Split-Protein-Strategien beruht auf der *tobacco etch virus* (TEV-) Protease, die es ermöglicht, dynamische Protein-Protein-Interaktionen sowohl im Zytosol als auch an der Zellmembran zu vermessen (Wehr et al., 2006; Wintgens et al., 2017) (Abb. 2A-F).

Zur Messung von Protein-Protein-Interaktionen ist die TEV-Protease in ein N-terminales (NTEV) und C-terminales (CTEV) Fragment aufgeteilt und beide TEV-Fragmente sind jeweils an potentielle Interaktionspartner fusioniert (Abb. 2G zeigt die Interaktion zwischen einem Membranrezeptor und einem zytosolischen Protein). Durch die erfolgte Interaktion der Interaktionspartner kommen die beiden inaktiven TEV-Fragmente in räumliche Nähe und falten sich zu einer funktionellen TEV-Protease, die eine direkt benachbarte TEV-Schnittstelle (*TEV cleavage site*, tcs) schneidet und dadurch den fusionierten Transkriptionsfaktor GAL4-

VP16 (GV) freisetzt. Dieser wird dann in den Kern transportiert, um an künstlich optimierte Transkriptionsfaktor-Bindestellen, sog. *upstream activating sequences*, UAS, zu binden und einen finalen Reporter, wie beispielsweise die *Firefly-Luziferase*, transkriptionell zu aktivieren.

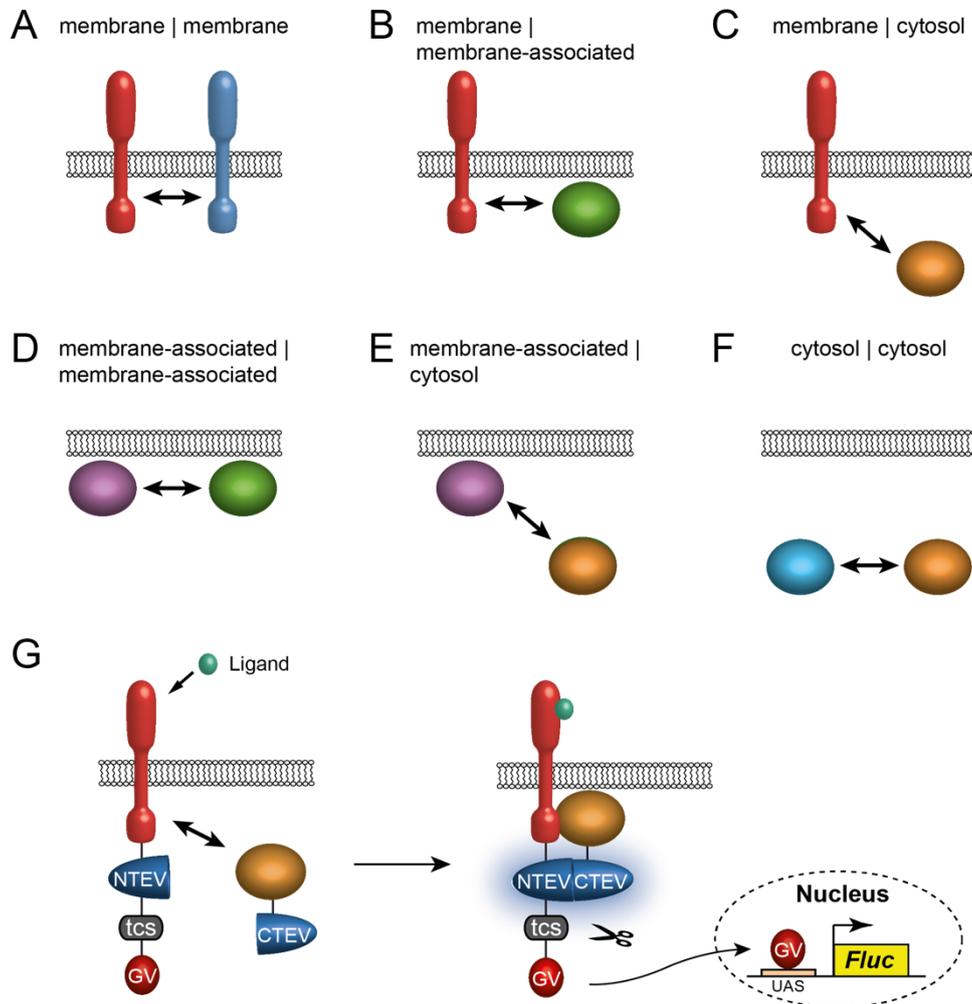


Abb. 2. Das Split-TEV-Protein-Protein-Interaktionssystem. (A-F) Kombinationen von Protein-Protein-Interaktionen, die mit dem Split-TEV-System gemessen werden können. Kandidaten können entweder Membranproteine, membranassoziierte Proteine oder zytosolische Proteine sein. (G) Schematische Darstellung des Split-TEV-Systems für die Interaktion zwischen einem Rezeptor (Membranprotein) und einem zytosolischen Protein. Der Rezeptor ist an das N-terminale Fragment der TEV-Protease (TEV), eine TEV-Schnittstelle (tcs) und den künstlichen Transkriptionsfaktor GAL4-VP16 (GV) fusioniert. Das zytosolische Protein ist an das C-terminale Fragment der TEV-Protease (CTEV) fusioniert. Der durch einen Liganden aktivierte Rezeptor rekrutiert das zytosolische Protein, so dass es zur funktionellen Komplementation der TEV-Protease kommt. Dies führt zur Abspaltung von GV und zur Aktivierung eines Firefly-Luziferase (*Fluc*) Reporter. UAS, *upstream activating sequences*.

Beim Design eines Split-TEV-Assays werden Membranproteine und membranassoziierte Proteine präferentiell an NTEV fusioniert und zusätzlich über eine TEV-Protease-Schnittstelle (tcs, *TEV cleavage site*) an GV (tcs-GV) gekoppelt. Zytosolische Proteine können ebenfalls an tcs-GV fusioniert werden, allerdings muss für diese Proteine sichergestellt werden, dass diese strikt im Zytosol verbleiben und nicht in den Nucleus translozieren können, da es ansonsten zu sehr hohe Hintergrundaktivität kommen kann, was zu falsch-positiven

Ergebnissen führen wurde. Die Split-TEV-Methode wurde für verschiedenste Proteinklassen (d. h. Rezeptoren, membranassoziierte Proteine und zytosolische Proteine) und Interaktionsarten (z. B. konstitutiv versus reguliert/transient) angewendet und eignet sich sowohl als Screening- als auch als Validierungstool für verschiedene Phasen der frühen Medikamentenentwicklung (Abb. 3).

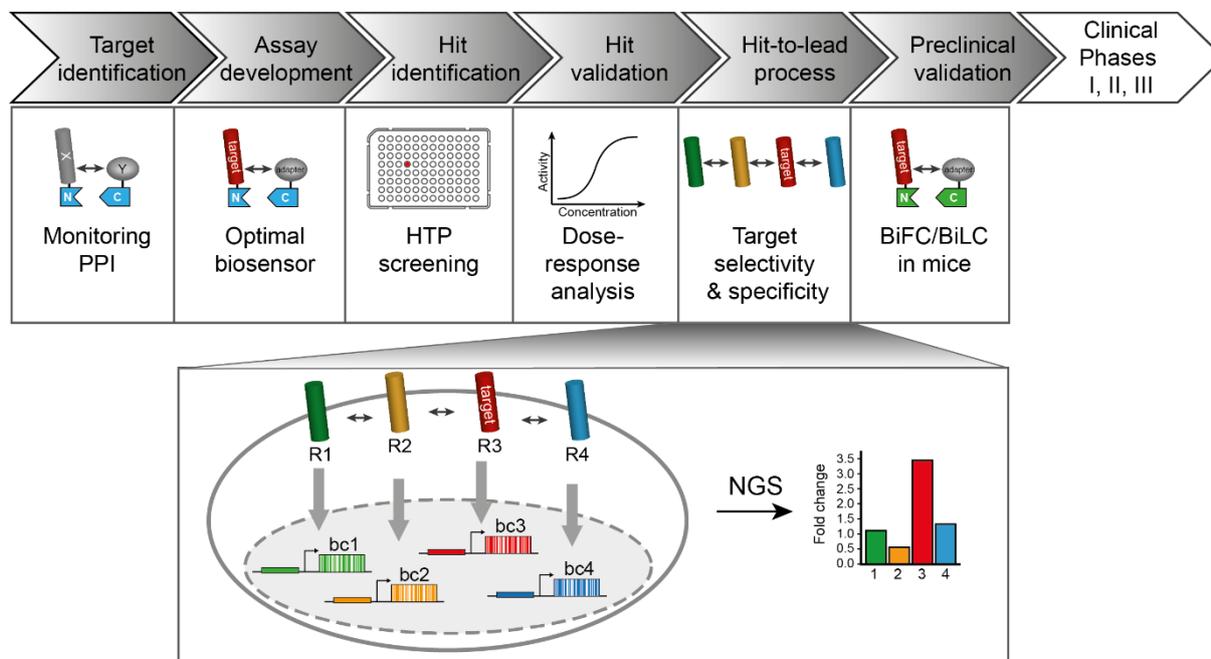


Abb. 3. Anwendungsbeispiele des Split-TEV-Systems in der Medikamentenentwicklung. Das Split-TEV-System wurde bereits erfolgreich von uns wie auch von Kollegen für verschiedene Anwendungen innerhalb der Medikamentenentwicklung eingesetzt, u.a. zur Messung verschiedenster Interaktionen (Monitoring protein-protein interactions, PPI), Hochdurchsatz-Screenings (high-throughput (HTP) screening), Dosis-Wirkungs-Analysen und Target-Selektivitäts-Studien. Der untere Kasten stellt den Einsatz des Split-TEV-Systems in multiparametrischen Assays dar, die mit Next-Generation Sequencing (NGS) ausgelesen werden. BiFC, Bimolekulare Fluoreszenz-Komplementation; BiLC, Bimolekulare Luziferase-Komplementation; R, Rezeptor; bc, molekularer Barcode. (Aus Wehr and Rossner, 2016)

Ein zentrales Anwendungsbeispiel für Rezeptoren sind regulierte Interaktionen von Rezeptor-Tyrosin-Kinasen (RTKs), die aktivitätsabhängig mit Adapterproteinen in sog. Rekrutierungsassays interagieren (Abb. 2C). Mit 58 verschiedenen Rezeptoren in 20 Unterfamilien stellen RTKs eine wichtige Targetklasse für Wirkstoffe dar, zumal sie in vielen entwicklungsbiologischen Prozessen eine Rolle spielen und eine anormale Aktivität von RTKs bei der Entstehung verschiedener Krankheiten zu finden ist, wie z. B. bei Krebs, neurodegenerativen Krankheiten oder der Schizophrenie (Lemmon and Schlessinger, 2010). Anhand der Split-TEV-Methode können aktivitätsabhängig regulierte Interaktionen von RTKs gemessen werden. So wurden mit der Split-TEV-Methode NRG1-vermittelte Interaktionen zwischen dem ERBB4 Rezeptor und dessen Adapter-Proteinen PIK3R1 (*Phosphoinositide-3-Kinase Regulatory Subunit 1*), PIK3R2 (*Phosphoinositide-3-Kinase Regulatory Subunit 2*), GRB2 (*Growth Factor Receptor Bound Protein 2*) und SHC1 (*SHC Adaptor Protein 1*)

vermessen (Wehr et al., 2008). Alle Interaktionen zwischen aktiviertem ERBB4 und den Adapterproteinen erwiesen sich als robust, wobei der Assay zwischen ERBB4 und PIK3R1 die Grundlage für einen späteren Substanzscreen bildete (Wehr et al., 2017). Darüber hinaus haben wir die Split-TEV-Methode auch erfolgreich angewandt, um regulierte Homodimerisierungen aller ERBB-Rezeptoren untereinander zu messen (Wehr et al., 2006, 2017).

Mit Hilfe der Split-TEV-Technik wurden zudem Aktivitäten von verschiedenen G-Protein gekoppelten Rezeptoren (GPCRs) gemessen, wobei hier ein Rekrutierungsassay mit dem zellulären Adapterprotein beta-Arrestin-2 (ARRB2), das aktivitätsabhängig an phosphorylierte GPCRs bindet, entwickelt wurde (Djannatian et al., 2011; Wehr et al., 2015). GPCRs bilden mit mehr als 800 Rezeptoren im menschlichen Genom die größte Klasse an Rezeptoren, die durch endogene und künstliche Substanzen in ihrer Aktivität moduliert werden können (Dorsam and Gutkind, 2007). Neueste Ergebnisse kalkulieren mit einem Anteil von 33% aller Medikamente, die auf GPCRs abzielen (Santos et al., 2016), so dass sensitive pharmakologische GPCR-Assays, beispielsweise basierend auf dem Split-TEV-System, von großer wissenschaftlicher und kommerzieller Bedeutung sind. Die Interaktion eines aktivierten GPCRs mit ARRB2 kommt aufgrund der vorhergehenden Phosphorylierung des GPCRs durch G-Protein gekoppelte Rezeptorkinasen (GRKs) zustande. Eine Bindung von ARRB2 an den phosphorylierten GPCR führt dann zu einer Desensibilisierung der ursprünglichen Rezeptoraktivierung durch eine Internalisierung des Rezeptors. Gleichzeitig werden intrazelluläre Signalprozesse aktiviert (Rajagopal et al., 2005). Mit Hilfe des Split-TEV-Systems konnte beispielsweise die Aktivierung und pharmakologische Inhibierung des Serotoninrezeptors 2A (HTR2A) in einer Dosis-Wirkungs-Kurve gemessen werden (Wehr et al., 2015).

Regulierte Interaktionen von rein löslichen Proteinen konnten ebenfalls von uns mit der Split-TEV-Methode sensitiv gemessen werden. So wurde zum Beispiel die phosphorylierungsabhängige Assoziation von BAD (*BCL2 Associated Agonist Of Cell Death*, ein pro-apoptotischem Regulator) und dem Phospho-Adapter-Protein 14-3-3 mit Split-TEV analysiert und zu biochemischen Untersuchungen korreliert (Wehr et al., 2008).

