

Aus der Klinik und Poliklinik für
Psychiatrie und Psychotherapie
Klinikum Innenstadt
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Direktor: Herr Prof. Dr. med. H.-J. Möller

Das GRIN2B-Gen und seine Bedeutung für die Schizophrenie

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

vorgelegt von
Claudia Helmreich

aus Kaiserslautern

2011

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Dan Rujescu

Mitberichterstatter: Priv.Doz. Dr. Angela Abicht

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: Dr. rer. biol. hum. I. Giegling

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h.c. M. Reiser, FACR, FRCR

Tag der mündlichen Prüfung: 10.11.2011

**„So wie die Verrücktheit, in einem höheren Sinn, der Anfang aller Weisheit ist, so ist
Schizophrenie der Anfang aller Kunst, aller Phantasie.“**

Hermann Hesse, Der Steppenwolf

meiner Familie, meinem Freund und Rosi gewidmet

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	1
1.1	Die Schizophrenie	1
1.1.1	Definition.....	1
1.1.2	Historische Aspekte.....	1
1.1.3	Klassifikation der Schizophrenie.....	2
1.1.4	Krankheitsverlauf und Prognose	4
1.1.5	Epidemiologie der Schizophrenie.....	5
1.1.6	Multifaktorielle Ätiopathogenese der Schizophrenie	6
1.2	Genetik in der Schizophrenie	7
1.2.1	Familien-, Adoptions- und Zwillingsstudien.....	8
1.2.2	Molekulargenetik.....	10
1.2.3	Kopplungsstudien	10
1.2.4	Assoziationsstudien	12
1.3	Hirnstrukturelle Veränderungen bei Schizophrenie	16
1.4	Neurobiologische Faktoren	16
1.4.1	Dopaminhypothese	17
1.4.2	Glutamathypothese	18
1.5	Glutamaterges System	19
1.5.1	Glutamat – Physiologie	19
1.5.2	Glutamat – Rezeptoren	19
1.5.3	Der NMDA-Rezeptor	21
1.5.3.1	Aufbau	22
1.5.3.2	Funktionsmechanismus	24
1.5.3.3	Expression der einzelnen Untereinheiten	26
1.5.3.4	Einfluss der Untereinheiten auf die Rezeptoreigenschaften.....	27
1.5.3.5	NR1-Untereinheit	28
1.5.3.6	NR2-Untereinheit	29
1.5.4	Glutamat und Hirnentwicklung	30
1.5.5	Postmortem Befunde	31
1.5.6	NMDA-Rezeptor Hypofunktion und Neurotoxizität.....	32
1.5.7	Einfluss des NMDA-Rezeptors auf die Neuroplastizität.....	34
1.5.8	Veränderungen des NMDA-Rezeptors bei Schizophrenie.....	34
1.6	Assoziation von SNPs im GRIN2B-Gen mit Schizophrenie.....	35
2.	Fragestellung	46
3.	Material und Methoden	47
3.1	Vorbedingungen der Studiendurchführung	47
3.2	Studienteilnehmer	47
3.2.1	Kontrollprobanden.....	47
3.2.2	Patientenkollektiv	50
3.3	Laborverfahren	53
3.3.1	DNA-Extraktion	54
3.3.2	DNA-Konzentration	56
3.3.3	Genotypisierung	58
3.3.3.1	Assaydesign	59
3.3.3.2	iPLEX-Verfahren	59

3.3.3.3	Polymerasekettenreaktion.....	60
3.3.3.4	Dephosphorylierung	62
3.3.3.5	Extensionsreaktion	62
3.3.3.6	Massenspektrometrie.....	64
3.4	Statistische Auswertung	65
4.	Ergebnisse.....	66
4.1	Analyse des Markers rs10772692 des GRIN2B-Gens	66
4.1.1	Allelverteilung	66
4.1.2	Genotypenverteilungen.....	67
4.2	Analyse des Markers rs1806195 des GRIN2B-Gens	68
4.2.1	Allelverteilung	68
4.2.2	Genotypenverteilungen.....	69
4.3	Analyse des Markers rs10772693 des GRIN2B-Gens	70
4.3.1	Allelverteilung	70
4.3.2	Genotypenverteilungen.....	71
4.4	Analyse des Markers rs3026167 des GRIN2B-Gens	73
4.4.1	Allelverteilung	73
4.4.2	Genotypenverteilungen.....	74
4.5	Übersicht der vier untersuchten SNPs des GRIN2B-Gens.....	75
5.	Diskussion	76
5.1	Diskussion der Methoden	76
5.2	Diskussion der Ergebnisse.....	83
5.3	Ausblick.....	87
6.	Zusammenfassung	90
7.	Abkürzungsverzeichnis	92
8.	Literaturverzeichnis.....	96
	Danksagung	III

1. Einleitung

1.1 Die Schizophrenie

1.1.1 Definition

Die Schizophrenie zählt zu den zehn für das Gesundheitssystem teuersten Erkrankungen weltweit (Murray et al. 1996) und gehört zu den häufigsten Ursachen für Arbeits- und Erwerbsunfähigkeit (Lopez und Murray 1998). Nach ICD-10 sind "die schizophrenen Störungen im allgemeinen durch grundlegende und charakteristische Störungen von Denken und Wahrnehmung sowie durch inadäquate oder verflachte Affekte gekennzeichnet. Das Bewusstsein und die intellektuellen Fähigkeiten sind in der Regel nicht beeinträchtigt, obwohl sich im Laufe der Zeit gewisse kognitive Defizite entwickeln können".

Die Schizophrenie als eine Form der endogenen Psychose wird als sehr heterogene und komplexe psychiatrische Erkrankung angesehen, die massive Auswirkung auf die Lebensqualität der Betroffenen und deren Umwelt hat. Sie ist gekennzeichnet durch charakteristische Störungsmuster in den Bereichen Denken, der Wahrnehmung, Ich-Funktionen, Affektivität, Psychomotorik und Antrieb (Möller et al. 2009, Dervaux et al. 2005, Faraone et al. 2002).

Diskutiert wird eine multifaktorielle Entstehung der Erkrankung, wobei genetische Faktoren eine wichtige Stellung innerhalb der Ätiologie einnehmen.

1.1.2 Historische Aspekte

Bereits 1896 wurden von Emil Kraepelin mehrere, bis dahin als eigenständig betrachtete Krankheitsbilder aus dem psychiatrischen Formenkreis unter dem Oberbegriff Dementia praecox zusammengefasst. Es erfolgte, je nach Verlauf und vorherrschender Symptomatik, eine Unterteilung in verschiedene Subtypen, die der heutigen Hebephrenie, Katatonie und paranoid-halluzinatorischen Form der Schizophrenie entsprechen (Kraepelin 1896).

Im Jahre 1908 wurde von Eugen Bleuler eine weitere Einteilung der Symptomatik in Grund- und akzessorische Symptome vorgenommen. Unter besonderer Berücksichtigung des psychopathologischen Erscheinungsbildes der Erkrankung gab er dieser den Namen

Schizophrenie ("Bewusstseinspaltung"). Er wollte damit den Zerfall der Denkprozesse, die Spaltung zwischen Gedanken und Gefühlen und den Rückzug von der Realität beschreiben (Comer 2001). Unter den Grundsymptomen fasste Bleuler Assoziationsstörungen, Affektstörungen, Autismus und Ambivalenz zusammen. Zu den akzessorischen Symptomen zählten Wahn, Halluzinationen und Störungen des Ich-Erlebens (Möller et al. 2009). Im späteren Verlauf wurde zur Operationalisierung der Diagnostik eine Zusammenstellung in Symptome ersten und zweiten Ranges nach Kurt Schneider eingeführt (Ebert und Loew 2008), die in den siebziger Jahren zur feineren graduellen Abstimmung in Positiv- und Negativsymptome unterteilt wurden (Tabelle 1.1).

Tabelle 1.1: Symptome 1. und 2. Ranges der Schizophrenie
modifiziert nach K. Schneider (aus Ebert und Loew 2008)

	Symptom 1. Ranges	Symptom 2. Ranges
Akustische Halluzinationen	<ul style="list-style-type: none"> • dialogische Stimmen • kommentierende Stimmen • Gedankenlautwerden 	<ul style="list-style-type: none"> • sonstige akustische Halluzinationen
Leibhalluzinationen	<ul style="list-style-type: none"> • leibliche Beeinflussungserlebnisse 	
Halluzinationen auf anderen Sinnesgebieten		<ul style="list-style-type: none"> • optische, olfaktorische, gustatorische Halluzinationen
Ichstörungen	<ul style="list-style-type: none"> • Gedankeneingebung • Gedankenentzug • Gedankenausbreitung • Willensbeeinflussung 	
Wahn	<ul style="list-style-type: none"> • Wahnwahrnehmung 	<ul style="list-style-type: none"> • Wahneinfall/-gedanke

1.1.3 Klassifikation der Schizophrenie

Aktuell werden zur Diagnostik der Schizophrenie die zehnte Fassung der International Classification of Diseases der WHO (ICD-10) und das von der American Psychiatric Association konzipierte Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders in der vierten Edition (DSM-IV) herangezogen. Die Diagnosestellung erfolgt hierbei nicht anhand eines Einzelsymptoms, sondern wird mittels einer Mindestanzahl vordefinierter Kriterien gestellt. Die ICD-10 Klassifikation, die meist im praktischen Bereich zur Anwendung kommt, unterteilt die Schizophrenie in sieben Subklassen. Es wird von der

paranoiden, katatonen, hebephrenen und undifferenzierten Schizophrenie gesprochen. Zudem wird eine postschizophrene Depression, das schizophrene Residuum und die Schizophrenia simplex differenziert (Tabelle 1.2). Nach dem Klassifikationssystem des DSM-IV, das als Basis für die Forschung dient, werden fünf Hauptgruppen unterschieden: der paranoide, desorganisierte, undifferenzierte, katatone und residuale Typus (Möller et al. 2009).

Tabelle 1.2: Typen der Schizophrenie, modifiziert nach ICD-10
(aus Ebert und Loew 2008)

		ICD-10 Nr.
akut	• paranoide Schizophrenie (paranoid-halluzinatorische)	F20.0
	• hebephrene Schizophrenie	F20.1
	• katatone Schizophrenie	F20.2
	• undifferenzierte Schizophrenie (kein eindeutiger Subtyp)	F20.3
	• zoenästhetische Schizophrenie (und andere Formen)	F20.8
	Verlaufsformen (in deren Rahmen eine akute Episode auftritt)	
	• kontinuierlich	F20.x0
	• episodisch mit zunehmendem Residuum	F20.x1
	• episodisch mit stabilem Residuum	F20.x2
	• episodisch remittierend	F20.x3
	• einzelne Episoden mit unvollständiger Remission	F20.x4
	• einzelne Episoden mit vollständiger Remission	F20.x5
chronisch	• schizophreses Residuum	F20.5
	• (Schizophrenia simplex)	F20.6
	• schizotype Störung	F21
bei nur kurzer schizophrenietypischer Symptomatik	• akute schizophrenieforme psychotische Störung	F23.2

Ein weiterer Unterschied dieser Klassifikationssysteme liegt in den geforderten zeitlichen Gegebenheiten zur Diagnostik der Schizophrenie. Während die DSM-IV Leitlinien einen kontinuierlichen Erkrankungszeitraum von sechs Monaten fordern, ist in der ICD-10 Klassifikation eine Symptombdauer von vier Wochen ausreichend.

1.1.4 Krankheitsverlauf und Prognose

Der Verlauf und auch die Prognose der Schizophrenie sind individuell sehr unterschiedlich. Das Vollbild der Schizophrenie kann sich sowohl akut, als auch über Jahre hinweg schleichend, manifestieren. Grob lässt sich der Verlauf in drei Phasen unterteilen (Comer 2001). Dabei durchleben etwa ein Drittel der Betroffenen ein Prodromalstadium (Marneros et al. 1991). Dieses kann bis zu fünf Jahre vor der Erstmanifestation auftreten. Es ist gekennzeichnet durch eine Verminderung der persönlichen Leistungsfähigkeit, einen sozialen Rückzug sowie häufig auftretende depressive oder manische Phasen (Ebert und Loew 2008). Bei etwa 70% der Betroffenen überwiegt die Negativsymptomatik, bei 10% stehen positive Symptome im Vordergrund, bei den restlichen 20% kommt es zu einer Mischung beider Symptomkomplexe (Maurer und Häfner 1995). Im Stadium der akuten, produktiv psychotischen Phase, die in der Regel ein bis drei Monate andauert, treten die schizophrenen Symptome in den Vordergrund. Die Entwicklung dieses Krankheitsbildes kann entweder schnell erfolgen oder über mehrere Wochen hinweg entstehen. Ein stationärer Aufenthalt ist zu diesem Zeitpunkt meist unvermeidlich, zum einen aufgrund der Notwendigkeit der Behandlung der betroffenen Person, zum anderen aufgrund einer in vielen Fällen bestehenden Selbst- oder Fremdgefährdung (Ebert und Loew 2008, Comer 2001).

Generell kann die Krankheit in Schüben mit Ausbildung einer Restsymptomatik oder in Phasen mit vollständiger Remission auftreten. In wenigen Fällen kommt es zu einer Chronifizierung der schizophrenen Symptomatik, die somit zeitlebens bestehen bleibt. Die Mehrzahl der Betroffenen gelangt nach der akuten Erkrankungsphase in einen Residualzustand, der dem der Prodromalphase der Schizophrenie sehr ähnlich ist. Das Niveau der Prodromalphase oder der gesunden präpsychotischen Persönlichkeit wird allerdings in vielen Fällen im weiteren Verlauf nicht mehr erreicht (Ebert und Loew 2008).

Bei dem am häufigsten diagnostizierten Subtyp handelt es sich um die paranoid-halluzinatorische Schizophrenie (Deister und Maneros 1993). Hinsichtlich der Auftretenswahrscheinlichkeit der unterschiedlichen Verlaufstypen lässt sich eine anhaltende Symptomatik in mehr als zwei Drittel der Fälle bereits nach der ersten Episode, bei etwa 20% dagegen erst im späteren Verlauf feststellen. Eine langfristige Persistenz der Symptome tritt nur bei knapp 7% der Betroffenen auf (Marneros et al. 1991). Im

langjährigen Krankheitsverlauf durchleben über 90% der Betroffenen mehr als eine abgrenzbare Krankheitsepisode (Marneros et al. 1991).

Hinsichtlich der Prognose ist eine verlässliche Abschätzung sehr schwierig zu treffen, da der Verlauf der Schizophrenie individuell sehr unterschiedlich ist. Nach aktuellen Erkenntnissen ist davon auszugehen, dass diese umso schlechter ist, je früher die Erkrankung auftritt und je schleichender der Beginn ist (Ebert und Loew 2008). Nach klinischen Erfahrungen ist die Prognose bei einem akuten Erkrankungsbeginn und bei deutlich erkennbaren situativen Auslösern am besten, wobei Frauen mit einer Zuordenbarkeit der auslösenden Ereignisse und lediglich wenig Residual- und/oder Negativsymptomen die besten Erfolgsaussichten zugesprochen werden (Ebert und Loew 2008). Bei einem Teil der Patienten (ca. 20 – 35%) zeigt sich eine chronische Verlaufsform mit Ausbildung eines Residualstadiums (Bäumel et al. 2002).

Durch die aktuellen pharmakologischen Behandlungsmöglichkeiten kann hinsichtlich Verlauf und Prognose im Durchschnitt die „Drittelregel“ angewendet werden (Ebert und Loew 2008). Etwa ein Drittel der Betroffenen wird geheilt bzw. weist zumindest nur noch leichte, uncharakteristische Residuen auf. Bei einem weiteren Drittel persistieren mittelschwere, uncharakteristische Symptome. Das letzte Drittel wird mit dauernden typisch schizophrenen Residuen konfrontiert (Möller et al. 2009).

1.1.5 Epidemiologie der Schizophrenie

Die Lebenszeitprävalenz, d.h. das Risiko im Verlauf des Lebens mindestens einmal an einer schizophrenen Episode zu erkranken, liegt weltweit zwischen 0.5-1.6%. Auch bei einem variierenden soziokulturellen Hintergrund lassen sich in unterschiedlichen Ländern der Welt in etwa gleiche Prävalenzzahlen ermitteln (Tsuang et al. 1995). Die Anzahl der Ersterkrankungen im Hauptrisikualter, 15 bis 59 Jahre (Inzidenzrate), liegt zwischen 0.16 und 0.42 pro 1000 Einwohner. Die Erkrankungshäufigkeit zu einem bestimmten Zeitraum in einer definierten Bevölkerung schwankt zwischen 1.4 und 4.6 pro 1000 Einwohner (Punktprävalenz) (Wobrock et al. 2004).

Die Erkrankungshäufigkeit bei Männern und Frauen ist relativ ausgeglichen. Männer erkranken etwa drei bis vier Jahre früher als Frauen, wobei als Ursachen hierfür psychosoziale, subtypologische und neurohumorale Faktoren wie eine Schutzwirkung des Östrogens diskutiert werden (Wobrock et al. 2004). Generell liegt das Prädilektionsalter für den Ausbruch der Erkrankung bei Männern bei 21 Jahren (Häfner et al. 1991), bei Frauen bei 26 Jahren (Aleman et al. 2003) mit einem zusätzlichen Plateau in der Postmenopause (Rist et al. 2005). Berücksichtigt werden müssen dabei noch die einzelnen Subtypen der Schizophrenie, die wiederum charakteristische Unterschiede im Prädilektionsalter aufweisen. So beginnt der hebephrene Typ der Schizophrenie vorwiegend im Jugendalter, während sich eine Manifestation des paranoid-halluzinatorischen Subtyps überwiegend im mittleren Erwachsenenalter um das vierzigste Lebensjahr zeigt (Möller et al. 2009).

Unter Personen mit niedrigem Bildungsabschluss und niedrigem sozialem Status sind schizophrene Psychosen häufiger zu finden (ca. 45% aller Schizophrenen leben in der untersten sozialen Klasse). Dies wird auf eine durch die Schizophrenie ausgelöste Beeinträchtigung der sozialen Entwicklung zurückgeführt. Auch tritt die Schizophrenie vermehrt bei in Großstädten lebenden bzw. geborenen Personen auf (Ebert und Loew 2008).

1.1.6 Multifaktorielle Ätiopathogenese der Schizophrenie

Die Schizophrenie ist eine komplexe Erkrankung, wobei heutzutage von einer multifaktoriellen Entstehung mit einem Zusammenwirken genetischer, psychosozialer, biologischer und/oder hirnanatomischer Faktoren ausgegangen wird (Abbildung 1.1). Als gesicherte Faktoren gelten genetische Variationen und neurobiologische Veränderungen im Gehirn (Ebert und Loew 2008).

Beim Vorliegen verschiedener prädisponierender Faktoren und gleichzeitigem Auftreten eines auslösenden Geschehens, wie beispielsweise eines einschneidenden, kritischen Lebensereignisses oder durch die Einnahme von Halluzinogenen, kann es zur Erstmanifestation einer Psychose kommen.

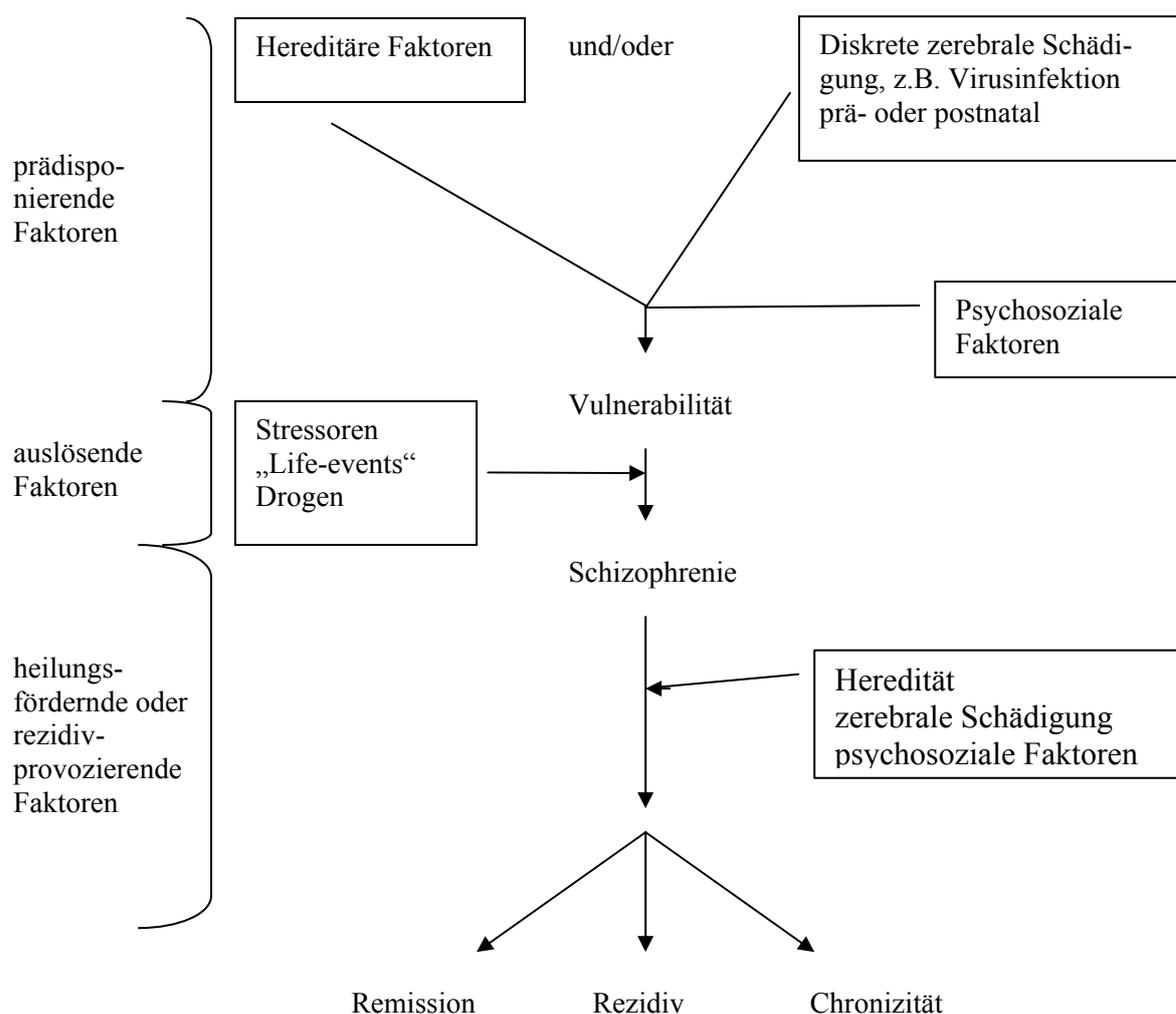


Abbildung 1.1: Multifaktorielle Entstehung der Schizophrenie
(aus Ebert und Loew 2008)

Andererseits kann sich eine Schizophrenie aber auch ohne Stressoren bei starker Disposition ausprägen. Bei den aufrechterhaltenden Bedingungen der Schizophrenie kommt es auf die Abwesenheit psychosozial heilungsfördernder Faktoren an (Möller et al. 2009).

1.2 Genetik in der Schizophrenie

In Familien-, Adoptions- und Zwillingsstudien konnte eine ausgeprägte genetische Komponente (polygener Erbgang) der Schizophrenie belegt werden (Tsuang et al. 2001, Cloninger 2002), die die unterschiedlichsten Bereiche betreffen kann. Generell weist die

Schizophrenie ein komplexes Vererbungsschema mit einer niedrigen Penetranz auf, sodass sich genetisch vermittelte Anlagen zur Entwicklung einer Schizophrenie auch in geringerer Ausprägung manifestieren können. Für die familiäre Häufung der Schizophrenie sind mit hoher Wahrscheinlichkeit mehrere untereinander agierende Genkonstellationen verantwortlich, von denen jede nur einen kleinen Teil zum Erkrankungsrisiko beiträgt (Wobrock et al. 2004).

1.2.1 Familien-, Adoptions- und Zwillingsstudien

Familien-, Adoptions- und Zwillingsstudien veranschaulichen die hohe genetische Komponente der Schizophrenie (Cardno et al. 1999). Das Risiko für die Entstehung einer Schizophrenie erhöht sich hierbei mit zunehmender genetischer Verwandtschaft (McGuffin et al. 1995). Vor allem bei Verwandten ersten und zweiten Grades einer an Schizophrenie erkrankten Person lässt sich eine Zunahme der Erkrankungshäufigkeit nachweisen (Bailer et al. 2002). In mehreren, auf operationalisierten Diagnosesystemen beruhenden Familienstudien, wurde bei Angehörigen ersten Grades von Schizophrenen trotz einer breiten Variation der Lebenszeitprävalenzen von ca. 1% (Coryell 1988) bis hin zu 16% (Parnas et al. 1993) eine signifikant vermehrte Häufung von sekundären Erkrankungen im Vergleich zu Angehörigen Gesunder (0-2%) gefunden (Bailer et al. 2002). In einer neueren Veröffentlichung wird das Erkrankungsrisiko für erstgradig Verwandte sogar mit 10% bis maximal 20% angegeben (Ebert und Loew 2008).

In durchgeführten Zwillings- und Adoptionsstudien wurden keine Hinweise auf relevante familiäre, nicht-genetische Umgebungsfaktoren gefunden. Demnach ist das gehäufte familiäre Auftreten vorwiegend auf genetische Faktoren zurückzuführen (Maier et al. 1999).

Mit Hilfe von Zwillingsstudien kann die Konkordanz von monozygoten Zwillingen, bei denen eine vollständige genetische Übereinstimmung vorherrscht, mit der von dizygoten Zwillingen, die sich nur etwa 50% der Gene teilen, verglichen werden. Bei eineiigen Zwillingen ergaben sich hierbei Konkordanzraten von 45% bis 75% für die Entstehung einer Schizophrenie, verglichen mit 4% bis 15% bei zweieiigen Zwillingen. Dies belegt wiederum die Relevanz genetischer Faktoren (Maier et al. 1999, vgl. Tabelle 1.3).

**Tabelle 1.3: Ergebnisse mehrerer Zwillingsstudien bei Schizophrenie
(Maier et al. 1999)**

Autoren	Anzahl untersuchter Paare (Indexfall mit Schizophrenie)		Probandenweise Konkordanzraten	
	MZ	DZ	DZ	MZ
Kringlen et al. (ICD-7)	555	90	45%	15%
Farmer et. al (DSM-III-R)	21	21	48%	10%
Onstad et al. (DSM-III-R)	31	28	48%	4%
Franzek und Beckmann (DSM-III-R)	21	18	75%	11%
Cannon et al. (DSM-III-R/ICD-8)	134	374	46%	9%

MZ = monozygote Zwillingspaare; DZ = dizygote Zwillingspaare

Andererseits wird durch die unvollständige Konkordanz bei monozygoten Zwillingen auf die Relevanz nicht genetischer Ursachenfaktoren bei der Entstehung der Schizophrenie hingewiesen. Durch Zwillingsstudien wird eine genetische Übertragung der Schizophrenie durch phänotypisch gesunde Personen belegt (Gottesman et al. 1989).

Adoptionsstudien ermöglichen die besten Darstellungen der genetischen Determination. Durch die Trennung von genetischen und umweltbedingten Faktoren liefern sie Hinweise für die Gewichtung der Genetik bei einer familiären Häufung der Schizophrenie. Die aus dem Verhältnis der Konkordanzraten ermittelte Schätzung für den Anteil der durch genetische Faktoren erklärbaren Heritabilität beträgt zwischen 50% und 87% (Cannon et al. 1998).

Bei Kindern ohne jegliche genetische Prädisposition für Schizophrenie existiert somit, auch in einer Adoptivfamilie mit einem schizophrenen Elternteil, kein erhöhtes Risiko für die Entwicklung einer Schizophrenie. Hingegen bleibt das Erkrankungsrisiko bei frühadoptierten Kindern mit an Schizophrenie erkrankten, leiblichen Eltern auch in einer gesunden Adoptivfamilie gleich (Kety et al. 1994).

1.2.2 Molekulargenetik

Durch molekulargenetische Untersuchungen hat sich die Erforschung der Schizophrenie in den letzten Jahren deutlich weiterentwickelt. Sie zählt ebenso wie affektive Störungen oder Diabetes mellitus zu den genetisch komplexen Erkrankungen (Corsico und McGuffin 2001, Lander und Schork 1994).

Der detaillierte molekulargenetische Mechanismus der Schizophrenie ist derzeit noch weitgehend unklar. Anhand neuerer Erkenntnisse kann ein monogener, den Mendelschen Regeln folgender, Erbgang ausgeschlossen werden (McGue und Gottesman 1989). Neuere Modelle gehen von einer polygenen Vererbung aus (Craddock et al. 2005), d.h. ein Zusammenspiel unterschiedlichster Faktoren, wie Geninteraktionen und umweltbedingte Risikofaktoren, die zur Krankheitsmanifestation führen können (Maier et al. 1999). Außerdem wird eine genetische Heterogenität angenommen, sodass dasselbe Merkmal durch verschiedene Mutationen an unterschiedlichen Genloci hervorgerufen werden kann.

Durch die im Rahmen von Familien-, Zwillings- und Adoptionsstudien gewonnenen Erkenntnisse wird die substantielle genetische Komponente der Schizophrenie weiter erhärtet (Gottesmann et al. 2001). Der Beitrag eines Gens zum Erkrankungsrisiko wird mit der so genannten Odds Ratio ausgedrückt, d.h. dem Vielfachen der normalen Chance zu erkranken, und entspricht etwa dem relativen Erkrankungsrisiko.

1.2.3 Kopplungsstudien

Mittels Kopplungs- und Assoziationsstudien sollen einzelne Gene, die an der Pathogenese der Schizophrenie beteiligt sind, identifiziert werden.

Bei so genannten Kopplungsuntersuchungen wird die überzufällige gemeinsame Vererbung von Allelen eines polymorphen Markergens oder eine überzufällige gemeinsame Vererbung eines Markergenortes innerhalb von Familien getestet (Bödecker und Ziegler 2000). Sie finden ihre Anwendung bei Geschwisterpaaren, Trios und Mutliplex-Familien.

Die Grundlage der Untersuchungen ist ein Gen-Kartierungsverfahren, wobei anfangs die mit Schizophrenie gekoppelten Loci vor der eigentlichen Identifikation des Gens bestimmt

werden (Rujescu 2007). Theoretisch wird davon ausgegangen, dass eine dem Phänotyp zugrunde liegende DNA-Sequenz und ein Marker mit umso geringerer Wahrscheinlichkeit durch eine Rekombination voneinander getrennt werden, je näher sie auf einem Chromosom liegen.

Das zur Untersuchung erforderliche Kollektiv sind Familien mit mindestens zwei erkrankten Mitgliedern. Bei komplexeren Erkrankungen, wie beispielsweise der Schizophrenie, ist die Untersuchung von erkrankten Geschwisterpaaren von Vorteil, da sich hier eher eine Homogenität für genetische Faktoren annehmen läßt (Maier et al. 1999). Als Maß für die gemeinsame Vererbung von genetischen Markern und der Erkrankung in Familien dient der "Transmission Disäquilibrium Test" (TDT) für das Kopplungsungleichgewicht.

Durch die Verwendung genetischer Variationen, wie beispielsweise Polymorphismen mit bekannter chromosomaler Lokalisation, ist es möglich, Hinweise auf die Lage der mit der Erkrankung gekoppelten Gene zu erhalten. Durch eine ausreichend große Anzahl an Markern läßt sich somit das gesamte Genom abdecken. Das Ausmaß der Kopplung wird hierbei durch den Abstand der Basenpaare zwischen Genom und Marker bestimmt.

Die ersten Kopplungsstudien basierten auf der Annahme, Gene mit einer Hauptwirkung auf die Schizophrenie zu identifizieren. Allerdings sind Mutationen mit einer sehr hohen Penetranz hinsichtlich einer klaren phänotypischen Manifestation äußerst selten oder nicht vorhanden (McGuffin und Owen 1996). Resultierend aus diesen Erkenntnissen wurden gemeinschaftliche Projekte zur Durchführung genomweiter Kopplungsstudien unternommen. Eine genaue Identifizierung eines Risikogens gestaltete sich jedoch schwierig (Giegling et al. 2008), da sich die ermittelten Loci über 10 bis 30 Centmorgan (cM) erstrecken.

In einer groß angelegten Meta-Analyse von Lewis et al. wurden 2003 die Daten von 20 genomweiten Kopplungsstudien mit insgesamt 1208 Stammbäumen zur Schizophrenie ausgewertet (Lewis et al. 2003). Hierdurch konnten größere Übereinstimmungen in den Ergebnissen dargelegt werden, als bislang vermutet wurde. Außerdem konnten durch diese Meta-Analyse verschiedene Hinweise auf Kopplungen bestätigt werden, die sich aus der Betrachtung homogener oder isolierter Bevölkerungsgruppen an einer geringen Anzahl von Stammbäumen ergaben. Die Studie zeigte hierbei die folgenden chromosomalen

Regionen auf: 1p13.3-q23.3, 2p12-q22.1, 2q22.1-q23.3, 3p25.3-p22.1, 5q23.2-q34, 6pter-p22.3, 6p22.3-p21.1, 8p22-p21.1, 11q22.3-q24.1, 14pter-q13.1, 20p12.3-p11, 22pter-q12.3.

Durch eine weitere Meta-Analyse von Ng et al. (2009), mit 32 eingeschlossenen Kopplungsstudien, konnten Hinweise auf eine Verbindung zwischen der Schizophrenie und Loci auf den Chromosomen 1, 2q, 3q, 4q, 5q, 8q und 10q gewonnen werden.

Durch diese Meta-Analysen konnte die Hypothese, dass mehrere Genorte zur Suszeptibilität für Schizophrenie beitragen, untermauert werden.

1.2.4 Assoziationsstudien

Ziel der Assoziationsstudien ist ein statistischer Vergleich der Allelfrequenzen genetischer Variation, wie beispielsweise der „single nucleotide polymorphism“ (SNPs) von nicht verwandten, erkrankten Personen und einer Kontrollstichprobe (Porteous 2008). Hierbei lassen sich auch Suszeptibilitätsgene mit einem geringeren krankheitsinduzierenden Effekt detektieren. Ein positives Ergebnis liegt vor, wenn der spezifische genetische Marker der untersuchten Population häufiger bei erkrankten als bei gesunden Personen vorkommt (Bödekker und Ziegler 2000).

Als Marker werden in gängigen Modellen zumeist Einzelnukleotid-Polymorphismen (SNPs) verwendet, die sich nur in einer Base unterscheiden. Im Falle einer Assoziation existieren mehrere Möglichkeiten: Der SNP kann das Gen funktionell beeinflussen oder er liegt mit dem, die Erkrankung verursachenden Polymorphismus im so genannten Kopplungsungleichgewicht. Die Assoziation beschreibt hierbei das überzufällige gemeinsame Auftreten einer genetischen Variation mit dem Vorliegen der Erkrankung.

Bei der Genauswahl kommen zum einen funktionelle und zum anderen positionelle Kandidatengene in Frage. Bei funktionellen Kandidatengenen handelt es sich meist um Gene, deren Funktion mit einer der bekannten Schizophreniehypothesen in Zusammenhang steht, wie beispielsweise Gene der dopaminergen und/oder glutamatergen Neurotransmission (Owen 2000), aber auch Gene, die mit der neuronalen Entwicklung assoziiert werden (Williams et al. 2009). Positionelle Kandidatengene dagegen liegen in einer Region mit einem signifikanten Kopplungsergebnis für Schizophrenie.

Bei einer genetisch sehr heterogenen Population kann es zu falsch-positiven Befunden durch "Stratifikation" kommen. In den letzten Jahren wurde daher zur Verbesserung der Aussagekraft von Assoziations- und Kopplungsstudien u.a. die Berechnung ganzer Haplotypenblöcke integriert (Schulze 2001).

Zu möglichen Suszeptibilitätsgenen der Schizophrenie existieren bisher zahlreiche Assoziationsstudien, u.a. Studien zu G72 und DAAO (Schumacher et al. 2004) oder zu DTNBP1 (Dysbindin) (Stefansson et al. 2002, van den Bogaert et al. 2003), bei denen eine Assoziation ermittelt werden konnte. In anderen unabhängigen Studien zu den genannten Genen konnte allerdings keine bzw. nur eine sehr geringe Assoziation belegt werden (Goldberg et al. 2006, Hall et al. 2004, Morris et al. 2003).

Straub und Weinberger benannten 2006 in einer groß angelegten Meta-Analyse 17 Kandidatengene (RGS4, DISC1, GAD1, ERBB4, DTNBP1, MUTED, GRM3, NRG1, PPP3CC, GRIK4, FEZ1, DAAO, DAOA, AKT1, CHRNA7, COMT und PRODH), die eine Assoziation zur Schizophrenie aufweisen, wobei GAD1, GRM3 und GRIK4 dem glutamatergen System zuzuordnen sind (Straub und Weinberger 2006; Tabelle 1.4).

Durch Allen et al. konnte 2008 in einer weiteren groß angelegten Meta-Analyse aufgezeigt werden, dass auf 16 Genen (APOE, COMT, DAO, DRD1, DRD2, DRD4, DTNBP1, GABRB2, GRIN2B, HP, IL1B, MTHFR, PLXNA2, SLC6A4 TP35 und TPH1) 24 Polymorphismen mit einer signifikanten Assoziation zur Schizophrenie liegen (Allen et al. 2008).

In einer Studie aus dem Jahr 2007, welche 500000 Marker integrierte, konnte eine Assoziation zu dem Locus rs4129148 in der Nähe des Gens CSF2RA, welches in der pseudoautosomalen Region des X- und Y-Chromosoms liegt, belegt werden. In einer anschließenden unabhängigen Fall-Kontroll-Studie wurden bei einer Sequenzierung dieses Gens und des benachbarten Gens ILR3 weitere Assoziationen zur Schizophrenie identifiziert. Aufgrund des Zusammenhangs der signifikanten Ergebnisse mit dem Immunsystem lieferten diese interessante Erklärungsansätze für epidemiologische Daten, wie beispielsweise das Auftreten von Schizophrenie nach pränatalen Erkrankungen (Lencz et al. 2007).

Tabelle 1.4: Kandidatengene für Schizophrenie
adaptiert nach Straub und Weinberg 2006 (aus Rujescu 2007)

Gen		Chr.region	Assoziation
RGS4	Regulator of G-protein signalling 4	1q23.3	+++
DISC1	Disrupted in schizophrenia 1	1q42.1	++++
GAD1	Glutamate decarboxylase 1 (brain, 67 kDa)	2q31	++
ERBB4	v-erb-a erythroblastic leukaemia viral oncogene homolog 4 (avian)	2q33.3-q34	++
DTNBP1	Dystrobrevin binding protein 1	6p22.3	+++++
MUTED	Muted homolog (mouse)	6p25.1-p24.3	++++
GRM3	Glutamate receptor, metabotropic	7q21.1-q21.2	+++
NRG1	Neuregulin 1	8p12	+++++
PPP3CC	Protein phosphatase 3 (formerly 2B), catalytic subunit, gamma isoform	8p21.3	+
GRIK4	Glutamate receptor, ionotropic, kainate 4	11q22.3	++
FEZ1	Fasciculation and elongation protein zeta 1 (zygin 1)	11q24.2	++
DAAO	D-amino-acid oxidase	12q24	++
DAOA	D-amino-acid oxidase activator	13q34	+++
AKT1	V-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1	14q32.32	+
CHRNA7	Cholinergic receptor, nicotinic, alpha 7	15q14	+
COMT	Catechol-O-methyltransferase	22q11.21	++
PRODH	Proline dehydrogenase (oxidase) 1	22q11.21	+

Eine weitere genomweite Assoziationsstudie erfolgte im Rahmen der CATIE-Studie. Hier wurden 492 900 SNPs von an Schizophrenie erkrankten Personen (Diagnosestellung nach DSM-IV Kriterien) und 733 Kontrollprobanden genotypisiert, ohne dass sich eine signifikante Assoziation zeigte. Allerdings könnte unter anderen Studienbedingungen bei einigen vielversprechenden SNPs aus dieser Studie eine Identifikation weiterer Suszeptibilitätsloci möglich sein (Sullivan et al. 2008).

