

Aus der  
Abteilung Molekulare Neurobiologie  
Klinik und Poliklinik für Psychiatrie und Psychotherapie  
Klinik der Universität München  
Direktor: Prof. Peter Falkai

***Validierung potenzieller Modulatoren der  
intrazellulären Neuregulinspaltung***

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

vorgelegt von

Adán Alberto Saavedra Cabrejos

aus  
Chiclayo (Peru)

Jahr  
2024

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. Moritz Rossner

Mitberichterstatter: PD Dr. Sven Lammich

Mitbetreuung durch den  
promovierten Mitarbeiter: Dr. Ben Brankatschk

Dekan: Prof. Dr. med. Thomas Gudermann

Tag der mündlichen Prüfung: 02.05.2024

Meinem Bruder Juan Carlos Monsalve Cabrejos gewidmet

# Inhaltsverzeichnis

<b>Kurzfassung</b> .....	<b>6</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>7</b>
<b>Abbildungsverzeichnis</b> .....	<b>8</b>
<b>Tabellenverzeichnis</b> .....	<b>10</b>
Abkürzungsverzeichnis .....	<b>11</b>
<b>1 Einleitung</b> .....	<b>13</b>
1.1 Schizophrenie .....	13
1.1.1 Ätiologie .....	13
1.1.2 Pathophysiologie .....	13
1.1.3 Epidemiologie .....	14
1.1.4 Diagnose und Klassifikation.....	14
1.1.5 Therapie und Prognose .....	16
1.2 Neuregulin .....	17
1.2.1 Zusammenhang zwischen Neuregulin-1 und Schizophrenie.....	17
1.2.2 Struktur von Neuregulin .....	17
1.2.3 Funktion von Neuregulin.....	19
1.2.4 Spaltung von Neuregulin .....	21
<b>2 Zielsetzung und Hypothesen</b> .....	<b>24</b>
<b>3 Material und Methoden</b> .....	<b>25</b>
3.1 Material .....	25
3.2 Zelllinien, Kulturmedien und Lösungen.....	27
3.3 Methoden.....	30
3.3.1 Transformation von Bakterien.....	30
3.3.2 Plasmidpräparation und -reinigung.....	30
3.3.3 Restriktionsverdau .....	31
3.3.4 Zellkulturen .....	32
3.3.5 NRG1-Spaltungs-Assay.....	33
3.3.5.2 Firefly- und Renilla-Luciferase-Mikrotiterplatten-Assay .....	35
3.3.6 Medikamentenrepositionierung.....	36
3.3.7 Zytotoxizitätstest .....	38
3.3.8 Quantifizierung von Proteinen sowie des C-Terminus von Neuregulin-1 Typ III .....	39
<b>4 Ergebnisse</b> .....	<b>42</b>
4.1 Selektion der im Rahmen der Medikamentenrepositionierung zu testenden Substanzen .....	42
4.2 D-Luciferin-Luminometer-Assay .....	43
4.3 Firefly- und Renilla-Luciferase-Mikrotiterplatten-Assay .....	44
4.3.1 Negative und positive Kontrollen .....	44
4.3.2 Konzentrations-Wirkungs-Kurven .....	46
4.4 Synergistische Effekte .....	55

4.4.1	Konzentrations-Wirkungs-Kurven .....	55
4.4.2	Zytotoxizitätstest .....	58
4.4.3	Quantifizierung von Proteinen sowie des C-Terminus von Neuregulin-1 Typ III .....	60
<b>5</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>64</b>
5.1	Devalidierte Substanzen.....	64
5.2	Validierte Substanzen.....	64
5.3	Medikamentenkombinationen.....	66
5.3.1	Synergistische Effekte .....	66
5.3.2	Zytotoxizität.....	67
5.3.3	Quantifizierung von Proteinen sowie des C-Terminus von Neuregulin-1 Typ III .....	67
<b>6</b>	<b>Schlussfolgerung .....</b>	<b>69</b>
	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>71</b>
	<b>Danksagung .....</b>	<b>74</b>
	<b>Affidavit.....</b>	<b>75</b>

## Kurzfassung

Schizophrenie ist eine psychische Störung mit bislang noch nicht vollständig verstandener Ätiologie und Pathophysiologie, die etwa 0,5 % der Weltbevölkerung betrifft. Unstrittig ist, dass sowohl genetische als auch umweltbedingte Faktoren eine Rolle bei der Entstehung und dem Verlauf der Erkrankung spielen. Der epidermale Wachstumsfaktor Neuregulin-1 (NRG1) ist im Zuge genomweiter Assoziationsstudien als ein diesbezüglich potentiell relevanter Faktor identifiziert worden. Insbesondere die Transmembrandomäne von NRG1-III betreffende Mutationen stehen im Verdacht, die korrekte Spaltung des Proteins zu verhindern und in der Folge die kortikale Entwicklung sowie die synaptische Plastizität zu beeinträchtigen. In der vorliegenden Untersuchung wurde ein innovativer Firefly- und Renilla-Luciferase-Mikrotiterplatten-Assay genutzt, um bereits registrierte Medikamente auf ihre Eignung zu prüfen, die Spaltung der intrazellulären Domäne (ICD) von NRG1-III in transfizierten PC12-Zellen zu modulieren. In diesem Zusammenhang wurden die mutmaßlichen Spaltungsinhibitoren Amitriptylin, Cyproheptadin, Ifenprodil, Mosaprid-Citrat, Perphenazin und Spironolacton mit Ausnahme der vierten Substanz validiert. Die potentiellen Spaltungsaktivatoren Citalopram, Nitrendipin und Zolmitriptan wurden hingegen allesamt devalidiert. Darüber hinaus wurden Dosis-Wirkungs-Kurven diverser Kombinationen des entweder potentesten (Spironolacton) oder effizientesten (Ifenprodil) Spaltungshemmer erstellt und durch Zytotoxizitätstests ergänzt. Spironolacton-Ifenprodil-Mischungen im Verhältnis 1:1, 1:2 und 1:3 schienen eine höhere Potenz, jedoch gleichzeitig eine geringere intrinsische Aktivität als die Reinsubstanzen zu haben. Zudem wurden Hinweise darauf gefunden, dass die Medikamentenkombination bereits erhebliche zytotoxische Effekte zeigen bei einer Dosierung unterhalb des Maximaleffekts. Obwohl die erzielten Ergebnisse anhand etablierter Techniken wie dem D-Luciferin-Luminometer-Assay und dem Western-Blot-Verfahren abgesichert wurden und somit eine gute Aussagekraft besaßen, sollten sie in zukünftigen Studien validiert und weitergeführt werden.

## **Abstract**

Schizophrenia is a mental disorder with a not yet completely understood etiology and pathophysiology, affecting approximately 0.5% of the world's population. It is undisputed that both genetic and environmental factors play a role in the development and progression of the disorder. The epidermal growth factor neuregulin-1 (NRG1) has been identified in genome-wide association studies as a potentially relevant factor in this regard. In particular, mutations affecting the transmembrane domain of NRG1-III are suspected to prevent proper cleavage of the protein and subsequently impair the cortical development as well as the synaptic plasticity. In this study, an innovative Firefly- and Renilla- Luciferase-Microplate assay were used to screen nine previously registered drugs on their ability to modulate cleavage of the intracellular domain (ICD) of NRG1-III into transfected PC12 cells. In this context, the putative cleavage inhibitors amitriptyline, cyproheptadine, ifenprodil, mosapride, perphenazine, and spironolactone, except for the fourth compound, were validated. In contrast, the potential cleavage activators citalopram, nitrendipine, and zolmitriptan were all disabled. In addition, dose-response curves of various combinations of either the most potent (spironolactone) or the most efficient (ifenprodil) cleavage inhibitors were generated and supplemented by cytotoxicity tests. Spironolactone-ifenprodil mixtures in the ratios of 1:1, 1:2, and 1:3 appeared to have higher potency while at the same time, appeared to have lower intrinsic activity than the pure substances. In addition, evidence was found that the drug combination presents significant cytotoxic effects even at doses insufficient to achieve maximum effect. Although the results obtained were validated using established techniques, such as the D-luciferin luminometer assay as well as the Western blot method and therefore had good significance, they should still be further validated and developed in future studies.

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Struktur von NRG1 bis NRG4 sowie NRG1-I bis NRG1-VI.....	19
Abbildung 2: Struktur von NRG1-I bis NRG1-VI sowie Pro-NRG1-I und Pro-NRG1-III. ....	22
Abbildung 3: Enzymatische Spaltung von NRG1-III.....	23
Abbildung 4: Im Rahmen der Medikamentenrepositionierung identifizierte potentielle Hits.....	42
Abbildung 5: Mit der Spaltung der ICD von NRG1-III assoziierte Luciferaseaktivität bei Baseline- (schwarze Linien) und negativen (10 $\mu$ M DAPT, orangene Linien) Kontrollbedingungen sowie in Präsenz von Ifenprodil (30 $\mu$ M, grüne Linien), Spironolacton (10 $\mu$ M, rote Linien) oder einer Spironolacton-Ifenprodil-Kombination im Verhältnis 1:3 (Spifen, 10 $\mu$ M + 30 $\mu$ M, blaue Linien). ....	43
Abbildung 6: A) Mit der Spaltung der ICD von NRG1-III assoziierte Luciferaseaktivität bei Baseline- (n) sowie negativen (DAPT) und positiven (ERBB4-F [E4 ], BACE1) Kontrollbedingungen; B) mit der Spaltung der ICD von NRG1-I assoziierte Luciferaseaktivität bei Baseline- (N) sowie negativen (DAPT) und positiven (ERBB4-F [E4 ], BACE1) Kontrollbedingungen; C) mit der Spaltung der ICD von NRG1-III assoziierte Luciferaseaktivität bei Baseline- (N), negativen (DAPT [DAPT], TAPI-1 [TAPI]) und positiven (ERBB4-F [E4 ], BACE1 [BACE1]) Kontrollbedingungen sowie in Präsenz der Substanzen Mosaprid-Citrat-(MC), Spironolacton (SPIRO) und Zolmitriptan (ZOL).....	46
Abbildung 7: Balkendiagramme und Konzentrations-Wirkungs-Kurven hinsichtlich des Effekts von AB) DAPT, CD) Amitriptylin, EF) Cyproheptadin, GH) Ifenprodil, IJ) Perphenazin, KL) Spironolacton, M) Citalopram und N) Nitrenpidin auf die mit der Spaltung der ICD von NRG1-III assoziierte Luciferaseaktivität (N= Baselinewert). ....	54
Abbildung 8: Synergistischer Effekt einer Spironolacton-Ifenprodil-Kombination im Verhältnis A) 1:1, B) 1:2 und CD) 1:3 auf die mit der Spaltung der ICD von NRG1-III assoziierte Luciferaseaktivität. ....	57
Abbildung 9: Quantitative Auswertung der Zytotoxizität von verschiedenen Konzentrationen einer Spironolacton-Ifenprodil-Kombination im Verhältnis 1:3 (Spifen 0,3 = 0,3 $\mu$ M Spironolacton + 0,9 $\mu$ M Ifenprodil; Spifen 1 = 1 $\mu$ M Spironolacton + 3 $\mu$ M Ifenprodil; Spifen 3 = 3 $\mu$ M Spironolacton + 9 $\mu$ M Ifenprodil; Spifen 10 = 10 $\mu$ M + 30 $\mu$ M Ifenprodil; Spifen 30 = 30 $\mu$ M Spironolacton + 90 $\mu$ M Ifenprodil; Spifen 100 = 100 $\mu$ M Spironolacton + 300 $\mu$ M Ifenprodil; niedrigere Werte auf der y-Achse gehen mit einer höheren Toxizität einher).....	58
Abbildung 10: Repräsentativ-qualitative Auswertung der Zytotoxizität von verschiedenen Konzentrationen einer Spironolacton-Ifenprodil-Kombination im Verhältnis 1:3 (A) Baseline; B) DAPT; C) Spifen 0,3 = 0,3 $\mu$ M Spironolacton + 0,9 $\mu$ M Ifenprodil; D) Spifen 1 = 1	

<p> <math>\mu\text{M}</math> Spironolacton + 3 <math>\mu\text{M}</math> Ifenprodil; E) Spifen 3 = 3 <math>\mu\text{M}</math>            Spironolacton + 9 <math>\mu\text{M}</math> Ifenprodil; F) Spifen 10 = 10 <math>\mu\text{M}</math>            Spironolacton + 30 <math>\mu\text{M}</math> Ifenprodil; G) Spifen 30 = 30 <math>\mu\text{M}</math>            Spironolacton + 90 <math>\mu\text{M}</math> Ifenprodil; H) Spifen 100 = 100 <math>\mu\text{M}</math>            Spironolacton + 300 <math>\mu\text{M}</math> Ifenprodil). .....         </p>	60
<p>           Abbildung 11: Quantifizierung der in den Lysaten vorkommenden            Proteinkonzentration mittels Bradford-Test bei Baseline- (DMSO)            und negativen (DAPT) Kontrollbedingungen sowie in Präsenz von            Spironolacton, Ifenprodil und einer Kombination der beiden letzten            Substanzen (Spifen).....         </p>	61
<p>           Abbildung 12: Visuelle und fotometrische Quantifizierung von NRG1-III            mittels Western Blot (AB) monoklonale Antikörper; (CD)            polyklonale Antikörper; obere Bande = 140 kDa, untere Bande =            50 kDa; BACE1 = BACE1-I-IV = BACE1-Inhibitor IV; Spifen =            Spironolacton-Ifenprodil-Kombination). .....         </p>	63

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: In Deutschland empfohlene Kriterien zur Diagnose einer Schizophrenie. ....	15
Tabelle 2: Klassifizierung der NRG-Familie. ....	18
Tabelle 3: Rezeptoren und anatomische Expression der NRG-Familie.....	20
Tabelle 4: Verwendete Laborgeräte.....	25
Tabelle 5: Verwendete Materialien, Kits, Plasmide, Enzyme und Antikörper. ....	26
Tabelle 6: Verwendete Chemikalien, Lösungsmittel und Reagenzien. ....	27
Tabelle 7: Verwendete Kulturmedien und Lösungen. ....	29
Tabelle 8: Versuchsprotokoll des D-Luciferin-Luminometer-Assays.....	34
Tabelle 9: Versuchsprotokoll des Firefly- und Renilla-Luciferase-Mikrotiterplatten-Assays.....	36
Tabelle 10: Versuchsprotokoll des Konzentrations-Wirkungs-Assays. ....	37
Tabelle 11: Versuchsprotokoll des Zytotoxizitätstests. ....	38
Tabelle 12: Versuchsprotokoll zur Quantifizierung von Proteinen sowie des C-Terminus von NRG1-III. ....	40

## Abkürzungsverzeichnis

	Englisch	Deutsch
ADAM	A disintegrin and metalloprotease	Eine-Disintegrin-und-Metalloproteinase
Akt	Protein kinase B	Proteinkinase B
BACE1	Beta-site amyloid precursor protein-cleaving enzyme 1	Beta-Sekretase
CRD	Cysteine-rich domain	Cysteinreiche Domäne
DSM	Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders	Diagnostischer und statistischer Leitfaden psychischer Störungen
ECD	Extracellular cleavage domain	Extrazelluläre Domäne
EGF	Epidermal growth factor	Epidermaler Wachstumsfaktor
ERK	Extracellular signal-regulated kinase	Extrazellulär signalregulierte Kinase
GABA	Gamma-Aminobutyric Acid	$\gamma$ -Aminobuttersäure
GWAS	Genome-wide association studies	Genomweite Assoziationsstudien
ICD	Intracellular cleavage domain	Intrazelluläre Domäne
ICD	International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems	Internationale statistische Klassifikation der Krankheiten und verwandter Gesundheitsprobleme
MAPK	Mitogen-activated protein kinase	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
NIH	National Institutes of Health	Nationale Gesundheitsinstitute
NMDA	N-methyl-D-aspartic acid	N-Methyl-D-Asparaginsäure
NRG1	Neuregulin-1	Neuregulin-1
PI3K	Phosphoinositide-3-kinase	Phosphoinositid-3-Kinase
PKB	Protein kinase B	Proteinkinase B

PNS	Peripheral nervous system	Peripheres Nervensystem
PVDF	Polyvinylidene fluoride	Polyvinylidenfluorid
SNP	Single-nucleotide polymorphism	Einzelnukleotid-Polymorphismus
TACE	Tumor necrosis factor- $\alpha$ -converting enzyme	Tumornekrosefaktor- $\alpha$ -konvertierendes Enzym
TMD	Transmembrane domain	Transmembrandomäne
UV	Ultraviolet	Ultraviolett
ZNS	Central nervous system	Zentrales Nervensystem

# **1 Einleitung**

## **1.1 Schizophrenie**

Schizophrenieerkrankungen können bezüglich ihrer Ätiologie, Pathophysiologie, Entwicklung und Prognose erheblich variieren und lassen sich daher nicht immer klar von anderen psychischen Störungen unterscheiden. Am einheitlichsten können Schizophrenien über die Präsenz von für das Krankheitsbild typischen Positiv- und/oder Negativsymptomen definiert werden, die sich sowohl auf der sensorischen und kognitiven als auch emotionalen Ebene manifestieren. Konkret bedeutet dies, dass Betroffene akute oder chronische Wahrnehmungsverzerrungen bis hin zu Wahnvorstellungen erleiden können. Auch Antriebs- und Affektstörungen sind auftretende Anzeichen einer Schizophrenie (DGPPN 2019). Die nachstehenden Unterkapitel beschäftigen sich mit den wichtigsten Aspekten, die zum besseren Verständnis dieses Krankheitsbilds notwendig sind.

### **1.1.1 Ätiologie**

Die Ursachen von Schizophrenie sind noch nicht vollständig verstanden, klar jedoch ist, dass eine komplexe Kombination von genetischen und umweltbedingten Faktoren die Entstehung sowie den Verlauf entsprechender Erkrankungen beeinflusst (Paul J. Harrison & Owen 2003). Aufzuzählen sind in diesem Zusammenhang insbesondere pränatale Beeinträchtigungen wie zum Beispiel übermäßiger Stress, eine Nährstoffunterversorgung oder toxikologische beziehungsweise virale Belastungen (Van Os et al. 2005). Während der Geburt auftretende Komplikationen zählen ebenso zu den Risikofaktoren wie in der frühen Kindheit erlittene Psychotraumata (Walder et al. 2014). Die individuell unterschiedlich ausgeprägte Resilienz kann diesen negativen Einflüssen in größerem oder kleinerem Ausmaß entgegenwirken und so eine entscheidende Rolle in der Unterdrückung beziehungsweise Förderung von schizophrenietypischen Symptomen spielen (Bozikas & Parlapani 2016).

### **1.1.2 Pathophysiologie**

Wie im Fall der Ätiologie sind auch die vielfältigen pathophysiologischen Mechanismen, die mit Schizophrenieerkrankungen assoziiert werden, noch nicht ausreichend erforscht. Das Vorliegen von Neurotransmitter- und Kommunikationsstörungen zwischen spezifischen Gehirnstrukturen scheint allerdings ein diesbezüglich zentraler Aspekt zu sein (Den et al. 2002). So postuliert die

klassische Dopaminhypothese, dass eine Überaktivität des mesolimbischen dopaminergen Systems für das Auftreten von Positivsymptomen wie auditiven Halluzinationen und paranoiden Wahnvorstellungen verantwortlich ist (Howes & Kapur 2009). Die wesentlich jüngere Glutathypothese assoziiert dagegen eine Unteraktivität von bestimmten N-Methyl-D-Asparaginsäure (Englisch: N-Methyl-D-aspartic acid [NMDA]) -Glutamatrezeptoren mit der Entstehung von Schizophrenie (Hasan et al. 2014). Da sich diese Rezeptoren an  $\gamma$ -Aminobuttersäure (Englisch: Gamma-Aminobutyric Acid [GABA])-spezifischen Interneuronen im präfrontalen Cortex befinden, kommt es zu einer Reduzierung der Freisetzung dieses Neurotransmitters. Weniger inhibitorisches GABA bedeutet wiederum mehr exzitatorisches Glutamat, das nun unter anderem das mesolimbische dopaminerge System überstimulieren kann. Anzumerken ist, dass die vermehrte Glutamatfreisetzung regional begrenzt, die Transmission dieses Botenstoffs aber generell gestört ist. In der Folge ergeben sich komplexe Wechselwirkungen, die gleich mehrere Neurotransmittersysteme aus dem Gleichgewicht bringen und somit sowohl Positiv- als auch Negativsymptome auslösen können (Hasan et al. 2014; Stahl & Stephen 2018).

### **1.1.3 Epidemiologie**

Die globale Prävalenz von Schizophrenie wird auf etwas unter 0,5 % geschätzt, während die jährliche Inzidenz bei 0,015 % verortet wird (McGrath et al. 2008). Die Mehrzahl der Betroffenen erhält eine Erstdiagnose im Alter von 15 bis 35 Jahren, nur eine Minderheit ist zu diesem Zeitpunkt unter 13 oder über 40 Jahre alt (Driver et al. 2013; Maglione et al. 2014). Ausgeprägte geschlechtsspezifische Unterschiede liegen prinzipiell nicht vor, ein im Vergleich zur Gesamtbevölkerung geringerer sozioökonomischer Status und häufigerer Konsum von psychoaktiven Substanzen geht allerdings mit dem Vorliegen einer Schizophrenie einher (Dohrenwend et al. 1992; Buckley et al. 2009).

### **1.1.4 Diagnose und Klassifikation**

Wie bereits erläutert, basiert die Diagnose von Schizophrenie auf der Identifizierung von Positiv- und/oder Negativsymptomen. Diese werden kontinuierlich in Form der Internationalen statistischen Klassifikation der Krankheiten und verwandter Gesundheitsprobleme (Englisch: International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems [ICD]) aktualisiert. Speziell im US-amerikanischen

Kulturraum gilt zudem der Diagnostische und statistische Leitfadens psychischer Störungen (Englisch: Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders [DSM]) als Referenzwerk. Die Positivsymptomatik umfasst dabei Beeinträchtigungen der Wahrnehmung und des Denkens sowie der Ich-Funktionen, während im Zuge der Negativsymptomatik Konzentrations- und Aufmerksamkeitsfähigkeit herabgesetzt beziehungsweise Intentionalität, Antrieb und Affektivität gestört sein können (DGPPN 2019). Die in Deutschland empfohlenen Diagnosekriterien sind in Tabelle 1 dargestellt.

**Tabelle 1: In Deutschland empfohlene Kriterien zur Diagnose einer Schizophrenie.**

Quelle: Modifiziert nach DGPPN (2019)

Symptom	Symptomatik	Diagnosekriterium
Gedankenlautwerden Gedankeneingebung Gedankenentzug Gedankenausbreitung	Positivsymptomatik	Mindestens ein eindeutiges beziehungsweise zwei weniger eindeutige Symptome über einen Mindestzeitraum von 30 Tagen
Kontroll- oder Beeinflussungswahn Gefühl des Gemachten bezüglich Körperbewegungen, Gedanken, Tätigkeiten oder Empfindungen Wahnwahrnehmungen	Positivsymptomatik	
Kommentierende oder dialogische Stimmen	Positivsymptomatik	
Anhaltender, kulturell unangemessener oder völlig unrealistischer (bizarrer) Wahn	Positivsymptomatik	
Anhaltende Halluzinationen jeder Sinnesmodalität	Positivsymptomatik	Mindestens zwei Symptome über einen Mindestzeitraum von 30 Tagen
Gedankenabreißen oder -einschiebungen in den Gedankenfluss	Positivsymptomatik	
Katatone Symptome:	Positivsymptomatik	

Erregung		
Haltungsstereotypien		
Negativismus		
Stupor		
Apathie	Negativsymptomatik	
Sprachverarmung		
verflachter oder inadäquater		
Affekt		

### 1.1.5 Therapie und Prognose

Die Behandlung von Patientinnen und Patienten mit Schizophrenie wird üblicherweise in Phasen aufgeteilt, wobei jeweils verschiedene, miteinander kombinierbare Konzepte zum Einsatz kommen. Eine vorwiegend medikamentöse Therapie wird oftmals in der maximal zwölfwöchigen Akutphase verfolgt. Hierbei werden vor allem Antipsychotika verschrieben, gerade beim Vorliegen von Negativsymptomen kann aber auch die Einnahme von Antidepressiva sinnvoll sein. Die anfangs nur begleitende Psychotherapie nimmt in der drei- bis sechsmonatigen postakuten Stabilisierungsphase und der daran anschließenden, zeitlich nicht weiter definierten, stabilen Remissionsphase eine stetig dominantere Rolle ein (DGPPN 2019).

Je nach Schweregrad der Erkrankung und Behandlungserfolg kann sich eine komplette oder partielle Rückbildung der Symptome einstellen. Rund zwei Drittel der Patientinnen und Patienten leiden fortgänglich unter isoliert auftretenden Episoden, während es bei einem Fünftel zu einer lebenslangen Remission kommt. Maximal ein Zehntel müssen trotz Therapie als chronisch schizophren eingestuft werden. Klar ist aber auch, dass Menschen mit Schizophrenie ein allgemein höheres Sterberisiko und eine um 15 Jahre verringerte Lebenserwartung als die Gesamtbevölkerung haben. Maßgeblich scheint in diesem Zusammenhang neben einer gesteigerten Tendenz zur Einnahme von gesundheitsschädlichen Substanzen eine höhere Unfall- und Suizidrate zu sein. Diese Risikofaktoren müssen daher bei der Erstellung eines individuellen Therapieplans berücksichtigt werden (DGPPN 2019).