3.2 Multiparametrische Profilierungsassays zur Bestimmung von Target-Selektivitäten und Signaltransduktionsprozessen

Aufgrund des modularen Aufbaus der Split-TEV-Methode können verschiedene Reporter verwendet werden, um eine Interaktion anzuzeigen. So kann je nach Bedarf zwischen fluoreszenten Proteinen (z. B. GFP), Luziferasen (z. B. *Firefly*) und molekularen Barcodes

gewählt werden. Molekulare Barcodes sind Reporter, die auf kurzen RNA-Molekülen basieren und anhand von *Next-Generation Sequencing*-Technologien quantifiziert werden können. Die Verwendung von molekularen Barcodes ermöglicht pharmakologische Assays in multiparametrischen Formaten, d.h. Assays, die parallel die zeitgleiche Messung mehrerer Targets unter verschiedenen Stimulationsbedingungen erlauben (Botvinnik et al., 2010; Wehr and Rossner, 2016). Derartige Profilierungsassays adressieren beispielsweise die Frage, mit welcher Selektivität und Spezifität ein Wirkstoff ein Target (meist: einen Rezeptor) im Vergleich sowohl zu nah als auch fern verwandten Targets modulieren kann. Diese Assays sind insbesondere bei der Entwicklung von Leitstrukturen im Rahmen der klassischen Medikamentenentwicklung gefragt, können aber auch beim *Drug Repurposing* helfen, die Modulation von Targets besser zu verstehen (Abb. 3).

Mit Hilfe der molekularen Barcodes als Reporter-moleküle wurde für GPCR-sein auf dem Split-TEV-System basierender multiparametrischer Profilierungsassay etabliert, um die Effekte von verschiedenen Substanzen auf diese Rezeptoren zu testen (Galinski et al., 2018). Ein analoger Profilierungsassay wird derzeit für ERBB-Rezeptoren (Wintgens et al., in Vorbereitung) entwickelt. Beide Profilierungsassays enthalten pharmakologisch relevante Targets, die eine Rolle in der Schizophrenie spielen: Bei den GPCRs sind dies u.a. der Dopaminrezeptor DRD2 und der Serotoninrezeptor HTR2A, bei den ERBB-Rezeptoren der ERBB4-Rezeptor. Diese Profilierungsassays sollen in Zukunft beispielsweise beim Validieren von Kandidaten aus *Drug-Repurposing*-Screens angewandt werden und helfen, die molekularen Mechanismen bzgl. Target-Selektivitäten besser zu verstehen. Die aktuelle, sich in Vorbereitung befindliche Publikation für RTKs wird detailliert im Abschnitt „Ausblick“ besprochen.

3.2.1 Multiparametrisches Profilierungstool für G-Protein gekoppelte Rezeptoren zur Bestimmung der Selektivität von Modulatoren

Für GPCRs haben wir einen Profilierungsassay mit 19 GPCRs aus fünf Unterfamilien (serotonerge, dopaminerge, adrenerge, Vasopressin- und Somatostatin-Rezeptoren) etabliert (Galinski et al., 2018). Dieser Profilierungsassay, der *GPCRprofiler* genannt wurde, beruht auf kombinierten Einzelmessungen von Split-TEV-basierten GPCR-Rekrutierungsassays (Djannatian et al., 2011; Wehr et al., 2015) und der Verwendung von molekularen RNA-Barcode-Reportern, die eine multiparametrische Analyse mehrerer Targets unter verschiedenen Stimulationsbedingungen zulassen (Botvinnik et al., 2010). Zur Messung der Selektivität wurden alle GPCRs mit ihren jeweiligen endogenen Liganden aktiviert, die für die Unterfamilien spezifisch sind (Serotonin, Dopamin, Epinephrin, Vasopressin, Somatostatin). Zusätzlich zu den Einzelstimulierungen, die die jeweiligen GPCR-Klassen aktivierten, wurde

ein Mix aus allen fünf Liganden appliziert. Aus dieser kreuzweisen Applikation wurde ersichtlich, dass die von Dopamin und Epinephrin hervorgerufenen Aktivitäten sowohl dopaminerge und adrenerge Rezeptoren aktivierten. Zudem führte eine Stimulierung von Dopamin zu einer Aktivierung von HTR2A- und HTR5A-Rezeptoren, so dass Dopamin eine gewisse Promiskuität gegenüber manchen GPCRs haben kann. Allerdings kann dieser Effekt auch zelltypspezifisch bedingt sein, da Dopamin HTR2A nur in PC12-Zellen (einer Zelllinie gewonnen aus der Nebennierenrinde der Ratte) und HTR5A ausschließlich in U2OS-Zellen (humane Osteosarkom-Zelllinie) aktivierte.

Tabelle 1: Vergleich der Substanzeffekte, die mit dem GPCRprofiler gemessen wurden bzw. in den Datenbanken PubChem (Kim et al., 2016) and IUPHAR (Alexander et al., 2017; Harding et al., 2017) hinterlegt sind.

Rezeptor	Paliperidon			Aripiprazol		
	GPCRprofiler	PubChem	IUPHAR	GPCRprofiler	PubChem	IUPHAR
HTR2A	Antagonist	Antagonist (Cohen, 1994; Megens et al., 1994; Richelson and Souder, 2000)	Antagonist (Schotte et al., 1996)	Agonist	Antagonist (Bortolozzi et al., 2007; Stark et al., 2007)	Agonist (Kroeze et al., 2003; Shapiro et al., 2003)
DRD2	Antagonist	Antagonist (Cohen, 1994; Megens et al., 1994)	N.V.	Agonist	Antagonist/partieller Agonist (Hirose and Kikuchi, 2005; Wood and Reavill, 2007; Wood et al., 2006)	Agonist (Allen et al., 2011; Zajdel et al., 2013)
ADRA2B	Antagonist	Antagonist (Richelson and Souder, 2000)	N.V.	N.V.	Antagonist (Nasrallah, 2008)	N.V.
ADRA2C	Antagonist	N.V.	N.V.	Antagonist	Antagonist (Nasrallah, 2008)	N.V.
HRH1	Antagonist	Agonist (Cohen, 1994; Megens et al., 1994; Richelson and Souder, 2000)	Antagonist (Schotte et al., 1996)	Antagonist	Antagonist (Nasrallah, 2008)	Antagonist (Kroeze et al., 2003)

N.V., nicht verfügbar.

Das GPCR-Profilierungstool wurde anhand der antipsychotischen Substanzen Paliperidon und Aripiprazol auf seine Sensitivität validiert. Paliperidon ist ein DRD2- und HTR2A-Antagonist (Corena-McLeod, 2015; Mauri et al., 2014; Schotte et al., 1996), während Aripiprazol als eine funktionell selektive Substanz sowohl als DRD2-Agonist, aber auch als partieller Agonist und Antagonist für DRD2 beschrieben wurde (Lawler et al., 1999; Shapiro et al., 2003). In dem Profilierungsassay wurden für Paliperidon antagonistische Effekte auf DRD2, HTR2A, auf die beiden adrenergen Rezeptoren ADRA2B und ADRA2C sowie auf den Histamin-Rezeptor HRH1 nachgewiesen. Der antagonistische Effekt auf ADRA2C wurde bislang nicht in der Literatur beschrieben (Tabelle 1). Aripiprazol zeigte sowohl agonistische

Effekte auf DRD2 und HTR2A, als auch antagonistische Effekte auf ADRA2C und HRH1, so dass die Eigenschaft von Aripiprazol als funktionell selektive Substanz bestätigt werden konnte. Die Resultate für beide Substanzen wurden mit publizierten Daten aus Publikationen und Datenbanken abgeglichen und sind in Tabelle 1 zusammengefasst. Das Profilierungstool dient somit (1) zur Identifikation von mehreren GPCR-Aktivitäten innerhalb eines Experiments und (2) zur Profilierung von Substanzaktivitäten in lebenden Zellen.

3.2.2 Multiparametrisches Profilierungstool zur Bestimmung von Signaltransduktionsprozessen

Genetisch komplexe Krankheiten werden auch als Signalwegserkrankungen klassifiziert, da genetische Veränderungen zu gestörten Signalübertragungsprozessen führen können, so dass Zellen in einen krankhaften Zustand versetzt werden. Um diese Veränderungen ganzheitlich nachzuweisen, wurde mit dem cisPROFILER ein Profilierungstool entwickelt, mit dem die Aktivitäten von kritischen Signalkaskaden in unterschiedlichsten Zelltypen, inklusive primärer Neurone, zeitgleich gemessen werden können (Abb. 4A) (Wichert et al., 2015 und unpublizierte Daten – siehe Abschnitt „Ausblick“ und Abb. 7). Dies wird durch die Anwendung von massiv-parallelierten Reporter-Assays (MPRA) erreicht, die als Auslesestrategie auf Signalweg-Sensoren und daran gekoppelte molekulare Barcodes beruhen und somit eine hohe Parallelisierung mit Hilfe der Next-Generation-Sequenzierung erlauben (Botvinnik et al., 2010). Einzelne Sensoren bilden entweder Transkriptionsfaktor- oder Promotoraktivitäten ab, so dass deren Aktivitätsmuster als Endpunkte definierter Signalkaskaden Rückschlüsse auf den Zustand dieser Kaskaden erlauben (Abb. 4A).

Die erste Generation dieses molekularen Profilierungstools enthielt elf Sensoren, die in zwei verschiedene Kategorien eingeteilt wurden: Sensoren für (1) Immediate-early-Gene (IEGs; das sind Gene, die unmittelbar nach einer Stimulation und über MAPK-Kaskaden aktiviert werden und in Neuronen am *synapse-to-nucleus signaling* beteiligt sind) und (2) Gene, die in der zellulären Stressantwort involviert sind (Abb. 4B, Wichert et al., 2015). Eine Stimulation von mit ERBB4 transfizierten PC12-Zellen führte bei der Applikation eines spezifischen Stimulus (hier: *EGF-like domain* (EGFId) bindet und aktiviert als bioaktive Komponente des Liganden NRG1 den ERBB4-Rezeptor) und eines Breitbandstimulus (hier: Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA)/10 % Serum) zu einer differentiellen zellulären Antwort (Abb. 4B). So aktivierte EGFId spezifisch IEG-Sensoren (z. B. AP1, SRE, EGR1, FOS, JUN), während PMA/Serum Stress-Sensoren (z. B. IL6, IL8, NFkB) und einige der IEG-Sensoren (z. B. FOS, JUN) anschaltete. Eine Applikation von Lapatinib, einem ERBB4-Inhibitor, führte zur vollständigen Inaktivierung der EGFId-vermittelten Antwort. Dagegen hatte Lapatinib auf den Breitbandstimulus nur marginale Effekte.