In einer weiteren genomweiten Assoziationsstudie von O'Donovan et al. (2008) wurden 479 an Schizophrenie erkrankte Personen (nach DSM-IV Kriterien) und 2937 Kontrollprobanden integriert. Hier wurden insgesamt 362532 SNPs auf eine Assoziation zur Schizophrenie untersucht und anschließend die Loci mit einem p-Wert $< 10^{-5}$ von weiteren 16726 Studienteilnehmern einem genauen Follow-Up, einschließlich einer Meta-

Analyse, unterzogen. Basierend darauf konnten drei SNPs detektiert werden, wobei die stärkste Assoziation bei ZNF804A auf Chromosom 2 lag.

Durch Stefansson et al. (2009) wurden 2663 an Schizophrenie erkrankte Personen und 13498 gesunde Kontrollprobanden an acht unterschiedlichen europäischen Standorten in Deutschland, Italien, Finnland, Island und Schottland rekrutiert. Insgesamt wurden 314868 SNPs in die Studie eingeschlossen, wobei die Ergebnisse der besten Marker mit weiteren Replikationsstichproben kombiniert wurden. Zusätzlich wurde ein Follow-Up mit weiteren 4999 an Schizophrenie erkrankten Personen und 15555 Kontrollprobanden durchgeführt. Die hieraus resultierenden signifikanten Ergebnisse zu Markern in der Region des *Major Histocompatibility Complex* stimmen mit den Theorien einer Beteiligung des Immunsystems an der Entstehung der Schizophrenie überein. Die zusätzlich detektierten Assoziationen mit NRG1 und TCF4 bestärken zudem die These der gestörten Hirnentwicklung (Stefansson et al. 2009). Für eine Assoziation zwischen dem Immunsystem und der Schizophrenie sprechen auch die Ergebnisse von Shi et al. (2009), die ebenfalls eine Signifikanz in der Region des *Major Histocompatibility Complex* belegen konnten.

Neben Untersuchungen zu SNPs werden auch die so genannten *Copy Number Variants*, also Genkopienzahlen im Hinblick auf ihre Assoziation zur Schizophrenie untersucht (Stefansson et al. 2008). In einer genomweiten Studie des Internationalen Schizophrenie Konsortiums zu seltenen Copy Number Variants konnten Deletionen in der Region festgestellt werden, die für velocardiofaciale Syndrome codieren, welche in 30% der Fälle auch psychotische Symptome verursachen. Weiterhin konnten Deletionen auf Chromosom 15q13.3 und Chromosom 1q21.1 aufgezeigt werden, die zuvor noch nicht detektiert wurden (The International Schizophrenia Consortium 2008).

Neben diesen genetischen Faktoren werden noch weitere Komponenten für die Entstehung einer Schizophrenie diskutiert, wie beispielsweise Veränderungen der Hirnarchitektur oder neurobiologische Faktoren.

1.3 Hirnstrukturelle Veränderungen bei Schizophrenie

Bei einem Teil der an Schizophrenie erkrankten Personen konnten in postmortalen NMR-Aufnahmen strukturelle Auffälligkeiten des Gehirns nachgewiesen werden. Typischerweise sind dabei eine Erweiterung der Ventrikel bei gleichzeitig reduziertem Gesamthirnvolumen, vor allem des Frontallappens, der medialen Temporallappen und im Bereich hippocampaler Strukturen, zu finden (Wright et al. 2000). Zusätzlich wurden ein Verlust der grauen Substanz mit globaler Atrophie, eine Reduktion von Neuropil in Hippocampus, Amygdalae, Thalamus, Temporallappen, frontoorbital sowie präfrontal (Ebert und Loew 2008) nachgewiesen. Im Thalamus konnten von Brickman et al. (2004) bei schizophrenen Personen im Vergleich zu gesunden Kontrollen strukturelle und metabolische Unterschiede dargestellt werden.

Als Ursache all dieser Veränderungen wird eine Störung in der Reifungs- und Entwicklungsphase des Gehirns diskutiert (Keshavan et al. 1994, Murray et al. 1991). Gestützt wird dies auf das Fehlen einer Astrogliose bei postmortem Gehirnen schizophrener Personen, dem typischen Zeichen neurodegenerativer Prozesse, welche beim Untergang von Nervenzellen entsteht (Falkai et al. 1999). Auch histologisch zeigt sich eine reduzierte Zellzahl und Zellgröße sowie eine gestörte hippocampale Zytoarchitektur (Sweatt 2004).

Auch eine Störung der Konnektivität zwischen Neuronen, verursacht durch eine Veränderungen der Axonmyelinisierung oder abnorme/degenerierte Synapsen und Dendriten wurde in diversen Studien als Ursache der Schizophrenie diskutiert (Möller et al. 2009, McGlashan et al. 2000).

1.4 Neurobiologische Faktoren

Im Mittelpunkt der biochemischen Schizophrenieforschung steht eine gestörte Neurotransmission, wobei das Hauptaugenmerk auf das dopaminerge und glutamaterge System gelegt wird.

1.4.1 Dopaminhypothese

Für die Entstehung schizophrener Psychosen mit Positivsymptomatik wird neurobiochemisch vor allem eine Überaktivität des mesolimbischen dopaminergen (DA) Systems verantwortlich gemacht.

Dopamin (DA) wird biosynthetisch über Dihydroxyphenylalanin aus der Aminosäure Tyrosin gewonnen und ist der dominierende Catecholamin-Neurotransmitter im zentralen Nervensystem des Menschen (Vallone et al. 2000). Das zerebrale dopaminerge System ist an einer Vielzahl von physiologischen und pathophysiologischen Prozessen beteiligt (Missale et al. 1998). Zu den physiologischen Prozessen zählen Emotionen, die Motorik, die Wahrnehmung und die endokrine Sekretion (Jaber et al. 1996). Veränderungen der dopaminergen Neurotransmission können u.a. zur Ausprägung einer Schizophrenie führen. In der gängigen Literatur wird das Auftreten der so genannten Plusssymptome der Schizophrenie in erster Linie auf eine regionale Hyperaktivität des Dopaminsystems (der dopaminergen Neurone) im Striatum zurückgeführt (Ebert und Loew 2008). Die Induktion psychotischer Symptome wird durch dopaminerge Substanzen (Dopaminagonisten), wie beispielsweise Amphetamin (bewirkt eine DA-Freisetzung) (Laruelle et al. 1996, Breier et al. 1997), sowie durch die antipsychotische Wirksamkeit der Neuroleptika mittels zentraler D₂-Rezeptor-Blockade gestützt. Diese These wird jedoch durch die Tatsache limitiert, dass die Einnahme klassischer Neuroleptika zwar zu einer Besserung der Positivsymptomatik, aber nur gering zu einer Beeinflussung der Negativsymptomatik führt (Meltzer 1997). In weiteren fortführenden Studien wurde schließlich eine modulierte Dopaminhypothese präsentiert, die nicht mehr von einem generellen Überangebot ausging, sondern eine Imbalance zwischen kortikalen und subkortikalen Bereichen postulierte.

Eine hypothetisch auftretende phasische Hyperaktivität im mesolimbischen Dopaminsystem kann somit eine Antwort sein auf eine primäre Hypoaktivität in mesofrontalen Dopaminbahnen mit der Entstehung von Negativsymptomen (Davis et al 1991, Ebert und Loew 2008). Wenn nun adaptiv zum Ausgleich dieses Defektes vermehrt Dopamin ausgeschüttet wird, führt dies in mesolimbischen Regionen zu einer relativen Überaktivierung des Dopaminsystems mit Plusssymptomen. Dies wiederum wäre auch eine Erklärung, warum Neuroleptika Plusssymptome vermindern, Minussymptome aber verstärken. Diese vereinfachende Theorie wird allerdings durch die unterschiedlichen Subtypen des Dopaminsystems kompliziert, die teilweise auch antagonistisch wirken.

Inzwischen existieren erste Untersuchungen mit neuen D₁-Rezeptor-sensitiven Radioliganden, die teilweise eine Erhöhung der Verfügbarkeit im dorsolateralen präfrontalen Cortex aufzeigen (Abi-Dargham et al. 2002). Dies könnte als indirekter Hinweis auf eine Unterfunktion des Dopaminsystems interpretiert werden.

Generell ist die Dopaminsynthese mit vielen weiteren neurobiochemischen Systemen vernetzt, bei denen auch in den letzten Jahren Anomalien bei an Schizophrenie erkrankten Personen festgestellt wurden. So wird beispielsweise von einer Interaktion zwischen beiden Systemen, dem Dopamin- und dem Glutamatsystem, ausgegangen.

1.4.2 Glutamathypothese

Die biologische Forschung der Schizophrenie war in den letzten Jahrzehnten im Wesentlichen durch die Hypothese einer gestörten dopaminergen Neurotransmission geprägt. Dennoch scheint die Möglichkeit zu bestehen, dass ein gestörtes dopaminerges System nicht die initiale und eigentliche Pathologie der Schizophrenie bildet, sondern vielmehr die Konsequenz einer anderen Pathophysiologie darstellt. Nach der Glutamathypothese besteht bei Schizophrenen eine Unterfunktion des hemmenden glutamatergen Systems. Als klinischer Beleg dafür dienen die von Phencyclidin (PCP, „angel dust“) und Ketamin induzierten Psychosen, die noch stärker dem Bild schizophrener Psychosen ähneln als Amphetaminpsychosen (Javitt und Coyle 2004, Krystal et al. 1994). Aus der glutamatergen Unterfunktion lässt sich somit wiederum eine Dopaminüberfunktion ableiten.

Auch die häufig bei schizophrenen Patienten alterierten Hirnregionen, wie beispielsweise der frontale Cortex und der Hippocampus, mit besonders viel glutamaterger Neurone, lassen sich mit einer glutamatergen Unterfunktion vereinbaren (Coyle und Tsai 2004).

Ebenso konnte bereits im Jahr 1980 durch Kim et al. eine verminderte Glutamatkonzentration im Liquor bei Schizophrenen nachgewiesen werden (Kim et al. 1980). Diese Hypothese wurde in den folgenden Jahren durch zahlreiche weitere Untersuchungen, wie beispielsweise durch Fallgatter et al. (2010), bestätigt, aber teilweise auch nicht repliziert.

Basierend auf der Glutamathypothese wurden in den vergangenen Jahren zahlreiche Kandidatengene innerhalb des glutamatergen Systems benannt. So konnte durch Straub et

al. (2002) eine Variation des Gens Dysbindin (DTNBP1) mit der Schizophrenie und den kognitiven Aspekten der Erkrankung assoziiert werden. Stefansson et al. beschrieben 2002 Neuregulin 1 als mögliches Vulnerabilitätsgen der Schizophrenie. Dies wurde durch Mei und Xiong (2008) bestätigt. Zudem wurden u.a. das DAAO-Gen und das Gen G72 (Chumakov et al. 2002) als weitere, das glutamaterge Systeme regulierende Gene benannt.

1.5 Glutamaterges System

1.5.1 Glutamat – Physiologie

Glutamat ist eine Aminosäure, die vorwiegend der Proteinbiosynthese dient. Darüber hinaus ist Glutamat (Glu) der am häufigsten vorkommende und am stärksten erregend (exzitatorisch) wirkende kortikale Transmitter im zentralen Nervensystem (Carlsson et al. 1997), der für die Aktivierung exzitatorischer Neurone verantwortlich ist. Nahezu 50% aller Neurone im Gehirn werden durch Glutamat moduliert (Snyder et al. 2000).

Nach der Freisetzung von Glutamat wird dieses von Astrozyten aufgenommen und zu Glutamin umgewandelt, welches wiederum zum präsynaptischen Neuron zurücktransportiert und zu Glutamat rekonvertiert. Durch Glutamat wird eine normale synaptische Informationsübertragung, Lernen und Gedächtnis, die Formation neuronaler Netzwerke während der Entwicklung sowie die Ausbildung neuronaler Plastizität gewährleistet (Sheng und Kim 2002). Zudem sind Glutamatrezeptoren an der Neurotoxizität beteiligt (Konradi und Heckers 2003).

Begründet auf den Feststellungen, dass die bei Schizophrenie häufig veränderten Hirnareale, wie der Hippocampus, relativ viele glutamaterge Neurone enthalten, wird Glutamat eine große Bedeutung bei der Entstehung der Schizophrenie zugesprochen.

1.5.2 Glutamat – Rezeptoren

Glutamatrezeptoren können pharmakologisch, elektrophysiologisch und biochemisch in zwei Hauptgruppen unterteilt werden: die ionotropen Rezeptoren, welche einen integralen kationenspezifischen Ionenkanal enthalten und die metabotropen, an G-Protein gekoppelte Rezeptoren (Nakanishi 1992, Tabelle 1.5). Zu den ionotropen Glutamatrezeptoren (iGluR)

werden nach ihren unterschiedlichen Liganden die α -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolpropionsäure (AMPA), N-Methyl-D-Aspartat (NMDA) sowie die Kainat-Rezeptoren gezählt (Kim et al. 1998, Keith 2001, Hollmann und Heinemann 1994, Mori und Mishina 1995). Durch Expressionsstudien konnte gezeigt werden, dass die Vielfalt der ionotropen Glutamatrezeptoren weitaus größer ist, als in pharmakologischen und elektrophysiologischen Studien angenommen wurde. Zusätzlich berücksichtigt werden müssen zudem unterschiedliche Varianten durch alternatives Spleißen und „RNA editing“ (Ozawa et al. 1998). Veränderungen der zerebralen Dichte und Struktur dieser Rezeptoren werden als Hinweis für eine gestörte glutamaterge Neurotransmission gewertet (Gallinat und Gudlowski 2008). In postmortem Studien wurde bei an Schizophrenie erkrankten Personen konsistent eine erhöhte präfrontale Dichte der Kainat- und AMPA-Rezeptoren im Hippocampus festgestellt, wohingegen NMDA-Rezeptoren in ihrer Dichte bei Schizophrenie kaum verändert zu sein scheinen (Harrison et al. 2003, Kerwin et al. 1990).

Tabelle 1.5: Klassifikation der Glutamatrezeptoren und ihrer Untereinheiten
(aus Cherlyn et al. 2010)

Ionotrope Glutamatrezeptoren			
Untereinheiten	NMDA	AMPA	Kainate
	NR1 (GRIN1)	GluR1 (GRIA1)	GluR5 (GRIK1)
	NR2A (GRIN2A)	GluR2 (GRIA2)	GluR6 (GRIK2)
	NR2B (GRIN2B)	GluR3 (GRIA3)	GluR7 (GRIK3)
	NR2C (GRIN2C)	GluR4 (GRIA4)	KA1 (GRIK4)
	NR2D (GRIN2D)		KA2 (GRIK5)
	NR3A (GRIN3A)		
	NR3B (GRIN3B)		
Metabotrope Glutamatrezeptoren			
Untereinheiten	Gruppe 1	Gruppe 2	Gruppe 3
	mGluR1 (GRM1)	mGluR2 (GRM2)	mGluR4 (GRM4)
	mGluR5 (GRM5)	mGluR3 (GRM3)	mGluR6 (GRM6)
			mGluR7 (GRM7)
			mGluR8 (Grm8)

Die G-Protein gekoppelten metabotropen Glutamatrezeptoren (mGluR), welche prä- und postsynaptisch und auf Gliazellen vorkommen, bestehen jeweils aus sieben verschiedenen

Transmembrandomänen. Aktuell sind acht Subtypen bekannt, die sich in drei Gruppen unterteilen lassen (De Blasi et al. 2001). Die Gruppe I Rezeptoren (mGluR1, mGluR5) sind für die Stimulierung der Aktivität der Phospholipase C, die cAMP-Bildung und die Freisetzung von Arachidonsäure verantwortlich (Aramori und Nakanishi 1992). Die Rezeptoren der Gruppe II (mGluR2, mGluR3) sowie die Rezeptoren der Gruppe III (mGluR4, mGluR6, mGluR7, mGluR8) hemmen die Aktivität der Adenylatzyklase (Fagni et al. 2000, Pellicciari und Costantino 1999). Die metabotropen Glutamatrezeptoren haben im Gegensatz zu den ionotropen, mit ihrer schnellen exzitatorischen Erregungsübertragung, eher eine modulatorische Funktion im Sinne einer Feinabstimmung der synaptischen Wirksamkeit und Regulation der Freisetzung von Glutamat (Spooren et al. 2003).

1.5.3 Der NMDA-Rezeptor

NMDA (N-Methyl-D-Aspartat)-Rezeptoren sind die komplexesten der ionotropen Glutamatrezeptoren. Sie stellen Liganden-gesteuerte Ionenkanäle dar und sind im ZNS verantwortlich für eine exzitatorische (erregende) Neurotransmission (Lynch und Guttman 2001). Annähernd 50% aller Neurone im Gehirn werden durch L-Glutamat moduliert (Snyder et al. 2000).

Der NMDA-Rezeptor verfügt im Vergleich zu den beiden anderen Glutamatrezeptortypen (AMPA- und Kainat-Rezeptor) über eine bedeutend höhere Ca^{2+} -Permeabilität (Burnashev et al. 1995). Er enthält neben der Bindungsstelle für den eigentlichen Neurotransmitter Glutamat eine weitere Bindungsstelle für Glyzin, das er zusätzlich für seine Aktivierung benötigt (Kleckner und Dingledine 1988, Brewer und Cotman 1989). Daneben ist er überwiegend permeabel für Calciumionen, in geringem Maße auch für Natrium- und Kaliumionen (Köles et al. 2001, Stark et al. 2000). Zudem existiert eine Bindungsstelle für Kanalblocker wie PCP oder MK-801, eine spannungsabhängige Mg^{2+} -Bindungsstelle, an die Zn^{2+} bindet und eine Polyamin-Bindungsstelle (Kapur und Seeman 2002).

Nach Anlagerung von Glutamat am Rezeptor öffnet sich der Ionenkanal und ermöglicht den Durchtritt von Kalzium- und Natriumionen. Hierdurch werden zahlreiche weitere intrazelluläre Vorgänge aktiviert. Zudem konnte in den vergangenen Jahren eine Interaktion des NMDA-Rezeptors mit mehreren intrazellulären, in der postsynaptischen

Dichte (PSD) gelegenen Proteinen nachgewiesen werden (Kornau et al. 1995). Desweiteren spielt der NMDA-Rezeptor eine wichtige Rolle bei synaptischer Plastizität in Form von LTP („long-term potentiation“) und LTD („long-term depression“) (Ozawa et al. 1998).

Der NMDA-Rezeptor ist entscheidend an der Hirnentwicklung, dem Gedächtnis, dem Lernen und an neuronalen Prozessen allgemein beteiligt (Javitt et al. 2004). Durch Rujescu et al. (2006) konnte im Tiermodell die Theorie einer NMDA-Hypofunktion bei Schizophrenie bekräftigt werden. Hierbei zeigte sich bei den Tieren, die mit dem NMDA-Antagonisten MK-801 behandelt wurden, auf zellulärer, molekularer und funktioneller Ebene Veränderungen ähnlich denen bei schizophrenen Personen.

Ebenso lassen sich Positiv- wie auch Negativsymptome durch NMDA-Rezeptordysfunktionen bzw. durch die Verabreichung von NMDA-Rezeptoragonisten erklären.

1.5.3.1 Aufbau

Der NMDA-Rezeptor ist ein heteromerer Membranproteinkomplex. Er besteht aus mehreren Untereinheiten: NR1 als nicht-variable Untereinheit und NR2A-D als variable Untereinheiten, die zusammen in unterschiedlicher Kombination ein Tetramer bilden. Je nach Zusammensetzung ergeben sich hieraus verschiedene physiologische und pharmakologische Eigenschaften (Lynch und Guttman 2001). In einigen Fällen werden zwei weitere Untereinheiten beschrieben, NR3A und NR3B (Misra et al. 2000), die hauptsächlich postnatal auftreten und von denen angenommen wird, dass sie an der Ausbildung synaptischer Elemente durch Modulation von NMDA-Rezeptoren beteiligt sind (Danysz und Parsons 1998).

Am Aufbau des Rezeptors sind meist zwei NR1- und zwei NR2-Untereinheiten beteiligt (Hollmann und Heinemann 1994, Madden 2002, Millan 2002). Die NR1-Untereinheit ist hierbei die wichtigste Untereinheit des NMDA-Rezeptors und in jedem Entwicklungsstadium zu finden, ohne sie ist der Kanal nicht funktionsfähig (Stephenson 2001). Die NR1-Untereinheit bildet einen Teil des funktionsfähigen Rezeptors mit einigen NMDA-Rezeptor-Eigenschaften, wie beispielsweise einer spannungsabhängigen Mg^{2+} -Blockade und Co-Agonismus von Glyzin (Grimwood et al. 1995, Siegel et al. 1996). Die

Verteilung der mRNA der NMDA-Rezeptor-Untereinheiten im ZNS weist regionale und entwicklungsabhängige Unterschiede auf (Monyer et al. 1992, Takahashi et al. 1996, Das et al. 1998). Die NR1- und NR2A-Untereinheiten werden im gesamten ZNS exprimiert, mit der höchsten Dichte im Hippocampus, während die NR2B-Untereinheit vorwiegend im Cortex, im Hippocampus sowie in den Basalganglien vorkommt.

Die Untereinheiten setzen sich aus drei Transmembrandomänen und einem „reentrant loop“ zusammen. Der N-Terminus der Transmembrandomänen enthält eine S1- und S2-Region, welche die Bindungsstelle für die Agonisten Glutamat, Glycin und NMDA formt. Im Zentrum eines jeden Rezeptors findet sich ein Ionenkanal, der durch den Ein- und Ausstrom von Kationen zu intra- und extrazellulären Reaktionen führt (Rosenmund et al. 1998, Safferling et al. 2001).

Von den am Aufbau des NMDA-Rezeptors beteiligten NR1-Untereinheiten sind bisher acht verschiedene, durch alternatives Spleißen der Exons 5, 21 und 22 entstehende Isoformen kloniert worden (NR1a-h), während für den NR2-Subtyp vier, auf verschiedenen Genen codierte Untereinheiten (NR2A, NR2B, NR2C, NR2D) bekannt sind, die sich in ihrer Aminosäuresequenz unterscheiden (Ikeda et al. 1992). Insgesamt enthält die NR1-Untereinheit zwei Glyzinbindungsstellen (Kuryatov et al. 1994, Hirai et al. 1996, Kew et al. 2000). Die beiden Glutamatbindungsstellen bzw. die Bindungsstellen für kompetitive Antagonisten, wie beispielsweise D-AP5, befinden sich an der NR2-Untereinheit.

Innerhalb eines NMDA-Rezeptors können mehrere unterschiedliche NR2-Untereinheiten exprimiert werden, wobei der jeweilige Subtyp das Funktionsprofil, die Kinetik des Rezeptors sowie die Affinität und die Effizienz der an der Glyzinbindungsstelle interagierenden Agonisten beeinflusst (Vicini et al. 1998, Cull-Candy et al. 2001, Sheinin et al. 2001, Madden 2002, Liu et al. 2004).

Der C-Terminus der NR2A- und NR2B-Untereinheit steht in engem Kontakt zu einer so genannten PDZ-bindenden Domäne (Proteininteraktionsdomäne), die wiederum an zahlreiche unterschiedliche Gerüstproteine in der postsynaptischen Verbindung ligieren kann (Sheng und Pak 2000). Der C-Terminus der NR2-Untereinheit setzt sich aus ca. 630 bis 650 Aminosäuren und Tyrosinresten zusammen, während der C-Terminus der NR1-

Untereinheit sehr viel kürzer ist (Salter und Kalia 2004). Die NMDA-Rezeptoruntereinheiten bestehen aus 920 bis 1456 Aminosäuren. Das Molekulargewicht der NR1-Untereinheiten liegt bei etwa 100 kDa und ähnelt dem Molekulargewicht der Non-NMDA-Rezeptoren. Die NR2-Untereinheiten besitzen bei einem Molekulargewicht zwischen 130 und 165 kDa deutlich mehr Aminosäuren (McBain und Mayer 1994).

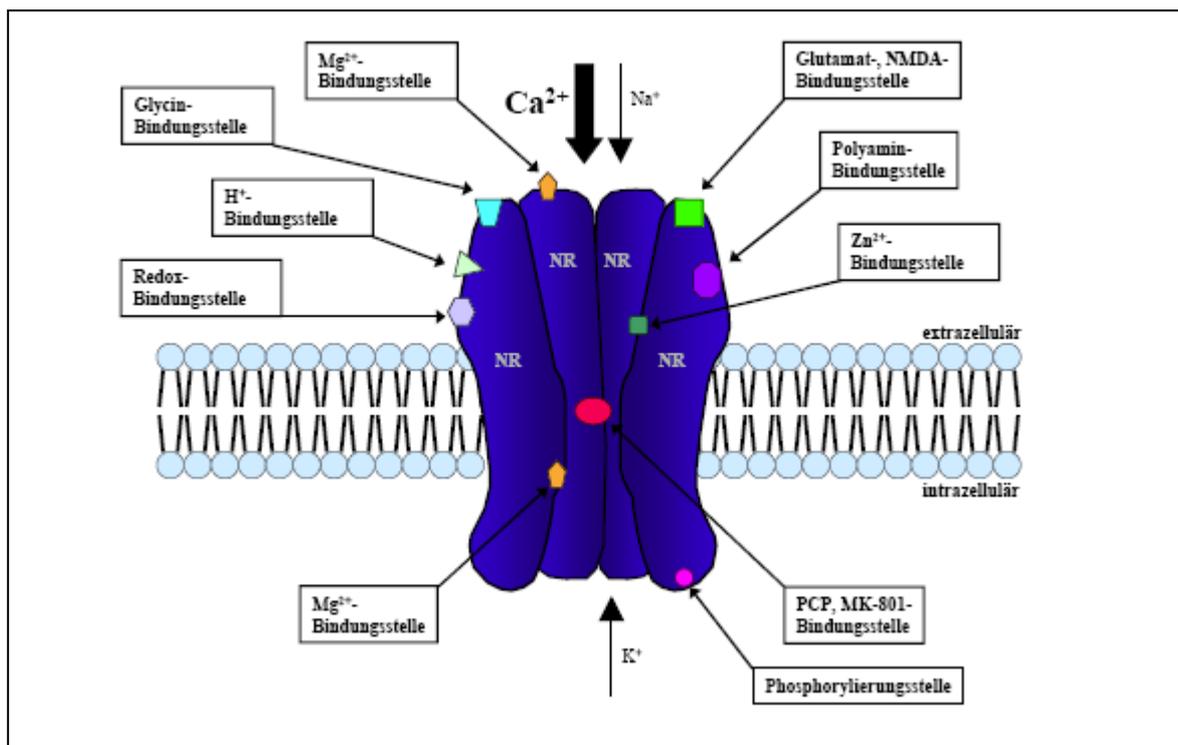


Abbildung 1.2: NMDA-Rezeptor mit Bindungsstellen
(modifiziert nach Leeson et al.)

Die aus zwei Subtypen bestehenden NR3-Untereinheiten können lediglich an die NR1-Untereinheit (Perez-Otano et al. 2001) des NR1-NR2-Komplex binden (Sasaki et al. 2002) und somit eine Glycinbindungsstelle bzw. einen Glycinrezeptor bilden, dessen Funktion im ZNS noch unbekannt ist (Prybylowski und Wenthold 2004) (Abbildung 1.2). Durch diese Interaktion wird die NMDA-Rezeptoraktivität deutlich verringert.

1.5.3.2 Funktionsmechanismus

Obligat für die Aktivierung des Rezeptors sind zwei Co-Agonsiten, die sich an die an der NR1- und NR2-Untereinheit lokalisierte Glycin- und Glutamatbindungsstelle anlagern

(Kew et al. 2000, Laube et al. 1998, Anson et al. 1998, Anson et al. 2000) und somit zu einer gegenseitigen Funktionsbeeinflussung führen (Danysz und Parsons 1998). So verbessert Glyzin durch seine Fähigkeit, die Desensibilierungsphase zu verlängern und die Dauer der Frequenz der Signalöffnung zu erhöhen, die Affinität und die Wirksamkeit von Glutamat (Dingledine et al. 1999).

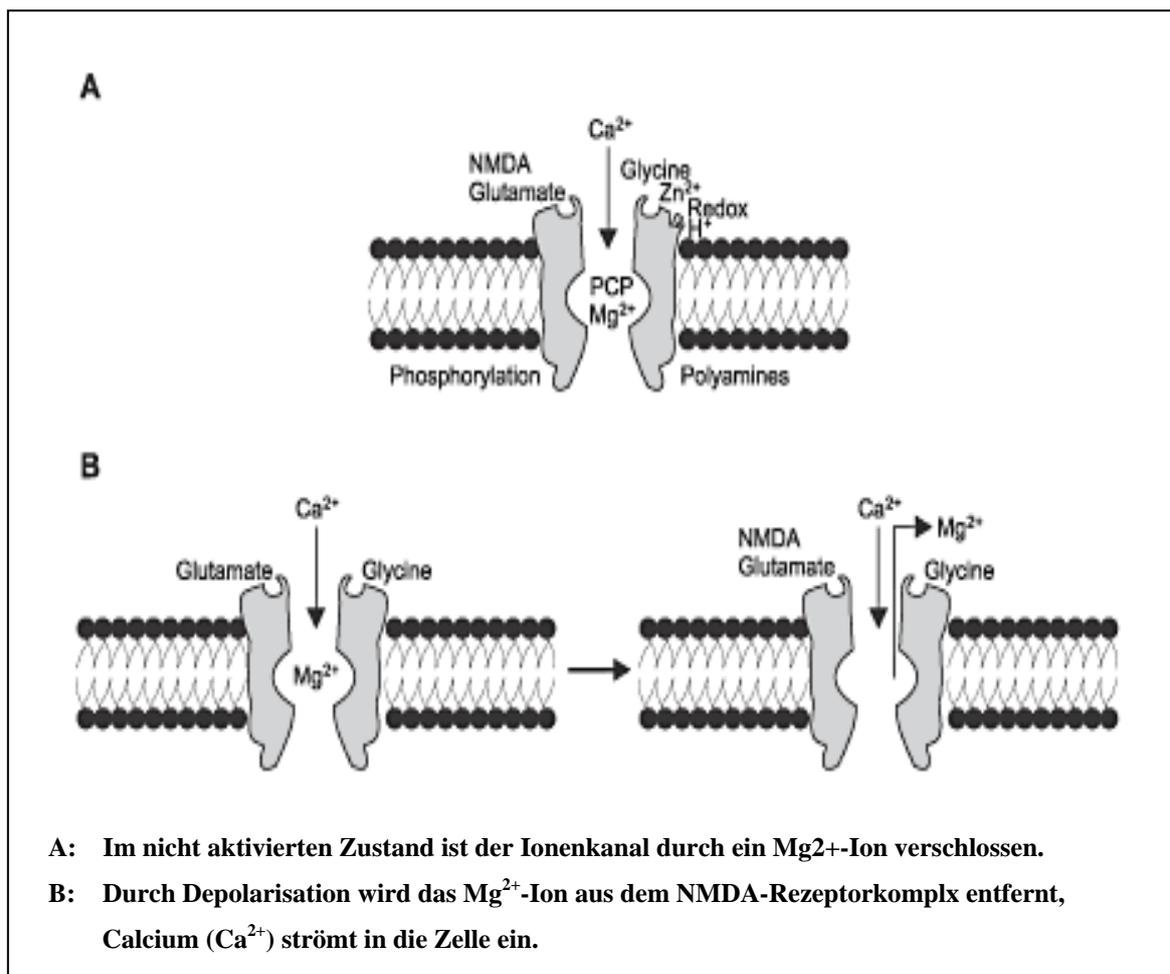


Abbildung 1.3: Funktionsmechanismus eines NMDA-Rezeptors

(aus Bading und Greenberg 1991)

Bei einem negativen Membranpotential ist der NMDA-Rezeptor durch ein Magnesium-Ion, welches sich zwischen der NR1- und NR2-Untereinheit befindet, verschlossen (Cull-Candy et al. 2001). Durch präsynaptisch freigesetztes Glutamat kommt es zunächst zu einer Aktivierung des AMPA-Rezeptors, einem Einströmen von Na⁺ und schließlich zu einer Depolarisation der postsynaptischen Membran. Durch das aus dieser Depolarisation resultierende positive Membranpotential (ca. + 40 mV) verlässt das Magnesiumion den

Ionenkanal, Ca^{2+} kann durch den NMDA-Rezeptor einströmen und es kommt daran anschließend zu einem exzitatorischen postsynaptischen Potential (EPSP) (Nowak et al. 1984) (Abbildung 1.3).

Zusätzlich werden nach Aktivierung des NMDA-Rezeptors weitere intrazelluläre Signalkaskaden, Kinasen und GTPasen initiiert, die wiederum Einfluss auf das Neuronenwachstum und die Neuronendifferenzierung nehmen.

1.5.3.3 Expression der einzelnen Untereinheiten

Die verschiedenen Untereinheiten des NMDA-Rezeptors zeigen ein deutlich unterschiedliches Expressionsmuster (Goebel und Poosch 1999). Durch zahlreiche postmortem Studien bei Nagetieren, vornehmlich Ratten, konnten detaillierte Informationen über die regionale und altersvariable Verteilung der Untereinheiten im zentralen Nervensystem (ZNS) gewonnen werden. Die NR1-Untereinheit ist ab der dritten embryonalen Woche bis ins adulte Stadium ubiquitär im ZNS und im Rückenmark nachweisbar (Zukin und Bennett 1995), mit einer besonders hohen Dichte im Hippocampus, Striatum und im Cerebralcortex. Von den NR2-Untereinheiten, die diskrete Verteilungen in spezifischen Hirnarealen zeigen, sind lediglich die NR2B- und NR2D-Untereinheit in embryonalen Stadien vertreten. Die NR2A-Untereinheit ist in einer hohen Dichte im Cortex und Hippocampus von erwachsenen Säugetieren vertreten (Ozawa et al. 1998). Die NR2B-Untereinheit ist in fast allen Hirnarealen, wie beispielsweise im cerebralen Cortex, im Hippocampus, im Striatum, im Thalamus und im olfaktorischen Bulbus, nachweisbar (Kundrotiene et al. 2004). Die Expression von NR2A-Untereinheiten wird im Alter in kortikalen Regionen gesteigert und die NR2D-Untereinheit in besonders hoher Dichte prä- und perinatal exprimiert. Die NR2C-Untereinheiten finden sich bevorzugt im Cerebellum und Rückenmark. Die NR2D-Untereinheiten als seltenste der NR2-Untereinheiten im ZNS von Erwachsenen sind im Diencephalon (Mori et al. 1995) und im Hirnstamm (Cull-Candy et al. 2001) verstärkt lokalisiert, finden sich aber auch im Mesencephalon und im olfaktorischen Bulbus (Buller et al. 1994, Wenzel et al. 1995). Durch die geänderte Zusammensetzung der NMDA-Rezeptoren verändert sich somit auch die Ansprechbarkeit auf verschiedene Liganden und zeigt damit eine altersabhängige Veränderung der Neurotransmission (Stark et al. 2000). Auch sind die NMDA-Rezeptoren,

die in verschiedenen Hirnarealen in unterschiedlichen heteromeren Rezeptorkomplexen vorliegen, zu hieraus resultierenden spezifischen Rezeptorantworten befähigt.

Neben der Expression im ZNS konnten weitere NMDA-Rezeptoren in extraneuronalen Geweben wie Herz, Lunge und pankreatischen β -Zellen nachgewiesen werden (Seeber et al. 2000, Said et al. 1996, Inagaki 1995).

1.5.3.4 Einfluss der Untereinheiten auf die Rezeptoreigenschaften

Durch den unterschiedlichen Aufbau der NMDA-Rezeptoren aus verschiedenen Untereinheiten resultiert eine große Heterogenität dieser Ionenkanäle. Zudem fällt beim Vergleich der einzelnen Untereinheiten auf, dass sowohl die Affinität als auch die Rezeptorantwort Liganden-abhängig ist (Sucher et al. 1996). So ergaben Untersuchungen hinsichtlich der Affinität von Glyzin zur NR1-Untereinheit eine Abhängigkeit dieser vom Subtyp der NR2-Untereinheit (Avenet et al. 1996, Kew et al. 1998). Die Affinität von Glyzin zu NR2B-, NR2C- und NR2D-enthaltenden Rezeptoren ist hierbei zehnfach höher als zu NR2A-enthaltenden NMDA-Rezeptoren (Laurie und Seeburg 1994, Priestley et al. 1995). Auch die Deaktivierungszeit des NMDA-Rezeptors wird von der vorliegenden NR1-Untereinheit beeinflusst (Cull-Candy et al. 2001).

In einzelnen Studien konnte eine Beeinflussung der Deaktivierungszeit des NMDA-Rezeptors durch die vorliegende NR1-Untereinheit belegt werden. Cull-Candy et al. (2001) gehen hierbei von Schwankungen der Werte um den Faktor 50 aus in der Reihenfolge: NR2A < NR2C = NR2C << NR2D. So konnte bei NR1/NR2A-Rezeptoren nach Glutamatapplikation eine Deaktivierungszeit von nur wenigen Millisekunden nachgewiesen werden, wohingegen sich diese bei NR1/NR2D-Rezeptoren in einem Bereich von mehreren Sekunden bewegte (Monyer et al. 1994, Wyllie et al. 1998). Weiterhin wird neben der Rezeptorkinetik durch die jeweilige NR2-Untereinheit auch die Ionenleitfähigkeit beeinflusst. So verfügen NMDA-Rezeptoren mit NR2A- oder NR2B-Untereinheiten über eine hohe Ionenleitfähigkeit bei einer gleichzeitig vorliegenden Sensitivität gegenüber einer Mg^{2+} -Blockade. NR2C- und NR2D-Untereinheiten besitzen demgegenüber eine geringere Ionenleitfähigkeit bei einer geringeren Sensitivität gegenüber extrazellulärem Mg^{2+} (Misra et al. 2000, Wyllie et al. 1996). Auch konnte gezeigt werden, dass

NR1/NR2A-Untereinheiten, die zusätzlich eine NR3-Untereinheit aufweisen, eine geringere Ca^{2+} -Leitfähigkeit aufweisen als reine NR1-/NR2A-Rezeptoren (Das et al. 1998, Perez-Otano et al. 2001).

In weiteren Studien konnte belegt werden, dass nicht nur die NR2-Untereinheiten, sondern auch die unterschiedlichen Spleiß-Varianten der NR1-Untereinheit einen beeinflussenden Effekt auf den NMDA-Rezeptor, wie beispielsweise Änderungen von dessen pH-Sensitivität, aufweisen (Traynelis et al. 1995).

1.5.3.5 NR1-Untereinheit

Das humane GRIN1-Gen, das für die NR1-Untereinheit codiert, befindet sich nahe des Telomers auf dem langen Arm von Chromosom 9 (9q34.3) (Karp et al. 1993, Zimmer et al. 1995). Es besteht insgesamt aus 22 Exons und 21 Introns (Dunah et al. 1999).

Die NR1-Untereinheit ist ein ca. 120 kDA großes Polypeptid (Kim et al. 1998). Es besteht aus einer im Bereich der extrazellulären Segmente S1 oder S2 lokalisierten Glyzinbindungsstelle, drei Transmembranomänen (TM1, TM3, TM4), einer extrazellulären N-terminalen Domäne und einer intrazellulären C-terminalen Region, die an mehreren Stellen von der Proteinkinase C (PKC) phosphoryliert werden kann (Nakanishi et al. 1992, Moriyoshi et al. 1991). Zusätzlich liegt ein viertes hydrophobes Element (TM2) vor, das in Form einer Haarnadelschleife den Ionenkanal bildet (Hollmann und Heinemann 1994).

