

# UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Zentrum für psychosoziale Medizin und Psychiatrie  
Prof. Dr. med. Jürgen Gallinat

## MicroRNA Expression im Serum von Patienten mit der Diagnose einer Schizophrenie

### Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
an der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

vorgelegt von:  
Maxi Dana Hofacker  
aus Rüsselsheim

Hamburg 2019

Angenommen von der Medizinischen Fakultät am: 30.09.2019

Veröffentlicht mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität  
Hamburg.

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: Prof. Dr. Jürgen Gallinat

Prüfungsausschuss, zweiter Gutachter/in: Prof. Dr. Stefan Kindler

# Inhaltsverzeichnis

<b>Abbildungsverzeichnis</b>	<b>5</b>
<b>Tabellenverzeichnis</b>	<b>5</b>
<b>1. Einleitung</b>	<b>6</b>
1.1. Schizophrenie . . . . .	6
1.1.1. Beschreibung und Diagnose der Schizophrenie . . . . .	6
1.1.2. Neurobiologie der Schizophrenie . . . . .	8
1.2. MicroRNA . . . . .	10
1.2.1. Biologische Rolle von microRNA . . . . .	10
1.2.2. Bedeutung von microRNA bei der Schizophrenie . . . . .	11
<b>2. Hintergrund und Fragestellung</b>	<b>13</b>
<b>3. Methoden und Material</b>	<b>14</b>
3.1. Ethikerklärung . . . . .	14
3.2. Probanden und Proben . . . . .	14
3.3. Selektion der microRNA . . . . .	15
3.3.1. Liste der microRNA . . . . .	16
3.4. Bestimmung der microRNA Expression im Serum . . . . .	16
3.4.1. RNA Extraktion . . . . .	16
3.4.2. Reverse-Transkriptase quantitative Polymerase-Ketten-Reaktion . . . . .	18
3.4.3. Prä-Prozessierung, Qualitätskontrollen und relative Quantifizierung . . . . .	19
3.5. Liste der Materialien . . . . .	22
3.6. Statistik . . . . .	24

<b>4. Ergebnisse</b>	<b>25</b>
4.1. Merkmale der Studienpopulation . . . . .	25
4.2. Qualitätskontrollen und fehlende Werte . . . . .	26
4.3. Expressionsanalyse . . . . .	27
4.4. Korrelationsanalyse . . . . .	28
<b>5. Diskussion</b>	<b>29</b>
5.1. Ergebnisse . . . . .	29
5.2. Methode . . . . .	34
5.3. Limitationen und Stärken dieser Studie . . . . .	35
5.4. Eignung von microRNA als Biomarker bei der Schizophrenie . . .	37
5.5. Ausblick . . . . .	38
<b>6. Zusammenfassung</b>	<b>39</b>
<b>7. Summary</b>	<b>40</b>
<b>Abkürzungen</b>	<b>42</b>
<b>Literatur</b>	<b>44</b>
<b>A. Anhang</b>	<b>50</b>
<b>Danksagung</b>	<b>58</b>
<b>Lebenslauf</b>	<b>59</b>
<b>Eidesstattliche Erklärung</b>	<b>60</b>

# Abbildungsverzeichnis

4.1. Hämolysen-Plot . . . . .	27
4.2. Volcano-Plot . . . . .	28
4.3. ROC-Kurven . . . . .	31
5.1. Boxplots ausgewählter microRNA . . . . .	32
A.2. Scatter-Plots . . . . .	52
A.3. Cluster-Analyse und Heatmap . . . . .	53

# Tabellenverzeichnis

1.1. Studien microRNA Serum und Plasma . . . . .	13
3.1. Liste der microRNA . . . . .	17
4.1. Demografie und Psychometrie . . . . .	26
4.2. t-Test und Expressionsunterschiede . . . . .	29
4.3. Korrelationen Dauer und Erstmanifestation der Erkrankung . . . . .	30
4.4. Korrelation PANSS . . . . .	30
4.5. AUC der ROC-Kurve . . . . .	31
A.1. Checkliste in Anlehnung an die MIQE Guidelines . . . . .	57

# 1. Einleitung

Die in dieser Arbeit gewählte männliche Form bezieht sich immer zugleich auf weibliche und männliche Personen. Sie dient ausschließlich der besseren Lesbarkeit.

## 1.1. Schizophrenie

### 1.1.1. Beschreibung und Diagnose der Schizophrenie

#### Geschichte und Epidemiologie

Der deutsche Psychiater Kraepelin unterscheidet 1898 bei einer Lesung in Heidelberg erstmals zwischen der Psychose bei affektiven Erkrankungen und jener bei der Schizophrenie, die er als „Dementia praecox“ bezeichnet [44]. Den Begriff Schizophrenie prägt der schweizer Psychiater Bleuler im Jahre 1908 im Rahmen einer Lesung in Berlin [27].

Die Schizophrenie bezeichnet eine heterogene psychische Erkrankung, die in der Regel zu schwerer Behinderung und sozialen Einschränkungen führt. Sie ist charakterisiert durch Störungen des Denkens, der Wahrnehmung und des eigenen Selbst. Typischerweise beginnt die Erkrankung in der späten Adoleszenz oder im frühen Erwachsenenalter. Neben der Belastung für Patienten und deren Familien hat die Erkrankung deutliche Auswirkungen auf unsere Gesellschaft [22]. Die weltweite Prävalenz der Schizophrenie liegt im Jahr 2016 bei etwa 0.28 %, wobei sich kein Unterschied in der Häufigkeit zwischen Frauen und Männern ergibt [14]. Zwar werden klassischerweise ein Drittel chronisch progrediente, ein Drittel episodisch psychotische und ein Drittel mit vordergründigem leichten Residualzustand

## 1. Einleitung

nach Psychose unterschieden, jedoch ist im Allgemeinen von einer chronischen Belastung in jedem dieser Fälle auszugehen.

### **Der Weg zur Diagnose**

Die Diagnose der Schizophrenie wird ausschließlich anhand der klinischen Präsentation der untersuchten Person gestellt [41]. Entsprechend der Natur der Diagnosekriterien wird die Diagnose zudem in einem Erkrankungsstadium gestellt, in welchem die Erkrankung bereits fortgeschritten ist [38].

Historische Diagnosekriterien gehen auf Bleuler und Schneider zurück. Bleuler unterscheidet Grundsymptome (Assoziationsstörungen, Affektivitätsstörungen, Ambivalenz der Gefühle, Autismus, Störungen des Willens und Handelns, Störungen der Person) und Akzessorische Symptome (Halluzinationen, Wahnideen, Funktionelle Gedächtnisstörungen, Katatonie, Störungen von Schrift und Sprache). Darüber hinaus unterscheidet er Primär- und Sekundärsymptome. Einbezogen werden in die Kriterien teils körperliche Symptome, wie ein Tremor oder eine Pupillendifferenz. Nach Schneider werden Erstrangsymptome (im Wesentlichen Wahn, Halluzinationen, Ich-Störungen) und Zweitrangsymptome (weitere Symptome aus dem Bereich der bereits genannten) beschrieben.

Mittlerweile gibt es eine Reihe klinischer Schizophreniekonzepte mit entsprechendem Diskurs. Im klinischen Alltag findet in erster Linie die Internationale statistische Klassifikation der Krankheiten und verwandter Gesundheitsprobleme, 10te Revision (ICD-10, International Classification of Diseases, 10th revision) Anwendung. Die Symptome müssen nach Ausschluss anderer Diagnosen über mindestens einen Monat dauerhaft bestehen und beinhalten vordergründig Positivsymptome (u.a. Halluzinationen und Wahn) und zudem Negativsymptome (Herabsetzung von Affekt, Antrieb, Psychomotorik und Denken) [69].

### 1.1.2. Neurobiologie der Schizophrenie

#### Genetik

Durch Zwillingsstudien ist bekannt, dass die Ätiologie der Schizophrenie durch genetische Faktoren und Umweltfaktoren bedingt ist. Im Rahmen einer dänischen Registerstudie schätzen Hilker et al. die Heredität der Erkrankung auf 79 % ein, wobei sich eine Konkordanz von 33 % für eineiige Zwillinge ergibt [34]. Als Umweltfaktoren mit einer Begünstigung der Schizophrenie gelten unter anderem Migrationsstatus [60], Stadtleben [77], Umstände vor und während der Geburt, sowie die Geburt in Winter oder Frühling [19]. Zudem wird die Assoziation mit bestimmten Infektionen diskutiert [80].

Das 22q11.2-Deletionssyndrom (DiGeorge-Syndrom) gilt als mögliches biologisches Model auf der Suche nach genetischen Hintergründen der Schizophrenie [57]. Die Rate an Schizophrenieerkrankungen bei diesem kongenitalen Mikrodeletionssyndrom betragen etwa 22 % [7]. Während diese Mikrodeletion auch bei phänotypisch nicht apparenter Ausprägung zu einem erhöhten Erkrankungsrisiko für die Schizophrenie zu führen scheint, gibt es Hinweise auf einen protektiven Effekt reziproker Duplikationen im entsprechenden Chromosomenabschnitt [64]. Marshall et al. beschreiben in einer großen Fall-Kontroll-Studie zumindest sieben weitere loci mit hoher Evidenz für Kopienzahlvariationen (CNV, copy number variants), welche mit Schizophrenien assoziiert sind [54].

Genomweite Assoziationsstudien (GWAS, genome-wide associations studies), welche genetische Variationen des humanen Genoms abbilden, identifizieren vielfach neue Signale mit möglicher Relevanz für die Erkrankung. Assoziierte Einzelnukleotid-Polymorphismen (SNPs, single nucleotide polymorphism) liegen oft in nicht Protein-kodierenden Bereichen[4]. Schätzungen besagen, dass die Hälfte bis ein Drittel des Risikos an einer Schizophrenie zu erkranken durch häufige Allele, die in GWAS gefunden werden, begründet sind [65].

Darüber hinaus werden seltene und *de novo* Varianten beschrieben [4].

Genetische Befunde stützen die These, dass es sich bei der Schizophrenie um eine Erkrankung der neuronalen Entwicklung handelt [78].

### Neurotransmitter

Es wird von der Beeinflussung verschiedener Neurotransmittersysteme ausgegangen.

Das Dopaminsystem gerät als erstes in den Fokus, nachdem die Wirkung von Neuroleptika am D2-Rezeptor gegen psychotische Symptome entdeckt wird [74]. Zudem ist bekannt, dass Patienten mit einer Schizophrenie sensibler auf Drogen – wie Amphetamine – mit dopaminergem Wirkung reagieren und diese psychotische Symptome auslösen können [17]. Der hyperdopaminerge Status wird mit einer chronischen Unterfunktion von N-Methyl-D-Aspartat-Rezeptoren (NMDARn, N-methyl-D-aspartate receptors), welche Glutamat binden, in Verbindung gebracht [23].

Im Rahmen der Glutamat-Hypothese wird eine Reduktion von Glutamatrezeptoren diskutiert. Wie bei der Dopamin-Hypothese wird dies auf post mortem Befunden und pharmakologischen Beobachtungen gegründet. Als Modell werden unter anderem die halluzinatorischen und kognitiven Auswirkungen von Ketamin herangezogen, welches am NMDAR-Glutamat-Rezeptorkomplex wirkt [46].

Zudem gibt es Evidenz für eine Unterfunktion des GABAergen Systems bei der Schizophrenie. Auch hier wird eine Unterfunktion von NMDAR als Mechanismus im Hintergrund diskutiert [16].

Neben diesen hauptsächlich diskutierten Neurotransmittern gibt es Hinweise für eine Beteiligung des serotonergen Systems. Dieses findet Beachtung, nachdem „entdeckt wird, dass die antipsychotisch wirksame Substanz Clozapin ein potenter Serotonin 5 –  $HT_{2A}$  Antagonist ist, ebenso wie ein Dopamin D2 Antagonist“ [37]. Mittlerweile werden weitere Serotoninrezeptoren, wie beispielsweise der 5 –  $HT_{5B}$ -Rezeptor und dessen Beeinflussung des dopaminergen Systems [21] untersucht.

Das cholinerge System wird ebenfalls für den Kontext der Schizophrenie untersucht [70].

## 1.2. MicroRNA

### 1.2.1. Biologische Rolle von microRNA

#### Geschichte der microRNA

Micro Ribonukleinsäure (microRNA, micro ribonucleic acid) wird erstmals in den 1990er Jahren unter anderen durch Lee et al. beschrieben.[47] Die regulatorische Rolle von microRNA und ihre Konservierung in verschiedenen Spezies wird Anfang der 2000er Jahre deutlich. Pasquinelli et al. dokumentieren zu jener Zeit die Rolle von *let-7* microRNA in der Entwicklung des Nematoden *C.Elegans* und weisen diese microRNA in verschiedenen Spezies nach[59]. Aktuell sind in der microRNA Datenbank *mirbase.org* über 1000 humane microRNA Sequenzen eingetragen [43, 31].

#### Biogenese und Funktion von microRNA

MicroRNA sind nicht-kodierende endogene Ribonukleinsäuren (RNAs, ribonucleic acid) von etwa 22 Nukleotiden Länge, welche Boten-RNA (mRNA, messenger RNA) durch Unterdrückung der Translation oder durch Spaltung beeinflussen und somit eine wichtige regulatorische Rolle spielen [6]. Für Säugetiere ist bekannt, dass eine bestimmte microRNA viele verschiedene mRNA regulieren kann. Eine mRNA kann wiederum durch unterschiedliche microRNA reguliert werden [25, 49]. Die Mehrzahl der microRNA Gene bei Säugetieren liegt innerhalb bestimmter Transkriptionseinheiten (*engl. transcription units*). Entsprechende Gene liegen in Protein-kodierenden Introns oder in nicht-kodierenden Introns oder Exons [66]. Die Transkription des microRNA Genes wird durch die Polymerase II mediiert [48]. Das entstehende lange Primärtranskript der miRNA (pri-miRNA, primary transcript of miRNA) wird durch die nukleäre RNAase III Drosha geschnitten und der Präkursor der miRNA (pre-miRNA, precursor of miRNA) mit einer Haarnadelstruktur in Folge dessen freigegeben. Die pre-miRNA wird durch den RNA-abhängigen Transportrezeptor exportin-5 in das Zytoplasma transportiert, um dort von der zytoplasmatischen RNAase III Dicer zu einem etwa 22 Nukleotide langen microRNA Duplex prozessiert zu werden. Die reife microRNA wird Teil des Effektor-Komplexes (miRNA-containing RNA-induced silencing

## 1. Einleitung

complex (miRISC)), während einer der Stränge degeneriert[42]. Der RNA-induced silencing complex (RISC) interagiert mit Zielgenen durch Sequenz-spezifische Bindung von 2-8 Nukleotiden (sog. *seed region*) und in Säugetieren für gewöhnlich im Bereich der 3'UTR (*3' untranslated region*) einer Ziel mRNA [49].

Extrazelluläre microRNA können in extrazellulären Vesikeln oder frei von diesen und in Assoziationen mit Proteinen vorliegen. Proteingebunden liegt microRNA beispielsweise im Kontext mit dem RISC durch Bindung an Argonaute2 (Ago2) vor [2]. MicroRNA im Serum gelten als besonders stabil in Bezug auf Veränderungen der Temperatur oder des Säure-Basen-Haushaltes [15].

### 1.2.2. Bedeutung von microRNA bei der Schizophrenie

Es gibt Untersuchungen der Expression von microRNA bei der Schizophrenie für verschiedene Gewebe.