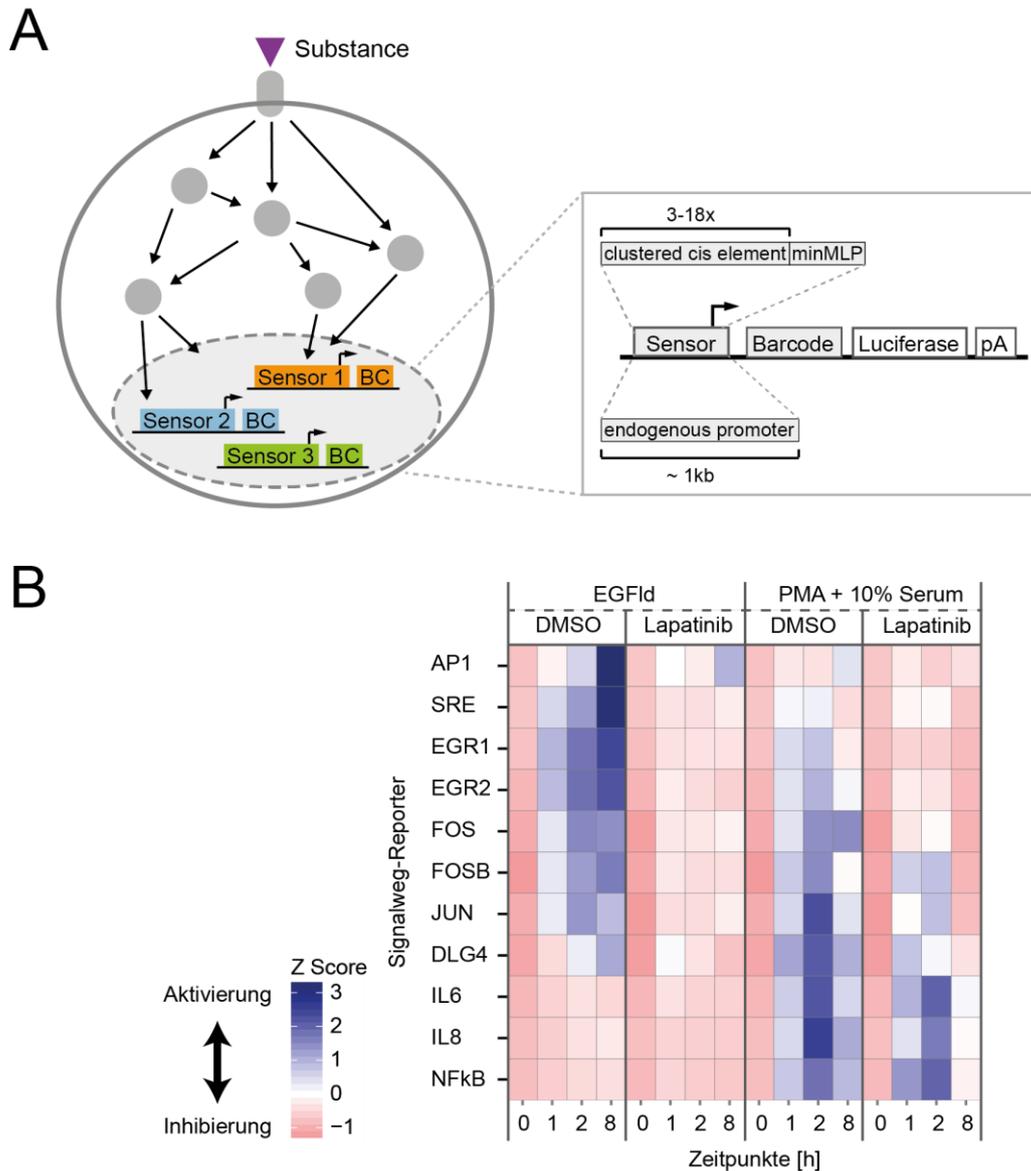


Abb. 4. Multiparametrischer cisPROFILER-Assay. **(A)** Schematische Darstellung des cisPROFILER-Assays. Die Zugabe einer Substanz kann unterschiedliche intrazelluläre Signalkaskaden aktivieren. Die Aktivität dieser Kaskaden wird anhand von genetischen Sensoren, an die Transkriptionsfaktoren binden, gemessen. Die cisPROFILER-Assays verwenden als Readout RNA-basierte molekulare Barcodes (BC, oder sog. expressed sequence tags, EXTs), die durch Next-Generation-Sequencing-Verfahren ausgelesen werden. Da jeder Sensor an einen eigenen Barcode gekoppelt ist, können nahezu beliebig viele Sensoren bzw. Assays gleichzeitig in einem Experiment gemessen werden. Einsatz: Die Sensoren für cisPROFILER-Assay basieren einerseits auf geclusterten Transkriptionsfaktor-Bindestellen (cis elements), die an einen Minimalpromotor (minMLP) gekoppelt sind (oben), und andererseits auf endogenen Promotorsequenzen (unten). **(B)** Quantitative und kinetische Analyse von zellulären Signalaktivitäten mit Hilfe des cisPROFILER-Assays. PC12-Zellen wurden mit dem ERBB4-Rezeptor und der cisPROFILER-Sensor-Bibliothek transfiziert und mit den angegebenen Substanzen stimuliert. Signalaktivitäten, die vom spezifischen Stimulus EGF-like domain (EGFlid) bzw. vom Breitbandstimulus Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA)/10 % Serum hervorgerufen wurden, werden unterschiedlich stark vom Inhibitor Lapatinib inhibiert. Blau: Aktivierung, rot: Inhibierung. Modifiziert aus Wichert et al., 2015.

Diese wegweisende Vorarbeit stellte die Pilotstudie des Profilierungstools dar und war der Startpunkt für Modifikationen, um diese Technik in Neuronen anzuwenden und zelluläre Aktivitätsprofile zu erstellen, die synaptische Aktivität messen können (Herholt et al., in Revision; siehe auch Ausblick, Abb. 7). Daher ist die Anwendung der cisPROFILER-Methodik aus Sicht der psychiatrischen Forschung insbesondere in neuronalen Zelltypen, die von

induzierten Stammzellen aus Schizophrenie-Patienten abgeleitet wurden, interessant (Brennand et al., 2015, 2011; Schadt et al., 2014). Mittels Signalwegprofilierung könnten in Zukunft somit nicht nur Substanzen identifiziert werden, die veränderte Wirkprofile in den Normalzustand zurückversetzen, sondern gleichzeitig potentielle Nebenwirkungen von Medikamenten-Kandidaten aufdecken (Bowes et al., 2012; Moffat et al., 2017).

3.3 Identifizierung chemischer Neuromodulatoren mittels Drug Repurposing

Die Split-TEV-Methode wurde als molekulares Screening-Tool eingesetzt, um anhand einer *Drug-Repurposing*-Strategie neue Modulatoren des NRG1-ERBB4-Signalweges zu identifizieren (Wehr et al., 2017). In dieser Studie wurde insbesondere nach inhibierenden Modulatoren gesucht, da der NRG1-ERBB4-Signalweges in Schizophrenie-Patienten und Mausmodellen in seiner Aktivität erhöht ist (Harrison and Law, 2006; Law et al., 2012; Li et al., 2006; Nicodemus et al., 2006; Stefansson et al., 2002). Um mit diesem Ansatz neue Behandlungsstrategien für die Schizophrenie zu entwickeln, wurde ein Ko-Kultur-Assay-System analog zur Physiologie in Neuronen etabliert: Der Ligand NRG1 wurde in einer ersten Zellpopulation exprimiert, der ERBB4-Rezeptor und die Komponenten der Split-TEV-Assay-Technologie wurden in einer zweiten Zellpopulation exprimiert (Abb. 5). Somit konnte sichergestellt werden, dass der ERBB4-Rezeptor ausschließlich an der Zellmembran aktiviert wird und Substanzen auf ihre inhibitorische Wirkung getestet werden konnten. Die Aktivität von ERBB4 wurde mit Hilfe des Split-TEV-Systems anhand der Stimulus-abhängigen Interaktion mit der regulatorischen Untereinheit 1 der Phosphoinositide-3-Kinase, PIK3R1, gemessen. Für den Split-TEV-Assay wurde ERBB4 mit dem NTEV-Fragment und tcs-GV fusioniert, während PIK3R1 an das CTEV-Fragment gekoppelt wurde. Mit diesem targetbasierten und physiologischem Assay wurde nach der Strategie des *Drug-Repurposing*-Screenings eine 729 zugelassene Substanzen umfassende Bibliothek auf modulatorische Effekte untersucht.

Der Top-Kandidat aus dem Screen war Spironolakton, ein Anti-Mineralokortikoid. Die Effekte von Spironolakton auf ERBB4-Aktivität wurden in Dosis-Wirkungs-Assays mit der Split-TEV-Technik validiert. Weiterhin wurde der inhibitorische Effekt von Spironolakton in biochemischen Analysen sowohl in der Zellkultur als auch in NRG1-überexprimierenden Mäusen anhand reduzierter phospho-ERBB4-Levels bestätigt. Eine Langzeitbehandlung mit Spironolakton von NRG1-transgenen Mäusen (drei Wochen) führte zu Verbesserungen von Endophänotypen für Kognition (Arbeitsgedächtnis im Y-Maze-Test) und Positivsymptomatik (Präpuls-Inhibition, Lokomotoraktivität) zugeordnet werden können. Wir postulieren dafür

den folgenden Wirkmechanismus: Eine Spironolaktone-vermittelte Inaktivierung von ERBB4 in inhibitorischen Interneuronen führt zu verringerter Aktivität der Interneuronen und somit zu einer höheren Aktivität der Pyramidalneuronen. Übereinstimmend mit diesem Modell bewirkt eine Applikation von Spironolaktone in kortikalen Slice-Kulturen eine Erhöhung der inhibitorischen postsynaptischen Ströme (*inhibitory postsynaptic currents, IPSC*), die im Layer II/III von Pyramidalneuronen des präfrontalen Kortexes gemessen wurden. In mit Spironolaktone behandelten NRG1-transgenen Mäusen konnte biochemisch eine Erhöhung der LIM-Kinase-1-(LIMK1)-Aktivität (vermutlich in exzitatorischen Pyramidalneuronen) nachgewiesen werden. Da eine erhöhte Aktivität von LIMK1 mit einer Vergrößerung von synaptischen Spines in Verbindung gebracht wird, könnte eine Inhibition von ERBB4 daher eine Erhöhung der Spine-Aktivität in Pyramidalneuronen bewirken.

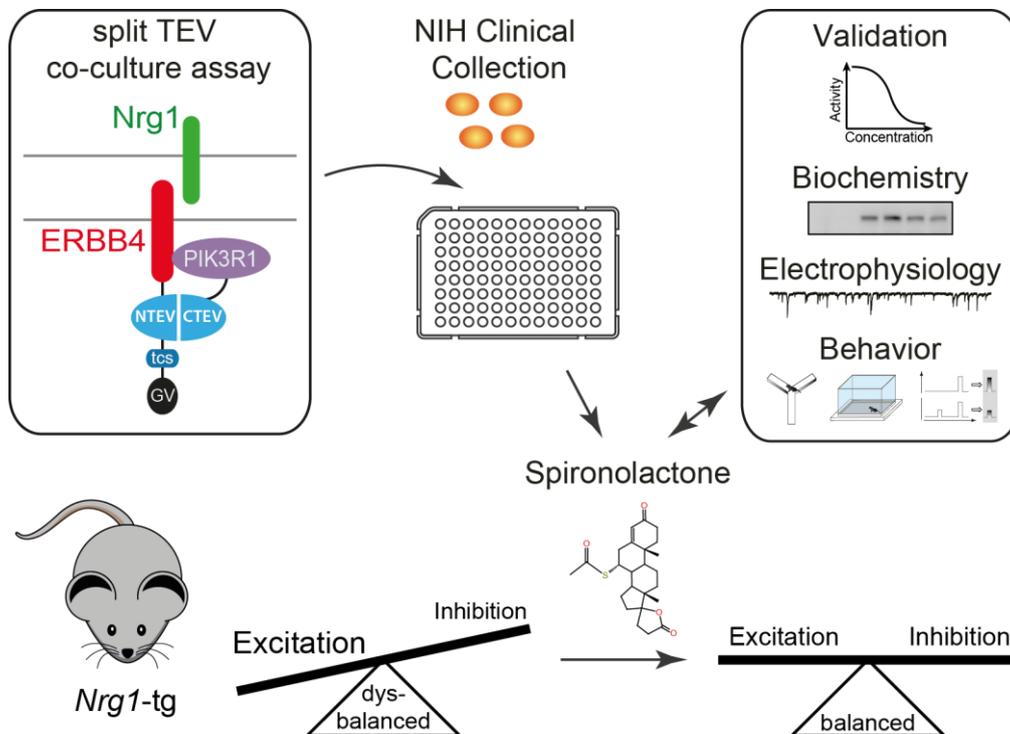


Abb. 5. Spironolaktone ist ein Antagonist des NRG1-ERBB4-Signalweges und verbessert Schizophrenie-relevante Phänotypen im NRG1-Maus-Model. Mit Hilfe des ERBB4-PIK3R1-Split-TEV-Ko-Kultur-Assays (Kasten links oben, Einzelheiten siehe Haupttext) wurde in der NIH Clinical Collection, einer Substanz-Bibliothek von 729 zugelassenen Medikamenten, nach Modulatoren gesucht, die die Aktivität von ERBB4 senken. Als Top-Hit wurde Spironolaktone identifiziert, das anhand verschiedener orthogonaler Assays validiert wurde (Kasten rechts oben, Einzelheiten siehe Haupttext). Wir postulieren, dass NRG1-Mäuse, die mit Spironolaktone behandelt wurden, eine Verbesserung des Erregungs-/Hemmungs-Gleichgewichts aufweisen.

Zusammenfassend lassen die Ergebnisse den Schluss zu, dass eine Spironolaktonebehandlung von NRG-1-transgenen Mäusen zu Verbesserungen von Verhaltensphänotypen führte, nachdem ein bei Menschen relevanter Krankheitsmechanismus gezielt in seiner Aktivität verändert wurde (hier: Verminderung einer ursprünglich erhöhten NRG1-ERBB4-Aktivität in NRG1-transgenen Tieren). Wir interpretieren dies dahingehend, dass das in NRG1-

transgenen Tieren ursprünglich verschobene E/H-Gleichgewicht durch die Gabe von Spironolakton wieder in Richtung des Normalzustandes zurückversetzt wurde (Abb. 5). Aufgrund dieser vielversprechenden Ergebnisse und der Tatsache, dass Spironolakton ein bereits zugelassenes und somit sicheres Medikament ist, wurde eine dreiarmige klinische Studie gestartet, bei der Spironolakton als Add-on-Therapie Schizophrenie-Patienten verabreicht wird (pers. Kommunikation mit P. Falkai, A. Hasan; www.stanleyresearch.org/13T-004/). Bislang sind über 60 Patienten in diese Studie aufgenommen worden. Das detaillierte Protokoll soll in Kürze zur Veröffentlichung eingereicht werden.

3.4 Modulatoren des Hippo-Signalweges

Die Split-TEV-Technologie wurde vom Autor weiterhin in einem RNAi-Hochdurchsatzscreen zur Identifizierung von Regulationsmechanismen des Hippo-Signalweges verwendet (Wehr et al., 2013). Der Hippo-Signalweg ist ein hoch konservierter Signalweg (von *Drosophila melanogaster* bis hin zum Menschen) und reguliert die Proliferation, Differenzierung, Apoptose und zelluläre Polarität verschiedener Zelltypen inklusive Stammzellen und neuraler Zellen wie Astrozyten und Neurone (Panciera et al., 2017) (Abb. 6). Der Signalweg ist in verschiedene komplexe humanen Krankheiten wie Krebs und neurodegenerative Erkrankungen involviert (Piccolo et al., 2014). Auf zellulärer Ebene integriert der Hippo-Signalweg verschiedene Signale, wie zellulären Stress, Zelldichte, mechanische Stimuli, Modulationen des Zytoskeletts und Zustände der zellulären Polarität, und setzt diese Informationen in spezifische Antworten um (Hansen et al., 2015; Panciera et al., 2017). Als ein entscheidender Vermittler der Kontaktinhibition verhindert ein aktiver Signalweg die Proliferation von Zellen und fördert die Differenzierung von Zellen bzw. hält deren Polarität aufrecht. Die Kontaktinhibition hat einen direkten Einfluss auf die subzelluläre Lokalisation vom Yes-assoziierten Protein (YAP) bzw. dessen Homolog TAZ (*Transcriptional Co-Activator With PDZ-Binding Motif*), die beide die Haupteffektoren des Hippo-Signalweges darstellen. Bei aktiviertem Signalweg, z. B. bei hoher Zelldichte, liegt YAP (bzw. TAZ) phosphoryliert vor (vermittelt durch die LATS1/LATS2 Kinasen), ist im Zytoplasma sequestriert und wird gleichzeitig degradiert (Abb. 6A, linke Seite). Bei inaktivem Signalweg hingegen, z. B. bei geringer Zelldichte, ist YAP überwiegend nuklear vorzufinden und fördert bis auf einzelne Ausnahmen die Aktivierung von proliferationsfördernden Zielgenen (Abb. 6B, rechte Seite). In Neuronen fördert ein aktiver Hippo-Signalweg die Differenzierung, wohingegen eine ektopische Inhibierung durch Überexpression von YAP zu Stammzell-ähnlichen Proliferationseffekten führt (Panciera et al., 2017). Zudem wurde eine starke nukleäre Expression von YAP sowohl in pluripotenten Stammzellen als auch in neuronalen

Stammzellen nachgewiesen. Interessanterweise wurden mit TAOK2 und KIBRA (*Kidney and Brain*, auch bekannt als WWC1, *WW And C2 Domain Containing 1*) zwei zentrale Modulatoren des Hippo-Signalweges mit psychiatrischen Erkrankungen in Verbindung gebracht: TAOK2 für Schizophrenie (Schizophrenia Working Group of the Psychiatric Genomics Consortium, 2014) und KIBRA für posttraumatische Belastungsstörung (*posttraumatic stress disorder*, PTSD) (Wilker et al., 2013). Im Absatz „Ausblick“ werden aktuelle Projekte zu TAOK2 detailliert beschrieben.