Die NR1-Untereinheit der NMDA-Rezeptoren besteht aus acht Isoformen (Durand et al. 1992, Sugihara et al. 1992), die durch alternatives Spleißen der Exone 5, 21 und 22 entstehen (Hollmann und Heinemann 1994). Hierbei kodiert das Exon 5 für eine aus 21 Aminosäuren bestehende N-terminale Kasette, die den Rezeptor desensibilisiert und die Empfindlichkeit für Protonen, Zink-Ionen und Polyamine beeinflusst (Zukin und Bennett 1995). Die Exons 21 und 22 kodieren für die 37 bzw. 38 Aminosäuren umfassenden C-terminalen Kassetten C1 und C2, die auf das Zusammenspiel der verschiedenen Untereinheiten des NMDA-Rezeptors modulierend wirken (Sheng et al. 1994) und auch andere intrazelluläre Moleküle, wie beispielsweise die Proteinkinase C, beeinflussen (Tingley et al. 1993).

1.5.3.6 NR2-Untereinheit

Die NR2-Untereinheit kann eine große Anzahl biophysikalischer und pharmakologischer Eigenschaften des NMDA-Rezeptors, wie beispielsweise die postsynaptische Signalübertragung, beeinflussen (Lau und Zukin 2007).

GRIN2A und GRIN2B kodieren hierbei für Glutamat-bindende Untereinheiten des NMDA-Rezeptors. 1996 erfolgte durch Hess et al. die erste Klonierung der NR2A-Untereinheit mit einem korrespondierenden, aus 1464 Aminosäuren bestehenden Protein (Hess et al. 1996). GRIN2A befindet sich in der chromosomalen Region 16p13 (Kalsi et al. 1998), es besteht aus 11 Exons und umfasst auf genomischer Ebene 450 kb.

In zahlreichen Studien konnte eine Assoziation zwischen einzelnen Polymorphismen der NR2A-Untereinheit und der Schizophrenie beschrieben werden (Itokawa et al. 2003, Iwayama-Shigeno et al. 2005, Tang et al. 2006).

Zudem konnten Hess et al. (1996) eine für die GRIN2B-Untereinheit kodierende cDNA aus humanem fetalem Gehirn isolieren, die aus 1484 Aminosäuren bestand (Hess et al. 1996). GRIN2B setzt sich aus 13 Exons zusammen, wobei 12 codierende Sequenzen darstellen (Williams et al. 2002) und umfasst auf genomischer Ebene 419 kb (Zhao et al. 2011). Es liegt in der chromosomalen Region 12p13 (Mandich et al. 1994) (Abbildung 1.4) und ist an der Langzeit-Potenzierung sowie an der aktivitätsabhängigen Steigerung der Effizienz von synaptischer Signalübertragung beteiligt. Durch eine Störung der Funktionsfähigkeit der GRIN2B-Untereinheit kann die Gedächtnisentwicklung und das Lernen beeinflusst werden (Linden 1994). Im Vergleich hierzu konnte bei einer Überexpression der NR2-Untereinheit eine Verbesserung von Lern- und Gedächtnisprozessen bei Mäusen erreicht werden (Tang et al. 1999).

Durch Liu et al. konnte 2004 in einer Studie gezeigt werden, dass die Blockade NR2B-enthaltender NMDA-Rezeptoren die Induktion einer Langzeit-Depression aufhebt, aber nicht die einer Langzeit-Potenzierung.

Eine Expression von GRIN2B wurde im Hippocampus, in den Basalganglien und im parieto-fronto-temporalen Cortex gefunden (Schito et al. 1997).

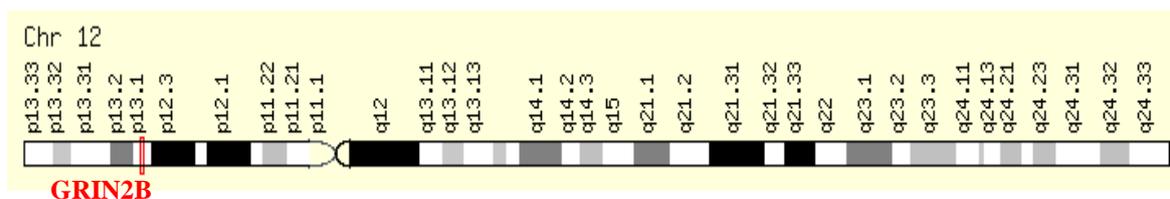


Abb. 1.4 Die Lage des Gens GRIN2B auf Chromosom 12 (Mapview 2011)

Studien bezüglich der Assoziation zwischen Schizophrenie und GRIN2C haben bisher lediglich negative Ergebnisse gezeigt, während Studien bezüglich der GRIN2D-Untereinheit verschiedene unterschiedliche Resultate erbrachten, die bis zum jetzigen Zeitpunkt weitere Forschungsprojekte erfordern (Makino et al. 2005).

1.5.4 Glutamat und Hirnentwicklung

Dem Glutamatsystem wird eine entscheidende Rolle bei der Hirnentwicklung zugesprochen. Neben der Formation einer ausreichenden Anzahl von Synapsen ist die glutamaterge Neurotransmission auch für deren Stabilisierung verantwortlich. Bei einer verminderten Aktivität von NMDA-Rezeptoren oder zu wenig vorliegendem Glutamat in der frühen Hirnentwicklung resultiert hieraus eine verminderte Anzahl von Synapsen. Beim infantilen Gehirn mit einem Überangebot an synaptischen Verbindungen, bewirkt dies im Kindesalter keinerlei klinische Symptome. Im weiteren Verlauf der Kindheit und auch Jugend erfolgt eine synaptische Restrukturierung «pruning», wobei gezielt Neuronen entfernt und die Zahl der Synapsen verringert wird (Huttenlocher 1984). Dies kann in der späten Jugend oder im frühen Erwachsenenalter zu entscheidenden Konsequenzen im Aufbau funktionierender, neuronaler Strukturen und synaptischer Konnektivität führen mit dem Auftreten erster Symptome einer schizophrenen Psychose (Konradi und Heckers 2003).

Die Synaptogenese lässt sich in zwei Phasen unterteilen: zum einen in die Phase des initialen Kontakts von Neuronen durch Filopodien, die in der frühen neuronalen Entwicklung zu finden sind, zum anderen in die daran anschließende Stabilisierungsphase. Filopodien sind dabei ein Bestandteil von Neuronen und dienen dazu, die Umgebung nach präsynaptischen Partnern abzusuchen (Lee und Sheng 2000, Wong und Wong 2000). Nach der Kontaktherstellung durch ein Filpodium zu einem potentiellen Partner liefern zelluläre

Adhäsionsmoleküle den initialen Stimulus zur Bildung einer Synapse (Doherty et al. 1995, Murase und Schuman 1999). Auf der präsynaptischen Seite werden vorgefertigte Proteinpäcken eingeschlossen, die in der Lage sind, Neurotransmitter freizusetzen und der Adhäsion der Membranen zu folgen (Ahmari et al. 2000, Haas 2000).

Durch die Freisetzung von Glutamat wird die postsynaptische Membran schließlich dazu stimuliert, Ankerproteine zu rekrutieren, die alle notwendigen Elemente für eine funktionsfähige postsynaptische Seite befestigen (Friedman et al. 2000). Nach Bildung der initialen Synapse müssen als nächster Schritt die Aktivitäten der prä- und postsynaptischen Membran synchronisiert werden. So muss beispielsweise die postsynaptische Membran auf eine präsynaptische Neurotransmitterfreisetzung reagieren. Durch eine fehlgeschlagene Synchronisation resultiert eine instabile postsynaptische Membran, aus der die Elimination der Synapse resultiert (Frank 1997).

Tatsächlich konnten in zahlreichen Studien bei an Schizophrenie erkrankten Personen Abweichungen in der Zytoarchitektur belegt werden. Hierzu zählt u.a. eine Verminderung der Dichte dendritischer Spines (Glantz und Lewis 2000) und eine Reduktion des Neuropils (Selemon und Goldman-Rakic 1999). Funktionelle Folge solcher neuroanatomischer Veränderungen könnte die Trennung kortikaler Verbindungen sein. Demnach sind zwei pathophysiologische Faktoren an der Störung beteiligt: eine Störung der Elimination synaptischer Verbindungen («pruning») in der späten Kindheit bzw. Adoleszenz und ein Mangel an „baseline“-Konnektivität (Konradi und Heckers 2003). Als Ursache der synaptischen Anomalien wäre demnach ein hypoaktives glutamaterges Systems in der frühen Hirnentwicklung denkbar.

1.5.5 Postmortem Befunde

In einer Vielzahl von postmortem Untersuchungen wurde die Expression von Glutamatrezeptoren in Gehirnen von schizophrenen Personen untersucht. Veränderungen der zerebralen Dichte und Strukturen dieser Rezeptoren gelten als Hinweise für eine gestörte glutamaterge Neurotransmission. Von Garey et al. konnten 1998 eine reduzierte Anzahl an Dendriten der Pyramidenzellen des Cortex (Glantz und Lewis 2000)

nachgewiesen werden. Selemon und Goldman-Rakic stellten 1999 zudem bei erwachsenen schizophrenen Patienten eine Verminderung des Neuropil fest.

Zu den am häufigsten verifizierten Befunden gehören eine verminderte Expression von AMPA- und Kainat-Rezeptoren im Hippocampus und eine erhöhte Anzahl von NMDA-Rezeptoren im Putamen und Cortex (Meador-Woodruff und Healy 2000). Durch eine verminderte NMDA-Funktion könnte es hierbei zu einem Anstieg des NMDAR-Levels kommen, während AMPA-Rezeptoren aufgrund einer sekundären Erhöhung glutamaterger Neurotransmission reduziert sein könnten (Konradi und Heckers 2003).

1.5.6 NMDA-Rezeptor Hypofunktion und Neurotoxizität

Zahlreiche Studien haben sich in der Vergangenheit mit der Rolle einer NMDA-Hypofunktion bei Schizophrenie beschäftigt. Hierbei wurde die These vertreten, dass die Schizophrenie auf einer neuronalen Entwicklungsstörung mit fehlerhaften neuronalen Verbindungen und einer herabgesetzten Synapsendichte beruht (Lewis und Lieberman 2000, Abbildung 1.5).

So konnte eine Abnahme der Expression der NR1-Untereinheit sowie der Rezeptordichte in der Substantia nigra (Müller et al. 2004) und im superior-temporalen Cortex (Nudmamud-Thanoi and Reynolds 2004) festgestellt werden. Eine solche NMDAR-Hypofunktion, beispielsweise verursacht durch eine verminderte Synthese der NR1-Untereinheit, führt zu einer Verminderung der Aktivität der GABAergen Neurone (Olney et al. 1991). Eine physiologische Stimulation von Glutamatrezeptoren stellt hierbei für die Nervenzellen einen optimalen Zustand dar, während durch eine exzessive Stimulation die neuronale Lebensfähigkeit durch Behinderung struktureller und funktioneller Integrität gefährdet sein kann (Olney und Farber 1995). Dieser Prozess wird Exzitotoxizität genannt. Eine solche Glutamat-Exzitotoxizität könnte als eine mögliche Ursache von Apoptose (programmiertem Zelltod) in Neuronen bei Schizophrenie angesehen werden (Glantz et al. 2006, Konradi und Heckers 2003). Eine Dysregulation der neuronalen Apoptose ließe sich so mit den Theorien einer veränderten synaptischen Konnektivität, verminderten synaptischen Markern, einem reduzierten Neuropil und vor allem dem progressivem Verlust von grauer Substanz beim Ausbruch der Erkrankung in Einklang bringen (Glantz et al. 2006).

In Mausmodellen von Mohn et al. (1999) mit einer nur 5%-igen Expression der NR1-Untereinheit zeigten diese Verhaltensanomalien, die den Symptomen der PCP-induzierten Psychose ähnelten und mittels adäquater Medikation (Haloperidol und Clozapin) reversibel waren (Mohn et al. 1999). Zudem konnte eine unregelmäßige Expression der NR2B-Untereinheit im Temporallappen von an Schizophrenie erkrankten Personen nachgewiesen werden (Grimwood et al. 1999).

Das Phänomen, dass die NMDA-Unterfunktion zu verstärkter glutamaterger Neurotransmission, Exzitotoxizität und Neurodegeneration führen kann, ist als NRH- („NMDA receptor hypofunction“-Modell der Schizophrenie bekannt (Olney et al. 1999). Hierbei resultiert aus einer Blockade von NMDA-Rezeptoren bzw. durch eine hypothetische Unterfunktion des Rezeptors durch genetische und non-genetische Faktoren eine verminderte Aktivierung GABAerger Neuron. Dadurch bedingt kommt es zu einer Disinhibition postsynaptischer Glutamatneurone mit einer exzessiven Freisetzung von Glutamat und Neurotoxizität. In postmortem Studien konnten im Gyrus cinguli und im präfrontalen Cortex eine Abnahme der GABAergen Interneurone sowie eine sekundär erhöhte Anzahl an GABA-Rezeptoren festgestellt werden (Benes et al. 1992). Bei glutamatergen Pyramidenzellen ohne eine GABAerge Hemmung kam es demnach durch den Einfluss anderer glutamaterger, dopaminerger und cholinergischer Rezeptoren zu deren Schädigung und Degeneration kommen. Rajkowska et al. konnten in einer 1998 veröffentlichten Studie als Hinweis dieser These ein postmortal vermindertes Pyramidenzellvolumen messen. Durch die Schädigung der Pyramidenzellen entsteht hierbei sekundär eine glutamaterge Unterfunktion in den langen Projektionsbahnen, welche in Einklang mit der Glutamathypothese der Schizophrenie steht (Goff und Coyle 2001). Zudem konnte durch Ikonomidou et al. (1999) gezeigt werden, dass eine kurzzeitige NMDAR-Blockade zu apoptotischer Neurodegeneration bei sich entwickelnden Rattenhirnen führt. Der erste in vivo Beweis für Anomalien am NMDA-Rezeptor wurde bei nicht-medikamentös behandelten schizophrenen Personen berichtet (Pilowsky et al. 2006).

1.5.7 Einfluss des NMDA-Rezeptors auf die Neuroplastizität

Das zentrale Nervensystem (ZNS) ist ein System, das permanenten Veränderungsprozessen unterliegt. Die Fähigkeit der Neurone, sich an verschiedenste Umweltprozesse anzupassen ist dabei entscheidend für die Aufrechterhaltung der Hirnfunktion. Neuroplastizität oder synaptische Plastizität stellen hierbei die Eigenschaft von Synapsen oder Neuronen dar, sich je nach Einflüssen oder Beanspruchung in ihren Funktionen zu verändern und sich anzupassen (Schmitt et al. 2010).

Die Aktivierung des NMDA-Rezeptors aufgrund einer vorangegangenen Membrandepolarisation ermöglicht einen Einstrom von Kalzium durch den Ionenkanal (MacDermott et al. 1986). Hierdurch wird eine LTP, eine zeitlich überdauernde Erregbarkeitssteigerung und Genexpression induziert (Malenka und Nicoll 1999). Durch das freie intrazelluläre Kalzium kommt es schließlich zu einer Aktivierung kalziumabhängiger Enzyme, wie z.B. CaM Kinasen und der Phosphatase Calcineurin. Diese Enzyme modulieren wiederum durch ihren Rückkopplungsmechanismus die Rezeptorfunktion und sind zudem für die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren verantwortlich (Thompson et al. 2000).

Durch die Phosphorylierung von NMDA-Rezeptoren durch CaM-Kinasen erhöht sich der Glutamateinstrom durch die spezifischen Ionenkanäle (Omkumar et al. 1996, Swope et al. 1999). Weiterhin wird durch die Phosphorylierung der Transport und der Einbau von NMDA-Rezeptoren in die postsynaptische Membran beeinflusst (Nicoll und Malenka 1999, Rongo und Kaplan 1999). Durch die Phosphatase Calcineurin resultiert eine Verkürzung der Öffnungszeit des NMDA-Rezeptorionenkanals (Shi et al. 2000, Tong et al. 1995). Der NMDA-Rezeptor kann somit seine Affinität gegenüber Glutamat, als auch seine Rezeptoraffinität eigenständig regulieren.

1.5.8 Veränderungen des NMDA-Rezeptors bei Schizophrenie

Ein Zusammenhang zwischen Glutamat und der Entwicklung einer Schizophrenie wurde bereits 1980 von Kim et al. angenommen, die bei Untersuchungen des Liquors von an Schizophrenie erkrankten Personen über eine signifikante Abnahme von Glutamat berichteten. Diese ersten Feststellungen führten zu weiteren Diskussionen hinsichtlich der Bedeutung von Glutamat in Verbindung mit dem dopaminergen System für die Entstehung

einzelner psychiatrischer Erkrankungen, wie beispielsweise der Schizophrenie (Kim et al. 1980, Riederer et al. 1991).

In zahlreichen durchgeführten neurochemischen Studien sollte zudem die Hypothese einer gestörten NMDA-Rezeptor-Funktion bei Schizophrenie untermauert werden. Hierbei konnte durch Clinton und Meador-Woodruff (2004) eine bei Schizophrenie vorliegende Fehlsteuerung des Thalamus mit einem deutlichen Abfall der für die NR1-Untereinheit codierenden mRNA festgestellt werden (Ibrahim et al. 2000, Meador-Woodruff et al. 2003), was durch eine Studie von Popken und Leggio (2002) allerdings nicht bestätigt werden konnte. Weiterhin konnte im Stratum moleculare des Cerebellums eine erniedrigte Expression der NR2A-Untereinheit bei an Schizophrenie erkrankten Personen im Vergleich zu gesunden Kontrollprobanden festgestellt werden (Schmitt et al. 2010).

Mittels GlyzinB Radioliganden [³H]MDL105, 519 wies Ibrahim et al. (2000) eine verminderte Anzahl an NR1-Untereinheiten nach. Auch Untersuchungen bezüglich der mRNA-Konzentrationen der NR2-Untereinheiten ergaben verminderte Werte für die NR2B- und NR2C-Isoformen (Ibrahim et al. 2000).

Durch eine Studie von Smith et al. (2001) konnte im Umfeld des NMDA-Rezeptors eine vermehrte Expression der Glutamattransporter EAAT1 und EAAT2 nachgewiesen werden (Ibrahim et al. 2000). Weiterhin wurden Veränderungen der glutamatergen Funktion durch eine erhöhte Expression des vesikulären Glutamattransporters vGluT2 und des Enzyms Glutaminase festgestellt (Smith et al. 2001, Meador-Woodruff et al. 2003).

1.6 Assoziation von SNPs im GRIN2B-Gen mit Schizophrenie

Die von Kim et al. (1980) postulierte Unterfunktion des glutamatergen Systems bei Schizophrenie wurde auch bekannt unter dem Namen „Glutamat Dysfunktions-Hypothese“ (Duncan et al. 1999). In späteren, darauf basierenden Studien konnten die Feststellungen von Kim jedoch nicht immer repliziert werden. Im Jahr 2001 wurde von zwei unabhängigen Forschergruppen ein Zusammenhang zwischen der Entwicklung einer Schizophrenie und der NR2-Untereinheit des glutamatergen Systems postuliert (Hong et al. 2001, Ohtsuki et al. 2001), der in weiteren Studien teils bestätigt, teils allerdings nicht

verifiziert werden konnte. Eine Assoziation zwischen dem GRIN2B-Gen und der Entstehung einer Schizophrenie konnte hierbei u.a. bei den Polymorphismen 366C/G, 2664C/T, 4197T/C, 5806A/C und 5988T/C festgestellt werden. Die Kombination GTTAT von 366C/G-2664C/T-4197T/C-5806A/C-5988T/C wurde häufiger bei an Schizophrenie erkrankten Personen als gesunden Kontrollprobanden gefunden (Ohtsuki et al. 2001).

Insgesamt konnte bis zum jetzigen Zeitpunkt in mehreren Studien eine positive Assoziation des GRIN2B-Gens zur Schizophrenie gefunden werden, wenngleich in einigen Studien kein genetischer Zusammenhang zu der Erkrankung nachgewiesen wurde (Tabelle 1.6).

Tabelle 1.6: Übersicht einer Auswahl der Assoziationsstudien zum GRIN2B-Gen

Autor	Jahr der Publikation	Population	Signifikanz
Nishiguchi et al.	2000	Japaner	negativ
Hong et al.	2001	Chinesen	positiv
Ohtsuki et al.	2001	Japaner	positiv
Miyatake et al.	2002	Japaner	positiv
Williams et al.	2002	Kaukasier	negativ
Chiu et al.	2003	Chinesen	positiv
Di Maria et al.	2004	Kaukasier	positiv
Qin et al.	2005	Chinesen	positiv
Martucci et al.	2006	Gemischt	positiv

Bereits im Jahr 2000 führten Nishiguchi et al. eine Studie an 164 nicht miteinander verwandten, japanischen Personen durch, bei denen nach DSM-IV Kriterien im Vorfeld eine Schizophrenie diagnostiziert wurde. Die Gruppe setzte sich aus 105 Männern und 59 Frauen zusammen mit einem mittleren Lebensalter von 51.5 Jahren. Die Vergleichsgruppe bestand aus 171 japanischen, nicht miteinander verwandten und gesunden freiwilligen Probanden (104 Männer und 67 Frauen mit einem mittleren Lebensalter von 47.8 Jahren). Untersucht wurden die Mutationen in einem großformatigen Exon, welches das Carboxylende der humanen NR2-Untereinheit codiert. Hierbei wurde u.a eine stille Punktmutation identifiziert, die auf der cDNA Position 2664 lokalisiert ist und das Codon 888 von ACC zu ACT verändert (Tabelle 1.7). Andere Mutationen, welche die Aminosäuresequenz in der untersuchten Region verändern, konnten nicht detektiert

werden. Die Genotypen und Allelfrequenzen bei den untersuchten Patienten zeigten im Vergleich zu den gesunden Kontrollprobanden keine besonderen Unterschiede (Genotyp: $\chi^2 = 0.93$, $df = 2$, $p > 0.10$; Allele: $\chi^2 = 0.08$, $df = 1$, $p > 0.10$).

Unter Berücksichtigung der gewonnenen Daten, die keine Assoziation zwischen der Schizophrenie und dem 2664C/T Polymorphismus zeigten, konnten Nishiguchi et al. somit keinen Beitrag der humanen NR2B-Untereinheit an der Ätiologie der Schizophrenie erkennen, wenngleich sie die Rolle der NR2-Untereinheit als mögliches Kandidateng für Assoziationen mit der Schizophrenie nicht gänzlich ausschlossen.

Tabelle 1.7: Genotypen und Allelfrequenzen der NMDA Rezeptor 2B Untereinheit im Polymorphismus 2664C/T bei Patienten mit Schizophrenie und gesunden Kontrollprobanden (aus Nishiguchi et al. 2000)

Genotyp/Allel	schizophrene Patienten (n= 164)		Vergleichsgruppe (n= 171)	
	n	%	n	%
Genotyp				
C/C	41	25.0	49	28.7
C/T	89	54.3	84	49.1
T/T	34	20.7	38	22.2
Allel				
C	171	52.1	182	53.2
T	157	47.9	160	46.8

Hong und Kollegen (2001) untersuchten in ihrer Studie 100 Patienten zur Überprüfung der Assoziation von Varianten des GRIN2B-Gens, psychiatrischen Symptomen und dem Ansprechen auf eine Clozapintherapie. Sämtliche Patienten waren chinesischer Herkunft mit einem mittleren Lebensalter von 20.2 +/- 0.5 Jahre. Von den untersuchten Personen erfüllten 98 die Kriterien einer Schizophrenie nach DSM-IV (n= 98), zwei die Kriterien eine schizoaffektiven Störung (n= 2). Sämtliche Patienten waren therapieresistent nach einer minimalen sechswöchigen pharmakologischen Therapie. Ausgangswerte für die spätere Anwendung der „Brief Psychiatric Rating Scale“ (BPRS) wurden vor Beginn der Clozapintherapie evaluiert. Letztendlich wurde der Polymorphismus 2664 mit seinen drei Genotypen 2664C/C, 2664C/T und 2664T/T untersucht. Die Aufteilung der drei

Genotypen der GRIN2B Variante C2664T war im Hardy-Weinberg-Gleichgewicht. Der BPRS-Wert für 60% der Patienten fiel wenigstens um 20% des Ausgangswertes nach einer achtwöchigen Behandlung mit Clozapin, wobei sich hierbei kein Unterschied bei der Verteilung der drei Genotypen zeigte (56.0 % für 2664C/C, 69.4 % für 2664C/T, 46.2 % für 2664T/T, $P=0.132$). Bei einem Vergleich zwischen den drei Genotypgruppen konnten keine signifikanten Unterschiede in der Brief Psychiatric Rating Scale (BPRS) festgestellt werden ($p=0.441$). Bei Patienten mit einer BPRS innerhalb von 20% nach Clozapintherapie zeigten sich in den drei Genotypen keine Unterschiede ($p=0.132$). Ein unwesentlich höherer Mittelwert bei der Clozapindosierung konnte bei Patienten mit einem 2664C/C Genotyp ($p=0.013$) ermittelt werden. Zusammenfassend konnten Hong et al. somit keine Beeinflussung der Clozapin-Empfindlichkeit bei Patienten mit Allelvariationen des GRIN2B-Gens detektieren. Allerdings konnte ein gewisser Trend einer höheren Clozapin-Dosierung für Patienten mit einem 2664C/T Genotyp aufgezeigt werden. Bei den weiterhin untersuchten Genotypen (2664C/C und 2664T/T) konnte keine Assoziation nachgewiesen werden.

Ohtsuki und Mitarbeiter (2001) untersuchten in ihrer Studie 48 an Schizophrenie erkrankte Personen japanischer Herkunft hinsichtlich vorliegender Mutationen in der codierenden Region der GRIN2B-Untereinheit des NMDA-Rezeptors. In einer Assoziationsstudie wurde anschließend die identifizierte DNA-Sequenz bei 268 nicht miteinander verwandten, japanischen Patienten mit Schizophrenie (154 Männer und 114 Frauen mit einem mittleren Lebensalter von 45.8 Jahren \pm 11.5 Jahre) und 332 unabhängigen, japanischen Kontrollprobanden (194 Männer und 143 Frauen mit einem mittleren Lebensalter von 48.2 Jahren \pm 12.5 Jahre) überprüft. Die schizophrenen Patienten wurden aus sechs Krankenhäusern aus der Nähe von Tokio rekrutiert und erfüllten sämtlich die ICD-10 oder DSM-III-R Kriterien für Schizophrenie. Innerhalb der Studie wurden acht verwandte SNPs untersucht (15G/T, 366C/G, 1665C/T, 4197T/C, 4615C/T, 5806A/C und 5988T/C). Hiervon waren die ersten fünf Polymorphismen in der codierenden Sequenz lokalisiert, sog. stille Polymorphismen: 15G/T (GCG/GCT, Ala5/Ala5), 366C/G (CCC/CCG, Pro122/Pro122), 1665C/T (AGC/AGT, Ser555/Ser555), 2664C/T (ACC/ACT, THR888/thr888), 4197T/C (CAT/CAC, His1399/His1399). Als Resultat dieser Studie wurde eine statistische Signifikanz für die Polymorphismen der 3' Region des letzten

Exons bei an Schizophrenie erkrankten Personen ($p= 0.004$) und ein gehäuftes Vorkommen des G-Allels des 366C/G Polymorphismus ($p= 0.04$) bei Patienten im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe festgestellt. Zudem konnte eine Assoziation zwischen dem GRIN2B-Gen und der Entstehung einer Schizophrenie in den Polymorphismen 366C/D, 2664T/C, 4197T/C, 5806A/C und 5988T/C nachgewiesen werden.

Miyatake und Kollegen (2002) bestimmten in dieser Analyse die Nukleotidsequenz der aufsteigenden 5'-Region der menschlichen NMDA-Rezeptor 2B (NR2B)-Untereinheit und identifizierten eine neuartige T-200G Variante, lokalisiert in einer der Sp1-Bindungsstellen. Zur Überprüfung der Effekte dieser Variante auf die Transkription des hNR2B-Genes kamen letztlich experimentelle Reportergene unter Verwendung von PC12 phäochromozytomen Zellen zur Anwendung, die vorübergehend mit Luciferase Reporterplasmiden transfiziert wurden. In Abwesenheit des Nervenwachstumsfaktor (NGF) zeigten die Luciferase-Aktivitäten keine signifikante Abweichung zwischen den beiden Allelen und dem Kontrollplasmid. Allerdings zeigte die Luciferase-Reporter-Aktivität beim T-Allel eine signifikant erhöhte Leistung im Vergleich zum G-Allel in Anwesenheit des Wachstumsfaktors ($p= 0.0013$), als Hinweis dafür, dass dieser polymorphe Bereich eine kritische Region für die NR2B-Gen-Regulation durch NGF-induzierte Sp1-Blockierung darstellt. In einer Fall-Kontroll-Studie wurden 100 nicht verwandte, an Schizophrenie erkrankte Japaner (55 Männer und 45 Frauen mit einem mittleren Lebensalter von 44.9 Jahren \pm 12.8 Jahre) aus vier Krankenhäusern in Kagawa und Tohukima (Japan) und eine Kontrollgruppe, ebenfalls bestehend aus 100 gesunden Personen (42 Männer und 58 Frauen mit einem mittleren Lebensalter von 40.2 Jahren \pm 10.2 Jahre) derselben Region (jeweils Kagawa und Tokushima) untersucht. Hierbei konnte gezeigt werden, dass die Häufigkeit des Auftretens des G-Allels ($p=0.0164$) signifikant erhöht ist bei den 100 schizophrenen Personen im Vergleich zu den Kontrollprobanden. Diese Resultate suggerieren eine NMDA-Rezeptor-Dysfunktion der NR2B-Untereinheit bei einer vorliegenden T-200G Variante.

Williams et al. (2002) rekonstruierten die genomische Struktur aller fünf Gene, die für die Verschlüsselung des NMDA-Rezeptors in silico verantwortlich sind. Jedes dieser Gene

wurde anschließend hinsichtlich vorliegender Sequenzvariationen gescreent und die Allelfrequenzen aller ermittelten SNPs in einer Fall-Kontroll-Studie mit 184 kaukasischen, an Schizophrenie erkrankten Personen (nach DSM-IV-Kriterien) und 184 kaukasischen Kontrollprobanden detektiert. Sämtliche Studienteilnehmer waren nicht miteinander verwandt und wurden in Großbritannien oder Irland geboren. Hierbei wurden insgesamt 27 Polymorphismen in den fünf NMDA-Rezeptor-Genen untersucht. Zehn dieser Polymorphismen waren im Intron, 17 im Exon und 10 innerhalb der codierenden Sequenz gelegen. Der einzige non-synonymous Polymorphismus zeigte sich im Exon 6 von GRIN2C. Für GRIN2B wurde hierbei folgende Polymorphismen betrachtet: 544C>G (P122P), IVS4 +40A>G, 1844C>T (S555S), 2843C>T (T888T), 3717C>T (H1178H), 4376T>C (H1399H), 5041T>G, 5985C>A. Zusätzlich analysiert wurde der Polymorphismus 122C>G, um die in der Studie von Ohtsuki 2001 festgestellte Assoziation zu Schizophrenie auf Replikation zu überprüfen. Letztlich konnte nur ein einzelner non-synonymous Polymorphismus in den GRIN-Genen dargestellt werden, sodass nicht ohne weiteres auf eine Assoziation von Schizophrenie und dem GRIN-Gen geschlossen werden kann – alle 27 untersuchten SNPs zeigten keine Signifikanz ($p \leq 0.1$). Auch die von Ohtsuki postulierte Assoziation zu dem 122C>G Polymorphismus konnte von Williams nicht bestätigt werden.

Von Chiu und Kollegen (2003) wurde in einer Assoziationsanalyse die Hypothese hinsichtlich eines Zusammenhangs zwischen den Polymorphismen 366C/G und 2664C/T des GRIN2B-Genes und den therapierefraktären Formen der Schizophrenie in der chinesischen Bevölkerung überprüft. Hierzu wurden 193 therapierefraktäre, schizophrene Patienten und 176 Kontrollprobanden rekrutiert. Das mittlere Alter bei den schizophrenen Personen lag bei 39.8 Jahren +/- 7.9 Jahre, das der Kontrollprobanden bei 37 Jahren +/- 6.5 Jahre. Die Geschlechterverteilung ($p = 0.69$) und das Alter waren annähernd gleich verteilt. Bei den erkrankten Probanden wurde die Diagnose der Schizophrenie mittels DSM-IV Kriterien gestellt. Die Studienbedingung der „therapierefraktären Schizophrenie“ wurde definiert als ein kontinuierliches Vorliegen von psychotischen Symptomen über sechs Monate während einer adäquaten pharmakologischen Therapie mit zwei unterschiedlichen Psychopharmaka. Das erkrankte Kollektiv wurde innerhalb einer psychiatrischen Klinik selektiert, die Kontrollprobanden stammten aus dem Kreis des dort medizinischen tätigen

Personals und/oder Studenten. Die Resultate zeigten, dass die Genotypenverteilung zwischen Schizophrenen und den Kontrollprobanden gleich waren bei dem Polymorphismus 366C/G ($p= 0.88$) und dem Polymorphismus 2664C/T ($p= 0.336$), wobei bei Patienten mit einem 2664C/C Genotyp im Vergleich zu den Genotypen 2664C/T und 2664T/T eine höhere Clozapindosis festgestellt werden konnte. Chiu et al. folgerten hieraus, unter Berücksichtigung der negativen Untersuchungsergebnisse, dass die Polymorphismen 366C/G und 2664C/T des GRIN2B-Gens nicht für die Pathogenese der therapierefraktären Schizophrenie in der chinesischen Population verantwortlich gemacht werden können, wenngleich der Effekt von Clozapin während der Behandlung durch GRIN2B Genvariationen beeinflusst werden kann.

Di Maria et al. (2004) führten eine Fall-Kontroll-Studie durch, zur Bestätigung der Hypothese, dass das GRIN2B-Gen bestimmend ist für die bei der Schizophrenie festgestellte Symptomatik. Hierzu wurden fünf single nucleotide Polymorphismen (SNPs) bei 188 italienischen, an Schizophrenie erkrankten Personen (nach DSM-IV Kriterien) und 156 gesunden Kontrollprobanden untersucht. Das mittlere Lebensalter bei den Patienten lag hierbei bei 41.7 Jahren mit einem Verhältnis des männlichen zum weiblichen Geschlecht von 1:1.5. Die Kontrollprobanden wurden hinsichtlich Alter, Geschlecht und geographischer Herkunft an die schizophrenen Patienten angepasst. Bei den Polymorphismen handelte es sich um den T-200G Genotyp und die Einzelmarker SNP366, SNP2664, SNP3533 und SNP890. Hierbei zeigte die Studie eine geringe Signifikanz für den in der 3'UTR-Region gelegenen Polymorphismus T-200G ($p= 0.04$), der bereits im Vorfeld in einer Studie von Miyatake et al. festgestellt werden konnte. Eine signifikante Assoziation konnte allerdings nicht verifiziert werden. Weitere Differenzen in den Genotyp- und Allelfrequenzen zwischen Schizophrenen und der Kontrollgruppe konnten nicht gefunden werden. Zudem konnten Haplotypen detektiert werden, die den Trend der Assoziation zur Schizophrenie bestätigten ($p= 0.04$). Somit konnte zumindest für Variationen des GRIN2B-Gens ein Trend für die Entwicklung einer Schizophrenie aufgezeigt werden.

Qin et al. untersuchten 2005 in einer Assoziationsanalyse 16 bekannte SNPs auf der NMDA-Rezeptor-Untereinheit NR1 (GRIN1) und der NR2B-Untereinheit. Fünf der untersuchten SNPs wurden bereits in der chinesischen Population identifiziert. Die

untersuchten Probanden waren allesamt Han-Chinesen: 253 mit einer nach DSM-IV diagnostizierten Schizophrenie (mittleres Lebensalter bei Erkrankungsbeginn 25.45 Jahre, aktuelles mittleres Lebensalter 38.43 Jahre), 140 nicht miteinander verwandte, gesunde Kontrollprobanden (mittleres Lebensalter 43.37 Jahre). Bei den untersuchten SNPs handelte es sich beim GRIN1-Gen um die 11 SNPs: C112T, C113T, G716A, A750G, G1001C, A290G, G301A, G308A, A1970G, G2108A und G6435A, beim GRIN2B um folgende fünf SNPs: G366C, C2664T, C3538T, T4197C und T5988C. Zur Untersuchung der SNPs fand zum einen eine universale DNA Microarray und zum anderen eine Ligase Detection Reaktion (LDR) Anwendung. Hierdurch wurde eine hohe Spezifität, als auch ein hoher Durchsatz an SNPs-Genotypisierung erreicht. Bei der Analyse der Allele konnten keine signifikanten Frequenzdifferenzen gefunden werden, die sich allerdings in den Haplotypen des GRIN2B-Gens zeigten. Die fünf identifizierten SNPs (C1001C, G366C, T2664C, T4197C, T5988C) waren im Hardy-Weinberg-Gleichgewicht. Es konnte bei den an Schizophrenie erkrankten Personen und den Kontrollprobanden keine signifikanten Unterschiede in der Allelfrequenz festgestellt werden. Bezüglich des GRIN2B fanden Hong et al., dass die Frequenz des CCT Haplotyps (das C-Allel von C2664T, das C-Allel von T4197C und das T-Allel von T5988C) bei den Kontrollprobanden höher war (0.089) als bei den Patienten (0.002) ($p=0.000146$).

Die Verteilung der gesamten Haplotypen zeigte eine signifikante Differenz zwischen den schizophrenen Patienten und den Kontrollprobanden. Zusammenfassend konnte somit in den niederfrequenten Haplotypen (CCT) und bei der Verteilung der gesamten Haplotypen des GRIN2B-Gens eine Assoziation mit der Schizophrenie festgestellt werden. Zusätzlich konnte eine Interaktion zwischen dem G19001C Polymorphismus des GRIN1-Gens und den T4197C und T5988C Polymorphismen des GRIN2B-Gens dargestellt werden.

In der Studie von Martucci et al. (2006) wurden drei genetische Polymorphismen des GRIN2B-Gens getestet: G-200T (5'UTR), A5806C und T5988C (beide in der 3'UTR-Region). Insgesamt wurden 86 Kernfamilien bestehend aus einer an Schizophrenie erkrankten Person und einem Verwandten ersten Grades untersucht. Die Rekrutierung erfolgte aus dem Patientengut einzelner Krankenhäuser in Toronto, Ontario. Außerdem wurden 192 an Schizophrenie erkrankte Fallkontroll-Paare untersucht. Bei allen Probanden wurde die unabhängige Diagnose einer Schizophrenie nach DSM-III-R/DSM-IV gestellt.

Bei der Selektion der Kontrollprobanden wurden diese bei Vorliegen einer psychiatrischen Erkrankung in der Familie oder in der eigenen Lebensgeschichte bzw. bei Alkohol und/oder Drogenabusus aus der Studie ausgeschlossen. Das Alter von Kontrollprobanden und Patienten wurde aufeinander abgestimmt mit einer Bandbreite von +/- fünf Jahren, ebenso das Geschlecht und die Abstammung. Das Durchschnittsalter lag bei 37 Jahren, mit einem Anteil männlicher zu weiblicher Probanden von 1:1.11. Da über 95% der erkrankten Personen kaukasischer Abstammung waren, wurden bei der Auswahl der Kontrollprobanden lediglich Personen mit einer ebenfalls kaukasischen Herkunft berücksichtigt. Zudem wurden hinsichtlich der Untersuchung von bipolaren Störungen mit und ohne psychotische Symptome 318 Kernfamilien aus dem Großraum Toronto untersucht. In der Studie wurden drei GRIN2B SNPs begutachtet: G-200T, A5806C und T5988C. Der Polymorphismus G-200T ist in der 5'UTR-Region lokalisiert, die beiden anderen in der 3'UTR-Region. A5806C und T5998C befinden sich in einem teilweisen Kopplungsungleichgewicht, alle drei Polymorphismen waren im Hardy-Weinberg-Gleichgewicht. Die Expression der GRIN2B mRNA wurde mittels einer quantitativen PCR bestimmt (bei Schizophrenie, bipolarer Störung und gesunden Kontrollen). Letztendlich konnte eine Assoziation zwischen dem Polymorphismus G-200T und der Schizophrenie ($p= 0.002$), zwischen T5998C und einer bipolaren Störung ($p= 0.02$) und zwischen A5806C und einer bipolaren Störung mit psychotischen Symptomen ($p= 0.0038$) festgestellt werden. Der TCC Haplotyp trat hierbei häufiger bei einer bipolaren Störung als bei Schizophrenie auf, während der GCT Haplotyp vermehrt bei Schizophrenie detektiert werden konnte. In allen Haplotyp-Frequenzen wurden signifikante Differenzen zwischen an Schizophrenie erkrankten Personen und den gesunden Kontrollprobanden gefunden ($p= 0.005$).