## **1.2 Neuregulin**

### **1.2.1 Zusammenhang zwischen Neuregulin-1 und Schizophrenie**

Genomweite Assoziationsstudien (Englisch: genome-wide association studies [GWAS]) haben einen Zusammenhang bestimmter Gene mit Schizophrenie aufgezeigt. Eines dieser Gene kodiert den epidermalen Wachstumsfaktor (Englisch: epidermal growth factor [EGF]) Neuregulin-1 (NRG1; Bergen & Petryshen 2012; Bush & Moore 2012; Harrison 2015; Mei & Nave 2014; Schizophrenia Working Group of the Psychiatric Genomics Consortium 2014; Stefansson et al. 2002, Tang et al. 2003; Yang et al. 2003), der über Prozesse wie Myelinisierung und Synapsenbildung die synaptische Plastizität beeinflusst (Bao et al. 2004). Bestimmte Mutationen von NRG1 können eine korrekte Spaltung des Proteins verhindern. In diesem Zusammenhang müssen vor allem Einzelnukleotid-Polymorphismen (Englisch: single-nucleotide polymorphism [SNP]) hervorgehoben werden, die innerhalb der Transmembrandomäne (Englisch: transmembrane Domain [TMD]) des NRG1-Typs III auftreten und in einer Substituierung von Valin durch Leucin resultieren (Walss-Bass et al. 2006). Mutationen dieser Art führen zu einer Einschränkung der sogenannten Rückwärtssignalisierung („back signaling“) von NRG1, was wiederum mit Beeinträchtigungen der kortikalen Entwicklung und einem erhöhten Risiko für Schizophrenie assoziiert worden ist (Chen et al. 2010; Fleck et al. 2013, 2016; Mei & Xiong 2008). Für die letztgenannte Hypothese spricht, dass im präfrontalen Kortex von schizophrenen Patientinnen und Patienten erhöhte zytoplasmatische NRG1-Konzentrationen gefunden wurden (Chong et al. 2008). Diese Beobachtung ist eventuell damit zu erklären, dass die erwähnte Substituierung von Valin durch Leucin die proteolytische Effizienz der für die Spaltung von NRG1 notwendige Gamma-Sekretase beeinträchtigt. In der Folge akkumuliert der Wachstumsfaktor im Cytoplasma ohne in den Zellkern einzudringen (Fleck et al. 2016). Im Sinne eines besseren Verständnisses der Thematik wird in den nachstehenden Unterkapiteln auf Struktur, Funktion und Regulierung von NRG1 eingegangen.

### **1.2.2 Struktur von Neuregulin**

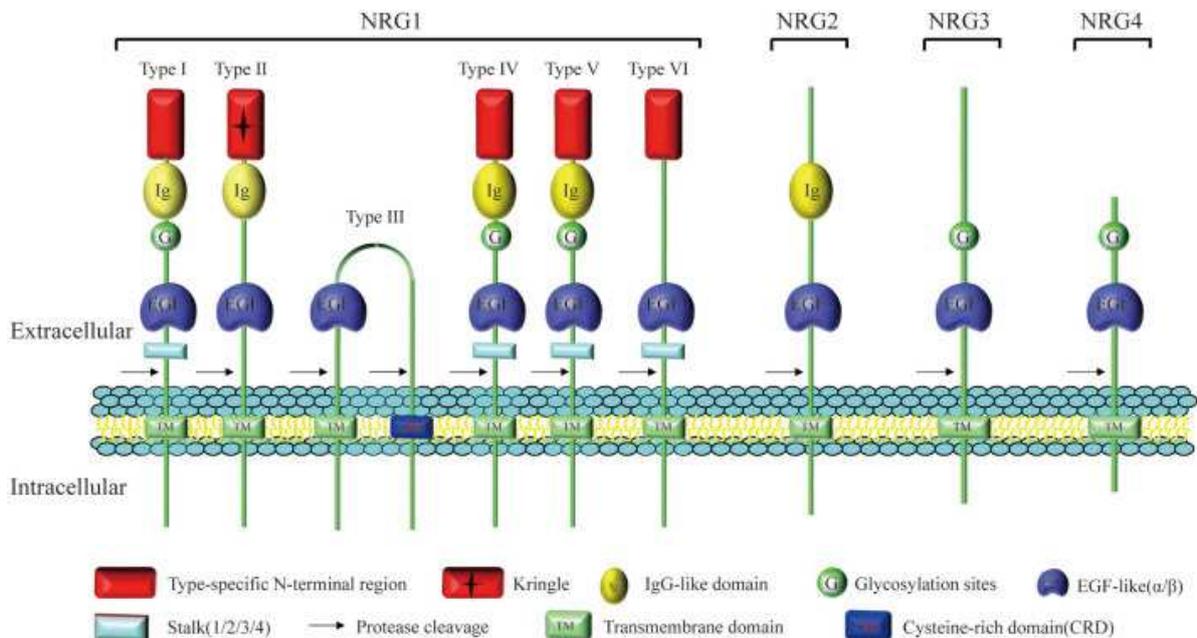
Die NRG-Familie umfasst sechs Gene, die entsprechend als NRG1-4 bezeichnet werden (Falls 2003). Obwohl sich von jedem dieser Gene zahlreiche Isoformen ableiten, weisen alle der resultierenden Transmembranproteine eine extrazelluläre EGF-ähnliche Domäne auf, die einen aktivierenden Effekt auf die Rezeptor-

Tyrosinkinase ERBB3 und/oder ERBB4 hat. Die EGF-ähnliche Domäne ist mit einer Transmembrandomäne verbunden, an die wiederum eine cytoplasmatische Domäne anschließt. NRG1-Proteine präsentieren zudem einen typspezifischen N-Terminus an der extrazellulären Seite der EGF-ähnlichen Domäne. Aufgrund struktureller Eigenheiten dieser Art lassen sich NRG1 und NRG2 in sechs beziehungsweise zwei verschiedene Typen untergliedern. NRG1-I, NRG1-II, NRG1-IV und NRG1-V enthalten ebenso wie NRG2 $\alpha$  und NRG2 $\beta$  eine Immunoglobulin-ähnliche Domäne. NRG1-III nimmt in struktureller Hinsicht eine Ausnahmestellung ein, da es statt nur einer gleich zwei Transmembrandomänen besitzt, von denen eine reich an Cystein ist (Ledonne & Mercuri 2020; Ou et al. 2021). In Bezug auf bekannte Isoformen präsentiert NRG1 eine zwei bis dreimal höhere Anzahl als NRG3 beziehungsweise NRG2 sowie eine sechsmal höhere Anzahl als NRG4. Tabelle 2 und Abbildung 1 fassen die in diesem Unterkapitel dargelegte Informationen zusammen.

**Tabelle 2: Klassifizierung der NRG-Familie.**

Quelle: Eigene Darstellung

Typ	Isoformen	Besonderheiten
NRG1-I NRG1-II NRG1-III NRG1-IV NRG1-V NRG1-VI	33	Enthalten einen typ-spezifischen N-Terminus. Können eine Immunoglobulin-ähnliche (Typ I, II, IV und V) oder cysteinreiche Domäne (Typ III) enthalten.
NRG2 $\alpha$ NRG2 $\beta$	10	Enthalten eine Immunoglobulin-ähnliche Domäne
NRG3	15	
NRG4	5	



**Abbildung 1: Struktur von NRG1 bis NRG4 sowie NRG1-I bis NRG1-VI.**

Alle diese Proteine präsentieren eine extrazelluläre EGF-ähnliche Domäne (EGF), eine Transmembrandomäne (TM) und eine cytoplasmatische Domäne. NRG1-Proteine weisen zudem einen typspezifischen N-Terminus (Type I-VI) an der EGF-ähnlichen Domäne auf. NRG1-I, NRG1-II, NRG1-IV und NRG1-V sowie NRG2 $\alpha$  und NRG2 $\beta$  enthalten eine Immunoglobulin-ähnliche Domäne (Ig). NRG1-III besitzt hingegen eine zusätzliche Transmembrandomäne (CRD), die reich an Cystein ist (Ledonne & Mercuri 2020; Ou et al. 2021). NRG1-I, NRG1-IV, NRG1-V und NRG1-VI enthalten eine Juxta-Membran-Domäne (Stalk 1/2/3/4).

Quelle: Ou et al. (2021, S. 4)

### 1.2.3 Funktion von Neuregulin

Als neurotrophe Wachstumsfaktoren nehmen NRG eine Schlüsselrolle in der Entwicklung des gesamten Nervensystems sowie der Steuerung und Aufrechterhaltung der neuronalen Plastizität ein. Die in diesem Zusammenhang relevanten Signalwege werden primär von der Interaktion zwischen NRG- und den schon erwähnten ERBB-Proteinen moduliert. Dabei binden die NRG mithilfe ihrer EGF-ähnlichen Domäne an ERBB-Rezeptoren und verursachen auf diese Weise Struktur- und/oder Konformationsänderungen. Die nur mit NRG1 und NRG2 interagierenden ERBB3-Proteine können daraufhin Heterodimere mit ERBB2 oder ERBB4 bilden. Im Gegensatz dazu kann ERBB4 aufgrund der Präsenz einer aktiven Kinasendomäne infolge der Bindung von NRG1 bis NRG4 neben Hetero- auch Homodimere formen (Ledonne & Mercuri 2020; Ou et al. 2021). Zwischen ERBB2 und NRG-Proteinen scheint lediglich eine indirekte Wechselwirkung zu bestehen, da Letztere eine höhere Bindungsaffinität für die bevorzugt gebildeten ERBB2/ERBB3-beziehungsweise ERBB2/ERBB4-Heterodimere zeigen als für ERBB3- oder ERBB4-

Rezeptoren alleine. Die Existenz von ERBB1/ERBB4-Heterodimeren ist ebenfalls dokumentiert worden, stichhaltige Beweise für eine Beteiligung dieser Moleküle in NRG-modulierten Signalwegen stehen allerdings noch aus (Ledonne & Mercuri 2020).

Die Aktivierung von ERBB-Rezeptoren durch NRG-Proteine führt letztendlich zur Induktion von intrazellulären biochemischen Kaskaden wie dem Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K)/Proteinkinase B (PKB beziehungsweise Akt)- oder dem Mitogen-aktivierte Proteinkinase (MAPK)/extrazellulär signalregulierte Kinase (ERK)-Signalweg (Ledonne & Mercuri 2020; Ou et al. 2021). Die konkreten Konsequenzen für die Entwicklung und Homöostase des menschlichen Organismus hängt von der speziellen Expression der verschiedenen NRG-Wachstumsfaktoren unter Berücksichtigung einer sowohl anatomischen als auch zeitlichen Dimension ab. So lassen sich zwar alle bekannten NRG im zentralen Nervensystem (ZNS) verorten, in Hinblick auf NRG4 trifft dies jedoch nur auf die Entwicklungsphase zu. Darüber hinaus kommen NRG1 und NRG2 auch im peripheren Nervensystem (PNS) vor, wobei im letzten Fall erneut entwicklungspezifische Beschränkungen bestehen. Diverse außerhalb des Nervensystems liegende Organe und Gewebe können NRG1, NRG2 und NRG4 aufweisen. Bei NRG2 ist in diesem Zusammenhang vor allem die Embryonalphase, bei NRG4 hingegen das Erwachsenenalter zu betonen. Nach aktuellem Kenntnisstand ist NRG1-III der im Gehirn vorherrschende NRG1-Typ (Ledonne & Mercuri 2020; Tabelle 3).

**Tabelle 3: Rezeptoren und anatomische Expression der NRG-Familie.**

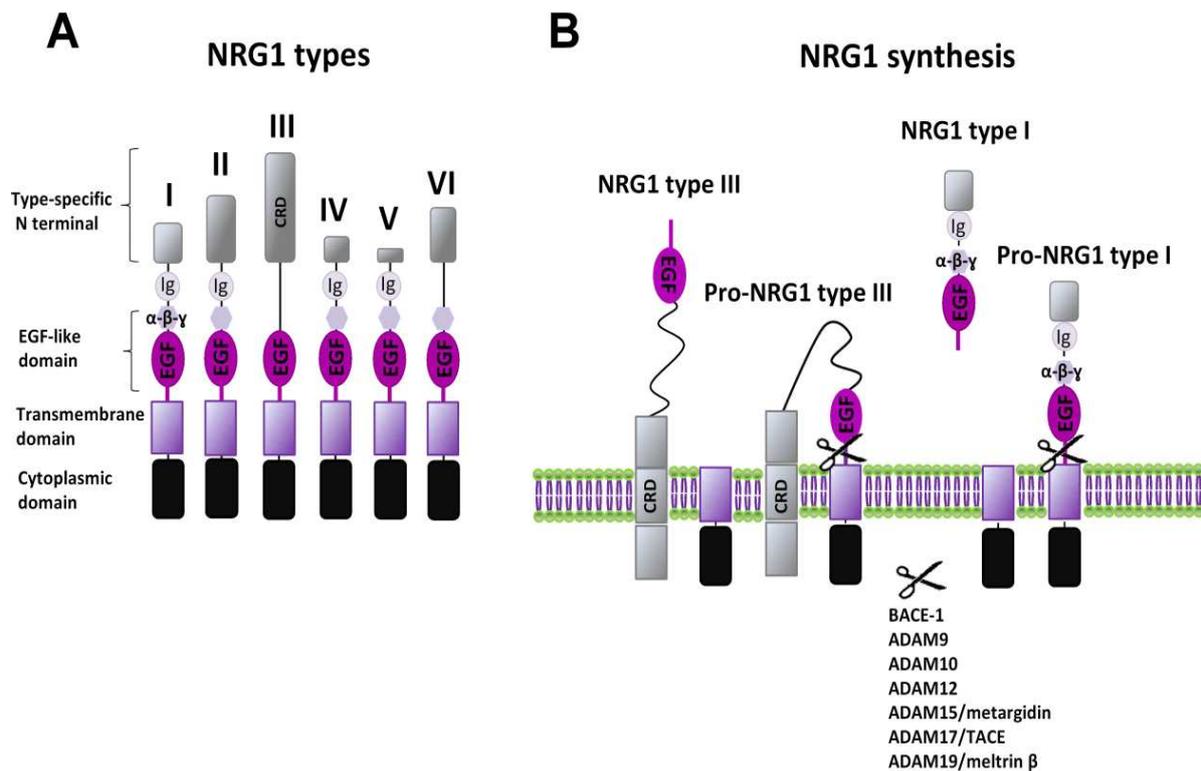
Quelle: Eigene Darstellung

<b>NRG</b>	<b>Rezeptor</b>	<b>Anatomische Expression</b>
NRG1	ERBB3 ERBB4	PNS und ZNS, Haut Herz, Leber, Lunge, Magen, Milz, Nieren
NRG2	ERBB3 ERBB4	Embryonalphase: Blase, Herz, Lunge Entwicklungsphase: PNS und ZNS Erwachsenenalter: Gehirn
NRG3	ERBB4	Embryonalphase und Erwachsenenalter: Gehirn
NRG4	ERBB4	Entwicklungsphase: ZNS Erwachsenenalter: braunes Fettgewebe, Pankreas, Skelettmuskel

Die Tatsache, dass die NRG-Familie eine universelle Verteilung im menschlichen Gehirn präsentiert, ist ein deutlicher Hinweis auf den Einfluss, den diese Wachstumsfaktoren auf die Funktionsweise des erwähnten Organs haben. Beispiele sind die Differenzierung von Astrozyten, Neuronen und Oligodendrozyten sowie die Entwicklungsregulierung von Schwann-Zellen (Mei & Xiong 2008). Des Weiteren sind NRG für die Ausbildung von Synapsen, insbesondere von motorischen Endplatten, unentbehrlich und regulieren die Freisetzung von Neurotransmittern wie Dopamin, GABA und Glutamat (Ledonne & Mercuri 2020; Ou et al. 2021).

#### **1.2.4 Spaltung von Neuregulin**

Wie die von NRG-Proteinen ausgelösten Signalkaskaden, so ist auch die Biosynthese dieser Wachstumsfaktoren komplex und noch nicht in allen ihren Einzelheiten verstanden. Bekannt ist, dass alle NRG sowohl eine inaktive als auch eine aktive Form annehmen können. Die erste bezieht sich auf die als ‚Pro-NRG‘ bezeichneten Vorläufermoleküle, die zweite auf die enzymatisch modifizierten und somit ‚reifen‘ Proteine (Mei & Xion). Der Wechsel von einer Form in die andere wird von Vertretern der Eine-Disintegrin-und-Metalloproteinase (Englisch: a disintegrin and metalloprotease [ADAM])-Familie sowie der Beta-Sekretase (Englisch: beta-site amyloid precursor protein-cleaving enzyme 1 [BACE1]) beziehungsweise dem Tumornekrosefaktor- $\alpha$ -konvertierenden Enzym (Englisch: tumor necrosis factor- $\alpha$ -converting enzyme [TACE]) vorangetrieben ( Mei & Xiong 2008). In der Regel bewirken diese Enzyme, dass sich die EGF-ähnliche Domäne von der Transmembrandomäne abspaltet und als parakrin löslicher Faktor freigesetzt wird. Im Fall des zwei Transmembrandomänen beinhaltenden NRG1-III-Typs wird die EGF-ähnliche Domäne zwar aktiviert, bleibt aber über den N-Terminus mit der cysteinreichen Domäne (CRD) verankert (Abbildung 2).

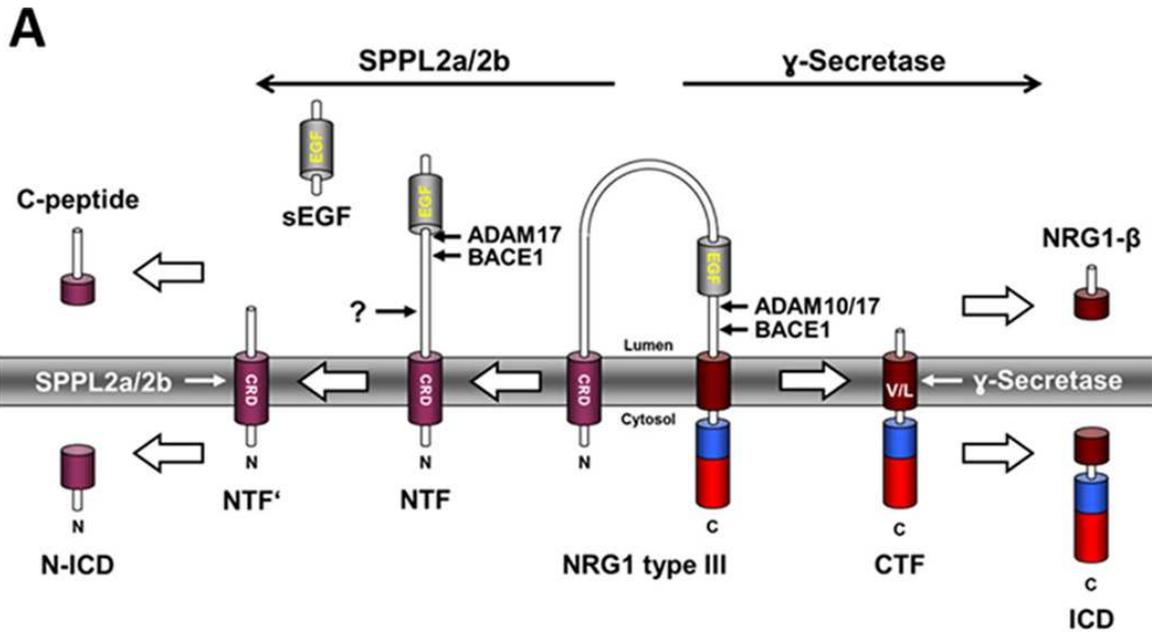


**Abbildung 2: Struktur von NRG1-I bis NRG1-VI sowie Pro-NRG1-I und Pro-NRG1-III.**

ADAM, BACE1 oder TACE spalten die EGF-ähnliche Domäne (EGF) von der Transmembrandomäne der inaktiven Pro-NRG ab. Die auf diese Weise aktivierte EGF-ähnliche Domäne kann dann als parakrin löslicher Faktor ihre Wirkung entfalten. Im Fall des zwei Transmembrandomänen beinhaltenden NRG1-III-Typs bleibt die aktivierte EGF-ähnliche Domäne über den N-Terminus mit der cysteinreichen Domäne (CRD) verbunden (Bao et al. 2003, 2004; Fleck et al. 2012, 2013, 2016; Mei & Xiong 2008).

Quelle: Ledonne & Mercuri (2020, S. 4)

Die EGF-ähnliche Domäne kann durch eine erneut von ADAM beziehungsweise BACE1 oder TACE katalysierte Reaktion von der CRD abgetrennt werden und so in Form einer extrazellulären Domäne (Englisch: extracellular cleavage domaine [ECD]) ebenfalls eine parakrine, als Vorwärtssignalisierung („forward signaling“) bezeichnete Wirkung entfalten. Der mit der anderen Transmembrandomäne von NRG1-III verbundene C-Terminus kann wiederum mithilfe der Gamma-Sekretase freigesetzt werden (Abbildung 3). Die so entstandene intrazelluläre Domäne (Englisch: intracellular cleavage domain [ICD]) transloziert daraufhin in den Zellkern, wo sie die Expression diverser Gene reguliert. Dieser Signalweg ist auch als Rückwärtssignalisierung bekannt (Bao et al. 2003, 2004; Fleck et al. 2012, 2013, 2016; Mei & Xiong 2008).



**Abbildung 3: Enzymatische Spaltung von NRG1-III.**

Die bereits aktivierte, aber noch mit der cysteinreichen Domäne (CRD) verbundene EGF-ähnliche Domäne (EGF) kann durch ADAM, BACE1 oder TACE von der CRD abgetrennt werden und in Form einer extrazellulären Domäne (sEGF) eine parakrine Vorwärtssignalisierung ausüben. Der mit der anderen Transmembrandomäne verbundene C-Terminus (CTF) kann mittels der Gamma-Sekretase freigesetzt werden, um eine intrazelluläre Domäne (ICD) zu formen. Diese transloziert in den Zellkern und löst dort eine Rückwärtssignalisierung aus (Bao et al. 2003, 2004; Fleck et al. 2012, 2013, 2016; Mei & Xiong 2008).

Quelle: Fleck et al. (2016, S. 321)

## 2 Zielsetzung und Hypothesen

Das Ziel der vorliegenden Untersuchung war, im Rahmen einer Medikamentenrepositionierung diverse bereits zu therapeutischen Zwecken genutzte Substanzen auf ihre Eignung zu testen, die intrazelluläre Spaltung von NRG1-ICD zu modulieren. Auf der Dissertation von Setiawan (2018) aufbauend, handelte es sich bei diesen Medikamenten um die Antidepressiva Amitriptylin und Citalopram, das Antihistaminikum Cyproheptadin, den NMDA-Rezeptorantagonisten Ifenprodil, das Gastrokinetikum Mosaprid-Citrat, das Antihypertensivum Nitrendipin, das Neuroleptikum Perphenazin, das Diuretikum Spironolacton sowie das Migränemedikament Zolmitriptan. Ebenfalls auf Grundlage der erwähnten Arbeit wurden die folgenden Hypothesen aufgestellt:

Hypothese 1: Amitriptylin, Cyproheptadin, Ifenprodil, Mosaprid-Citrat, Perphenazin und Spironolacton haben einen hemmenden Effekt auf die Spaltung von NRG1-ICD.

Hypothese 2: Citalopram, Nitrendipin und Zolmitriptan haben einen aktivierenden Effekt auf die Spaltung von NRG1-ICD.

### 3 Material und Methoden

Die in dieser Studie angewendete Vorgehensweise basierte prinzipiell auf folgendem experimentellen Ansatz: Zuerst wurde ein NRG1-Spaltungs-Assay durchgeführt, um ausgewählte Substanzen mit bekanntem Sicherheitsprofil im Kontext eines Small-Molecule-Screens auf ihre potentiell aktivierenden oder hemmenden Effekte hinsichtlich der Abspaltung der ICD von NRG1-III zu prüfen. Eine Kombination der beiden erfolgversprechendsten Substanzen wurde dann nicht nur nach demselben Verfahren, sondern zusätzlich anhand der Western-Blot-Technik evaluiert. Des Weiteren wurde die Zytotoxizität dieser Mischung bestimmt. Eine detaillierte Beschreibung des jeweiligen experimentellen Designs folgt in den nachstehenden Unterkapiteln.

#### 3.1 Material

Die verwendeten Laborgeräte, Kits, Plasmide und Enzyme sowie Chemikalien, Lösungsmittel und Reagenzien sind in den Tabellen 4 bis 6 aufgelistet.