Um weitere vom Hippo-Signalweg regulierte Regulationsmechanismen zu identifizieren, wurde mit Hilfe des Split-TEV-Systems ein Readout entwickelt, der transiente und dynamische Signale messen kann. Hierfür wurde die Split-TEV-Technik mit genomweitem RNAi-Screening in der *Drosophila*-Zelllinie S2Rplus kombiniert (Wehr et al., 2013). Als Readout für diesen Screen wurde die regulierte Interaktion von Yorkie (Yki, Ortholog von YAP) und des Signalproteins 14-3-3 verwendet und als zellbasierter Assay etabliert. 14-3-3 bindet phosphoryliertes Yki/YAP und hilft, dieses im Zytosol zu sequestrieren. Aus dem RNAi-Screen wurden mit *Drosophila Salt-Inducible Kinase 2* (Sik2) und *Drosophila Salt-Inducible Kinase 3* (Sik3) neue Modulatoren des Hippo-Signalweges identifiziert und *in vivo* in *Drosophila* validiert (Abb. 6C). Eine Überexpression von aktiviertem Sik2 bzw. Sik3 während des Larvenstadiums in Imaginalscheiben, die sich nach der Metamorphose zu Flügeln entwickeln, führte zu einer Vergrößerung der Flügel mit einhergehender Überproliferation und einer transkriptionellen Aktivierung von Zielgenen des Hippo-Signalweges. Sik2 und Sik3 binden an das Strukturprotein Salvador (Sav, Ortholog zu humanem SAV1) und phosphorylieren dieses. Sav ist ein Protein der Hippo-Kernkaskade und aktiviert die beiden zentralen Kinasen des Hippo-Signalweges Hippo (Hpo, *Drosophila* Ortholog zu den Kinasen MST1 (*Mammalian STE20-Like Protein Kinase 2*, auch bekannt als *Serine/Threonine Kinase 4*, STK4) und MST2/STK3) und Warts (Wts, *Drosophila* Ortholog zu den LATS1/LATS2 Kinasen) und hält diese in einem Komplex zusammen. Die Bindung von Sik2/Sik3 an Sav verhindert, dass Sav die beiden Kinasen Hpo und Wts in einem Komplex zusammenhält und aktiviert. Aufgrund der verminderten Wts-Aktivität wandert Yki vermehrt in den Zellkern und aktiviert proliferationsfördernde Zielgene. Sowohl Sik2 als auch Sik3 phosphorylieren Sav an der Aminosäure S413. Die Punktmutation S413A in Sav führt dazu, dass Sik2/Sik3 das Strukturprotein Sav nicht mehr phosphorylieren und aus dem Hippo-Kinase-Komplex entfernen können. Folgerichtig besitzen Fliegen, die die S413A-Mutante tragen, verkleinerte Flügel, da Sav eine erhöhte Hippo-Signalwegaktivität bewirkt. Diese Phosphorylierungsstelle ist jedoch nicht im humanen SAV1 konserviert. Humanes SIK2 kann auch die YAP-vermittelte Transkription erhöhen, allerdings sind die molekularen Mechanismen hier noch unklar (Abb. 6B).

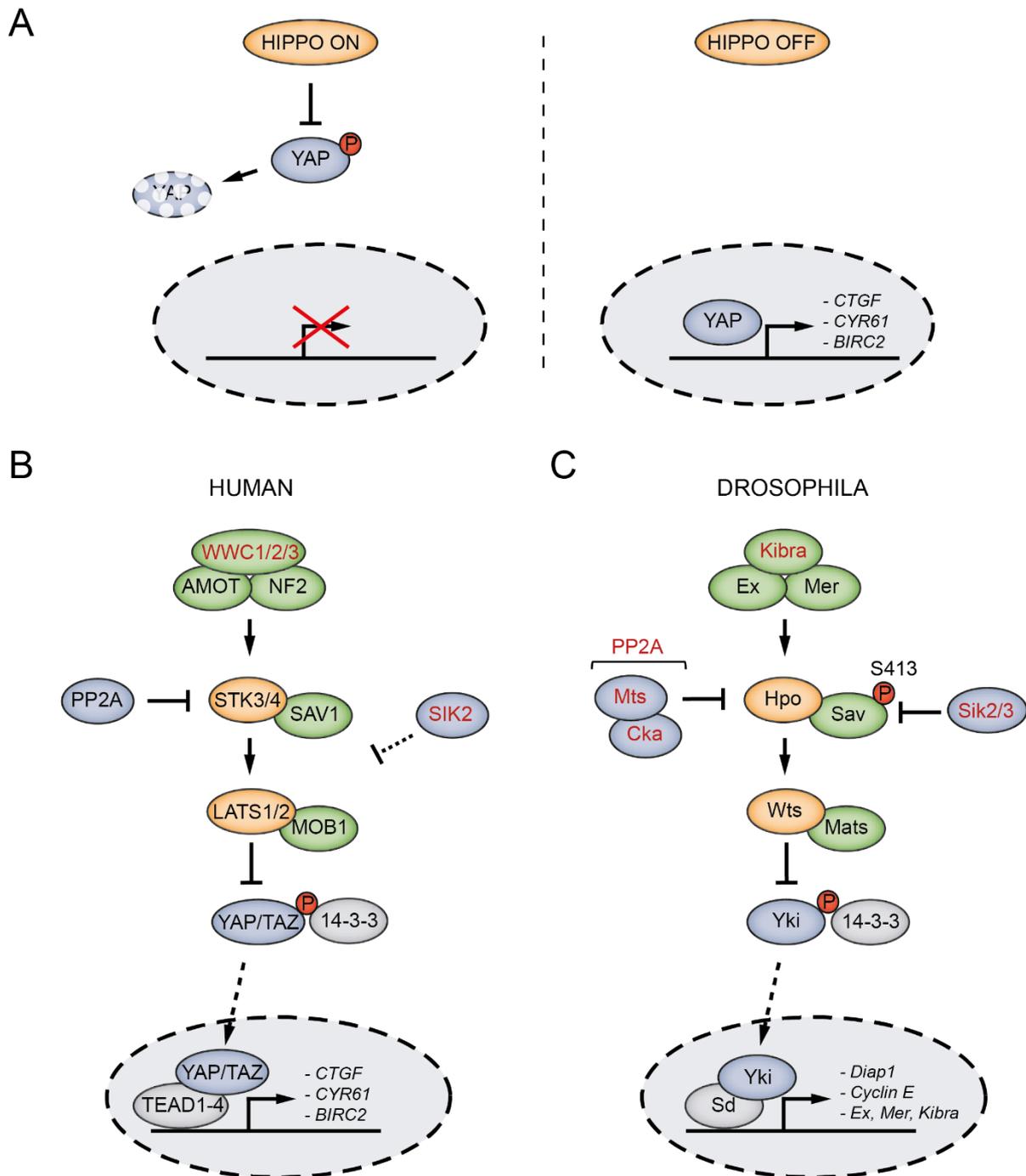


Abb. 6. Der Hippo-Signalweg. (A) Funktionsweise des aktivierten (HIPPO ON) und des inaktivierten (HIPPO OFF) Hippo-Signalweges. Im Falle des aktivierten Signalweges liegt YAP phosphoryliert vor und wird vom Proteasom abgebaut, so dass keine Zielgene aktiviert werden können (linke Seite). Dagegen ist YAP bei inaktivem Hippo-Signalweg nicht phosphoryliert und wandert in den Nukleus, wo YAP Zielgene anschalten kann (rechte Seite). (B, C) Schema des Hippo-Signalweges im Menschen (B) und in *Drosophila melanogaster* (C). In roter Schrift sind alle Komponenten des Signalweges aufgeführt, die der Autor identifiziert bzw. unterstützend charakterisiert hat (humanes WWC1/2/3 (Wennmann et al., 2014), humanes SIK2 (Wehr et al., 2013), *Drosophila* Kibra (Genevet et al., 2010), *Drosophila* PP2A bestehend aus den Komponenten Mts und Cka (Ribeiro et al., 2010), *Drosophila* Sik2 und Sik3 (Wehr et al., 2013)).

Da Sik2 und Sik3 im zellulären Energiehaushalt involviert sind, wird vermutet, dass der Hippo-Signalweg auch Signale des Metabolismus bei der Organentwicklung integrieren kann. So nehmen wir an, dass Yki/YAP-vermitteltes Wachstum nur unter günstigen

Umständen, bei denen genug Energie zur Verfügung steht, stattfindet. Nachfolgende Publikationen bestätigten, dass der Hippo-Signalweg durch den zellulären Energiehaushalt, wie z. B. der Verfügbarkeit von Glucose, reguliert wird (DeRan et al., 2014; Mo et al., 2015; Wang et al., 2015).

Im Rahmen von drei weiteren Studien identifizierten wir zusätzlich wesentliche Regulatoren des Hippo-Signalweges (Abb. 6B,C):

(1) *Drosophila* Kibra/humanes WWC1, ein apikales Protein, erhöht die Signalaktivität der Hippo-Kaskade durch Bindung an *Drosophila* Merlin (Mer)/humanes *Neurofibromatosis 2* (NF2), *Drosophila* Expanded (Ex)/humanes *Angiomotin* (AMOT) sowie Wts/LATS1 (Genevet et al., 2010). Als ein zentrales Gerüstprotein bewirkt Kibra/WWC1, dass die transkriptionelle Aktivität von Yki/YAP inaktiviert ist und phosphoryliert im Zytosol vorliegt. Mit Hilfe der Split-TEV-Technik wurde zudem die Interaktion zwischen humanem KIBRA und NF2 bestätigt. Die mit aus *Drosophila* übereinstimmenden Ergebnisse weisen somit auf eine strukturelle und funktionelle Konservierung der Regulation des Hippo-Signalweges hin.

(2) Die gesamte WWC-Proteinfamilie, zu der auch KIBRA (WWC1) gehört, reguliert die Aktivität des Hippo-Signalweges (Wennmann et al., 2014). Alle WWC-Proteine (WWC1/2/3) interagieren sowohl untereinander als auch mit LATS Kinasen und aktivieren diese, so dass es bei einer erhöhten Expression der WWC-Proteine zu einer Inhibierung der YAP-Aktivität kommt. Demzufolge konnten wir zeigen, dass eine im Zellkulturmodell erhöhte Expression der WWC-Proteine zu einer Verringerung der Proliferationsaktivität von HEK293-Zellen führte.

(3) Der STRIPAK-Phosphatase-2A-Komplex, der in *Drosophila* die zentrale Kinase Hpo dephosphoryliert, ist ein negativer Regulator des Signalweges. Die katalytische Untereinheit der Phosphatase 2A (PP2A) *Microtule star* (Mts) konkurriert hier über ihre regulatorische Untereinheit *Connector of kinase to AP-1* (Cka) mit Sav um Hpo. Folglich führt eine Inaktivierung von Cka bzw. Mts zu erhöhter Hpo-Aktivität und somit zu vermehrter Inaktivierung von Yki (Ribeiro et al., 2010). Dieses Regulationsmuster ist in Säugerzellen konserviert (Bae et al., 2017; Guo et al., 2011).

Die von uns veröffentlichten Arbeiten und weitere Publikationen von Kollegen aus dem Feld legen dar, dass der Hippo-Signalweg durch verschiedene Komponenten moduliert werden kann und dass unterschiedliche physiologische Zusammenhänge (z. B. Metabolismus, Proliferation, Differenzierung, Polarität, mechanische Stimuli) Auswirkungen auf die Aktivität des Signalweges haben (Hansen et al., 2015). Zudem ist der Signalweg in unterschiedlichen Zelltypen inklusive neuraler Zellen (Neuronen, Astrozyten, Oligodendrozyten) aktiv, so dass in Zukunft ein Aspekt sein wird, die Funktion des Hippo-Signalweges und seiner

Komponenten, die eine Assoziation mit psychiatrischen Erkrankungen aufweisen (z. B. TAOK2), in diesen Zelltypen näher zu bestimmen.

4 Ausblick

Folgende Projekte bearbeiten wir zurzeit in meiner Arbeitsgruppe:

4.1 Genetisch kodierte Sensoren für multiparametrische pharmakologische Assays

4.1.1 Etablierung eines Einheitsadapters für RTK-Split-TEV-Assays

Die Messung von RTK-Aktivitäten mit genetisch kodierten Systemen wie der Split-TEV-Methode beruht auf der regulierten Interaktion eines phosphorylierten Rezeptors mit einem Adapterprotein, das mit seiner SH2-Domäne an die phosphorylierte Domäne des Rezeptors binden kann. Da im Gegensatz zu den GPCRs, die in der Regel aktivitätsabhängig mit beta-Arrestin-2 assoziieren, jede RTK einen anderen Satz an Adaptoren binden kann und diese Adaptoren auch unterschiedliche Bindepräferenzen zu einem Rezeptor aufzeigen können (wie wir für ERBB4 mit der Split-TEV-Methode gemessen haben, Wehr et al., 2008), müssen für jeden RTK-Assay unterschiedliche Kombinationen von Rezeptor und Adapter getestet werden. Um diesen Prozess zu vereinfachen und auch für multiparametrische Assays effizienter zu gestalten, haben wir einen künstlichen Adapter generiert, mit dem die Aktivitäten von einer Vielzahl von RTKs gemessen werden können. Ein künstlicher Adapter, der eine verkettete Struktur von mehreren SH2-Domänen, aber keine weiteren Domänen zur Signalweiterleitung besitzt, soll zudem sensitivere Messergebnisse liefern, für Dosis-Wirkungs-Messungen geeignet sein und keinen Einfluss auf endogene Signalkaskaden haben, um auch nachgeschaltete Signalprozesse mit multiparametrischen cisPROFILER-Assays abbilden zu können. Mit dem künstlichen SH2-Phospho-Sensor, der auf einer dreifach verketteten SH2-Domäne von GRB2 (GRB2[SH2]) basiert, konnten wir einen sensitiven Sensor zur Messung aller ERBB-Rezeptor-Aktivitäten entwickeln und in Stimulations- sowie Inhibitionsassays, u.a. im Dosis-Wirkungs-Format, validieren (Wintgens et al., in Revision).