Durch Li und He (2007) wurde in einer großen Meta-Analyse alle bis zum Januar 2006 publizierten Assoziationsstudien erfasst, die sich mit der systematischen Allel- und Genotypenanalyse der folgenden fünf Polymorphismen des GRIN2Bgens beschäftigten: T-200G, 366C/G, 2664C/T, 4197T/C und 5988T/C. Die Studien mussten zudem folgende Kriterien erfüllen: (1) Publikation in einem Fachjournal, (2) ausreichende Daten zur Berechnung der odds ratio (OR) mit Konfidenzintervall (CI) und p-Wert, (3) Untersuchung von einem oder mehreren der fünf aufgeführten Polymorphismen, (4) Beschreibung der

Primer, Geräte mit genauem Material- und Methodenteil, (5) Patienten mit einer nach den gültigen Diagnosekriterien (u.a. ICD-10) festgestellten Schizophrenie und (6) gesunde Kontrollprobanden (Tabelle 1.8).

Unter Berücksichtigung der oben aufgeführten Studienkriterien wurden aus den anfänglich 62 selektierten Studien, lediglich 9 bei der vorliegenden Meta-Analyse berücksichtigt.

Tabelle 1.8: Beschreibung der fünf untersuchten Polymorphismen
(aus Li und He 2007)

Marker	dbSNP rs id	Contig Position	Region	Funktion	Codon	Proteinrest
2664C/T	rs1806201	6476482	Exon 13	synonym	ACC/ACT	Thr888/Thr888
366C/G	rs7301328	6777751	Exon 2	synonym	CCC/CCG	Pro122/Pro122
T-200G	rs1019385	6893817	5' aufwärts	Lokus	-	-
4197T/C	rs1805247	6474949	Exon 13	synonym	CAT/CAC	His1399/His1399
5988T/C	rs1805502	6473155	Exon 13	nicht translatiert	-	-

Für den Polymorphismus T-200G des GRIN2B-Gens zeigten die Ergebnisse einen signifikanten p-Wert von 0.005 bei einer odds ratio von 0.71 (0.56 – 0.9). Auch in der Genotyp-Analyse konnten positive Resultate ohne Heterogenität festgestellt werden, unabhängig davon, ob ein T-Allel oder ein G-Allel kombiniert wurde. Für den Polymorphismus 4197T/C wurde eine schwache Assoziation bei der Genotypen-Analyse mit einem p-Wert von 0.017 (odds ratio 0.47; 0.26 – 0.87) gefunden, ohne einen sicheren Hinweis einer Heterogenität ($p=0.57$). Für die anderen drei SNPs konnte keine statistisch signifikante Assoziation bei den Allel- und/oder Genotypanalysen aufgezeigt werden. Die drei codierenden SNPs (2664C/T, 366C/G und 4197T/C) führen zu keiner Veränderung der Aminosäuresequenz, sie sind als stille Polymorphismen (synonyme Mutationen) zu bezeichnen (Abbildung 1.6).

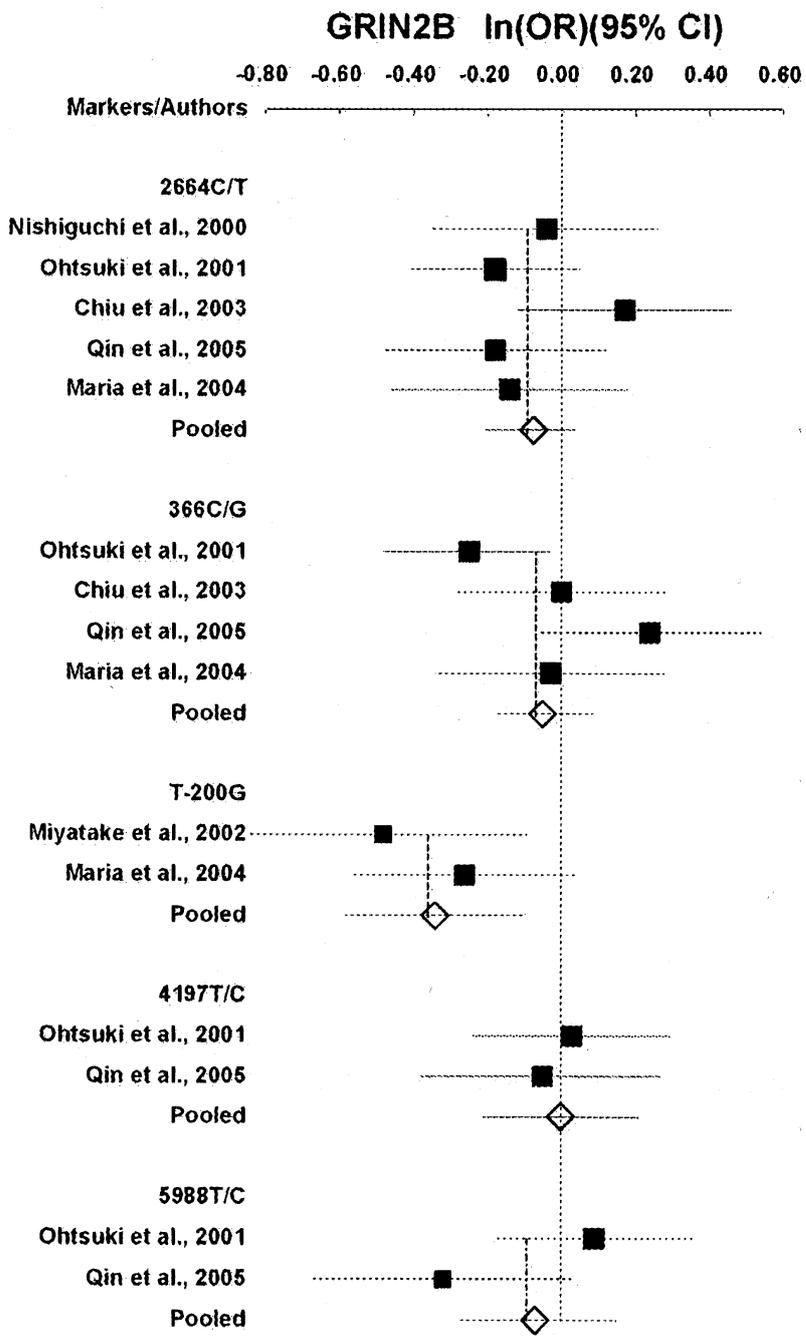


Abbildung 1.6: Forest plots der fünf Polymorphismen des GRIN2B-Gens (aus Li und He 2007)

2. Fragestellung

Es gilt heute als gesichert, dass für die Ätiologie der Schizophrenie eine starke genetische Komponente verantwortlich ist. Eine genaue Entschlüsselung aller beteiligten Faktoren ist aufgrund der Komplexität der Erkrankung bisher noch nicht möglich gewesen.

Mit Hilfe von Fall-Kontroll-Assoziationsstudien kann auf molekulargenetischer Ebene nach Suszeptibilitätsgenen mit zum Teil kleinen Effekten bei komplexen Krankheiten wie Schizophrenie gesucht werden.

Durch zahlreiche Studien bei schizophrenen Patienten konnten Veränderungen im glutamatergen System festgestellt werden, wobei dem NMDA-Rezeptor eine entscheidende Schlüsselrolle zugesprochen wird. In Tiermodellen wurde eine Assoziation zwischen einer verminderten NR2-Untereinheit und Störungen der Gedächtnisfunktion sowie der Lernvorgänge festgestellt. Zudem ist das GRIN2B-Gen an der Hirnentwicklung, der Neuroplastizität und an neurotoxischen Vorgängen beteiligt. In neurochemischen Studien wurde eine veränderte Expression von NMDA-Rezeptoren bei Schizophrenie belegt. Gleichzeitig konnte beim Menschen durch die Gabe von NMDA-Rezeptor-Antagonisten, wie z.B. PCP, die klinische Symptomatik einer Schizophrenie hervorgerufen werden.

Ziel dieser Arbeit war es, mögliche Zusammenhänge zwischen Polymorphismen des GRIN2B-Genes und der Entstehung einer Schizophrenie zu untersuchen. Hierzu wurden vier Polymorphismen (rs10772692, rs1806195, rs10772693, rs3026167) auf dem GRIN2B-Gen näher analysiert. Insgesamt wurden die Allel- und Genotypenfrequenz von 511 an Schizophrenie erkrankten Personen im Vergleich zu 611 gesunden Kontrollprobanden gesetzt und auf Assoziation überprüft.

3. Material und Methoden

Bei dieser Arbeit handelt es sich um eine Fall-Kontroll-Assoziationsstudie, in die 511 Patienten und 611 Kontrollprobanden eingeschlossen wurden.

Die SNPs rs10772692, rs1806195, rs10772693, rs3026167 des GRIN2B-Gens wurden genotypisiert und im Hinblick auf eine Assoziation zur Schizophrenie überprüft.

3.1 Vorbedingungen der Studiendurchführung

Vor Beginn der Studiendurchführung wurde eine genaue Beschreibung des Studiendesigns vorgenommen und die Zustimmung der verantwortlichen Ethikkommission eingeholt.

Alle Studienteilnehmer wurden vorab ausführlich über das Ziel und den Inhalt der Studie, die anonymisierte Verwendung ihrer Daten und Blutproben aufgeklärt. Am Ende wurde zudem darauf hingewiesen, dass der Teilnehmer jederzeit seine Einwilligung widerrufen kann und somit die Datenerhebung auf freiwilliger Basis abläuft. Nachdem die Probanden mit diesen Bedingungen einverstanden waren, bestätigten sie mit ihrer Unterschrift die Bereitschaft zur Teilnahme.

Die Gespräche fanden jeweils in den Räumlichkeiten der Universitätsklinik für Psychiatrie und Psychotherapie der Ludwig-Maximilians-Universität München statt.

3.2 Studienteilnehmer

3.2.1 Kontrollprobanden

Auswahlverfahren für das Kontrollkollektiv

Die Rekrutierung der Kontrollprobanden beruhte auf einem mehrstufigen Verfahren. Zunächst wurden die Adressdaten der Personen randomisiert innerhalb der Stadt München ermittelt. Die hierbei selektierten Personen erhielten auf postalischem Weg eine Studieneinladung mit einer beigefügten Rückantwort, in der sie ihr generelles Interesse an einer Teilnahme angeben konnten. Bei einem positiven Bescheid wurde ein

standardisiertes Telefoninterview durchgeführt, innerhalb dessen psychiatrische und neurologische Erkrankungen des Probanden sowie bei dessen Familienangehörigen erfragt wurden. Erbrachte diese Befragung kein negatives Resultat, wurde dem Probanden im nächsten Schritt ein Anamnesebogen (ANA 1) zugesandt. Im diesem Bogen sollte der Proband neben allgemeinen Angaben zu seiner Abstammung und seinem Familienstand mögliche Geburtskomplikationen und bisher aufgetretene Erkrankungen angeben. Darüber hinaus wurden Rauchverhalten, Alkohol- und Drogenkonsum sowie Suizidversuche des Probanden und mögliche Suizide innerhalb der Familie genau erfasst. Auch Phasen mit großer Angst, Essstörungen, affektive Störungen oder Störungen aus dem schizophrenen Formenkreis waren anzugeben. Nachdem die Auswertung dieses Fragebogens ebenfalls keine Anhaltspunkte für eine psychiatrische Erkrankung des Probanden oder innerhalb der Familie ergab, wurde der Teilnehmer zu einem ausführlichen Interview in die Klinik eingeladen. Während dieses Gesprächs wurde ein zweiter Anamnesebogen, die so genannte „ANA 2“ ausgefüllt. Hierin machte der Proband Angaben hinsichtlich seiner schulischen Laufbahn und der beruflichen Karriere. Ermittelt wurden auch Verhaltensweisen im Kinder- und Jugendalter, Partnerschaften, die finanzielle Situation des Probanden sowie die Einschätzung der aktuellen Lebenslage.

Als Interviewleitfaden für das spätere Gespräch diente das Strukturierte Klinische Interview (SKID) zur Exploration gemäß der Klassifikation des DSM-IV der *American Psychiatric Association* in seiner vierten Revision, 1994 (DSM-IV dt.: Wittchen et al. 1996 (SKID I), Wittchen et al. 1997). Bei dem SKID I handelt es sich um ein halbstrukturiertes klinisches Interview, das zur Diagnosefindung von Achse I-Störungen dient. Zusätzlich wurde das SKID II (Wittchen et al. 1997) eingesetzt. Dieses ebenfalls halbstrukturierte klinische Interview wird zur Erfassung von Persönlichkeitsstörungen der Achse II herangezogen.

Weiterhin kam als Messinstrument zur Anwendung das *Family History Assessment Modul* (FHAM; Rice et al. 1995), welches zur Erhebung psychiatrischer Diagnosen bei Verwandten ersten Grades verwendet wird. Bisherige belastende Erlebnisse wurden durch das *Leipziger Ereignis- und Belastungsinventar* (LEBI; Richter und Guthke 1996) in Form eines strukturierten Interviews erfasst. Hierdurch ist eine Bewertung bestimmter Lebensereignisse und Belastungen hinsichtlich des Zeitraums ihres Auftretens, der

subjektiv erlebten Belastung, der Kontrollierbarkeit, der Vorhersagbarkeit und der erhaltenen sozialen Unterstützung möglich. Die Beurteilung von zwanghaftem Verhalten und dessen Schwere wurde mit dem *Maudsley Zwangs-Inventar* (Maudsley Obsessional-Compulsive Inventory; MOCI; deutsche Fassung: Kallinke et al. 1979) durchgeführt. Mögliche Persönlichkeitsdispositionen wurden mit dem *State-Trait-Ärgerausdrucks-Inventar* (STAXI; Schwenkmezger et al. 1992), mit dem *NEO Persönlichkeitsinventar*, revidierte Form (NEO-PI-R; Ostendorf und Angleitner 2004) mit dem Fragebogen zur Erfassung von *Aggressivitätsfaktoren* (FAF; Hampel und Selg 1998) und dem *Minnesota Multiphasic Personality Inventory-2* (MMPI-2; Hathaway et al. 2000) getestet.

Neuropsychologische Testverfahren

Die Daten zur kognitiven Leistungsfähigkeit des Probanden wurden mit verschiedenen psychologischen Testverfahren erhoben. Zum einen mit dem Mini-Mental-Status-Test (MMST; Kessler et al. 1990), der die kognitiven Leistungseinbußen bei Probanden mit dementiellen und psychiatrischen Erkrankungen quantitativ erfasst und für die Anwendung bei Personen im Senium und Präsenium gedacht ist. Zum anderen mit dem Wortschatztest (WST; Schmidt und Metzler 1992) und dem Hamburg-Wechsler-Intelligenztest für Erwachsene in revidierter Form (HAWIE-R; Tewes 1994). Sie dienen der Erfassung der allgemeinen Intelligenz.

Ein-/Ausschlusskriterien für Kontrollprobanden

Ein Studieneinschluss des jeweiligen Kontrollprobanden erfolgte nur, wenn keine Anhaltspunkte für eine psychiatrische Erkrankung bei ihm selbst oder innerhalb der blutsverwandten Familienlinie bis hin zur dritten Generation ermittelt werden konnten. Des Weiteren durften keine Achse I- oder II-Störung und keine relevanten somatischen oder neurologischen Erkrankungen vorliegen. Hierunter fallen unter anderem Morbus Parkinson, Multiple Sklerose, Epilepsie, Chorea Huntington, Neuroborreliose, Neuroleues, FSME, Folgeschäden aufgrund einer Meningitis oder Enzephalitis oder ein vorangegangener Apoplex. Relevante internistische Ausschlusskriterien sind Morbus Cushing, Morbus Wilson, Morbus Addison, Leberzirrhose und Lupus erythematodes. Auch eine Gehirnerschütterung mit einem daraus resultierenden stationären Aufenthalt von mehr als 24 Std. sowie ein schweres Schädel-Hirn-Trauma führen zu einem Ausschluss aus

der Studie. Ebenfalls unberücksichtigt blieben Probanden mit einem klaren Drogenmissbrauch, einer generellen i.v.-Drogenanamnese oder infektiösen Erkrankungen wie HIV, Hepatitis C oder einer floriden Hepatitis B.

Hinsichtlich der Abstammung der Probanden wurden die Personen in die Studie mit eingeschlossen, deren Vorfahren deutschstämmig sind und deren Muttersprache von Seiten der Eltern bzw. Großeltern deutsch ist bzw. war.

Der Cut-off-Score beim MMST lag bei 26 Punkten und bei einem IQ-Gesamtwert von 80 Punkten beim HAWIE-R.

3.2.2 Patientenkollektiv

Auswahlverfahren für die Patientengruppe

Die Rekrutierung der an Schizophrenie erkrankten Patienten erfolgte mittels klinikinterner Patientendaten. Die in Frage kommenden Personen wurden zunächst telefonisch kontaktiert, um ihre Bereitschaft zur Teilnahme an der Studie zu ermitteln. Sofern Interesse an der Mitwirkung bestand, wurden die Patienten zu einem diagnostischen Interview in die Klinik eingeladen. In der Einleitung dieses Gesprächs wurde zuerst die Abstammung des Patienten abgeklärt, da nur Personen kaukasischer Herkunft in der Studie berücksichtigt wurden. Danach wurde auf eventuelle Geburtskomplikationen, vorliegende eigene Erkrankungen, die aktuelle Medikamenteneinnahme, Alkohol- und/oder Drogenkonsum sowie das Rauchverhalten eingegangen. Ein weiteres Augenmerk wurde auf die Lebensgeschichte des Patienten von der Kindheit bis zum aktuellen Zeitpunkt, ambulante sowie stationäre psychiatrische/psychologische Therapien, vorangegangene Klinikaufenthalte, eventuelle Suizidversuche, den schulischen und beruflichen Werdegang sowie die familiäre und finanzielle Situation des Patienten gelegt. Dies wurde mit Hilfe der zwei Anamnesebögen (ANA 1 und ANA 2) erfasst.

Anschließend wurde zur Abklärung der Diagnose einer Schizophrenie das Strukturierte Klinische Interview nach den DSM-IV Richtlinien, der SKID I (Wittchen et al. 1997) angewandt. Um eine Schizophrenie zu diagnostizieren, müssen mindestens zwei der fünf charakteristischen Merkmale wie Wahnvorstellungen, Halluzinationen, desorganisierte Sprache, desorganisiertes oder katatonisches Verhalten bzw. Negativsymptomatik, d.h. flacher Affekt, Willensschwäche, Alogie, Antriebshemmung für mindestens einen Monat

persistieren. Lediglich ein Merkmal wird unabdingbar gefordert, wenn es sich um bizarre Wahnvorstellungen handelt oder eine akustische Halluzination in Form von kommentierenden oder dialogisierenden Stimmen vorliegt. Als zeitliche Minimalvoraussetzung für die Symptome der Störung sind sechs Monate vorgegeben, wovon mindestens für einen Zeitraum von einem Monat die Symptome der akuten Episode erfüllt sein sollten. Das alleinige Vorliegen von Negativsymptomatik ist nur während der Prodromal- oder Residualphase ausreichend. Außerdem sollte das Leiden klinisch bedeutsam und die Leistungsfähigkeit des Patienten auf sozialer Ebene oder im Arbeitsbereich deutlich herabgesetzt sein.

Differentialdiagnosen

Differentialdiagnostisch waren schizoaffective Störungen, affektive Störungen mit psychotischen Merkmalen, schizophreniforme, rein wahnhaft, nur kurze oder nicht näher zu bezeichnende psychotische Störungen auszuschließen.

Bei der schizophreniformen Störung müssen die Symptome (sowohl Positiv- als auch Negativsymptomatik) für mindestens einen Monat vorhanden sein, dürfen aber nicht länger als sechs Monate andauern. Bei der wahnhaften Störung muss für mindestens einen Monat eine wahnhafte Symptomatik im Vordergrund stehen. Die kurze psychotische Störung ist dadurch gekennzeichnet, dass nur ein Symptom, wie beispielsweise ein Wahn, vorliegen und nur maximal einen Monat andauern darf. Die gemeinsame psychotische Störung wird dann diagnostiziert, wenn eine Person die gleiche psychotische Symptomatik zeigt, wie eine andere Person, mit der diejenige viel Zeit verbringt.

Zudem durften die Erstmanifestation sowie die Exazerbation der Erkrankung nicht auf den regelmäßigen Konsum von psychotropen Substanzen wie Drogen, Medikamentenmissbrauch oder Alkohol zurückzuführen sein. Auch ein medizinischer Krankheitsfaktor als Ursache der Erkrankung war auszuschließen. Demnach waren ein der Schizophrenie vorangegangenes Schädel-Hirn-Trauma oder organische Ursachen auf neurologischer, endokriner, somatischer, Stoffwechsel- oder autoimmuner Ebene als Ausschlusskriterien anzusehen. Außerdem sollte darauf geachtet werden, dass in der

Vorgeschichte keine autistische oder tief greifende Entwicklungsstörung (z.B. Hypoxie während der Geburt) diagnostiziert wurde.

Sektionen des SKID

Neben den oben genannten Möglichkeiten der Diagnosefestigung und genauen Aufschlüsselung der Schizophrenie bietet der SKID I zusätzlich die Möglichkeit, den Verlauf (episodisch, kontinuierlich, mit/ohne Negativsymptomatik, mit/ohne Residualsymptome), das Alter bei Erstmanifestation bzw. Prodromalstadium sowie den Remissionsgrad der Schizophrenie zu klassifizieren.

Der SKID I ist in verschiedene Sektionen untergliedert:

In Sektion A wurden alle, jemals im Leben des Patienten aufgetretenen affektiven Symptome, wie beispielsweise Anzeichen für Depression, Manie, Hypomanie und Dysthymie, abgefragt und entsprechend kodiert. Sektion B befasste sich mit psychotischen und assoziierten Symptomen und beinhaltete unter anderem Wahnvorstellungen sowie Halluzinationen. In Sektion C ging es um die Differentialdiagnose psychotischer Störungen sowie die einzelnen Subtypen der Schizophrenie (d.h. paranoider Typus, katatoner Typus, desorganisierter Typus, undifferenzierter Typus und Residualtypus). Sektion D beschäftigte sich mit der Differentialdiagnose affektiver Störungen. Hier konnten eine Major Depression, bipolare Störungen (Bipolar I und Bipolar II) und depressive sowie manische Symptome als Prodromalphase bzw. postpsychotische Symptome diagnostiziert werden. Sektion E diente der Abklärung von Missbrauch und Abhängigkeit von psychotropen Substanzen wie Alkohol und Drogen. In Sektion F wurden verschiedene Angststörungen (z.B. Phobien, Zwangsstörungen, Panikstörungen, generalisierte Angststörung) beurteilt. In Sektion G wurden somatoforme Störungen anhand von Einstiegsfragen abgeklärt. Fiel dieses anfängliche Screening negativ aus, konnte mit Sektion H begonnen werden. Diese diente der diagnostischen Abklärung von Essstörungen (Anorexie, Bulimie, binge eating).

Zuletzt wurden die aktuelle Leistungsfähigkeit sowie die Leistungsfähigkeit während der schlimmsten Phase der Erkrankung durch die GAS-Skala (0-100 Punkte) eingeschätzt.

Dabei wurde der Patient unter anderem bezüglich aufgetretener Probleme im sozialen und familiären Umfeld, bei der Arbeit oder der allgemeinen Alltagsbewältigung befragt.

Tabelle 3.1: Ausschlusskriterien Patientenkollektiv

Liste der Ausschlusskriterien	
Neurologisch:	Infektiös:
Polio (vor prodromal)	Lues-II-Infektion
FSME	Toxoplasmose
Meningitis (vor prodromal)	Morbus Creutzfeld-Jakob
Enzephalitis/Enzephalopathie	HIV
Neuroborreliose	Floride Hepatitis B
ALS	Hepatitis C
Chorea Huntington	i.v. Drogenkonsum (>1x)
Apoplex (vor prodromal)	Neurochirurgisch:
Multiple Sklerose	schweres Schädel-Hirn-Trauma (vor prodromal)
Muskeldystrophie	Z.n. Gehirntumor
Restless-legs-Syndrom	Internistisch:
Fibromyalgie	Leberzirrhose

Ein-/Ausschlusskriterien des Patientenkollektivs

Aufgenommen in die Studie wurden grundsätzlich nur Patienten mit einer eindeutig diagnostizierten Schizophrenie, bei denen eine schizoaffektive Störung, andere Störungen aus dem schizophrenen Formenkreis und drogen-, medikamenten- bzw. alkoholinduzierte Psychosen sicher ausgeschlossen werden konnten. Zudem durfte keine organische Ursache der Erkrankung vorliegen. Auch Patienten mit einer infektiösen Erkrankung wie HIV, Hepatitis C oder einer floriden Hepatitis B wurden nicht in das Patientenkollektiv integriert (Tabelle 3.1).

3.3 Laborverfahren

Die Laborverfahren wurden anhand von Standardverfahren der Sektion Molekulare und Klinische Neurobiologie durchgeführt.

3.3.1 DNA-Extraktion

Bei allen Studienteilnehmern wurde nach dem Interview eine venöse Blutentnahme durchgeführt. Die Probenröhrchen wurden hierzu kodiert, um die Anonymität des jeweiligen Teilnehmers zu wahren. Um eine Gerinnung des Blutes nach der Abnahme zu verhindern, kamen EDTA-Monovetten zur Anwendung. Danach erfolgte gemäß des vorgegebenen Protokolls mit dem QIAamp Blood Maxi Kit (QIAamp DNA Blood Midi/Maxi Handbook, Firma Qiagen, Hilden, Germany, 2005) die Extraktion der genomischen DNA (Tabelle 3.2).

Als erstes wurden 5 bis 10 ml des EDTA-Blutes zur Lyse der Leukozyten und Freisetzung der Nukleinsäuren mit 500 µl Proteinkinase K versetzt. Durch die einsetzende Verdauung und Degradierung der denaturierten Proteine zu kleineren Fragmenten wurde eine leichtere Trennung der DNA erreicht. Anschließend wurden 12 ml eines Guanidin-HCl-haltigen AL-Puffers hinzugegeben, der zum Entzug der Hydrathülle der DNA führte und somit die spätere Bindung der DNA an die Silicagel-Säule ermöglichte. Zur Vervollständigung der Zelllyse wurde die Lösung danach zwei Minuten auf dem Vortexer durchmischt. Das Ergebnis war eine homogene Lösung. Für eine maximale DNA-Ausbeute wurde die Lösung nun für 30 Minuten bei 70 °C im Wasserbad unter gleichmäßigem Schütteln inkubiert. Zur Fällung der DNA auf das Säulenmaterial wurde die Probe mit 10 ml Ethanol (96-100%) versetzt und für zwei Minuten auf dem Vortexer vermischt. Anschließend wurde sie auf die Silicamembran gegeben und sukzessiv für drei Minuten bei 3000 Umdrehungen pro Minute (rpm) zentrifugiert. Die hierbei vorherrschenden Salz- und pH-Bedingungen sorgten dafür, dass die RNA und die Nukleinsäure-bindenden Proteine ungebunden blieben.

Zur Entfernung von RNA- und Protein-Verunreinigungen und zur Reinigung der DNA wurde die Säule anschließend erst mit Guanidin-HCl-haltigem Puffer (5 ml) gewaschen, danach wurden 5 ml eines ethanolhaltigen Waschpuffers hinzugegeben, um die Guanidiumsätze zu entfernen. Die Elution der DNA von der Silicamembran erfolgte unter der Zugabe von 1 ml AE-Puffer (Tris-Puffer, pH > 9,0). Der Puffer wurde dazu direkt auf die DNA-haltige Membran pipettiert. Für einen maximalen DNA-Ertrag wurde die Membran für fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und für weitere fünf Minuten bei

5000 rpm zentrifugiert. Durch den basischen AE-Puffer ließ sich die DNA an die Silicamembran eluieren. Die hierbei gewonnene DNA wurde bei -80 °C gelagert bzw. für die nachfolgende Genotypisierung verwendet.

Tabelle 3.2: Materialien zur DNA-Extraktion

Material, Reagenz, Gerät	Verwendungszweck	Hersteller
10x PBS-Puffer	Herstellung des 1x PBS-Puffers	Reagenzien zur Eigenherstellung, Carl Roth, Hamburg
1x PBS-Puffer	Resuspendierung des Blutkuchens	Eigene Herstellung
50 ml Zentrifugenröhre	Auffangen der Eluate	Sarstedt, Nürnbrecht
Sammelgefäße	Auffangen der DNA	Qiagen Hilden
EDTA Dinatriumsalz Dihydrat (Titrierkomplex III)	Herstellen des 10x PBS-Puffers	Carl Roth, Karlsruhe
EDTA Monovette	Blutentnahme	Sarstedt, Nürnbrecht
Eppendorf Research Pipette (100-1000 µl)	Pipettierung der DNA	Eppendorf, Hamburg
Ethanol Rotipuran > 99.8% p.a.	Entfernung der Hydrathülle der DNA	Carl Roth, Karlsruhe
Kaliumchlorid, KCl	Herstellung des 10x PBS-Puffers	Carl Roth, Karlsruhe
Kaliumhydrogenphosphat, KH ₂ PO ₄	Herstellung des 10xPBS-Puffers	Carl Roth, Karlsruhe
Micro Schraubröhre, 2 ml	Lagerung der DNA	Sarstedt, Nürnbrecht
Natriumhydrogenphosphat, Na ₂ HPO ₄	Herstellung des 10x PBS-Puffers	Carl Roth, Karlsruhe
Natriumhydroxid, NaOH	Herstellung des 10x PBS-Puffers	Carl Roth, Karlsruhe
Puffer AE	Elution der DNA	Qiagen, Hilden
Puffer AL	Zellyse	Qiagen, Hilden
Material, Reagenz, Gerät	Verwendungszweck	Hersteller
Puffer AW1	Entfernung von Zellrückständen	Qiagen, Hilden
Puffer AW2	Entfernung von Zellrückständen	Qiagen, Hilden
QIAmp <i>Maxi Spin Columns</i>	Bindung der DNA	Qiagen, Hilden
Qiagen Protease, 500 µl	Abbau von Zellproteinen	Qiagen, Hilden
Rotixa RP Standzentrifuge	Alle Zentrifugationsschritte	Hettich, Tuttlingen
Vortex Genie	Durchmischung der Blut-Puffer-Suspensionen	Scientific Industries, New York, USA
WB Wasserbad	Inkubation bei 70 C der Blut-Puffer-Suspension	Memmert, Schwabhausen

3.3.2 DNA-Konzentration

Zur Konzentrationsbestimmung der DNA wurde die PicoGreen-Methode angewendet. Bei PicoGreen handelt es sich um ein ultraspezifisches, fluoreszierendes Färbemittel, das in doppelsträngiger DNA interkaliert. Mit dieser hochsensitiven Methode können kleinste Mengen an DNA quantifiziert werden.

Tabelle 3.3: Materialien zur DNA-Konzentrationsbestimmung

Verbrauchsmaterialien	
96 well Platte	Greiner
Selbstklebende Aluminiumfolie	Eppendorf, Hamburg
Konische PP-Röhrchen (à 50 ml)	Sarsted, Nürnberg
Reagenzien	
PicoGreen dsDNA quantitation reagent	Molecular Probes
TE (pH 7,4), Tris Base, EDTA	Carl Roth, Karlsruhe
Clontech Human Genomic DNA 100 ng/µl	Clontech
Geräte	
Victor 3 Multilabel Counter 1420	Perkin Elmer Inc., Massachusetts, USA
Vortexer Reax	Heidolph

Die Intensität der Fluoreszenz korreliert dabei direkt mit der Menge der in der Probe enthaltenen DNA (invitrogen.com). Die Konzentration wird anhand einer Eichkurve aus genomischer DNA bestimmt (Tabelle 3.3).

Die Standardkurve wurde durch eine 1:2 Verdünnungsreihe eines 100 ng/µl DNA-Standards (Clontech, Mountain View, USA) bestimmt. Hierzu wurden 200 µl dieses Standards aus genomischer DNA der Vertiefung A1 einer Thermo fast 96 well plate (Firma Abgene, Hamburg) vorgelegt und in die Vertiefungen B1 bis H1 mit 100 µl autoklaviertem, destilliertem Wasser gefüllt. Anschließend wurde aus der Vertiefung A1 mit einer Pipette 100 µl entnommen, in die Vertiefung B1 einpipettiert und die Lösung durch mehrmaliges Aufziehen mit der Pipette gemischt. Aus dem Well B1 wurden wiederum 100 µl entnommen und in die Vertiefung C1 transferiert und gemischt. Die Verdünnungsreihe wurde bis zur Vertiefung G1 fortgeführt, während das Well H1 unberührt blieb und somit keine genomische DNA enthielt (Tabelle 3.4).

Tabelle 3.4: Positionen, Volumina und Konzentrationen der DNA-Verdünnungsreihe

Position	Volumen	Konzentration an genomischer DNA
A1	100 µl	100 ng/ ml
B1	100 µl	50 ng/ µl
C1	100 µl	25 ng/ µl
D1	100 µl	12.5 ng/ µl
E1	100 µl	6.25 ng/ µl
F1	100 µl	3.125 ng/ µl
G1	200 µl	1.5262 ng/ µl
H1	100 µl	0

Die zu messenden DNA- Lösungen wurden in einer 96 *well plate* (Firma Abgene, Hamburg) mit autoklaviertem, destilliertem Wasser 1:10 vorverdünnt (5 µl DNA und 45 µl H₂O), während die Standardkurve nicht mehr weiter verdünnt wurde. Außerdem wurde in eine 96 *well flat bottom plate* (Firma Greiner, Frickenhausen) 50 µl autoklaviertes, destilliertes Wasser pro Vertiefung vorgelegt. Zu diesen wurden jeweils 5 µl der Standardverdünnungsreihe bzw. der vorverdünnten DNA gegeben. Sowohl die Standard-DNA als auch die Proben-DNA wurde jeweils aus demselben Röhrchen bzw. Vertiefung in Replikaten in die *flat bottom plate* einpipettiert.

Unmittelbar vor der Messung wurde das photosensible PicoGreen (Firma Invitrogen, Karlsruhe) unter möglichst geringem Lichteinfall mit autoklaviertem, destilliertem Wasser 1:156 verdünnt. Anschließend wurde aus dieser Verdünnung pro Vertiefung 145 µl zu der vorverdünnten Proben- bzw. der Standard-DNA gegeben. So resultierte eine Endverdünnung des PicoGreens von 1:200. Durch einen Greifarm der Janus Workstation wurde die befüllte Platte in den Victor 3 Multilabel Counter 1420 (Firma Perkin Elmer, Massachusetts) überführt.

Um eine homogene Durchmischung der Lösungen zu erreichen, wurde vor der Messung die 96 *well* Platte im Messgerät 30s in horizontaler Ebene in Doppellellipsen geschüttelt. Die Anregung des PicoGreens erfolgte durch Licht der Wellenlänge 485nm und die Emissionsmessung bei 520nm. Mit Hilfe der Wallac 1420 Workstation Software (Perkin Elmer, Massachusetts) konnte die Fluoreszenzmessung *online* verfolgt werden. Die ermittelten Fluoreszenzwerte wurden vom Messgerät an einen Rechner (Optiplex GX620 Pentium 4 HAT, Dell, Frankfurt) übermittelt und die Konzentrationen der DNA-Lösungen anhand der Fluoreszenzwerte der Standardkurve mit einem auf *Virtual Basic* basierenden

Makro berechnet. Ebenso wurden die nötigen Volumina an DNA-Lösung und autoklaviertem, destilliertem Wasser, die für die Konzentrationseinstellung der DNA-Lösungen auf 50ng/µl nötig waren, bestimmt.

Basierend auf den Ergebnissen der Konzentrationsmessung wurde die Konzentrationseinstellung auf 50 ng/µl vollautomatisch mit dem Janus Pipettierroboter durchgeführt, das Endvolumen betrug dabei 500 µl. Die so entstandene Arbeitslösung wurde bei -80°C gelagert und bei Bedarf bei 4 °C aufgetaut. Für die Hochdurchsatzgenotypisierung wurden die Arbeitslösungen in 96-*well* Platten (Abgene, Hamburg) vorgelegt und bis zur weiteren Prozessierung sorgfältig verschlossen und bei -20 °C gelagert.

3.3.3 Genotypisierung

Die Genotypisierung wurde mittels iPLEX an vier SNPs im GRIN2B-Gen vorgenommen (rs10772692, rs1806195, rs10772693 und rs3026167; Internet: National Centre für Biotechnology Information (NCBI, 2010, Tabelle 3.5).

Zuerst erfolgte die Amplifizierung der die SNPs flankierenden Sequenzen im Multiplexmaßstab, danach eine allelspezifische Extension der Primer. Durch die Bestimmung der molekularen Massen der allelspezifischen Primerextensionsprodukte wurden die Genotypen des jeweils untersuchten SNP eindeutig identifiziert.

Die Analysen wurden mittels des MassArray MALDI TOF MS (matrix assisted laser desorption/ionisation time of flight mass spectrometry) Systems der Firma Sequenom durchgeführt.

Tabelle 3.5: Lokalisation der SNPs des GRIN2B-Gens

ID/Accession No.	Contig Position	Chromosom	Allel	Funktion
rs10772692	6480122	12p13.1	A/C	Intron 9
rs1806195	6482366	12p13.1	G/T	Intron 8
rs10772693	6490218	12p13.1	C/T	Intron 7
rs3026167	6491978	12p13.1	A/G	Intron 7

3.3.3.1 Assaydesign

Die Assays wurden mit Hilfe der Spectro Designer Software (Sequenom, San Diego, CA) konzipiert (Tabelle 3.6).

Tabelle 3.6: Primersequenzen

SNP ID	Primer 1	Primer 2	Fragmentlänge	Extensionsprimer
rs10772692	ACGTTGGATGCGGT GCTTTGATCACTTA AC	ACGTTGGATGCT TTTGTCTGGGAC CTCTTC	123	caGACCTCTTCCT ACTTCCT
rs1806195	ACGTTGGATGCACC TCTATCCTTGTTG C	ACGTTGGATGGG GATAAGTGTAGG TGTTTG	119	aTGTAGGTGTTTG TGTTTCAATAGA T
rs10772693	ACGTTGGATGTCTT AGCTGACCTAGGTG AC	ACGTTGGATGCA AGGTGGAAGCTG CAAATC	124	TTATGCCCTTGTC TCAGCAATCCCA CAG
rs3026167	ACGTTGGATGTCAG AACGACCACTGCTT TG	ACGTTGGATGGA AGTCTTTAAGGT CCTGGC	119	aACCAGGAGAGG AGCAGG

3.3.3.2 iPLEX-Verfahren

Das iPLEX-Verfahren basiert im Wesentlichen auf zwei unterschiedlichen PCR-Reaktionen. Zum einen die konventionelle PCR-Reaktion des zu untersuchenden Genombereichs und zum anderen eine weitere spezielle PCR-Reaktion, bei der für jedes Allel des SNPs ein massenspezifisches Produkt entsteht.