**Tabelle 4: Verwendete Laborgeräte**

Quelle: Eigene Darstellung

Gerät	Modell	Hersteller
Bildzytometer	Celigo Image Cytometer	Nexcelom Bioscience
Biofotometer	BioPhotometer 6131	Eppendorf
Biosicherheitswerkbank	Safe 2020 Class II	Thermo Scientific
Chemilumineszenzsystem	CHEMOcam Imager	INTAS
CO <sub>2</sub> -Inkubator	Heracell 240i	Thermo Scientific
Fotometer	BioPhotometer 6131	Eppendorf
Gelelektrophoresesystem	Mini-PROTEAN Tetra Cell	Bio-Rad
Hämozytometer		Neubauer
Labor-Arbeitsstation	Microlab STAR Line	Hamilton Robotics
Luminometer	LumiCycle 32	Actimetrics
Mikrotiterplattenfotometer		Berthold Technologies
Mikroskop	Primovert	Zeiss
Multikanalpipette	Finnpipette F1	Thermo Scientific

Proteintransfersystem	Trans-Blot Turbo	Bio-Rad
Schüttler	DELFIA Plateshake	Wallac
Spektralfotometer	Picodrop	Picodrop
ThermoMixer		Eppendorf
Ultraschallgerät		
Wasseraufbereitungssystem		Millipore
Zentrifuge	5810 R	Eppendorf
Zentrifuge	Heraeus Megafuge 16	Thermo Scientific

**Tabelle 5: Verwendete Materialien, Kits, Plasmide, Enzyme und Antikörper.**

Quelle: Eigene Darstellung

<b>Enzym</b>	BsrGI	<b>Sequenz</b>	T/GTACA	<b>Puffer</b>	NEBuffer 2.1
	HindIII-HF		A/AGCTT		CutSmart Buffer
	HpaI		GTT/AAC		CutSmart Buffer
	NcoI		C/CATGG		NEBuffer 3.1
	PstI-HF		CTGCA/G		CutSmart Buffer
	XbaI		T/CTAGA		CutSmart Buffer
<b>Antikörper</b>	Monoklonale Antikörper	<b>Hersteller</b>	Santa Cruz Biotechnology	<b>Bezeichnung</b>	NRG1 $\alpha$ / $\beta$ 1/2 (D-10)
	Polyklonale Antikörper		Santa Cruz Biotechnology		NRG1 $\alpha$ / $\beta$ 1/2 (C-20)
	Sekundäre Antikörper		Jackson Immuno Research Labs		HRP-Goat-Anti-Mouse IgG (H+L)
HRP-Goat-Anti-Rabbit IgG (H+L)					
<b>Material</b>	Proteinleiter	<b>Hersteller</b>	Thermo Scientific	<b>Modell</b>	Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder
	SDS-Gel		Bio-Rad		Mini-PROTEAN-TGX
	Transfermembran		GE Healthcare		Amersham Hybond P
<b>KIT</b>	NucleoBond Xtra Midi EF	<b>Hersteller</b>	Macherey-Nagel	<b>Modell</b>	
	NucleoSpin Plasmid Miniprep Kit		Macherey-Nagel		
<b>Plasmid</b>	pcDNA3.1	<b>Abkürzung</b>	pcDNA	<b>Modell</b>	
	pcDNA3.1_BACE1 (V1662)		BACE1		
	pTag4C_mErbB4-JMa-Cyt1-Flag		ERBB4-F		
	pTag4C_mNrg1-typel-beta1a-GV-2HA		N1-I-GV		
	pTag4C_mNrg1-typell-beta1a-GV-2HA		N1-III-GV		
	pG5_Fluc		G5-luc		
	pGL4.16_10xUAS_CMVmin_EXT-luc2		G10-CMV-luc		
	pGL4.20_10xUAS-MLP-luc2/Puro		G10-MLP-luc		
	TK Renilla TC35		TK Renilla		

**Tabelle 6: Verwendete Chemikalien, Lösungsmittel und Reagenzien.**

Quelle: Eigene Darstellung

Substanz	Abkürzung	Hersteller
Adenosintriphosphat	ATP	PJK
Agarose	-	Bio-Rad
Ampicillin	-	Sigma
BACE1-Inhibitor IV	-	-
Bovines Serumalbumin	BSA	Sigma
Bradford-Reagenz	-	-
Chemilumineszenzreagenz	-	PerkinElmer
Coelenterazin	-	PJK
Coenzym A	CoA	PJK
N-[N-(3,5-di-fluorphenacetyl)-L-alanyl]-S-phenylglycine-t-butylester	DAPT	Enzo Life Sciences
Dialysiertes fetales Kälberserum	FBS	Life Technologies
D-Luciferin	-	PJK
Dulbeccos modifiziertes Eagle Medium, 1 g/l Glucose, 500 ml	DMEM	Lonza
Dimethylsulfoxid	DMSO	Merck
DNA-Leiter (100 bp, 1 kb)	-	Thermo Scientific
Dithiothreitol	DTT	PJK
Ethylendiamintetraessigsäure	EDTA	Sigma
Ethylendiamintetraessigsäure-Dinatriumsalz	Na <sub>2</sub> -EDTA	Merck
Ethanol	-	Merck, Sigma
Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N, N, N', N'-tetraessigsäure	EtOH	Merck, Sigma
GlutaMAX (L-Glutamin)	EGTA	Life Technologies
Glycin	-	-
Kaliumhydroxid	-	-
Kaliumphosphat	KOH	Merck
Kanamycin	K <sub>x</sub> PO <sub>4</sub>	Merck, Carl Roth
Ladepuffer	-	Merck
Lipofectamin 2000	L2000	Life Technologies
LY2811376	-	MedChemExpress
Lysogeny-Broth-Medium	LB-Medium	Carl Roth

Magnesiumcarbonat-Hydroxid Pentahydrat	$(\text{MgCO}_3)_4 \cdot \text{Mg}(\text{OH})_2 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	Merck
Magnesiumsulfat-Heptahydrat	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	Merck
Methanol	MeOH	Carl Roth
Milchpulver	-	Carl Roth
Natriumazid	$\text{NaN}_3$	Carl Roth
Natriumchlorid	NaCl	Merck
Natriumhydroxid	NaOH	Merck
Natriumlaurylsulfat	SDS	Carl Roth
Octoxinol 9 (Triton X-100)	-	Sigma
Opti-MEM	-	Life Technologies
NuPAGE LDS-Probenpuffer	-	Life Technologies
Passiv-Lysepuffer	PLB	Promega
Penicillin	-	Sigma
Pferdeserum	-	Life Technologies
Phosphataseinhibitoren (PhosSTOP)	-	Roche
Phosphatgepufferte Salzlösung	PBS	Biochrom
Poly-L-Lysin Hydrobromid	PLL	Sigma-Aldrich
Polysorbat 20	Tween 20	Sigma-Aldrich
Proteaseinhibitoren (cOmplete)	-	Roche
Reduktionspuffer	-	-
Salzsäure	HCl	Merck
Streptomycin	-	Sigma
Tromethamin	TRIS	Carl Roth
Tumornekrosefaktor- $\alpha$ -Proteasehemmer I	TAPI-1	Sigma Aldrich
Tricin	-	Merck
Trypanblau	-	Sigma
Trypsin 2,5 % (10X)	-	Life Technologies
Zeocin (Phleomycin D1)	-	Thermo Scientific

### 3.2 Zelllinien, Kulturmedien und Lösungen

Alle Versuche wurden an der einem Phäochromozytom der Ratte entstammenden PC12-Zelllinie vorgenommen. Die in diesem Zusammenhang verwendeten Kulturmedien und Lösungen werden in Tabelle 7 beschrieben.

**Tabelle 7: Verwendete Kulturmedien und Lösungen.**

Quelle: Eigene Darstellung

Kulturmedium / Lösungen	Komponente	Menge	Anmerkung
<b>PC12-Nährmedium</b>	DMEM (1g/L Glucose)	500 ml	
	FBS	10%	
	Pferdeserum	5%	
	GlutaMAX	1%	
	Penicillin/Streptomycin	1%	
<b>Antibiotikafreies PC12-Nährmedium</b>	DMEM (1g/L Glucose)	500 ml	
	FBS	10%	
	GlutaMAX	1%	
<b>PBS (1x)</b>	PBS	9,55 g	Mit NaOH (1 M) auf pH-Wert von 7,2 einstellen
	Doppelt destilliertes Wasser	1 l	
<b>Trypsin-EDTA (10x, 100 ml)</b>	Trypsin	5 g	Trypsin-EDTA im Verhältnis 1:10 mit PBS mischen. In 50 ml-Aliquoten bei -20°C aufbewahren
	EDTA	6,85 mM	
	PBS		
<b>PLL</b>	PLL		In 50 ml-Aliquoten bei -20°C aufbewahren
	Doppelt destilliertes Wasser		
	Stocklösungen	5 mg/ml	
	Arbeitslösungen	0,02 mg/ml	
<b>Firefly-Luciferase-Assay-Puffer</b>	Tricin	20 mM	HCl (37 %) zu (MgCO <sub>3</sub> ) <sub>4</sub> *Mg(OH) <sub>2</sub> *5H <sub>2</sub> O zugeben, bis die Lösung klar wird. Dann den pH-Wert mit NaOH (5 M) auf 7,8 einstellen. D-Luciferin sowie CoA zugeben und erneut den pH messen. Bei -20°C aufbewahren
	(MgCO <sub>3</sub> ) <sub>4</sub> *Mg(OH) <sub>2</sub> *5H <sub>2</sub> O	1,07 mM	
	MgSO <sub>4</sub> *7H <sub>2</sub> O	2,67 mM	
	EDTA	0,1 mM	
	DTT	33,3 mM	
	CoA	270 µM	
	D-Luciferin	470 µM	
	ATP	530 µM	
<b>Renilla-Luciferase-Assay-Puffer</b>	NaCl	1,1 M	KOH (2M) zu K <sub>x</sub> PO <sub>4</sub> zugeben, bis ein pH-Wert von 5,0 erreicht wird. Coelenterazin hinzufügen. Bei -20°C aufbewahren
	Na <sub>2</sub> -EDTA	2,2 mM	
	K <sub>x</sub> PO <sub>4</sub>	0,22 M	
	BSA	0,44 mg/ml	
	NaN <sub>3</sub>	1,3 mM	
	Coelenterazin (1 mg/ml in EtOH)	1,43 mM	
<b>Lysepuffer</b>	PLB (5x)		PLB im Verhältnis 1:4 mit Wasser mischen
	Doppelt destilliertes Wasser		
<b>Lysepuffer (Western Blot)</b>	TRIS	50 mM	
	NaCl	150 mM	
	Triton X-100	1%	
	EGTA	1 mM	
	cOmplete	1 Tablette/10 ml	
	PhosSTOP	1 Tablette/10 ml	
<b>Denaturierungspuffer</b>	Vierfach-Ladepuffer		
	Zehnfach-Reduktionspuffer		

### **3.3 Methoden**

Die vorliegende Studie griff auf diverse Verfahren der Molekularbiologie, der Biotechnologie sowie der Pharmakologie zurück. Diese werden in den nachstehenden Unterkapiteln im Detail beschrieben.

#### **3.3.1 Transformation von Bakterien**

Bei -80° C gelagerte Aliquoten kompetenter *Escherichia coli*-Zellen der Stämme XL1 Blue- oder DH5 $\alpha$  wurden aufgetaut. Zwischen 100 und 200 ng Plasmid-DNA sowie 15  $\mu$ l der kompetenten Bakterienzellen wurde mittels einer Mikropipette in ein Eppendorf-Mikroreaktionsgefäß übertragen. Die so entstandene Suspension wurde 15 min lang inkubiert. Alle Schritte wurden auf Eis realisiert. Das Mikroreaktionsgefäß wurde sodann für 30 bis 35 s bei 42° C im ThermoMixer hitzeschockbehandelt und erneut 2 min lang auf Eis inkubiert, bevor 600  $\mu$ l des auf 37° C erwärmten LB-Mediums hinzugegeben wurden. Die Mischung wurde bei 37° C und 450 rpm im ThermoMixer inkubiert. Nach 20 min wurden 200  $\mu$ l der Suspension gleichmäßig auf vorab aufgewärmtes, festes, LB-Medium in Petrischalen verteilt. Diese zudem ein geeignetes Antibiotikum enthaltende Plattenkulturen wurden dann mit Parafilm umhüllt und über Nacht bei 32° C inkubiert.

#### **3.3.2 Plasmidpräparation und -reinigung**

Eine einzelne isolierte Bakterienkolonie wurde von einer der Plattenkulturen in ein 15 ml-Röhrchen mit Rundboden transferiert, das 4 ml flüssiges LB-Medium und ein entsprechendes Antibiotikum enthielt. Das Röhrchen wurde verschlossen und bei 37° C sowie 200 rpm sechs Stunden lang inkubiert. Darauffolgend wurden 500  $\mu$ l dieser Suspension in einen mit 150 ml LB-Medium befüllten Erlenmeyerkolben gegeben. Diese ebenfalls mit einem Antibiotikum angereicherte Flüssigkultur wurde über Nacht bei 37° C und 200 rpm inkubiert. Die eigentliche Vorbereitung und Reinigung der Plasmiden wurde mit dem NucleoSpin Plasmid Miniprep- oder NucleoBond Xtra Midi EF-Kit nach Herstellerangaben durchgeführt.

##### **3.3.2.1 NucleoSpin Plasmid Miniprep-Protokoll**

Eppendorf-Mikroreaktionsgefäße wurden mit maximal 1,5 ml der bakteriellen Flüssigkulturen befüllt und für 30 s bei 11,000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 250  $\mu$ l A1-Puffer resuspendiert. Ein identisches Volumen von A2-Puffer wurde dazugegeben und die Suspension 5 min lang bei

Raumtemperatur inkubiert. Das Lysat wurde durch Zumischung von 300 µl A3-Puffer neutralisiert, bevor das Mikroreaktionsgefäß für 5 min bei 11,000 x g zentrifugiert wurde. Eine sich in einem 2 ml-Röhrchen befindende NucleoSpin Plasmid-Säule wurde mit dem Überstand beladen und anschließend für 1 min bei 11,000 x g zentrifugiert. Die Silikamembran der Säule wurde mit 600 µl A4-Puffer gewaschen und erneut für 1 min bei 11,000 x g zentrifugiert. Danach wurde die Membran ebenfalls per Zentrifugierung für 2 min bei 11,000 x g dehydriert. Säule und Membran wurden in ein Eppendorf-Mikroreaktionsgefäß platziert und die an die Membran gebundene DNA mit 50 µl AE-Puffer eluiert. Der AE-Puffer wurde 1 min lang bei Raumtemperatur inkubiert und für 1 min bei 11,000 x g zentrifugiert.

### **3.3.2.2 NucleoBond Xtra Midi EF-Protokoll**

Maximal 40 ml der bakteriellen Flüssigkulturen wurden in 50 ml-Falcon-Röhrchen gefüllt und für 15 min bei 2500 rpm und 4° C zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 8 ml RES-EF resuspendiert und durch Zugabe eines identischen Volumens von LYS-EF lysiert. Das Röhrchen wurde fünfmal invertiert und 5 min lang bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde das Lysat mit 8 ml NEU-EF neutralisiert. Das Röhrchen wurde zehn- bis fünfzehnmal invertiert und der Inhalt auf den Filter einer NucleoBond Xtra-Säule geladen. Sowohl Filter als auch Säule waren zuvor mit 15 ml EQU-EF äquilibriert worden. Das sich auf dem Filter befindende Lysat wurde mit 5 ml FIL-EF gereinigt und der Filter verworfen. Die Säule wurde zweimal mit 35 ml ENDO-EF sowie 15 ml WASH-EF gewaschen, um potentiell vorhandene Endotoxine zu eliminieren. Die an das Kieselsäureharz der Säule gebundene DNA wurde sodann mit 5 ml ELU-EF eluiert, in einem 50 ml-Falcon-Röhrchen aufgefangen und mittels Zugabe von 3,5 ml Isopropanol gefällt. Das Röhrchen wurde für 30 min bei 11,000 rpm und 4° C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet mit 2 ml Äthanol (70 %) gewaschen. Die Suspension wurde in einem Eppendorf-Mikroreaktionsgefäß für 20 min bei 11,000 rpm und Raumtemperatur zentrifugiert und die wässrig-alkoholische Überstand verworfen. Das trockene Zellpellet wurde in 200 µl TE-EF resuspendiert und die entsprechende DNA-Konzentration mittels Spektralfotometrie bestimmt.

### **3.3.3 Restriktionsverdau**

Die Plasmid-DNA wurde nach der Restriktionsverdaumethode analysiert. Hierbei wurden 1 µl DNA mit 0,5 µl einer geeigneten Restriktions-Endonuklease vom Typ II, 2,5 µl eines entsprechenden Puffers sowie 21 µl doppelt destilliertem Wasser

vermischt. Die Probe wurde zuerst bei Raumtemperatur inkubiert, bevor ihr nach 30 bis 45 min 3 µl Sechsfach-DNA-Ladepuffer zugesetzt wurde. Von dieser Lösung wurden 12 µl wiederum mit 10 µl eines Markers gemischt, der aus 9 µl einer 1kb-GeneRuler-DNA-Leiter sowie 1 µl Sechsfach-DNA-Ladepuffer bestand. Eine Agarosegelplatte wurde mit 12 µl dieser finalen Probe beladen und die einzelnen DNA-Fragmente bei 70 V über einen Zeitraum von 40 min elektrophoretisch getrennt. Unter Ultravioletter (UV) Strahlung wurden die Fragmente visualisiert und mit einem Skalpell aus dem Gel entfernt. Die Aufreinigung der DNA-Fragmente erfolgte mittels Nucleo Spin Extract Kits.

### **3.3.4 Zellkulturen**

#### **3.3.4.1 Coating**

Die Etablierung der Zellkulturen setzte die Vorbereitung der zu verwendenden Petrischalen beziehungsweise Mikrotiterplatten voraus. Je nach Durchmesser und Fassungsvermögen wurden verschiedene Volumen PLL-Coatinglösung (0,02 mg/ml) in das jeweilige Behältnis gegeben und durch leichtes Schwenken gleichmäßig verteilt. Nach einer dreißigminütigen Inkubation bei 37° C wurde die Lösung abgegossen und das Behältnis zweimal mit doppelt destilliertem Wasser gewaschen. Eventuell verbleibende Wasserrückstände wurden eliminiert, indem die offenen Petrischalen beziehungsweise Mikrotiterplatten dem Luftstrom sowie der UV-Strahlung einer Biosicherheitswerkbank ausgesetzt wurden. Danach wurden die Schalen oder Platten verschlossen und in einem Kühlschrank aufbewahrt. Im Fall von Petrischalen mit einem Durchmesser von 15 cm wurden jeweils 10 ml Coatinglösung und Wasser verwendet. Bei einem Durchmesser von 3,5 cm wurden die Schalen dagegen mit 1 ml PLL-Lösung und 2 ml Wasser behandelt. Das Coating der 96-Well-Mikrotiterplatten geschah unter Verwendung einer Multikanalpipette und 50 µl der beschriebenen PLL-Lösung sowie 100 µl doppelt destilliertem Wasser pro Well.

#### **3.3.4.2 Etablierung von PC12-Zellkulturen**

PC12-Zellen wurden aufgetaut, in ein mit 30 ml flüssigem PC12-Nährmedium befülltes 50 ml-Falcon-Röhrchen transferiert und bei 1200 rpm zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 1 ml flüssigem Nährmedium resuspendiert und in eine 15 ml flüssiges PC12-Nährmedium enthaltende Petrischale mit einem Durchmesser von 15 cm übertragen. Diese wurde bei 37° C inkubiert. Das Passagieren der Zellen fand alle drei bis fünf Tage nach Erreichen einer Konfluenz von maximal 80 bis 90 % statt. Hierbei wurden

die in einer Petrischale enthaltenen Zellen zuerst mit 10 ml PBS gewaschen und sodann mit 5 ml Trypsin behandelt, von denen 3 ml sofort wieder entfernt wurden. Nach dem Ablösen der Zellen vom Boden der Petrischale wurden sie in 10 ml flüssigem Medium resuspendiert und in ein leeres 50 ml-Falcon-Röhrchen pipettiert. Letzterem wurde dann das gewünschte Suspensionsvolumen entnommen, um eine neue PC12-Nährmedium enthaltende Petrischale zu inokulieren.

### **3.3.4.3 Transfektion**

Die Transfektion der PC12-Zellen mit der in Unterkapitel 3.3.2 beschriebenen Plasmid-DNA wurde unter Verwendung von L2000 eingeleitet. Die erwähnte Substanz kann Komplexe mit Plasmid-DNA bilden, die dann über Endozytoseprozesse ins Zellinnere eingeschleust werden. Die Plasmid-DNA wird zuerst im Cytoplasma freigesetzt, um dann in den Nukleus zu gelangen und gegebenenfalls transkribiert zu werden.

### **3.3.5 NRG1-Spaltungs-Assay**

#### **3.3.5.1 D-Luciferin-Luminometer-Assay**

Ein Volumen von jeweils 100 oder 300 ng der im Rahmen des NRG1-Spaltungs-Assays benötigten DNA (BACE1, G10-MLP-luc, ERBB4-F, N1-III-GV beziehungsweise pcDNA) wurde in einem Eppendorf-Mikroreaktionsgefäß mit 100 µl Opti-MEM gemischt und bei Raumtemperatur inkubiert. Nach 5 min wurde diese Mischung wiederum in eine zuvor vorbereitete Lösung gegeben, die aus 100 µl Opti-MEM and 4,2 µl L2000 bestand. Die nun folgende Inkubationszeit von 20 min wurde genutzt, um die transfektierten PC12-Zellen mithilfe eines Hämozytometers zu quantifizieren. Dazu wurden die Zellen zuerst in frisches antibiotikafreies Nährmedium transferiert und 10 µl dieser Suspension mit 90 µl Trypanblau (0,4 %) vermennt. Danach wurde erneut ein Volumen von 10 µl entnommen und in den Hämozytometer gegeben. Die Anzahl der in den vier Eckquadraten gezählten lebenden Zellen wurde durch vier geteilt und mit dem Volumenfaktor eines Eckquadrats ( $10^5 \text{ ml}^{-1}$ ) multipliziert. Auf Grundlage der so bestimmten Zelldichte wurde das gewünschte Volumen an zellhaltigem Medium in ein leeres Falcon-Röhrchen transferiert und mit einer der DNA-Opti-MEM-L2000-Lösungen gemischt. Das Röhrchen wurde dreimal invertiert und dann in horizontaler Lage bei 37° C inkubiert. Nach fünf Stunden wurde dem Röhrchen so viel frisches PC12-Nährmedium zugegeben, wie zum Erreichen des angestrebten Endvolumens vonnöten war. Darauffolgend wurden 3 µl D-Luciferin (1:1000)

beigemischt. Röhren, die der negativen Kontrolle dienten, wurden zudem mit einer identischen Menge DAPT (1:1000) aufbereitet. Petrischalen mit einem Durchmesser von 3,5 cm wurden mit jeweils 1,5 ml der resultierenden Lösungen befüllt, was einer Anzahl von  $1,4 \times 10^6$  transfektierten PC12-Zellen entsprach. Die Schalen wurden mit Parafilm umhüllt und 48 Stunden lang in einem Luminometer belassen. Die Induktionskinetik wurde mit der LumiCycle-Analysesoftware registriert und ausgewertet. Tabelle 8 fasst das zur Durchführung des NRG1-Spaltungs-Assays befolgte Versuchsprotokoll zusammen.

**Tabelle 8: Versuchsprotokoll des D-Luciferin-Luminometer-Assays.**

Quelle: Eigene Darstellung

	1-Baseline	2-negative Kontrolle	3-positive Kontrolle I	4-positive Kontrolle II
N1-III-GV	300 ng*	300 ng*	300 ng*	300 ng*
G10-MLP-luc	300 ng*	300 ng*	300 ng*	300 ng*
pcDNA	100 ng*	100 ng*		
ERBB4-F			100 ng*	
BACE1				100 ng*
Mischung der verschiedenen DNA mit Opti-MEM und L2000				
Opti-MEM	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl
L2000	4,2 µl	4,2 µl	4,2 µl	4,2 µl
Zugabe von transfektierten Zellen und Inkubation (37° C, fünf Stunden)				
Endvolumen	3,0 ml	3,0 ml	3,0 ml	3,0 ml
D-Luciferin	3,0 µl	3,0 µl	3,0 µl	3,0 µl
DAPT		3,0 µl		
Aufzeichnung der Induktionskinetik mithilfe der LumiCycle-Analysesoftware über 48 Stunden in einem Luminometer.				

\*Jede Testreihe bestand aus zwei Replikationen (Petrischalen), in denen jeweils die angegebenen Mengen sowie 1.400.000 transfektierte Zellen in einem 1,5 ml umfassenden Volumen verwendet wurden.

### 3.3.5.2 Firefly- und Renilla-Luciferase-Mikrotiterplatten-Assay

Der NRG1-Spaltungs-Assay wurde in einer 96-Well-Mikrotiterplatte durchgeführt. Das Versuchsprotokoll ähnelte dabei prinzipiell dem des Luminometer-Assays, mit dem Unterschied, dass pro Replikation geringere Mengen der einzelnen Komponenten (5 bis 15 ng DNA, 43,75 µl Opti-MEM, 3,15 µl L2000) sowie kein D-Luciferin verwendet wurden. Jeder Well wurde mittels Multikanalpipette mit 200 µl antibiotikafreiem, rund 70000 Zellen enthaltendem Nährstoffmedium befüllt. Die Anfertigung der hierzu benötigten Stammsuspensionen erfolgte nicht mithilfe einer hämozytometrischen Quantifizierung, sondern beruhte auf Schätzungen der jeweiligen Zelldichte. Die Inkubationszeit war nur knapp halb so lang wie im Fall des Luminometer-Assays. Die Mikrotiterplatte selber wurde nach Abschluss aller Vorbereitungsmaßnahmen bei 37° C über 24 Stunden inkubiert. Am Folgetag wurde das Nährmedium aus den Wells entfernt und durch jeweils 35 µl PLB ersetzt. Die Platte wurde auf einem Schüttler 20 min lang bei Raumtemperatur inkubiert und dann unter Zugabe von Firefly-beziehungsweise Renilla-Luciferase mit einem Mikrotiterplattenfotometer ausgelesen (Tabelle 9). Zu diesem Zweck wurden im Programm Micro/WIN 2000 die folgenden Einstellungen vorgenommen:

1. Gewünschte Datei öffnen.
2. Plate ==> zu benutzende Wells markieren ==> Injector 2 (blue = RN) und Injector 3 (red = FF) ==> Next
3. (Den RN- und FF-Schlauch in jeweils ein doppelt destilliertes Wasser enthaltendes Falcon-Röhrchen tauchen.) ==> Instrument ==> Wash ==> 50 Cycle ==> Injector 2 and 3 in ddH2O ==> OK
4. (Die Schläuche in die jeweiligen Substrate, also Firefly- oder Renilla-Luziferase tauchen.) ==> Instrument ==> Prime ==> Injector 2 and 3 ==> Next (einmal wiederholen)
5. Instrument ==> Unload plate ==> (Mikrotiterplatte in den Fotometer stellen.) ==> Dateinamen eingeben ==> Start
6. Instrument ==> Wash ==> Injector 2 and 3 in ddH2O ==> 50 Cycle ==> Next
7. Instrument ==> Wash ==> Injector 2 and 3 in ethanol ==> 50 Cycle ==> Next
8. Instrument ==> Wash ==> Injector 2 and 3 in ddH2O ==> 50 Cycle ==> Next
9. Instrument ==> Unload Injector ==> 15 Cycle ==> Next

**Tabelle 9: Versuchsprotokoll des Firefly- und Renilla-Luciferase-Mikrotiterplatten-Assays.**

Quelle: Eigene Darstellung

	<b>1-Baseline</b>	<b>2-negative Kontrolle</b>	<b>3-positive Kontrolle I</b>	<b>4-positive Kontrolle II</b>
N1-III-GV	15 ng*	15 ng*	15 ng*	15 ng*
G10-MLP-luc	15 ng*	15 ng*	15 ng*	15 ng*
pcDNA	5 ng*	5 ng*		
ERBB4-F			5 ng*	
BACE1				5 ng*
Mischung der verschiedenen DNA mit Opti-MEM und L2000				
Opti-MEM	43,75 µl	43,75 µl	43,75 µl	43,75 µl
L2000	3,15 µl	3,15 µl	3,15 µl	3,15 µl
Zugabe von transfektierten Zellen und Inkubation (37° C, zwei bis drei Stunden)				
Endvolumen	6,0 ml	6,0 ml	6,0 ml	6,0 ml
DAPT		6,0 µl		
Inkubation (37° C, 24 Stunden)				
Ersetzung des Nährmediums durch 35 µl PLB pro Well und Inkubation (Raumtemperatur, 20 min auf Schüttler)				
Zugabe von Firefly- beziehungsweise Renilla-Luciferase und Auslesung in einem Mikrotiterplattenfotometer				

\*Jede Testreihe bestand aus 24 Replikationen (Wells), in denen jeweils die angegebenen Mengen sowie 70000 transfektierte Zellen in einem 200 µl umfassenden Volumen verwendet wurden.