4.1.2 Multiparametrisches Profilierungstool für Rezeptor-Tyrosin-Kinasen

In der Medikamentenentwicklung muss die Selektivität und Spezifität einer Wirksubstanz gegenüber seinem Target validiert werden. Dabei wird getestet, inwieweit die Substanz selektiv für das tatsächliche Targetprotein gegenüber verwandten Targets und anderen denkbaren Proteinen ist. Insbesondere bei RTKs ist es ein bekanntes Problem, dass

allosterische Modulatoren nicht selektiv sind und verwandte Targetrezeptoren modulieren können. Auf Grundlage der zuvor entwickelten einzelnen RTK-Split-TEV-Assays haben wir in diesem Projekt damit begonnen, ein molekulares Werkzeug zu erstellen, mit dem wir Wirkprofile von mehreren RTKs (insbesondere von ERBB-Rezeptoren) gleichzeitig und parallel messen können. Methodisch wird dieses Vorhaben anhand von molekularen Barcodes als Reporter realisiert, die eine Parallelisierung von mehreren Assays ermöglichen. Das Ziel dieses Projekts ist es, in einem einzigen RTK-Profilierungsassay die Aktivitäten aller vier Rezeptoren der ERBB-Familie (EGFR, ERBB2, ERBB3, ERBB4), einer weiteren RTK (z. B. *MET Proto-Oncogene*, auch als c-MET oder *Hepatocyte Growth Factor Receptor* bekannt) und des HTR2A zu kombinieren. Mit diesem multiparametrischen Assay sollen dann beispielsweise ERBB4-Modulatoren auf ihre Selektivität hin getestet werden, um geeignete Kandidaten für nachfolgende Studien (d. h. Klärung des Wirkmechanismus (*mechanism of action*), Verhaltensexperimente im Mausmodell) zu identifizieren.

4.1.3 Multiparametrisches Tool zur Profilierung von Signaltransduktionsprozessen

In den letzten Jahren setzt sich immer mehr die Erkenntnis durch, dass der Schizophrenie auf zellulärer Ebene Störungen von Signaltransduktionsprozessen zugrunde liegen (s. o.). In diesem Zusammenhang spricht man bei Schizophrenie auch von einer Signalwegserkrankung (*pathway disease*) zu, bei der kritische Veränderungen in Signalkaskaden multifaktoriell und nicht durch einzelne Gene verursacht werden (Horváth and Mirnics, 2015; Network and Pathway Analysis Subgroup of Psychiatric Genomics Consortium, 2015). Vor allem die GWAS mit Tausenden von Patienten- und Kontrollproben haben ergeben, dass multiple Nukleotid-Polymorphismen (sog. *single nucleotide polymorphisms*, SNPs) mit erhöhtem Schizophrenie-Risiko assoziiert sind (Schizophrenia Working Group of the Psychiatric Genomics Consortium, 2014). Diese Polymorphismen liegen selten in kodierenden Regionen, sondern meist in Gen-regulatorischen Sequenzen. Deren Auswirkungen auf die Signaltransduktion in sich entwickelnden oder auch in Patienten-abgeleiteten Neuronen zu erforschen, ist ein hochaktuelles Forschungsgebiet in der Schizophrenie-Grundlagenforschung dar und bildet gleichzeitig eine Basis für neue ursachenbezogene Therapieansätze.

Um mehrere Signalwege in lebenden Neuronen parallel messen zu können, haben wir für eine grundlegende Konzeptstudie (*proof-of-concept*) die cisPROFILER-Sensor-Bibliothek in Vektoren für Adeno-assoziierte Viren umkloniert, um einen effizienten Transfer der Sensoren in Neuronen zu garantieren. Zudem haben wir den cisPROFILER auf über 100 Sensoren erweitert, um eine Vielzahl an Signalaktivitäten zu messen, die wir in sieben Kategorien von Signalwegaktivitäten zusammengefasst haben (Abb. 7A). In einer exemplarischen

Signalwegsanalyse haben wir damit primäre kortikale Neuronen aus der Maus mit der Sensor-Bibliothek des cisPROFILERS infiziert und mit fünf verschiedenen Bedingungen stimuliert:

1. Stimulierung der Rezeptor-Tyrosinkinase TrkB (*Neurotrophic Receptor Tyrosine Kinase 2 NTRK2*, auch als *Tyrosine Kinase Receptor B*, TrkB bekannt) mittels BDNF. TrkB aktiviert den MAPK-Signalweg.
2. Inhibition der MAPK/ERK-Aktivität (ERK, *extracellular regulated kinase*) mittels MEK-Inhibitor UO126 (MEK, *MAPK/ERK kinase*).
3. – 5. Neuronale Aktivierung (jeweils mit Bicucullin-4AP-Strychnin-Glycin-Cocktail (GABA_A-Antagonist, Kaliumkanalinhibitor, Glycin-Rezeptorantagonist, Glycin-Rezeptoragonist), Kaliumchlorid (KCl) und Forskolin (Adenylylcyclase-Stimulator).

Die Transkriptionsfaktor- und Promotor-Aktivitäten haben wir über eine Zeitspanne von insgesamt 24h gemessen. Deutlich zu erkennen sind Aktivierungseffekte für Sensoren, die auf Aktivitäten von MAPK-Kaskaden und Calcium-Signalwegen reagieren. Besonders vielversprechend ist, dass die verwendeten Sensoren tatsächlich differentiell auf die unterschiedlichen Stimulationen reagieren (z. B. Erhöhung durch neuronale Aktivierung, aber nicht durch TrkB-Stimulation; spezifische Inaktivierung der BDNF-vermittelten Aktivierung durch den ERK-Inhibitor).

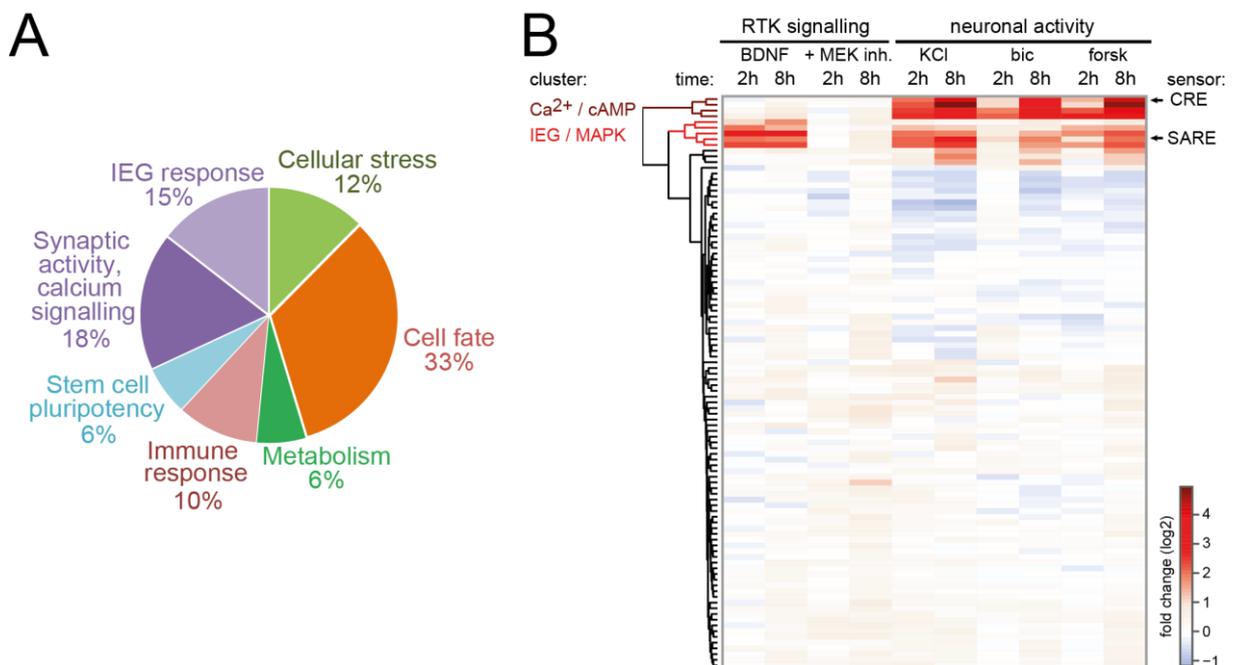


Abb. 7 Multiparametrischer Assay cisPROFILER in primären Neuronen. (A) Die bisher entwickelten Sensoren lassen sich grob in sieben verschiedene Kategorien zellulärer Prozesse einordnen. (B) Beispiel eines cisPROFILER-Assays in primären Neuronenkulturen, die mit brain-derived neurotrophic factor (BDNF), BDNF und MEK-Inhibitor UO126, KCl, Bicuculline (bic) und Forskolin (forsk) stimuliert wurden. CRE, CREB responsive element; SARE, synaptic activity-responsive element.

Diese Ergebnisse bestätigen die verschiedenen Einflüsse von MAPK-Kaskaden und Calcium-abhängigen Signalwegen bei der neuronalen Signalverarbeitung (Hagenston and Bading,

2011; Thomas and Huganir, 2004). So zeigt beispielsweise der synaptische Aktivitätssensor SARE (*synaptic activity-responsive element*), der sowohl Calcium- als auch MAPK-vermittelte Signale detektiert, eine Modulation nach Zugabe aller getesteten Stimulantien an. Dagegen reagiert der CRE (*CREB-responsive element*) Sensor spezifisch auf eine Aktivierung von Calcium-vermittelten Signalwegen (Abb. 7B).

In darauf aufbauenden Experimenten planen wir, dieses multiparametrische Profilierungstool mit pharmakologischen und genetischen Interventionen (z. B. mit dem Schizophrenie-Risikogen TAOK2, siehe unten) zu kombinieren, um Veränderungen von relevanten Signalkaskaden zu messen. Beispielsweise sollen mit Hilfe einer Kombination aus phänotypischem Screening und *Drug Repurposing* in Neuronenkulturen, die defizient für Schizophrenie-Risikogene sind, Substanzen identifiziert werden, die bereits als Medikamente zugelassen sind und die synaptische Aktivität erhöhen können. Als Auslesesystem bieten sich beispielsweise der SARE-Sensor oder ein anderer Sensor an, der synaptische Aktivitäten effizient messen kann (z. B. CRE oder EGR1) an. Darüber hinaus ermöglicht diese Entwicklung eines multiparametrischen Signalweg-Assays die unvoreingenommene Identifikation neuer Targets, die die Aktivität definierter Signalwege modulieren. Dieser Assay, der pathScreeener genannt wird, basiert auf der Kopplung eines Aktivitätssensors (z. B. SARE-Sensor) und der genetischen Inaktivierung einer Vielzahl von Genen (z. B. mittels shRNA oder CRISPRi). Der Assay wurde in primären Neuronenkulturen getestet und identifizierte zentrale Modulatoren neuronaler Aktivität (Herholt et al., in Revision).

4.2 Wirkmechanismen des Schizophrenie-Risikogens TAOK2 in der Zellkultur und im Mausmodell

Das Schizophrenie-Risikogen TAOK2 gehört zur Familie der *Thousand-And-One*-Kinasen (TAOK), die aus den drei Genen TAOK1, TAOK2 und TAOK3 besteht. TAOK2 ist eine MAP-Kinase-Kinase-Kinase und wird in klassischen zellulären Modellen durch zellulären Stress aktiviert (Chen and Cobb, 2001; Moore et al., 2000), um dann über die Kinasen p38 und JNK zelluläre Stress-Signalwege zu aktivieren. TAOK2 reguliert zudem das Aktin-Zytoskelett. In Neuronen hat TAOK2 zudem eine Rolle bei der Ausbildung neuronaler Plastizität (Baltussen et al., 2017).

4.2.1 TAOK2 als Regulator der neuronalen Erregbarkeit

Die zellulären Funktionen von TAOK2 sind direkt mit der strukturellen und funktionellen Plastizität von Synapsen verbunden. So fördert TAOK2 aufgrund seiner regulatorischen

Funktion für das Zytoskelett die Arborisierung von Neuronen (Calderon de Anda et al., 2012). In Synapsen wird TAOK2 durch die regulierte Endozytose von N-Cadherin aktiviert (Yasuda et al., 2007). Weiterhin fördert TAOK2 die Ausbildung von reifen synaptischen Spines, indem es Septin-7 (SEPT7) bindet und phosphoryliert (Yadav et al., 2016). Phosphoryliertes SEPT7 wiederum bindet an das *Post-Synaptic Density Protein 95* (PSD-95) und stabilisiert dieses, so dass es zu gefestigten Synapsen kommt. Im Gegensatz dazu führt inaktiviertes TAOK2 zu delokalisierten Synapsen am dendritischen Schaft, wodurch es zu einem Defekt der Calcium-Kompartimentalisierung und somit zu einer Beeinträchtigung der Calcium-Signaltransduktion kommt.