Generell handelt es sich bei der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) um eine Methode zur Vervielfältigung von DNA, die 1983 von Lary Mullis und seinen Mitarbeitern entwickelt wurde (Mullis 1990, Saiki et al. 1985).

Innerhalb der initialen PCR wurde der genomische Bereich amplifiziert, der den jeweiligen SNP flankiert. Zur Senkung der Kontaminationsgefahr wurden die PCR-Reaktionen, die im 384er-Format in Mikrotiterplatten (Firma Abgene) durchgeführt werden, mit Hilfe eines Pipettierroboters (Microlab 4000, Firma Hamilton) durchgeführt. In jedes *well* wurde

ein PCR-Cocktail bestehend aus den in Tabelle 7 dargestellten Reagenzien pipettiert (Tabelle 3.7).

Tabelle 3.7: Reagenzien initiale PCR

Reagenz	Volumen	Hersteller
Autoklaviertes H ₂ O	1,850 µl	Purelab ultra, ELGA
PCR Puffer mit MgCl ₂	0,625 µl	Qiagen
MgCl ₂ (25mM)	0,325 µl	Qiagen
dNTP Mix (25mM)	0,100 µl	Abgene
Primer Mix (jeweils 500 nM aus Primer 1 und Primer 2)	1 µl	Qiagen
Genomische DNA (5-10 ng/µl)	1 µl	
Hotstar Taq (5 U/ µl)	0,100 µl	Qiagen

3.3.3.3 Polymerasekettenreaktion

Die drei Reaktionsschritte der PCR:

Denaturierung:

Die mit den PCR-Cocktails versehenen DNA-Platten wurden für ca. 1 Minute vorsichtig mit dem Vortexer gemischt. Anschließend wurde die PCR in einem für die Primer optimierten Thermocycler (GeneAmp, PCR System 9700, Firma Applied Biosystems) durchgeführt. Zuerst wurde der Cycler für 15 Minuten auf 94 °C erhitzt (initiale Denaturierung). In den folgenden Zyklen erfolgte die Denaturierung der DNA für 20 Sekunden bei 94 °C.

Annealing:

In einem zweiten Schritt wurden die Proben für 30 Sekunden auf 56 °C abgekühlt, um die Anlagerung der forward- und reverse-Primer an die Einzelstränge zu gewährleisten.

Elongation:

Im dritten Schritt wurde die Temperatur wiederum für die Dauer von 1 Minute auf 72 °C erhöht. Dadurch konnte die Taq-Polymerase die Nukleotide an die Primer anfügen.

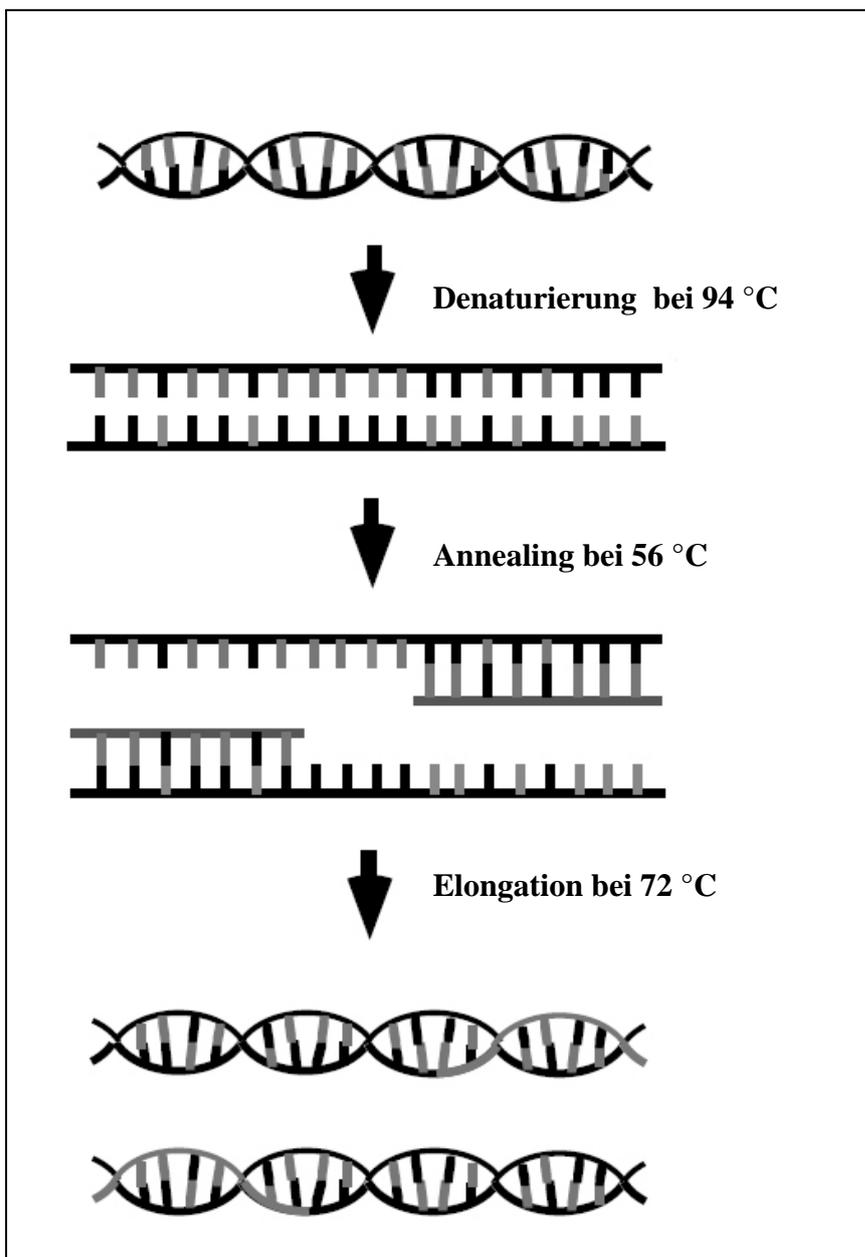


Abbildung 3.1: Systematische Darstellung der einzelnen Reaktionsschritte der PCR

Diese oben dargestellten Abläufe (vgl. Abbildung 3.1) wurden insgesamt 45mal wiederholt, um zu gewährleisten, dass genügend Template für das weitere Prozedere zur Verfügung stand. Abschließend wurden die Proben zur finalen Extension für weitere 3 Minuten konstant auf 72 °C gehalten, um sie dann auf 4 °C abzukühlen. Bei dieser Temperatur wurden die Proben für das weitere Vorgehen aufbewahrt.

3.3.3.4 Dephosphorylierung

Da bei der PCR nicht alle Nukleotide eingebaut werden, diese jedoch die spätere Messung im Massenspektrometer stören könnten, wurden sie mit dem Enzym SAP (shrimp alkaline phosphatase) inaktiviert. Hierzu wurde ein SAP-Mix bestehend aus 0,170 µl SAP 10x Puffer, 0,300 µl Enzym (1 U/µl) und 1,530 µl H₂O angesetzt (Tabelle 3.8).

Zu jeder PCR-Reaktion wurden 2 µl des SAP-Cocktails hinzugegeben und vorsichtig mit dem Vortexer gemischt. Die PCR-Reaktionen wurden in einem Thermocycler bei 37 °C für 20 Minuten inkubiert, das Enzym anschließend für 5 Minuten bei 85 °C inaktiviert und auf 4 °C herabgekühlt.

Tabelle 3.8: Zusammensetzung des SAP-Mixes

Reagenz	Volumen	Hersteller
Autoklaviertes H ₂ O	1,530 µl	Sequenom
SAP Puffer 10x	0,170 µl	Sequenom
SAP Enzym (1 U/ µl)	0,3 00 µl	Sequenom

3.3.3.5 Extensionsreaktion

Für die Extensionsreaktion wurde ein Primer, der so genannte Extensionsprimer, so entworfen, dass er unmittelbar vor dem zu untersuchenden SNP an das PCR-Produkt bindet. Für die Reaktion wurden drei Didesoxynukleotiden benutzt, die nach dem Einbau nicht mehr verlängert werden konnten. Dadurch konnte jeder Extensionsprimer um eine Base verlängert werden. Es entstanden somit allelspezifische DNA Fragmente mit unterschiedlicher Masse.

Zuerst wurde ein iPLEX-Cocktail aus den in Tabelle 3.9 aufgelisteten Reagenzien in jedes *well* pipettiert.

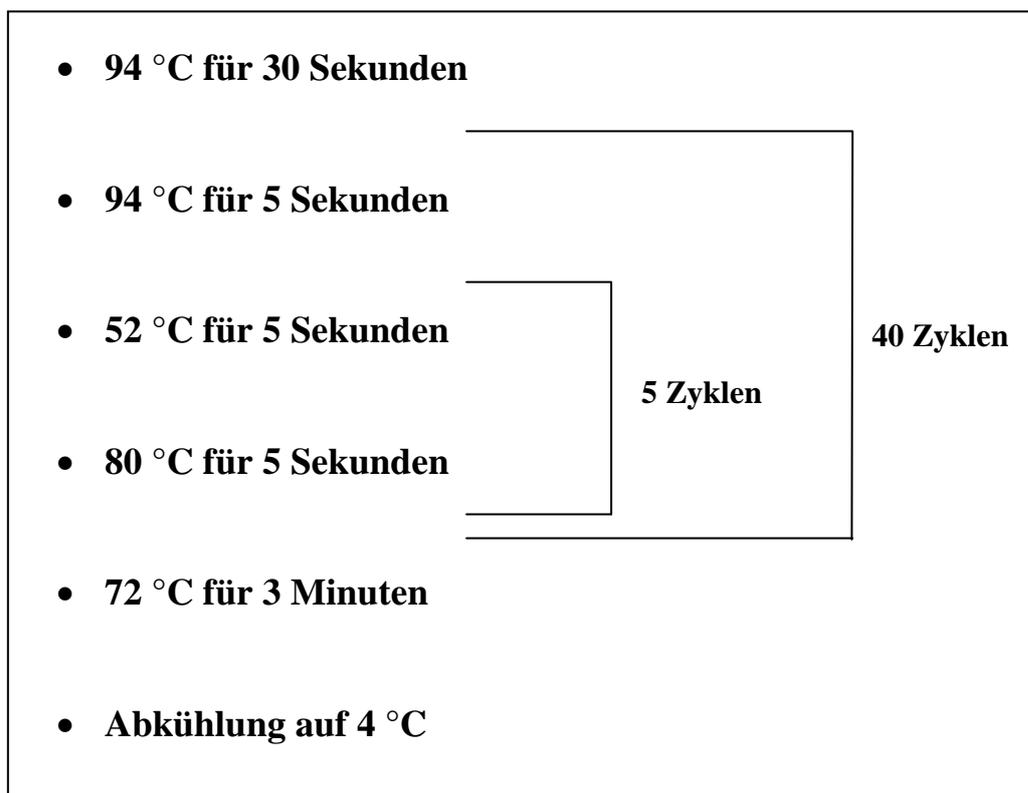
Die PCR wurde in einem Thermocycler durchgeführt. Das zweistufige Programm verwendet zwei Durchlaufschleifen, d.h. eine äußere Schleife, die wiederum aus fünf inneren Schleifen besteht, die 40mal durchlaufen werden.

Tabelle 3.9: Zusammensetzung des iPLEX-Cocktails

Reagenz	Volumen	Hersteller
Autoklaviertes H ₂ O	0.755µl	Sequenom
iPLEX Puffer 10x	0.200µl	Sequenom
iPLEX Abbruch-Mix	0.200µl	Sequenom
Primer Mix (7µM:14 µM)	0.800µl	Sequenom
iPLEX Enzyme	0.041µl	Sequenom

Für die initiale Denaturierung wurde die Temperatur im Cycler zuerst auf 94 °C für 30 s erhöht. Anschließend wurden 40 Zyklen aus Denaturierung bei 94 °C für 5 s und innerer Schleife durchgeführt. Die innere Schleife bestand aus 5 Zyklen mit Annealing bei 52 °C 5 s und Extension bei 80 °C für 5 s.

Die finale Extension erfolgte bei 72 °C für 3 min. Die Proben wurden anschließend auf 4 °C herabgekühlt (Abbildung 3.2).

**Abbildung 3.2: Ablauf der Extensionsreaktion**

Als nächster Schritt wurden die Proben mit einem Ionenaustauschharz (SpectroClean, Fa. Sequenom) aufbereitet, um störende Kationen zu entfernen, die aufgrund der hohen Affinität der Nukleinsäuren zu Alkali- und Erdalkaliionen auftraten. Ohne diese Reinigung würde es zu Störungen der MALDI TOF-Messung durch zusätzlich auftretende Signale kommen.

Anschließend folgte die Transferierung des Analytengemischs auf Siliziumchips mittels des MassARRAY Nanodispenser (Sequenom). Auf den Chips befindet sich eine 384er Matrix, bestehend aus der organischen Säure 3-Hydroxypicolinsäure (3-HPA). Hierzu wurden Kalibranten aus einer Mischung von Oligonukleotiden bekannter Masse aufgetragen. Dies dient der Kalibrierung des Analysesystems.

3.3.3.6 Massenspektrometrie

Abläufe im Massenspektrometer (vgl. Abbildung 3.3)

Nach den oben aufgeführten Schritten wurden die Chips durch eine Vakuumschleuse in das Massenspektrometer eingebracht und im Hochvakuum des Massenspektrometers einem intensiven Laserpuls von 3 bis 4 Nanosekunden Dauer ausgesetzt. Bei dieser Ionisation wurden einfach geladene Molekülionen erzeugt, die in die Gasphase übertraten. Die Ionen wurden danach in einem elektrischen Feld beschleunigt und erreichten eine feldfreie Driftstrecke (Flugrohr), in dem sie abhängig vom Masse-/Ladungsverhältnis (m/z) aufgeteilt wurden. Die Ionen mit hohen m/z -Werten wanderten dabei langsamer durch das Flugrohr und trafen später am Detektor auf, als Ionen mit niedrigeren m/z -Werten. Da die mittels Extensionsreaktion erzeugten DNA-Fragmente unterschiedliche Massen haben, können sie anhand der Dauer ihres Fluges durch das Rohr mittels der TYPER Analyzer 3.3.0 Software (Sequenom) einem spezifischen Genotyp zugeordnet werden.



Abbildung 3.3: Komponenten eines Massenspektrometers (aus Wunderlich, IZKF Ulm)

3.4 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung zu Allel- und Genotypenverteilung der vier Marker erfolgte mit Hilfe der Software SPSS 17.0 (Statistical Package for Social Sciences; Inc Chicago, 2010). Die Verteilung der Genotypen wurde mittels des Hardy-Weinberg-Gleichgewichts getestet. Der Chi-Quadrat-Test diente hierbei der Signifikanzprüfung. Vor allem interessierten die Unterschiede in der Allel- und Genotypverteilung zwischen Patienten und Kontrollprobanden.

Für alle statistischen Berechnungen wurde ein Signifikanzniveau von $p < .05$ zugrunde gelegt. Ein Trend zur Signifikanz wurde ab $p < .10$ gesehen.

4. Ergebnisse

Die in dieser Arbeit untersuchten Marker des GRIN2B-Gens sind auf Chromosom 12 lokalisiert. Insgesamt wurden 611 gesunde Probanden in die Studie eingeschlossen. 54% des Kontrollkollektivs waren hierbei weiblichen, 46% männlichen Geschlechts. Die Altersspanne lag zwischen 30 und 61 Jahren mit einem Mittelwert von 45.26 Jahren (Standardabweichung 15.240).

Im Patientenkollektiv wurden insgesamt 511 an Schizophrenie erkrankte Personen berücksichtigt. Davon waren 35% weiblichen Geschlechts. Der männliche Anteil lag bei 65%. Der Altersdurchschnitt lag bei 37.86 Jahren (Standardabweichung 11.361) mit einer Altersspanne zwischen 26 und 49 Jahren.

4.1 Analyse des Markers rs10772692 des GRIN2B-Gens

4.1.1 Allelverteilung

Die statistische Auswertung veranschaulicht die Allelverteilung innerhalb der Kontrollprobanden und der Patientengruppe mit einem Überwiegen des C-Allels in beiden Gruppen (vgl. Tabelle 4.1).

Tabelle 4.1: Darstellung der Allelverteilung des Polymorphismus rs10772692

	A-Allel n (%)	C-Allel n (%)	Gesamt n (%)
Kontrollen	584 (47,9)	636 (52,1)	1220 (100,0)
Patienten	448 (44,4)	562 (55,6)	1010 (100,0)
Gesamt	1032 (46,3)	1198 (53,7)	2230 (100,0)

Es fand sich ein Trend zur Signifikanz der Allelverteilung zwischen den Kontrollprobanden und der Patientengruppe, wobei das C-Allel bei den Schizophrenen häufiger war.

$$X^2 = 2,742, df = 1, p = 0,098$$

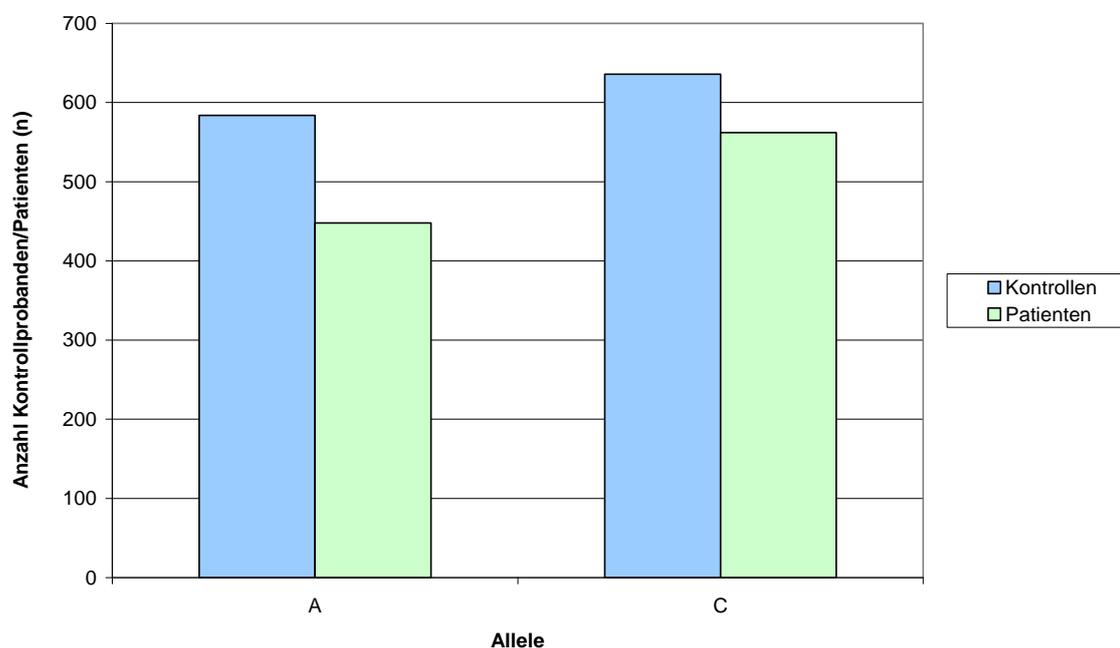


Abbildung 4.1: Graphische Darstellung der Allelhäufigkeiten des SNP rs10772692 in der Patienten- und Kontrollgruppe

4.1.2 Genotypenverteilungen

In der Kontroll- und Patientengruppe waren die Genotypen des Markers rs10772692 innerhalb des Hardy-Weinberg-Gleichgewichts verteilt.

Gruppe Kontrollprobanden	Gruppe Patienten
$\chi^2 = 0,121$, $df = 2$, $p = 0,941$	$\chi^2 = 0,432$, $df = 2$; $p = 0,806$

Tabelle 4.2: Darstellung der Genotypenverteilung des Polymorphismus rs10772692

	Genotyp A/A n (%)	Genotyp A/C n (%)	Genotyp C/C n (%)	Gesamt n (%)
Kontrollen	137 (22,5)	310 (50,8)	163 (26,7)	610 (100,0)
Patienten	103 (20,4)	242 (47,9)	160 (31,7)	505 (100,0)
Gesamt	240 (21,5)	552 (49,5)	323 (29,0)	1115 (100,0)

Die Frequenzen der Genotypen zeigten keine signifikanten Gruppenunterschiede.

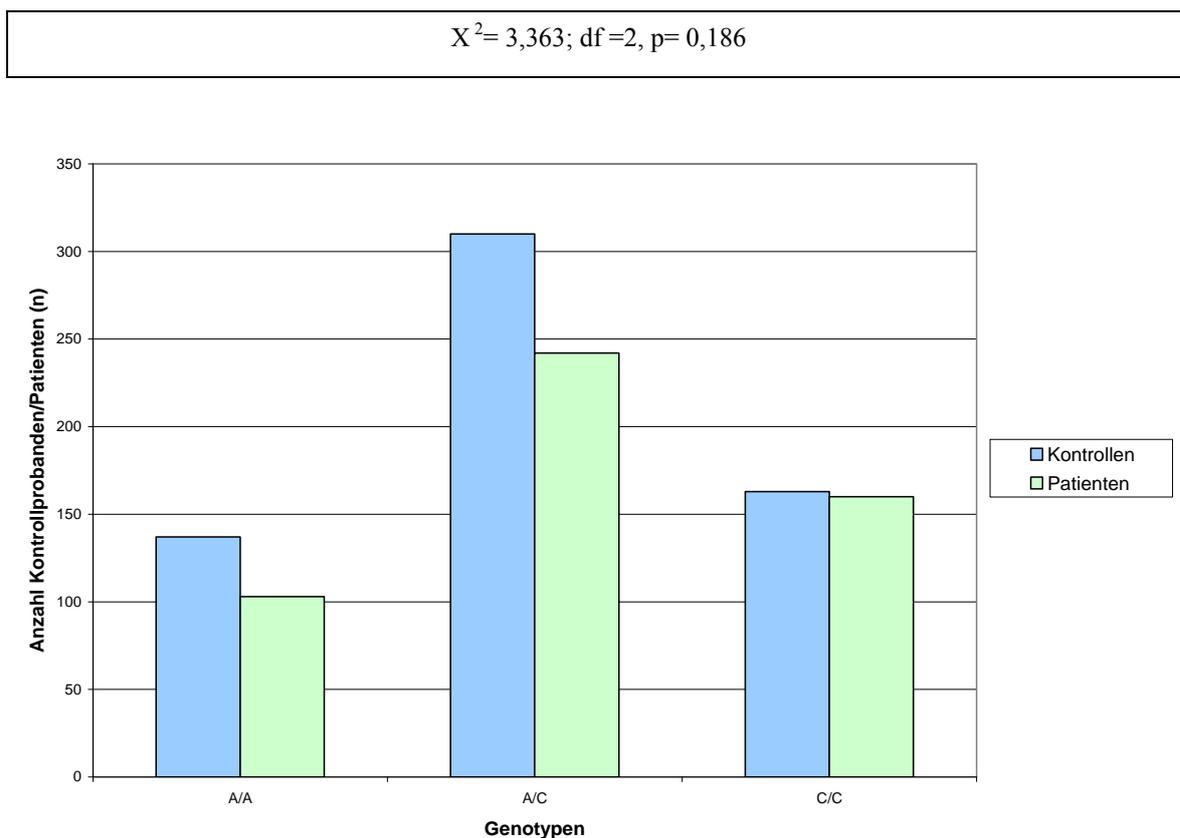


Abbildung 4.2: Graphische Darstellung der Genotypenverteilung des SNP rs10772692 in der Patienten- und Kontrollgruppe

4.2 Analyse des Markers rs1806195 des GRIN2B-Gens

4.2.1 Allelverteilung

Aus Tabelle 4.3 ergibt sich die Allelverteilung innerhalb der Kontroll- und Patientengruppe.

Tabelle 4.3: Darstellung der Allelverteilung des Markers rs1806195

	G-Allel n (%)	T-Allel n (%)	Gesamt n (%)
Kontrollen	606 (51,5)	570 (48,5)	1176 (100,0)
Patienten	485 (48,8)	509 (51,2)	994 (100,0)
Gesamt	1091 (50,3)	1079 (49,7)	2170 (100,0)

Es bestand kein signifikanter Unterschied in der Allelverteilung zwischen den Kontrollprobanden und der Patientengruppe. Beide Allele sind ungefähr gleich stark vorhanden.

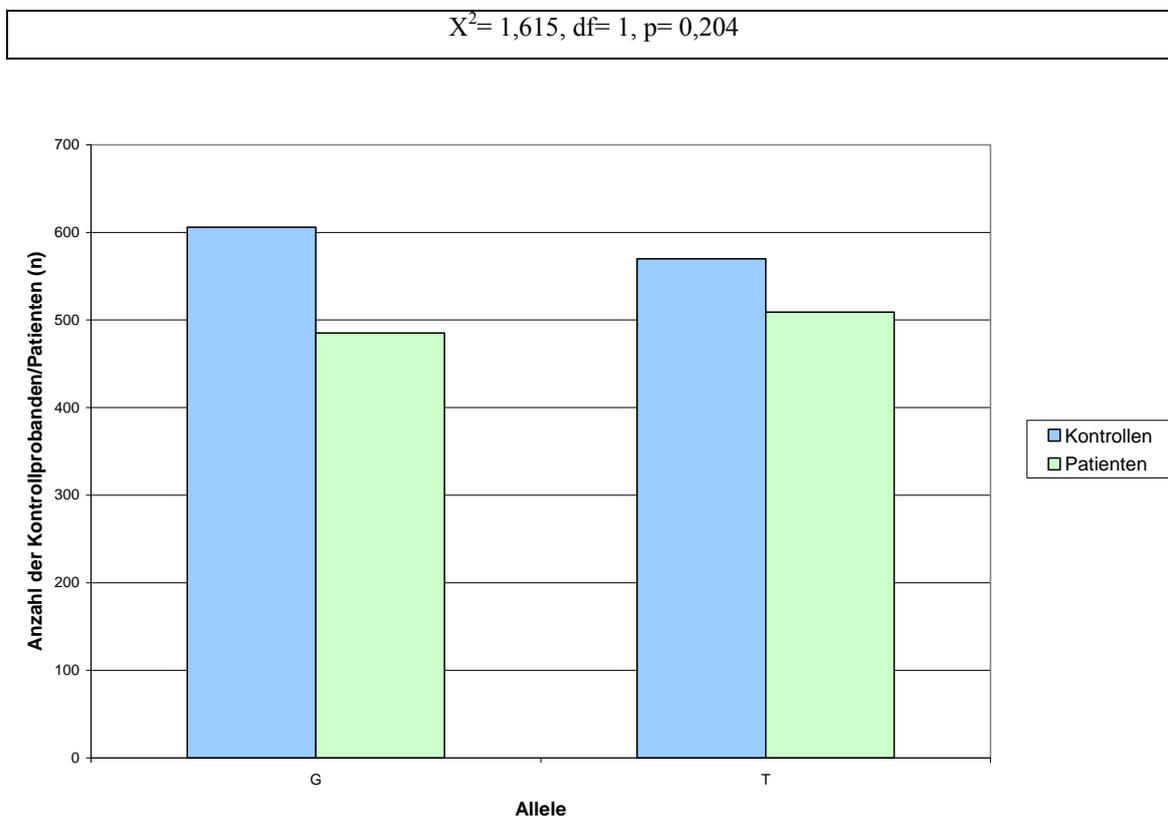


Abbildung 4.3: Graphische Darstellung der Allelhäufigkeiten des SNP rs1806195 in der Patienten- und Kontrollgruppe

4.2.2 Genotypenverteilungen

In der Analyse der Kontroll- und Patientengruppe waren die Genotypen des Markers rs1806195 innerhalb des Hardy-Weinberg-Gleichgewichts verteilt.

Gruppe Kontrollen	Gruppe Patienten
$\chi^2 = 1,027, df = 2, p = 0,598$	$\chi^2 = 3,018, df = 2, p = 0,221$

Tabelle 4.4 zeigt die Genotypenfrequenzen in den beiden Gruppen.

Tabelle 4.4: Darstellung der Genotypenverteilung des Polymorphismus rs1806195

	Genotyp G/G n (%)	Genotyp G/T n (%)	Genotyp T/T n (%)	Gesamt n (%)
Kontrollen	150 (25,5)	306 (52,0)	132 (22,4)	588 (100,0)
Patienten	128 (25,8)	229 (46,1)	140 (28,2)	497 (100,0)
Gesamt	278 (25,6)	535 (49,3)	272 (25,1)	1085 (100,0)

Hierbei war ein Trend zur Signifikanz in den Genotypfrequenzen zwischen den beiden untersuchten Gruppen erkennbar. Die Patienten wiesen häufig den Genotyp T/T auf.

$$X^2 = 5,465, df = 2, p = 0,065$$

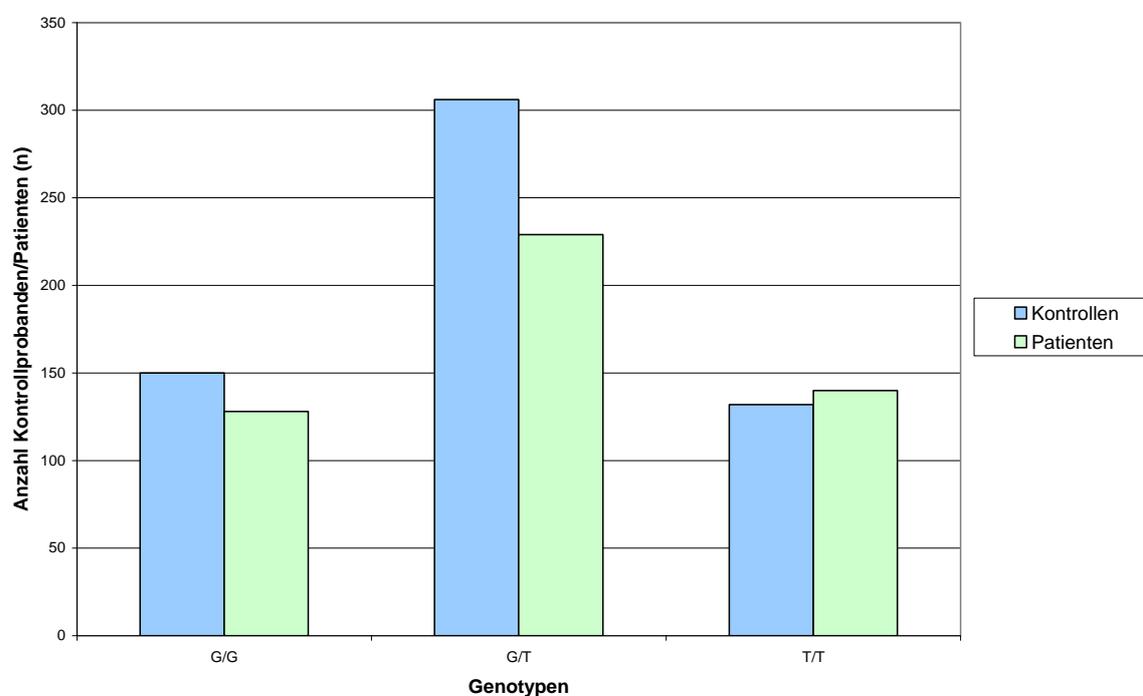


Abbildung 4.4 : Graphische Darstellung der Genotypenverteilung des SNP rs1806195 in der Patienten- und Kontrollgruppe

4.3 Analyse des Markers rs10772693 des GRIN2B-Gens

4.3.1 Allelverteilung

Die Datenauswertung ergibt die in Tabelle 4.5 veranschaulichte Allelverteilung innerhalb der Patienten- und Kontrollgruppe.

Tabelle 4.5: Darstellung der Allelverteilung des Polymorphismus rs10772693

	C-Allel n (%)	T-Allel n (%)	Gesamt n (%)
Kontrollen	1039 (85,6)	175 (14,4)	1214 (100,0)
Patienten	875 (86,8)	133 (13,2)	1008 (100,0)
Gesamt	1914 (86,1)	308 (13,9)	2222 (100,0)

Es bestand kein signifikanter Unterschied in der Allelverteilung zwischen Patienten- und Kontrollgruppe. Nach den absoluten Zahlen zu urteilen, ist das C-Allel gruppenübergreifend verstärkt vorhanden.

$$\chi^2 = 0,687, df = 1, p = 0,407$$

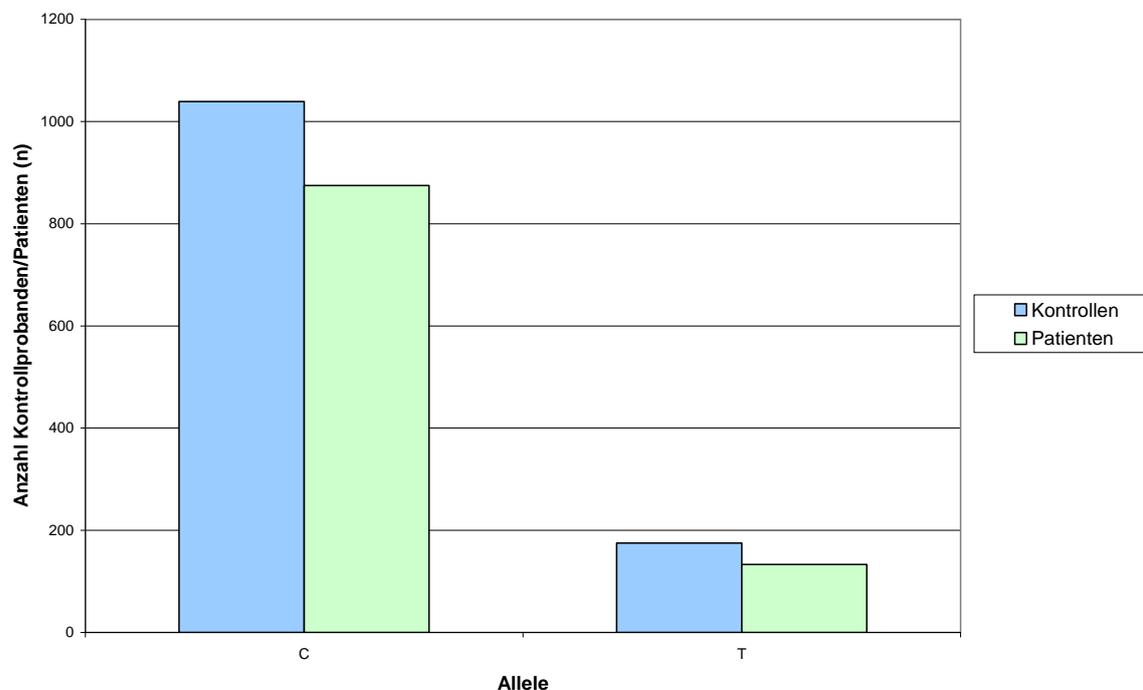


Abbildung 4.5 : Graphische Darstellung der Allelhäufigkeiten des SNP rs10772693 in der Patienten- und Kontrollgruppe

4.3.2 Genotypenverteilungen

In der Kontroll- und Patientengruppe waren die Genotypen des Polymorphismus rs10772693 innerhalb des Hardy-Weinberg-Gleichgewichts verteilt.

Gruppe Kontrollen $\chi^2 = 0,014$, df= 2, p= 0,993	Gruppe Patienten $\chi^2 = 0,000$, df= 2, p= 1
--	---

Die Genotypenverteilungen in der Kontroll- und Patientengruppe sind aus Tabelle 4.6 ersichtlich.

Tabelle 4.6: Darstellung der Genotypenverteilung des Polymorphismus rs10772693

	Genotyp C/C n (%)	Genotyp C/T n (%)	Genotyp T/T n (%)	Gesamt n (%)
Kontrollen	445 (73,3)	149 (24,5)	13 (2,1)	607 (100,0)
Patienten	380 (75,4)	115 (22,8)	9 (1,8)	504 (100,0)
Gesamt	825 (74,3)	264 (23,8)	22 (2,0)	1111 (100,0)

Die Genotypenfrequenzen wiesen zwischen Kontroll- und Patientengruppe keinen signifikanten Unterschied auf.

$$X^2 = 0,684, \text{ df} = 2, \text{ p} = 0,710$$

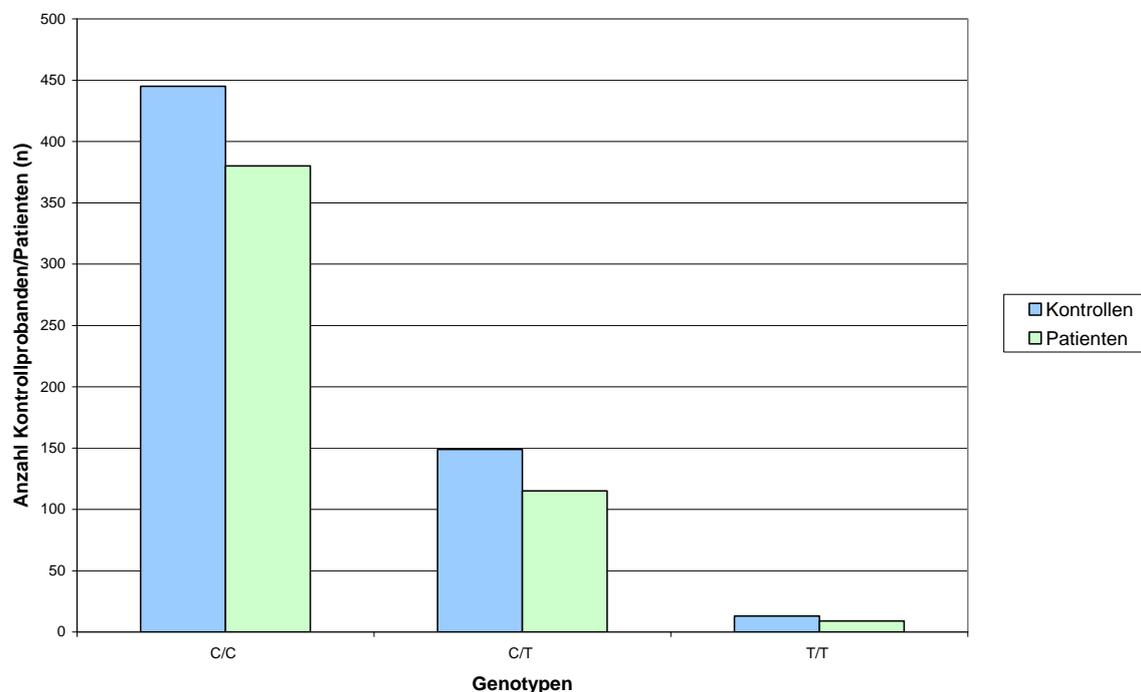


Abbildung 4.6: Graphische Darstellung der Genotypenverteilung des SNP rs10772693 in der Patienten- und Kontrollgruppe

4.4 Analyse des Markers rs3026167 des GRIN2B-Gens

4.4.1 Allelverteilung

Aus Tabelle 4.7 ergibt sich die Allelverteilung innerhalb der Patienten- und Kontrollgruppe.