### 3.3.6 Medikamentenrepositionierung

#### 3.3.6.1 Selektion der zu testenden Substanzen

Die Auswahl der im Kontext der Medikamentenrepositionierung zu evaluierenden Substanzen basierte auf dem von Setiawan (2018) durchgeführten Screening von diversen in der National Institutes of Health (NIH) Clinical Collection registrierten Molekülen. Als potentiell die Spaltung von NRG1-ICD hemmende Hits wurden

Annolytin, CGS-15943, Cyproheptadin, Dactinomycin, Diphenylcyclopropenon, Doxorubicin, Epirubicin, Homoharringtonin, Idarubicin, Ifenprodil, Mitoxantron, Mosaprid-Citrat, Pamelor, Perphenazin, Spironolacton, Thioridazin, Topotecan und Triptolid, identifiziert. Als die erfolversprechendsten Aktivatoren der Spaltung von NRG1-ICD wurden 4-(Aminomethyl)-Benzensulfonamidacetat, Albendazol, Allegra, Bestatin, Citalopram, Dipyridamol, Irsogladinmaleat, Naltrexon, Nitrendipin, Rifapentine und Zolmitriptan aufgeführt. Unter diesen Substanzen wurden wiederum die mutmaßlich wirksamsten in der vorliegenden Arbeit zu testenden Stoffe selektiert.

### 3.3.6.2 Konzentrations-Wirkungs-Assay

Der Konzentrations-Wirkungs-Assay folgte grundsätzlich dem Prinzip des oben beschriebenen Firefly- und Renilla-Luciferase-Mikrotiterplatten-Assays. Der Hauptunterschied bestand darin, dass die Wells jeweils 100 µl der Zellsuspension und ein identisches Volumen einer Testsubstanzlösung enthielten. Alle selektierten Medikamente wurden auf diese Weise in einer Konzentration von 0,0003 µM, 0,003 µM, 0,03 µM, 0,3 µM, 3 µM und 30 µM evaluiert (Tabelle 10).

**Tabelle 10: Versuchsprotokoll des Konzentrations-Wirkungs-Assays.**

Quelle: Eigene Darstellung

	1-Baseline	2-negative Kontrolle	3-positive Kontrolle I	4-positive Kontrolle II
N1-III-GV	15 ng*	15 ng*	15 ng*	15 ng*
G10-MLP-luc	15 ng*	15 ng*	15 ng*	15 ng*
pcDNA	5 ng*	5 ng*		
ERBB4-F			5 ng*	
BACE1				5 ng*
Mischung der verschiedenen DNA mit Opti-MEM und L2000				
Opti-MEM	43,75 µl	43,75 µl	43,75 µl	43,75 µl
L2000	3,15 µl	3,15 µl	3,15 µl	3,15 µl
Zugabe von transfektierten Zellen und Inkubation (37° C, zwei bis drei Stunden)				
Endvolumen	6,0 ml	6,0 ml	6,0 ml	6,0 ml

DAPT		6,0 µl		
Mischung von Zellsuspension mit Testsubstanzlösung und Inkubation (37° C, 24 Stunden)				
Ersetzung des Nährmediums durch 35 µl PLB pro Well und Inkubation (Raumtemperatur, 20 min auf Schüttler)				
Zugabe von Firefly- beziehungsweise Renilla-Luciferase und Auslesung in einem Mikrotiterplattenfotometer				

\*Jede Testreihe bestand aus 24 Replikationen (Wells), in denen jeweils die angegebenen Mengen sowie 70000 transfizierte Zellen in einem 200 µl umfassenden Volumen verwendet wurden.

### 3.3.7 Zytotoxizitätstest

Die potentiell wirksamste Medikamentenkombination wurde einem Zytotoxizitätstest in einer 96-Well-Mikrotiterplatte unterzogen. Hierzu wurden verschiedene Konzentrationen Spironolacton und Ifenprodil im Verhältnis 1:3 gemischt und nicht transfizierten PC12-Zellsuspensionen zugesetzt, die zuvor 24 Stunden bei 37° C inkubiert worden waren. Nach einer weiteren Inkubationszeit von sechs Stunden wurden mittels Bildzytometers Aufnahmen der einzelnen Wells angefertigt, die dann von der in das Gerät integrierten Software in Bezug auf die Präsenz lebender Zellen quantitativ analysiert wurden. Als nicht toxische Kontrolle wurden 10 µM DAPT eingesetzt (Tabelle 11).

**Tabelle 11: Versuchsprotokoll des Zytotoxizitätstests.**

Quelle: Eigene Darstellung

Reihe	DAPT	Spironolacton	Ifenprodil
1-Baseline	—	—	—
2-Kontrolle	10 µM	—	—
3-Kombination 1	—	0,3 µM	0,9 µM
4-Kombination 2	—	1 µM	3 µM
5-Kombination 3	—	3 µM	9 µM
6-Kombination 4	—	10 µM	30 µM
7-Kombination 5	—	30 µM	90 µM

8-Kombination 6	—	100 µM	300 µM
Mischung von Zellsuspension mit Testsubstanzlösung und Inkubation (37° C, 24 Stunden)			
Zugabe der Testsubstanzkombination (37° C, sechs Stunden)			
Anfertigung von Aufnahmen sowie quantitative Analyse per Bildzytometer			

\*Jede Testreihe bestand aus sechs Replikationen (Wells), in denen jeweils die angegebenen Mengen sowie 600000 Zellen in einem 100 µl umfassenden Volumen verwendet wurden.

### 3.3.8 Quantifizierung von Proteinen sowie des C-Terminus von Neuregulin-1

#### Typ III

In einem letzten Experiment wurden die Auswirkungen von Spironolacton alleine beziehungsweise in Kombination mit Ifenprodil auf die intrazelluläre Akkumulation des C-Terminus von NRG1-III untersucht. In Anlehnung an Wehr et al. (2017) wurden entsprechend transfizierte PC12-Zellen in mit 10 ml Nährmedium befüllten Petrischalen bis zum Erreichen einer mikroskopisch kontrollierten Konfluenz von 70 bis 80 % kultiviert. Die so reproduzierten Zellen wurden in 6-Well-Mikrotiterplatten gegeben und nach einer Inkubationszeit von acht Stunden vier verschiedenen Behandlungen unterzogen. Zum einen wurde den Zellsuspensionen entweder 10 µM Spironolacton oder eine Kombination von 30 µM Spironolacton und 100 µM Ifenprodil zugesetzt. Zum anderen wurden drei Kontrollen vorbereitet, von denen eine lediglich das für die Herstellung der Testsubstanzlösungen verwendete Lösungsmittel DMSO enthielt. Des Weiteren wurden 10 µM DAPT sowie 10 µM BACE1-Inhibitor IV als negative Kontrollen eingesetzt.

Nach 16 bis 24 Stunden wurde das Medium entfernt. Die Zellen wurden mit PBS gewaschen, in 200 µl Lysepuffer pro Well resuspendiert und zehn Minuten lang auf Eis inkubiert. Sodann wurden die Suspension einer zehneckündigen Ultraschallbehandlung unterzogen und zehn Minuten lang bei 13000 rpm sowie 4° C zentrifugiert. Ein 65 µl umfassendes Aliquot des jeweiligen Überstands wurde in Eppendorf-Mikroreaktionsgefäßen mit 35 µl eines Denaturierungspuffers vermengt. Die resultierenden Lösungen wurden bei -20° C aufbewahrt.

Die Bestimmung der in den Proben enthaltenen Proteinkonzentrationen erfolgte auf Basis des Bradford-Tests. Hierzu wurden jeweils 2 µl der verschiedenen Proteinlysate mit 1000 µl einer im Verhältnis 1:5 verdünnten Bradford-Reagenz gemischt, um anschließend die OD<sub>600</sub> mittels Biofotometer zu quantifizieren. Die spezifische in µg/µl angegebene Proteinkonzentration wurde berechnet, indem die ermittelten Werte mit dem Faktor 0,03 multipliziert und durch den Faktor 2 dividiert wurden.

Die zielgerichtete Detektion des C-Terminus von NRG1-III erfolgte auf Grundlage einer Western-Blot-Analyse der Proteinlysate. Die vollzogenen Arbeitsschritte entsprachen dabei der vom Hersteller des verwendeten Systems empfohlenen Vorgehensweise. Die Proteine beziehungsweise Peptide der einzelnen Proben wurden zuerst mittels SDS-Page-Gelelektrophorese voneinander getrennt und per Elektrotransfer auf eine Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Membran übertragen. Die Membran wurde dann über Nacht in einer Lösung inkubiert, die mono- oder polyklonale Antikörper gegen den C-Terminus von NRG1-III beinhaltet. Mithilfe eines Chemilumineszenzsystems wurden dann die Zielmolekülbande identifiziert und die von ihnen ausgehenden Lumineszenzsignale registriert. Die Intensität Letzterer wurde unter Einsatz des Open-Source-Programms ImageJ ausgelesen und quantifiziert. Der gesamte Versuchsaufbau wird in Tabelle 12 in kondensierter Form umrissen.

**Tabelle 12: Versuchsprotokoll zur Quantifizierung von Proteinen sowie des C-Terminus von NRG1-III.**

Quelle: Eigene Darstellung

	<b>1-Baseline</b>	<b>2-negative Kontrolle I</b>	<b>3-negative Kontrolle II</b>
N1-III-GV	15 ng*	15 ng*	15 ng*
pcDNA	5 ng*	5 ng*	
Mischung der verschiedenen DNA mit Opti-MEM und L2000			
Opti-MEM	43,75 µl	43,75 µl	43,75 µl
L2000	3,15 µl	3,15 µl	3,15 µl
Zugabe von transfektierten Zellen und Inkubation (37° C, acht Stunden)			
Endvolumen	6,0 ml	6,0 ml	6,0 ml
DMSO	2,0 µl	2,0 µl	

DAPT		6,0 µl	
BACE1-Inhibitor IV			6,0 µl
Mischung von Zellsuspension mit Testsubstanzlösung und Inkubation (37° C, 16 bis 24 Stunden)			
Zytolyse und Quantifizierung der Proteinkonzentration mittels Bradford-Test			
Western Blot			

\*Jede Testreihe bestand aus zwei Replikation (Wells), in denen jeweils die angegebenen Mengen sowie 1 Million transfektierte Zellen in einem 200 µl umfassenden Volumen verwendet wurden.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Selektion der im Rahmen der Medikamentenrepositionierung zu testenden Substanzen

Das Screening von in der NIH Clinical Collection registrierten Substanzen führte zur Identifizierung mehrerer Hits mit potentiell die Spaltung von NRG1-ICD beeinflussender Wirkung (Abbildung 4). Einige der Hits wurden aufgrund unerwünschter Eigenschaften beziehungsweise ungünstiger Sicherheitsprofile von vornherein ausgeschlossen. Dies war zum Beispiel bei Chemotherapeutika der Fall. Von den verbleibenden Hits wurden die Antidepressiva Amitriptylin und Citalopram, das Antihistaminikum Cyproheptadin, den NMDA-Rezeptorantagonisten Ifenprodil, das Gastrokinetikum Mosaprid-Citrat, das Antihypertensivum Nitrendipin, das Neuroleptikum Perphenazin, das Diuretikum Spironolacton sowie das Migränemedikament Zolmitriptan als besonders erfolgversprechend ausgewählt. Nur Citalopram, Nitrendipin und Zolmitriptan wurden mit aktivierenden Effekten auf die Spaltung von NRG1-ICD assoziiert, allen anderen Medikamenten wurde eine diesbezüglich hemmende Wirkung zugeschrieben.

Im Rahmen der Medikamentenrepositionierung identifizierte potentielle Hits

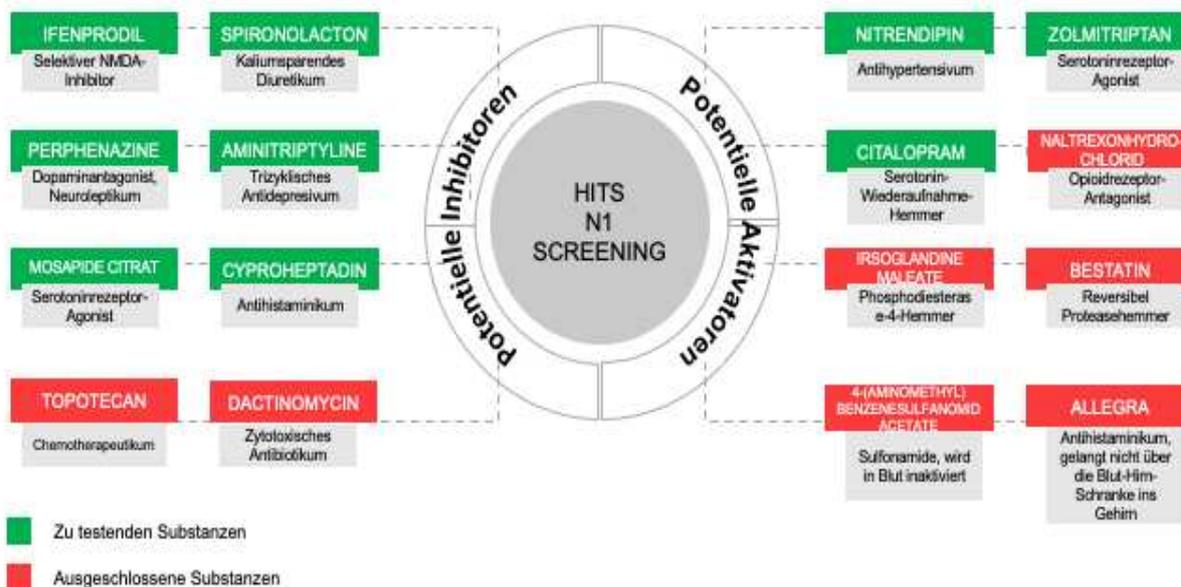


Abbildung 4: Im Rahmen der Medikamentenrepositionierung identifizierte potentielle Hits.

Quelle: Eigene Darstellung

## 4.2 D-Luciferin-Luminometer-Assay

Der D-Luciferin-Luminometer-Assay wurde lediglich realisiert, um die Ergebnisse des in dieser Studie primär verwendeten Firefly- und Renilla-Luciferase-Mikrotiterplatten-Assays auf Basis eines etablierten Testverfahrens zu validieren. Sowohl 10  $\mu\text{M}$  der negativen Kontrollsubstanz DAPT als auch 30  $\mu\text{M}$  Ifenprodil beziehungsweise 10  $\mu\text{M}$  Spironolacton hatten einen verminderten Einfluss auf die mit der Spaltung der ICD von NRG1-III assoziierte Luciferaseaktivität. Ifenprodil präsentierte dabei eine Hemmwirkung, die größer als die von Spironolacton, aber kleiner als die von DAPT war. Eine Spironolacton-Ifenprodil-Kombination im Verhältnis 1:3 reduzierte die Luciferaseaktivität sogar in höherem Ausmaß als DAPT (Abbildung 5). Unter Berücksichtigung der jeweils eingesetzten Konzentrationen stimmten diese Beobachtungen tendenziell mit den in den nachfolgenden Unterkapiteln dargestellten Resultaten überein.

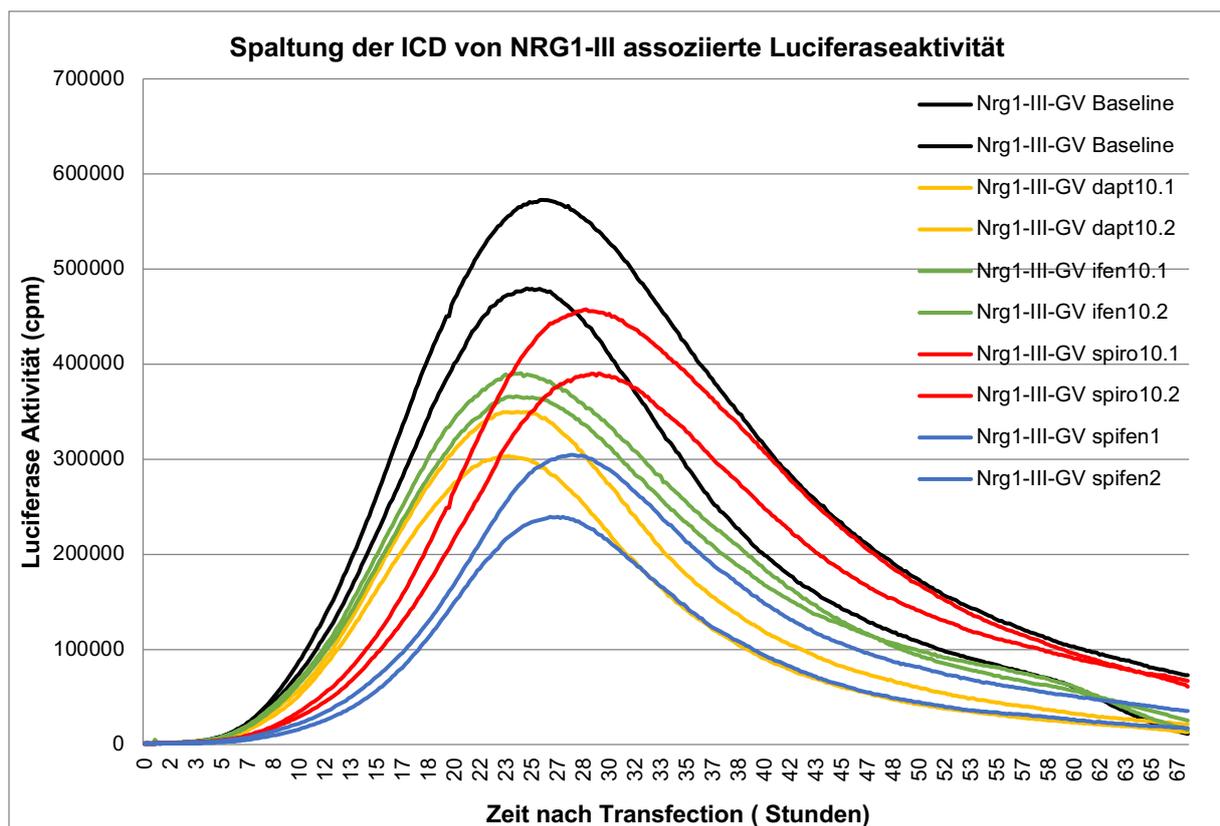


Abbildung 5: Mit der Spaltung der ICD von NRG1-III assoziierte Luciferaseaktivität bei Baseline- (schwarze Linien) und negativen (10  $\mu\text{M}$  DAPT, orangene Linien) Kontrollbedingungen sowie in Präsenz von Ifenprodil (30  $\mu\text{M}$ , grüne Linien), Spironolacton (10  $\mu\text{M}$ , rote Linien) oder einer Spironolacton-Ifenprodil-Kombination im Verhältnis 1:3 (Spifen, 10  $\mu\text{M}$  + 30  $\mu\text{M}$ , blaue Linien).

Quelle: Eigene Darstellung

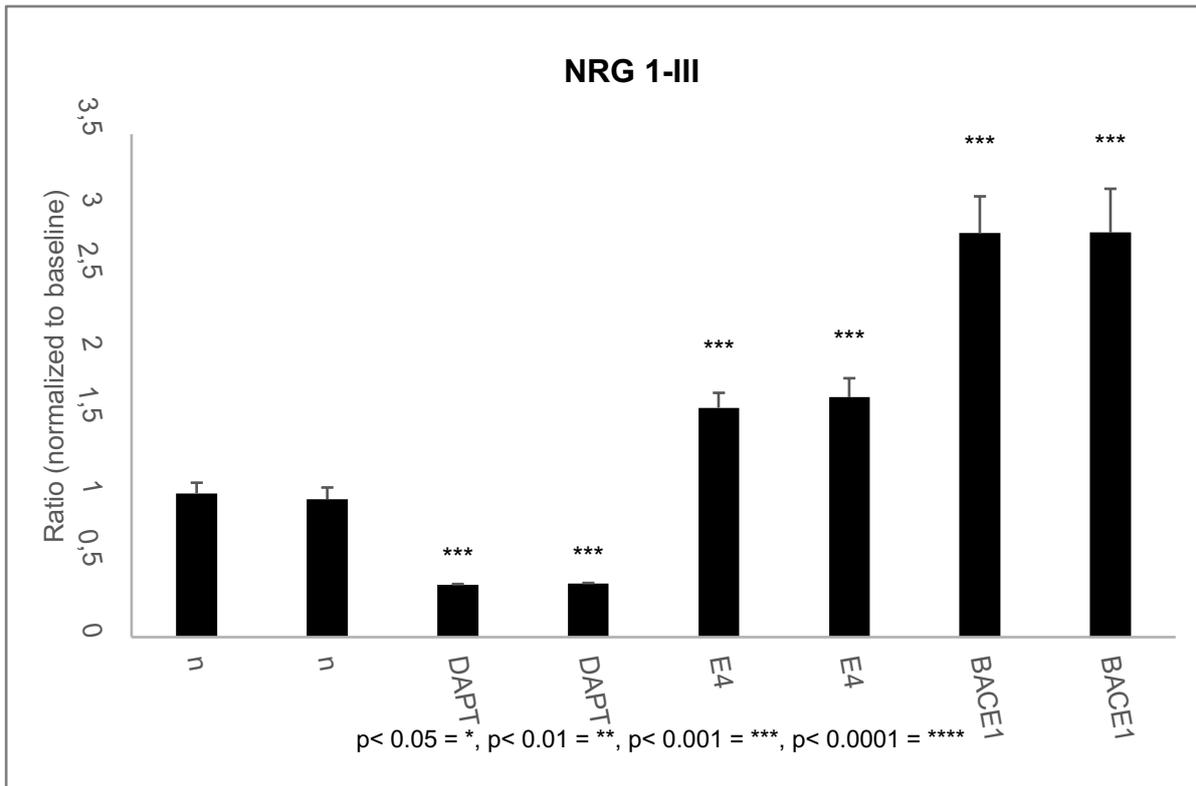
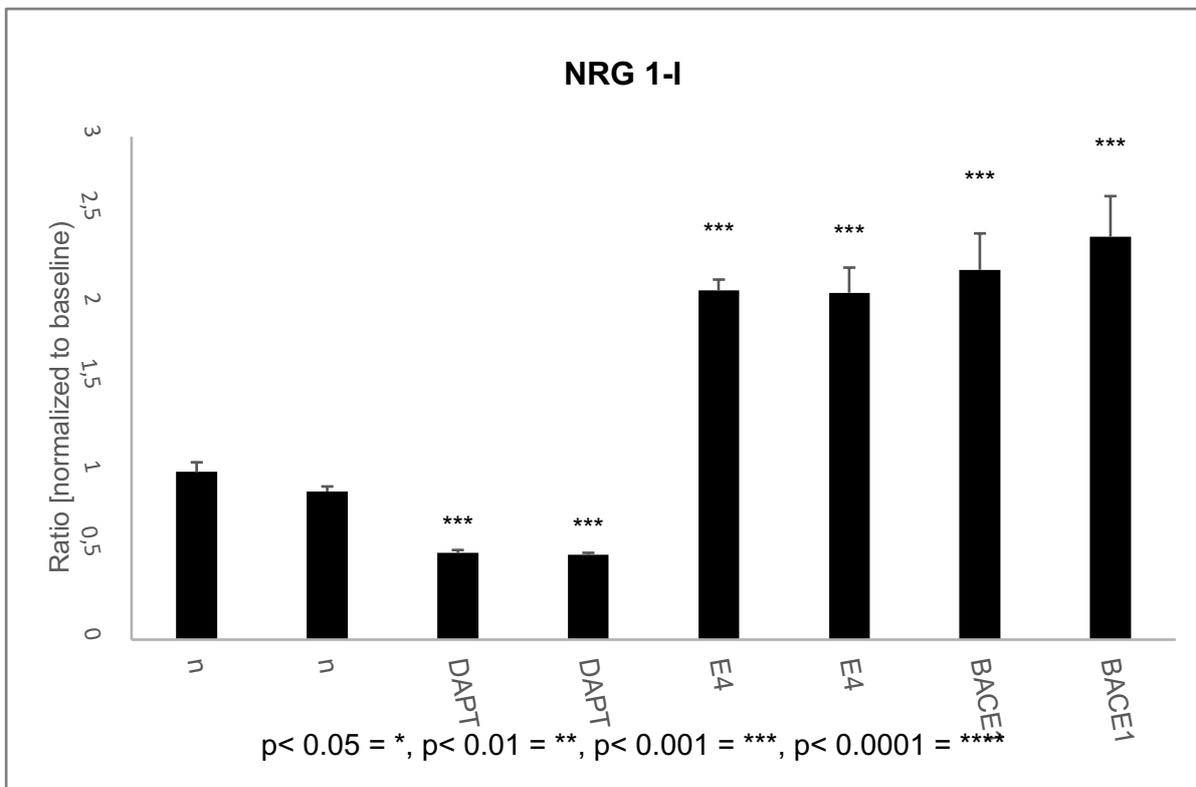
### **4.3 Firefly- und Renilla-Luciferase-Mikrotiterplatten-Assay**

#### **4.3.1 Negative und positive Kontrollen**

Die in der vorliegenden Arbeit realisierten Experimente schlossen drei Kontrollen ein. Die konkret zu diesen Zwecken verwendeten Substanzen waren der Gamma-Sekretase-Hemmer DAPT (negative Kontrolle) beziehungsweise ERBB4-F- oder BACE1-kodierende DNA ohne Zugabe von DAPT (positive Kontrollen). In Bezug auf NRG1-III zeigte sich, dass sowohl ERBB4-F als auch BACE1 zu einer Steigerung der Luciferaseaktivität führten. Im Vergleich zu den entsprechenden Baselinewerten fiel diese Steigerung im ersten Fall anderthalb und im zweiten Fall zweieinhalb aus. Im Gegensatz dazu reduzierte DAPT die Baseline-Luciferaseaktivität um das Zweieinhalb- bis Dreifache (Abbildung 6A).