Um die Funktion von TAOK2 für die Ausprägung synaptischer Plastizität besser zu verstehen, haben wir Interaktionsstudien zwischen Proteinen aus der *Post-Synaptic Density* und TAOK2 unter Verwendung der Split-TEV-Methode geplant. Anhand dieser Daten wollen wir eine Interaktionskarte erstellen, die die Funktion von TAOK2 bei der strukturellen Plastizität beschreibt und die Grundlage für zukünftige pharmakologische Interventionsstudien ist. Weiterhin planen wir, den Effekt von TAOK2 auf neuronale Signalwege zu untersuchen, insbesondere das *Synapse-to-Nucleus Signalling*, den Calcium-Signalweg und den MAPK-Signalweg. Hierzu soll TAOK2 in primären Neuronenkulturen aus der Maus inaktiviert bzw. überexprimiert und Veränderungen in Signalprofilen mit Hilfe der multiparametrischen cisPROFILER-Assays gemessen werden (siehe folgende Abschnitte und Abb. 7). Veränderungen in globalen Signalaktivitäten sollen in die Interaktionskarte integriert werden, um ein ganzheitliches Verständnis der Regulation durch TAOK2 auf synaptische Plastizität zu erhalten.

4.2.2 Entwicklung und Verhaltensanalyse eines TAOK2 Mausmodells

Die Inaktivierung von TAOK2 in der Maus soll als Modell dienen, um sowohl neuronale Erregbarkeit als auch Phänotypen im Verhalten und damit einhergehende kompensatorische Mechanismen zu verstehen. Mit dieser ausführlich charakterisierten TAOK2-Maus wollen wir die in-vitro-charakterisierten TAOK2-Modulatoren in Verhaltensversuchen validieren.

In Mäusen führt eine Inaktivierung von TAOK2 im Vorderhirn zu erhöhter Lokomotoraktivität (Kapfhamer et al., 2013), einem Phänotyp, der mit der Positivsymptomatik von Schizophrenie-Patienten in Verbindung gebracht wird (van den Buuse, 2010). Eine umfassende Analyse von Verhaltenstests, die Schizophrenie-relevante Phänotypen abbilden, steht jedoch noch aus. Daher wollen wir mit der nun vorliegenden TAOK2-Mutante, bei der TAOK2 spezifisch im Vorderhirn mittels Camk2a-Cre inaktiviert wird (Taok2^{fl/fl} x Camk2a-Cre; kurz: Taok2^{-/-}), eine umfassende Verhaltensanalyse auf Schizophrenie-relevante Phänotypen durchführen. Diese Tiere werden beispielsweise auf Lokomotoraktivität, Präpuls-Inhibition,

Arbeitsgedächtnis (*Y-Maze-Test*) und Motivationsverhalten (z. B. *Sucrose-Preference-Test*) untersucht werden. Diese Verhaltenstests werden wir mit sozialen Interaktionstests (*social isolation, social defeat*) kombinieren, um entsprechend der *Two-Hit-Hypothese* der Schizophrenie (s. o.) auch die psychosoziale Komponente im Tiermodell abzubilden. Weiterhin werden wir die TAOK2-Mutanten auf veränderte Signalaktivitäten von relevanten Signalkaskaden (z. B. Calcium- und MAPK-Signalwege) untersuchen.

Eine Duplikation des TAOK2-Gens im genomischen Locus 16p11.2 wurde in Schizophrenie-Patienten identifiziert, eine Mikrodeletion wurde dagegen mit Autismus assoziiert (Maillard et al., 2015; Steinberg et al., 2014). Daher wollen wir ebenfalls eine TAOK2 überexprimierende Maus generieren, da bei anderen mit der Schizophrenie assoziierten Genen wie z. B. ERBB4 und NRG1 sowohl die Über- als auch die Unterexpression zu vergleichbaren und zum Teil überlappenden Phänotypen führt (gemäß dem sog. *inverted U-shaped model*) (Mattay et al., 2003).

4.2.3 TAOK2 als Regulator des Hippo-Signalweges

Für TAOK1 und TAOK3 wurde eine Aktivierung des Hippo-Signalweges nachgewiesen, wobei TAOK1 und TAOK3 sowohl die MST-Kinasen als auch die nachgeschalteten LATS-Kinasen über Phosphorylierung aktivieren (Boggiano et al., 2011; Plouffe et al., 2016; Poon et al., 2011). Bisherige Studien zeigen jedoch keine Regulation des Hippo-Signalweges durch TAOK2 (Plouffe et al., 2016). In einem fokussierten Protein-Protein-Interaktionsscreen von potentiellen Modulatoren des Hippo-Signalweges haben wir eine starke Assoziation zwischen TAOK2 und LATS1/LATS2 festgestellt. Dies konnten wir biochemisch anhand von Ko-Immunopräzipitationen validieren. In einem zellbasierten Assay, der eine transkriptionelle Aktivierung von YAP misst, verursachte TAOK2 eine potente Inhibierung der YAP-Aktivität, die signifikant höher war als die TAOK1- oder TAOK3-vermittelte Inhibierung. Unsere Daten sprechen dafür, dass TAOK2 ein zentraler Regulator des Hippo-Signalweges ist. In weiterführenden Experimenten untersuchen wir zurzeit sowohl den molekularen Mechanismus (d.h. die Phosphorylierung von nachgeschalteten Kaskadenkomponenten LATS1 und YAP) als auch die physiologische Wirkung (d.h. Effekte auf Differenzierung und Proliferation) (Ma et al, in Vorbereitung).

5 Literaturverzeichnis

- Agarwal, A., Zhang, M., Trembak-Duff, I., Unterbarnscheidt, T., Radyushkin, K., Dibaj, P., Martins de Souza, D., Boretius, S., Brzózka, M.M., Steffens, H., et al. (2014). Dysregulated expression of neuregulin-1 by cortical pyramidal neurons disrupts synaptic plasticity. *Cell Rep* 8, 1130–1145.
- Alexander, S.P., Christopoulos, A., Davenport, A.P., Kelly, E., Marrion, N.V., Peters, J.A., Faccenda, E., Harding, S.D., Pawson, A.J., Sharman, J.L., et al. (2017). THE CONCISE GUIDE TO PHARMACOLOGY 2017/18: G protein-coupled receptors. *Br J Pharmacol* 174, S17–S129.
- Allen, J.A., Yost, J.M., Setola, V., Chen, X., Sassano, M.F., Chen, M., Peterson, S., Yadav, P.N., Huang, X., Feng, B., et al. (2011). Discovery of β -Arrestin-Biased Dopamine D2 Ligands for Probing Signal Transduction Pathways Essential for Antipsychotic Efficacy. *Proceedings of the National Academy of Sciences*.
- Angrist, B., Rotrosen, J., and Gershon, S. (1980). Differential effects of amphetamine and neuroleptics on negative vs. positive symptoms in schizophrenia. *Psychopharmacology (Berl.)* 72, 17–19.
- Ashburn, T.T., and Thor, K.B. (2004). Drug repositioning: identifying and developing new uses for existing drugs. *Nat Rev Drug Discov* 3, 673–683.
- Bae, S.J., Ni, L., Osinski, A., Tomchick, D.R., Brautigam, C.A., and Luo, X. (2017). SAV1 promotes Hippo kinase activation through antagonizing the PP2A phosphatase STRIPAK. *Elife* 6.
- Baltussen, L.L., Rosianu, F., and Ultanir, S.K. (2017). Kinases in synaptic development and neurological diseases. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*.
- Balu, D.T., and Coyle, J.T. (2011). Neuroplasticity Signaling Pathways Linked to the Pathophysiology of Schizophrenia. *Neurosci Biobehav Rev* 35, 848–870.
- Baumeister, A.A. (2013). The chlorpromazine enigma. *J Hist Neurosci* 22, 14–29.
- Beasley, C.L., and Reynolds, G.P. (1997). Parvalbumin-immunoreactive neurons are reduced in the prefrontal cortex of schizophrenics. *Schizophr. Res.* 24, 349–355.
- Bergeron, R., Meyer, T.M., Coyle, J.T., and Greene, R.W. (1998). Modulation of N-methyl-D-aspartate receptor function by glycine transport. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95, 15730–15734.
- Boggiano, J.C., Vanderzalm, P.J., and Fehon, R.G. (2011). Tao-1 Phosphorylates Hippo/MST Kinases to Regulate the Hippo-Salvador-Warts Tumor Suppressor Pathway. *Dev. Cell* 21, 888–895.
- Bortolozzi, A., Díaz-Mataix, L., Toth, M., Celada, P., and Artigas, F. (2007). In vivo actions of aripiprazole on serotonergic and dopaminergic systems in rodent brain. *Psychopharmacology (Berl.)* 191, 745–758.
- Botvinnik, A., Wichert, S.P., Fischer, T.M., and Rossner, M.J. (2010). Integrated analysis of receptor activation and downstream signaling with EXTassays. *Nat. Methods* 7, 74–80.
- Bowes, J., Brown, A.J., Hamon, J., Jarolimek, W., Sridhar, A., Waldron, G., and Whitebread, S. (2012). Reducing safety-related drug attrition: the use of in vitro pharmacological profiling. *Nat Rev Drug Discov* 11, 909–922.

- Brennand, K., Savas, J.N., Kim, Y., Tran, N., Simone, A., Hashimoto-Torii, K., Beaumont, K.G., Kim, H.J., Topol, A., Ladrán, I., et al. (2015). Phenotypic differences in hiPSC NPCs derived from patients with schizophrenia. *Mol. Psychiatry* *20*, 361–368.
- Brennand, K.J., Simone, A., Jou, J., Gelboin-Burkhart, C., Tran, N., Sangar, S., Li, Y., Mu, Y., Chen, G., Yu, D., et al. (2011). Modelling schizophrenia using human induced pluripotent stem cells. *Nature advance online publication*.
- Brisch, R., Saniotis, A., Wolf, R., Bielau, H., Bernstein, H.-G., Steiner, J., Bogerts, B., Braun, K., Jankowski, Z., Kumaratilake, J., et al. (2014). The Role of Dopamine in Schizophrenia from a Neurobiological and Evolutionary Perspective: Old Fashioned, but Still in Vogue. *Front. Psychiatry* *5*.
- Bumb, J.M., Enning, F., and Leweke, F.M. (2013). Repurposed drugs for the treatment of schizophrenia and bipolar disorders. *Curr Top Med Chem* *13*, 2364–2385.
- van den Buuse, M. (2010). Modeling the Positive Symptoms of Schizophrenia in Genetically Modified Mice: Pharmacology and Methodology Aspects. *Schizophr Bull* *36*, 246–270.
- Calderon de Anda, F., Rosario, A.L., Durak, O., Tran, T., Gräff, J., Meletis, K., Rei, D., Soda, T., Madabhushi, R., Ginty, D.D., et al. (2012). Autism spectrum disorder susceptibility gene TAO2 affects basal dendrite formation in the neocortex. *Nat. Neurosci.* *15*, 1022–1031.
- Carlsson, A., and Lindqvist, M. (1963). EFFECT OF CHLORPROMAZINE OR HALOPERIDOL ON FORMATION OF 3METHOXYTYRAMINE AND NORMETANEPHRINE IN MOUSE BRAIN. *Acta Pharmacol Toxicol (Copenh)* *20*, 140–144.
- Chang, S., Fang, K., Zhang, K., and Wang, J. (2015). Network-Based Analysis of Schizophrenia Genome-Wide Association Data to Detect the Joint Functional Association Signals. *PLoS One* *10*.
- Chen, Z., and Cobb, M.H. (2001). Regulation of stress-responsive mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways by TAO2. *J. Biol. Chem.* *276*, 16070–16075.
- Cohen, L.J. (1994). Risperidone. *Pharmacotherapy* *14*, 253–265.
- Corena-McLeod, M. (2015). Comparative Pharmacology of Risperidone and Paliperidone. *Drugs in R&D* *15*, 163.
- Coyle, J.T. (2012). NMDA Receptor and Schizophrenia: A Brief History. *Schizophr Bull* *38*, 920–926.
- Deakin, I.H., Law, A.J., Oliver, P.L., Schwab, M.H., Nave, K.A., Harrison, P.J., and Bannerman, D.M. (2009). Behavioural characterization of neuregulin 1 type I overexpressing transgenic mice. *Neuroreport* *20*, 1523–1528.
- Deakin, I.H., Nissen, W., Law, A.J., Lane, T., Kanso, R., Schwab, M.H., Nave, K.-A., Lamsa, K.P., Paulsen, O., Bannerman, D.M., et al. (2012). Transgenic overexpression of the type I isoform of neuregulin 1 affects working memory and hippocampal oscillations but not long-term potentiation. *Cereb. Cortex* *22*, 1520–1529.
- DeRan, M., Yang, J., Shen, C.-H., Peters, E.C., Fitamant, J., Chan, P., Hsieh, M., Zhu, S., Asara, J.M., Zheng, B., et al. (2014). Energy stress regulates hippo-YAP signaling involving AMPK-mediated regulation of angiomin-like 1 protein. *Cell Rep* *9*, 495–503.
- Djannatian, M.S., Galinski, S., Fischer, T.M., and Rossner, M.J. (2011). Studying G protein-coupled receptor activation using split-tobacco etch virus assays. *Analytical Biochemistry* *412*, 141–152.