Unterschiede in der Expression von microRNA im Vergleich zu einer gesunden Kontrollgruppe werden in bestimmten Hirnarealen festgestellt. Perkins et al. finden in der ersten dieser Studien 16 unterschiedlich exprimierte microRNA im dorsolateralen präfrontalen Cortex von Patienten mit einer Schizophrenie (n=13) und Patienten mit einer Schizoaffektiven Störung (n=2) im Vergleich zu einer Gruppe von Patienten ohne eine psychiatrische Diagnose (n=21) [61]. Es folgen Weitere, wobei Beveridge et al. insbesondere miR-181b im Gyrus temporalis superior als hoch-reguliert in einer Schizophreniegruppe im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe beschreiben [10]. Beveridge et al. stellen in einer weiteren Studie eine mit der Schizophrenie assoziierte globale Hochregulation von microRNA im Gyrus temporalis superior und im präfrontalem dorsalen Kortex bei der Untersuchung im Vergleich zu einer gesunden Kontrollgruppe fest. Mitgliedern der 'miR-15'-Familie (miR-15a, miR-15b und miR-195) wird in dieser Studie eine besondere Bedeutung zugemessen, welche aufgrund ihrer gemeinsamen *seed region* einen großen Anteil von Zielgenen teilen. Diese beinhalten Zielgene wie beispielsweise den brain-derived neurotrophic factor (BDNF) mit einer Implikation für die Schizophrenie[9].

Bekannt gewordene genetische Assoziationen werden in Hinblick auf die Rolle von microRNA weiter untersucht. Die miR-137 wird im Jahr 2011 im Rahmen

## 1. Einleitung

des 'Schizophrenia Psychiatric Genome-Wide Association Study GWAS Consortium' mit der Schizophrenie assoziiert und ist seither Teil von Studien, die den Zusammenhang zwischen dieser microRNA und der Genese der Schizophrenie untersuchen [67].

Mellios et al. beschreiben die mögliche Rolle von microRNA in der Feinregulation des BDNF im präfrontalen Cortex und benennen in diesem Zusammenhang miR-30a-5p und miR-195 als Feinregulatoren [55].

Neben der unterschiedlichen Expression von microRNA im Gehirngewebe aus post mortem Untersuchungen, ist die unterschiedliche Expression in Blutbestandteilen oder Vollblut [53] beschrieben. Gardiner et al. beschreiben unter anderen die unterschiedliche Expression in Mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMCs, peripheral blood mononuclear cell) [28].

Für das 22q11.2-Deletionssyndrom ergibt sich Evidenz für einen direkten Zusammenhang zwischen dem Kandidatengen DiGeorge Syndrome Critical Region Gene 8 (DGCR8) – welches unter anderem im Zusammenhang mit microRNA-185 steht – und *down-stream* Signalwegen mit potentiell neurobiologischer Relevanz für die Schizophrenie [24].

Raghavan et al. stellen die Hypothese auf, dass exosomale microRNA aufgrund ihrer biologischen Rolle potentielle Biomarker für die Schizophrenie sein könnten, untersuchen dies jedoch nicht experimentell [63].

### **MicroRNA Expression im Blutserum oder Blutplasma**

Erstmals untersuchen Wenting Shi et al. zirkulierende microRNA im Serum von Patienten mit einer Schizophrenie, wobei 115 Patienten mit der Diagnose einer Schizophrenie und 40 gesunde Probanden untersucht werden. Anhand von Datenbankanalysen ausgewählte mit Schizophrenie assoziierte neun microRNA werden mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR, polymerase chain reaction) untersucht. Die Arbeitsgruppe detektiert microRNA-181b, microRNA-219-2-3p, microRNA-1308 und let-7g als in der Schizophreniegruppe hochregulierte, sowie microRNA-195 als herunterregulierte microRNA. Darüber hinaus wird eine Wirksamkeit von Risperidon auf die Serumexpression von microRNA-346 postuliert. [73].

Studie	Hoch regulierte microRNA	Herunter regulierte microRNA
Hui Wei et al. (2015) [79]	miR-130b, miR-193a-3p	
Xin-Yang Sun et al. (2014) [75]	miR-181b, miR-30e, miR-346, miR-34a, miR-7	
Wenting Shi et al. (2012) [73]	miR-181b, miR-219-2-3p, miR-1308, let-7g	miR-195

Tabelle 1.1.: MicroRNA Expression im Serum/ Plasma in ausgewählten Studien

Xin-yang Sun et al. untersuchen die Plasmaexpression von zehn microRNA mittels PCR in einer Kohorte von 61 Patienten mit einer Schizophrenie und 62 Kontrollprobanden. Die Arbeitsgruppe findet eine relativ erhöhte Expression in der Schizophreniegruppe für microRNA-30e, microRNA-181b, microRNA-34a, microRNA-346 und microRNA-7 [75].

Hui Wei et al. rekrutieren 564 Patienten mit der Diagnose einer Schizophrenie und 162 mit anderen psychiatrischen Erkrankungen. Zudem wird eine Kontrollgruppe mit 400 gesunden Probanden untersucht. Der Studienaufbau umfasst ein *globales profiling* von microRNA im ersten Schritt. In einem zweiten Schritt findet die Validierung in einer unabhängigen Kohorte von acht gefundenen microRNA statt. Die Arbeitsgruppe findet die hoch-regulierten microRNA-130b und microRNA-193a-3p als potentielle Biomarker der Schizophrenie [79]. Eine Übersichtstabelle über die regulierten microRNA in den genannten Studien findet sich in Tabelle 1.1.

## 2. Hintergrund und Fragestellung

Bislang wird die Diagnose der Schizophrenie ausschließlich anhand klinischer Kriterien gestellt und ist somit von den jeweiligen Untersuchern abhängig. Die Differentialdiagnostik setzt Sorgfalt und Erfahrung des Untersuchers voraus. Zudem handelt es sich um ein heterogenes Krankheitsbild mit unterschiedlichen Verlaufsformen. Die Diagnose erfolgt regelhaft erst in einem bereits fortgeschrittenen

Krankheitsstadium. Ein objektives Diagnosekriterium in Form eines Biomarkers würde einen großen Fortschritt bedeuten.

Fragen dieser Arbeit sind:

1. Unterscheidet sich die Expression von microRNA im Serum von Patienten mit einer Schizophrenie von der psychisch gesunden Kontrollgruppe?
2. Eignen sich microRNA im Serum als Biomarker für die Schizophrenie in Bezug auf die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse und die klinische Umsetzbarkeit?

## **3. Methoden und Material**

### **3.1. Ethikerklärung**

Diese Studie beruht auf der Entscheidung der Ethikkommission des Universitätsklinikums Berlin (Charité, Campus Benjamin Franklin) vom 12.12.2013 (Antragsnummer EA4/081/13). Die dieser Arbeit zu Grunde liegenden Patientendaten liegen in anonymisierter Form vor.

### **3.2. Probanden und Proben**

Die microRNA Expression im Serum von Probanden ( $n=66$ ), bestehend aus einer Gruppe mit der Diagnose einer paranoiden Schizophrenie ( $n=34$ ) und einer Kontrollgruppe ( $n = 32$ ), wird gemessen. Die Kontrollgruppe beinhaltet ausschließlich Probanden, bei welchen keine psychiatrische Erkrankung bekannt ist.

Für die Diagnose der Schizophrenie werden die ICD-10 Kriterien angewendet und die Diagnose der paranoiden Schizophrenie (ICD-10: F20.0) gestellt. Darüber hinaus finden die folgenden psychometrischen Tests Anwendung:

- Positive and Negative Syndrome Scale (PANSS) [40]
- Scale for the Assessment of Negative Symptoms (SANS) [1]
- Scale for the Assessment of Positive Symptoms (SAPS) [1]
- Global Assessment of Functioning (GAF) [39]
- Clinical Global Impression (CGI) [32]

Alle Patienten befinden sich in Behandlung der psychiatrischen Abteilung des Universitätsklinikums Berlin (Charité, St. Hedwig Krankenhaus).

Die Blutentnahme erfolgt zu unterschiedlichen Tageszeitpunkten.

### 3.3. Selektion der microRNA

In einem ersten Arbeitsgang wird die Reverse Transkriptase quantitative Polymerase-Ketten-Reaktion (RT-qPCR, Reverse transcription quantitative polymerase chain reaction) für 16 Proben durchgeführt und es werden 192 microRNA untersucht. Hierfür werden alle microRNA ausgewählt, welche in vorangegangenen Studien in Serumproben oder Plasmaproben von Patienten mit einer Schizophrenie als potentiell mit der Erkrankung assoziiert eingestuft werden. Hierfür wird in der medizinischen Datenbank Pubmed mit den Suchbegriffen *microRNA*, *microRNA*, *miRNA* und *Serum bzw. Plasma*, sowie *schizophrenia* recherchiert. Es finden microRNA Beachtung, die in vorherigen Studien im Serum oder Plasma von Patienten mit einer Schizophrenie unterschiedlich exprimiert werden und in Studien beschrieben sind, deren Ergebnisse bis Januar 2017 publiziert werden. Ergänzt wird die Auswahl durch eine Reihe bekanntermaßen im Plasma oder Serum gut messbarer microRNA, um eine ausreichende Anzahl von microRNA für die angewendete Normalisierungsmethode zu erhalten. Dies bedeutet idealerweise, dass über 100 microRNA untersucht werden.

Im zweiten Schritt werden die verbliebenen 50 Proben mit einem reduzierten Panel von 121 Ziel-microRNA gemessen. Diese werden anhand der folgenden Kriterien ausgewählt:

- Expressionsstärke der Signale mit Setzung eines cutoff  $C_T \leq 34$ .
- Abundanz (Anzahl der positiven Signale pro  $n=16$  Proben basierend auf  $C_T \leq 34$ ). Ausschluss von Signalen mit mehr als 20% fehlenden Daten.
- Beurteilung der Probenqualität hinsichtlich möglicher Hämolyse (siehe Kapitel 3.4.3 für das angewendete Verfahren).

Für die weiteren Auswertungen werden die Ergebnisse der Messungen aus beiden Schritten herangezogen.

#### 3.3.1. Liste der microRNA

Im Folgenden sind die Ziel-microRNA in Tabelle 3.1 gelistet, welche für die hauptsächliche Analyse herangezogen werden.

## 3.4. Bestimmung der microRNA Expression im Serum

### 3.4.1. RNA Extraktion

Zunächst wird die gesamte RNA mittels des Qiagen miRNAeasy Serum/Plasma Kit (Qiagen,P/N 217184) isoliert.

Hierfür werden die Serumproben fünf Minuten bei 3000 g zentrifugiert. Anschließend werden 200  $\mu$ l Serum mittels QIAzol auf Phenol-Guanidin- Basis lysiert, um die RNA von anderen Bestandteilen der Probe zu trennen und RNasen zu inaktivieren. Während dieses Schrittes werden 1.25  $\mu$ l Bakteriophage RNA (Roche Applied Science), sowie 1  $\mu$ l eines Spike-in-Mix (UniSp2, UniSp4, UniSp5, RNA Spike-in Kit Exiqon, P/N203203) zur internen Qualitätskontrolle hinzugefügt. Durch Zugabe von 200  $\mu$ l Chloroform und anschließender Zentrifugation für 15 Minuten

### 3. Methoden und Material

hsa-let-7a-5p	hsa-let-7b-5p	hsa-let-7c-5p	hsa-let-7d-3p
hsa-let-7d-5p	hsa-let-7e-5p	hsa-let-7f-5p	hsa-let-7g-5p
hsa-let-7i-5p	hsa-miR-100-5p	hsa-miR-101-3p	hsa-miR-103a-3p
hsa-miR-106a-5p	hsa-miR-106b-5p	hsa-miR-122-5p	hsa-miR-1246
hsa-miR-125a-5p	hsa-miR-125b-5p	hsa-miR-1260a	hsa-miR-126-3p
hsa-miR-130a-3p	hsa-miR-130b-3p	hsa-miR-132-3p	hsa-miR-133a-3p
hsa-miR-140-3p	hsa-miR-140-5p	hsa-miR-142-3p	hsa-miR-142-5p
hsa-miR-143-3p	hsa-miR-144-3p	hsa-miR-144-5p	hsa-miR-145-5p
hsa-miR-146a-5p	hsa-miR-148a-3p	hsa-miR-148b-3p	hsa-miR-150-5p
hsa-miR-151a-3p	hsa-miR-151a-5p	hsa-miR-152-3p	hsa-miR-154-5p
hsa-miR-155-5p	hsa-miR-15a-5p	hsa-miR-15b-3p	hsa-miR-15b-5p
hsa-miR-16-2-3p	hsa-miR-16-5p	hsa-miR-17-5p	hsa-miR-181a-5p
hsa-miR-181b-5p	hsa-miR-185-5p	hsa-miR-18a-3p	hsa-miR-18b-5p
hsa-miR-191-5p	hsa-miR-193b-3p	hsa-miR-195-5p	hsa-miR-197-3p
hsa-miR-199a-3p	hsa-miR-19a-3p	hsa-miR-19b-3p	hsa-miR-20a-5p
hsa-miR-21-5p	hsa-miR-221-3p	hsa-miR-222-3p	hsa-miR-223-3p
hsa-miR-223-5p	hsa-miR-22-3p	hsa-miR-22-5p	hsa-miR-23a-3p
hsa-miR-23b-3p	hsa-miR-24-3p	hsa-miR-25-3p	hsa-miR-26a-5p
hsa-miR-26b-5p	hsa-miR-27a-3p	hsa-miR-27b-3p	hsa-miR-28-3p
hsa-miR-28-5p	hsa-miR-29b-3p	hsa-miR-29c-3p	hsa-miR-301a-3p
hsa-miR-30a-5p	hsa-miR-30b-5p	hsa-miR-30c-5p	hsa-miR-30d-5p
hsa-miR-30e-3p	hsa-miR-30e-5p	hsa-miR-320a	hsa-miR-320b
hsa-miR-320c	hsa-miR-320d	hsa-miR-324-3p	hsa-miR-324-5p
hsa-miR-328-3p	hsa-miR-338-3p	hsa-miR-339-3p	hsa-miR-339-5p
hsa-miR-342-3p	hsa-miR-34a-5p	hsa-miR-361-5p	hsa-miR-375
hsa-miR-423-3p	hsa-miR-423-5p	hsa-miR-424-5p	hsa-miR-425-3p
hsa-miR-425-5p	hsa-miR-451a	hsa-miR-454-3p	hsa-miR-484
hsa-miR-486-5p	hsa-miR-505-3p	hsa-miR-532-3p	hsa-miR-532-5p
hsa-miR-652-3p	hsa-miR-660-5p	hsa-miR-7-5p	hsa-miR-877-5p
hsa-miR-92a-3p	hsa-miR-93-3p	hsa-miR-93-5p	hsa-miR-99a-5p
hsa-miR-99b-5p			

Tabelle 3.1.: Liste der microRNA.

bei 12.000 g erfolgt die Phasen-Trennung. Die RNA in der wässrigen Phase wird dann mittels 100 %-igem Ethanol präzipitiert und anschließend auf einem Säulen-basierten Filtersystem gesammelt. Hierfür erfolgt zunächst die Zentrifugation nach Gabe von 650 µl des Gemisches auf das Filtersystem für 15 Sekunden bei 8000 g. Dieser Schritt wird wiederholt bis die Probe aufgebraucht ist. Anschließend erfolgt die wiederholte Zentrifugation in mehreren Schritten nach Zugabe von jeweils einem RWT und RPE Puffer auf das Filtersystem, sowie in einem weiteren Schritt nach Zugabe von 500 µl 80 %-igem Ethanol auf den Filter. In einem letzten Schritt erfolgt nach erneuter Zentrifugation bei 16.100 g für eine Minute die Elution der RNA aus dem Filter mittels 22 µl RNase freiem Wasser und die vorübergehende Aufbewahrung der eluierten RNA bei  $-80^{\circ}\text{C}$ .