Bei Verwendung von NRG1-I statt NRG1-III wurde ein prinzipiell ähnliches, jedoch weniger markantes Muster ersichtlich. Während die bei Baseline registrierte Luciferaseaktivität in Präsenz von DAPT um rund die Hälfte fiel, stieg sie unter beiden positiven Kontrollbedingungen um knapp das Zweifache. In diesem Zusammenhang zeichnete sich eine leichte Tendenz zu einer ausgeprägteren Wirkung von BACE1 im Vergleich zu ERBB4-F ab (Abbildung 6B).

In einem nächsten Schritt wurden auch der TNF-alpha-Proteasehemmer TAPI-1 sowie das Gastrokinetikum Mosaprid-Citrat, das Diuretikum Spironolacton und das Migränemedikament Zolmitriptan in die oben beschriebenen Tests aufgenommen. TAPI-1 erwies sich im Vergleich zu DAPT als weniger effizient, die Luciferaseaktivität zu senken. BACE1 zeigte erneut einen tendenziell stärker ausgeprägten aktivitätssteigernden Effekt als ERBB4-F. Mosaprid-Citrat und Zolmitriptan beeinflussten die Luciferaseaktivität nicht beziehungsweise bestenfalls tendenziell. Auffällig war, dass diese Tendenzen in beiden Fällen der jeweils vermuteten hemmenden beziehungsweise aktivierenden Wirkung diametral entgegenliefen. Spironolacton hingegen erwies sich als ein ähnlich effizienter Inhibitor der mit der Spaltung der ICD von NRG1-III assoziierten Luciferaseaktivität wie TAPI-1 (Abbildung 6C).

**A****B**

C

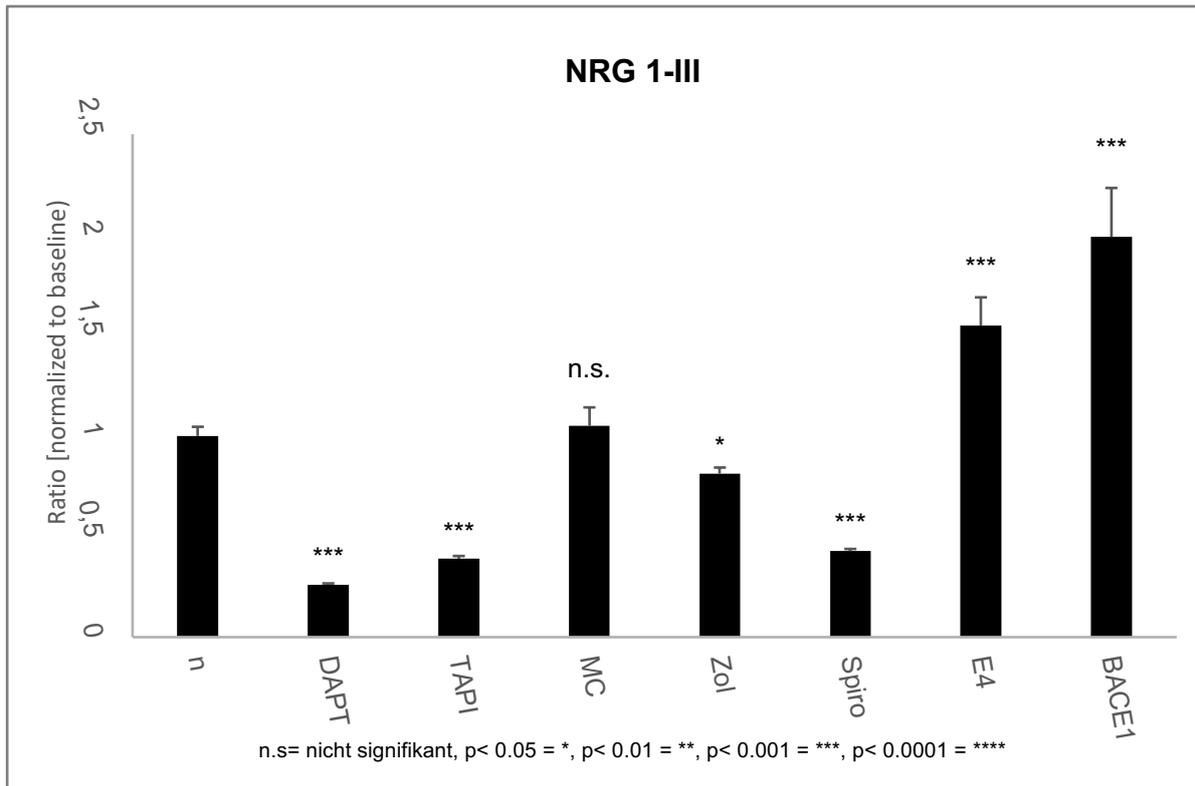


Abbildung 6: A) Mit der Spaltung der ICD von NRG1-III assoziierte Luciferaseaktivität bei Baseline- (n) sowie negativen (DAPT) und positiven (ERBB4-F [E4 ], BACE1) Kontrollbedingungen; B) mit der Spaltung der ICD von NRG1-I assoziierte Luciferaseaktivität bei Baseline- (N) sowie negativen (DAPT) und positiven (ERBB4-F [E4 ], BACE1) Kontrollbedingungen; C) mit der Spaltung der ICD von NRG1-III assoziierte Luciferaseaktivität bei Baseline- (N), negativen (DAPT [DAPT], TAPI-1 [TAPI]) und positiven (ERBB4-F [E4 ], BACE1 [BACE1]) Kontrollbedingungen sowie in Präsenz der Substanzen Mosaprid-Citrat-(MC), Spironolacton (SPIRO) und Zolmitriptan (ZOL)

Quelle: Eigene Darstellung

#### 4.3.2 Konzentrations-Wirkungs-Kurven

In Anbetracht der Tatsache, dass sich DAPT als der effizienteste Inhibitor der Spaltung der ICD von NRG1-III erwiesen hatte, sollte eine entsprechende Konzentrations-Wirkungs-Kurve erstellt und die im Kontext der negativen Kontrollbedingungen optimale Konzentration ermittelt werden. Bereits die Konzentration von 0,03  $\mu\text{M}$  schien die mit der Spaltung von NRG1-ICD assoziierte Luciferaseaktivität zu reduzieren. Ab die Konzentration von 0,3  $\mu\text{M}$  war diese Wirkung unbestreitbar, da die bei Baseline gemessenem Wert auf 62 % fiel. Einen quantitativ ähnlichen Hemmeffekt lösten 1  $\mu\text{M}$  und 3  $\mu\text{M}$  DAPT aus. Die jeweils bestimmte Aktivität lag im Vergleich zu Baseline bei 61 % beziehungsweise 57 %. Eine Steigerung der Konzentration auf 10  $\mu\text{M}$  und 30  $\mu\text{M}$  verursachte eine weitere Reduzierung der Baseline-Luciferaseaktivität auf 42 % beziehungsweise 38 % (Abbildung 7AB).

Auch die Evaluierung der eigentlichen Testsubstanzen basierte auf dem oben beschriebenen Prinzip. Im Fall von Amitriptylin ergaben sich erste Hinweise auf eine eventuelle Hemmung der Luciferaseaktivität ab einer Konzentration von 10  $\mu\text{M}$ . Bei Verdrei- beziehungsweise Verzehnfachung dieser Konzentration zeigte sich eine deutlich reduzierte Aktivität, die 51 % beziehungsweise 16 % der bei Baseline gemessenen Werte entsprach (Abbildung 7CD).

Cyproheptadin wirkte sich nur in Konzentrationen von 30  $\mu\text{M}$  und 100  $\mu\text{M}$  negativ auf die Baseline-Luciferaseaktivität aus, die auf 54 % beziehungsweise 31 % fiel (Abbildung 7EF).

Eine potentiell hemmende Wirkung von Ifenprodil auf die mit der Spaltung von NRG1-ICD assoziierte Luciferaseaktivität zeichnete sich zuerst bei einer Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  ab. Eindeutig sichtbar wurden diese Effekte jedoch erst bei 30  $\mu\text{M}$  und vor allem 100  $\mu\text{M}$ . Im ersten Fall ging die Aktivität auf rund die Hälfte (50 % im Vergleich zu Baseline) zurück, im zweiten Fall deutlich stärker gehemmt (16 % im Vergleich zu Baseline) (Abbildung 7GH).

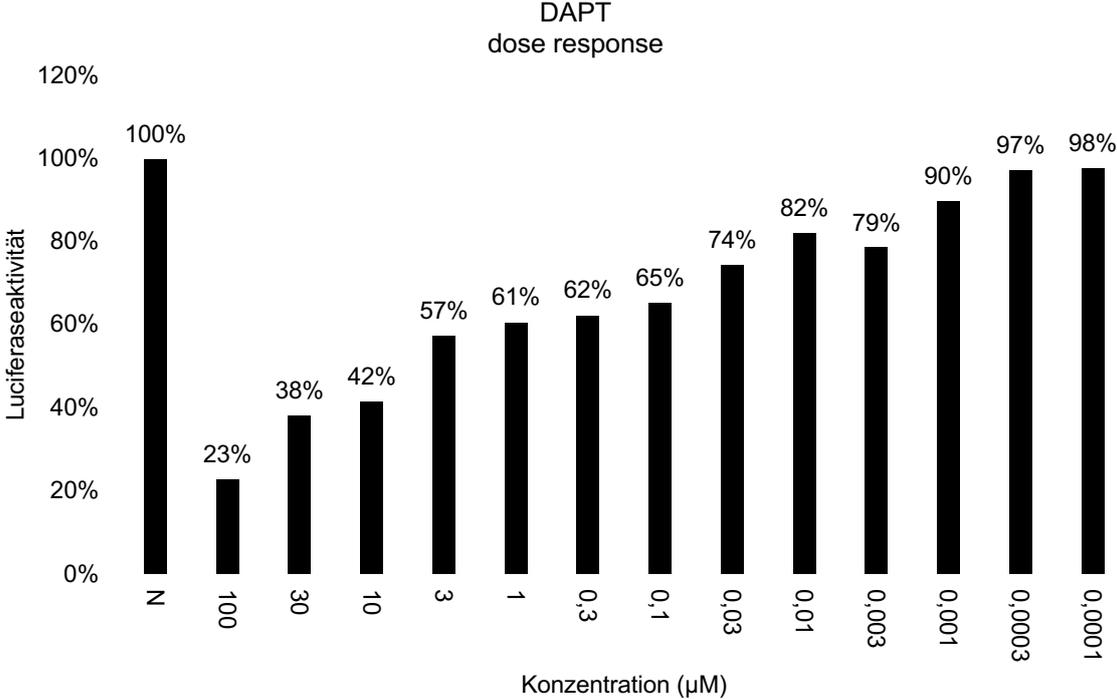
Auch 100  $\mu\text{M}$  Perphenazin reduzierten die Luciferaseaktivität stark auf 10 % der unter Baselinebedingungen registrierten Werte. Eine Konzentration von 30  $\mu\text{M}$  hatte hingegen eine wesentlich geringere Hemmwirkung. Im Vergleich zu Baseline betrug die entsprechende Aktivität 65 % (Abbildung 7IJ).

Als einzige der getesteten Substanzen präsentierte Spironolacton schon ab einer Konzentration von 3  $\mu\text{M}$  einen potentiellen Effekt auf die mit der Spaltung von NRG1-ICD assoziierte Luciferaseaktivität. Bei Verwendung von 10  $\mu\text{M}$ , 30  $\mu\text{M}$  und 100  $\mu\text{M}$  Spironolacton manifestierte sich diese Wirkung in signifikanter Weise und führte zu Werten die 37 %, 20 % beziehungsweise 8 % der Baselineaktivität entsprachen (Abbildung 7KL).

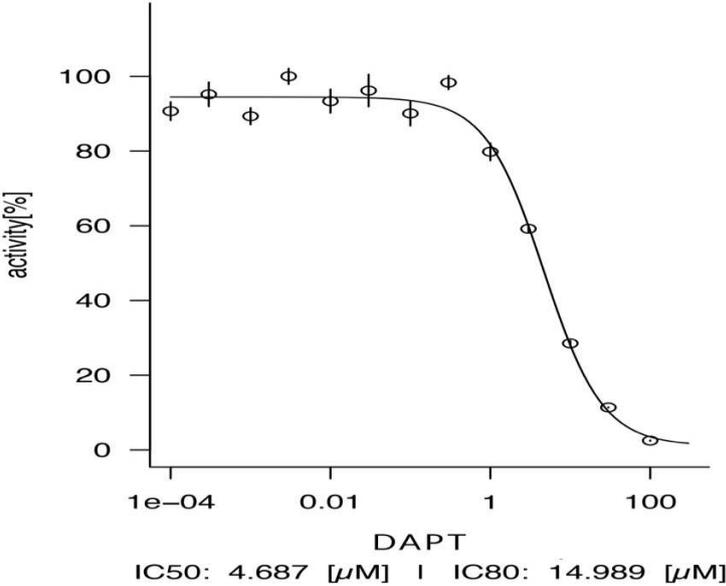
Entgegen der ursprünglichen Hypothese übte Citalopram keinen aktivierenden, sondern vielmehr einen hemmenden Einfluss auf die Spaltung von NRG1-ICD aus. Entsprechende Effekte wurden bei Konzentrationen von 30  $\mu\text{M}$  und 100  $\mu\text{M}$  ersichtlich, waren im Vergleich zu den zuvor beschriebenen, sämtlich den Inhibitoren der Spaltung von NRG1-ICD zugeordneten Substanzen jedoch schwächer ausgeprägt. Folgerichtig gingen zwei genannten Konzentration mit Werten einher, die 76 % beziehungsweise 54 % der unter Baselinebedingungen bestimmten Luciferaseaktivität entsprachen (Abbildung 7M).

Im Gegensatz dazu wirkte sich Nitrendipin nicht oder bestenfalls marginal aktivierend auf die Luciferaseaktivität aus. Eine Konzentration von 30  $\mu\text{M}$  hatte eventuell einen entsprechenden schwach ausgeprägten Effekt, der sich jedoch durch eine weitere Erhöhung der Nitrendipinkonzentration nicht weiter steigern ließ (Abbildung 7N).

