

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

**GLYT2**  
**in seiner Bedeutung für die Schizophrenie**

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

vorgelegt von  
Clara Luisa Fieguth

aus  
Hannover

2013

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Dan Rujescu

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Bernd Sutor

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

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

Tag der mündlichen Prüfung: 18.04.2013

meiner Familie gewidmet

# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Zusammenfassung</b>	<b>1</b>
<b>2. Einleitung</b>	<b>3</b>
2.1. Das Krankheitsbild der Schizophrenie	3
2.1.1. Die Definition der Schizophrenie im historischen Wandel	3
2.1.2. Aktuelle Klassifikation der Schizophrenie	5
2.1.3. Symptomatik der Schizophrenie	7
2.1.4. Verlauf und Prognose der Schizophrenie	8
2.1.5. Epidemiologie der Schizophrenie	10
2.1.6. Die Theorie der multifaktoriellen Ätiologie	11
2.1.6.1. Risikofaktoren für die Schizophrenie	11
2.1.6.2. Die Two-Hit-Hypothese der Ätiologie	12
2.1.7. Vorstellungen zur Pathogenese	12
2.1.7.1. Neurobiologie der Schizophrenie	12
2.1.7.2. Neurochemie der Schizophrenie	15
2.1.7.3. Die pathogenetischen Modelle	16
2.1.7.4. Das Konzept der Endophänotypen	17
2.2. Die Genetik der Schizophrenie	18
2.2.1. Studien zur familiären Häufung der Schizophrenie	18
2.2.2. Die Molekulargenetik der Schizophrenie	19
2.2.2.1. Kopplungsstudien	20
2.2.2.2. Assoziationsstudien	22
2.3. Der Glycintransporter 2 und die Schizophrenie	26
2.3.1. Glycin als inhibitorischer Neurotransmitter	26
2.3.2. Glycin als exzitatorischer Neurotransmitter	27
2.3.2.1. Glutamat und der NMDA-Rezeptor in der Schizophrenie	28
2.3.2.2. Modulation der NMDA-Rezeptor-Aktivität durch Glycin	30
2.3.3. Die Rolle des GLYT2 im Glyzinneurotransmittersystem	31
2.3.4. Das Transportprotein GLYT2	33
2.3.4.1. Die Struktur des GLYT2	33
2.3.4.2. Die Funktionsweise des GLYT2	34
2.3.4.3. Lokalisation und Regulierung des GLYT2	35
2.3.5. Das GLYT2-Gen SLC6A5	35
2.3.5.1. Chromosomale Position und genomische Organisation	35
2.3.5.2. Molekulargenetische Studien zu SLC6A5	36
<b>3. Fragestellung</b>	<b>39</b>
<b>4. Material und Methoden</b>	<b>41</b>
4.1. Vorbedingungen	41
4.2. Datengewinnung	41
4.3. Studienteilnehmer	42
4.3.1. Kontrollprobanden	42
4.3.2. Patienten	43

4.4. Untersuchte Einzelnukleotidpolymorphismen	45
4.5. Laborverfahren	46
4.5.1. DNA-Extraktion	46
4.5.2. Konzentrationsmessung und -einstellung der DNA	48
4.5.3. Genotypisierung	51
4.5.3.1. iPlex-Verfahren	51
4.5.3.1.1. Multiplex-Polymerase-Kettenreaktion	51
4.5.3.1.2. SAP-Behandlung	54
4.5.3.1.3. iPlex-Extensionsreaktion	54
4.5.3.2. MALDI-TOF Massenspektrometrie	57
4.6. Statistische Auswertung	58
<b>5. Ergebnisse</b>	<b>60</b>
5.1. Analyse des Polymorphismus rs4923219	61
5.1.1. Allelverteilung des SNPs rs4923219	61
5.1.2. Genotypverteilung des SNPs rs4923219	62
5.2. Analyse des Polymorphismus rs4923220	64
5.2.1. Allelverteilung des SNPs rs4923220	64
5.2.2. Genotypverteilung des SNPs rs4923220	65
5.3. Analyse des Polymorphismus rs11025642	66
5.3.1. Allelverteilung des SNPs rs11025642	66
5.3.2. Genotypverteilung des SNPs rs11025642	67
5.4. Analyse des Polymorphismus rs16906511	69
5.4.1. Allelverteilung des SNPs rs16906511	69
5.4.2. Genotypverteilung des SNPs rs16906511	69
5.5. Analyse des Polymorphismus rs10500882	71
5.5.1. Allelverteilung des SNPs rs10500882	71
5.5.2. Genotypverteilung des SNPs rs10500882	71
5.6. Analyse des Polymorphismus rs1373165	72
5.6.1. Allelverteilung des SNPs rs1373165	72
5.6.2. Genotypverteilung des SNPs rs1373165	73
5.7. Das Hardy-Weinberg-Equilibrium	74
5.8. Übersichtstabelle der signifikanten Ergebnisse	75
<b>6. Diskussion</b>	<b>76</b>
6.1. Diskussion des Studiendesigns	76
6.2. Diskussion der Ergebnisse	84
6.3. Ausblick	90
<b>7. Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>94</b>
<b>8. Literaturverzeichnis</b>	<b>98</b>
<b>9. Danksagung</b>	<b>124</b>