#### 3.4.2. Reverse-Transkriptase quantitative Polymerase-Ketten-Reaktion

Die extrahierte RNA wird unter Verwendung des Universal cDNA synthesis kit II (Exiqon, P/N203301) in komplementäre DNA (cDNA, complementary DNA) umgeschrieben. Hierfür werden jeweils 4 µl RNA mit 16 µl Master-Mix zu einer final 20 µl enthaltenden Reaktions-Mischung zusammengefügt. Der cDNA Master Mix enthält die folgenden Komponenten: 4 µl Reaktions-Puffer, 9 µl RNase freies Wasser, 2 µl Enzym-Mix und 1 µl eines Spike-in-Mix (UniSp6, cel-miR-39-3p, Exiqon P/N203203) als interne Kontrolle für die Konvertierung zu cDNA. Die reverse Transkription erfolgt bei  $42^{\circ}\text{C}$  für 60 Minuten und  $95^{\circ}\text{C}$  für 5 Minuten in einem qTower 2.2 (Jena Analytik).

Die erzeugte cDNA wird im nächsten Schritt 1:50 in nuklease freiem Wasser verdünnt und anschließend 1:1 mit dem PCR Master Mix kombiniert – entsprechend des Protokolls für Pick-and-Mix-Platten (miRCURY LNA<sup>TM</sup> Universal RT microRNA PCR, v6.2). Für die Amplifikation werden je 10 µl der verdünnten cDNA der Probe pro well auf eine Pick-and-Mix microRNA PCR Platte mit bereits platzierten LNA primern pipettiert. Analog wird zur Detektion des Hintergrundrauschens RNase freies Wasser anstelle der RNA extrahiert und als *no template control* gemessen. Die Messung erfolgt nach folgendem Protokoll:  $95^{\circ}\text{C}$  für 10 Minuten, 45 Amplifikationszyklen bei  $95^{\circ}\text{C}$  für 10 Sekunden und bei  $60^{\circ}\text{C}$  für 60

Sekunden (Fluoreszenzmessung) mit folgender Schmelzkurvenanalyse. Die Amplifikation erfolgt in einem LightCycler 480 (Roche).

Im Rahmen der RT-qPCR erfolgen in einem Durchlauf Amplifikation, Detektion und Quantifikation des PCR-Produktes im Rahmen einer Weiterentwicklung früherer PCR-Methoden [13]. Die Darstellung des Messergebnisses erfolgt in 'real-time'. Möglich wird die Detektion durch Einlagerung bzw. Interkalation des fluoreszierenden Farbstoffes (in diesem Fall *SYBR-green* [62]). Hierdurch verstärkt sich die Emission des ansonsten nur schwach fluoreszierenden *SYBR-green*. Überschreitet die Menge amplifizierter cDNA bzw. der eingelagerte Farbstoff zu einem bestimmten Zeitpunkt (Überschreitungspunkt ( $C_P$ , crossing point)) erstmals einen Schwellenwert (Schwellenwert-Zyklus ( $C_T$ , threshold Cycle)), wird dieser ermittelt und erlaubt dem System (LightCycler) einen Rückschluss auf die anfängliche Menge des cDNA-Templates in der Probe. Liegt die cDNA in hoher Kopienanzahl vor, wird der Schwellenwert mit weniger Zyklen und somit schneller erreicht. Die Auswertung erfolgt in dieser Arbeit im Rahmen der relativen Quantifizierung (siehe Normalisierung und Fold Change (FC)).

#### 3.4.3. Prä-Prozessierung, Qualitätskontrollen und relative Quantifizierung

##### Qualitätskontrollen

In der hauptsächlichen Analyse werden (anders als in der vorangegangenen Analyse) microRNA Signale mit einem  $C_T \leq 37$  als aktiv exprimiert gewertet.

An erster Stelle erfolgt die Kalibration zwischen den Platten (IPC, Interplate Calibration) mittels einer durch den Hersteller auf jeder Platte vorplatzierten Reaktion (UniSp3 IPC). Zu Grunde liegt die folgende Gleichung:

$$C_T^{\text{norm}}(s, j) = C_T(s, j) - \left( \frac{1}{|IPC|} \sum_{i \in IPC} C_T(i, j) - \frac{1}{|PLT|} \sum_{k \in PLT} \frac{1}{|IPC|} \sum_{i \in IPC} C_T(i, k) \right),$$

### 3. Methoden und Material

mit  $s \in S$ . Hierbei bezeichnet  $S$  die Indexmenge der gemessenen Reaktionen von Interesse,  $IPC$  die Menge der interplate calibration spikes und  $PLT$  die Indexmenge der Platten. Diese Berechnungen entsprechen der Empfehlung und Beschreibung im Handbuch des Herstellers Exiqon.

Die No template control (NTC) erfasst den Hintergrund der einzelnen Signale. Ist die Differenz zwischen den  $C_T$ -Werten einer NTC und ihrer Probe  $> 5$  kann eine Verunreinigung oder das Auftreten von Primer-Dimeren für das entsprechende Signal nicht ausgeschlossen werden und der  $C_T$ -Wert wird ausgeschlossen.

Ausreißer bezogen auf die RNA-Extraktion und cDNA-Synthese werden anhand der Spike-in-Kontrollen (siehe RNA-Extraktion und cDNA-Synthese) nach dem *Ausreißertest nach Grubbs* identifiziert. Diese exogenen Kontrollen spiegeln jede Variation im Protokoll wider und kontrollieren somit die Effizienz von RNA-Extraktion, cDNA-Synthese und Amplifikation.

Die Schmelzkurvenanalyse bildet die Dissoziationscharakteristika der doppelsträngigen Desoxyribonukleinsäure (DNA, deoxyribonucleic acid) durch ihre Denaturierung bei einer spezifischen Schmelztemperatur ab. Gemessen wird die Abnahme der Fluoreszenz durch das freigesetzte SYBR green (ein Cyanin Farbstoff zur Detektion doppelsträngiger DNA). Es wird  $-dF/dT$  gegen die Temperatur geplottet, sodass pro Signal ein spezifischer Peak (die Schmelztemperatur  $T_m$ ) entstehen sollte. Signale bei denen ein signifikanter zweiter Peak entsteht, weisen auf ein unspezifisches Signal hin und werden demnach ausgeschlossen.

Proben mit einem hohen Risiko für Hämolyse werden anhand der von Blondal et al. publizierten Methode identifiziert [11]. Hierfür wird ein  $\Delta C_T = C_T(\text{miR-23a}) - C_T(\text{miR-451}) \geq 7$  als auf Hämolyse hinweisend gewertet und die entsprechenden Proben werden ausgeschlossen; siehe Abbildung 4.1.

Durch Prozessierung und Qualitätskontrollen entstehen fehlende Daten. Zur Analyse robuster Signale werden Signale mit  $> 20\%$  fehlender Daten von weiteren Analysen ausgeschlossen.

## Relative Quantifizierung

Zur Quantifizierung in der RT-qPCR stehen zwei Strategien zur Verfügung. Die absolute Quantifizierung erfolgt mittels einer Kalibrierungskurve, welche auf einer Verdünnungsreihe (beispielsweise von RNA Oligomeren) basiert. Sie erlaubt die Bestimmung der exakten Anzahl der Transkripte bzw. der vorliegenden Kopien. Bei der relativen Quantifizierung wird die Expression eines Zielgens einer Probe auf mehrere, nicht regulierte, Referenzgene bezogen. Bei den Referenzgenen handelt es sich um konstitutiv exprimierte Gene, die eine konstante Kopienzahl unter allen getesteten Bedingungen zeigen und nicht reguliert sind. Man nennt diesen Vorgang auch Normalisierung der Expressionsergebnisse. Die normierte Expression wird mit der einer anderen Probe verglichen, so dass sich die relative Änderung der Genexpression darstellt. Es ergibt sich somit eine relative, dimensionslose Zahl, die sich ausschließlich zum Vergleich mit anderen Proben eignet. Für die Normalisierung können in einem Pilotprojekt identifizierte Referenzgene herangezogen werden. Alternativ werden alle gemessenen Signale für den Bezug herangezogen. Für die Normalisierung von microRNA eignet sich die in dieser Arbeit angewandte Normalisierung über den *Global Mean*, welche im Folgenden erläutert wird.

In der vorliegenden Arbeit wird die Strategie der relativen Quantifizierung gewählt. Die Normalisierung wird durchgeführt, indem der *Global Mean* [18] aller microRNA für jede Probe bestimmt wird. Hierfür wird der arithmetische Mittelwert aller Signale einer Probe berechnet und dieser von jedem einzelnen  $C_T$  Wert subtrahiert um  $\Delta C_T$  Werte zu erhalten (siehe Gleichung (3.1)). Zur präzisen Darstellung werden die folgenden Bezeichnungen eingeführt.

Die Menge der Probanden wird mit  $P$  bezeichnet und setzt sich aus den disjunkten Mengen der Kontrollgruppe  $K$  und Probanden  $D$ , die mit Schizophrenie diagnostiziert wurden, zusammen; in Zeichen  $P = K \dot{\cup} D$ . Mit  $R$  wird die Menge der untersuchten microRNA bezeichnet.

Es gilt,

$$\Delta C_T(p, r) := C_T(p, r) - \frac{1}{|R|} \sum_{i \in R} C_T(p, i), \quad \text{wobei } p \in P \text{ und } r \in R. \quad (3.1)$$

Um die relativen Expressionsniveaus darzustellen wird die  $\text{sgn}(\Delta \Delta C_T) 2^{|\Delta \Delta C_T|}$  Me-

thode verwendet – maßgeblich entsprechend der von Livak et al. publizierten Methode [51].

Für eine microRNA wird der arithmetische Mittelwert über alle Proben der Kontrollgruppe von dem arithmetischen Mittelwert aller Proben der erkrankten Probanden über die  $\Delta C_T$  Werte subtrahiert um die  $\Delta\Delta C_T$  Werte zu erhalten.

Die  $\Delta\Delta C_T$  Werte zur Berechnung der relativen Quantifizierung,

$$\Delta\Delta C_T(r) := \frac{1}{|D|} \sum_{i \in D} \Delta C_T(i, r) - \frac{1}{|K|} \sum_{i \in K} \Delta C_T(i, r), \quad \text{mit } r \in R. \quad (3.2)$$

Der relative Expressionsunterschied kann mit Hilfe der  $\Delta\Delta C_T$  Werte dargestellt werden,

$$FC(r) := \text{sgn}(\Delta\Delta C_T) 2^{|\Delta\Delta C_T|}, \quad \text{mit } r \in R; \quad (3.3)$$

hier ist  $\text{sgn}(\cdot)$  die Signumfunktion. Diese ist definiert als,

$$\text{sgn}(x) = \begin{cases} +1 & \text{falls } x > 0, \\ 0 & \text{falls } x = 0, \\ -1 & \text{falls } x < 0. \end{cases}$$

Ein positiver Expressionsunterschied bedeutet in der Analyse hoch regulierte microRNA in der Erkrankungsgruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe, während negative Werte für herunter regulierte microRNA im Gruppenvergleich stehen.

Expressionsunterschiede, deren Betrag größer gleich 1.5 ist, werden als unterschiedlich reguliert und biologisch relevant gewertet.

## 3.5. Liste der Materialien

### Geräte und Apparaturen

LightCycler® 480 (Roche)

qTower 2.2 (Jena Analytik)

Zentrifuge Typ 5415 D (Eppendorf)

### 3. Methoden und Material

Zentrifuge Typ Perfect Spin (VWR Peqlab)

Vortex Typ Reax 1 (Heidolph)

Multipette E3 (Eppendorf)

#### **Verbrauchsmaterialien**

Microcentrifuge tube 2 ml(Eppendorf)

Microcentrifuge tube 1,5 ml (Sarstedt)

Microcentrifuge tube 0,5 ml (Eppendorf)

Microcentrifuge tube 0,2 ml (Sarstedt)

PCR adhesive foil REF 95.1999 (Sarstedt)

Pipettenspitze 10 µl (Eppendorf)

Pipettenspitze 20 µl (Biosphere)

Pipettenspitze 100-1000 µl (Eppendorf)

Combitips advanced 0,2 ml (Eppendorf)

Combitips advanced 1 ml (Eppendorf)

Extra long pipette tips 1250 µl (Biosphere)

Phase Lock Gel<sup>TM</sup> Heavy (5Trime)

#### **Reaktionskits und Spike-ins**

Qiagen miRNAeasy Serum/Plasma Kit (Qiagen,P/N 217184)

- QIAzol® Lysis Reagent
- Buffer RWT
- Buffer RPE
- Reaction tubes

ExiLENT SYBR® Green master mix, 20 ml (P/N 203421, Exiqon)

MS2 Bakteriophage RNA (Roche Applied Science)

RNA Spike-in Kit, Uni RT (Exiqon, P/N203203)

- Spike-in assay UniSp2, UniSp4, UniSp5, cel-miR-39-3p

Universal cDNA Synthesis Kit II (Exiqon, P/N 203301)

- 5x Reaction buffer
- Enzyme mix
- Nuclease free water
- UniSp6, RNA spike-in template

#### **Chemikalien, Puffer und Lösungen**

Ethanol (Produktnummer 1.00983.2500, Merck)

Chloroform (ohne isoamyl alcohol) (Produktnummer C2432, Sigma)

## **3.6. Statistik**

Entsprechend einer explorativen Datenbetrachtung und bei ausreichend großer Stichprobe wird von annähernd normalverteilten Daten ausgegangen und der t-Test für den Vergleich zwischen den zwei Testgruppen angewendet. Es wird nach Benjamini-Hochberg für multiple Vergleiche korrigiert. Als Signifikanzlevel wird  $\alpha = 0.05$  nach Benjamini-Hochberg-Korrektur gesetzt.

Zum Ausschluss signifikant unterschiedlicher Geschlechterverteilung zwischen Schizophrenie- und Kontrollgruppe wird der Chi-Quadrat-Test angewendet. Um signifikante Unterschiede hinsichtlich der Altersverteilung in beiden Gruppen auszuschließen wird der Welch's t-Test angewendet. Ebenso wird durch den Welch's t-Test auf Unterschiede der Bildungsjahre zwischen Schizophrenie- und Kontrollgruppe getestet.

Zur Prüfung von Korrelationen zwischen microRNA und Krankheitscharakteristika wird die Methode nach Pearson angewendet.

Zur Einschätzung von Spezifität und Sensitivität wird die Fläche unter der Grenzwertoptimierungskurve (AUC, area under the receiver operating characteristics

curve) berechnet und mit Hilfe der Grenzwertoptimierungskurve (ROC, Receiver Operating Characteristics) dargestellt.

Die statistischen Analysen und graphischen Darstellungen erfolgen mittels der statistischen Programmiersprache R (Version 3.4.2).

## 4. Ergebnisse

### 4.1. Merkmale der Studienpopulation

Die Geschlechterverteilung innerhalb der Schizophreniegruppe zeigt sich getestet durch den Chi-Quadrat-Test nicht signifikant unterschiedlich zu jener in der Kontrollgruppe ( $\chi^2(2, n = 52) = 0.30831, p > 0.05$ ).

Die Altersverteilung innerhalb der Schizophreniegruppe ( $M = 35.19, SD = 10.95$ ) weist keinen signifikanten Unterschied zur Altersverteilung in der Kontrollgruppe ( $M = 38.92, SD = 10.27, t(1) = 1.2552, p > 0.05$ ) entsprechend dem Welch's t-Test auf.