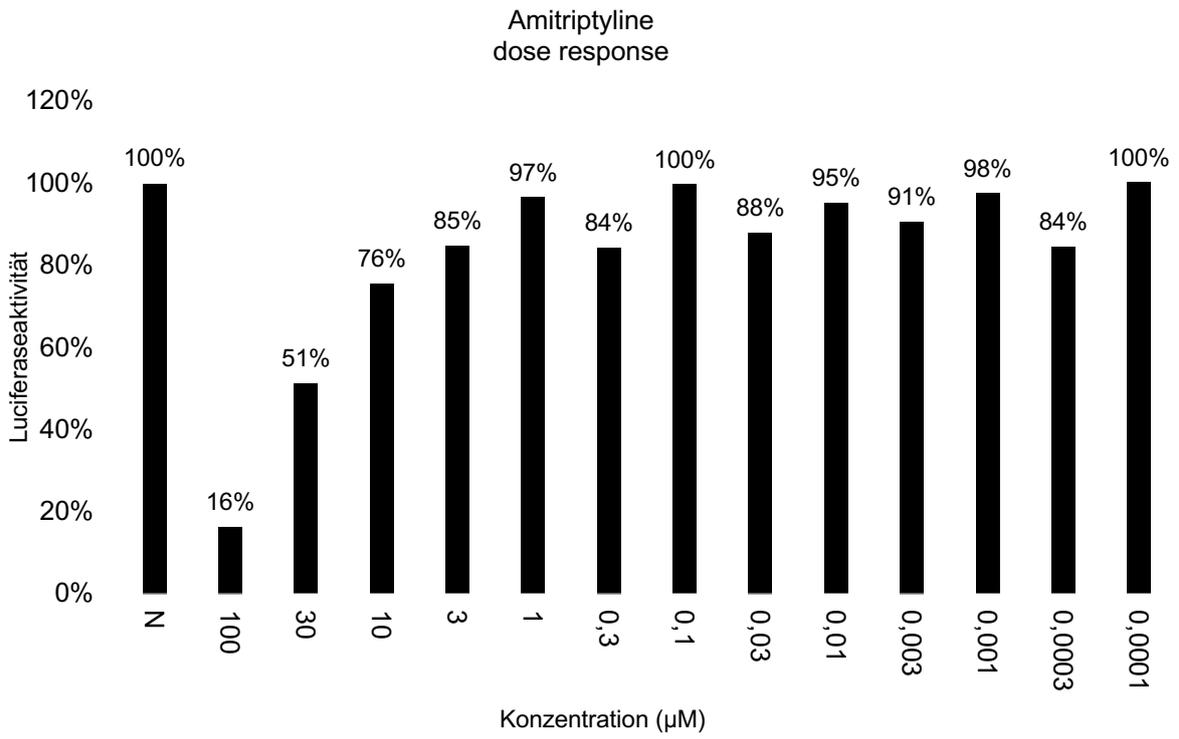
**A**



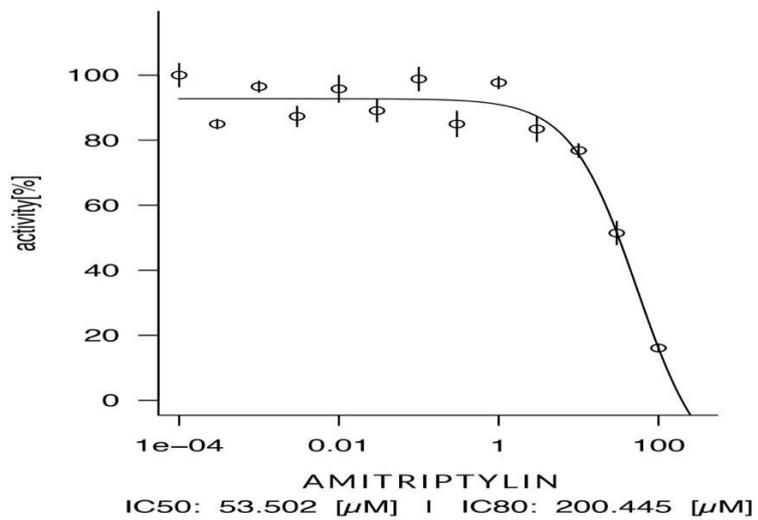
**B**



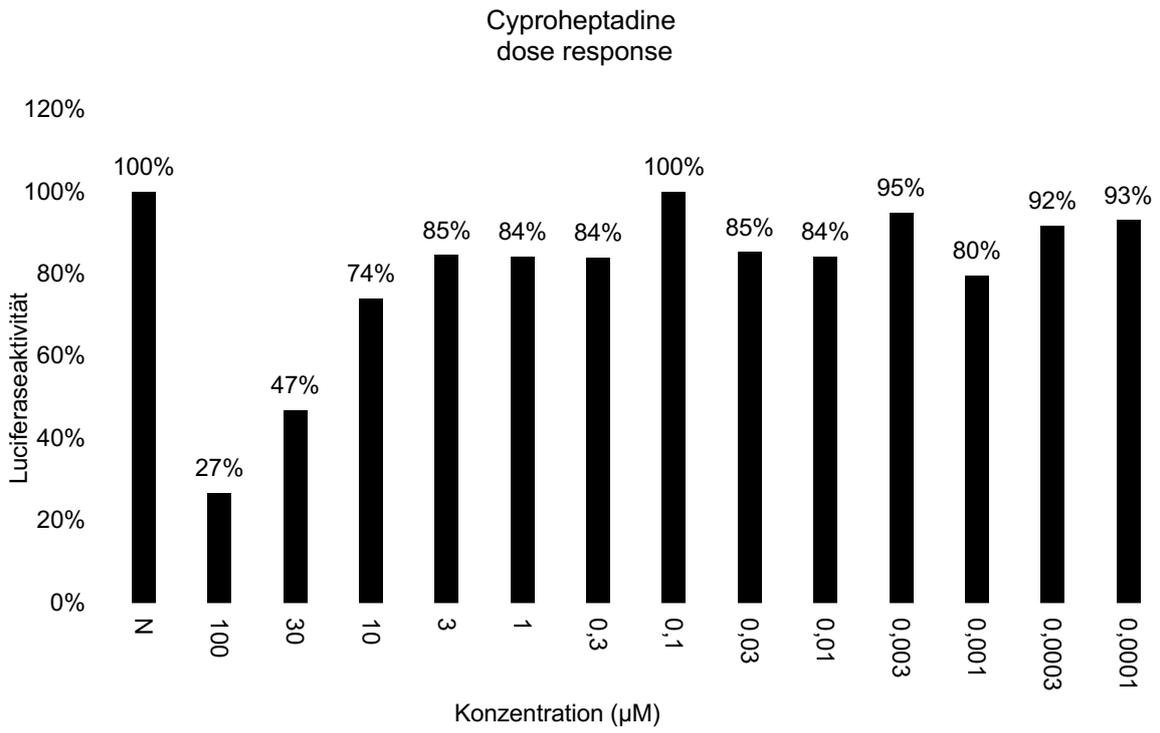
C



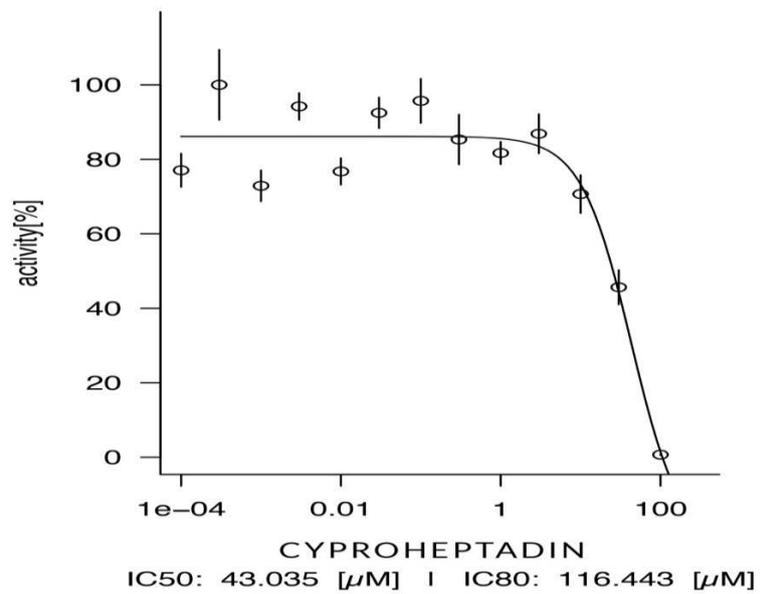
D



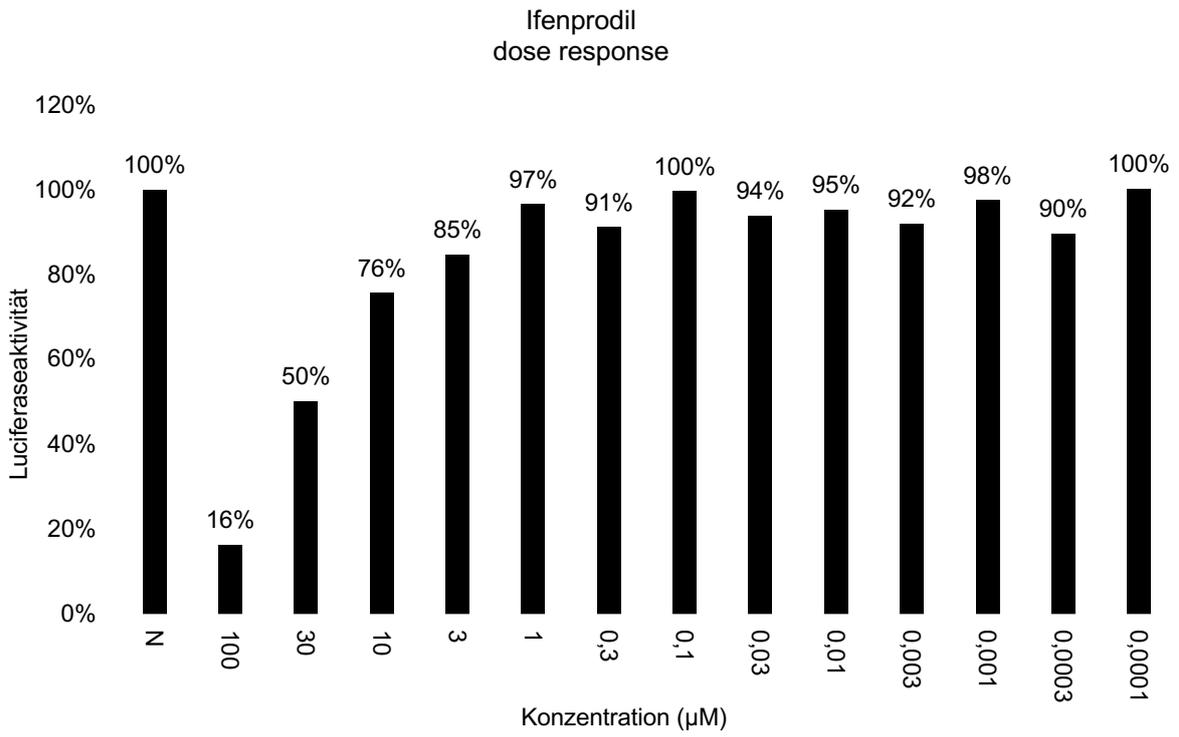
E



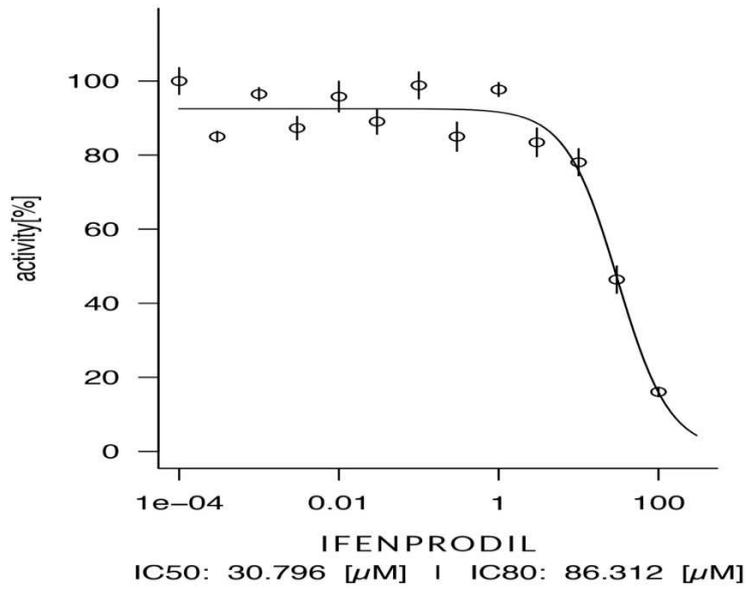
F



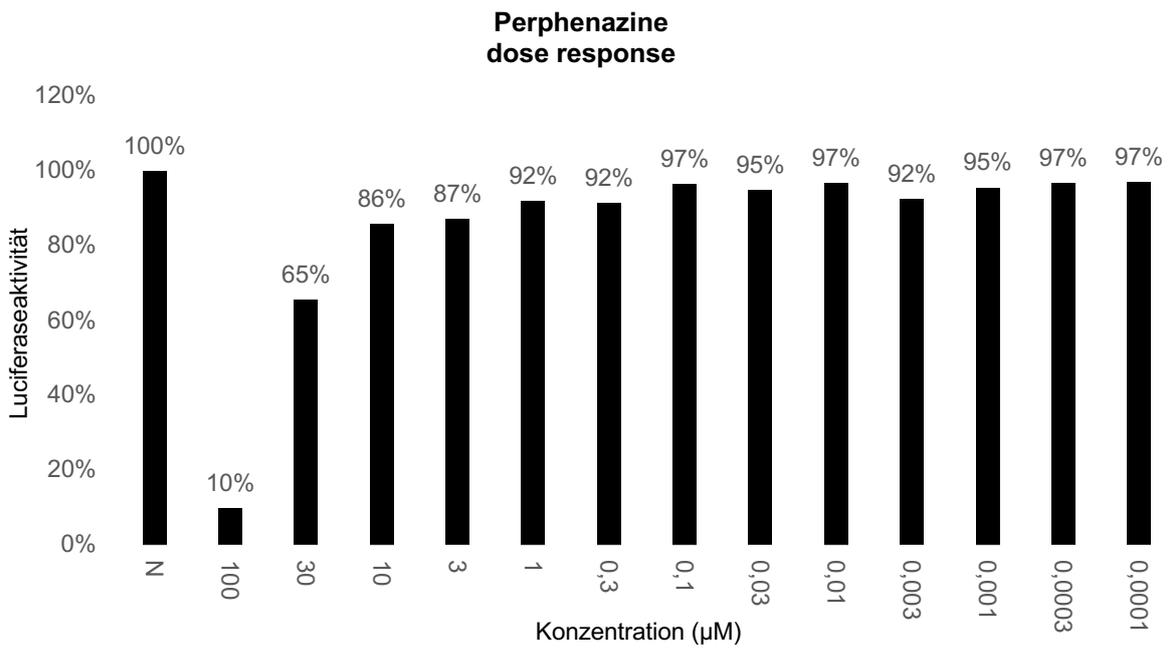
G



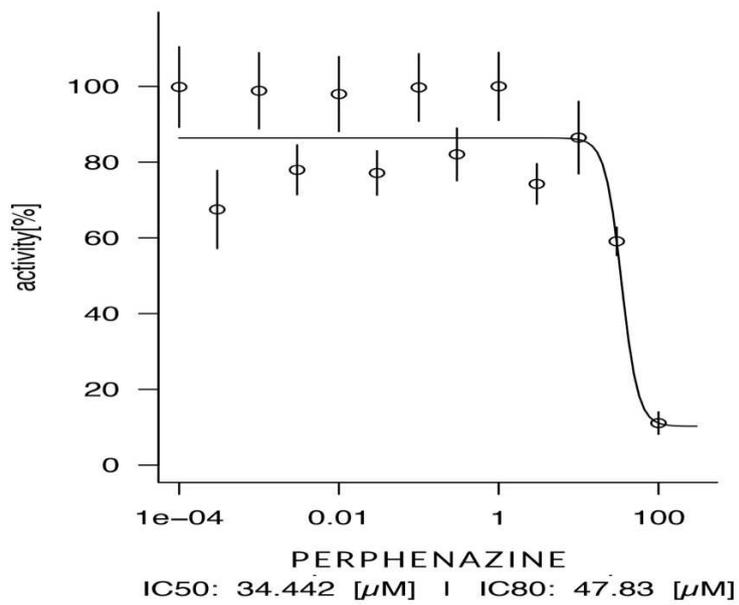
H



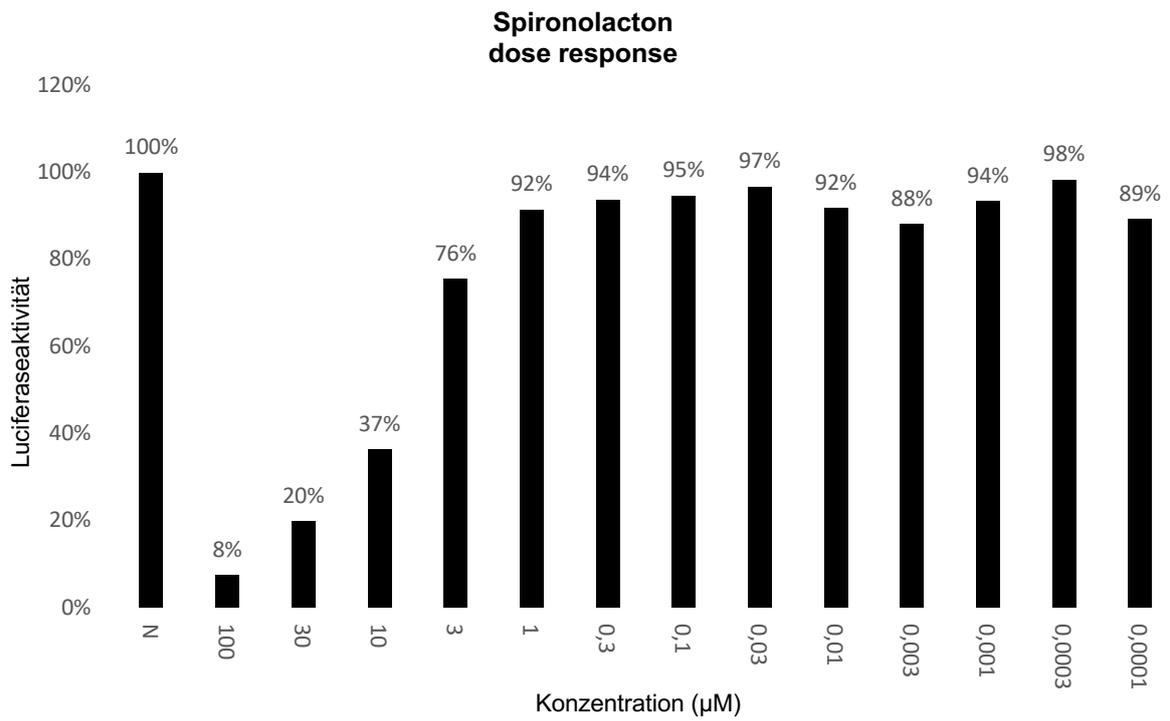
I



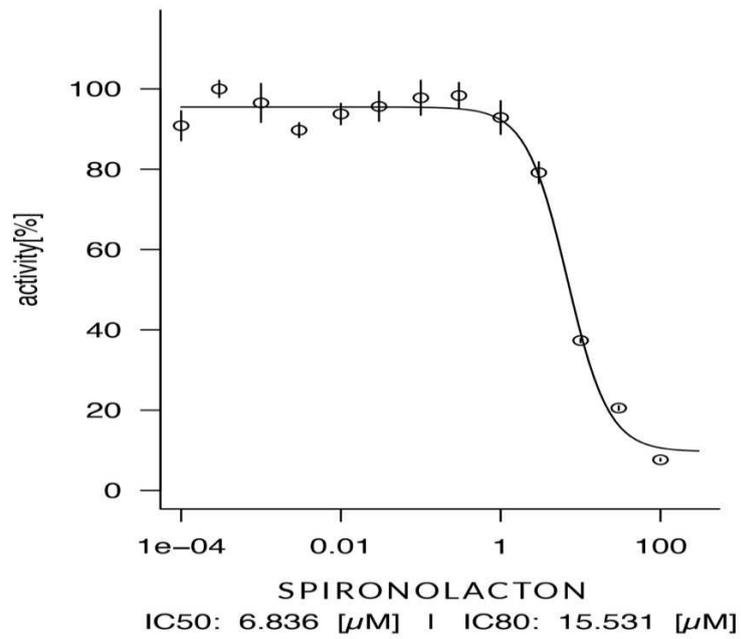
J



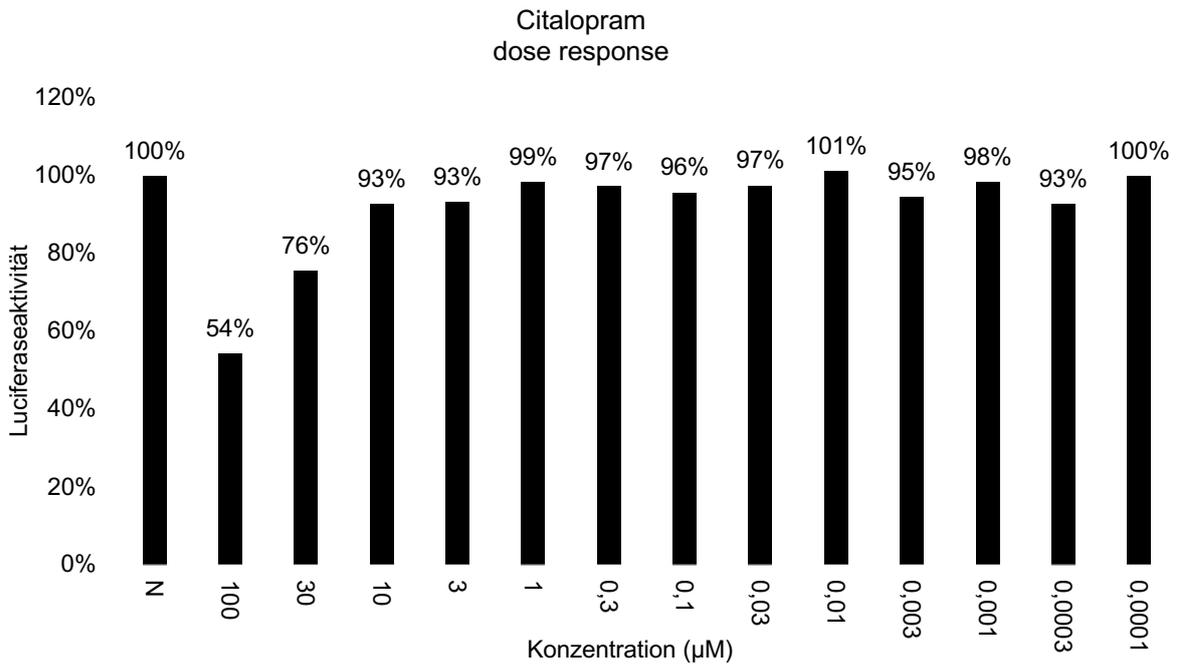
K



L



M



N

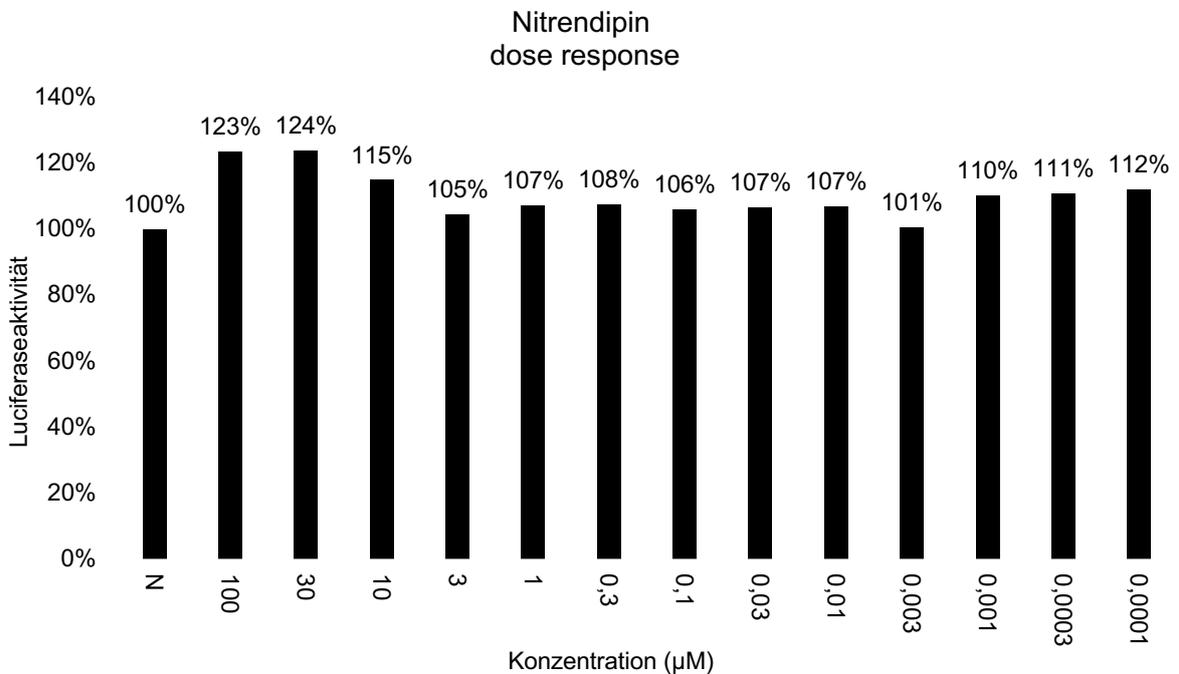


Abbildung 7: Balkendiagramme und Konzentrations-Wirkungs-Kurven hinsichtlich des Effekts von AB) DAPT, CD) Amitriptylin, EF) Cyproheptadin, GH) Ifenprodil, IJ) Perphenazin, KL) Spironolacton, M) Citalopram und N) Nitrendipin auf die mit der Spaltung der ICD von NRG1-III assoziierte Luciferaseaktivität (N= Baselinewert).

Quelle: Eigene Darstellung

## 4.4 Synergistische Effekte

### 4.4.1 Konzentrations-Wirkungs-Kurven

Da Ifenprodil und Spironolacton unter allen getesteten Substanzen die am stärksten ausgeprägte Hemmwirkung auf die Spaltung von NRG1-ICD gezeigt hatten, sollte eine Kombination beider Stoffe auf potentielle synergistische Effekte untersucht werden. Hierfür wurden Spironolacton und Ifenprodil im Verhältnis 1:1, 1:2 und 1:3 vermischt und die resultierenden Gemische den im vorangegangenen Unterkapitel erläuterten Experimenten unterzogen. Als Kontrolle dienen DAPT (10  $\mu\text{M}$ ) und Canrenon (10 $\mu\text{M}$ ), ein aktiver Metabolit von Spironolacton.

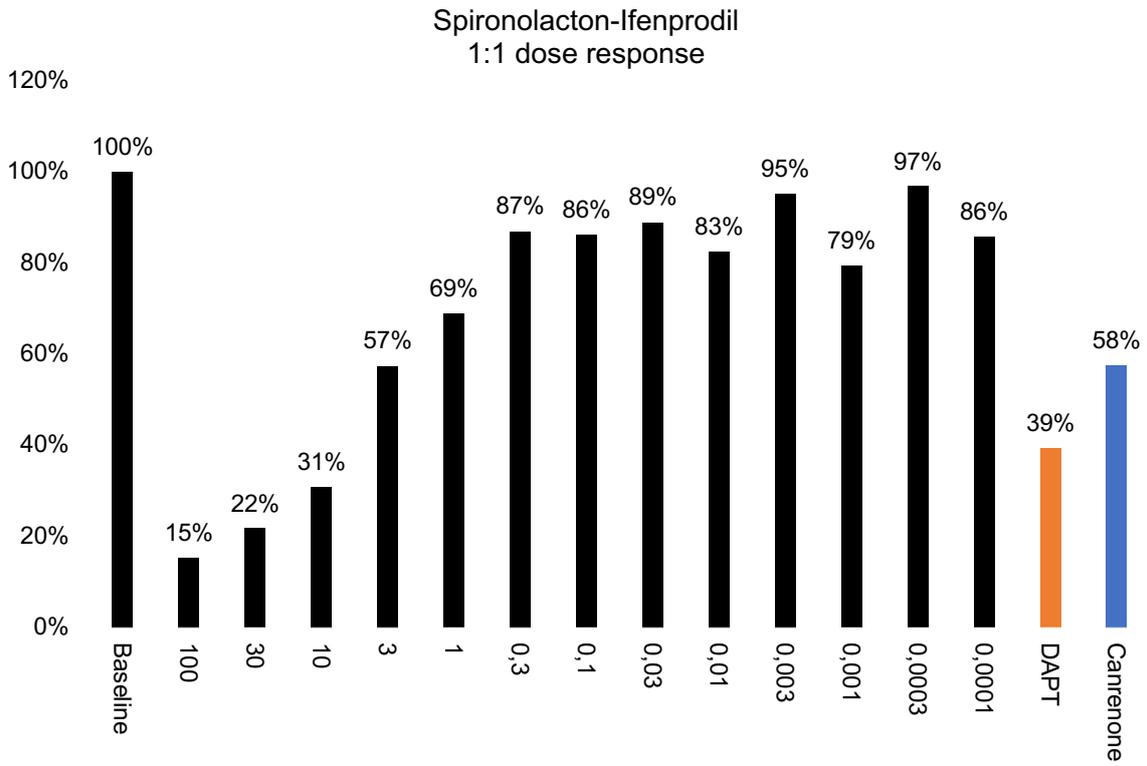
Vorausgehend ist anzumerken, dass zwar alle drei Medikamentenkombinationen in jeweils 13 verschiedenen Konzentrationen evaluiert wurden, jedoch erst ab 0,3  $\mu\text{M}$  Spironolacton und 0,9  $\mu\text{M}$  Ifenprodil durchgehend konzentrationsabhängige Wirkungsmuster beobachtet wurden. Die Verwendung kleinerer Konzentrationen führte zu teilweise oszillierenden und widersprüchlichen Resultaten (Abbildung 8), die mit der gebotenen Vorsicht zu interpretieren sind.

Ein Mischungsverhältnis von 1:1 wurde mit einer Luciferaseaktivität assoziiert, die je nach Konzentration bei 87 % (0,3  $\mu\text{M}$  + 0,3  $\mu\text{M}$ ), 69 % (1  $\mu\text{M}$  + 1  $\mu\text{M}$ ), 57 % (3  $\mu\text{M}$  + 3  $\mu\text{M}$ ), 31 % (10  $\mu\text{M}$  + 10  $\mu\text{M}$ ), 22 % (30  $\mu\text{M}$  + 30  $\mu\text{M}$ ) oder 15 % (100  $\mu\text{M}$  + 100  $\mu\text{M}$ ) des entsprechenden Baselinewerts lag (Abbildung 8A).

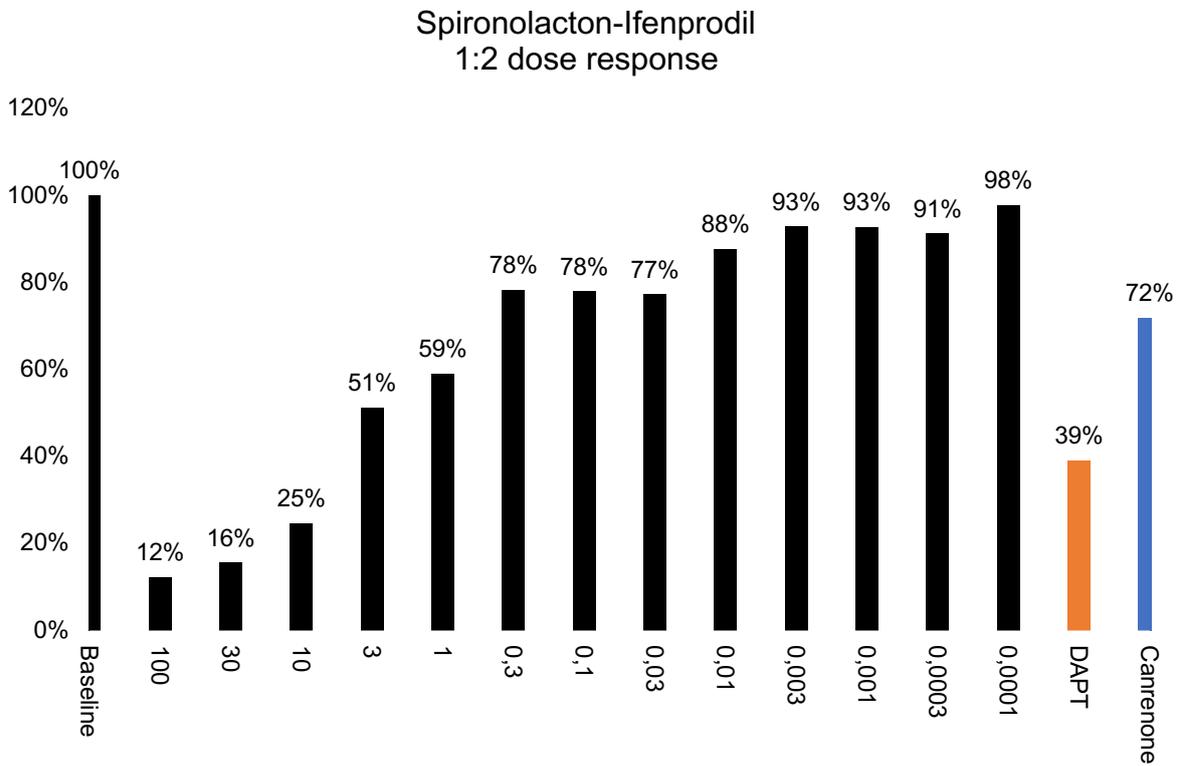
Die aus einem Teil Spironolacton und zwei Teilen Ifenprodil bestehende Kombination hemmte die Spaltung von NRG1-ICD in geringerem Maße. Die Baseline-Luciferaseaktivität wurde unter Verwendung derselben Konzentrationen auf 78 % (0,3  $\mu\text{M}$  + 0,9  $\mu\text{M}$ ), 59 % (1  $\mu\text{M}$  + 3  $\mu\text{M}$ ), 51 % (3  $\mu\text{M}$  + 9  $\mu\text{M}$ ), 25 % (10  $\mu\text{M}$  + 30  $\mu\text{M}$ ), 16 % (30  $\mu\text{M}$  + 90  $\mu\text{M}$ ) beziehungsweise 12 % (100  $\mu\text{M}$  + 300  $\mu\text{M}$ ) verringert (Abbildung 8B).

Die Hemmwirkung des Gemischs, das dreimal so viel Ifenprodil wie Spironolacton enthielt, erwies sich wiederum als weitgehend deckungsgleich mit den Effekten, die im Fall der ausgeglichenen Medikamentenkombination beobachtet worden waren. Die konkret ermittelten Werte betragen 76 % (0,3  $\mu\text{M}$  + 0,9  $\mu\text{M}$ ), 59 % (1  $\mu\text{M}$  + 3  $\mu\text{M}$ ), 47 % (3  $\mu\text{M}$  + 9  $\mu\text{M}$ ), 32 % (10  $\mu\text{M}$  + 30  $\mu\text{M}$ ), 22 % (30  $\mu\text{M}$  + 90  $\mu\text{M}$ ) sowie 13 % (100  $\mu\text{M}$  + 300  $\mu\text{M}$ ) der unter Baselinebedingungen bestimmten Luciferaseaktivität (Abbildung 8C).