# 1. Zusammenfassung

Die Schizophrenie stellt als oft chronische psychiatrische Erkrankung, welche die fundamentalen Funktionen der Wahrnehmung, des Denkens und des Handelns in Mitleidenschaft zieht, eine schwere Beeinträchtigung und Belastung der Betroffenen und deren Angehörigen dar. Mit einem Lebenszeitrisiko von annähernd 1% zählt sie zudem nicht zu den seltenen Krankheiten, weshalb großes Interesse an der Aufklärung ihrer Ätiologie besteht. Als gesichert gilt dabei bisher lediglich, dass es sich um eine multifaktoriell bedingte Erkrankung mit sowohl komplex genetischen als auch umweltbedingten Ursachen handelt. Die molekulargenetische Forschung soll zur Aufdeckung der Gene, die die Suszeptibilität für die Erkrankung erhöhen, zur Quantifizierung der jeweiligen Risikoerhöhung und zur Verbesserung des Verständnisses der Interaktion der Gene sowohl untereinander als auch mit den ätiopathogenetisch relevanten Umweltfaktoren beitragen.

Das auf Chromosom 11 lokalisierte Gen SLC6A5 kodiert für den Glycintransporter GLYT2, der für die Wiederaufnahme des Glycins aus dem Zytosol in die Präsynapse verantwortlich ist und daher die extrazelluläre Glycinkonzentration beeinflusst. SLC6A5 stellt aufgrund mehrerer Gegebenheiten ein interessantes Gen in der Schizophrenieforschung dar. Zum einen lässt seine Rolle im Glycinneurotransmittersystem eine Auswirkung auf die Funktion des NMDA-Rezeptors, welcher im Zentrum der Glutamathypothese der Schizophrenie steht, plausibel erscheinen. Zum anderen hat die inhibitorische glycinerge Neurotransmission, für welche die GLYT2-Funktion essentiell ist, Auswirkungen auf die auch in der Schizophrenie vermutlich beeinträchtigte neuronale Plastizität und ZNS-Entwicklung. Darüber hinaus weisen Erkrankungen, welche nachweislich durch SLC6A5-Mutationen bedingt sind, in ihrer Symptomatik Übereinstimmungen mit der Schizophrenie auf. Diese Berührungspunkte regten die Untersuchung des Gens und der umliegenden chromosomalen Region im Hinblick auf deren mögliche Bedeutung für die Schizophrenie an.

Eine in der Molekulargenetik zunehmend verfolgte Strategie stellen die Assoziationsstudien dar, welche gut geeignet sind, um häufig vorkommende Genvariationen mit kleinem Effekt, wie sie bei der Schizophrenie vermutet werden, aufzudecken. In der hier durchgeführten Fall-Kontroll-Assoziationsstudie mit 510

schizophrenen Patienten und 618 gesunden Kontrollprobanden eines kaukasischen Kollektivs wurden sechs Marker-Einzelnukleotidpolymorphismen des SLC6A5-Gens mit Hilfe einer Kombination aus dem iPLEX-Verfahren und der MALDI-TOF-Massenspektrometrie analysiert.