Der Mittelwert des Alters bei Erstmanifestation der Erkrankung liegt in der Schizophreniegruppe bei 27 Jahren ( $SD = 8.92$ ). Die mittlere Erkrankungsdauer liegt bei 15 Jahren ( $SD = 7.41$ ). Die Ausprägung der Symptomatik liegt abgebildet durch den PANSS im Mittel bei einem Gesamtscore von 66 ( $SD = 20.69$ ). (siehe Tabelle 4.1).

Für die Bildungsjahre zeigt sich kein signifikanter Unterschied zwischen der Schizophreniegruppe ( $M = 13.31, SD = 4.23$ ) und der Kontrollgruppe ( $M = 14.90, SD = 3.27, t(1) = 1.4913, p > 0.05$ ) entsprechend der Testung durch den Welch's t-Test.

## 4. Ergebnisse

Charakteristika			p-Wert S vs. K	
	Schizophrenie (n=28)	Kontrolle (n=24)	$\chi^2$	t-Test
Geschlecht	12/15 (w/m)	13/11 (w/m)	0.5787	
Alter (Jahre)	M 35.19 (SD 10.95)	M 38.92 (SD 10.27)		0.2154
Bildungsjahre	M 13.31 (SD 4.23)	M 14.90 (SD 3.27)		0.1426
PANSS	M 65.85 (SD 20.69)	na		
SANS	M 23.19 (SD 14.21)	na		
SAPS	M 23.59 (SD 19.74)	na		

Tabelle 4.1.: Demografische und psychometrische Charakteristika der Probanden. S = Schizophreniegruppe, K = Kontrollgruppe, M = Mittelwert, SD = Standardabweichung, na = not available.

### 4.2. Qualitätskontrollen und fehlende Werte

Proben ( $n = 5$ ) mit weniger als 80 % validen Daten bei einem zu Grunde liegenden Cut-Off von  $C_T \leq 37$  werden im ersten Schritt ausgeschlossen.

Entsprechend der bereits (siehe Kapitel 3.4.3) beschriebenen Strategie werden sechs Proben aufgrund eines hohen Risikos für Hämolyse ausgeschlossen. Eine weitere Probe wird aufgrund fehlender Signale der für die Anwendung der Strategie notwendigen microRNA ausgeschlossen (siehe Abb. 4.1).

Die RNA-Isolation wird durch Hinzugabe der synthetischen microRNA UniSp2 (simuliert ein hoch exprimiertes Signal), UniSp4 (simuliert ein mäßig exprimiertes Signal) und UniSp5 (simuliert ein niedrig exprimiertes Signal) kontrolliert. Die cDNA-Synthese wird durch Hinzugabe von UniSp6 und cel-miR-39 überwacht. Im Allgemeinen zeigt sich eine konstante Effizienz der Extraktion ohne Zeichen einer Inhibition in der reversen Transkription zu cDNA. Zwei Proben werden entsprechend dem *Ausreißertest nach Grubbs* identifiziert und entsprechend ausgeschlossen (siehe Abb. A.1a und A.1b).

Die Anzahl der Serumproben reduziert sich nach Anwendung der Qualitätskontrollen von  $n=66$  auf  $n=52$ .

Entsprechend der Negativkontrolle und der Maßgabe von zumindest 80 % validen Daten, werden 16 microRNA nicht für weitere Analysen herangezogen (hsa-miR-7-5p, hsa-miR-17-5p, hsa-miR-133a-3p, hsa-miR-877-5p, hsa-miR-532-5p, hsa-miR-505-3p, hsa-miR-454-3p, hsa-miR-375, hsa-miR-328-3p, hsa-miR-30e-3p, hsa-miR-

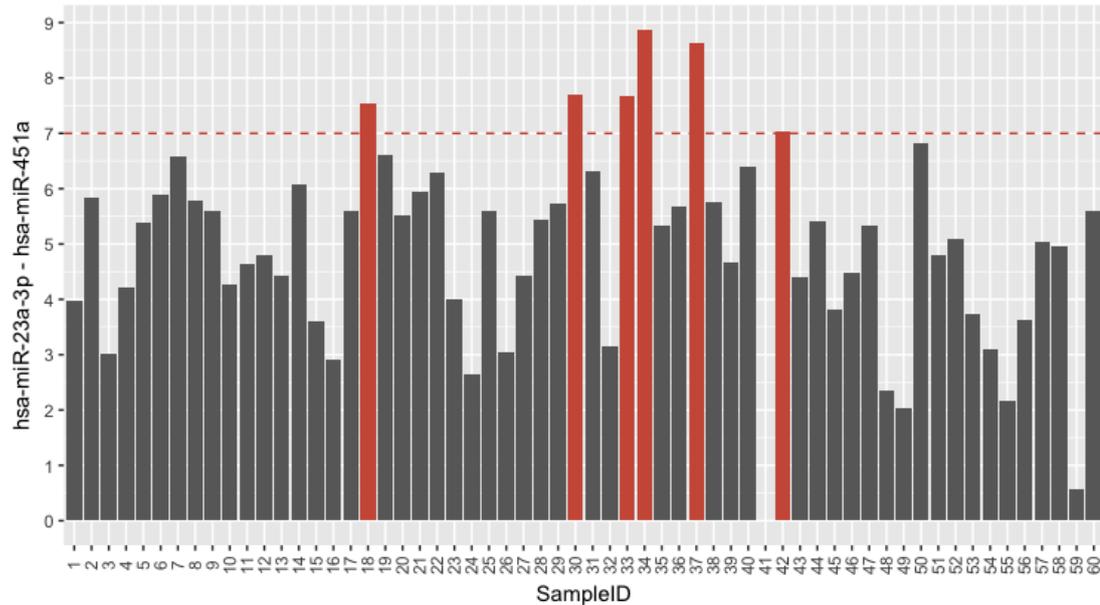


Abbildung 4.1.: Hämolyse-Plot. Ein  $\Delta C_T = C_T(\text{miR-23a}) - C_T(\text{miR-451}) \geq 7$  wird entsprechend der Methode von Blondal et al. als hinweisend auf eine vorliegende Hämolyse gewertet.

28-3p, hsa-miR-22-5p, hsa-miR-193b-3p, hsa-miR-15b-3p, hsa-miR-1260a, hsa-miR-1246). Die Anzahl der microRNA reduziert sich somit von  $n = 121$  auf  $n = 105$ .

### 4.3. Expressionsanalyse

Insgesamt werden jeweils 105 microRNA in 52 Serumproben für die Analysen herangezogen. Die differentielle Expressionsanalyse ergibt  $n = 3$  Signale, deren Expressionslevel sich jeweils um zumindest den Faktor  $|1.5|$  zwischen den Gruppen unterscheidet. So ergibt sich eine relative Erhöhung von hsa-miR-148a-3p (FC = 1,95) in der Schizophreniegruppe. Es zeigen sich hsa-let-7b-5p (FC = -1,90) und hsa-miR-150-5p (FC = -1,59) relativ erniedrigt (siehe Tabelle 4.2, sowie Abb. 4.2).

Einige microRNA zeigen einen Trend hin zu signifikanten Unterschieden der Expression zwischen der Schizophreniegruppe und der Kontrollgruppe im Vergleich mittels t-Test und werden entsprechend im Folgenden diskutiert (siehe Kapitel

## 4. Ergebnisse

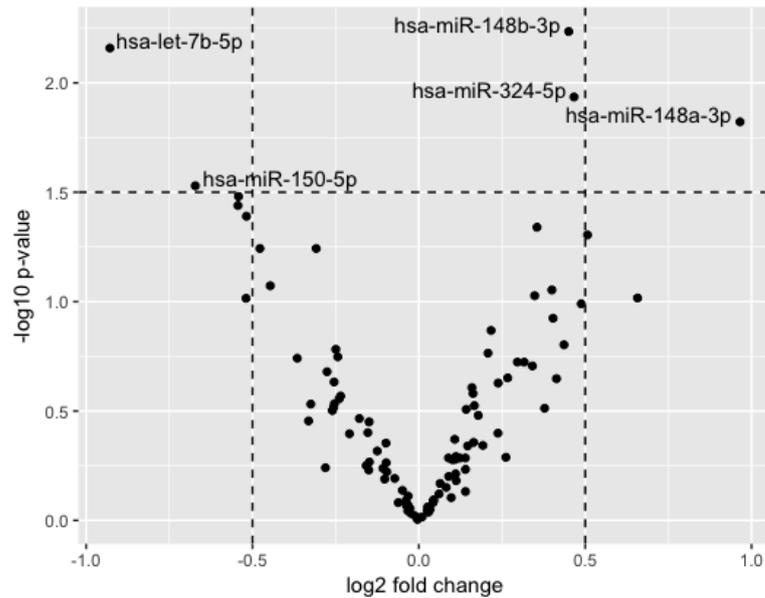


Abbildung 4.2.: Volcano-Plot: die microRNA hsa-let-7b-5p und hsa-miR-150-5p zeigen sich relativ herunterreguliert, während sich hsa-miR-148a-3p relativ hoch reguliert zeigt.

5). Nach Benjamini-Hochberg-Korrektur (Signifikanzlevel  $\alpha = 0.05$ ) ergeben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen.

In der ROC Analyse ergibt sich für hsa-let-7b-5p eine AUC von 0.71 (95 % CI: 0.56-0.85) und für hsa-miR-150-5p eine AUC von 0.71 (95 % CI: 0.57-0.86). Für hsa-miR-148a-3p ergibt sich eine AUC von 0.67 (95 % CI: 0.54-0.83) (siehe Tabelle 4.5, siehe Abb. 4.3).

In der explorativen Datenanalyse ergeben sich zudem keine relevanten Cluster im Rahmen der Cluster-Analyse (siehe Abbildung A.3).

### 4.4. Korrelationsanalyse

In der Korrelationsanalyse zeigt sich eine vor Korrektur signifikante Korrelation von miR-150-5p ( $r = 0.551$ ,  $p = 0.003$ ) mit dem Gesamt-Score des PANSS, sowie dem anteiligen Score für Positivsymptomatik ( $r = 0.463$ ,  $p = 0.015$ ) und Negativsymptomatik ( $r = 0.433$ ,  $p = 0.541$ ) (siehe Abb. A.2a A.2b A.2c). Nach

miRNA	Schizophrenie	Kontrolle	t-Test	Expressionsunterschiede
hsa-*	M (SD / NAs)	M (SD/ NAs)	p-Werte (BH)	Ratio
miR-148b-3p	0,48 (0,52/0)	0,93 (0,59/0)	0,0058 (0,3639)	1,3666
let-7b-5p	-1,72 (1,47/0)	-2,65 (0,85/0)	0,0069 (0,3639)	-1,9034
miR-324-5p	2,99 (0,61/1)	3,46 (0,65/0)	0,0116 (0,3957)	1,3818
miR-148a-3p	0,36 (1,24/0)	1,33 (1,48/0)	0,0151 (0,3957)	1,9527
miR-150-5p	-0,94 (1,07/0)	-1,61 (1,09/0)	0,0295 (0,5001)	-1,5931
miR-342-3p	-0,24 (0,97/0)	-0,78 (0,81/0)	0,0330 (0,5001)	-1,4560
miR-155-5p	4,31 (0,85/1)	3,77 (0,94/0)	0,0364 (0,5001)	-1,4577
miR-181b-5p	4,55 (0,95/3)	4,04 (0,69/4)	0,0407 (0,5001)	-1,4321
miR-423-3p	0,08 (0,69/0)	0,43 (0,56/0)	0,0457 (0,5001)	1,2792
miR-142-5p	1,70 (0,91/0)	2,21 (0,90/0)	0,0495 (0,5001)	1,4211

Tabelle 4.2.: t-Test und Expressionsunterschiede (Ratio). Der relative Expressionsunterschied wird mit Hilfe der  $\Delta\Delta C_T$  Werte dargestellt. Negative Werte zeigen Herunterregulation bei Patienten mit einer Schizophrenie im Vergleich zur Kontrollgruppe an und umgekehrt. Die angegebenen Mittelwerte und deren Standardabweichungen beziehen sich auf die  $\Delta C_T$ -Werte. BH = Benjamini-Hochberg-Korrektur, M = Mittelwert, SD = Standard deviation, NA = not available.

Korrektur nach Benjamini-Hochberg ergeben sich keine signifikanten Korrelationen zwischen der Expression der getesteten microRNA und dem PANSS (Gesamtscore, Score für Positivsymptomatik und Score für Negativsymptomatik), der Erkrankungsdauer oder dem Alter der Erstmanifestation der Erkrankung (siehe Tabellen 4.3, 4.4).

## 5. Diskussion

### 5.1. Ergebnisse

Zunächst werden hsa-let-7b-5p, hsa-miR-148a-3p, hsa-miR-148b-3p, hsa-miR-324-5p, hsa-miR-150-5p, hsa-miR-342-3p, hsa-miR-155-5p, hsa-miR-181b-5p, hsa-miR-423-3p und hsa-miR-142-5p im t-Test als unterschiedlich zwischen den Gruppen

## 5. Diskussion

	Erkrankungsdauer		Erstmanifestation	
	p-Wert (BH)	r-Wert	p-Wert (BH)	r-Wert
hsa-miR-324-5p	0.229 (0.923)	-0.255	0.480 (0.923)	-0.152
hsa-miR-148a-3p	0.507 (0.923)	0.139	0.109 (0.923)	0.329
hsa-miR-148b-3p	0.861 (0.936)	-0.037	0.496 (0.923)	0.143
hsa-miR-423-3p	0.471 (0.923)	-0.151	0.737 (0.923)	-0.071
hsa-miR-142-5p	0.810 (0.923)	-0.051	0.204 (0.923)	0.263
hsa-miR-181b-5p	0.433 (0.923)	-0.176	0.937 (0.959)	0.018
hsa-let-7b-5p	0.787 (0.923)	-0.057	0.522 (0.923)	-0.135
hsa-miR-155-5p	0.707 (0.923)	0.081	0.664 (0.923)	0.093
hsa-miR-150-5p	0.347 (0.923)	-0.196	0.403 (0.923)	0.175
hsa-miR-342-3p	0.645 (0.923)	0.097	0.155 (0.923)	0.293

Tabelle 4.3.: Korrelation Erkrankungsdauer und Erkrankungsmanifestation mit ausgewählten microRNA (BH=Benjamini-Hochberg-Korrektur).

hsa-*	PANSS (gesamt)		PANSS (positiv)		PANSS (negativ)	
	p-Wert (BH)	r-Wert	p-Wert (BH)	r-Wert	p-Wert (BH)	r-Wert
miR-324-5p	0.438 (0.930)	-0.159	0.577 (0.930)	-0.115	0.120 (0.748)	-0.313
miR-148a-3p	0.772 (0.973)	-0.058	0.407 (0.930)	-0.166	0.925 (0.977)	-0.019
miR-148b-3p	0.576 (0.930)	-0.113	0.379 (0.930)	-0.176	0.658 (0.973)	0.089
miR-423-3p	0.470 (0.930)	0.145	0.770 (0.973)	0.059	0.256 (0.889)	0.226
miR-142-5p	0.485 (0.930)	-0.140	0.289 (0.886)	-0.216	0.940 (0.977)	-0.015
miR-181b-5p	0.745 (0.973)	0.070	0.545 (0.930)	0.130	0.812 (0.973)	-0.051
let-7b-5p	0.227 (0.886)	0.240	0.719 (0.973)	0.073	0.215 (0.886)	0.246
miR-155-5p	0.504 (0.930)	0.137	0.217 (0.886)	0.250	0.831 (0.973)	-0.044
miR-150-5p	0.003 (0.145)	0.551	0.015 (0.252)	0.463	0.024 (0.261)	0.433
miR-342-3p	0.595 (0.930)	0.107	0.995 (0.995)	-0.001	0.541 (0.930)	0.123