Tabelle 4.7: Darstellung der Allelverteilung des Polymorphismus rs3026167

	A-Allel n (%)	G-Allel n (%)	Gesamt n (%)
Kontrollen	307 (25,0)	919 (75,0)	1226 (100,0)
Patienten	251 (24,7)	767 (75,3)	1018 (100,0)
Gesamt	558 (24,9)	1686 (75,1)	2244 (100,0)

Es fand sich kein signifikanter Unterschied in der Allelverteilung zwischen Patienten- und Kontrollgruppe, bei einer gruppenübergreifenden Dominanz des G-Allels.

$$\chi^2 = 0,044, df = 1, p = 0,834$$

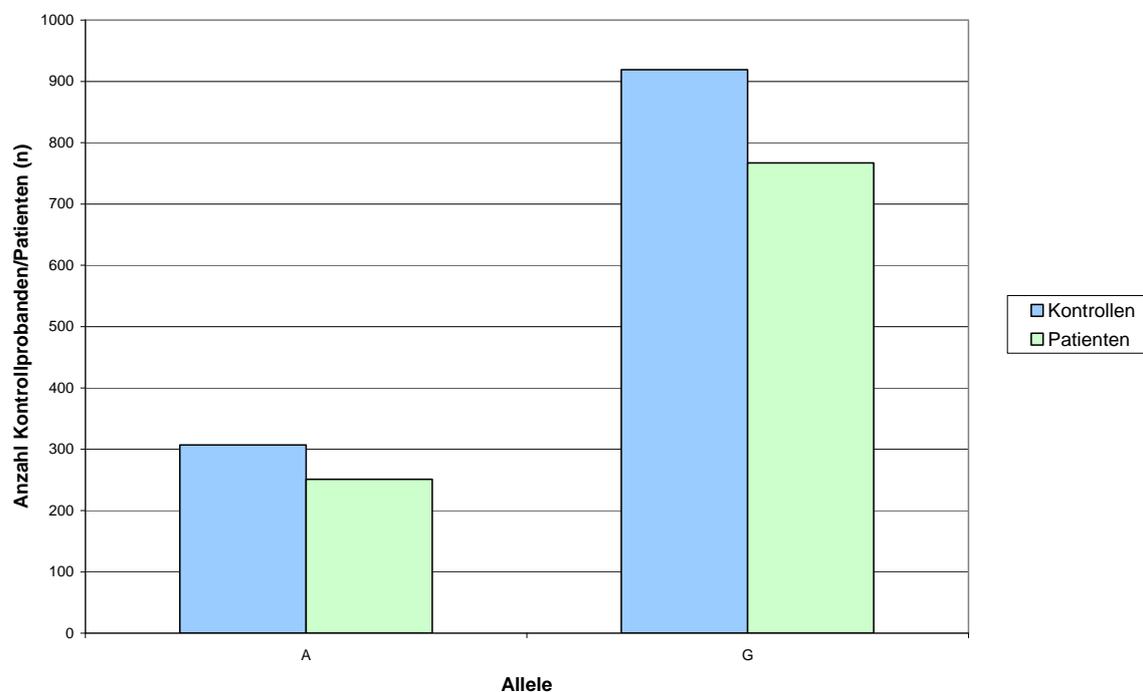


Abbildung 4.7: Graphische Darstellung der Allelhäufigkeit des SNP rs3026167 in der Patienten- und Kontrollgruppe

4.4.2 Genotypenverteilungen

In der Analyse der Kontroll- und Patientengruppe waren die Genotypen des Polymorphismus rs3026167 innerhalb des Hardy-Weinberg-Gleichgewichts verteilt.

Gruppe Kontrollen	Gruppe Patienten
$\chi^2 = 1,436$, df= 2, p= 0,488	$\chi^2 = 0,207$, df= 2, p= 0,902

Die Genotypenverteilungen in den beiden Gruppen zeigt Tabelle 4.8.

Tabelle 4.8: Darstellung der Genotypenverteilung des Polymorphismus rs3026167

	Genotyp A/A n (%)	Genotyp A/G n (%)	Genotyp G/G n (%)	Gesamt n (%)
Kontrollen	44 (7,2)	219 (35,7)	350 (57,1)	613 (100,0)
Patienten	29 (5,7)	193 (37,9)	287 (56,4)	509 (100,0)
Gesamt	73 (6,5)	412 (36,7)	637 (56,8)	1122 (100,0)

Die Frequenzen der Genotypen zeigen keine signifikanten Gruppenunterschiede.

$$X^2 = 1,325, df = 2, p = 0,516$$

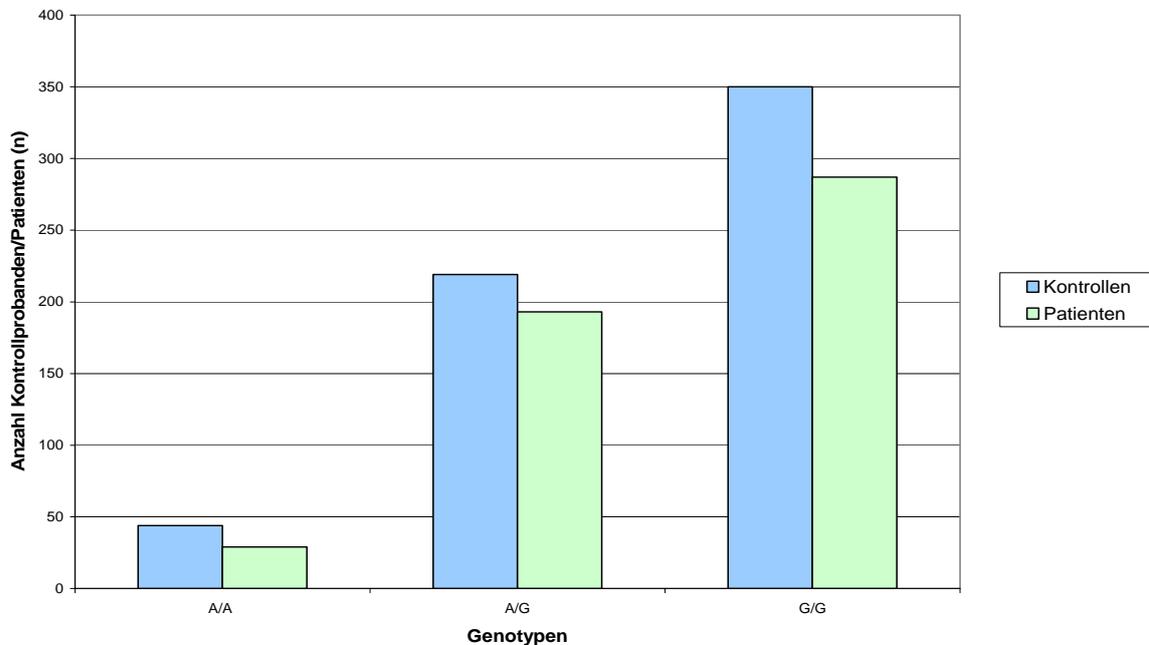


Abbildung 4.8: Graphische Darstellung der Genotypenverteilung des SNP rs3026167 in der Patienten- und Kontrollgruppe

4.5 Übersicht der vier untersuchten SNPs des GRIN2B-Gens

Die folgende Tabelle 4.9 veranschaulicht die Allel- und Genotypenverteilung der vier untersuchten Polymorphismen (rs10772692, rs1806195, rs10772693, rs3026167) des GRIN2B-Gens. Bei dem Polymorphismus rs10772692 zeigte sich bei der Allelverteilung ein Trend ($p=0,098$) mit größerer Häufigkeit des C-Allels bei an Schizophrenie erkrankten Personen. Beim Polymorphismus rs1806195 bestand kein signifikanter Unterschied in der Allelverteilung zwischen den Kontrollprobanden und der Patientengruppe, wobei ein Trend zur Signifikanz in den Genotypfrequenzen zwischen den beiden untersuchten Gruppen erkennbar war. Bei den übrigen untersuchten Polymorphismen (rs10772693 und rs3026167) zeigten sich keine Assoziationen.

Tabelle 4.9 Zusammenfassung der untersuchten Polymorphismen

SNP	Allelverteilung	Genotypverteilung
rs10772692	$p=0,098$	$P=0,186$
rs1806195	$P=0,204$	$P=0,065$
rs10772693	$P=0,407$	$P=0,710$
rs3026167	$P=0,834$	$P=0,516$

5. Diskussion

Zahlreiche Studien (u.a. Hong et al. 2001, Ohtsuki et al. 2001, Williams et al. 2002) haben in den letzten Jahren eine Assoziation des GRIN2B-Gens mit dem Auftreten einer Schizophrenie untersucht und sind hierbei zu unterschiedlichen Ergebnissen gekommen. Das Ziel dieser Arbeit war es, eine vorliegende Assoziation zwischen vier Polymorphismen (rs10772692, rs1806195, rs10772693, rs3026167) des GRIN2B-Gens und der Schizophrenie festzustellen.

Im Folgenden sollen die im Rahmen dieser Doktorarbeit gefundenen Ergebnisse vor dem Hintergrund der bisher durchgeführten Studien erörtert werden. Anhand der Untersuchungsergebnisse lassen sich folgende Aussagen treffen:

Bei dem Polymorphismus rs10772692 zeigte sich bei der Allelverteilung ein Trend ($p=0,098$) mit größerer Häufigkeit des C-Allels bei an Schizophrenie erkrankten Personen.

Beim Polymorphismus rs1806195 fand sich zwar kein signifikanter Unterschied in der Allelverteilung zwischen den Kontrollprobanden und der Patientengruppe, jedoch war ein Trend zur Signifikanz in den Genotypfrequenzen zwischen den beiden untersuchten Gruppen erkennbar.

Keinerlei signifikante Unterschiede konnten bei den Polymorphismen rs10772693 und rs3026167 festgestellt werden.

5.1 Diskussion der Methoden

Bei der vorliegenden Arbeit handelt es sich um eine Assoziationsstudie, bei der das Fall-Kontroll-Design zur Anwendung kommt. Hiermit ist eine Identifizierung von Regionen auf dem Genom mit einem geringen Einfluss auf die Erkrankung möglich. Die Lokalisation beruht auf der Detektion von Krankheitsassoziation mit bestimmten Einzelnukleotid Polymorphismen (Maier et al. 1999, Owen 2000).

Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurden Fallzahlen von 611 gesunden Personen und 511 an Schizophrenie erkrankten Probanden verwirklicht. Bei den bisher durchgeführten Studien zum GRIN2B-Gen wurden solche Größenordnungen nicht erreicht. Die im Jahr 2000 von Nishiguchi veröffentlichte Studie untersuchte 164 an Schizophrenie erkrankte Personen und 171 Kontrollprobanden. Die in den folgenden Jahren durchgeführten Studien bewegten sich in einem Spektrum von 100 bis 268 untersuchten Patienten mit entsprechenden Anzahlen an Kontrollprobanden. Im Vergleich zu diesen anderen Studien liegt die Probanden-/Patientenanzahl in dieser Doktorarbeit weit oberhalb der dort realisierten Fallzahlen und sollte damit eine höhere Aussagekraft für eine begrenzte Population aufweisen.

Ethnische Abstammung

Neben einer ausreichenden Gruppengröße ist eine vergleichbare Ethnizität wichtig für die Aussagekraft einer Studie. Menschen unterschiedlicher Ethnizität zeigen hinsichtlich der Allelausprägung an polymorphen Loci deutliche Differenzen. Diese Theorie lässt sich u.a. durch die beiden unabhängig voneinander durchgeführten Studien von Ohtsuki et al. 2001 an einer japanischen Population und der Studie von Williams et al. 2002 an einer kaukasischen Population belegen. Hier wurde eine abweichende Allelverteilung bei der Untersuchung des Polymorphismus 366C/G des GRIN2B-Gens festgestellt (Ohtsuki et al. 2001, Williams et al. 2002).

Bei einem Vergleich unterschiedlicher Ethnizitäten innerhalb einer Studie können sich aufgrund unterschiedlicher Häufigkeiten der untersuchten Merkmale in den einzelnen Gruppen Verzerrungen bzw. falsch-positive und falsch-negative Ergebnisse ergeben (Maier et al. 1999, Owen 2000). Resultate von Teilnehmern heterogener ethnischer Abstammung sind ebenfalls kritisch zu bewerten, da aus einer Populationsstratifikation unterschiedlich falsch-positive und falsch-negative Ergebnisse resultieren können (Lander und Schorck 1994). Diese Einschränkung trifft auf die kanadische Studie von Martucci et al. (2006) zu, in der Probanden unterschiedlicher ethnischer Herkunft untersucht wurden (95% waren hierbei kaukasischer Abstammung). Hier wurde ein gehäuftes Vorkommen des G-Allels bei dem Polymorphismus T-200G festgestellt. Bei Untersuchungen derselben Polymorphismen durch Di Maria et al. (2004) wurde bei Kaukasiern ein gehäuftes Vorliegen des C-Allels und bei Ohtsuki et al. (2001) des G-Allels in der Kontrollgruppe

bei Asiaten (Ohtsuki et al 2001) aufgezeigt, was zu einer Hinterfragung der Studienergebnisse von Martucci führen könnte.

In unserer Studie wurde in besonderem Maße, unter Berücksichtigung der Ein- und Ausschlusskriterien, auf genetische Homogenität geachtet. Somit wurden ausschließlich Personen kaukasischer Herkunft rekrutiert, um eine verlässliche Aussagekraft der untersuchten SNPs in Bezug auf die Ethnizität zu gewährleisten.

Durch das Internationale HapMap Project (HapMap 2011) konnten bei der Ausprägung der einzelnen Genotypen zahlreiche ethnische Differenzen festgestellt und katalogisiert werden. Bei Betrachtung dieser Daten wird deutlich, wie unterschiedlich die Merkmalshäufigkeiten bei verschiedenen Ethnizitäten sein können (Tab. 5.1).

Tabelle 5.1 Genotyp und Allelfrequenzen der untersuchten Polymorphismen (rs10772692, rs1806195, rs10772693, rs3026167) in der Patienten- und Kontrollgruppe im Kontext der International HapMap (HapMap2011) (Fortsetzung auf der nächsten Seite)

P = Patientengruppe
K = Kontrollgruppe
E = Europäer (Bewohner von Utah, nord- und westeuropäischer Herkunft)
C = Han Chinesen (Peking)
J = Japaner (Tokyo)
A = Afrikaner (Nigeria)

	Genotyp	Frequenz in %	Genotyp	Frequenz in %	Genotyp	Frequenz in %	Allel	Frequenz in %	Allel	Frequenz in %
rs10772692										
P	A/A	20,4	A/C	47,9	C/C	31,7	A	44,4	C	55,6
K	A/A	22,5	A/C	50,8	C/C	26,7	A	47,9	C	52,1
E	A/A	19,0	A/C	44,8	C/C	36,2	A	41,4	C	58,6
C	A/A	50,0	A/C	43,2	C/C	6,8	A	75,6	C	24,4
J	A/A	57,8	A/C	35,6	C/C	6,7	A	75,6	C	24,4
A	A/A	81,7	A/C	18,3	C/C	0	A	90,8	C	9,2

	Genotyp	Frequenz in %	Genotyp	Frequenz in %	Genotyp	Frequenz in %	Allel	Frequenz in %	Allel	Frequenz in %
rs1806195										
P	T/T	25,8	G/T	46,1	G/G	28,2	T	51,2	G	48,8
K	T/T	25,5	G/T	52,0	G/G	22,4	T	48,5	G	51,5
E	T/T	35,0	G/T	36,7	G/G	28,3	T	53,3	G	46,7
C	T/T	0	G/T	8,9	G/G	91,1	T	4,4	G	95,6
J	T/T	0	G/T	2,2	G/G	97,8	T	1,1	G	98,9
A	T/T	25,0	G/T	53,3	G/G	21,7	T	51,7	G	48,3
rs10772693										
P	T/T	1,8	C/T	22,8	C/C	75,4	T	13,2	C	86,8
K	T/T	2,1	C/T	24,5	C/C	73,3	T	14,4	C	85,6
E	T/T	1,8	C/T	22,8	C/C	75,4	T	13,2	C	86,8
C	T/T	9,1	C/T	59,1	C/C	31,8	T	38,6	C	61,4
J	T/T	16,3	C/T	51,2	C/C	32,6	T	41,9	C	58,1
A	T/T	33,3	C/T	46,7	C/C	20,0	T	56,7	C	43,3
rs3026167										
P	A/A	5,7	A/G	37,9	G/G	56,4	A	24,7	G	75,3
K	A/A	7,2	A/G	35,7	G/G	57,1	A	25,0	G	75,0
E	A/A	57,9	A/G	36,8	G/G	5,3	A	76,3	G	23,7
C	A/A	72,2	A/G	22,2	G/G	5,6	A	83,3	G	16,7
J	A/A	74,4	A/G	25,6	G/G	0	A	87,2	G	12,8
A	A/A	41,7	A/G	40,0	G/G	18,3	A	61,7	G	38,3

Alter der Studienteilnehmer

Auch das Alter der Studienteilnehmer kann zu einer Verfälschung der Ergebnisse führen. Um dem entgegenzuwirken und etwaige Störgrößen zu eliminieren, sollten das Alter der Kontrollprobanden und des Patientenkollektivs annähernd gleich sein. Dies ist besonders bei einem Durchschnittsalter der Kontrollprobanden unterhalb des typischen Erkrankungsbeginns der Schizophrenie, der zwischen dem 22. und 32. Lebensjahr liegt (Häfner et al. 1999) entscheidend, da hier eine Manifestation der Erkrankung im weiteren

Verlauf nicht gänzlich ausgeschlossen werden kann. Hierdurch können vor allem bei genetischen Untersuchungen falsch-negative Ergebnisse beim Vergleich der Kontrollprobanden mit dem Patientenkollektiv resultieren.

In dieser Arbeit lag das Durchschnittsalter des Probandenkollektivs mit 45.26 Jahren sowie der Patienten mit 37.86 Jahren oberhalb des 32. Lebensjahres und damit über dem Prädilektionsalter der Schizophrenie. Damit kann zwar eine späte Manifestation nicht ausgeschlossen werden, das Risiko für fehlerhafte Ergebnisse bei der Auswertung der Daten mit falsch-negativen Ergebnissen kann allerdings minimiert werden.

Diagnosestellung mittels Rekrutierungsverfahren und Einschlusskriterien

Von großer Bedeutung für die Vergleichbarkeit der verschiedenen Studienergebnisse ist eine enge Diagnosestellung bei der Rekrutierung des Patientenkollektivs. Die wichtigsten Gütekriterien einer empirischen Studie stellen hierbei Objektivität, Reliabilität und Validität dar. Durch die Diagnosesysteme ICD-10 und DSM-IV wird zu einer Verbesserung der Objektivität und Reliabilität beigetragen, die zur Diagnosefindung bei fehlenden pathognomonischen Indizien oder messbaren Laborwerten einen wichtigen Beitrag leisten. Die Diagnose beruht allerdings mitunter auf der subjektiven Einschätzung des jeweiligen Untersuchers. Bei einer weiten Auslegung des Schizophreniebegriffes sind mindestens 15% bis 20% der diagnostizierten Psychosen den schizoaffectiven Störungen zuzurechnen (Marneros et al. 1991).

Bei der Auswahl der Probanden kam in unserer Studie der standardisierte Leitfaden für DSM-IV (SKID) zur Anwendung, mit dessen Hilfe die Einschlussdiagnose (Schizophrenie) gestellt wurde. Dabei fanden unter anderem Schilderungen des Patienten zu seinem Befinden, Verhaltensbeobachtungen durch den Untersucher, aber auch evtl. vorliegende Arztbriefe Berücksichtigung. Die Zusammenarbeit zwischen dem Untersucher und dem Patienten erfolgte auf einer vertrauensvollen Ebene, geprägt durch Offenheit und wahrheitsgemäßen Angaben zur Krankengeschichte, soweit diese noch erinnerlich war. Ein detailliertes Interview ist somit sehr wichtig zur Diagnosestellung, kann allerdings mitunter bei unkorrekten und/oder fehlenden Angaben zu einer falschen Diagnose führen. Zudem ist der Untersucher bei einigen Abschnitten des SKIDs angehalten, das Vorliegen bestimmter Symptome nach eigenem Ermessen einzuschätzen. Hierbei kann es zu

Schwierigkeiten bei der Objektivierung eines Symptoms kommen, besonders bei einem fließenden Übergang vom gesunden ins krankhafte Verhalten (z.B. bei der Beurteilung der Affektivität) und bei fehlenden eindeutigen Definitionen der Befunde. Bei Bereichen mit unscharfen Grenzen (z.B. bei der Einschätzung der Konzentrationsfähigkeit des Probanden) kann dies zu abweichenden Diagnosen bei unterschiedlichen Untersuchern führen. Demnach sollte bei der Einbeziehung von Arztbriefen in die Diagnosefindung immer deren subjektiver Charakter berücksichtigt werden. Auch durch eine zusätzliche Anwendung des PANSS (Kay et al. 1987) sollte im Patientenkollektiv die Diagnose einer Schizophrenie erhärtet werden bzw. andere Störungen des schizophrenen Formenkreises ausgeschlossen werden.

Schizophrenie als multifaktorielle Erkrankung

Bei der Rekrutierung der Kontrollprobanden wurde eine anfänglich gestellte negative Anamnese bezüglich psychiatrischer und/oder neurologischer Erkrankungen im weiteren Verlauf noch mittels zusätzlicher Interviews/Fragebögen, wie beispielsweise mit dem SKID, abgeklärt. Somit konnte eine maximal „gesunde“ Kontrollgruppe selektiert werden. Als Nachteil dieser strengen Auswahlmethode ist der große zeitliche Aufwand, sowohl für die Studienteilnehmer, als auch für die Rekrutierenden, zu sehen. Dies gilt insbesondere bei der Realisierung hoher Fallzahlen. Ein klarer Vorteil dieser aufwendigen Rekrutierung stellt die daraus resultierende Kontrollgruppe mit wenig fehlerhaften Einschlüssen dar.

Durch verschiedene klinische Diagnoseverfahren und Einschlusskriterien kann unter Umständen eine Beeinflussung der Assoziationsergebnisse resultieren. Allgemein ist davon auszugehen, dass es sich bei der Schizophrenie nicht um eine einzelne Erkrankung, sondern um eine Mischung verschiedener, miteinander verwandter Störungen handelt (Stefansson et al. 2004). Daher sollte die Einschlussdiagnose zur Sicherstellung einer gemeinsamen genetischen Grundlage besondere Berücksichtigung finden. Häufig werden allerdings bei Assoziationsstudien zur Schizophrenie auch Patienten mit Erkrankungen des schizophrenen Formenkreises mit eingeschlossen (Goldberg et al. 2006, van den Bogaert et al. 2003). Dies erleichtert die Rekrutierung hoher Patientenzahlen, wenngleich wenig differenzierte Ergebnisse zu erwarten sind. In der von Hong et al. (2001) veröffentlichten Studie wurden neben schizophrenen Patienten zusätzlich noch Personen mit bipolarer

Störung untersucht. Auch Martucci et al. (2006) untersucht die Assoziation von drei genetischen Polymorphismen des GRIN2B-Gens bei Schizophrenen, Personen mit bipolarer Störung und bei Personen mit einer bipolaren Störung und gleichzeitigem Auftreten von psychotischen Symptomen. Letztendlich konnte hierbei eine Assoziation zwischen dem G-200T Marker und der Schizophrenie, dem T5998C Marker und einer bipolaren Störung sowie dem A5806C Marker und einer schizoaffektiven Störung festgestellt werden. Dies lässt vermuten, dass schizophrene, schizoaffektive und bipolar erkrankte Personen in der Genregion von GRIN2B einen gemeinsamen Vulnerabilitätsmarker aufweisen.

Nach dem derzeitigen Wissensstand handelt es sich bei der Schizophrenie um eine multifaktorielle Erkrankung, deren Phänotyp durch verschiedene pathophysiologische Mechanismen hervorgerufen werden kann. Von einigen Forschern wird sie als eine heterogene Störung bezeichnet, mit Unterteilung in einzelne Subtypen. Andere Wissenschaftler vertreten wiederum die Auffassung, dass schizophrenieartige Störungen zu einem breiten Spektrum schizoider Störungen zusammengefasst werden sollten (McGue und Gottesman 1989). Als Begründung hierfür wird die Auswirkung einer einzelnen Mutation auf ein Kontinuum von Symptomen in verschiedenen Schweregraden angeführt. So lässt sich beispielsweise das Symptom der „formalen Denkstörung“ mit Aufmerksamkeitsproblemen bis hin zu Denkzerfahrenheit beschreiben. Die unterschiedlich starke Ausprägung der Symptome kann dabei nicht nur durch die Aktivierung verschiedener mutierter Gene oder Allelvarianten bestimmt werden, sondern auch durch Umweltfaktoren und/oder epigenetische Faktoren beeinflusst werden. Auch das interindividuelle Ansprechen auf Psychopharmaka könnte wiederum für das Vorliegen verschiedenster Krankheitsmechanismen auf genetischer Ebene sprechen. Unter Berücksichtigung dieser unterschiedlichen Erkenntnisse wird leicht verständlich, dass es diverse widersprüchliche Studien zur Schizophrenie gibt.

Generell wird die Interpretation positiver und negativer Assoziationen zur Schizophrenie durch die Heterogenität der Erkrankung erschwert. In dieser Arbeit wurden die Kontrollprobanden und die Patienten stufenweise rekrutiert und bis zum endgültigen Einschluss in die Studie mehrfach und sehr ausführlich mittels Fragebögen zu bestimmten

Themenbereichen, wie beispielsweise Krankengeschichte, Familienanamnese, Herkunft o.ä., befragt.

Abweichende Studienergebnisse bei den zahlreichen zur Schizophrenie durchgeführten Studien könnten somit auf unterschiedliche, auf die einzelnen Populationen einwirkende Umweltfaktoren und Mutationen in unterschiedlichen Genen, die zum Auftreten verschiedenster Symptome führen, zurückgeführt werden. Auch eine Locus-Heterogenität, d.h. auch beim Auftreten gleicher Symptome könnte der Vulnerabilitätsmarker dennoch in unterschiedlichen Genen vorhanden sein und eine Allel-Heterogenität, d.h. bei verschiedenen Mutationen im gleichen Gen können die gleichen Symptome resultieren, könnten die unterschiedlichen Resultate der einzelnen Studien erklären. Diese schlossen zwar, soweit erkennbar, weitestgehend Patienten mit ähnlichen Symptomen ein, gelangten allerdings zu unterschiedlichen, ursächlichen Veränderungen im GRIN2B-Gen. Demnach wäre eine Kombination von Studien zu Sequenzvariationen, wie in unserer Studie erfolgt, mit Untersuchungen zu epigenetischen Faktoren ein für die Zukunft durchaus weiter verfolgbarer Ansatz in der genetischen Forschung.

5.2 Diskussion der Ergebnisse

Die Hypothese einer Beteiligung des GRIN2B-Gens an der Pathogenese der Schizophrenie stützt sich u.a. auf pharmakologische- und Tiermodelle der Schizophrenie (Rujescu et al. 2008). Zudem wurden in der Vergangenheit Studien zu Einzelmarkern des GRIN2B-Gens durchgeführt, die teilweise zu positiven (Hong et al. 2001, Miyatake et al. 2002), aber auch zu negativen (Nishiguchi et al. 2000, Williams et al. 2002) oder widersprüchlichen Ergebnissen (Ohtsuki et al. 2001, Di Maria et al. 2004) führten. Bei der statistischen Auswertung des Polymorphismus rs10772692 zeigt sich bei der Allelverteilung ein Trend mit einem gehäuften Auftreten des C-Allels bei an Schizophrenie erkrankten Personen. Der Polymorphismus rs10772692 könnte demnach an der Entstehung der Schizophrenie beteiligt sein. Für die Zukunft sollten in diese Richtung, z.B. zur Verifizierung der festgestellten Tendenz, weitere Untersuchungen durchgeführt werden.

Eine Betrachtung der Ergebnisse des Polymorphismus rs1806195 zeigt keine signifikanten Unterschiede in der Allelverteilung zwischen den Kontrollprobanden und den Patienten, wobei ein Trend zur Signifikanz in den Genotypenfrequenzen zwischen den beiden untersuchten Gruppen erkennbar war: Bei einem Vergleich der homozygoten T-Allelträger mit den C-Allelträgern zeigt sich bei den an Schizophrenie erkrankten Personen ein leichtes Überwiegen des T-Allels. Unter Berücksichtigung der bei Schizophrenen vermehrt vorkommenden Genotypen G/T und T/T im Vergleich zu den Kontrollprobanden, könnten diese Ergebnisse auf einen Zusammenhang des Polymorphismus rs1806195 hindeuten. Somit scheint dieser Polymorphismus ein interessanter Ansatzpunkt für weitere Untersuchungen zu sein. Bei den weiterhin untersuchten Polymorphismen rs10772693 und rs3026167 wurden keine signifikanten Unterschiede gefunden.

Die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Polymorphismen wurden bis zum jetzigen Zeitpunkt wenig bzw. gar nicht erforscht, wobei besonders die Ergebnisse zu den Polymorphismen rs10772692 und rs1806195 weitere Fragen aufwerfen.

Somit sind das GRIN2B-Gen bzw. dessen Polymorphismen, auch unter Berücksichtigung von in der Vergangenheit durchgeführter Studien, ein interessanter Ansatzpunkt zur weiteren Schizophrenieforschung.

In der von Ohtsuki et al. (2001) durchgeführten Fall-Kontroll-Studie konnte eine statistische Signifikanz für die Polymorphismen der 3'-Region des letzten Exons bei an Schizophrenie erkrankten Personen festgestellt werden ($p= 0.004$). Zusätzlich konnte ein gehäuftes Vorkommen des G-Allels des 366C/G Polymorphismus ($p= 0.04$) dargestellt werden. Durch Williams et al. (2002) konnte die von Ohtsuki postulierte Assoziation zu dem 122C>G Polymorphismus des GRIN2B-Gens nicht bestätigt werden.

Di Maria et al. konnten 2004 in einer Fall-Kontroll-Studie eine geringe Signifikanz für den in der 3'UTR-Region gelegenen Polymorphismus T-200G ($p= 0.04$) belegen. Dieser Polymorphismus konnte bereits 2002 von Miyatake et al. in einer ebenfalls durchgeführten Fall-Kontrollstudie aufgezeigt werden. Die Häufigkeit des Auftretens des G-Allels war hierbei im Patientenkollektiv im Vergleich zu den Kontrollprobanden signifikant erhöht

($p= 0.0164$). Auch Martucci et al. beschrieben 2006 eine Assoziation zwischen dem Polymorphismus G-200T (5'UTR) und der Schizophrenie ($p= 0.002$). Zudem konnten sie noch eine Assoziation zwischen dem Polymorphismus T5998C und einer bipolaren Störung ($p= 0.02$) sowie dem Polymorphismus A5806C und einer bipolaren Störung mit psychotischen Symptomen feststellen ($p= 0.0038$).

Chiu et al. (2003) konnten in seiner Assoziationsanalyse der Polymorphismen 366C/G und 2664C/T keine Unterschiede in der Genotypenverteilung feststellen, wobei die Patienten mit einem 2664C/C Genotyp im Vergleich zu den Genotypen 2664C/T und 2664T/T eine höhere Clozapindosis aufwiesen. Qin et al. untersuchten 2006 in einer Assoziationsanalyse 16 bekannte SNPs auf der NMDA-Rezeptor Untereinheit NR1 und NR2B. Bei den niederfrequenten Haplotypen CCT (das C-Allel von C2664T, das C-Allel von T4197C und das T-Allel von T5998C) und bei der Verteilung der gesamten Haplotypen des GRIN2B-Gens (G366C, C2664T, C3538T, T4197C und T5988C) konnte eine Assoziation mit der Schizophrenie festgestellt werden, neben einer Interaktion zwischen dem G19001C Polymorphismus des GRIN1-Gens und den T4197C und T5988C Polymorphismen des GRIN2B-Gens. Im Gegensatz dazu fanden Nishiguchi et al. in ihrer Studie im Jahr 2000 bei der Untersuchung der Assoziation zwischen der Schizophrenie und dem 2664C/T Polymorphismus des GRIN2B-Gens keine Signifikanz. Auch Hong et al. konnten 2001 bei der Untersuchung des Polymorphismus 2664 mit ihren drei Genotypen 2664C/C, 2664C/T und 2664T/T keine Beeinflussung der Clozapinempfindlichkeit bei Patienten mit Allelvariationen des GRIN2B-Gens aufzeigen, wenngleich ein gewisser Trend einer höheren Clozapindosierung für Patienten mit dem 2664C/T Genotyp aufgezeigt werden konnte.

Bei einer 2007 von Li und He durchgeführten Meta-Analyse zeigte sich für den Polymorphismus T-200G des GRIN2B-Gens ein signifikanter p-Wert von 0.005 bei einer odds ratio von 0.71 (0.56 – 0.9). Auch in der Genotyp-Analyse konnten positive Resultate festgestellt werden, unabhängig davon, ob ein T-Allel oder ein G-Allel kombiniert wurde. Für den Polymorphismus 4197T/C wurde eine schwache Assoziation bei der Genotypen-Analyse mit einem p-Wert von 0.017 (odds ratio 0.47; 0.26 – 0.87) gefunden. Für die anderen drei SNPs konnte keine statistisch signifikante Assoziation bei den Allel- und/oder Genotypanalysen aufgezeigt werden. Die drei codierenden SNPs (2664C/T, 366C/G und

4197T/C) führen zu keiner Veränderung der Aminosäuresequenz, sog. stille Polymorphismen.

Positive Ergebnisse von genetischen Studien hängen entscheidend von der Untersuchung des richtigen Markers ab. Ein negatives Ergebnis in einer Studie in Bezug auf einen bestimmten Marker schließt demnach eine Kopplung oder Assoziation eines anderen Markers in dieser Genregion nicht aus. Ob die in dieser Arbeit als signifikant befundenen Marker eine reliable Assoziation mit der Schizophrenie aufweisen, kann erst nach positiven Replikationen in weiteren Studien abschließend beurteilt werden.

Bei der Schizophrenie handelt es sich nach dem derzeitigen Wissensstand um eine komplexe Erkrankung, bei der eine polygene Übertragung mit mehreren beteiligten Genen angenommen wird, von denen jedes nur einen kleinen Teil zum Erkrankungsrisiko beiträgt (Ebert und Loew 2008, Wobrock et al. 2004). In den letzten Jahren konnte in zahlreichen Kopplungs- und Assoziationsstudien mehrere Vulnerabilitätsgene an verschiedenen Genorten dargestellt werden (Stefansson et al. 2002). Hierbei wurden u.a. für das GRIN1- und das GRIN2-Gen des glutamatergen Systems positive Ergebnisse verzeichnet. Weitere Kandidatengene sind u.a. Neuregulin 1 und Dysbindin. Neuregulin spielt eine wichtige Rolle bei der Expression und Aktivierung von Neurotransmitter-Rezeptoren, wie dem NMDA-Rezeptor (Stefansson et al. 2002). Der Dystrophin-Protein-Komplex, an den das Dysbindin bindet, ist ein Bestandteil des Zytoskeletts und wahrscheinlich auch an der Signaltransduktion des NMDA-Rezeptors beteiligt (Benson et al. 2001). Eine weitere signifikante Assoziation mit der Schizophrenie wurde u.a. für das Prolin-Dehydrogenase-Gen (PRODH) (Willis et al. 2008) und das Catechol-O-Methyltransferase-Gen (COMT) (Norton et al. 2006) festgestellt. Komplettiert werden die Befunde durch Untersuchungen zur Beteiligung des dopaminergen Systems, das eng mit dem glutamatergen System gekoppelt ist und dessen Einfluss auf die Schizophrenie als gesichert gilt (Fallgatter et al. 2010).

Da bislang die Identifikation eines Hauptgenes nicht gelungen ist, scheint es nahe liegend, dass nicht einzelne SNPs, sondern die Interaktion verschiedener Varianten einen Einfluss auf die Entstehung einer Schizophrenie haben könnten. In zahlreichen Gen-Gen Interaktionsstudien konnte bereits eine Wechselwirkung zwischen multiplen Genen bei der

Pathogenese verschiedenster anderer Erkrankungen, wie beispielsweise von Diabetes mellitus Typ II, der Hypertonie und dem Mamma-Karzinom, nachgewiesen werden (Cho et al. 2004, Moore und Williams 2002, Ritchi et al. 2001).

Auch durch die Ergebnisse der Studie von Qin et al. (2005) wurde durch die kombinierten Effekte des GRIN1- und des GRIN2B-Gens auf eine Beteiligung an der Ätiologie der Schizophrenie geschlussfolgert. Dies deutet daraufhin, dass auch für die Entstehung der Schizophrenie Interaktionen zwischen den verschiedenen Vulnerabilitätsgenen verantwortlich sein könnten.

5.3 Ausblick

Die vorliegende Arbeit ergab bei der Allelverteilung des Polymorphismus rs10772692 des GRIN2B-Gens einen Trend mit größerer Häufigkeit des C-Allels bei an Schizophrenie erkrankten Personen. Weiterhin zeigte sich bei dem Polymorphismus rs1806195 in den Genotypenfrequenzen zwischen beiden untersuchten Gruppen ein Trend zur Signifikanz. Wie einige weitere genetische Untersuchungen deutet diese Studie somit auf einen Zusammenhang des GRIN2B-Gens und der Entstehung einer Schizophrenie hin. Wie in Kapitel 1.6 gezeigt, existieren aber auch Studien mit negativen oder inkonsistenten Ergebnissen bezüglich genetischer Kopplung oder Assoziation weiterer Marker des GRIN2B-Gens. Somit kann nicht abschließend beurteilt werden, ob das genannte Gen ein Kandidatengen der Schizophrenie darstellt.

Durch die zentrale Rolle des NMDA-Rezeptors innerhalb des glutamatergen Systems und seiner Beteiligung an der Hirnentwicklung (Javitt et al. 2004), der Neuroplastizität (Schmitt et al. 2010) und bei neurotoxischen Vorgängen (Olney et al. 1991) sind seine Gene auch weiterhin als interessante Suszeptibilitätsgene zu sehen. Der zweifelfreie Nachweis einer Beteiligung des GRIN2B-Gens an der Pathogenese der Schizophrenie sollte von daher das Ziel weiterer Studien sein.

Hierbei ist auf eine ausreichend große Studienpopulation zu achten, um auch statistisch aussagekräftige Ergebnisse bei seltenen Allelen oder Genotypen zu erhalten. Die Untersuchungen sollten mit Studienteilnehmern (Probanden und Patienten) derselben Ethnizität durchgeführt werden, um populationsspezifische Variationen innerhalb der Allel- und Genotypenverteilung zu vermeiden. Auch könnten die einzelnen Ethnizitäten

entsprechend ihrer Herkunft weiter untergliedert werden, um auch eventuell vorliegende geographisch bedingte Unterschiede der großen genetischen Gruppen (z.B. Chinesen, Kaukasier) in den Untersuchungen entsprechend zu berücksichtigen.

Zusätzlich könnten neben dem Einschlusskriterium einer nach ICD-10 und DSM-IV diagnostizierten Schizophrenie auch neurophysiologische und neuropsychologische Kriterien (sog. Endophänotypen) bei der Auswahl der Studienteilnehmer berücksichtigt werden. Während klassische Phänotypen durch Verhaltensmerkmale oder Krankheitsdiagnosen definiert werden, repräsentieren Endophänotypen neurobiologische Krankheitskorrelate (Zobel und Maier 2004). Sie scheinen somit ein näheres Abbild der Wirkung bestimmter Gene darzustellen und könnten hierdurch das Auffinden suszeptibler Gene erleichtern. Durch diese Vorgehensweise lässt sich die Sensitivität und Spezifität der Studienergebnisse möglicherweise erhöhen, da erkrankte Personen zusätzlich einen Endophänotyp aufweisen müssen, andererseits aber auch klinisch gesunde Träger des Endophänotyps in die Beurteilung miteinbezogen werden können.

In den meisten bisher veröffentlichten Referenzstudien wurden nur isolierte SNPs des GRIN2B-Gens untersucht (u.a. Di Maria et al. 2004). Durch die Analyse einzelner SNPs ergibt sich die Möglichkeit, gezielt menschliche Gene und deren Assoziation zu untersuchen, um die Signifikanz genetischer Variationen besser verstehen zu können. Der Einfluss einzelner SNPs ist jedoch quantitativ oft wenig ausgeprägt und wird erst in Wechselwirkung mit anderen SNPs verdeutlicht (Zhao et al. 2006). So sollte die Analyse einzelner SNPs bei in vitro Untersuchungen hinsichtlich ihrer funktionellen Relevanz kritisch betrachtet werden, da durch weitere Polymorphismen im selben Gen eine Beeinflussung der Funktionalität in vivo resultieren könnte. Als Konsequenzen wären zum einen eine additive Wirkung mehrerer SNPs, aber auch das Vorliegen von protektiven Allelen denkbar. Durch eine Analyse von Haplotypen wird dieses Zusammenwirken von möglichen Einzelmarkern innerhalb eines Gens berücksichtigt. Dadurch kann die Aussagekraft über mögliche Interaktionen verbessert oder demaskiert werden. Aus einer getrennten Untersuchung einzelner SNPs könnten demnach kausale Fehlinterpretationen oder unter Umständen sogar eine Nichtreproduzierbarkeit von genetischen Studien

resultieren. Somit sollten in künftigen Studien nicht nur Marker innerhalb eines Gens, sondern auch vermehrt Gen-Gen-Interaktionen näher betrachtet werden.