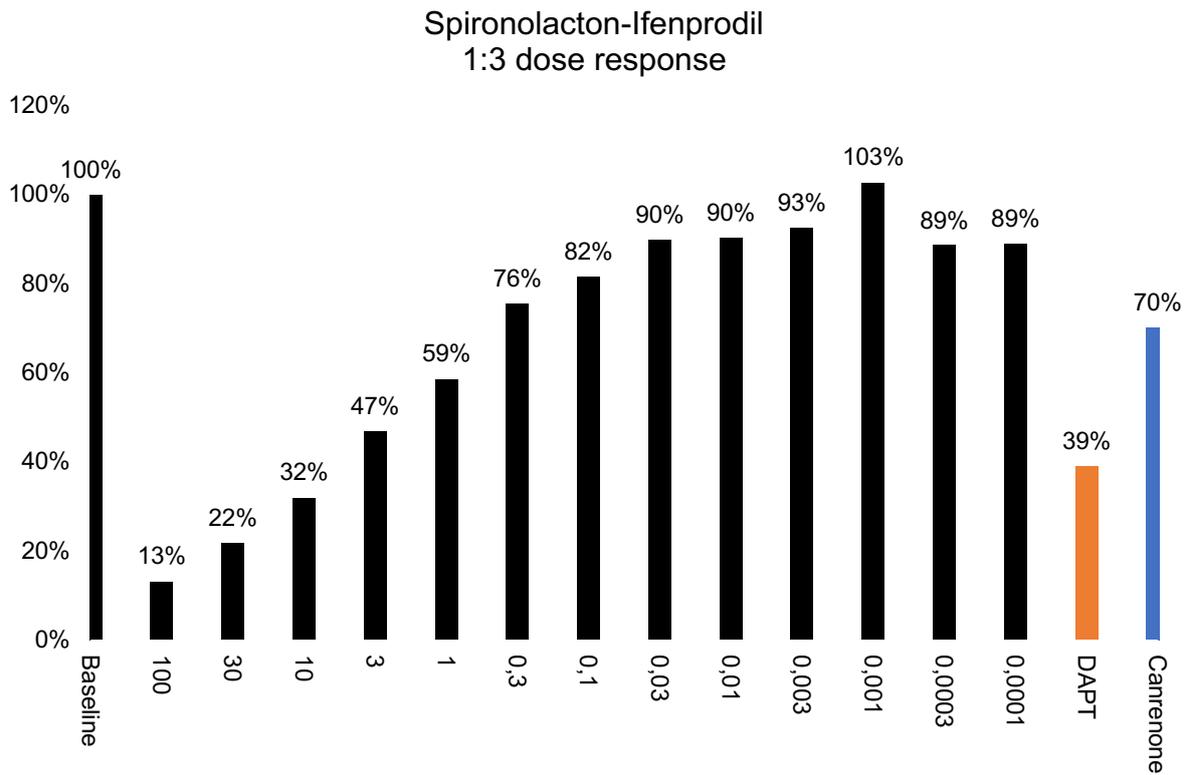
**A**



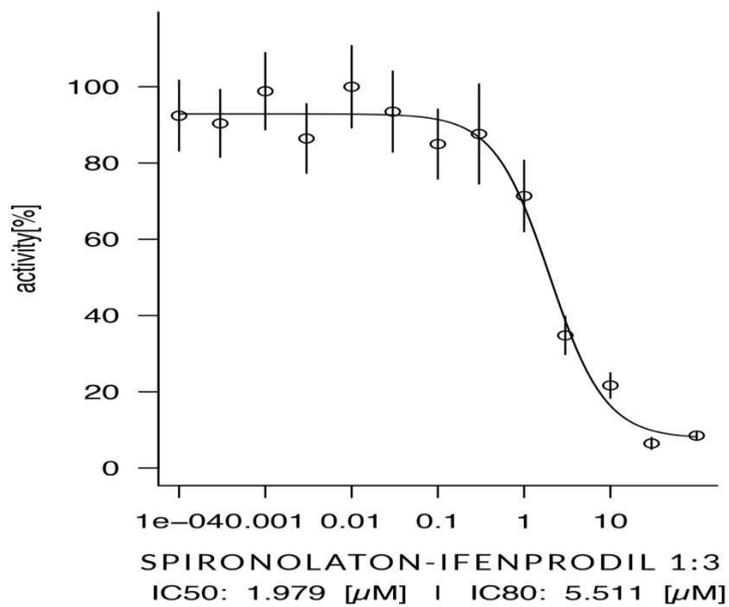
**B**



C



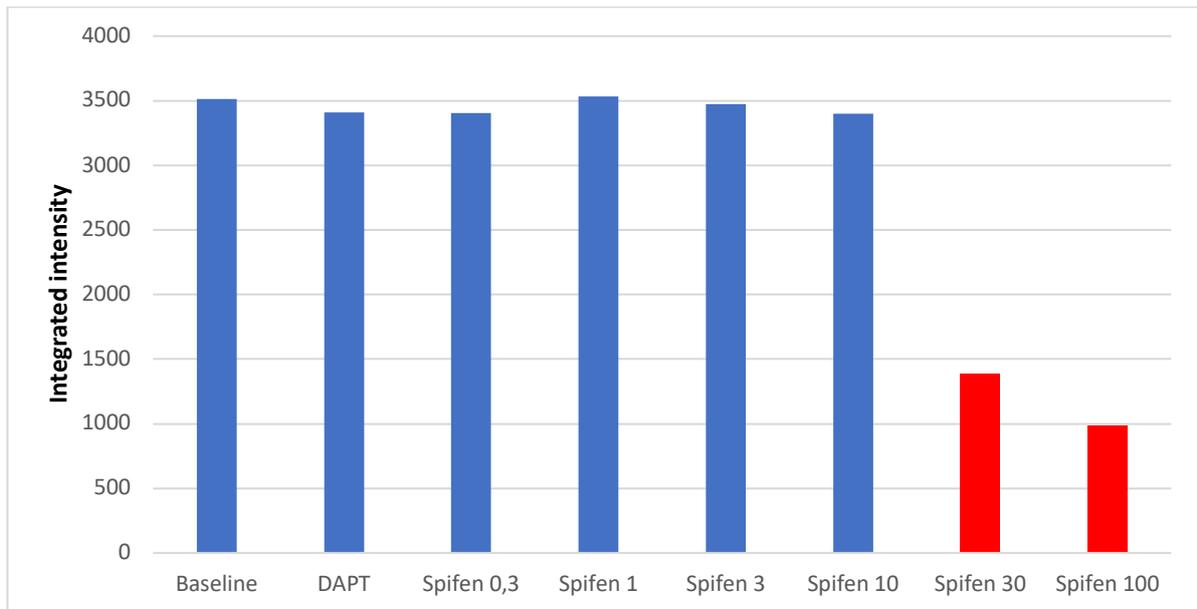
D



**Abbildung 8: Synergistischer Effekt einer Spirolacton-Ifenprodil-Kombination im Verhältnis A) 1:1, B) 1:2 und CD) 1:3 auf die mit der Spaltung der ICD von NRG1-III assoziierte Luciferaseaktivität.**

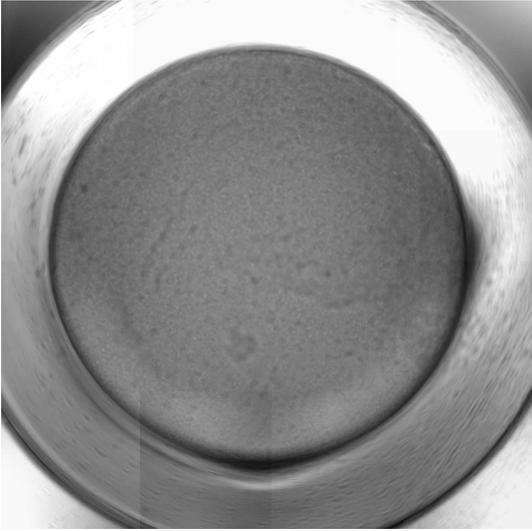
#### 4.4.2 Zytotoxizitätstest

Die Spironolacton-Ifenprodil-Kombination im Verhältnis 1:3 wurde auf Basis der Bildzytometrie auf ihre Zytotoxizität geprüft. Hierbei zeigte sich spätestens ab einer Konzentration von 30  $\mu\text{M}$  Spironolacton und 90  $\mu\text{M}$  Ifenprodil erheblich toxische Effekte, wie die Abbildungen 9 und 10 auf quantitative beziehungsweise repräsentativ-qualitative Weise belegen.



**Abbildung 9: Quantitative Auswertung der Zytotoxizität von verschiedenen Konzentrationen einer Spironolacton-Ifenprodil-Kombination im Verhältnis 1:3 (Spifen 0,3 = 0,3  $\mu\text{M}$  Spironolacton + 0,9  $\mu\text{M}$  Ifenprodil; Spifen 1 = 1  $\mu\text{M}$  Spironolacton + 3  $\mu\text{M}$  Ifenprodil; Spifen 3 = 3  $\mu\text{M}$  Spironolacton + 9  $\mu\text{M}$  Ifenprodil; Spifen 10 = 10  $\mu\text{M}$  + 30  $\mu\text{M}$  Ifenprodil; Spifen 30 = 30  $\mu\text{M}$  Spironolacton + 90  $\mu\text{M}$  Ifenprodil; Spifen 100 = 100  $\mu\text{M}$  Spironolacton + 300  $\mu\text{M}$  Ifenprodil; niedrigere Werte auf der y-Achse gehen mit einer höheren Toxizität einher).**

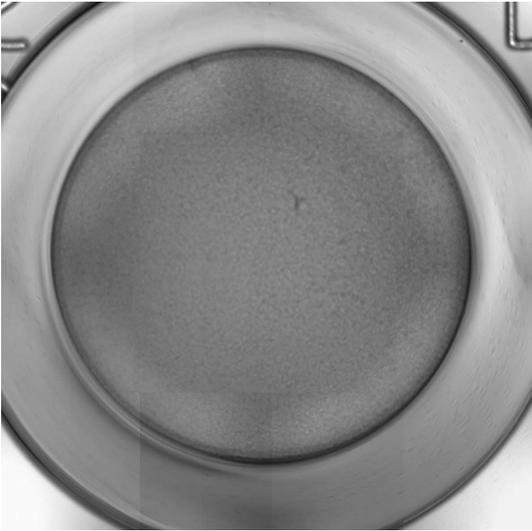
**A**



**B**



**C**



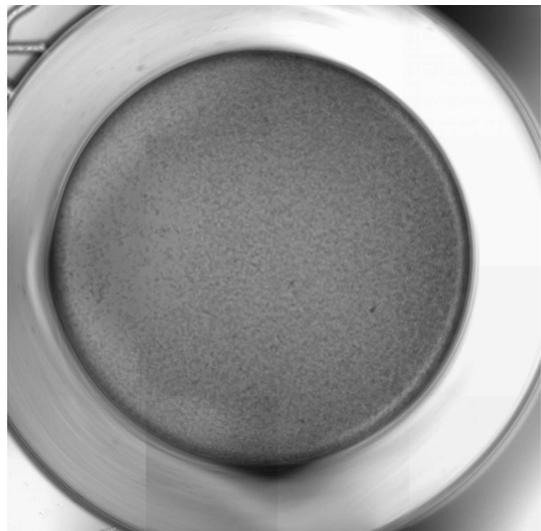
**D**

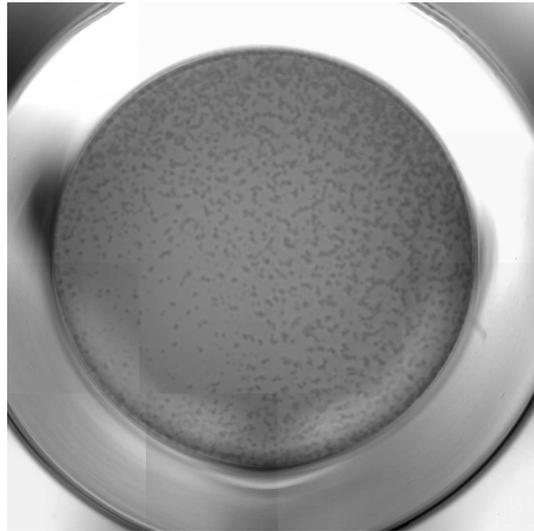


**E**



**F**

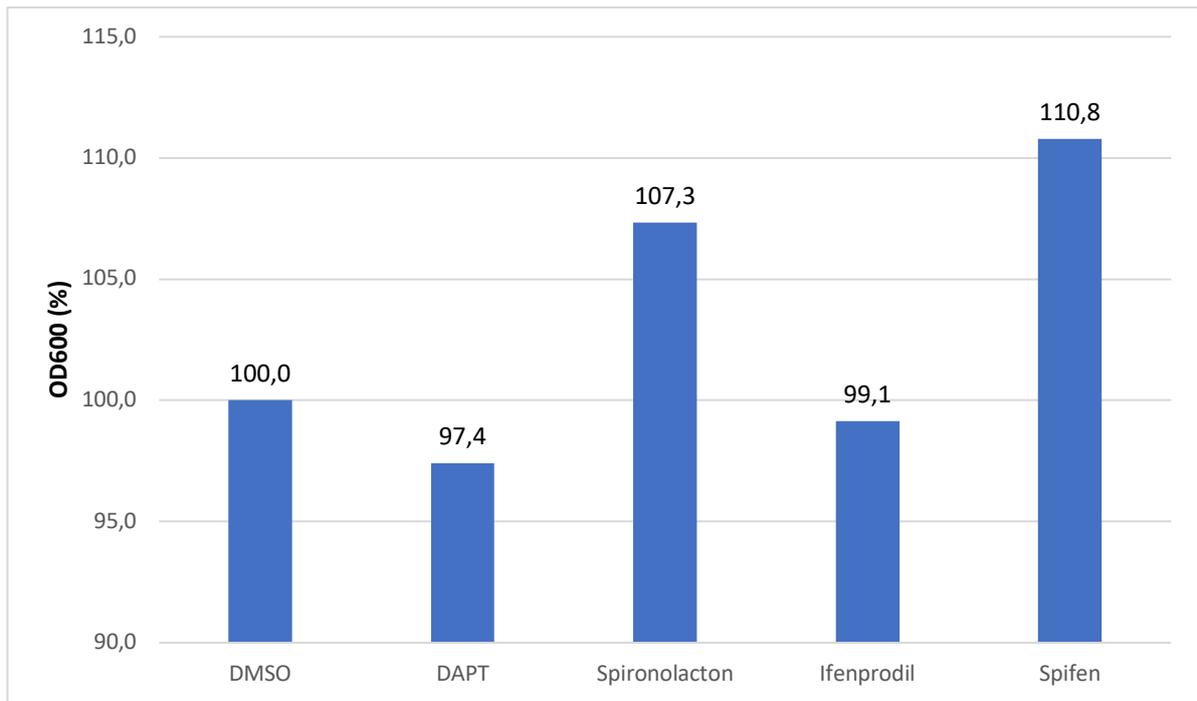


**G****H**

**Abbildung 10: Repräsentativ-qualitative Auswertung der Zytotoxizität von verschiedenen Konzentrationen einer Spironolacton-Ifenprodil-Kombination im Verhältnis 1:3 (A) Baseline; B) DAPT; C) Spifen 0,3 = 0,3  $\mu\text{M}$  Spironolacton + 0,9  $\mu\text{M}$  Ifenprodil; D) Spifen 1 = 1  $\mu\text{M}$  Spironolacton + 3  $\mu\text{M}$  Ifenprodil; E) Spifen 3 = 3  $\mu\text{M}$  Spironolacton + 9  $\mu\text{M}$  Ifenprodil; F) Spifen 10 = 10  $\mu\text{M}$  Spironolacton + 30  $\mu\text{M}$  Ifenprodil; G) Spifen 30 = 30  $\mu\text{M}$  Spironolacton + 90  $\mu\text{M}$  Ifenprodil; H) Spifen 100 = 100  $\mu\text{M}$  Spironolacton + 300  $\mu\text{M}$  Ifenprodil).**

#### **4.4.3 Quantifizierung von Proteinen sowie des C-Terminus von Neuregulin-1 Typ III**

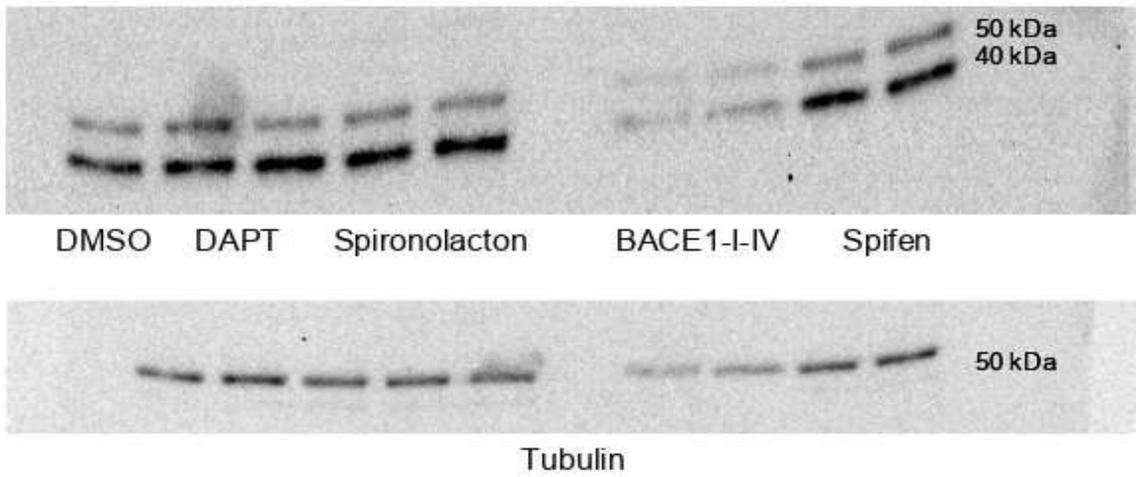
In Vorbereitung auf die Western-Blot-Analyse wurden die in den Lysaten der PC12--Zellsuspensionen präsenten Proteinkonzentrationen bestimmt. Es wurden keine offensichtlichen Unterschiede zwischen den einzelnen Behandlungen gefunden. Eventuell hatte der Einsatz von sowohl 10  $\mu\text{M}$  als auch 30  $\mu\text{M}$  Spironolacton zu einer Erhöhung der entsprechenden Baselinewerte geführt. Der Effekt war allerdings relativ klein und könnte daher Zufallsschwankungen geschuldet gewesen sein (Abbildung 11).



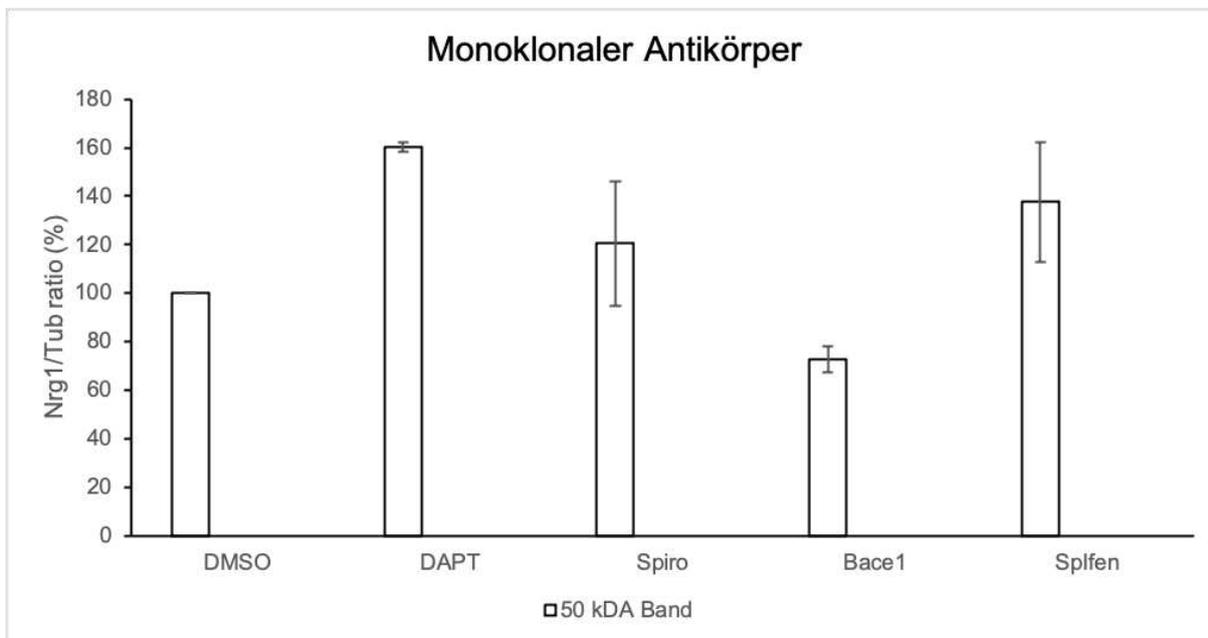
**Abbildung 11: Quantifizierung der in den Lysaten vorkommenden Proteinkonzentration mittels Bradford-Test bei Baseline- (DMSO) und negativen (DAPT) Kontrollbedingungen sowie in Präsenz von Spironolacton, Ifenprodil und einer Kombination der beiden letzten Substanzen (Spifen)**

Die Identifizierung der mittels Western Blot separierten Proteine beziehungsweise Peptide fand auf Grundlage von Fleck et al. (2016) statt. In diesem Sinne entsprachen Bande von 140 kDa dem kompletten NRG1-III-Molekül, während der C-Terminus dieses Proteins mit Banden von 50 kDa assoziiert wurden. Sowohl unter Verwendung mono- als auch polyklonaler Antikörper zeigte sich, dass DAPT und Spironolacton alleine beziehungsweise in Kombination mit Ifenprodil die Akkumulation des C-Terminus in erheblichem Maß gefördert hatten. Im Umkehrschluss konnte nachgewiesen werden, dass der BACE1-Inhibitor IV die Ansammlung des C-Terminus stark reduziert und die Akkumulation des kompletten NRG1-III-Moleküls bedeutsam gesteigert hatte (Abbildung 12).

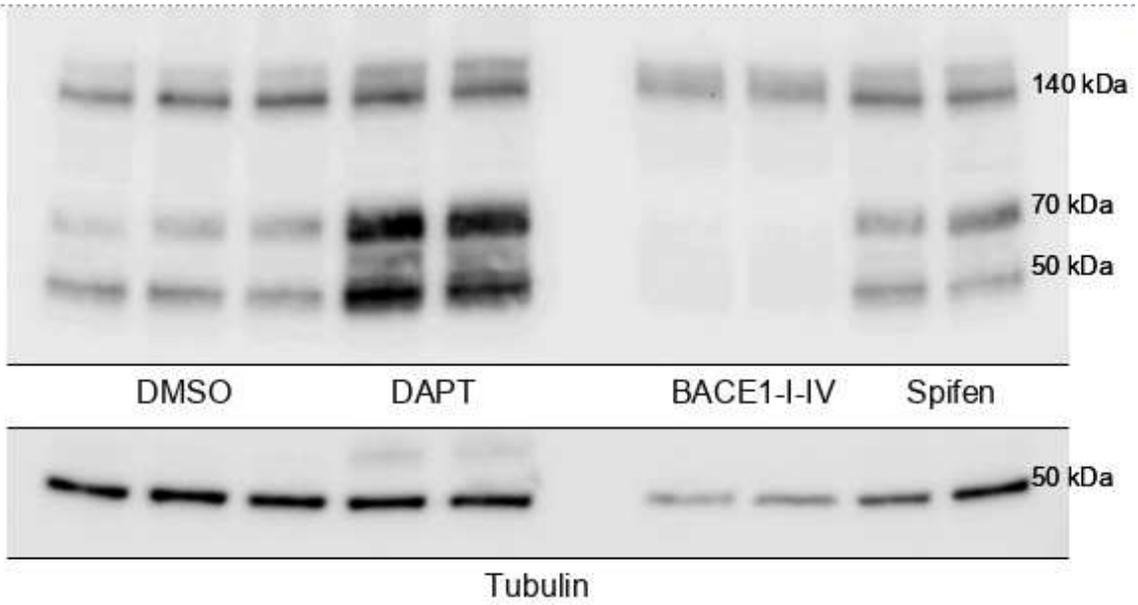
**A**



**B**



C



D

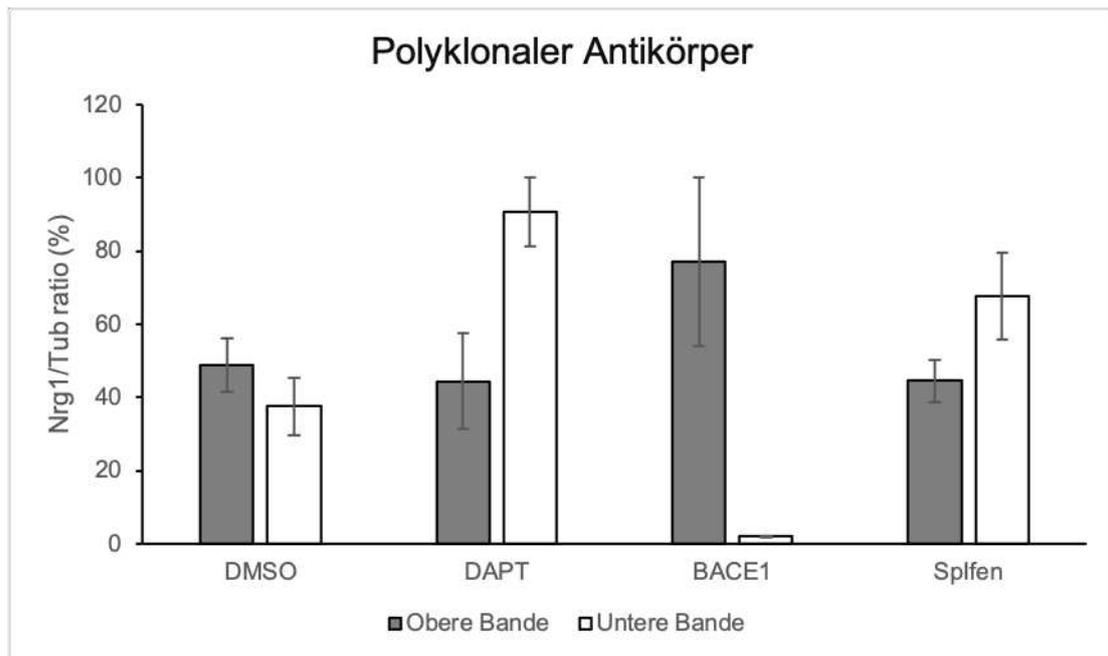


Abbildung 12: Visuelle und fotometrische Quantifizierung von NRG1-III mittels Western Blot (AB) monoklonale Antikörper; (CD) polyklonale Antikörper; obere Bande = 140 kDa, untere Bande = 50 kDa; BACE1 = BACE1-I-IV = BACE1-Inhibitor IV; Spifen = Spironolacton-Ifenprodil-Kombination).

## **5 Diskussion**

Die im Rahmen dieser Dissertation durchgeführten Experimente verfolgten das Ziel, auf Grundlage eines speziell modifizierten NRG1-Spaltungs-Assays die Effekte von diversen bereits in der NIH Clinical Collection registrierten Medikamente auf die intrazelluläre Spaltung von NRG1-ICD zu untersuchen. Das diesbezügliche Potential mehrerer in einer zuvor veröffentlichten Studie identifizierter Hits sollte nun in Form von Konzentrations-Wirkungs-Kurven genauer bestimmt werden. Hierbei wurde zwischen mutmaßlich die Spaltung von NRG1-ICD aktivierenden oder hemmenden Substanzen unterschieden. Des Weiteren erlaubten die im vorangegangenen Kapitel dargelegten Ergebnisse, die getesteten Hits in Bezug auf die eingangs definierter Zielsetzung und Hypothesen zu validieren oder zu devalidieren.