Tabelle 4.4.: Korrelation des PANSS (Gesamtscore, Score für Positivsymptomatik, Score für Negativsymptomatik) mit ausgewählten microRNA

## 5. Diskussion

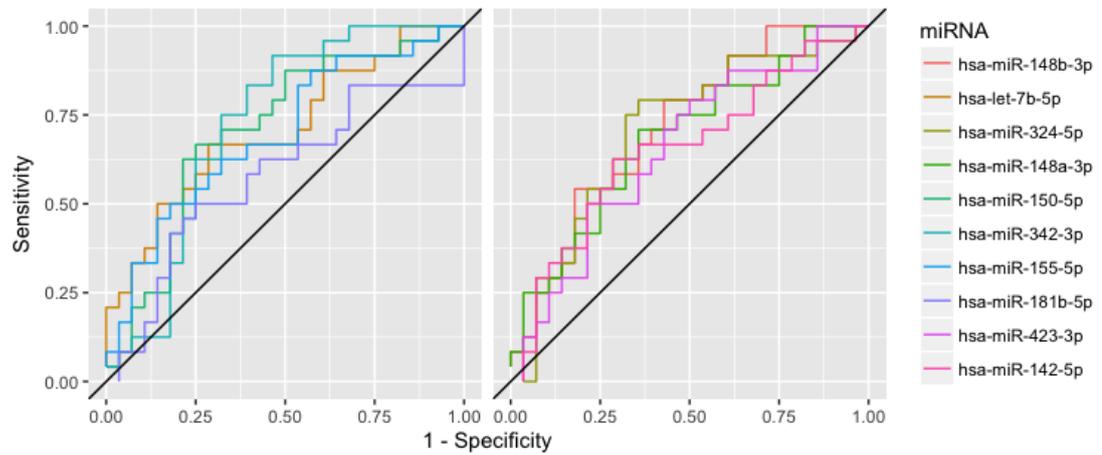


Abbildung 4.3.: ROC-Kurven. In der linken Abb. finden sich die relativ herunter regulierten microRNA. In der rechten Abb. sind ROC-Kurven der relativ hoch regulierten microRNA gezeigt.

microRNA	AUC
hsa-miR-148b-3p	0.72 (95 % CI: 0.58-0.86)
hsa-let-7b-5p	0.71 (95 % CI: 0.56-0.85)
hsa-miR-324-5p	0.71 (95 % CI: 0.56-0.85)
hsa-miR-148a-3p	0.67 (95 % CI: 0.54-0.83)
hsa-miR-150-5p	0.71 (95 % CI: 0.57-0.86)
hsa-miR-342-3p	0.73 (95 % CI: 0.58-0.87)
hsa-miR-155-5p	0.69 (95 % CI: 0.55-0.84)
hsa-miR-181b-5p	0.59 (95 % CI: 0.43-0.75)
hsa-miR-423-3p	0.66 (95 % CI: 0.50-0.81)
hsa-miR-142-5p	0.66 (95 % CI: 0.50-0.81)

Tabelle 4.5.: AUC der ROC-Kurve. Gezeigt sind die Werte für die *Area under the ROC curve* für ausgewählte microRNA.

## 5. Diskussion

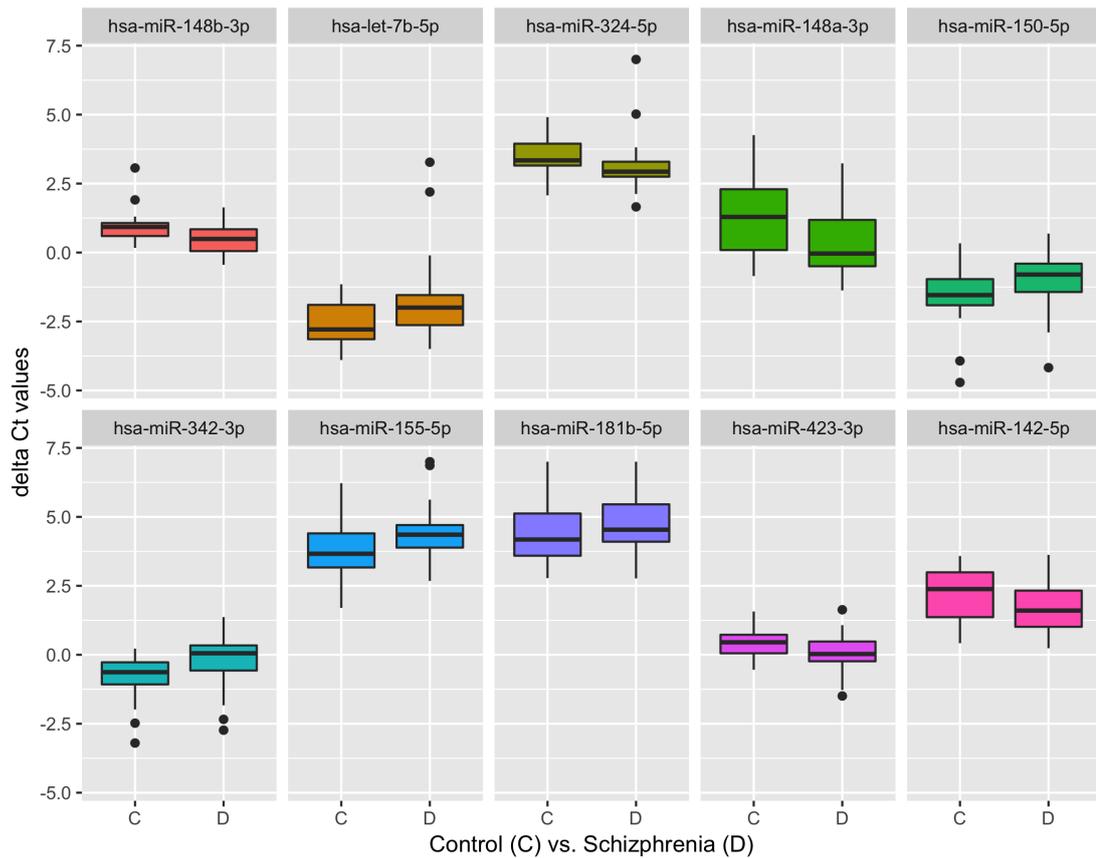


Abbildung 5.1.: Boxplots: Niedrige  $\Delta C_T$ -Werte zeigen relativ hoch regulierte microRNA und umgekehrt.

exprimiert identifiziert (siehe Abb. 5.1). Jedoch werden nach Benjamini-Hochberg-Korrektur keine signifikanten Unterschiede zwischen den Testgruppen gefunden.

Während sich hsa-miR-148a-3p in der relativen Quantifizierung hoch reguliert in der Gruppe der Patienten mit einer Schizophrenie im Vergleich zur Kontrollgruppe zeigt, zeigen sich hsa-let-7b-5p und hsa-miR-150-5p entsprechend der ermittelten Expressionsunterschiedes relativ herunter reguliert.

In der ROC Analyse ergibt sich unter diesen als biologisch relevant unterschiedlich exprimierten microRNA (hsa-miR-148a-3p, hsa-let-7b-5p, hsa-miR-150-5p), eine relevante Sensitivität und Spezifität für hsa-miR-148a-3p (0.67 (95 % CI: 0.54-0.83)), hsa-let-7b-5p (0.71 (95 % CI: 0.56-0.85)) und hsa-miR-150-5p (0.71 (95 % CI: 0.57-0.86)).

Im nächsten Schritt ergibt sich für hsa-miR-150-5p eine vor Korrektur signifikante

## 5. Diskussion

Korrelation mit dem PANSS-Score ( $r = 0.551$ ,  $p = 0.003$ ).

Für die hsa-miR-150 postulieren Sellier et al. einen möglichen Zusammenhang zwischen einer verringerten Expression dieser microRNA und einer Haploinsuffizienz des DGCR8 Genes im peripheren Blut von Probanden mit entsprechender Mutation im Vergleich zu einer gesunden Kontrollgruppe. Das entsprechende Gen ist relevant für das 22q11.2 Deletionssyndrom, welches mit dem gehäuften Auftreten einer Schizophrenie assoziiert ist und könnte somit für die Untersuchung in folgenden Studien interessant sein [72]. Interessanterweise wird die Herunterregulation dieser zirkulierenden microRNA für andere Erkrankungen, wie beispielsweise eine fortgeschrittene Herzinsuffizienz [71] diskutiert. In zukünftigen Studien mit großen Fallzahlen könnte es sinnvoll sein, Patienten entsprechend häufiger zusätzlich vorliegender Erkrankungen besser zu charakterisieren. Beispielsweise haben Patienten mit einer Schizophrenie ein insgesamt erhöhtes Risiko an einer kardiovaskulären Erkrankung zu erkranken, als die Normalbevölkerung [33]. Es bedarf Studiendesigns, die zu einem besseren ätiologischen Verständnis der in unterschiedlichen Erkrankungen gefundenen microRNA beitragen und die Spezifität der Ergebnisse erhöhen.

Da in der Literatur für Serum- bzw. Plasmaproben reproduziert und wiederholt beschrieben, ist zudem die hsa-miR-181b-5p zu diskutieren [75, 73]. Diese weist in dieser Untersuchung entsprechend dem t-Test vor Korrektur nach Benjamini-Hochberg ebenfalls einen Gruppenunterschied zwischen Schizophrenie ( $M = 4.55$ ,  $SD = 0.95$ ) und Kontrolle ( $M = 4.04$ ,  $SD = 0.69$ ) auf ( $p = 0.0401$ ,  $BH = 0.5001$ ). Der relative Expressionsunterschied ist  $-1,4321$ , somit ist dessen Betrag knapp unterhalb der als relevant gewerteten Grenze von  $1,5$  angesiedelt. Auffallend ist ein vergleichsweise hoher Anteil fehlender Werte für diese microRNA. Die hsa-miR-181b wird ebenfalls im Gehirngewebe beschrieben und in Zusammenhang mit möglicherweise relevanten Zielgenen gebracht [10]. Die Charakterisierung von Subgruppen in weiteren Studien könnte zu differenzierten und reproduzierbaren Ergebnissen für diese microRNA beitragen.

Unter den aufgrund der beschriebenen Qualitätskontrollen ausgeschlossenen microRNA befinden sich in der Literatur als interessant beschriebene microRNA für die Schizophrenie. So sind miR-30e und miR-7 für Serum bzw. Plasma [75] beschrieben, sowie miR-17-5p und miR-328 mit veränderter Expression im dorsolateralen präfrontalen Cortex von Patienten mit einer Schizophrenie [68]. Diese

microRNA könnten somit für folgende Untersuchungen weiterhin von Interesse sein.

Für die Eignung der untersuchten microRNA als Biomarker der Schizophrenie stellen sich somit weitere Fragen in Bezug auf die angewandte Methode, die untersuchten microRNA und die untersuchte Studienpopulation. Diese sollen im Folgenden weiter diskutiert werden.

### 5.2. Methode

Es wird die RT-qPCR als Messmethode angewendet. In Bezug auf die Durchführung werden relativ hohe Standards angewandt. Dies beinhaltet die Beachtung der MiQE-guidlines [12] und das Einbeziehen von Qualitätskontrollen (siehe Tab. A.1). Vorangegangene Studien wenden zum Teil andere Messverfahren (DNA sequencing, DNA microarrays) an [79]. Die PCR ist anderen Messverfahren hinsichtlich Sensibilität und Spezifität überlegen und wird als Gold Standard unter den zur Verfügung stehenden Methoden genannt [36]. Zu beachten ist, dass einige Studien vor Durchführung der PCR eine Präamplifizierung der cDNA durchführen [73]. Dies führt zwar zu einer höheren Sensibilität, begünstigt jedoch auch das Auftreten von Artefakten [11]. Dass sich microRNA ohne Präamplifizierung reproduzierbar im Serum nachweisen lassen, wurde bereits in einer vorherigen Studie mit entsprechendem Protokoll gezeigt [20].

Ogleich microRNA als stabil hinsichtlich wiederholten Einfrierens und Auftauens, sowie anderer Einflussgrößen betrachtet werden, müssen wir eine recht große Anzahl Proben aufgrund eines erhöhten Risikos von Hämolyse ausschließen. Dies ist ein Qualitätskriterium, welches vorherige Studien nicht konsequent angewendet und dokumentiert haben [79, 75]. MicroRNA in Erythrozyten spielen eine relevante Rolle in der Erythropoese und auch später nach Verlust des Zellkernes [5].

Bislang werden unterschiedliche Normalisierungsstrategien angewendet. Wobei externe synthetische microRNA [73], identifizierte endogene stabile microRNA oder andere kleinere RNA als Referenz Verwendung finden. Häufig verwendet wird die kleine nukleäre RNA (snRNA, small nuclear RNA) U6, welche jedoch größer

(etwa 106 nt) als microRNA ist. Es können sich Unterschiede in der Effizienz während Extraktion und Amplifikation ergeben. Darüber hinaus werden kleine nukleoläre RNA (snoRNA, small nucleolar RNA) [8] verwendet, welche jedoch beispielsweise bei Tumorerkrankungen reguliert sind und somit nicht als stabil gelten können [30]. In dieser Arbeit findet der *global mean* für die Normalisierung Anwendung. Die Normalisierung mittels anderer kleiner RNA birgt das Risiko von Artefakten [8]. Mestdagh et al. zeigen, dass die Verwendung des mittleren Expressionswertes über alle microRNA technische Variationen reduziert und biologische Veränderungen besser identifiziert im Vergleich zur alternativen Normalisierung mittels geNorm [56]. Die Normalisierung mittels geNorm beinhaltet die Verwendung mehrerer zuvor identifizierter interner Referenzgene [76].

### 5.3. Limitationen und Stärken dieser Studie

Die Schizophrenie ist eine heterogene Erkrankung in Bezug auf die klinische Präsentation und die Patienten erleben charakteristischerweise unterschiedliche Erkrankungsphasen während vieler Jahre. Die Differentialdiagnostik zu anderen Erkrankungen erfordert Erfahrung und das Bestehen der Symptome über einen zumindest einmonatigen Zeitraum. Insbesondere andere Erkrankungen mit psychotischen Symptomen, wie beispielsweise Bipolare Störungen oder komplexe Persönlichkeitsstörungen, werden gelegentlich fälschlicherweise mit einer Diagnose aus dem schizophrenen Formenkreis versehen. Der Auswahl der Probanden für diese Studie liegt neben der klinischen Diagnose nach ICD-10 eine umfängliche psychometrische Testung zu Grunde.

Limitationen dieser Studie beinhalten eine relativ kleine Fallzahl und die Unterteilung in nur zwei Testgruppen. Es kann von Vorteil sein, eine weitere Testgruppe bestehend aus anderen neuropsychiatrischen Erkrankungen einzubeziehen. Zudem könnte es in folgenden Studien interessant sein, Subgruppen anhand genauer klinischer Charakterisierung von Patienten mit einer Schizophrenie zu untersuchen. Beispielsweise könnten Patienten mit vordergründiger Positiv- bzw. Negativsymptomatik oder mit unterschiedlicher Symptomausprägung betrachtet werden. Die Patienten in dieser Studie erhalten unterschiedliche Medikamente in verschiedener Dosierung. Dies lässt sich nicht vermeiden, um eine individuell optimale Behand-

## 5. Diskussion

lung der Patienten gewährleisten zu können. Darüber hinaus gibt es in der Kohorte stark variierende Unterschiede in Bezug auf den Konsum von Nikotin, Alkohol und illegalen Drogen. Diese möglichen Einflussfaktoren werden bereits durch Beveridge et al. im Rahmen eines Reviews auch für andere Studien diskutiert [8]. Ein geeigneter Biomarker dürfte sich durch solche Einflussgrößen nicht maßgeblich beeinflussen lassen. Eine statistische Testung dieser Einflussgrößen gestaltet sich aufgrund der unterschiedlichen Substanzen und Konsummuster schwierig.