Als langfristiges Ziel der molekulargenetischen Forschung wäre eine auf den jeweiligen Patienten anpassbare Therapie mit Medikamenten eines gezielten Wirkspektrums zu sehen. Im günstigsten Fall könnte auch eine Einleitung von Präventivmaßnahmen bei Trägern von Risikoallelen bzw. bei bestehender familiärer Vorbelastung das Risiko der Entstehung einer Schizophrenie eingrenzen. Zur Erreichung dieses Ziels ist es notwendig, die funktionellen Auswirkungen von Risikoallelen und Haplotypen auf die Genfunktion und die Eigenschaften der exprimierten Proteine zu entschlüsseln.

Insgesamt bleibt festzustellen, dass die Schizophrenie eine komplexe Erkrankung darstellt, die hinsichtlich ihrer Entstehungsursachen noch weitergehender intensiver Forschung bedarf. Erste Schritte zur Entschlüsselung der genetischen Grundlagen der Schizophrenie sind bereits getan und auch im Hinblick auf die im Rahmen dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse lässt sich für die weitere Zukunft ein positiver Verlauf erwarten.

6. Zusammenfassung

Die Schizophrenie stellt eine der schwerwiegendsten psychiatrischen Erkrankungen dar mit einer Lebenszeitprävalenz von 0.5-1.6%. Sie führt zu einer massiven Beeinträchtigung der Lebensqualität, der Erlebnisfähigkeit und der Kognition der betroffenen Personen. In den letzten Jahren gelang es vermehrt, eine Assoziation der Schizophrenie mit genetischen Risikofaktoren nachzuweisen (Möller et al. 2009). Nach dem derzeitigen Wissensstand wird ein Zusammenhang zwischen der Schizophrenie und einzelnen, auf unterschiedlichen Chromosomen lokalisierten Genen und deren Interaktion mit Umweltfaktoren angenommen. Mit Hilfe von Kopplungsanalysen und Assoziationsstudien konnten bisher zahlreiche Kandidatengene identifiziert werden.

Auf der anderen Seite stellten zahlreiche durchgeführte Studien eine verminderte Expression von glutamatergen Neuronen u.a. im frontoparietotemporalen Cortex und im Hippocampus bei an Schizophrenie erkrankten Personen fest (Schito et al. 1997). Dieses Modell einer Glutamat- und NMDA-Hypofunktion basiert auf genetischen und pharmakologischen Erkenntnissen (Harrison und Owen 2003) und führte neben dem bereits lange Zeit vorliegenden Dopaminmodell zu neuen Diskussionsansätze hinsichtlich der Auslösemechanismen einer Schizophrenie durch Veränderungen im glutamatergen System (Kantrowitz und Javitt 2010).

Das in der vorliegenden Arbeit untersuchte, auf Chromosom 12p13 lokalisierte, GRIN2B-Gen ist eines dieser funktionellen Kandidatengene im glutamatergen System. In mehreren Fallkontrollstudien wurde ein Zusammenhang zwischen Schizophrenie und diesem Risikogen hergestellt (Miyatake et al. 2002, Di Maria et al. 2004, Qin et al. 2005). In einer Studie von Grimwood et al. (1999) konnte zudem eine unregelmäßige Expression der NR2B-Untereinheit im Temporallappen von an Schizophrenie erkrankten Personen nachgewiesen werden.

Das GRIN2B-Gen codiert für eine Untereinheit des NMDA-Rezeptors. Dieser N-Methyl-D-Aspartat-Rezeptor spielt als zentraler Bestandteil des glutamatergen Systems eine entscheidende Rolle bei der neuronalen Entwicklung, der Neurotoxizität sowie bei neuronalen Vorgängen (Monaghan et al. 1989).

In zahlreichen Studien konnte zudem eine pharmakologisch induzierte Hypofunktion des NMDA-Rezeptors mittels nicht-kompetitiver Antagonisten wie PCP und MK-801 belegt werden, die zur Ausbildung von Positiv- und Negativsymptomen bei gesunden Kontrollprobanden führte (Javitt und Zukin 1991). Auf der anderen Seite wurde nach Verabreichung von NMDA-Rezeptor-Agonisten, wie beispielsweise Glyzine und d-Cycloserine, eine Besserung der schizophrenen Symptome festgestellt (Javitt et al. 1994, Goff et al. 1996).

So konnten im Cortex, Thalamus und in zahlreichen weiteren Hirnregionen bei an Schizophrenie erkrankten Personen im Vergleich zu gesunden Kontrollgruppen eine veränderte Konzentration der einzelnen Untereinheiten des NMDA-Rezeptors festgestellt werden.

Diese unterschiedlichen Ergebnisse deuten daraufhin, dass das GRIN2B-Gen an der Entstehung der Schizophrenie beteiligt sein könnte. In der vorliegenden Arbeit wurden vier Basenaustauschpolymorphismen innerhalb des GRIN2B-Gens in einer Fall-Kontroll-Studie mit 511 an Schizophrenie erkrankten Personen und 611 gesunden Kontrollprobanden kaukasischer Abstammung hinsichtlich einer Assoziation zur Schizophrenie hin untersucht.

Bei der Untersuchung von Allel- und Genotypfrequenzen fand sich bei den Polymorphismen rs10772692 und rs1806195 eine Assoziation zur Schizophrenie. Bei den Polymorphismen rs10772693 und rs3026167 zeigten sich keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den beiden untersuchten Gruppen (Patientenkollektiv/Kontrollgruppe).

Somit bedarf es, zu den bereits existierenden Studien, weiterer Untersuchungen in kaukasischen und anderen Ethnizitäten, um zweifelsfrei von einer Beteiligung des GRIN2B-Gens und seiner Polymorphismen bei der Entstehung der Schizophrenie sprechen zu können.

7. Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Erklärung
A	Adenosin
AKT1	v-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1
AMPA	α -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolpropionsäure
ANA1	Anamnesebogen 1
ANA2	Anamnesebogen 2
APOE	Apolipoprotein E
CHRNA7	Neuronal acetylcholine receptor subunit alpha-7
C	Cytosin
CaM Kinase	kalmodulinabhängige Proteinkinase II
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
CATIE-Studie	Clinical Antipsychotic Trials of Intervention Effectiveness
cDNA	complementary Desoxyribonukleinsäure
cM	Centmorgan
COMT	Catechol-O-Methyltransferase
CSF2RA	Colony stimulating factor 2 receptor alpha
D-AP5	Death associated protein 5
DA	Dopamin
DAAO	D-Amino-Acid-Oxidase
DAO	D-Aminosäure Oxidase
DAOA	D-Aminosäure Oxidase Aktivator (G72)
DISC1	Gen disrupted in schizophrenia 1
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DRD	Anti-Dopamin-Rezeptor D
3-HPA	3-Hydroxypicolinsäure
DSM-III-R	Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders
DSM-IV	Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders [4. Edition der American Psychiatric Association (APA)]
DTNBP1	Dysbindin

Abkürzung	Erklärung
DZ	dizygote Zwillingspaare
D2-Rezeptor	Dopamin D2-Rezeptor
EAAT	Excitatory amino acid transporter
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EPSE	Exzitatorisches postsynaptisches Potential
ERBB4	Rezeptor tyrosine-protein kinase erbB-4
FAF	Erfassung von Aggressivitätsfaktoren
FAHM	Family Assessment History Modul
FEZ1	Fasciculation and elongation protein zeta 1 (Zygin I)
FSME	Frühsommer-Meningoenzephalitis
G	Guanin/Guanosin
GABRB2	Gamma-aminobutyric acid (GABA) A receptor, beta 2
GAD1	Glutamatdecarboxylase 1
gDNA	genomic Desoxyribunukleinsäure
Glu	Glutamat
GRIK4	ionotroper Glutamatrezeptor 4
GRM3	metabotroper Glutamatrezeptor 3
H ⁺	Wasserstoff-Ion
HAWIE-R	Hamburger-Wechsler-Intelligenztest für Erwachsene in revidierter Form
HIV	humanes Immundefizienz-Virus
ICD-10	International Classification of Disease der Weltgesundheitsorganisation, Revision 10
iGluR	ionotroper Glutamatrezeptor
mGluR	metabotroper Glutamatrezeptor
ILR3	Iaa-leucine resistant 3
KA1	Kainsäure 1
KA2	Kainsäure 2
kb	Kilobasenpaare
LTP	long-term depression

Abkürzung	Erklärung
LTP	long-term potentiation
MANCOVA	Multiple analysis of covariance
Mg ²⁺	Magnesium
MK-801	NMDA Rezeptorantagonist Dizolcipin
mmol	Millimol
MMPI-2	Minnesota Multiphasic Personality Inventory 2
MMST	Mini-Mental-Status-Test
MOCI	Maudsley Obsessional Compulsive Inventory
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
MRT	Magnetresonanztomographie
MTHFR	Methylentetrahydrofolat-Reduktase
MUTED	Muted homolog (mouse)
MW	Mittelwert
MZ	monozygote Zwillingspaare
n	Probandenzahl
NEO-PI-R	Persönlichkeitsinventar, revidierte Form
ng	Nanogramm
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
NMR	NMR-Spektroskopie
NRG1	Neuregulin 1
NRH-Model	NMDA Rezeptor Hypofunktionsmodell
OR	Odds Ratio
p	Signifikanz, p-Wert, probability
p (Chromosom)	petit, kurzer Arm eines Chromosoms
PANSS	Positiv- und Negativ-Syndrom Skala
PCK	Proteinkinase C
PCP	Phencyclidin
PCR	Polymerasekettenreaktion
pH	Wasserstoff-Ionenkonzentration
PLXNA2	Plexin A2 Antikörper

Abkürzung	Erklärung
PPP3CC	Protein Phosphatase 3-Gen, welches die Calcineurin γ katalytische Untereinheit kodiert
Primer	DNA-Oligonukleotid
PRODH	Prolin Dehydrogenase
PSD	postsynaptische Dichte
q (Chromosom)	queue, langer Arm eines Chromosoms
RGS4	Regulator of G protein 4
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehung pro Minute
SAP	Shrimp alkaline phosphatase
SKID I/II	Strukturiertes Klinisches Interview für DCM-IV Achse I/II
SNP	Einzel (Single) Nukleotid-Polymorphismus
STAXI	State-Trait-Ärgerausdrucksinventar
T	Thymidin
TDT	Transmission Disäquilibrium Test
TE	Tris-EDTA
TM	Transmembrandomäne
TPH	Tryptophanhydroxylase
U	Units
vGluT	vesikulärer Glutamatttransporter
WHO	Weltgesundheitsorganisation
ZN ²⁺	Zink
ZNF804A	Zinc finger protein 804A
ZNS	Zentrales Nervensystem

8. Literaturverzeichnis

Abi-Dargham A, Mawlawi O, Lombardo I, Gil R, Martinez D, Huang Y, Hwang DR, Keilp J, Kochan L, van Heertum R, Gorman JM, Laruelle M. Prefrontal dopamine D1 receptors and working memory in schizophrenia. *J Neurosci* 2002; 22(9): 3708-3719.

Ahmari SE, Buchanan J, Smith SJ. Assembly of presynaptic active zones from cytoplasmic transport packets. *Nat Neurosci* 2000; 3(5): 445-451.

Aleman A, Kahn RS, Selten P-J. Sex Differences in the Risk of Schizophrenia: Evidence from Meta-analysis. *Arch Gen Psychiatry* 2003; 60(6): 565-571.

Allen NC, Bogade S, McQueen MB, Ioannidis JP, Kawoura FK, Khoury MJ, Tanzi RE, Bertram L. Systematic meta-analyses and field synopsis of genetic association studies in schizophrenia: the SZGene database. *Nat Genet* 2008; 40(7): 827-834.

Anson LC, Chen PE, Wyllie DJA, Colquhoun D, Schoepfer R. Identification of amino acid residues of the NR2A subunit that control glutamate potency in recombinant NR1/NR2A NMDA receptors. *J Neurosci* 1998; 18(2): 581-589.

Anson LC, Schoepfer R, Colquhoun, Wyllie DJ. Single-channel analysis of a NMDA receptor possessing a mutation in the region of the glutamate binding site. *J Physiol (Lond)* 2000; 527(Pt2): 225-237.

Aramori I, Nakanishi S. Signal transduction and pharmacological characteristics of a metabotropic glutamate receptor, mGluR1, in transfected CHO cells. *Neuron* 1992; 8(4): 757-765.

Aramori I, Nakanishi S. Signal transduction and pharmacological characteristics of a metabotropic glutamate receptor, mGluR1, in transfected CHO cells. *Neuron* 2001; 8(4): 757-765.

Avenet P, Léonardon J, Besnard F, Graham D, Frost J, Depoortere H, Langer SZ, Scatton B. Antagonist properties of the stereoisomers of ifenprodil at NR1A/NR2A and NR1A/NR2B subtypes of the NMDA receptor expressed in *Xenopus* oocytes. *Eur J Pharmacol* 1996; 296(2): 209-213.

Bading H, Greenberg ME. Stimulation of protein tyrosine phosphorylation by NMDA receptor activation. *Science* 1991; 253(5022): 912-914.

Bäumli J, Pitschel-Walz G, Schaub A. in: Schmauß M (Hrsg.) Schizophrenie – Pathogenese, Diagnostik und Therapie; Bremen 2002: UNI-MED Verlag.

Bailer U, Aschauer H, Kasper S. Genetik der Schizophrenie. *J Neurol Neurochir Psychiatr* 2002; 3(3): 25-31.

Benes FM, Sorensen I, Vincent SL, Bird ED, Sathi M. Increased density of glutamate-immunoreactive vertical processes in superficial laminae in cingulate cortex of schizophrenic brain. *Cereb Cortex* 1992; 2(6): 503-512.

Benson MA, Newey SE, Martin-Rendon E, Hawkes R, Blake DJ. Dysbindin, a novel coiled-coil-containing protein that interacts with the dystrobrevins in muscle and brain. *J Biol Chem* 2001; 276(26): 24232-24241.

Bödecker I, Ziegler A. Assoziations- und Kopplungsstudien zur Analyse von Kandidatengen. *Dtsch Med Wochenschr* 2000; 125: 810-815.

Breier A, Su TP, Saunders R, Carson RE, Kolachana BS, de Bartolomeis A, Weinberger DR, Weisenfeld N, Malhotra AK, Eckelman WC, Pickar D. Schizophrenia is associated with elevated amphetamine-induced synaptic dopamine concentrations: evidence from a novel positron emission tomography method. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94(6): 2569-2574.

Brewer GJ, Cotman CW. NMDA receptor regulation of neuronal morphology in cultured hippocampal neurons. *Neurosci Lett* 1989; 99(3): 268-273.

Brickman AM, Buchsbaum MS, Shihabuddin L, Byne W, Newmark RE, Brand J, Ahmed S, Mitelman SA, Hazlett EA. Thalamus size and outcome in schizophrenia. *Schizophr Res* 2004; 71(2-3): 473-84.

Buller AL, Larson HC, Schneider BE, Beaton JA, Morrisett RA, Monaghan DT. The molecular basic of NMDA receptor subtypes: native receptor diversity is predicted by subunit composition. *J Neurosci* 1994; 14(9): 5471-5484.

Burnashev N, Zhou Z, Neher E, Sakmann B. Fractional calcium currents through recombinant GluR channels of the NMDA, AMPA and kainate receptor subtypes. *J Physiol* 1995; 485(Pt 2): 403-418.

Cannon TD, van Erp TG, Huttunen M, Lonnqvist J, Salonen O, Valanne L, Poutanen VP, Standertskjöld-Nordenstam CG, Gur RE, Yan M. Regional gray matter, white matter and cerebrospinal fluid distributions in schizophrenic patients, their siblings and controls. *Arch Gen Psychiatry* 1998; 55 (12): 1084-1091.

Cardno AG, Marshall EJ, Coid B, Macdonald AM, Ribchester TR, Davies NJ, Venturi P, Jones LA, Lewis SW, Sham PC, Gottesman II, Farmer AE, McGuffin P, Reveley AM, Murray RM. Heritability estimates for psychotic disorders: the Maudsley twin psychosis series. *Arch Gen Psychiatr* 1999; 56(2): 162-168.

Carlsson A, Hansson N, Waters ML. Neurotransmitter aberrations in schizophrenia: new perspectives and therapeutic implications. *Life Sciences* 1997; 61(2): 75-94.

Cherlyn SYT, Woon PS, Liu JJ, Tsai GC, Sim K. Genetic association studies of glutamate, GABA and related genes in schizophrenia and bipolar disorder: A decade of advance. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 2010; 34(6): 958-977.

Chiu H-J, Wang Y-C, Liou Y-J, Lai I-C, Chen J-Y. Association Analysis of the Genetic Variants of the N-Methyl-D-Aspartate Receptor Subunit 2b (NR2b) and Treatment-Refractory Schizophrenia in the Chinese. *Biological Psychiatry* 2003; 47(4): 178-181.

Cho YM, Ritchi MD, Moore JH. Multifactor-dimensionality reduction shows a two-locus interaction associated with Type 2 diabetes mellitus. *Diabetologia* 2004; 47(3): 549-554.

Chumakov I, Blumenfeld M, Guerassimenko O, Cavarec L, Palicio M, Abderrahim H, Bougueleret L, Barry C, Tanaka H, La Rosa P, Puech A, Tahri N, Cohen-Akenine A, Delabrosse S, Lissarrague S, Picard FP, Maurice K, Essieux L, Millasseau P, Grel P, Debailleul V, Simon AM, Caterina D, Dufaure I, Malekzadeh K, Belova M, Luan JJ, Bouillot M, Sambucy JL, Primas G, Saumier M, Boubkiri N, Martin-Saumier S, Nasroune M, Peixoto H, Delaye A, Pinchot V, Bastucci M, Guillou S, Chevillon M, Sainz-Fuertes R, Meguenni S, Aurich-Costa J, Cherif D, Gimalac A, van Duijn C, Gauvreau D, Ouellette G, Fortier I, Raelson J, Sherbatich T, Riazanskaia N, Rogaev E, Raeymaekers P, Aerssens J, Konings F, Luyten W, Macciardi F, Sham PC; Straub RE, Weinberger DR, Cohen N, Ouelette G, Realson J. Genetic and physiological data implicating the new human gene G72 and the gene for d-amino acid oxidase in schizophrenia. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99(21): 13675-13680.

Clinton SM, Meador-Woodruff JH. Abnormalities of the NMDA receptor and associated intracellular molecules in the thalamus in schizophrenia and bipolar disorder. *Neuropsychopharmacol* 2004; 29(7): 1353-1362.

Cloninger CR. The discovery of susceptibility genes for mental disorders. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99(21): 13365-13367.

Comer RJ. *Klinische Psychologie*. 2. deutsche Auflage 2001. Heidelberg, Berlin: Spektrum Akademischer Verlag.

Corsico A, McGuffin P. Psychiatric genetics: recent advances and clinical implications. *Epidemiol Psychiatr Soc* 2001; 10(4): 253-259.

Coryell W. Panic disorder and mortality. *Psychiatr Clin Nor Am* 1988; 11(2): 433-440.

Coyle JT, Tsai G. NMDA receptor function, neuroplasticity, and the pathophysiology of schizophrenia. *Int Rev Neurobiol* 2004; 59: 491-515.

Craddock N, O'Donovan MC, Owen MJ. The genetics of schizophrenia and bipolar disorder: dissecting psychosis. *J Med Genet* 2005; 43(3): 194-204.

Cull-Candy S, Brickley S, Farrant M. NMDA receptor subunits: diversity, development and disease. *Curr Opin Neurobiol* 2001; 11(3): 327-335.

Danysz W, Parsons CG. Glycine and N-Methyl-D-Aspartate Receptors: Physiological Significance and Possible Therapeutic Applications. *Pharmacological Reviews* 1998; 50(4): 597-664.

Das S, Sasaki YF, Rothe T, Premkumar LS, Takasu M, Crandall JE, Dikkes P, Conner DA, Rayudu PV, Cheung W, Chen HS, Lipton SA, Nakanishi N. Increased NMDA current and spine density in mice lacking the NMDA receptor subunit NR3A. *Nature* 1998; 393(6683): 377-381.

Davis KL, Kahn RS, Krant K, Davidson M. Dopamine in schizophrenia: a review and reconceptualization. *Am J Psychiatr* 1991; 148(11): 1474-1486.

De Blasi A, Conn PJ, Pin J, Nicoletti F. Molecular determinants of metabotropic glutamate receptor signalling. *Trends Pharmacol Sci* 2001; 22: 114-120.

Deister A, Marneros A. Long-term stability of subtypes in schizophrenic disorders: a comparison of four diagnostic systems. *Eur Arch Psychiatr Clin Neurosci* 1993; 242(4):184-190.

Dervaux A, Krebs MO, Laqueille X. Schizophrenia and amphetamine dependence. A case report. *Encephale* 2005; 31(2): 247-250.

Di Maria E, Gulli R, Begni S, DeLuca A, Bignotti S, Pasini A, Bellone E, Pizzuti A, Dallapiccola B, Novelli G, Ajmar F, Gennarelli M, Mandich P. Variations in the NMDA receptor subunit 2B gene (GRIN2B) and schizophrenia: a case-control study. *Neuropsychiatric Genetics* 2004; 128B(1): 27-29.

Dingledine R, Borges K, Bowie D, Traynelis SF. The glutamate receptor ion channels. *Pharmacol Rev* 1999; 51(1): 7-61.

Doherty P, Fazeli MS, Walsh FS. The neural cell adhesion molecule and synaptic plasticity. *J Neurobiol* 1995; 26(3): 437-446.

Dunah AW, Yasuda RP, Luo J, Wang Y, Prybylowski KL, Wolfe BB. Biochemical studies of the structure and function of NMDA subtype of glutamate receptors. *Molecular Neurobiology* 1999; 19(2): 151-179.

Duncan GE, Sheitman BB, Lieberman JA. An integrated view of pathophysiological models of schizophrenia. *Brain Res Brain Res Rev* 1999; 29(2-3): 250-264.

Durand GM, Gregor P, Zheng X, Bennett MV, Uhl GR, Zukin RS. Cloning of an apparent splice variant of the N-methyl-D-aspartate receptor NMDAR1 with altered sensitivity to polyamines and activators of protein kinase C. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992; 89(19): 9359-9363.

Ebert D, Loew T. *Psychiatrie systematisch*. 7. Auflage 2008: UNI-MED Verlag AG Bremen-London-Boston.

Fagni L, Chavis P, Ango F, Bockaert J. Complex interactions between mGluRs, intracellular Ca²⁺ stores and ion channels in neurons. *Trends Neurosci* 2000; 23(2): 80-88.

Falkai P, Honer WG, David S, Bogerts B, Majtenyi C, Bayer TA. No evidence for astrogliosis in brains of schizophrenic patients. A post-mortem study. *Neuropathol Appl Neurobiol* 1999; 25(1): 48-53.

Fallgatter AJ, Ehlis AC, Herrmann MJ, Hohoff C, Reif A, Freitag CM, Deckert J. DTNBP1 (dysbindin) gene variants modulate prefrontal brain function in schizophrenic patients - support for the glutamate hypothesis of schizophrenias. *Genes Brain Behav* 2010; 9(5): 489-497.

Faraone SV, Taylor L, Tsuang MT. The molecular genetics of schizophrenia: an emerging consensus. *Expert Rev Mol Med* 2002; 4(14): 1-13.

Frank E. Synapse elimination: for nerves it's all or nothing. *Science* 1997; 275: 324-324.

Friedman HV, Bresler T, Garner CC; Ziv NE. Assembly of new individual excitatory synapses: time course and temporal order of synaptic molecule recruitment. *Neuron* 2000; 27(1): 57-69.

Gallinat J, Gudlowski Y. Die Glutamathypothese der Schizophrenie. *Nervenheilkunde* 2008; 4: 317-325.

Garey LJ, Ong WY, Patel TS, Kanani M, Davis A, Mortimer AM, Barnes TR, Hirsch SR. Reduced dendritic spine density on cerebral cortical pyramidal neurons in schizophrenia. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1998; 65(4): 446-453.

Giegling I, Hartmann AM, Genius J, Benninghoff J, Möller HJ, Rujescu D. Systems biology and complex neurobehavioral traits. *Pharmacopsychiatry* 2008; 41 Suppl 1: 32-36.

Glantz LA, Lewis DA. Decreased dendritic spine density on prefrontal cortical neurons in schizophrenia. *Arch Gen Psychiatry* 2000; 57(1): 65-73.

Glantz LA, Gilmore JH, Lieberman JA, Jarskog LF. Apoptotic mechanisms and the synaptic pathology of schizophrenia. *Schizophr Res* 2006; 81(1): 47-63.

Goebel DJ, Poosch MS. NMDA receptor subunit gene expression in the rat brain: a quantitative analysis of endogenous mRNA levels of NR1Com, NR2A, NR2B, NR2D and NR3A. *Brain Res Mol Brain Res* 1999; 69(2): 164-170.

Goff DC, Tsai G, Manoach DS, Flood J, Darby DG, Coyle JT. D-cycloserine added to clozapine for patients with schizophrenia. *Am J Psychiatry* 1996; 153(12): 1628-1630.

Goff DC, Coyle JT. The emerging role of glutamate in the pathophysiology and treatment of schizophrenia. *Am J Psychiatry* 2001; 158(9): 1367-1377.

Goldberg TE, Straub RE, Callicott JH, Hariri A, Mattay VS, Bigelow L, Coppola R, Egan MF, Weinberg DR. The G72/G30 gene complex and cognitive abnormalities in schizophrenia. *Neuropsychopharmacology* 2006; 31(9): 2022-2032.

Gottesman II; Bertelsen A. Confirming unexpressed genotypes for schizophrenia. Risks in the offspring of Fischer's Danish identical and fraternal discordant twins. *Arch Gen Psychiatry* 1989; 46(10): 976-978.

Gottesman II, Erlenmeyer-Kimling L. Family and twin strategies as a head start in defining prodromes and endophenotypes for hypothetical early-interventions in schizophrenia. *Schizophr Res* 2001; 51(1): 93-102.

Grimwood S, Le Bourdellès B, Whiting PJ. Recombinant human NMDA homomeric NR1 receptors expressed in mammalian cells form a high-affinity glycine antagonist binding site. *J Neurochem* 1995; 64(2): 525-530.

Grimwood S, Slater P, Deakin JFW. NR2B-containing NMDA receptors are up-regulated in temporal cortex in schizophrenia. *Neuro Report* 1999; 10(3): 461-465.

Haas K. Prefabrication provides synapses on demand. *Trends Neurosci* 2000; 23(10): 449.

Häfner H, Riecher A, Maurer K, Fatkenheuer B, Löffler W, an den Heiden W, Munk-Jorgensen P, Stromgren E. Sex differences in schizophrenic diseases. *Fortschr Neurol Psychiatr* 1991; 59(9): 343-360.

Häfner H, an der Heiden W. The course of schizophrnie in the light of modern follow-up studies: the ABC and WHO studies. *Eur Arch Psychaitry Clin Neurosci* 1999; 4: 14-26.

Hall D, Gogos JA, Karayiorgou M. The contribution of the three strong candidate schizophrenia susceptibility genes in demographically distinct populations. *Genes Brain Behav* 2004; 3(4): 240-248.

Hampel R, Selg H. FAF-Fragebogen zur Erfassung von Aggressivitätsfaktoren. Handanweisung; Göttingen 1998: Hogrefe.

Harrison PJ, Law AJ, Eastwood SL. Glutamate receptor and transporters in the hippocampus in schizophrenia. *Ann NY Acad Sci* 2003; 94-101.

Harrison PJ, Owen MJ. Genes for schizophrenia? Recent findings and their pathophysiological implications. *Lancet* 2003; 361(9355): 417-419.

Hathaway SR, McKinley JC, Engel RR (Hrsg. der deutschen Adaptation). *Minnesota Multiphasic Personality Inventory-2. Manual*; Bern, Göttingen, Toronto, Seattle 2000: Verlag Hans Huber.

Hess SD, Daggett LP; Crona J, Deal C, Lu CC; Urrutia A, Chavez-Noriega L, Ellis SB, Johnson EC, Velicelebi G. Cloning and functional characterization of human heteromeric N-methyl-D-aspartate receptors. *J Pharmacol Exp Ther* 1996; 278(2): 808-816.

Hirai H, Hirsch J, Laube B, Betz H, Kuhse J. The glycine binding site of the N-methyl-D-aspartate receptor subunit NR1: identification of novel determinants of co-agonist potentiation in the extracellular M3-M4-loop region. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996; 93(12): 6031-6036.

Hollmann M und Heinemann S. Cloned glutamate receptors *Annu Rev Neurosci* 1994; 17: 31-108.

Hong CJ, Yu YWY, Lin CH, Cheng CY, Tsai SJ. Association analysis for NMDA receptor subunit 2B (GRIN2B) genetic variants and psychopathology and clozapine response in schizophrenia. *Psychiatr Genet* 2001; 11(4): 219-222.

Huttenlocher PR. Synapse elimination and plasticity in developing human cerebral cortex. *Am J Ment Defic* 1984; 88(5): 488-496.

Ibrahim HM, Hogg jr AJ, Healy DJ, Haroutunian V, Davis KL, Meador-Woodruff JH. Iontropic glutamate receptor binding and subunit mRNA expression in thalamic nuclei in schizophrenia. *Am J Psychiatry* 2000; 157(11): 1811-1823.

ICD-10: Internationale Klassifikation der Krankheiten 10. Revision.

Ikeda K, Nagasawa M, Mori H, Araki K, Sakimura K, Watanabe M, Inoue Y, Mishina M. Cloning and expression of the epsilon 4 subunit of the NMDA receptor channel. *FEBS Lett* 1992; 313(1): 34-38.

Ikonomidou C, Bosch F, Miksa M, Bittigau P, Vöckler J, Dikranian K, Tenkova TI, Stefovskaja V, Turski L, Olney JW. Blockade of NMDA receptors and apoptotic neurodegeneration in the developing brain. *Science* 1999; 283(5398): 70-74.

Inagaki N, Kuromi H, Gono T, Okamoto Y, Ishida H, Seino Y, Kaneko T, Iwanaga T, Seino S. Expression and role of ionotropic receptors in pancreatic islet cells. *FASEB J* 1995; 9(8): 686-691.

International HapMap Project (HapMap) 2011, www.hapmap.org.

Invitrogen Life Technologies 2011.

Itokawa M, Yamada K, Yoshitsugu K, Toyota T, Suga T, Ohba H, Watanabe A, Hattori E, Shimizu H, Kumakura T, Ebihara M, Meerabux JMA, Toru M, Yoshikawa T. A microsatellite repeat in the promoter of the N-methyl-D-aspartate receptor 2A subunit (GRIN2A) gene suppresses transcriptional activity and correlates with chronic outcome in schizophrenia. *Pharmacogenetics* 2003; 13(5): 271-278.

Iwayama-Shigeno Y, Yamada K, Itokawa M, Toyota T, Meerabux JM, Minabe Y, Mori N, Inada T, Yoshikawa T. Extended analyses support the association of a functional (GT)_n polymorphism in the GRIN2A promoter with Japanese schizophrenia. *Neurosci Lett* 2005; 378(2): 102-105.

Jaber M, Robinson SW, Missale C, Caron MG. Dopamine receptors and brain function. *Neuropharmacology* 1996; 35(11): 1503-1519.

Javitt DC, Zukin SR. Recent advances in the phencyclidine model of schizophrenia. *Am J Psychiatry* 1991; 148(10): 1301-1308.

Javitt DC, Zylberman I, Zukin SR, Heresco-Levy U, Lindenmayer JP. Amelioration of negative symptoms in schizophrenia by glycine. *Am J Psychiatry* 1994; 151(8): 1234-1236.

Javitt DC, Coyle JT. Decoding schizophrenia. *Sci Am* 2004; 290(1): 48-55.

Kallinke K, Lutz R, Ramsay RW. Die Behandlung von Zwängen. Eine verhaltenstherapeutische Kontroverse. München 1979: Urban & Schwarzenberger.

Kalsi G, Whiting PJ, Bourdelles BL; Callen D, Barnard EA, Gurling HM. Localization of the human NMDAR2D receptor subunit gene (GRIN2D) to 19q13.1-qter, the NMDAR2A subunit gene to 16p13.2 (GRIN2A), and the NMDAR2C subunit gene (GRIN2C) to 17q24-25 using somatic cell hybrid and radiation hybrid mapping panels. *Genomics* 1998; 47(3): 423-425.

Kantrowitz JT, Javitt DC. N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor dysfunction or dysregulation: The final common pathway on the road to schizophrenia? *Brain Research Bulletin* 2010; 83(3-4): 108-121.

Kapur S, Seeman P. NMDA receptor antagonists ketamine PCP have direct effects on the dopamine D2 and serotonin 5-HT2 receptor-simplications for models of schizophrenia. *Molecular Psychiatry* 2002; 7(8): 837-844.

Karp SJ, Masu M, Eki T, Ozawa K, Nakanishi S. Molecular cloning and chromosomal localization of the key subunit of the human N-methyl-D-aspartate receptor. *J Biol Chem* 1993; 268(5): 3728-3733.

Kay SR, Fiszbein A, Opler LA: The positive and negative syndrome scale (PANSS) für schizophrenia. *Schizophr Bull* 1987; 13(2): 261-276.

Keith SJ. Evaluating characteristics of patient selection and dropout rates. *J Clin Psychiatr* 2001; 62(9): 11-14.

Kerwin R, Patel S, Meldrum B. Quantitative autoradiographic analysis of glutamate binding sites in the hippocampal formation in normal and schizophrenic brain post mortem. *Neuroscienc* 1990; 39(1): 25-32.

Keshavan MS, Anderson S, Pettegrew JW. Is schizophrenia due to excessive synaptic pruning in the prefrontal cortex? The Feinberg hypothesis revisited. *J Psychiatr Res* 1994; 28(3): 239-65.

Kessler J, Folstein SE, Denzler P. MMST. Mini-Mental-Status-Test. Deutschsprachige Fassung; Weinheim 1990: Beltz.

Kety SS, Wender PH, Jakobsen B. Ingraham LJ, Jansson L, Faber B, Kinney DK. Mental illnesses in the biological and adoptive relatives of schizophrenic adoptees. Replication of the Copenhagen Study in the rest of Denmark. *Arch Gen Psychiatr* 1994; 51(6): 442-455.

Kew JN, Richards JG, Mutel V, Kemp JA. Developmental changes in NMDA receptor glycine affinity and ifenprodil sensitivity reveal three distinct populations of NMDA receptors in individual rat cortical neurons. *J Neurosci* 1998; 18(6): 1935-1943.

Kew JN, Koester A, Moreau JL, Jenck F, Ouagazzal AM, Mutel V, Richards JG, Trube G, Fischer G, Montkowski A, Hundt W, Reinscheid RK, Pauly-Evers M, Kemp JA, Bluethmann H. Functional consequences of reduction in NMDA receptor glycine affinity in mice carrying targeted point mutations in the glycine binding site. *J Neurosci* 2000; 20(11): 4037-4049.

Kim JS, Kornhuber HH, Schmid-Burgh W. Low cerebrospinal fluid glutamate in schizophrenic patients and a new hypothesis on schizophrenia. *Neurosci Lett* 1980; 20(3): 379-382.

Kim WT, Kuo MF, Mishra OP, Delivoria-Papadopoulos M. Distribution and expression of the subunits of n.methyl-D-aspartate (NMDA) receptors: NR1, NR2A and NR2B in hypoxic newborn piglet brains. *Brain Res* 1998; 799(1): 49-54.

Kleckner NW, Dingledine R. Requirement for glycine in activation of NMDA-receptors expressed in *Xenopus* oocytes. *Science* 1988; 241(4867): 835-837.

Köles L, Wirkner K, Illes P. Modulation of ionotropic glutamate receptor channels. *Neurochem Res* 2001; 26(8-9): 825-832.

Konradi C, Heckers S. Molecular aspects of glutamate dysregulation: implications for schizophrenia and its treatment, *Pharmacol Ther* 2003; 97(2): 153-179.

Kornau HC, Schenker LT, Kennedy MB, Seeburg PH. Domain interaction between NMDA receptor subunits and the postsynaptic density protein PSD-95. *Science* 1995; 269(5231): 1737-1740.

Kraepelin E. Dementia praecox. Psychiatrie. Ein Lehrbuch für Studierende und Ärzte. 5. Auflage ed. Leipzig 1896: Barth.

Krystal JH, Karper LP, Seibyl JP, Freeman GK, Delaney R, Bremner JD, Heninger GR, Bowers MB Jr, Charney DS. Subanesthetic effects of the noncompetitive NMDA antagonist, ketamine, in humans. Psychotomimetic, perceptual, cognitive, and neuroendocrine responses." Arch Gen Psychiatry 1994; 51(3): 199-214.

Kundrotiene J, Cebers G, Wägner A, Liljequist S. The NMDA NR2B subunit-selective receptor antagonist, CP-101,606, enhances the functional recovery the NMDA NR2B subunit-selective receptor and reduces brain damage after cortical compression-induced brain ischemia. J Neurotrauma 2004; 21(1): 83-93.

Kuryatov A, Laube B, Betz H, Kuhse J. Mutational analysis of the glycine-binding site of the NMDA receptor: structural similarity with bacterial amino acid-binding proteins. Neuron 1994; 12(6): 1291-1300.

Lander ES, Schork NJ. Genetic dissection of complex traits. Science 1994; 265(5181): 2037-2048.

Laruelle M, Abi-Dargham A, van Dyck CH, Gil R, D'Souza CD, Erdos J, McCance E, Rosenblatt W, Fingado C, ZoghbiSS, Baldwin RM, Seibyl JP, Krystal JH, Charney DS, Innis RB. Single photon emission computerized tomography imaging of amphetamine-induced dopamine release in drug-free schizophrenic subjects. Pro Natl Acad Sci U S A 1996; 93(17): 9235-9240.

Lau CG, Zukin RS. NMDA receptor trafficking in synaptic plasticity and neuropsychiatric disorders. Neuroscience 2007; 8(6): 413-426.

Laube B, Kuhsa J, Betz H. Evidence of a tetrameric structure of recombinant NMDA receptors. J Neurosci 1998; 18(8): 2954-2961.

Laurie DJ, Seeburg PH. Ligand affinities at recombinant N-methyl-D-aspartate receptors depend on subunit composition. *Eur J Pharmacol* 1994; 268(3): 335-345.

Lee SH, Sheng M. Development of neuron-neuron synapses. *Curr Opin Neurobiol* 2000; 10(1): 125-131.

Leeson PD, Iverson LL. The glycine site on the NMDA receptor: structure-activity relationships and therapeutic potential. *J Med Chem* 1994; 37(24): 4053-4067.

Lencz T, Morgan TV, Athanasiou M, Dain B, Reed CR, Kane JM, Kucherlapati R, Malhotra AK. Converging evidence for a pseudoautosomal cytokine receptor gene locus in schizophrenia. *Mol Psychiatry* 2007; 12(6): 572-580.

Lewis DA, Lieberman JA. Catching up on schizophrenia: natural history and neurobiology. *Neuron* 2000; 28(2): 325-334.