- Dolgin, E. (2014). Therapeutics: Negative feedback. *Nature* 508, S10–S11.
- Dorsam, R.T., and Gutkind, J.S. (2007). G-protein-coupled receptors and cancer. *Nat Rev Cancer* 7, 79–94.
- Eder, J., Sedrani, R., and Wiesmann, C. (2014). The discovery of first-in-class drugs: origins and evolution. *Nat Rev Drug Discov* 13, 577–587.
- Eichler, S.A., and Meier, J.C. (2008). E-I balance and human diseases - from molecules to networking. *Front Mol Neurosci* 1, 2.
- Elert, E. (2014). Aetiology: Searching for schizophrenia's roots. *Nature* 508, S2–S3.
- Elis, O., Caponigro, J.M., and Kring, A.M. (2013). Psychosocial treatments for negative symptoms in schizophrenia: current practices and future directions. *Clin Psychol Rev* 33, 914–928.
- Galinski, S., Wichert, S.P., Rossner, M.J., and Wehr, M.C. (2018). Multiplexed profiling of GPCR activities by combining split TEV assays and EXT-based barcoded readouts. *Sci Rep* 8, 8137.
- Genevet, A., Wehr, M.C., Brain, R., Thompson, B.J., and Tapon, N. (2010). Kibra is a regulator of the Salvador/Warts/Hippo signaling network. *Dev. Cell* 18, 300–308.
- Gilman, S.R., Chang, J., Xu, B., Bawa, T.S., Gogos, J.A., Karayiorgou, M., and Vitkup, D. (2012). Diverse types of genetic variation converge on functional gene networks involved in schizophrenia. *Nat. Neurosci.* 15, 1723–1728.
- Guo, C., Zhang, X., and Pfeifer, G.P. (2011). The tumor suppressor RASSF1A prevents dephosphorylation of the mammalian STE20-like kinases MST1 and MST2. *J. Biol. Chem.* 286, 6253–6261.
- Gustavsson, A., Svensson, M., Jacobi, F., Allgulander, C., Alonso, J., Beghi, E., Dodel, R., Ekman, M., Faravelli, C., Fratiglioni, L., et al. (2011). Cost of disorders of the brain in Europe 2010. *Eur Neuropsychopharmacol* 21, 718–779.
- Hagenston, A.M., and Bading, H. (2011). Calcium Signaling in Synapse-to-Nucleus Communication. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 3.
- Hansen, C.G., Moroishi, T., and Guan, K.-L. (2015). YAP and TAZ: a nexus for Hippo signaling and beyond. *Trends in Cell Biology* 25, 499–513.
- Harding, S.D., Sharman, J.L., Faccenda, E., Southan, C., Pawson, A.J., Ireland, S., Gray, A.J.G., Bruce, L., Alexander, S.P.H., Anderton, S., et al. (2017). The IUPHAR/BPS Guide to PHARMACOLOGY in 2018: updates and expansion to encompass the new guide to IMMUNOPHARMACOLOGY. *Nucleic Acids Res.*
- Harrison, P.J., and Law, A.J. (2006). Neuregulin 1 and schizophrenia: genetics, gene expression, and neurobiology. *Biol. Psychiatry* 60, 132–140.
- Harrison, P.J., Law, A.J., and Eastwood, S.L. (2003). Glutamate receptors and transporters in the hippocampus in schizophrenia. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1003, 94–101.
- Hirose, T., and Kikuchi, T. (2005). Aripiprazole, a novel antipsychotic agent: dopamine D2 receptor partial agonist. *J. Med. Invest.* 52 Suppl, 284–290.
- Horváth, S., and Mirnics, K. (2015). Schizophrenia as a Disorder of Molecular Pathways. *Biol Psychiatry* 77, 22–28.

- Insel, T.R. (2010). Rethinking schizophrenia. *Nature* 468, 187–193.
- Insel, T.R. (2012). Next-generation treatments for mental disorders. *Sci Transl Med* 4, 155ps19.
- Jahchan, N.S., Dudley, J.T., Mazur, P.K., Flores, N., Yang, D., Palmerton, A., Zmoos, A.-F., Vaka, D., Tran, K.Q.T., Zhou, M., et al. (2013). A drug repositioning approach identifies tricyclic antidepressants as inhibitors of small cell lung cancer and other neuroendocrine tumors. *Cancer Discov* 3, 1364–1377.
- Javitt, D.C. (2010). Glutamatergic theories of schizophrenia. *Isr J Psychiatry Relat Sci* 47, 4–16.
- Javitt, D.C., Zylberman, I., Zukin, S.R., Heresco-Levy, U., and Lindenmayer, J.P. (1994). Amelioration of negative symptoms in schizophrenia by glycine. *Am J Psychiatry* 151, 1234–1236.
- Kapfhamer, D., Taylor, S., Zou, M.E., Lim, J.P., Kharazia, V., and Heberlein, U. (2013). Taok2 controls behavioral response to ethanol in mice. *Genes Brain Behav.* 12, 87–97.
- Kato, T., Kasai, A., Mizuno, M., Fengyi, L., Shintani, N., Maeda, S., Yokoyama, M., Ozaki, M., and Nawa, H. (2010). Phenotypic Characterization of Transgenic Mice Overexpressing Neuregulin-1. *PLoS ONE* 5, e14185.
- Kim, J., Tang, J.Y., Gong, R., Kim, J., Lee, J.J., Clemons, K.V., Chong, C.R., Chang, K.S., Fereshteh, M., Gardner, D., et al. (2010). Itraconazole, a commonly used antifungal that inhibits Hedgehog pathway activity and cancer growth. *Cancer Cell* 17, 388–399.
- Kim, S., Thiessen, P.A., Bolton, E.E., Chen, J., Fu, G., Gindulyte, A., Han, L., He, J., He, S., Shoemaker, B.A., et al. (2016). PubChem Substance and Compound databases. *Nucleic Acids Res* 44, D1202–D1213.
- Kleckner, N.W., and Dingledine, R. (1988). Requirement for glycine in activation of NMDA-receptors expressed in *Xenopus* oocytes. *Science* 241, 835–837.
- Kroeze, W.K., Hufeisen, S.J., Popadak, B.A., Renock, S.M., Steinberg, S., Ernsberger, P., Jayathilake, K., Meltzer, H.Y., and Roth, B.L. (2003). H1-histamine receptor affinity predicts short-term weight gain for typical and atypical antipsychotic drugs. *Neuropsychopharmacology* 28, 519–526.
- Law, A.J., Wang, Y., Sei, Y., O'Donnell, P., Piantadosi, P., Papaleo, F., Straub, R.E., Huang, W., Thomas, C.J., Vakkalanka, R., et al. (2012). Neuregulin 1-ErbB4-PI3K signaling in schizophrenia and phosphoinositide 3-kinase-p110 δ inhibition as a potential therapeutic strategy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 109, 12165–12170.
- Lawler, C.P., Prioleau, C., Lewis, M.M., Mak, C., Jiang, D., Schetz, J.A., Gonzalez, A.M., Sibley, D.R., and Mailman, R.B. (1999). Interactions of the novel antipsychotic aripiprazole (OPC-14597) with dopamine and serotonin receptor subtypes. *Neuropsychopharmacology* 20, 612–627.
- Lemmon, M.A., and Schlessinger, J. (2010). Cell Signaling by Receptor Tyrosine Kinases. *Cell* 141, 1117–1134.
- Lencz, T., and Malhotra, A.K. (2015). Targeting the schizophrenia genome: a fast track strategy from GWAS to clinic. *Mol Psychiatry* 20, 820–826.
- Li, D., Collier, D.A., and He, L. (2006). Meta-analysis shows strong positive association of the neuregulin 1 (NRG1) gene with schizophrenia. *Hum. Mol. Genet.* 15, 1995–2002.

Lieberman, J.A., Dunbar, G., Segreti, A.C., Girgis, R.R., Seoane, F., Beaver, J.S., Duan, N., and Hosford, D.A. (2013). A Randomized Exploratory Trial of an Alpha-7 Nicotinic Receptor Agonist (TC-5619) for Cognitive Enhancement in Schizophrenia. *Neuropsychopharmacology* 38, 968–975.

Luo, X., He, W., Hu, X., and Yan, R. (2014). Reversible overexpression of bace1-cleaved neuregulin-1 N-terminal fragment induces schizophrenia-like phenotypes in mice. *Biol. Psychiatry* 76, 120–127.

Maillard, A.M., Ruef, A., Pizzagalli, F., Migliavacca, E., Hippolyte, L., Adaszewski, S., Dukart, J., Ferrari, C., Conus, P., Männik, K., et al. (2015). The 16p11.2 locus modulates brain structures common to autism, schizophrenia and obesity. *Mol Psychiatry* 20, 140–147.

Mattay, V.S., Goldberg, T.E., Fera, F., Hariri, A.R., Tessitore, A., Egan, M.F., Kolachana, B., Callicott, J.H., and Weinberger, D.R. (2003). Catechol O-methyltransferase val158-met genotype and individual variation in the brain response to amphetamine. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 6186–6191.

Mauri, M.C., Paletta, S., Maffini, M., Colasanti, A., Dragogna, F., Pace, C.D., and Altamura, A.C. (2014). Clinical pharmacology of atypical antipsychotics: an update. *EXCLI Journal* 13, 1163.

Megens, A.A., Awouters, F.H., Schotte, A., Meert, T.F., Dugovic, C., Niemegeers, C.J., and Leysen, J.E. (1994). Survey on the pharmacodynamics of the new antipsychotic risperidone. *Psychopharmacology (Berl.)* 114, 9–23.

Mei, L., and Nave, K.-A. (2014). Neuregulin-ERBB Signaling in the Nervous System and Neuropsychiatric Diseases. *Neuron* 83, 27–49.

Mo, J.-S., Meng, Z., Kim, Y.C., Park, H.W., Hansen, C.G., Kim, S., Lim, D.-S., and Guan, K.-L. (2015). Cellular energy stress induces AMPK-mediated regulation of YAP and the Hippo pathway. *Nat. Cell Biol.*

Moffat, J.G., Vincent, F., Lee, J.A., Eder, J., and Prunotto, M. (2017). Opportunities and challenges in phenotypic drug discovery: an industry perspective. *Nat Rev Drug Discov* 16, 531–543.

Moghaddam, B., and Javitt, D. (2012). From Revolution to Evolution: The Glutamate Hypothesis of Schizophrenia and its Implication for Treatment. *Neuropsychopharmacology* 37, 4–15.

Moore, T.M., Garg, R., Johnson, C., Coptcoat, M.J., Ridley, A.J., and Morris, J.D. (2000). PSK, a novel STE20-like kinase derived from prostatic carcinoma that activates the c-Jun N-terminal kinase mitogen-activated protein kinase pathway and regulates actin cytoskeletal organization. *J. Biol. Chem.* 275, 4311–4322.

Nasrallah, H.A. (2008). Atypical antipsychotic-induced metabolic side effects: insights from receptor-binding profiles. *Mol. Psychiatry* 13, 27–35.

Network and Pathway Analysis Subgroup of Psychiatric Genomics Consortium (2015). Psychiatric genome-wide association study analyses implicate neuronal, immune and histone pathways. *Nat. Neurosci.* 18, 199–209.

Nicodemus, K.K., Luna, A., Vakkalanka, R., Goldberg, T., Egan, M., Straub, R.E., and Weinberger, D.R. (2006). Further evidence for association between ErbB4 and schizophrenia and influence on cognitive intermediate phenotypes in healthy controls. *Mol. Psychiatry* 11, 1062–1065.

- van Os, J., and Kapur, S. (2009). Schizophrenia. *Lancet* 374, 635–645.
- Panciera, T., Azzolin, L., Cordenonsi, M., and Piccolo, S. (2017). Mechanobiology of YAP and TAZ in physiology and disease. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*
- Pardiñas, A.F., Holmans, P., Pocklington, A.J., Escott-Price, V., Ripke, S., Carrera, N., Legge, S.E., Bishop, S., Cameron, D., Hamshere, M.L., et al. (2018). Common schizophrenia alleles are enriched in mutation-intolerant genes and in regions under strong background selection. *Nature Genetics* 1.
- Piccolo, S., Dupont, S., and Cordenonsi, M. (2014). The biology of YAP/TAZ: hippo signaling and beyond. *Physiol. Rev.* 94, 1287–1312.
- Plouffe, S.W., Meng, Z., Lin, K.C., Lin, B., Hong, A.W., Chun, J.V., and Guan, K.-L. (2016). Characterization of Hippo Pathway Components by Gene Inactivation. *Mol. Cell* 64, 993–1008.
- Poon, C.L.C., Lin, J.I., Zhang, X., and Harvey, K.F. (2011). The Sterile 20-like Kinase Tao-1 Controls Tissue Growth by Regulating the Salvador-Warts-Hippo Pathway. *Dev. Cell* 21, 896–906.
- Rajagopal, K., Lefkowitz, R.J., and Rockman, H.A. (2005). When 7 transmembrane receptors are not G protein-coupled receptors. *J. Clin. Invest.* 115, 2971–2974.
- Rapoport, J., Giedd, J., and Gogtay, N. (2012). Neurodevelopmental model of schizophrenia: update 2012. *Mol Psychiatry* 17, 1228–1238.
- Ribeiro, P.S., Josué, F., Wepf, A., Wehr, M.C., Rinner, O., Kelly, G., Tapon, N., and Gstaiger, M. (2010). Combined Functional Genomic and Proteomic Approaches Identify a PP2A Complex as a Negative Regulator of Hippo Signaling. *Molecular Cell* 39, 521–534.
- Richelson, E., and Souder, T. (2000). Binding of antipsychotic drugs to human brain receptors focus on newer generation compounds. *Life Sci.* 68, 29–39.
- Saha, S., Chant, D., and McGrath, J. (2007). A systematic review of mortality in schizophrenia: is the differential mortality gap worsening over time? *Arch. Gen. Psychiatry* 64, 1123–1131.
- Santos, R., Ursu, O., Gaulton, A., Bento, A.P., Donadi, R.S., Bologa, C.G., Karlsson, A., Al-Lazikani, B., Hersey, A., Oprea, T.I., et al. (2016). A comprehensive map of molecular drug targets. *Nat Rev Drug Discov* *advance online publication*.
- Schadt, E.E., Buchanan, S., Brennand, K.J., and Merchant, K.M. (2014). Evolving toward a human-cell based and multiscale approach to drug discovery for CNS disorders. *Front Pharmacol* 5, 252.
- Schizophrenia Working Group of the Psychiatric Genomics Consortium (2014). Biological insights from 108 schizophrenia-associated genetic loci. *Nature* 511, 421–427.
- Schmitt, A., Hasan, A., Gruber, O., and Falkai, P. (2011). Schizophrenia as a disorder of disconnectivity. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* 261 Suppl 2, S150–S154.
- Schotte, A., Janssen, P.F., Gommeren, W., Luyten, W.H., Van Gompel, P., Lesage, A.S., De Loore, K., and Leysen, J.E. (1996). Risperidone compared with new and reference antipsychotic drugs: in vitro and in vivo receptor binding. *Psychopharmacology (Berl.)* 124, 57–73.
- Sekar, A., Bialas, A.R., Rivera, H. de, Davis, A., Hammond, T.R., Kamitaki, N., Tooley, K., Presumey, J., Baum, M., Doren, V.V., et al. (2016). Schizophrenia risk from complex

variation of complement component 4. *Nature* 530, 177.