Nachdem es Teil der Erkrankung sein kann, dass das Einhalten von Terminen für die Patienten schwierig ist, werden die Blutentnahmen für diese Studie zu unterschiedlichen Tageszeitpunkten durchgeführt. Einige Studien geben keinen Hinweis darauf, zu welchem Zeitpunkt Blutentnahmen erfolgen [73]. Bislang gibt es kein eindeutiges Wissen über die Auswirkungen der circadianen Rhythmik auf die Bestimmung von microRNA in Serum, Plasma oder Vollblut. Jedoch gibt es Hinweise auf eine circadian unterschiedliche microRNA-Regulation im Gehirn aus dem Tierexperiment [3]. Ein Einfluss der zirkadianen Rhythmik auf einzelne microRNA in dieser Studie kann entsprechend aufgrund fehlender Untersuchungen hierzu nicht ausgeschlossen werden.

In der vorliegenden Arbeit werden Probanden unterschiedlicher Ethnien mit Geburtsorten auf verschiedenen Kontinenten untersucht. Somit ist eine mutmaßlich relativ große Bandbreite an genetischen Faktoren und Umwelteinflüssen im Studienkollektiv abgebildet. Ein Biomarker, der sich hiervon unbeeinflusst zeigt, würde in der klinischen Praxis anwendbar sein. Vorangegangene Studien für die Bestimmung von microRNA im Serum bzw. Plasma von Patienten mit einer Schizophrenie beschränken sich auf die Untersuchung von Probanden mit einer gemeinsamen Herkunft [79].

Die aktuelle Arbeit beschränkt sich auf die Untersuchung einer Auswahl von microRNA, die nicht die Gesamtheit der möglicherweise interessanten microRNA für die gegebene Fragestellung abbildet. Limitierend sind hier in erster Linie die Kosten für die Untersuchung, die eine Vorauswahl notwendig macht.

Im Rahmen der Prä-Prozessierung werden einige Proben und microRNA von weiteren Analysen ausgeschlossen. Dies bedeutet, dass möglicherweise interessante microRNA nicht weiter Berücksichtigung gefunden haben. Andererseits deutet

deren Ausschluss in jenen Fällen mit vielen fehlenden Werten bzw. insgesamt hoher  $C_T$ -Werte auf eine insgesamt schlechte Messbarkeit dieser microRNA hin. Dies würde deren Wertigkeit als Biomarker reduzieren.

## 5.4. Eignung von microRNA als Biomarker bei der Schizophrenie

Für onkologische Fragestellungen, wie beispielsweise zur Identifikation einer Risikopopulation an Bronchialcarcinom erkrankter Patienten, haben microRNA als Biomarker bereits anerkannte Relevanz [58]. Im Bereich der Neurobiologie werden microRNA als Biomarker von onkologischen bis hin zu psychiatrischen Erkrankungen diskutiert [35, 52].

Die microRNA-Signatur ist „indikativ für einen funktionell relevanten biologischen Zustand und könnte sich daher als Biomarker eignen“ [8]. Für die Eignung von microRNA im Serum spricht deren Stabilität [15]. Zudem ist es nahe liegend, dass die microRNA im Serum die Veränderungen im erkrankten Gewebe widerspiegeln. Würden sich geeignete microRNA im Serum finden, ließen sich diese durch eine Blutentnahme und den Nachweis mittels PCR auch im täglichen diagnostischen Alltag gut bestimmen lassen.

Sha Liu et al. werten in ihrer Meta-Analyse microRNA aus Blutbestandteilen als relevante Biomarker für die Schizophrenie, wobei vordergründig Studien mit microRNA-Bestimmungen aus PBMC herangezogen werden [50]. Für Serum und Plasma ergeben sich uneinheitliche und unterschiedliche Ergebnisse hinsichtlich der möglichen als Biomarker geeigneten microRNA [79, 75, 73].

Für einige microRNA gibt es bereits Ergebnisse, die einen Zusammenhang zwischen bekannten oder vermuteten genetischen Hintergründen der Schizophrenie oder involvierter Neurotransmittersysteme herstellen [29]. Ein Biomarker, dessen biologische Funktion mit der Pathogenese der Schizophrenie in Verbindung gebracht werden kann, wäre wertvoll. Jedoch ist das Verständnis der Pathogenese der Schizophrenie fragmentiert und nicht hinreichend.

In der vorliegenden Arbeit werden insbesondere hsa-miR-150-5p und hsa-let-7b-5p als für kommende Untersuchungen interessante Kandidaten für Biomarker identifiziert.

Insgesamt stellt sich die Frage der Spezifität von bestimmten microRNA bei der Schizophrenie. Einige microRNA finden sich überlappend bei Schizophrenie, Autismus-Spektrum-Störung und Depression [29]. MicroRNA im Serum oder Plasma bei Patienten mit einer Schizophrenie lassen sich bislang nicht sicher reproduzieren.

Nachdem eine microRNA Einfluss auf verschiedene Proteine haben kann und diese wiederum durch verschiedene microRNA beeinflusst werden, gilt es ein komplexes System zu verstehen.

Trotzdem die PCR eine hohe Sensibilität und Spezifität aufweist, ist der Nachweis von microRNA im Serum oder Plasma technisch nicht unproblematisch aufgrund der relativ geringen Menge von dort enthaltener microRNA.

Es bedarf weiterer Studien mit ausreichend großer Fallzahl. Diese sollten insbesondere auf eine standardisierte und reproduzierbare Messmethode und eine detaillierte klinische Charakterisierung der Probanden Wert legen, um mögliche Subgruppen identifizieren zu können.

### 5.5. Ausblick

Zwar werden microRNA formal bereits in den 1990-er Jahren entdeckt [47], doch geraten sie erst etwa zehn Jahre später in den Fokus von Forschern hinsichtlich ihrer regulatorischen Rolle und werden weiter untersucht [45]. Da die diskutierten Studien zu unterschiedlichen Zeitpunkten in der Vergangenheit ausgeführt werden, liegen jeweils unterschiedliche Erkenntnisse zu Grunde. Dies beeinflusst unter anderem die Nomenklatur und bedingt aus heutiger Perspektive uneindeutige Resultate. Auch Datenbanken als Grundlage für die bekannten microRNA Sequenzen, die als gesichert gelten sollen, befinden sich in Prozess und Diskussion[26].

Zukünftige Studien sollten weiterhin einer sorgfältigen klinischen Charakterisierung der Patienten nachkommen und Subgruppen von Patienten identifizieren.

Generell ist es wünschenswert allgemein gültige Standards für die Quantifizierung und Daten-Analyse von RT-qPCR-Daten aus dem Bereich der microRNA zu etablieren, um die Ergebnisse besser vergleichen zu können.

In folgenden Studien sollten interessante microRNA zudem im Liquor untersucht werden. Dieser wird zur Ausschlussdiagnostik bei Verdachtsdiagnose einer Schizophrenie regelhaft entnommen und kann so ebenfalls leicht zugänglich untersucht werden.

## 6. Zusammenfassung

Die Schizophrenie ist eine heterogene Erkrankung mit in der Regel chronischem Verlauf und führt zu schwerwiegender Belastung von Patienten, Angehörigen und der Gesellschaft. Die Diagnose ist aktuell alleine auf klinische Kriterien und deren Interpretation durch den Untersucher gestützt. Ein besseres Verständnis auf neurobiologischer Ebene, von Untersuchern unabhängige Diagnosekriterien und daraus resultierende neue Möglichkeiten einer medikamentösen oder präventiven Therapie sind notwendig.

In der vorliegenden Arbeit wird die Expression von 121 Ziel-microRNA im Serum von Probanden (n=66) mit der Diagnose einer paranoiden Schizophrenie (n=34) und einer gesunden Kontrollgruppe (n=32) mittels RT-qPCR gemessen. Untersucht werden sollen Unterschiede in der Expression zwischen beiden Gruppen mit möglicher Implikation für die Eignung von microRNA als Biomarker für die Schizophrenie. In vorherigen Studien wurde diese Frage mit unterschiedlichen und teils nicht vergleichbaren Ergebnissen beantwortet. Berücksichtigt werden alle microRNA, die im Serum oder Plasma von Patienten mit einer Schizophrenie in der bis 2017 publizierten Literatur als reguliert beschrieben werden.

Während sich hsa-miR-148-3p in der relativen Quantifizierung hoch reguliert in der Gruppe der Patienten mit einer Schizophrenie im Vergleich zur Kontrollgruppe zeigt, zeigen sich hsa-let-7b-5p und hsa-miR-150-5p entsprechend der ermittel-

ten fold changes relativ herunter reguliert. In der ROC Analyse ergibt sich eine relevante Sensibilität und Spezifität für hsa-let-7b-5p und hsa-miR-150-5p. Für hsa-miR-150-5p ergibt sich zudem eine vor Korrektur signifikante Korrelation mit dem PANSS-Score. Es zeigen sich in dieser Untersuchung keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der Expression von microRNA zwischen der Schizophreniegruppe und Kontrollgruppe nach Benjamini-Hochberg-Korrektur (Signifikanzlevel  $\alpha = 0.05$ ).

In zukünftigen Studien sollten Standards zu Mess- und Analyseverfahren weiter etabliert werden, um die Vergleichbarkeit von Ergebnissen zu verbessern. Zudem ist es wünschenswert Patienten klinisch gut zu charakterisieren, um mögliche Subgruppen identifizieren zu können. Die in dieser Arbeit als möglicherweise interessant identifizierten microRNA hsa-let-7b-5p und hsa-miR-150-5p sollten in zukünftigen Studien weiter untersucht werden.

## 7. Summary

Schizophrenia is a heterogeneous disease with a generally chronic course of disease that severely affects patients, families and the society. Diagnosis is solely based on clinical criteria and their interpretation by the examiner. A better understanding for the neurobiology of Schizophrenia and diagnosis criteria that are more independent from the examiners interpretation are necessary and could even lead to new therapies. In this study the expression of 121 serum microRNA of probands (n=66) diagnosed with Schizophrenia (n=34) and a healthy control group (n=32) are measured by RT-qPCR. The analysis aims to detect differences between the groups with respect to an implication for microRNA as possible biomarkers for Schizophrenia. Former studies generated varying results that were sometimes not comparable. Considered were all microRNA published as being regulated in the serum or plasma of schizophrenia patients until 2017. Analysis shows hsa-miR-148-3p to be up-regulated in Schizophrenia compared to control, whereas hsa-let-7b-5p and hsa-miR-150-5p are down-regulated. ROC analysis shows relevant sensitivity

## 7. Summary

and specificity for hsa-let-7b-5p and hsa-miR-150-5p. There is a significant correlation for hsa-miR-150-5p with the PANSS-Score before Benjamini-Hochberg-correction. No significant differences between test and control group are found after Benjamini-Hochberg-correction ( $\alpha = 0.05$ ).

Future studies with larger sample sizes should continue to lay emphasis on precise clinical characterisation to identify subgroups of patients. It is highly desirable to standardise quantification methods and data analysis for RT-qPCR to make results comparable. In this study hsa-let-7b-5p and hsa-miR-150-5p are identified as possible biomarker candidates for Schizophrenia that should be examined further in future studies.

# Abkürzungen

$C_P$  Überschreitungspunkt (crossing point) 19

$C_T$  Schwellenwert-Zyklus (threshold Cycle) 19, 20, 37

**AUC** Fläche unter der Grenzwertoptimierungskurve (area under the receiver operating characteristics curve) 24, 28, 31

**BDNF** brain-derived neurotrophic factor 11, 12

**cDNA** komplementäre DNA (complementary DNA) 18–20, 24, 26, 34

**CGI** Clinical Global Impression 15

**CNV** Kopienzahlvariationen (copy number variants) 8

**DGCR8** DiGeorge Syndrome Critical Region Gene 8 12

**DNA** Desoxyribonukleinsäure (deoxyribonucleic acid) 20, 34

**FC** Fold Change 19

**GAF** Global Assessment of Functioning 15

**GWAS** Genomweite Assoziationsstudien (genome-wide associations studies) 8, 12

**ICD-10** Internationale statistische Klassifikation der Krankheiten und verwandter Gesundheitsprobleme, 10te Revision (International Classification of Diseases, 10th revision) 7, 15, 35

**IPC** Kalibration zwischen den Platten (Interplate Calibration) 19

## Abkürzungen

- LNA** locked nucleic acid 18
- microRNA** micro Ribonukleinsäure (micro ribonucleic acid) 10–16, 18, 19, 21, 22, 26–40
- miRISC** miRNA-containing RNA-induced silencing complex 10
- mRNA** Boten-RNA (messenger RNA) 10, 11
- NMDAR** N-Methyl-D-Aspartat-Rezeptor (N-methyl-D-aspartate receptors) 9
- NTC** No template control 20
- PANSS** Positive and Negative Syndrome Scale 15, 25, 28–30, 33, 40, 41
- PBMC** Mononukleäre Zelle des peripheren Blutes (peripheral blood mononuclear cell) 12, 37
- PCR** Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction) 12, 13, 18, 19, 34, 37, 38
- pre-miRNA** Präkursor der miRNA (precursor of miRNA) 10
- pri-miRNA** Primärtranskript der miRNA (primary transcript of miRNA) 10
- RISC** RNA-induced silencing complex 11
- RNA** Ribonukleinsäure (ribonucleic acid) 10, 16, 18, 20, 21, 23, 24, 26, 34, 35
- ROC** Grenzwertoptimierungskurve (Receiver Operating Characteristics) 25, 28, 31, 32, 40
- RT-qPCR** Reverse Transkriptase quantitative Polymerase-Ketten-Reaktion (Reverse transcription quantitative polymerase chain reaction) 15, 19, 21, 34, 39–41
- SANS** Scale for the Assessment of Negative Symptoms 15
- SAPS** Scale for the Assessment of Positive Symptoms 15
- snoRNA** kleine nukleoläre RNA (small nucleolar RNA) 35

**SNP** Einzelnukleotid-Polymorphismus (single nucleotide polymorphism) 8

**snRNA** kleine nukleäre RNA (small nuclear RNA) 34

## Literatur

- [1] NC Andreasen u. a. „Positive and negative symptoms: assessment and validity“. In: *Negative versus positive schizophrenia*. Springer, 1991, S. 28–51.
- [2] Jason D Arroyo u. a. „Argonaute2 complexes carry a population of circulating microRNAs independent of vesicles in human plasma“. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108.12 (2011), S. 5003–5008.
- [3] Sydney Aten u. a. „miR-132 couples the circadian clock to daily rhythms of neuronal plasticity and cognition“. In: *Learning & Memory* 25.5 (2018), S. 214–229.
- [4] Dimitrios Avramopoulos. „Recent Advances in the Genetics of Schizophrenia“. In: *Molecular neuropsychiatry* 4.1 (2018), S. 35–51.
- [5] Imane Azzouzi u. a. „Deep sequencing and proteomic analysis of the microRNA-induced silencing complex in human red blood cells“. In: *Experimental hematology* 43.5 (2015), S. 382–392.
- [6] David P Bartel. „MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function“. In: *cell* 116.2 (2004), S. 281–297.
- [7] Anne S Bassett u. a. „Clinical features of 78 adults with 22q11 deletion syndrome“. In: *American journal of medical genetics Part A* 138.4 (2005), S. 307–313.
- [8] Natalie J Beveridge und Murray J Cairns. „MicroRNA dysregulation in schizophrenia“. In: *Neurobiology of disease* 46.2 (2012), S. 263–271.
- [9] Natalie Jane Beveridge u. a. „Schizophrenia is associated with an increase in cortical microRNA biogenesis“. In: *Molecular psychiatry* 15.12 (2010), S. 1176.