Lewis CM, Levinson DF, Wise LH, DeLisi LE, Straub RE, Hovatta I, Williams NM, Schwab SG, Pulver AE, Faraone SV, Brzustowicz LM, Kaufmann CA; Garver DL, Gurling HM, Lindholm E, Coon H, Moises HW, Byerley W, Shaw SH, Mesen A, Sherrington R, O'Neill FA; Walsh D, Kendler KS, Ekelund J, Paunio T, Lonnqvist J, Peltonen L, O'Donovan MC, Owen MJ, Wildenauer DB, Maier W, Nestadt G, Blouin JL, Antonarakis SE; Mowry BJ, Silverman JM, Crowe RR; Cloninger CR, Tsuang MT, Malaspina D, Harkavy-Friedman JM, Svrakic DM, Bassett AS, Holcomb J, Kalsi G, McQuillin A, Brynjolfson J, Sigmundsson T, Petursson H, Jazin E, Zoega T, Helgason T. Genome scan meta-analysis of schizophrenia and bipolar disorder, part II: Schizophrenia. *Am J Hum Genet* 2003; 73(1): 34-48.

Li D, He L. Association study between the NMDA receptor 2B subunit gene (GRIN2B) and schizophrenia: A HuGe review and meta-analysis. *Genetics in Medicine* 2007; 9(1): 4-8.

Linden DJ. Long-term synaptic depression in the mammalian brain. *Neuron* 1994; 12: 457-472.

Liu L, Wong TP, Pozza MF, Lingenhoehl K, Wang Y, Sheng M, Auberson YP, Wang YT. Role of NMDA receptor subtypes in governing the direction of hippocampal synaptic plasticity. *Science* 2004; 304(5673): 1021-1024.

Lopez AD, Murray CC. The global burden of disease, 1990-2020. *Nat Med* 1998; 4(11): 1241-1243.

Lynch DR, Guttman RP. NMDA receptor pharmacology: perspectives from molecular biology. *Curr Drug Targets* 2001; 2(3): 215-231.

MacDermott AB, Mayer ML, Westbrook GL, Smith SJ, Barker JL. NMDA-receptor activation increases cytoplasmic calcium concentration in cultured spinal cord neurones. *Nature* 1986; 321(6069): 519-522.

Madden DR. The structure and function of glutamate receptor ion channels. *Nat Rev Neurosci* 2002; 3(2): 91-101.

Maier W, Lichtermann D, Rietschel M, Held T, Falkai P, Wagner M, Schwab S. Genetik schizophrener Störungen. *Nervenarzt* 1999; 70: 955-69.

Makino C, Shibata H, Ninomiya H, Tashiro N, Fukumaki Y. Identification of single-nucleotide polymorphisms in the human N-methyl-D-aspartate receptor subunit NR2D gene, GRIN2D, and association study with schizophrenia. *Psychiatr Genet* 2005; 15(3): 215-221.

Malenka RC, Nicoll RA. Long-term potentiation – a decade of progress? *Science* 1999; 285(5435): 180-1874.

Mandich P, Schito AM, Bellone E, Antonacci R, Finelli P, Rocchi M, Ajmar F. Mapping of the human NMDAR2B receptor subunit gene (GRIN2B) to chromosom 12p12. *Genomics* 1994; 22(1): 216-218.

Mapview 2011: www.pubmed.com.

Marneros A, Deister A, Rhode A. Affektive, schizoaffektive und schizophrene Psychosen. Eine vergleichende Langzeitstudie. Berlin 1991: Springer.

Martucci L, Wong AHC, DeLuca V, Likhodi O, Wong GWH, King N, Kennedy JL. N-methyl-D-aspartate receptor NR2B subunit gene GRIN2B in schizophrenia and bipolar disorder: Polymorphisms and mRNA levels. *Schizophr Res* 2006; 84(2-3): 214-221.

Maurer K, Häfner H. Epidemiologie positiver und negativer Symptome in der Schizophrenie. In: Häfner H. (Hrsg.) Was ist Schizophrenie? Stuttgart, Jena, New York 1995: Fischer.

McBain CJ, Mayer ML. N-methyl-D-aspartic acid receptor structure and function. *Physiol Rev* 1994; 74(3): 723-760.

McGlashan TH, Hoffmann RE. Schizophrenia as a disorder of developmentally reduced synaptic connectivity. *Arch Gen Psychiatry* 2000; 57(7): 637-648.

McGue M, Gottesman II. Genetic linkage in schizophrenia: perspectives from genetic epidemiology. *Schizophr Bull* 1989; 15(3): 453-464.

McGuffin P, Owen MJ, Farmer AE. Genetic basis of schizophrenia. *Lancet* 1995; 346: 678-682.

McGuffin P, Owen MJ. Molecular genetic studies of schizophrenia. *Cold Spring Harb. Symp Quant Biol* 1996; 61: 815-822.

Meador-Woodruff JH, Healy DJ. Glutamate receptor expression in schizophrenic brain. *Brain Res Brain Res Rev* 2000; 31(2-3): 288-294.

Meador-Woodruff JH, Clinton SM, Beneyto M, McCullumsmith RE. Molecular abnormalities of the glutamate synapse in the thalamus in schizophrenia. *Ann N Y Acad Sci* 2003; 1003: 75-93.

Mei L, Xiong W. Neuregulin 1 in neural development synaptic plasticity and schizophrenia. *Nat Rev Neurosci* 2008; 9(6): 437-452.

Meltzer HY. Treatment-resistant schizophrenia – the role of clozapine. *Curr Med Res Opin* 1997; 14(1): 1-20.

Millan MJ. N-methyl-D-aspartate receptor-coupled glycine receptors in the pathogenesis and treatment of schizophrenia: a critical review. *Curr Drug Targets CNS Neurol Disord* 2002; 1(2): 191-213.

Misra C, Brickley SG, Farrant M, Cull-Candy SG. Identification of subunits contributing to synaptic and extrasynaptic NMDA receptors in Golgi cells of the rat cerebellum. *J Physiol* 2000; 524 (Pt 1): 147-162.

Missale C, Nash SR, Robinson SW, Jaber M, Caron MG. Dopamine receptors: from structure to function. *Physiol Rev* 1998; 78(1): 189-225.

Miyatake R, Furukawa A, Suwaki H. Identification of a novel variant of the human NR2B gene promoter region and its possible association with schizophrenia. *Molecular Psychiatry* 2002; 7(10): 1101-1106.

Möller HJ, Laux G, Deister A. *Duale Reihe. Psychiatrie und Psychotherapie*. 4. überarbeitete Auflage 2009. Stuttgart: Georg Thieme Verlag KG.

Mohn AR, Gainetdinov RR, Caron MG, Koller BH. Mice with reduced NMDA receptor expression display behaviours related to schizophrenia. *Cell* 1999; 98(4): 427-436.

Monaghan DT, Bridges RJ, Cotmann CW. The excitatory amino acid receptors: Their classes, pharmacology and distinct properties in the function of the central nervous system. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1989; 29: 365-402.

Monyer H, Sprengel R, Schoepfer R, Herb A, Higuchi M, Lomeli H, Burnashev N, Sakmann B, Seeburg PH. Heteromeric NMDA receptors: molecular and functional distinction of subtypes. *Science* 1992; 256(5060): 1217-1221.

Monyer H, Burnashev N, Laurie DJ, Sakman B, Seeburg PH. Developmental and regional expression in the rat brain and functional properties of four NMDA receptors. *Neuron* 1994; 12(3): 529-540.

Moore JH, Williams SM. New strategies for identifying gene-gene interactions in hypertension. *Ann Med* 2002; 34(2): 88-95.

Mori H, Mishina M. Structure and function of the NMDA receptor channel. *Neuropharmacol* 1995; 34(10): 1219-1237.

Moriyoshi K, Masu M, Ishii T, Shigemoto R, Mizuno N, Nakanishi S. Molecular cloning and characterization of the rat NMDA receptor. *Nature* 1991; 354(6348): 31-37.

Morris DW, McGhee KA, Schwaiger S, Scully P, Quinn J, Meagher D, Waddington JL, Gill M, Corvin AP. No evidence for association of the dybindin gene (DTNBP1) with schizophrenia in an Irish population-based study. *Schizophr Res* 2003; 60(2-3): 167-172.

Müller N, Riedel M, Schwarz MJ. Psychotropic effects of COX-2 inhibitors – a possible approach for the treatment of psychiatric disorders. *Pharmacopsychiatry* 2004; 37(6): 266-269.

Mullis KB. The unusual origin of the polymerase chain reaction. *Sci Am* 1990; 262(4): 64-65.

Murase S, Schuman EM. The role of cell adhesion molecules in synaptic plasticity and memory. *Curr Opin Cell Biol* 1999; 11(5): 549-553.

Murray CJ, Lopez AD. Evidence-based health policy – lessons from the Global Burden of Disease Study. *Science* 1996; 274(55288): 740-743.

Murray RM, Jones P, O'Callaghan E. Fetal brain development and later schizophrenia. *Ciba Found Symp* 1991; 156: 155-63; discussion 163-70.

Nakanishi S. Molecular diversity of glutamate receptors and implications for brain function. *Science* 1992; 258(5082): 597- 603.

National Centre of Biotechnology Information (NCBI), 2010.

Ng MY, Levinson DF, Faraone SV, Suarez BK, Delisi LE, Arinami T, Riley B, Paunio T, Pulver AE, Irmansyah, Holmans, PA, Escamilla, M, Wildenauer, DB, Williams NM, Laurent C, Mowry BJ, Brzustowicz LM, Maziade M, Sklar P, Garver DL, Abecasis GR, Lerer B, Fallin MD, Gurling HM, Gejman PV, Lindholm E, Moises HW, Byerley W, Wijsman EM, Forabosco P, Tsuang MT, Hwu HG, Okazaki Y, Kendler KS, Wormley B, Fanous A, Walsh D, O'Neill FA, Peltonen L, Nestadt G, Lasseter VK, Liang KY, Papadimitriou GM, Dikeos DG, Schwab SG, Owen MJ, O'Donovan MC, Norton N, Hare E, Raventos H, Nicolini H, Albus M, Maier W, Nimgaonkar VL, Terenius L, Mallet J, Jay M, Godard S, Nertney D, Alexander M, Crowe RR, Silverman JM, Bassett AS, Roy MA, Merette C, Pato CN, Pato MT, Roos JL, Kohn Y, Amann-Zalcenstein D, Kalsi G, McQuillin A, Curtis D, Brynjolfson J, Sigmundsson T, Petursson H, Sanders AR, Duan J, Jazin E, Myles-Worsley M, Karayiorgou M, Lewis CM. Meta-analysis of 32 genom-wide linkage studies of schizophrenia. *Mol Psychiatry* 2009; 14(8): 774-785.

Nicoll RA, Malenka RC. Expression mechanisms underlying NMDA receptor-dependent long-term potentiation. *Ann N Y Acad Sci* 1999; 868: 515-525.

Nishiguchi N, Shirakawa O, Ono H, Hashimoto T, Maeda K. Novel Polymorphism in the Gene Region Encoding the Carboxyl-Terminal Intracellular Domain of the NMDA Receptor 2B Subunit: Analysis of Association With Schizophrenia. *Am J Psychiatry* 2000; 157(8): 1329-1331.

Norton N, Williams HJ, Owen MJ. An update on the genetics of schizophrenia. *Curr Opin Psychiatry* 2006; 19(2): 158-164.

Nowak L, Bregestovski P, Ascher P, Herbet A, Prochiantz A. Magnesium gates glutamate-activated channels in mouse central neurones. *Nature* 1984; 307(5950): 462-465.

Nudmamud-Thanoi S, Reynolds GP. The NR1 subunit of the glutamate/NMDA receptor in the superior temporal cortex in schizophrenia and affective disorders. *Neurosci Lett* 2004; 372(1-2): 173-177.

O'Donovan MC, Craddock N, Norton N, Williams H, Peirce T, Moskvina V, Nikolov I, Hamshere M, Carroll L, Georgieva L, Dwyer S, Holmans P, Marchini JL, Spencer CC, Howie B, Leung HT, Hartmann AM, Moller HJ, Morris DW, Shi Y, Feng G, Hoffmann P, Propping P, Vasilescu C, Maier W, Rietschel M, Zammit S, Schumacher J, Quinn EM, Schulze TG, Williams NM, Giegling I, Iwata N, Ikeda M, Darvasi A, Shifman S, He L, Duan J, Sanders AR, Levinson DF, Gejman PV, Cichon S, Nothen MM., Gill M, Corvin A, Rujescu D, Kirov G, Owen MJ, Buccola NG, Mowry BJ, Freedman R, Amin F, Black DW, Silverman JM, Byerley WF, Cloninger CR. Identification of loci associated with schizophrenia by genome-wide association and follow-up. *Nat Genet* 2008; 40(9): 1053-1055.

Ohtsuki T, Sakurai K, Dou H, Toru M, Yamakawa-Kobayashi K, Arinami T. Mutation analysis of the NMDAR2B (GRIN2B) gene in schizophrenia. *Molecular Psychiatry* 2001; 6(2): 211-216.

Olney JW, Kabruyere J, Wang G, Wozniak DF, Price MT, Sesma MA. NMDA antagonist neurotoxicity: mechanism and prevention. *Science* 1991; 254(5037): 1515-1518.

Olney JW, Farber NB. Glutamate receptor dysfunction and schizophrenia. *Arch Gen Psychiatry* 1995; 52(12): 998-1007.

Olney JW, Newcomer JW, Farber NB. NMDA receptor hypofunction model of schizophrenia. *J Psychiatr Res* 1999; 33(6): 523-533.

Omkumar RV, Kiely MJ, Rosenstein AJ, Min KT, Kennedy MB. Identification of a phosphorylation site for calcium/calmodulin-dependent protein kinase II in the NR2B subunit of the N-methyl-aspartate receptor. *J Biol Chem* 1996; 271(49): 31670-31678.

Ostendorf F, Angleitner A. NEO-PI-R. NEO-Persönlichkeitsinventar nach Costa und MacCrae. Revidierte Fassung; Göttingen 2004: Hogrefe.

Owen MJ. Molecular genetic studies of schizophrenia. *Brain Res Brain Res Rev* 2000; 31(2-3): 179-186.

Ozawa S, Kamiya H, Tsuzuki K. Glutamate receptors in the mammalian central nervous system. *Prog Neurobiol* 1998; 54(5): 581-618.

Parnas J, Cannon TD, Jacobsen B, Schulsinger H, Schulsinger F, Mednick SA. Lifetime DSM-III-R diagnostic outcomes in the offspring of schizophrenic mothers. Results from the Copenhagen High-Risk Study. *Arch Gen Psychiatr* 1993; 50(9): 707-714.

Pellicciari R, Costantino G. Metabotropic G-protein-coupled glutamate receptors as therapeutic targets. *Curr Opin Chem Biol* 1999; 3:433-440.

Perez-Otano I, Schulteis CT, Contractor A, Lipton SA, Trimmer JS, Sucher NJ, Heinemann SF. Assembly with the NR1 subunit is required for surface expression of NR3A-containing NMDA receptors. *J Neurosci* 2001; 21(4): 1228-1237.

Pilowsky LS, Bressan RA, Stone JM, Erlandsson K, Mulligan RS, Krystal JH, Ell PJ. First in vivo evidence of an NMDA receptor deficit in medication-free schizophrenic patients. *Mol Psychiatry* 2006; 11(2): 118-119.

Popken GJ, Leggio MG. Expression of mRNAs related to the GABAergic and glutamatergic neurotransmitter systems in the human thalamus: normal and schizophrenic. *Thalamus Relat Syst* 2002; 1: 349-369.

Porteous D. Genetic causality in schizophrenia and bipolar disorder: out with the old and with the new. *Curr Opin Genet Dev* 2008; 18(3): 229-234.

Priestley T, Laughton P, Myers J, Le Bourdellés B, Kerby J, Whiting PJ. Pharmacological properties of recombinant human N-methyl-D-aspartate receptors comprising NR1a/NR2A and NR1a/NR2B subunit assemblies expressed in permanently transfected mouse fibroblast cells. *Mol Pharmacol* 1995; 48(5): 841-848.

Prybylowski K, Wenthold RJ. N-Methyl-D-Aspartate receptors: subunit assembly and trafficking to the synapse. *J Biol Chem* 2004; 279(11): 9673-9676.

Qin S, Zhao X, Pan Y, Liu J, Feng G, Fu J, Bao J, Zhang Z, He L. An association study of the N-methyl-D-aspartate receptor NR1 subunit gene (GRIN1) and NR2B subunit gene (GRIN2B) in schizophrenia with universal DNA microarray. *Eur J Hum Genet* 2005; 13(7): 807-814.

Rajkowska G, Selemon LD, Goldman-Rakic PS. Neuronal and glial somal size in the prefrontal cortex: a post-mortem morphometric study of schizophrenia and Huntington disease. *Arch Gen Psychiatry* 1998; 55(3): 215-224.

Rice JP, Reich T, Buchholz KK, Neuman RJ, Fishman R, Rochberg N, Hesselbrock VM, Nurnberger JI, Schuckit jr MA, Begleiter H. Comparison of direct interview and family history diagnoses of alcohol dependence. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research* 1995; 19(4): 1018-1023.

Richter V, Guthke J. Leipziger Ereignis- und Belastungsinventar (LEBI); Göttingen 1996: Hogrefe.

Riederer P, Lange KW, Jellinger K. Glutamate receptor antagonism: neurotoxicity, anti-kinetic effects and psychosis. *J Neural Transm Suppl* 1991; 34: 203-210.

Rist F, Cohen R, Watzl H. Schizophrenie: Ätiologie/Bedingungsanalyse. In: Perrez M und Baumann U (Hrsg.). *Lehrbuch Klinische Psychologie-Psychotherapie*. Bern 2005: Huber.

Ritchi MD, Hahn LM, Roodi N, Bailey LR, Dupont WD, Parl FF, Moore JH. Multifactor-dimensionality reduction reveals high-order interactions among estrogen-metabolism genes in sporadic breast cancer. *Am J Hum Genet* 2001; 69(1): 138-147.

Rongo C, Kaplan JM. CaMKII regulates the density of central glutamatergic synapses in vivo. *Nature* 1999; 402(6758): 195-199.

Rosenmund C, Stern-Bach Y, Stevens CF. The tetrameric structure of a glutamate receptor channel. *Science* 1998; 280(5369): 1596-1599.

Rujescu D, Bender A, Keck M, Hartmann AM, Ohl F, Raeder H, Giegling I, Genius J, McCarley RW, Möller HJ, Grunze H. A pharmacological model for psychosis based on N-methyl-D-aspartate receptor hypofunction: Molecular, cellular, functional and behavioral abnormalities. *Biol Psychiatr* 2006; 59(8): 721-729.

Rujescu D. Psychiatrische Erkrankungen – Genetik der Schizophrenie. *Biospektrum* 2007; 13: 727-729.

Rujescu D, Inqason A, Cichon S, Pietiläinen OP, Barnes MR, Toulopoulou T, Picchioni M, Vassos E, Ettinger U, Bramon E, Murray R, Ruggeri M, Tosato S, Bonetto C, Steinberg S, Sigurdsson E, Sigmundsson T, Petursson H, Gylfason A, Olason PI, Hardarsson G, Jonsdottir GA, Gustafsson O, Fossdal R, Giegling I, Möller HJ, Hartmann AM, Hoffmann P, Crombie C, Fraser G, Walker N, Lonnqvist J, Suvisaari J, Tuulio-Henriksson A,

Djurovic S, Melle I, Andreassen OA, Hansen T, Werge T, Kiemeny LA, Franke B, Veltman J, Buizer-Voskamp JE; GROUP Investigators, Sabatti C, Ophoff RA, Rietschel M, Nöthen MM; Stefansson K, Peltonen L, St Clair D, Stefansson H, Collier DA. Disruption of the neurexin 1 gene is associated with schizophrenia. *Hum Mol Genet* 2008; 18(5): 988-996.

Safferling M, Tichelaar W, Kummerle G, Joupilla A, Kuusinen A, Keinänen K, Madden DR. First images of a glutamate receptor ion channel: oligomeric state and molecular dimensions of GluRB homomers. *Biochemistry* 2001; 40(46): 13948-13953.

Said SI, Berisha HI, Pakbaz H. Excitotoxicity in the lung: N-methyl-D-aspartate-induced, nitric oxide-dependent, pulmonary edema is attenuated by vasoactive intestinal peptide and by inhibitors of poly(ADP-ribose) polymerase. *Proc Natl Acad U S A* 1996; 93(10): 4688-4692.

Saiki RK, Sharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, Arnheim N. Enzymic amplification of β -globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 1985; 230(4732): 1350-1354.

Salter MW, Kalia LV. Src kinases: a hub for NMDA receptor regulation. *Nat Rev Neurosci* 2004; 5(4): 317-328.

Sasaki YV, Rothe T, Premkumar LS, Das S, Cui J, Talantova MV, Wong HK, Gong X, Chan SF, Zhang D, Nakanishi N, Sucher NJ, Lipton SA. Characterization and comparison of the NR3A subunit of the NMDA receptor in recombinant systems and primary cortical neurons. *J Neurophysiol* 2002; 87(4): 2052-2063.

Schito AM, Pizzuti A, Di Maria E, Schenone A, Ratti A, Defferrari R, Bellone E, Mancardi GL, Ajmar F, Mandich P. mRNA distribution in adult human brain of GRIN2B, a N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor subunit. *Neurosci Lett* 1997; 239(1): 49-53.

Schmidt KH, Metzler P. Wortschatztest. WST; Weinheim 1992: Beltz.

Schmitt A, Koschel J, Zink M, Bauer M, Sommer C, Frank J, Treutlein J, Schulze T, Schneider-Axmann T, Parlapani E. Gene expression of NMDA receptor in the cerebellum of elderly patients with schizophrenia. *Eur Arch Psychiatr Clin Neurosci* 2010; 260(2): 101-111.

Schulze TG, Muller DJ, Krauss H, Gross M, Bauer I, Fangerau-Lefevre H, Illes F, Ohlraun S, Fimmers R, Cichon S, Held T, Propping P, Nothen MM, Maier W, Rietschel M. Caught in the trio trap? Potential selection bias inherent to association studies using parent-offspring trios. *Am J Med Genet* 2001; 105(4): 351-353.

Schumacher J, Jamra RA, Freudenberg J, Becker T, Ohlraun S, Otte AC, Tullius M, Kovalenko S, Bogaert AV, Maier W, Rietschel M, Propping P, Nothen MM, Cichon S. Examination of G72 and D-amino-acid oxidase as genetic risk factors for schizophrenia and bipolar affective disorder. *Mol Psychiatry* 2004, 9(2): 203-207.

Schwenkmezger P, Hodapp V, Spielberger CD. Das State-Trait-Ärgerausdrucks-Inventar (STAXI). Handbuch; Bern 1992: Huber.

Seeber S, Becker K, Rau T, Eschenhagen T, Becker CM, Herkert M. Transient expression of NMDA receptor subunit NR2B in the developing rat heart. *J Neurochem* 2000; 75(6): 2472-2477.

Selemon LD, Goldman-Rakic PS. The reduced neuropil hypothesis: a circuit based model of schizophrenia. *Biol Psychiatry* 1999; 45(1): 17-25.

Sheinin A, Shavit S, Benveniste M. Subunit specificity and mechanism of action of NMDA partial agonist D-cycloserine. *Neuropharmacol* 2001; 41(2): 151-158.

Sheng K, Kim MJ. Postsynaptic signalling and plasticity mechanisms. *Science* 2002; 298(5594): 776-780.

Sheng M, Cummings J, Roldan LA, Jan YN, Jan LY. Changing subunit composition of heteromeric NMDA receptors during development of rat cortex. *Nature* 1994; 368(6467): 144-147.

Sheng M, Pak DT. Ligand-gated ion channel interactions with cytoskeletal and signaling proteins. *Annu Rec Physiol* 2000; 62: 755-778.

Shi J, Townsend M, Constantine-Paton M. Activity-dependent induction of tonic calcineurin activity mediates a rapid developmental downregulation of NMDA receptor currents. *Neuron* 2000; 28(1): 103-114.

Shi J, Levinson DF, Duan J, Sanders AR, Zheng Y, Pe'er I, Dudbridge F, Holmans PA, Whittemore AS, Mowry BJ, Olincy A, Amin F, Cloninger CR, Silverman JM, Buccola NG, Byerley WF, Black DW, Crowe RR, Oksenberg JR, Mirel DB, Kendler KS, Freedman R, Gejman PV. Common variants on chromosome 6p22.1 are associated with schizophrenia. *Nature* 2009; 460(7256): 753-757.

Siegel BW, Sreekrishna K, Baron BM. Binding of the radiolabeled glycine site antagonist [3H]MDL 105,519 to homomeric NMDA-NR1a receptors. *Eur J Pharmacol* 1996; 312(3): 357-365.

Smith RE, Haroutunian V, Davis KL, Meador-Woodruff JH. Expression of excitatory amino acid transporter transcripts in the thalamus of subjects with schizophrenia. *Am J Psychiatry* 2001; 158(9): 1393-1399.

Snyder SH, Ferris CD. Novel neurotransmitters and their neuropsychiatric relevance. *Am J Psychiatry* 2000; 157(11): 1738-1751.

Spooren W, Ballard T, Gasparini F, Amalric M, Mutel V, Schreiber R. Insight into the function of Group I and Group II metabotropic glutamate (mGlu) receptors: behavioural characterization and implications for the treatment of CNS disorders. *Behav Pharmacol* 2003; 14(4): 257-277.

Stark H, Graßmann S, Reichert U. Struktur, Funktion und potentielle therapeutische Bedeutung von NMDA-Rezeptoren. *Pharmazie in unserer Zeit* 2000; 29(3): 159-166.

Stefansson H, Sigurdsson E, Steinthorsdottir V, Bjornsdottir S, Sigmundsson T, Ghosh S, Brynjolfsson J, Gunnarsdottir S, Ivarsson O, Chou TT, Hjaltason O, Birgisdottir B, Jonsson H, Gudnadottir VG, Gudmundsdottir E, Bjornsson A, Ingvarsson B, Ingason A, Sigfusson S, Hardardottir H, Harvey RP, Lai D, Zhou M, Brunner D, Mutel V, Gonzalo A, Lemke G, Sainz J, Johannesson G, Andresson T, Gudbjartsson D, Manolescu A, Frigge ML, Gurney ME, Kong A, Gulcher JR, Petursson H, Stefansson K. Neuregulin1 and susceptibility to schizophrenia. *Am J Hum Genet* 2002; 71(4): 877-922.

Stefansson H, Steinthorsdottir V, Thorgeirsson TE, Gulcher JR, Stefansson K. Neuregulin 1 and schizophrenia. *An Med* 2004; 36(1): 62-71.

Stefansson H, Rujescu D, Cichon S, Pietiläinen OP, Ingason A, Steinberg S, Fossdal R, Sigurdsson E, Sigmundsson T, Buizer-Voskamp JE, Hansen T, Jakobsen KD, Muglia P, Francks C, Matthews PM, Gylfason A, Halldorsson BV, Gudbjartsson D, Thorgeirsson TE, Sigurdsson A, Jonasdottir A, Jonasdottir A, Bjornsson A, Mattiasdottir S, Blondal T, Haraldsson M, Magnusdottir BB, Giegling I, Möller HJ, Hartmann A, Shianna KV, Ge D, Need AC, Crombie C, Fraser G, Walker N, Lonnqvist J, Suvisaari J, Tuulio-Henriksson A, Paunio T, Touloupoulou T, Bramon E, Di Forti M, Murray R, Ruggeri M, Vassos E, Tosato S, Walshe M, Li T, Vasilesci C, Mühleisen TW, Wang AG, Ullum H, Djurovic S, Melle I, Olesen J, Kiemeny LA, Franke B; GROUP, Sabatti C, Freimer NB, Gulcher JR, Thorsteinsdottir U, Kong A, Andreassen OA, Ophoff RA, Georgi A, Rietschel M, Werge T, Petursson H, Goldstein DB, Nöthen MM, Peltonen L, Collier DA, St Clair D, Stefansson K. Large recurrent microdeletions associated with schizophrenia. *Nature* 2008; 455(7210): 232-236.

Stefansson H, Ophoff RA, Steinberg S, Andreassen OA, Cichon S, Rujescu D, Werge T, Pietiläinen OP, Mors O, Mortensen PB, Sigurdsson E, Gustafsson O, Nyegaard M, Tuulio-Henriksson A, Ingason A, Hansen T, Suvisaari J, Lonnqvist J, Paunio T, Borglum AD, Hartmann A, Fink-Jensen A, Nordentoft M, Hougaard D, Norgaard-Pedersen B, Bottcher

Y, Olesen J, Breuer R, Moller HJ, Giegling I, Rasmussen HB, Timm S, Mattheisen M, Bitter I, Rethelyi JM, Magnusdottir BB, Sigmundsson T, Olason P, Masson G, Gulcher JR, Haraldsson M, Fossdal R, Thorgeirsson TE, Thorsteinsdottir U, Ruggeri M, Tosato S, Franke B, Strengman E, Kiemenev LA, Melle I, Djurovic S, Abramova L, Kaleda V, Sanjuan J, de Frutos R, Bramon E, Vassos E, Fraser G, Ettinger U, Picchioni M, Walker N, Touloupoulou T, Need AC, Ge D, Yoon JL, Shianna KV, Freimer NB, Cantor RM, Murray R, Kong A, Golimbet V, Carracedo A, Arango C, Costas J, Jonsson EG, Terenius L, Agartz I., Petursson H, Nothen MM, Rietschel M, Matthews PM, Muglia P, Peltonen L, St Clair D, Goldstein DB, Stefansson K, Collier DA. Common variants conferring risk of schizophrenia. *Nature* 2009; 460(7256): 744-747.

Stephenson FA. Subunit characterization of NMDA receptors. *Curr Drug Targets* 2001; 2(3): 233-239.

Straub RE, Jiang Y, MacLean CJ, Ma Y, Webb BT, Myakishev MV, Harris-Kerr C, Wormley B, Sadek H, Kadambi B, Cesare AJ, Gibberman A, Wang X, O'Neill FA, Walsh D, Kendler KS. Genetic variation in the 6p22.3 gene DTNBP1, the human ortholog of the mouse dysbindin gene, is associated with schizophrenia. *Am J Hum Genet* 2002; 72(4): 1007.

Straub RE, Jing Y, MacLean CJ, Ma Y, Webb BT, Myakishev MV, Harris-Kerr C, Wormley B, Sadek H, Kadambi B, Cesare AJ, Gibberman A, Wang X, O'Neill FA, Walsh D, Kendler KS. Genetic variation in the 6p22.3 gene DTNBP1, the human ortholog of the mouse dysbindin gene, is associated with schizophrenia. *Am J Hum Genet* 2002; 71(2): 337-348.

Straub RE, Weinberger DR. Schizophrenia genes – famine to feast. *Biol Psychiatry* 2006; 60(2): 81-83.

Sucher NJ, Awobuluyi M, Choi YB, Lipton SA. NMDA receptors. From genes to channels. *Trends Pharmacol Sci* 1996; 17(10): 348-355.

Sugihara H, Moriyoshi K, Ishii T, Masu M, Nakanishi S. Structures and properties of seven isoforms of the NMDA receptor generated by alternative splicing. *Biochem Biophys Res Commun* 1992; 185(3): 826-832.

Sullivan PF, Lin D, Tzeng JY, van den Oord E, Perkins D, Stroup TS, Wagner M, Lee S, Wright FA, Zou F, Liu W, Downing AM, Lieberman J, Close SL. Genomwide association for schizophrenia in the CATIE study: results of stage 1. *Mol Psychiatry* 2008; 13(6): 570-584.

Sweatt JD. Hippocampal function in cognition. *Psychopharmacology (Berl)* 2004; 174(1): 99-110.

Swope SL, Moss SJ, Raymond LA, Huganir RL. Regulation of ligand-gated ion channels by protein phosphorylation. *Adv Second Messenger Phosphoprotein Res* 1999; 33: 49-78.

Takahashi T, Feldmeyer D, Suzuki N, Onodera K, Cull-Candy SG, Sakimura K, Mishina M. Functional correlation of NMDA receptor subunit expression with the properties of single-channel and synaptic currents in developing cerebellum. *J Neurosci* 1996; 16(14): 4376-4382.

Tang YP, Shimizu E, Dube GR, Rampon C, Kerchner GA; Zhuo M, Liu G, Tsien JZ. Genetic enhancement of learning and memory in mice. *Nature* 1999; 401(6748): 63-69.

Tang J, Chen X, Xu X, Wu R, Zhao J, Hu Z, Xia K. Significant linkage and association between a functional (GT)_n polymorphism in promoter of the N-methyl-D-aspartate receptor subunit gene (GRIN2A) and schizophrenia. *Neurosci Lett* 2006; 409(1): 80-82.

Tewes U. HAWIE-R. Hamburger-Wechsler-Intelligenztest für Erwachsene. Revision; Bern, Göttingen, Toronto, Seattle 1994: Huber.

The International Schizophrenia Consortium, 2008.

Thompson CL, Drewery DL, Atkins HD, Stephenson FA, Chazot PL, Immunohistochemical localization of N-methyl-D-aspartate receptor NR1, NR2A, NR2B and NR2C/D subunits in the adult mammalian cerebellum. *Neurosci Lett* 2000; 283(2): 85-88.

Tingley WG, Roche KW, Thompson AK, Huganir RL. Regulation of NMDA receptor phosphorylation by alternative splicing of the C-terminal domain. *Nature* 1993; 364(6432): 70-73.

Tong G, Shepherd D, Jahr CE. Synaptic desensitization of NMDA receptors by calcineurin. *Science* 1995; 267(5203): 1510-1512.

Traynelis SF, Hartley M, Heinemann SF. Control of proton sensitivity of the NMDA receptor by RNA splicing and polyamines. *Science* 1995; 268(5212): 873-876.

Tsuang MT, Tohen M, Zahner GEP. *Textbook in Psychiatry epidemiology*. New York 1995: Wiley-Liss.

Tsuang MT, Stone WS, Faraone SV. Genes, environment and schizophrenia. *BR J Psychiatr Suppl* 2001; 40: 18-24.

Vallone D, Picetti P, Borrelli E. Structure and function of dopamine receptors. *Neurosci Biobehav Rev* 2000; 24(1): 125-132.

Van den Bogaert A, Schumacher J, Schulze TG, Otte AC, Ohlraun S, Kovalenko S, Becker T, Freudenberg J, Jonsson EG, Mattila-Evenden M, Sedvall GC, Czerski PM, Kapelski P, Hauser J, Maier W, Rietschel M, Propping P, Nothen MM, Cichon S. The DTNBP1 (dysbindin) gene contributes to schizophrenia, depending on family history of the disease. *AM J Hum Genet* 2003; 73(6): 1438-1443.

Vicini S, Wang JF, Li JH, Zhu WJ, Wang YH, Luo JH, Wolfe BB, Grayson DR. Functional and pharmacological differences between recombinant N-methyl-D-aspartate receptors. *J Neurophysiol* 1998; 79(2): 555-566.

Wenzel A, Scheurer L, Künzi R, Fritschy JM, Mohler H, Benke D. Distribution of NMDA receptor subunit proteins NR2A, 2B, 2C and 2D in rat brain. *Neuroreport* 1995; 7(1): 45-48.

Williams NM, Bowen T, Spurlock G, Norton N, Williams HJ, Hoogendoorn B, Owen MJ, O'Donovan MC. Determination of the genomic structure and mutation screening in schizophrenic individuals for five subunits of the N-methyl-D-aspartate glutamate receptor. *Molecular Psychiatry* 2002; 7(5): 508-514.

Williams HJ, Owen MJ, O'Donovan MC. New findings from genetic association studies of schizophrenia. *J Hum Genet* 2009; 54(1): 9-14.

Willis A, Bender HU, Steel G, Valle D. PRODH variants and risk for schizophrenia. *Amino acids* 2008; 35(4): 673-679.

Wittchen HU, Saß H, Zaudig M. Diagnostisches und Statistisches Manual Psychischer Störungen DSM-IV. Göttingen, Bern, Toronto, Seattle 1996: Hogrefe Verlag für Psychiatrie.

Wittchen HU, Zaudig M, Fydrich T. SKID Strukturiertes Klinisches Interview für DSM-IV Achse I und II. Göttingen, Bern, Toronto, Seattle 1997: Hogrefe Verlag für Psychiatrie.

Wobrock T, Pajonk FG, Falkai P. Schizophrenie. *Fortschr Neurol Psychiatr* 2004; 72: 98-113.

Wong WT, Wong RO. Changing specificity of neurotransmitter regulation of rapid dendritic remodeling during synaptogenesis. *Nat Neurosci* 2000; 4(4): 351-352.

Wright IC, Rabe-Hesketh S, Woodruff PW, David AS, Murray RM, Bullmore ET. Meta-analysis of regional brain volumes in schizophrenia. *Am J Psychiatr* 2000; 157(1): 16-25.

Wunderlich M. Einführung in die MALDI-Massen-Spektrometrie, IZFK Ulm.

Wyllie DJ, Béhé P, Nassar M, Schoepfer R, Colquhoun D. Single-channel currents from recombinant NMDA NR1a/NR2D receptors expressed in *Xenopus* oocytes. *Proc Biol Sci* 1996; 263(1373): 1079-1086.

Wyllie DJ, Béhé P, Colquhoun D. Single-channel activations and concentration jumps: comparison of recombinant NR1a/NR2A and NR1a/NR2D NMDA receptors. *J Physiol* 1998; 510(Pt 1): 1-18.

Zhao X, Li H, Tang R, Chen W, Liu J, Feng G, Shi J, Yan L, Liu H, He L. Significant association between the genetic variations in the 5' end of the N-methyl-D-aspartate receptor subunit gene GRIN1 and schizophrenia. *Biol Psychiatry* 2006; 59(8): 747-753.

Zhao Q, Che R, Zhang Z, Wang P, Li J, Li Y, Huang K, Tang W, Feng G, Lindpaintner K, He L, Shi Y. Positive association between GRIN2B gene and bipolar disorder in the Chinese Han Population. *Psychiatr Res* 2011; 185(1-2): 290-292.

Zimmer M, Fink TM, Franke Y, Lichter P, Spiess J. Cloning and structure of the gene encoding the human N-methyl-D-aspartate receptor (NMDAR1). *Gene* 1995; 159(2): 219-223.

Zobel A, Maier W. Endophänotypen – ein neues Konzept zur biologischen Charakterisierung psychischer Störungen. *Nervenarzt* 2004; 75: 205-214.

Zukin RS, Bennett MV. Alternatively spliced isoforms of the NMDAR1 receptor subunit. *Trends Neurosci* 1995; 18(7): 306-313.

Danksagung

Hiermit möchte ich mich bei allen Personen, die mich tatkräftig mit Informationen, wertvollen Tipps und Ratschlägen unterstützt haben, ganz herzlich bedanken.

Vor allem bei meinem Betreuer, Herrn Prof. Dr. Dan Rujescu, möchte ich mich dafür bedanken, dass er meine Doktorarbeit sehr entgegenkommend und geduldig betreut hat. Zudem danke ich Frau Dr. Ina Giegling für die Unterstützung bei allen statistischen Fragen und auch bei allen anderen Problemen, die während dieser Arbeit aufgetreten sind.

Zudem möchte ich mich noch ganz herzlich bei meiner Arbeitsgruppe, allen voran Frau Heike Konnerth, für die gute Betreuung während des praktischen Abschnitts dieser Arbeit und für die sehr freundliche und kollegiale Arbeitsatmosphäre bedanken.

Ganz besonders möchte ich mich bei Frau Dr. Annette Hartmann bedanken. Zum einen für ihre unermüdliche Korrekturarbeit und ihre wertvollen Tipps bei der Umsetzung dieser Arbeit, zum anderen dafür, dass sie jederzeit ein offenes Ohr für mich hatte, egal welchem Stress sie selbst gerade ausgesetzt war.

Ein ganz großes Dankeschön geht auch an meine Korrekturleser, meine Mutter, Frau Elisabeth Dinges, und meinen Freund, Herrn Steffen Helmreich. Ihre Hilfe bzw. konstruktive Kritik hat in außerordentlichem Maße zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