### **5.1 Devalidierte Substanzen**

Insgesamt wurde vier Testsubstanzen eine ungenügende Wirkung auf die Spaltung von NRG1-ICD attestiert. In Hinblick auf den potentiellen Inhibitor Mosaprid-Citrat sowie den Aktivator Nitrendipin konnten schlicht keine oder höchstens geringe signifikante Effekte beobachtet werden. Die beiden ebenfalls mutmaßlich die Spaltung von NRG1-ICD aktivierenden Medikamente Citalopram und Zolmitriptan zeigten eine der ursprünglichen Hypothese entgegengesetzte Wirkung, die im ersten Fall beträchtlich, im zweiten bestenfalls marginal war. Diese Resultate stehen zum Teil im Widerspruch zur Studie von Setiawan (2018), in der Mosaprid-Citrat ein signifikanter hemmender, Citalopram, Nitrendipin und Zolmitriptan jedoch ein ausgeprägter aktivierender Einfluss zugeschrieben wurde. Mosaprid-Citrat konnte dabei eine deutliche höhere Effizienz als DAPT nachgewiesen werden, während die beiden letztgenannten Aktivatoren eine ähnliche Wirkung wie ERBB4-F präsentierten. Die diesbezügliche Effizienz von Citalopram war im direkten Vergleich nur etwa halb so hoch.

### **5.2 Validierte Substanzen**

Zu den validierten Testmolekülen zählten im weitesten Sinne auch die Kontrollsubstanzen. In Übereinstimmung mit Setiawan (2018) stellten sich DAPT und TAPI-1 als geeignete negative sowie ERBB4-F und BACE1 als adäquate positive Kontrollen heraus. Entgegen der erwähnten Studie präsentierte DAPT jedoch einen stärkeren Hemmeffekt auf die Spaltung von NRG1-ICD als TAPI-1. Zudem konnte in der vorliegenden Dissertation BACE1 nur tendenziell mit einer im Vergleich zu ERBB4-

F stärker ausgeprägten Stimulierung dieser Spaltung assoziiert werden, während sich das gleiche Muster in der Arbeit von Setiawan (2018) auf signifikante Art und Weise offenbart hatte. Die Gründe für diese lediglich quantitativen, nicht aber qualitativen Ergebnisdiskrepanzen sind möglicherweise methodologischer Art, da Setiawan (2018) seine Experimente größtenteils mit 384-Well-Mikrotiterplatten durchführte und sich der ursprünglich entwickelte NRG1-Spaltungs-Assay weiterer Optimierungs- und Standardisierungsmaßnahmen bedarf, um ein etabliertes Routineverfahren darzustellen. Im Sinne dieses Vorhabens stellt die vorliegende Dissertation den nächsten von weiteren notwendigen Schritten dar. Zukünftige Forschungsarbeiten sollten sich daher insbesondere auf die Untersuchung der Unterschiede zwischen den Resultaten der beiden erwähnten Studien konzentrieren. Von methodologischen Aspekten einmal abgesehen, erscheint es durchaus logisch anzunehmen, dass Substanzen mit verschiedenen Wirkmechanismen auch quantitativ unterschiedliche Effekte verursachen. So hemmt DAPT die Gamma-Sekretase, während TAPI-1 ein Inhibitor von TACE/ADAM17 ist (Yu et al. 2017). Weil die letztgenannten Enzyme die Abspaltung der ECD von NRG1-III katalysieren können, aber nur die Gamma-Sekretase imstande ist, die Abspaltung der ICD voranzutreiben (Fleck et al. 2016), ist DAPT ein grundsätzlich anderes Wirkprinzip als TAPI-1 zuzuschreiben. Analog hierzu können auch im Fall der positiven Kontrollen unterschiedliche Mechanismen ausgemacht werden. So scheint BACE1 über einen direkt die Abspaltung der ECD fördernden Effekt auch einen indirekten Einfluss auf die Abspaltung der ICD zu haben. Im Gegensatz dazu wirkt sich die Bindung von NRG1-III an ERBB4-F nachweislich begünstigend auf die Translokation der ICD in den Nukleus aus. Wie genau dieser Prozess vonstattengeht ist jedoch ebenso ungeklärt wie die Frage, ob ERBB4-F auch die Abspaltung der ECD beeinflusst (Mei & Xiong 2008).

Da im Zuge der Medikamentenrepositionierung die drei potentiellen Aktivatoren der Spaltung von NRG1-ICD devalidiert wurden, gehörten alle positiv evaluierten Substanzen der Gruppe der Inhibitoren an. Generell waren Konzentrationen von mindestens 10  $\mu\text{M}$ , eher aber 30  $\mu\text{M}$  notwendig, um entsprechend signifikante Hemmwirkungen zu erzielen. Die maximale Testkonzentration von 100  $\mu\text{M}$  lieferte aufschlussreiche Hinweise auf die jeweils vorliegende intrinsische Aktivität. Amitriptylin und Cyproheptadin zeigten ein ähnliches quantitatives Wirkungsprofil, da die Verwendung von 30  $\mu\text{M}$  des jeweiligen Medikaments zu einer rund fünfzigprozentigen Reduzierung der die Spaltung von NRG1-ICD indizierenden Baseline-

Luciferaseaktivität führte. Hinsichtlich des in der vorliegenden Studie gemessenen Maximaleffekts übertraf die erste Substanz die zweite jedoch fast um das Doppelte. Im Fall von Perphenazin und Spironolacton zeigte sich eine weitere Verdopplung des Maximaleffekts, der mit einem über neunzigprozentigen Rückgang der Baseline-Luciferaseaktivität einherging. In Konzentrationen unter 100  $\mu\text{M}$  erwies Spironolacton allerdings eindeutig günstigere Eigenschaften als Perphenazin, das schon in der zweithöchsten Konzentration von 30  $\mu\text{M}$  einen geringeren Effekt als Amitriptylin und Cyproheptadin präsentierte. Im Gegensatz dazu war Spironolacton die mit Abstand potenteste Testsubstanz, da erste Wirkungshinweise schon beim Einsatz von 3  $\mu\text{M}$  festgestellt wurden und 10  $\mu\text{M}$  beziehungsweise 30  $\mu\text{M}$  die Spaltung von NRG1-ICD zu über 60 % beziehungsweise 80 % hemmten. Ifenprodil wurde wiederum mit der höchsten vermuteten intrinsischen Aktivität in Verbindung gebracht. Die maximale Testkonzentration resultierte in einem fast vollständigen Stillstand der Spaltung von NRG1-ICD, während die Verwendung von 30  $\mu\text{M}$  ähnliche Auswirkungen wie dieselbe Menge an Amitriptylin oder Cyproheptadin zur Folge hatte.

Von allen getesteten Substanzen ist nur das Neuroleptikum Perphenazin im Rahmen der systematischen Therapie von Schizophrenie eingesetzt worden. Die aus qualitativer Sicht unzureichende Studienlage lässt aktuell allerdings keine klaren Schlussfolgerungen hinsichtlich der Frage zu, ob das Medikament im Vergleich zu anderen Antipsychotika ein eher günstiges oder ungünstiges Nutzen-Risiko-Verhältnis aufweist (Hartung et al. 2015). Relativ sicher ist dagegen, dass die neuroleptische Wirkung von Perphenazin zumindest zum Teil auf seiner Aktivität als Dopaminrezeptorantagonist beruht (Heo et al. 2020). Auf Grundlage der Ergebnisse der vorliegenden Studie kann argumentiert werden, dass Perphenazin nicht nur direkt, sondern auch indirekt die Entstehung und den Verlauf von Schizophrenie beeinflusst. Diese potentiellen indirekten Effekte lassen sich vor dem Hintergrund der Dopaminhypothese damit erklären, dass die Spaltung von NRG1-ICD hemmende Substanzen wie Perphenazin eben auch die von NRG1 regulierte Freisetzung von Dopamin beeinträchtigen können.

### **5.3 Medikamentenkombinationen**

#### **5.3.1 Synergistische Effekte**

Die zwei auf Basis der Ergebnisse als potenteste (Spironolacton) beziehungsweise effizienteste (Ifenprodil) Testsubstanzen identifizierten Medikamente wurden

kombiniert und in Bezug auf das Vorliegen synergistischer Effekte untersucht. Das genaue Mengenverhältnis schien dabei eine untergeordnete Rolle zu spielen, da Spironolacton-Ifenprodil-Proportionen von 1:1, 1:2 und 1:3 die Spaltung von NRG1-ICD in vergleichbarem Ausmaß hemmten. Wesentlich aufschlussreicher war die Beobachtung, dass die Medikamentenkombination eine womöglich höhere Potenz als Spironolacton aufwies. Erste Effekte wurden nun bereits bei einer zehnmal kleineren Spironolactonkonzentration von 0,3  $\mu\text{M}$  (plus 0,9  $\mu\text{M}$  Ifenprodil) statt 3  $\mu\text{M}$  Spironolacton registriert. Bei 10  $\mu\text{M}$  (plus 30  $\mu\text{M}$  Ifenprodil) und 30  $\mu\text{M}$  (plus 90  $\mu\text{M}$  Ifenprodil) Spironolacton reduzierte sich dieses Wirkungsverhältnis aber auf ein nicht mehr klar zu bestimmender Größenordnung. Der gemessene Maximaleffekt der drei Kombinationen war hingegen eindeutig immer geringer als der den Reinsubstanzen Spironolacton beziehungsweise Ifenprodil zugeschriebene. Ob die beiden Medikamente zusammen tatsächlich eine höhere Potenz und niedrigere Effizienz als alleine haben, sollte Gegenstand zukünftiger Forschungsarbeiten sein.

### **5.3.2 Zytotoxizität**

Die Zytotoxizität der Medikamentenkombination nahm bei einer Verdreifachung der Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  Spironolacton und 30  $\mu\text{M}$  Ifenprodil auf 30  $\mu\text{M}$  Spironolacton und 90  $\mu\text{M}$  Ifenprodil drastisch zu. Sollte sich diese Dynamik in zukünftigen Studien sowohl in vitro als auch in vivo bestätigen, dann könnte dies ein Hinweis darauf sein, dass das spezifische Sicherheitsprofil der getesteten Medikamentenkombination die Verabreichung der zum Erreichen des therapeutischen Maximaleffekts notwendige Dosis eventuell nicht erlaubt. Es ist jedoch möglich, dass andere Mischungsverhältnisse eine größere therapeutische Breite präsentieren. Aus diesem Grund sollten zukünftige Studien Dosis-Wirkungs-Kurven und Zytotoxizität von diversen Spironolacton-Ifenprodil-Kombinationen sowohl untereinander als auch mit den beiden Reinsubstanzen vergleichen.

### **5.3.3 Quantifizierung von Proteinen sowie des C-Terminus von Neuregulin-1 Typ III**

In Übereinstimmung mit den Ergebnissen von Fleck et al. (2016) übten DAPT und der BACE1-Inhibitor IV einen entgegengesetzten Effekt auf die Spaltung von NRG1-III aus. Während DAPT keinen beziehungsweise einen steigernden Einfluss auf die Akkumulation des kompletten NRG1-III-Moleküls beziehungsweise des C-Terminus hatte, führte der BACE1-Inhibitor IV zu einer verstärkten Ansammlung des

Gesamtproteins und einer reduzierten Akkumulation des C-Terminus-Peptids. Da neben BACE1 aber auch Enzyme der ADAM-Familie, die Spaltung der EGF und im Folgeschritt der ECD katalysieren, brachte der BACE1-Inhibitor IV die Ansammlung des C-Terminus nicht komplett zum Erliegen. DAPT hemmt hingegen die Beta-Sekretase und somit die Abspaltung der ICD vom C-Terminus, was wiederum der Ansammlung des letztgenannten Transmembranpeptids zuträglich war (Fleck et al. 2016). Der Fakt, dass der Einsatz von Spironolacton alleine oder in Kombination mit Ifenprodil in allen realisierten Experimenten zu ähnlichen Resultaten, wie die Verwendung von DAPT führte, lässt die Aufstellung der Hypothese zu, dass auch der Wirkungsmechanismus zwischen diesen Substanzen Parallelen aufweist.

## 6 Schlussfolgerung

In der vorliegenden Arbeit wurde ein eigens entwickelter Mikrotiterplatten-Assay genutzt, um diverse Medikamente auf ihre Eignung zu prüfen, die Spaltung der ICD von NRG1-III zu modulieren. Die Hypothese, dass Amitriptylin, Cyproheptadin, Ifenprodil, Mosaprid-Citrat, Perphenazin und Spironolacton eine diesbezüglich hemmende Wirkung haben, konnte mit Ausnahme der vierten Substanz bestätigt werden. Demgegenüber präsentierten die hypothetischen Aktivatoren Citalopram, Nitrendipin und Zolmitriptan keine die Spaltung der ICD von NRG1-III stimulierenden Effekte. Über diese konkreten Ergebnisse hinaus konnte das von Setiawan (2018) Erreichte konsolidiert und weitergeführt werden, denn auf der einen Seite wurde der zuerst vom erwähnten Autor beschriebene Firefly- und Renilla-Luciferase-Mikrotiterplatten-Assay auf Grundlage etablierter Techniken wie dem D-Luciferin-Luminometer-Assay und dem Western-Blot-Verfahren validiert. Auf der anderen Seite wurde der entwickelte NRG1-Spaltungs-Assay zum ersten Mal in eine praktische Anwendung, nämlich die Identifizierung und quantitative Beurteilung von Modulatoren der Spaltung der ICD von NRG1-III im Rahmen einer Medikamentenrepositionierung, überführt. Die Hypothesenprüfung erlaubte es, die Experimente mit einer Kombination der zwei potentesten (Spironolacton) beziehungsweise effizientesten (Ifenprodil) Testsubstanzen fortzuführen und durch Zytotoxizitätstests zu ergänzen.

Obwohl die erzielten Resultate allgemein eine gute Aussagekraft besaßen und in sich stimmig waren, sollten einzelne unzureichende oder gar widersprüchliche Ergebnisse in zukünftigen Studien rigoros überprüft werden. Zum einen konnte im Gegensatz zu Setiawan (2018) keine effektiv die Spaltung der ICD von NRG1-III aktivierende Substanz gefunden werden. Um die Grundlagenforschung hinsichtlich dieses Prozesses voranzutreiben, ist es aber unerlässlich über ein breites Sortiment von sowohl hemmenden als auch aktivierenden Spaltungsmodulatoren zu verfügen. In einem ersten Schritt sollte deshalb geklärt werden, ob Citalopram, Nitrendipin und Zolmitriptan zur letztgenannten Gruppe gezählt werden sollten (sowie von Setiawan 2018 vorgeschlagen) oder nicht (so wie von der vorliegenden Arbeit nahegelegt). In einem zweiten Schritt sollten dann auch weitere potentielle Hits evaluiert werden, wobei Letzteres natürlich nicht nur auf Spaltungsaktivatoren, sondern auch -inhibitoren zutrifft. Im spezifischen Bezug auf den theoretischen Hintergrund dieser Dissertation sollten die jeweils identifizierten Substanzen dazu genutzt werden, die Rückwärtssignalisierung von NRG1 im Allgemeinen sowie mit Schizophrenie im

Zusammenhang stehende Signalwege im Besonderen zu erforschen. Am Ende einer langen Serie von In vitro- und auf Tiermodellen beruhenden In vivo-Experimenten könnten letztendlich klinische Studien stehen, die das Nutzen-Risiko-Verhältnis von Reinstoffen oder Substanzmischungen an gesunden Probanden und Patienten mit Schizophrenie untersuchen. In dieser Hinsicht ist zu berücksichtigen, dass gerade die pharmakologischen Effekte von Medikamentenkombinationen nicht zwingend die Summe ihrer Teile abbilden, sondern im Kontext von zusätzlich zu realisierenden Dosis-Wirkungs-Kurven und Zytotoxizitätstests zu bewerten sind.

## Literaturverzeichnis

Bao, Jianxin et al. "Activity-dependent transcription regulation of PSD-95 by neuregulin-1 and Eos." *Nature neuroscience* vol. 7,11 (2004): 1250-8. doi:10.1038/nn1342

Bao, Jianxin et al. "Back signaling by the Nrg-1 intracellular domain." *The Journal of cell biology* vol. 161,6 (2003): 1133-41. doi:10.1083/jcb.200212085

Bergen, Sarah E, and Tracey L Petryshen. "Genome-wide association studies of schizophrenia: does bigger lead to better results?" *Current opinion in psychiatry* vol. 25,2 (2012): 76-82. doi:10.1097/YCO.0b013e32835035dd

Bozikas, Vasilis, and Parlapani, Eleni. "Resilience in patients with psychotic disorder." *The Journal of Nervous and Mental Disease* vol. 204,8 (2016): 578-584. doi:10.1097/NMD

Buckley, Peter F et al. "Psychiatric comorbidities and schizophrenia." *Schizophrenia Bulletin* vol.35,2 (2009):383-402. doi:10.1093/schbul/sbn135

Bush, William S, and Jason H Moore. "Chapter 11: Genome-wide association studies." *PLoS computational biology* vol. 8,12 (2012): e1002822. doi:10.1371/journal.pcbi.1002822

Chen, Yachi et al. "Intramembranous valine linked to schizophrenia is required for neuregulin 1 regulation of the morphological development of cortical neurons." *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* vol. 30,27 (2010): 9199-208. doi:10.1523/JNEUROSCI.0605-10.2010

Chong, Victor Z et al. "Elevated neuregulin-1 and ErbB4 protein in the prefrontal cortex of schizophrenic patients." *Schizophrenia research* vol. 100,1-3 (2008): 270-80. doi:10.1016/j.schres.2007.12.474

Dean B. „understanding the pathology of schizophrenia: recent advances from the study of the molecular architecture of postmortem CNS tissue." *Postgraduate medical journal* vol. 78, 917 (2002): 142-8. doi:10.1136/pmj.78.917.142

DGPPN e.V. (Hrsg.) für die Leitliniengruppe: S3-Leitlinie. Langfassung, 2019, Version 1.0, zuletzt geändert am 15. März 2019, verfügbar unter: <https://www.awmf.org/leitlinien/detail/II/038-009.html>

Dohrenwend, Bruce P et al. "socioeconomic status and psychiatric disorders: the causation-selection issue." *Science (New York)* vol. 255,5047 (1992): 946-52. doi:10.1126/science.1546291

Driver, David I et al. "Childhood onset schizophrenia and early onset schizophrenia spectrum disorders." *Child and adolescent psychiatric clinics of North America* vol. 22,4 (2013): 539-55. doi:10.1016/j.chc.2013.04.001

Falls, Douglas L. "Neuregulins: Functions, forms, and signaling strategies." *Experimental cell research* vol.284,1 (2003):14-30.doi:10.2016/s0014-4827(02)001027

Fleck, Daniel et al. "BACE1 dependent neuregulin processing: review." *Current Alzheimer research* vol. 9,2 (2012): 178-83. doi:10.2174/156720512799361637

Fleck, Daniel et al. "Dual cleavage of neuregulin 1 type III by BACE1 and ADAM17 liberates its EGF-like domain and allows paracrine signaling." *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* vol. 33,18 (2013): 7856-69. doi:10.1523/JNEUROSCI.3372-12.2013

Fleck, Daniel et al. "Proteolytic Processing of Neuregulin 1 Type III by Three Intramembrane-cleaving Proteases." *The Journal of biological chemistry* vol. 291,1 (2016): 318-33. doi:10.1074/jbc.M115.697995

Harrison, Paul J. "Recent genetic findings in schizophrenia and their therapeutic relevance." *Journal of psychopharmacology (Oxford, England)* vol. 29,2 (2015): 85-96. doi:10.1177/0269881114553647

Harrison, Paul J., and Michael J. Owen. "Genes for Schizophrenia? Recent Findings and Their Pathophysiological Implications." *Lancet (London, England)* 361,9355 (2003): 417-419. doi:10.1016/S0140-6736(03)12379-3

Hartung, Benno et al. "Perphenazine for schizophrenia." *The Cochrane database of systematic reviews* vol. 2015,3 CD003443. 6 Mar. 2015, doi:10.1002/14651858.CD003443.pub3

Hasan, A et al. "Die Glutamathypothese der Schizophrenie". *Fortschritte der Neurologie-Psychiatrie* vol. 82,8 (2014): 447-56. doi:10.1055/s-0034-1366571

Heo, Min-Jeong et al. "Perphenazine Attenuates the Pro-Inflammatory Responses in Mouse Models of Th2-Type Allergic Dermatitis." *International journal of molecular sciences* vol. 21,9 3241. 3 May. 2020, doi:10.3390/ijms21093241

Howes, Oliver D., and Shitij Kapur. "The Dopamine Hypothesis of Schizophrenia: Version III – the final common Pathway." *Schizophrenia Bulletin* 35,3 (2009): 549-62. doi:10.1093/schbul/sbp006.

Ledonne, Ada, and Nicola B Mercuri. "On the Modulatory Roles of Neuregulins/ErbB Signaling on Synaptic Plasticity." *International journal of molecular sciences* vol. 21,1 275. 31 Dec. 2019, doi:10.3390/ijms21010275

Maglione, Jeanne E et al. „Late-onset schizophrenia: do recent studies support categorizing LOS as a subtype of schizophrenia?." *Current opinion in psychiatry* vol. 27,3 (2014):173-8. Doi:10.1097/YCO.0000000000000049

Mei, Lin, and Wen-Cheng Xiong. "Neuregulin 1 in neural development, synaptic plasticity and schizophrenia." *Nature reviews. Neuroscience* vol. 9,6 (2008): 437-52. doi:10.1038/nrn2392

- McGrath, John et al. „Schizophrenia: a concise overview of incidence, prevalence, and mortality.“ *Epidemiologic reviews* vol. 30 (2008) : 67-76. Doi :10.1093/epirev/mxn001
- Ou, Guan-Yong et al. “Neuregulins in Neurodegenerative Diseases.” *Frontiers in aging neuroscience* vol. 13 662474. 9 Apr. 2021, doi:10.3389/fnagi.2021.662474
- Schizophrenia Working Group of the Psychiatric Genomics Consortium. “Biological insights from 108 schizophrenia-associated genetic loci.” *Nature* vol. 511,7510 (2014): 421-7. doi:10.1038/nature13595
- Setiawan, C. (2018). *NRG1 Cleavage Assay and Small Molecule Screen for Modulators of NRG1 Processing* [Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität zu München]. <https://edoc.ub.uni-muenchen.de/22848/>
- Stahl, Stephen M. “Beyond the dopamine hypothesis of schizophrenia to three neural networks of psychosis: dopamine, serotonin, and glutamate.” *CNS spectrums* vol. 23,3 (2018): 187-191. doi:10.1017/S1092852918001013
- Stefansson, Hreinn et al. “Neuregulin 1 and susceptibility to schizophrenia.” *American journal of human genetics* vol. 71,4 (2002): 877-92. doi:10.1086/342734
- Tang, J X et al. “Polymorphisms within 5' end of the Neuregulin 1 gene are genetically associated with schizophrenia in the Chinese population.” *Molecular psychiatry* vol. 9,1 (2004): 11-2. doi:10.1038/sj.mp.4001436
- Van Os, Jim et al. “The Schizophrenia envirome.” *Current opinion in psychiatry* vol 18,2 (2005): 141-5. Doi: 10/1097/00001504-200503000-00006
- Walder, Deborah J et al. „Genetic liability, prenatal health, stress and family environment: risk Factors in the Harvard Adolescent Family High Risk for schizophrenia Study.“ *Schizophrenia Research* vol. 157, 1-3(2014): 142-8. doi: 10.2016/j.schres.2014.04.015
- Walss-Bass, Consuelo et al. “A novel missense mutation in the transmembrane domain of neuregulin 1 is associated with schizophrenia.” *Biological psychiatry* vol.60,6 (2006):548-53
- Wehr, Michael C et al. “Spironolactone is an antagonist of NRG1-ERBB4 signaling and schizophrenia-relevant endophenotypes in mice.” *EMBO molecular medicine* vol. 9,10 (2017): 1448-1462. doi:10.15252/emmm.201707691
- Yang, J Z et al. “Association study of neuregulin 1 gene with schizophrenia.” *Molecular psychiatry* vol. 8,7 (2003): 706-9. doi:10.1038/sj.mp.4001377
- Yu, Tong et al. “EpCAM Intracellular Domain Promotes Porcine Cell Reprogramming by Upregulation of Pluripotent Gene Expression via Beta-catenin Signaling.” *Scientific reports* vol. 7 46315. 10 Apr. 2017, doi:10.1038/srep4631

## **Danksagung**

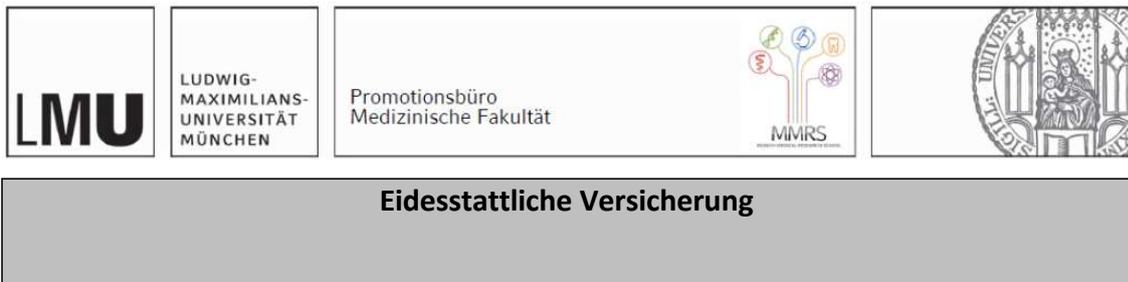
Herrn Prof. Moritz Rossner danke ich für die Überlassung des Themas und seine Begleitung während der gesamten Arbeit.

Herrn Dr. Ben Brankatsch danke ich für ihre ausgezeichnete Betreuung und Unterstützung bei der Durchführung dieser Arbeit.

Auch möchte ich allen Mitarbeitern des Labors danken, die dazu beigetragen haben, dass ich dieses Thema mit Freude bearbeiten konnte.

Meiner Mutter Frau Gladys Cabrejos Sandoval und meiner Familie möchte ich für die Unterstützung und Ermutigung danken.

# Affidavit



## Eidesstattliche Versicherung

Saavedra Cabrejos, Adán Alberto

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel:

### **Validierung potenzieller Modulatoren der intrazellulären Neuregulinspaltung**

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

München, 23.07.2024

Ort, Datum

Adan Alberto Saavedra Cabrejos

Unterschrift Doktorand