- [10] Natalie J Beveridge u. a. „Dysregulation of miRNA 181b in the temporal cortex in schizophrenia“. In: *Human molecular genetics* 17.8 (2008), S. 1156–1168.
- [11] Thorarinn Blondal u. a. „Assessing sample and miRNA profile quality in serum and plasma or other biofluids“. In: *Methods* 59.1 (2013), S1–S6.
- [12] Stephen A Bustin u. a. „The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments“. In: *Clinical chemistry* 55.4 (2009), S. 611–622.
- [13] Stephen A Bustin und Tania Nolan. „Pitfalls of quantitative real-time reverse-transcription polymerase chain reaction“. In: *Journal of biomolecular techniques: JBT* 15.3 (2004), S. 155.
- [14] Fiona J Charlson u. a. „Global Epidemiology and Burden of Schizophrenia: Findings From the Global Burden of Disease Study 2016“. In: *Schizophrenia bulletin* (2018).
- [15] Xi Chen u. a. „Characterization of microRNAs in serum: a novel class of biomarkers for diagnosis of cancer and other diseases“. In: *Cell research* 18.10 (2008), S. 997.
- [16] Samuel M Cohen u. a. „The impact of NMDA receptor hypofunction on GABAergic neurons in the pathophysiology of schizophrenia“. In: *Schizophrenia research* 167.1-3 (2015), S. 98–107.
- [17] Catherine Curran, Neetha Byrappa und Andrew McBride. „Stimulant psychosis: systematic review“. In: *The British journal of psychiatry* 185.3 (2004), S. 196–204.
- [18] Barbara D’haene u. a. „miRNA expression profiling: from reference genes to global mean normalization“. In: *Next-Generation MicroRNA Expression Profiling Technology*. Springer, 2012, S. 261–272.
- [19] Geoffrey Davies u. a. „A systematic review and meta-analysis of Northern Hemisphere season of birth studies in schizophrenia“. In: *Schizophrenia bulletin* 29.3 (2003), S. 587–593.
- [20] Johannes Denk u. a. „Specific serum and CSF microRNA profiles distinguish sporadic behavioural variant of frontotemporal dementia compared with Alzheimer patients and cognitively healthy controls“. In: *PloS one* 13.5 (2018), e0197329.

- [21] Céline Devroye u. a. „The central serotonin<sub>2B</sub> receptor as a new pharmacological target for the treatment of dopamine-related neuropsychiatric disorders: Rationale and current status of research“. In: *Pharmacology & therapeutics* (2017).
- [22] Stig Evensen u. a. „Prevalence, employment rate, and cost of schizophrenia in a high-income welfare society: a population-based study using comprehensive health and welfare registers“. In: *Schizophrenia bulletin* 42.2 (2015), S. 476–483.
- [23] Mark J Ferris u. a. „Sustained N-methyl-d-aspartate receptor hypofunction remodels the dopamine system and impairs phasic signaling“. In: *European Journal of Neuroscience* 40.1 (2014), S. 2255–2263.
- [24] Andreas J Forstner u. a. „MicroRNAs as the cause of schizophrenia in 22q11.2 deletion carriers, and possible implications for idiopathic disease: a mini-review“. In: *Frontiers in molecular neuroscience* 6 (2013), S. 47.
- [25] Robin C Friedman u. a. „Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs“. In: *Genome research* (2008).
- [26] Bastian Fromm u. a. „A uniform system for the annotation of vertebrate microRNA genes and the evolution of the human microRNAome“. In: *Annual review of genetics* 49 (2015), S. 213–242.
- [27] Paolo Fusar-Poli und Pierluigi Politi. „Paul Eugen Bleuler and the birth of schizophrenia (1908)“. In: *American Journal of Psychiatry* 165.11 (2008), S. 1407–1407.
- [28] E Gardiner u. a. „Imprinted DLK1-DIO3 region of 14q32 defines a schizophrenia-associated miRNA signature in peripheral blood mononuclear cells“. In: *Molecular psychiatry* 17.8 (2012), S. 827.
- [29] Michael Geaghan und Murray J Cairns. „MicroRNA and posttranscriptional dysregulation in psychiatry“. In: *Biological psychiatry* 78.4 (2015), S. 231–239.
- [30] HE Gee u. a. „The small-nucleolar RNAs commonly used for microRNA normalisation correlate with tumour pathology and prognosis“. In: *British journal of cancer* 104.7 (2011), S. 1168.
- [31] Sam Griffiths-Jones. „The microRNA registry“. In: *Nucleic acids research* 32.suppl\_1 (2004), S. D109–D111.

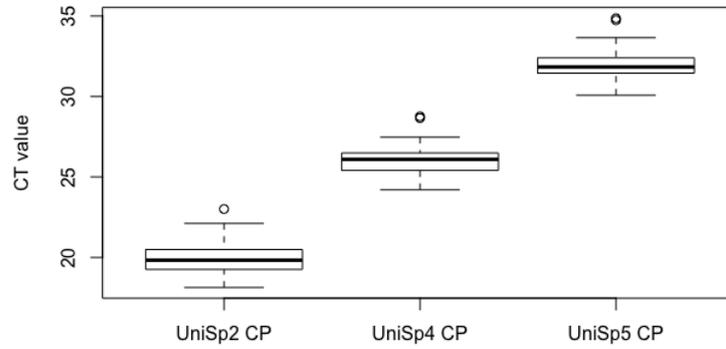
- [32] JM Haro u. a. „The Clinical Global Impression–Schizophrenia scale: a simple instrument to measure the diversity of symptoms present in schizophrenia“. In: *Acta Psychiatrica Scandinavica* 107 (2003), S. 16–23.
- [33] Charles H Hennekens u. a. „Schizophrenia and increased risks of cardiovascular disease“. In: *American heart journal* 150.6 (2005), S. 1115–1121.
- [34] Rikke Hilker u. a. „Heritability of schizophrenia and schizophrenia spectrum based on the nationwide Danish twin register“. In: *Biological psychiatry* 83.6 (2018), S. 492–498.
- [35] Shi-wei Huang, Lily Zhong, Jian Shi u. a. „MicroRNAs as biomarkers for human glioblastoma: progress and potential“. In: *Acta pharmacologica Sinica* (2018).
- [36] Eric A Hunt u. a. „MicroRNA detection: current technology and research strategies“. In: *Annual review of analytical chemistry* 8 (2015), S. 217–237.
- [37] Matti Huttunen. „The evolution of the serotonin-dopamine antagonist concept.“ In: *Journal of clinical psychopharmacology* (1995).
- [38] Thomas R Insel. „Rethinking schizophrenia“. In: *Nature* 468.7321 (2010), S. 187.
- [39] Steven H Jones u. a. „A brief mental health outcome scale: Reliability and validity of the Global Assessment of Functioning (GAF)“. In: *The British Journal of Psychiatry* 166.5 (1995), S. 654–659.
- [40] Stanley R Kay, Abraham Fiszbein und Lewis A Opler. „The positive and negative syndrome scale (PANSS) for schizophrenia“. In: *Schizophrenia bulletin* 13.2 (1987), S. 261–276.
- [41] JP Kesby u. a. „Dopamine, psychosis and schizophrenia: the widening gap between basic and clinical neuroscience“. In: *Translational psychiatry* 8.1 (2018), S. 30.
- [42] V Narry Kim und Jin-Wu Nam. „Genomics of microRNA“. In: *Trends in Genetics* 22.3 (2006), S. 165–173.
- [43] Ana Kozomara und Sam Griffiths-Jones. „miRBase: annotating high confidence microRNAs using deep sequencing data“. In: *Nucleic acids research* 42.D1 (2013), S. D68–D73.
- [44] Emil Kraepelin. *Dementia praecox and paraphrenia*. 1921.

- [45] Mariana Lagos-Quintana u. a. „Identification of novel genes coding for small expressed RNAs“. In: *Science* 294.5543 (2001), S. 853–858.
- [46] Adrienne C Lahti u. a. „Effects of ketamine in normal and schizophrenic volunteers“. In: *Neuropsychopharmacology* 25.4 (2001), S. 455–467.
- [47] Rosalind C Lee, Rhonda L Feinbaum und Victor Ambros. „The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*“. In: *cell* 75.5 (1993), S. 843–854.
- [48] Yoontae Lee u. a. „MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II“. In: *The EMBO journal* 23.20 (2004), S. 4051–4060.
- [49] Benjamin P Lewis u. a. „Prediction of mammalian microRNA targets“. In: *Cell* 115.7 (2003), S. 787–798.
- [50] Sha Liu u. a. „Diagnostic value of blood-derived microRNAs for schizophrenia: results of a meta-analysis and validation“. In: *Scientific reports* 7.1 (2017), S. 15328.
- [51] Kenneth J Livak und Thomas D Schmittgen. „Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2-  $\Delta\Delta$ CT method“. In: *methods* 25.4 (2001), S. 402–408.
- [52] Juan Pablo Lopez, Aron Kos und Gustavo Turecki. „Major depression and its treatment: microRNAs as peripheral biomarkers of diagnosis and treatment response“. In: *Current opinion in psychiatry* 31.1 (2018), S. 7–16.
- [53] Jie Ma u. a. „Identification of miR-22-3p, miR-92a-3p, and miR-137 in peripheral blood as biomarker for schizophrenia“. In: *Psychiatry research* 265 (2018), S. 70–76.
- [54] Christian R Marshall u. a. „Contribution of copy number variants to schizophrenia from a genome-wide study of 41,321 subjects“. In: *Nature genetics* 49.1 (2017), S. 27.
- [55] Nikolaos Mellios u. a. „A set of differentially expressed miRNAs, including miR-30a-5p, act as post-transcriptional inhibitors of BDNF in prefrontal cortex“. In: *Human molecular genetics* 17.19 (2008), S. 3030–3042.
- [56] Pieter Mestdagh u. a. „A novel and universal method for microRNA RT-qPCR data normalization“. In: *Genome biology* 10.6 (2009), R64.

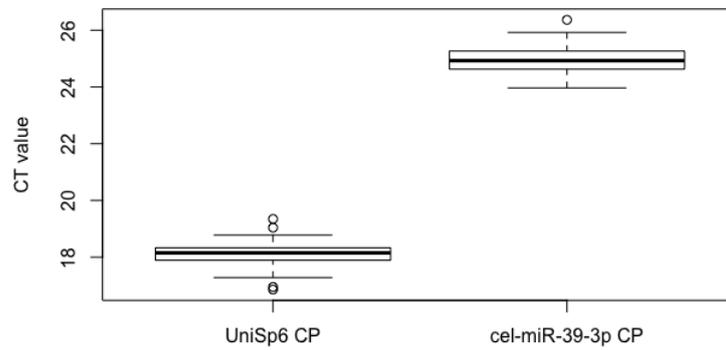
- [57] Stephen Monks u. a. „Further evidence for high rates of schizophrenia in 22q11. 2 deletion syndrome“. In: *Schizophrenia research* 153.1-3 (2014), S. 231–236.
- [58] Francesca Montani u. a. „miR-Test: a blood test for lung cancer early detection“. In: *JNCI: Journal of the National Cancer Institute* 107.6 (2015).
- [59] Amy E Pasquinelli u. a. „Conservation of the sequence and temporal expression of let-7 heterochronic regulatory RNA“. In: *Nature* 408.6808 (2000), S. 86.
- [60] Carsten Bøcker Pedersen und Elizabeth Cantor-Graae. „Age at migration and risk of schizophrenia among immigrants in Denmark: a 25-year incidence study“. In: *American Journal of Psychiatry* 169.10 (2012), S. 1117–1118.
- [61] Diana O Perkins u. a. „microRNA expression in the prefrontal cortex of individuals with schizophrenia and schizoaffective disorder“. In: *Genome biology* 8.2 (2007), R27.
- [62] Frederique Ponchel u. a. „Real-time PCR based on SYBR-Green I fluorescence: an alternative to the TaqMan assay for a relative quantification of gene rearrangements, gene amplifications and micro gene deletions“. In: *BMC biotechnology* 3.1 (2003), S. 18.
- [63] Vijaya Raghavan u. a. „Hypothesis: Exosomal microRNAs as potential biomarkers for schizophrenia“. In: *Medical hypotheses* 103 (2017), S. 21–25.
- [64] Elliott Rees u. a. „Evidence that duplications of 22q11. 2 protect against schizophrenia“. In: *Molecular Psychiatry* 19.1 (2014), S. 37.
- [65] Stephan Ripke u. a. „Biological insights from 108 schizophrenia-associated genetic loci“. In: *Nature* 511.7510 (2014), S. 421.
- [66] Antony Rodriguez u. a. „Identification of mammalian microRNA host genes and transcription units“. In: *Genome research* 14.10a (2004), S. 1902–1910.
- [67] Kensuke Sakamoto und James J Crowley. „A comprehensive review of the genetic and biological evidence supports a role for MicroRNA-137 in the etiology of schizophrenia“. In: *American Journal of Medical Genetics Part B: Neuropsychiatric Genetics* 177.2 (2018), S. 242–256.
- [68] Danielle M Santarelli u. a. „Upregulation of dicer and microRNA expression in the dorsolateral prefrontal cortex Brodmann area 46 in schizophrenia“. In: *Biological psychiatry* 69.2 (2011), S. 180–187.

- [69] Organisation mondiale de la santé, World Health Organization und WHO. *The ICD-10 classification of mental and behavioural disorders: clinical descriptions and diagnostic guidelines*. Bd. 1. World Health Organization, 1992.
- [70] Martin Sarter, Cindy Lustig und Stephan F Taylor. „Cholinergic contributions to the cognitive symptoms of schizophrenia and the viability of cholinergic treatments“. In: *Neuropharmacology* 62.3 (2012), S. 1544–1553.
- [71] Domenico Scrutinio u. a. „Circulating microRNA-150-5p as a novel biomarker for advanced heart failure: a genome-wide prospective study“. In: *The Journal of Heart and Lung Transplantation* 36.6 (2017), S. 616–624.
- [72] Chantal Sellier u. a. „Decreased DGCR8 expression and miRNA dysregulation in individuals with 22q11. 2 deletion syndrome“. In: *PLoS One* 9.8 (2014), e103884.
- [73] Wenting Shi u. a. „Aberrant expression of serum miRNAs in schizophrenia“. In: *Journal of psychiatric research* 46.2 (2012), S. 198–204.
- [74] Solomon H Snyder. „The dopamine hypothesis of schizophrenia: focus on the dopamine receptor.“ In: *The American journal of psychiatry* (1976).
- [75] Xin-yang Sun u. a. „A preliminary analysis of microRNA as potential clinical biomarker for schizophrenia“. In: *American Journal of Medical Genetics Part B: Neuropsychiatric Genetics* 168.3 (2015), S. 170–178.
- [76] Jo Vandesompele u. a. „Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes“. In: *Genome biology* 3.7 (2002), research0034–1.
- [77] Evangelos Vassos u. a. „Meta-analysis of the association of urbanicity with schizophrenia“. In: *Schizophrenia bulletin* 38.6 (2012), S. 1118–1123.
- [78] Tom Walsh u. a. „Rare structural variants disrupt multiple genes in neurodevelopmental pathways in schizophrenia“. In: *science* (2008).
- [79] Hui Wei u. a. „Detection of circulating miRNA levels in schizophrenia“. In: *American Journal of Psychiatry* 172.11 (2015), S. 1141–1147.
- [80] RH Yolken und EF Torrey. „Are some cases of psychosis caused by microbial agents? A review of the evidence“. In: *Molecular psychiatry* 13.5 (2008), S. 470.