Shapiro, D.A., Renock, S., Arrington, E., Chiodo, L.A., Liu, L.-X., Sibley, D.R., Roth, B.L., and Mailman, R. (2003). Aripiprazole, a novel atypical antipsychotic drug with a unique and robust pharmacology. *Neuropsychopharmacology* 28, 1400–1411.

Shaw, P., Lerch, J.P., Pruessner, J.C., Taylor, K.N., Rose, A.B., Greenstein, D., Clasen, L., Evans, A., Rapoport, J.L., and Giedd, J.N. (2007). Cortical morphology in children and adolescents with different apolipoprotein E gene polymorphisms: an observational study. *Lancet Neurol* 6, 494–500.

Shim, J.S., Rao, R., Beebe, K., Neckers, L., Han, I., Nahta, R., and Liu, J.O. (2012). Selective inhibition of HER2-positive breast cancer cells by the HIV protease inhibitor nelfinavir. *J. Natl. Cancer Inst.* 104, 1576–1590.

da Silva Alves, F., Figuee, M., van Amelsvoort, T., Veltman, D., and de Haan, L. (2008). The revised dopamine hypothesis of schizophrenia: evidence from pharmacological MRI studies with atypical antipsychotic medication. *Psychopharmacol Bull* 41, 121–132.

Stark, A.D., Jordan, S., Allers, K.A., Bertekap, R.L., Chen, R., Mistry Kannan, T., Molski, T.F., Yocca, F.D., Sharp, T., Kikuchi, T., et al. (2007). Interaction of the novel antipsychotic aripiprazole with 5-HT_{1A} and 5-HT_{2A} receptors: functional receptor-binding and in vivo electrophysiological studies. *Psychopharmacology (Berl.)* 190, 373–382.

Stefansson, H., Sigurdsson, E., Steinthorsdottir, V., Bjornsdottir, S., Sigmundsson, T., Ghosh, S., Brynjolfsson, J., Gunnarsdottir, S., Ivarsson, O., Chou, T.T., et al. (2002). Neuregulin 1 and susceptibility to schizophrenia. *Am. J. Hum. Genet.* 71, 877–892.

Steinberg, S., de Jong, S., Mattheisen, M., Costas, J., Demontis, D., Jamain, S., Pietiläinen, O.P.H., Lin, K., Papiol, S., Huttenlocher, J., et al. (2014). Common Variant at 16p11.2 Conferring Risk of Psychosis. *Mol Psychiatry* 19.

Swinney, D.C., and Anthony, J. (2011). How were new medicines discovered? *Nat Rev Drug Discov* 10, 507–519.

Thomas, G.M., and Huganir, R.L. (2004). MAPK cascade signalling and synaptic plasticity. *Nat Rev Neurosci* 5, 173–183.

Umbricht, D., Alberati, D., Martin-Facklam, M., Borroni, E., Youssef, E.A., Ostland, M., Wallace, T.L., Knoflach, F., Dorflinger, E., Wettstein, J.G., et al. (2014). Effect of bitopertin, a glycine reuptake inhibitor, on negative symptoms of schizophrenia: a randomized, double-blind, proof-of-concept study. *JAMA Psychiatry* 71, 637–646.

Vincent, F., Loria, P., Pregel, M., Stanton, R., Kitching, L., Nocka, K., Doyonnas, R., Steppan, C., Gilbert, A., Schroeter, T., et al. (2015). Developing predictive assays: the phenotypic screening “rule of 3.” *Sci Transl Med* 7, 293ps15.

Vullhorst, D., Mitchell, R.M., Keating, C., Roychowdhury, S., Karavanova, I., Tao-Cheng, J.-H., and Buonanno, A. (2015). A negative feedback loop controls NMDA receptor function in cortical interneurons via neuregulin 2/ErbB4 signalling. *Nat Commun* 6, 7222.

Wang, W., Xiao, Z.-D., Li, X., Aziz, K.E., Gan, B., Johnson, R.L., and Chen, J. (2015). AMPK modulates Hippo pathway activity to regulate energy homeostasis. *Nat. Cell Biol.*

Wehr, M.C., and Rossner, M.J. (2016). Split protein biosensor assays in molecular pharmacological studies. *Drug Discov. Today* 21, 415–429.

Wehr, M.C., Laage, R., Bolz, U., Fischer, T.M., Grünewald, S., Scheek, S., Bach, A., Nave,

- K.-A., and Rossner, M.J. (2006). Monitoring regulated protein-protein interactions using split TEV. *Nat. Methods* 3, 985–993.
- Wehr, M.C., Reinecke, L., Botvinnik, A., and Rossner, M.J. (2008). Analysis of transient phosphorylation-dependent protein-protein interactions in living mammalian cells using split-TEV. *BMC Biotechnol.* 8, 55.
- Wehr, M.C., Holder, M.V., Gailite, I., Saunders, R.E., Maile, T.M., Ciirdaeva, E., Instrell, R., Jiang, M., Howell, M., Rossner, M.J., et al. (2013). Salt-inducible kinases regulate growth through the Hippo signalling pathway in *Drosophila*. *Nat Cell Biol* 15, 61–71.
- Wehr, M.C., Galinski, S., and Rossner, M.J. (2015). Monitoring G Protein-Coupled Receptor Activation Using the Protein Fragment Complementation Technique Split TEV. *Methods Mol. Biol.* 1272, 107–118.
- Wehr, M.C., Hinrichs, W., Brzózka, M.M., Unterbarnscheidt, T., Herholt, A., Wintgens, J.P., Papiol, S., Soto-Bernardini, M.C., Kravchenko, M., Zhang, M., et al. (2017). Spironolactone is an antagonist of NRG1-ERBB4 signaling and schizophrenia-relevant endophenotypes in mice. *EMBO Mol Med.*
- Wennmann, D.O., Schmitz, J., Wehr, M.C., Krahn, M.P., Koschmal, N., Gromnitza, S., Schulze, U., Weide, T., Chekuri, A., Skryabin, B.V., et al. (2014). Evolutionary and molecular facts link the WWC protein family to Hippo signaling. *Mol. Biol. Evol.* 31, 1710–1723.
- Wichert, S.P., Herbig, E., and Wehr, M.C. (2015). Reinstwasser als Bestandteil multi-parametrischer Messverfahren in der Wirkstoffforschung. *Pharm Ind.* 77, 756–761.
- Wilker, S., Kolassa, S., Vogler, C., Lingenfelder, B., Elbert, T., Papassotiropoulos, A., de Quervain, D.J.-F., and Kolassa, I.-T. (2013). The Role of Memory-related Gene WWC1 (KIBRA) in Lifetime Posttraumatic Stress Disorder: Evidence from Two Independent Samples from African Conflict Regions. *Biol. Psychiatry.*
- Wintgens, J.P., Rossner, M.J., and Wehr, M.C. (2017). Characterizing Dynamic Protein-Protein Interactions Using the Genetically Encoded Split Biosensor Assay Technique Split TEV. *Methods Mol. Biol.* 1596, 219–238.
- Wood, M., and Reavill, C. (2007). Aripiprazole acts as a selective dopamine D2 receptor partial agonist. *Expert Opin Investig Drugs* 16, 771–775.
- Wood, M.D., Scott, C., Clarke, K., Westaway, J., Davies, C.H., Reavill, C., Hill, M., Rourke, C., Newson, M., Jones, D.N.C., et al. (2006). Aripiprazole and its human metabolite are partial agonists at the human dopamine D2 receptor, but the rodent metabolite displays antagonist properties. *Eur. J. Pharmacol.* 546, 88–94.
- Yadav, S., Osés-Prieto, J.A., Peters, C.J., Zhou, J., Pleasure, S.J., Burlingame, A.L., Jan, L.Y., and Jan, Y.-N. (2016). TAOK2 Kinase Mediates PSD95 Stability and Dendritic Spine Maturation through Septin7 Phosphorylation. *Neuron.*
- Yasuda, S., Tanaka, H., Sugiura, H., Okamura, K., Sakaguchi, T., Tran, U., Takemiya, T., Mizoguchi, A., Yagita, Y., Sakurai, T., et al. (2007). Activity-induced protocadherin arcadlin regulates dendritic spine number by triggering N-cadherin endocytosis via TAO2beta and p38 MAP kinases. *Neuron* 56, 456–471.
- Yin, D.-M., Chen, Y.-J., Lu, Y.-S., Bean, J.C., Sathyamurthy, A., Shen, C., Liu, X., Lin, T.W., Smith, C.A., Xiong, W.-C., et al. (2013). Reversal of behavioral deficits and synaptic dysfunction in mice overexpressing neuregulin 1. *Neuron* 78, 644–657.
- Zajdel, P., Marciniak, K., Maślankiewicz, A., Grychowska, K., Satała, G., Duszyńska, B.,

Lenda, T., Siwek, A., Nowak, G., Partyka, A., et al. (2013). Antidepressant and antipsychotic activity of new quinoline- and isoquinoline-sulfonamide analogs of aripiprazole targeting serotonin 5-HT_{1A}/5-HT_{2A}/5-HT₇ and dopamine D₂/D₃ receptors. *Eur J Med Chem* 60, 42–50.

6 Anhang: habilitationsrelevante Publikationen

Aufgrund des Urheberrechtsgesetzes wurde in der elektronischen Version der Habilitationsschrift auf den Abdruck der Originalarbeiten verzichtet. Diese Publikationen sind unter folgenden DOIs, PMIDs bzw. Links zu finden:

1. Galinski S, Wichert SP, Rossner MJ & **Wehr MC** (2018) Multiplexed profiling of GPCR activities by combining split TEV assays and EXT-based barcoded readouts. *Sci. Rep.* 8: 8137
DOI: 10.1038/s41598-018-26401-9 PMID: 29802268
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29802268>
2. **Wehr MC**, Hinrichs W, Brzózka MM, Unterbarnscheidt T, Herholt A, Wintgens JP, Papiol S, Soto-Bernardini MC, Kravchenko M, Zhang M, Nave K-A, Wichert SP, Falkai P, Zhang W, Schwab MH & Rossner MJ (2017) Spironolactone is an antagonist of NRG1-ERBB4 signaling and schizophrenia-relevant endophenotypes in mice. *EMBO Mol. Med.*
DOI: 10.15252/emmm.201707691 PMID: 28743784
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28743784>
3. Wintgens JP, Rossner MJ & **Wehr MC** (2017) Characterizing Dynamic Protein-Protein Interactions Using the Genetically Encoded Split Biosensor Assay Technique Split TEV. *Methods Mol. Biol.* Clifton NJ 1596: 219–238
DOI: 10.1007/978-1-4939-6940-1_14 PMID: 28293890
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28293890>
4. **Wehr MC** & Rossner MJ (2016) Split protein biosensor assays in molecular pharmacological studies. *Drug Discov. Today* 21: 415–429
Review
DOI: 10.1016/j.drudis.2015.11.004 PMID: 26610415
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26610415>
5. **Wehr MC**, Galinski S & Rossner MJ (2015) Monitoring G Protein-Coupled Receptor Activation Using the Protein Fragment Complementation Technique Split TEV. *Methods Mol. Biol.* Clifton NJ 1272: 107–118
DOI: 10.1007/978-1-4939-2336-6_8 PMID: 25563180
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25563180>

6. Wichert SP, Herbig E & **Wehr MC** (2015) Reinstwasser als Bestandteil multi-parametrischer Messverfahren in der Wirkstoffforschung. *Pharm. Ind.* 5: 756–761
https://www.researchgate.net/profile/Michael_Wehr/publication/278967032_Reinstwasser_als_Bestandteil_multi-parametrischer_Messverfahren_in_der_Wirkstoffforschung/links/5609969e08ae1396914a2498/Reinstwasser-als-Bestandteil-multi-parametrischer-Messverfahren-in-der-Wirkstoffforschung.pdf
7. Wennmann DO, Schmitz J, **Wehr MC**, Krahn MP, Koschmal N, Gromnitzer S, Schulze U, Weide T, Chekuri A, Skryabin BV, Gerke V, Pavenstädt H, Duning K & Kremerskothen J (2014) Evolutionary and molecular facts link the WWC protein family to Hippo signaling. *Mol. Biol. Evol.* 31: 1710–1723
DOI: 10.1093/molbev/msu115 PMID: 24682284
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24682284>
8. **Wehr MC**, Holder MV, Gailite I, Saunders RE, Maile TM, Ciirdaeva E, Instrell R, Jiang M, Howell M, Rossner MJ & Tapon N (2013) Salt-inducible kinases regulate growth through the Hippo signalling pathway in *Drosophila*. *Nat. Cell Biol.* 15: 61–71
DOI: 10.1038/ncb2658 PMID: 23263283
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23263283>
9. Ribeiro PS, Josué F, Wepf A, **Wehr MC**, Rinner O, Kelly G, Tapon N & Gstaiger M (2010) Combined Functional Genomic and Proteomic Approaches Identify a PP2A Complex as a Negative Regulator of Hippo Signaling. *Mol. Cell* 39: 521–534
DOI: 10.1016/j.molcel.2010.08.002 PMID: 20797625
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20797625>
10. Genevet A, **Wehr MC**, Brain R, Thompson BJ & Tapon N (2010) Kibra is a regulator of the Salvador/Warts/Hippo signaling network. *Dev. Cell* 18: 300–308
DOI: 10.1016/j.devcel.2009.12.011 PMID: 20159599
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20159599>
11. **Wehr MC**, Reinecke L, Botvinnik A & Rossner MJ (2008) Analysis of transient phosphorylation-dependent protein-protein interactions in living mammalian cells using split-TEV. *BMC Biotechnol.* 8: 55
DOI: 10.1186/1472-6750-8-55 PMID: 18620601
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18620601>

12. **Wehr MC**, Laage R, Bolz U, Fischer TM, Grünewald S, Scheek S, Bach A, Nave K-A & Rossner MJ (2006) Monitoring regulated protein-protein interactions using split TEV. *Nat. Methods* 3: 985–993
DOI: 10.1038/nmeth967 PMID: 17072307

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17072307>