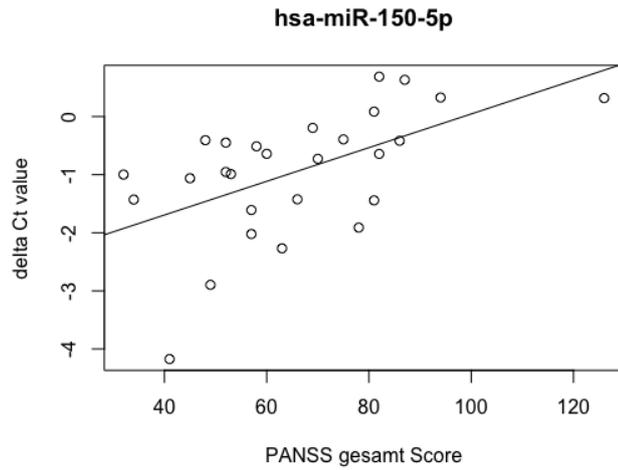
# A. Anhang



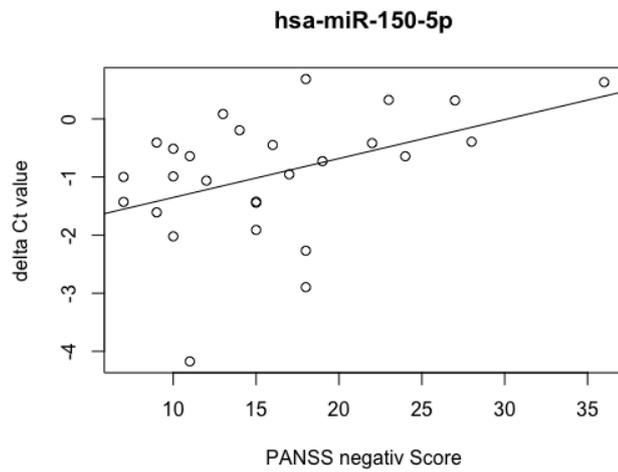
(a) Boxplots: Spikes für die RNA-Extraktion nach Ausschluss von Proben entsprechend dem Grubbs Ausreißertest.



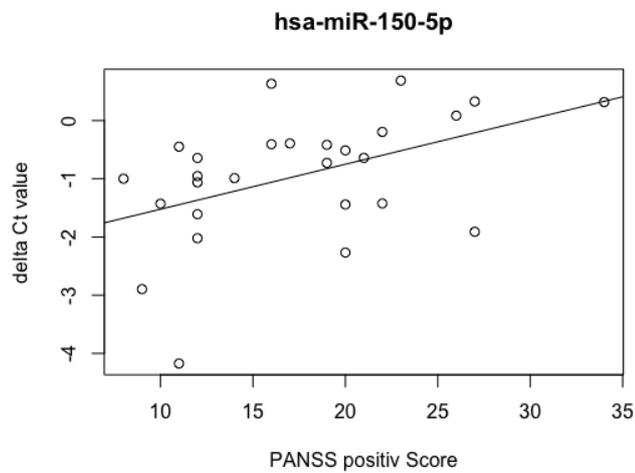
(b) Boxplots: Spikes für die cDNA Synthese nach Ausschluss von Proben entsprechend dem Grubbs Ausreißertest.



(a) Scatter-Plot: Korrelation von miR-150-5p und dem PANSS Gesamtscore.



(b) Scatter-Plot: Korrelation von miR-150-5p und dem PANSS Negativsymptomatik.



(c) Scatter-Plot: Korrelation von miR-150-5p und dem PANSS Positivsymptomatik.

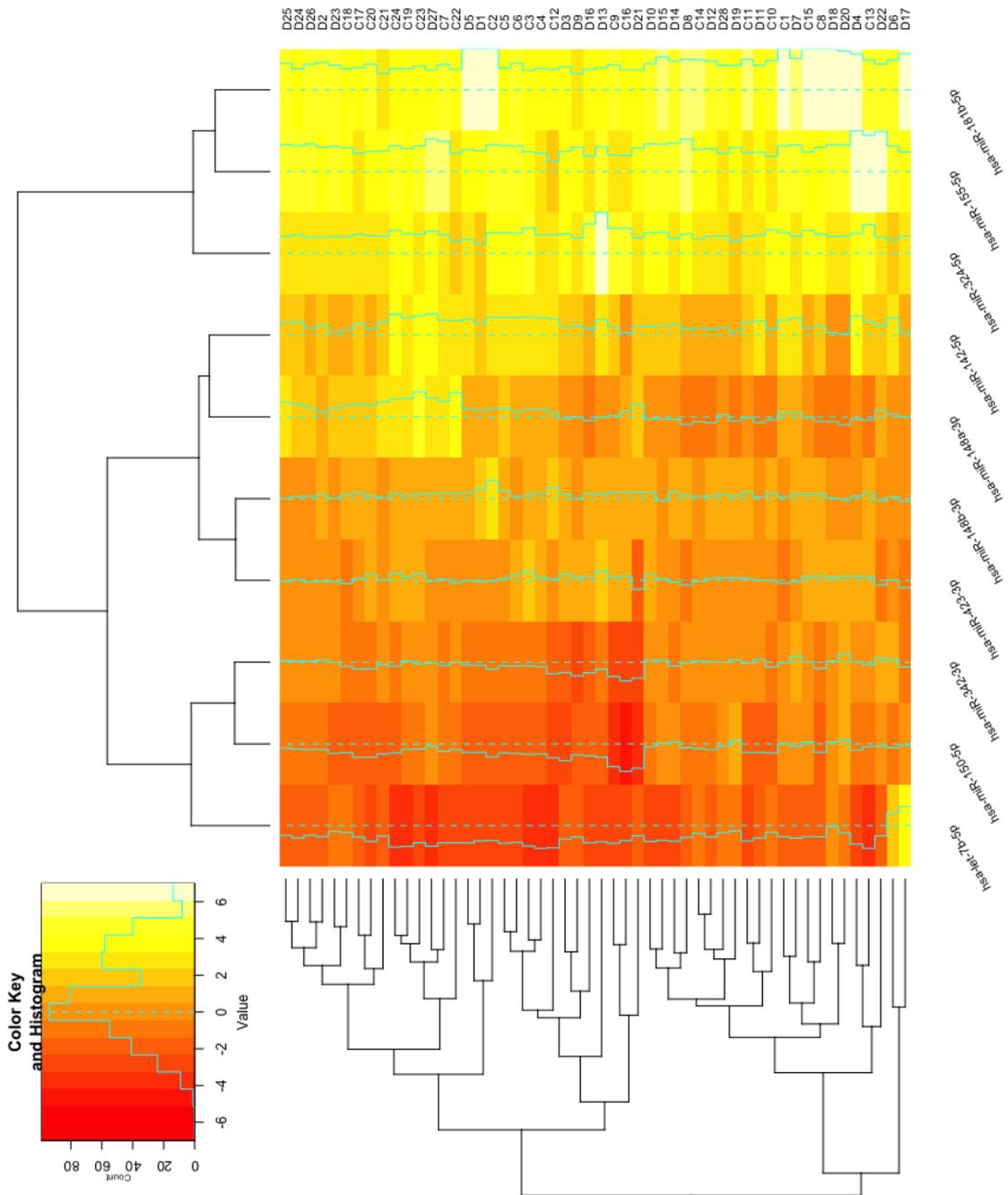


Abbildung A.3.: Hierarchische Cluster-Analyse. In der Heatmap (Spearmankorrelation, euklidische Metrik) dargestellt sind die  $\Delta C_T$ -Werte ausgewählter microRNA für alle Proben, wobei gelb für hohe und rot für niedrige  $\Delta C_T$ -Werte steht. D = Diagnosis (Schizophreniegruppe), C = Control (Kontrollgruppe).

## A. Anhang

ITEM	BEDEUTUNG	CHECKLISTE	KOMMENTAR
<b>Design des Experimentes</b>			
Definition von Experimental- und Kontrollgruppe	E	Ja	Methoden
Anzahl in jeder Gruppe	E	Ja	Methoden
Tests durchgeführt in Zentrallabor oder Forschungslabor?	D	Ja	Forschungslabor
Benennen der Beiträge der beteiligten Autoren?	D	Ja	Design des Experimentes: HJ, JD, MH; Durchführung des Experimentes: MH; Datenanalyse: MH; Verfassen der Arbeit: MH
<b>Probe</b>			
Beschreibung	E	Ja	Methoden
Volumen/Masse der bearbeiteten Proben	D	Ja	Methoden
Mikrodissektion oder Makrodissektion	E	N/A	
Bearbeitung der Proben	E	Ja	Methoden
Wenn eingefroren – wie und wie schnell?	E	eingeschränkt	Transport aus externem Labor, Lagerung bei $-80^{\circ}\text{C}$ .
Wenn fixiert – womit und wie schnell?	E	entfällt	
Aufbewahrung der Proben (Dauer und Umgebungsbedingungen)	E	eingeschränkt	Transport aus externem Labor, Lagerung bei $-80^{\circ}\text{C}$ .
<b>Nukleinsäure-Extraktion</b>			
Verfahren und Geräte	E	Ja	Methoden
Name des Kits und Modifizierungen	E	Ja	Methoden
Ursprung zusätzlich verwendeter Reagenzien	D	Ja	Liste der Materialien
Details zu DNase oder RNase Behandlung	E	N/A	
Prüfen auf Kontamination (DNA oder RNA)	E	Ja	Negativkontrolle für qPCR
Quantifizierung der Nukleinsäure	E	N/A	Kontrolle durch miRNA Spikes
Gerät und Methode	E	Ja	Methoden/Liste der Materialien
Reinheit (A260/A280)	D	N/A	
Ergiebigkeit	D	N/A	
RNA Integrität Methode/Gerät	E	N/A	
RIN/RQI oder Ct des 3' und 5' Transkriptes	E	N/A	
Elektrophoresespuren	D	N/A	
Inhibitionstestung	E	Ja	Methoden

## A. Anhang

(Ct Verdünnung, Spikes oder andere)

### Reverse Transkription

Komplette Reaktionsbedingungen	E	Ja	Methoden
Menge der RNA und Reaktionsvolumen	E	Ja	Methoden
Priming Oligonukleotide	E	Ja	Eigentum von Exiqon
Reverse Transkriptase und Konzentration	E	Ja	Eigentum von Exiqon
Temperatur und Zeit	E	Ja	Methoden
Hersteller der Reagenzien und Katalognummern	D	Ja	Methoden
<i>C<sub>t</sub>s</i> mit und ohne Reverse Transkription	D	Nein	
Aufbewahrungsbedingungen der cDNA	D	Ja	unverdünnt bei $-20^{\circ}\text{C}$ , wenn nicht gleich weiter bearbeitet
<b>qPCR Ziel Information</b>			
Gen Symbol	E	Nein	
Sequence accession number	E	Nein	
Lokalisation des Amplicons	D	Nein	siehe <a href="http://www.mirbase.org/">http://www.mirbase.org/</a>
Länge des Amplicons	E	Nein	
In silico Spezifitäts Screen (BLAST etc.)	E	Nein	
Pseudogene, Retropseudogene oder andere Homologe?	D	Nein	
Sequenzausrichtung	D	Nein	
Sekundäre Strukturanalyse des Amplicons	D	Nein	
Lokalisation jeden Primers (Exon oder Intron)	E	N/A	
Welche Splice-Varianten werden anvisiert?	E	N/A	
<b>qPCR Oligonukleotide</b>			
Primer Sequenzen	E	Nein	Eigentum des Herstellers
RTPPrimerDB Identifikationsnummern	D	Nein	Eigentum des Herstellers
Probensequenzen	D	Nein	Eigentum des Herstellers
Lokalisation und Identität von Modifikationen	E	N/A	
Hersteller der Oligonukleotide	D	Ja	Methoden
Methode der Aufreinigung	D	N/A	

## A. Anhang

### qPCR Protokoll

Katalognummer des Herstellerprotokolls	E	Ja	miRCURY LNA <sup>TM</sup> Universal RT, microRNA PCR Instruction manual v6.2
Komplette Reaktionsbedingungen	E	Ja	Methoden
Reaktionsvolumen und Menge der cDNA/DNA	E	Ja	Methoden
Primer, (Probe), Mg++ und dNTP Konzentrationen	E	Nein	Eigentum des Herstellers
Polymerase Identität und Konzentration	E	Nein	Eigentum des Herstellers
Puffer/Kit Identität und Hersteller	E	Nein	Eigentum des Herstellers
Exakte chemische Zusammensetzung des Puffers	D	Nein	Eigentum des Herstellers
Zusätze (SYBR Green etc.)	E	Nein	
Hersteller von Platten/Röhrchen und Katalognummer	D	Ja	Liste der Materialien
Komplette Thermozyklerparameter	E	Ja	Methoden
Reaktions Setup (manuell/automatisiert)	D	Ja	Methoden
Hersteller des qPCR Gerätes	E	Ja	Liste der Materialien
<b>qPCR Validierung</b>			
Evidenz der Optimierung (durch Gradienten)	D	N/A	
Spezifität (Gel, Sequenz, Schmelze oder Verdauung)	E	N/A	
Für SYBR Green I, Ct der NTC	E	Ja	Methoden
Standardkurve mit Steigung und y-Schnittstelle	E	Nein	
PCR Effizienz berechnet aus der Steigung	E	Nein	
Konfidenzintervall für PCR Effizienz oder Standardfehler	D	Nein	
$r^2$ der Standardkurve	E	N/A	
Linear dynamischer Wertebereich	E	Nein	
Ct Variation an der unteren Grenze	E	N/A	
Konfidenzintervall über den Wertebereich	D	Nein	
Evidenz für die Nachweisbarkeitsgrenze	E	Nein	

## A. Anhang

Falls Multiplex, Effizienz und LOD für jedes Assay	E	N/A	
<b>Datenanalyse</b>			
qPCR Analyse Programm (Quelle, Version)	E	Ja	qPCRSoft (Analytik Jena, Version 3.1.15)
Methode der Ct Bestimmung	E	Ja	Methoden
Identifizierung von Ausreißern	E	Ja	Methoden
Ergebnis der Negativkontrolle (NTC)	E	Ja	Methoden
Begründung für die Auswahl der Referenzgene	E	N/A	
Beschreibung der Normalisierungsmethode	E	Ja	Methoden
Anzahl und Konkordanz biologischer Replikate	D	N/A	
Anzahl (RT or qPCR) technischer Replikate	E	N/A	
Wiederholungsgenauigkeit (Intra-Assay Variation)	E	Nein	
Reproduzierbarkeit (Inter-Assay Variation, CV)	D	Nein	
Leistungsanalyse	D	Nein	
Statistische Methoden und Signifikanz	E	Ja	Methoden
Software (Quelle, Version)	E	Ja	Methoden
Einreichen von Ct oder Rohdaten unter Verwendung von RDML	D	Nein	

Tabelle A.1.: Checkliste in Anlehnung an die MIQE Guidelines für qPCR. E = essenzielle Information (essential); D = wünschenswerte Information (desirable).

# Danksagung

Ich danke Dr. Johannes Denk, Dr. Holger Jahn und Prof. Dr. Jürgen Gallinat für die Ermöglichung dieser Arbeit und die Unterstützung bei deren Umsetzung.

# Lebenslauf

Entfällt aus datenschutzrechtlichen Gründen.

# Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe. Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe. Ich erkläre mich einverstanden, dass meine Dissertation vom Dekanat der Medizinischen Fakultät mit einer gängigen Software zur Erkennung von Plagiaten überprüft werden kann.

Ort, Datum

Maxi Dana Hofacker