Zusammenfassend ergeben die Ergebnisse in diesem Studienkollektiv eine signifikante Assoziation der SNPs rs4923219 und rs11025642, welche beide 5´ des Gens SLC6A5 lokalisiert sind, mit der Schizophrenie. Des Weiteren konnte ein Trend in Richtung des häufigeren Vorkommens der homozygoten A-Träger in der Gruppe der schizophrenen Patienten für den SNP rs10500882 gefunden werden. Die Analyse der übrigen SNPs, rs4923220, rs16906511 und rs1373165, erbrachte kein statistisch signifikantes Ergebnis.

Der Vergleich mit Studien, die andere SNPs des SLC6A5-Gens betrachten, führt zu widersprüchlichen Ergebnissen: Eine Studie, welche eine mögliche Relevanz des SLC6A5-Gens annimmt (Deng et al. 2008), steht dabei einer Untersuchung mit negativem Resultat (Jamra et al. 2006) gegenüber. Erklärungen für diese Diskrepanz bietet neben dem Problem der Populationsstratifikation, welche zu falsch-positiven Ergebnissen führen kann, auch die Analyse der Studienpopulationen, welche bei unzureichender Größe das Entstehen falsch-negativer Ergebnisse begünstigen.

Insgesamt bestätigt die hier gefundene Assoziation einzelner Marker-SNPs des SLC6A5-Gens Vermutungen einer möglichen Relevanz dieses Genabschnittes in der Ätiologie der Schizophrenie. Besonders zu erwähnen sind die Hinweise auf die Lokalisation eines Suszeptibilitätslocus 5´ des SLC6A5-Gens. Die Befunde erfordern jedoch weitere Replikationsstudien und Metaanalysen. Darüber hinaus bedarf es Untersuchungen zur Präzisierung der Funktion jener Gene, welche im Kopplungsungleichgewicht mit den hier mit der Schizophrenie assoziierten Polymorphismen stehen. Auch potentielle Gen-Gen-Interaktionen sowie die Epigenetik des SLC6A5-Gens und benachbarter Gene sollten Gegenstand weiterer Studien sein. Ziel dabei ist nicht nur die Ergründung der Ätiopathogenese der Schizophrenie, sondern – mit Hilfe der gewonnenen Erkenntnisse – auch eine präzise, nebenwirkungsarme und eventuell sogar den individuell zu Grunde liegenden genetischen Faktoren angepasste Therapie und Prävention dieser belastenden Erkrankung.

## 2. Einleitung

Ein Erkrankungsbild mit tiefgreifenden Veränderungen im Denken und in der Wahrnehmung und dem Verlust der fundamentalen Funktionen, welche einer Person das Gefühl der Individualität, Einzigartigkeit und Selbstbestimmtheit geben (World Health Organisation 2001), wurde 1908 durch Paul Eugen Bleuler beschrieben und erstmals als Schizophrenie, als Abspaltung („schizein“, altgriechisch für abspalten) der Seele („phren“, altgriechisch für Seele; Fusar-Poli und Politi 2008), bezeichnet. Auch nach Abklingen der akuten, eindrücklichen Symptomatik verschwindet die Erkrankung meist nicht vollständig, gerade die residualen Symptome führen oft zu einer bleibenden Einschränkung, einer schlechten Lebensqualität und einer großen Belastung der Familie (Rössler et al. 2005). Diese Umstände haben die Schizophrenie zu einer viel beachteten Erkrankung in der wissenschaftlichen Forschung gemacht. In den letzten Jahrzehnten beteiligte sich auch speziell die molekulargenetische Ursachenforschung an den Bemühungen um ein klareres Bild der noch immer nicht in allen Einzelheiten verstandenen Schizophrenieentstehung.

### 2.1. Das Krankheitsbild der Schizophrenie

Obleich heutzutage vielgestaltige klinische Bilder und eine große Variabilität bezüglich des Verlaufes und der Prognose beobachtet werden, ist die Schizophrenie in der Mehrheit der Fälle noch immer eine stark einschränkende psychiatrische Erkrankung mit tiefgreifenden Auswirkungen auf die Betroffenen und deren Familien (Rössler et al. 2005). Sie ist als oft lebenslange Erkrankung und durch die mit ihr einhergehenden Defizite eine der zehn Erkrankungen mit dem weltweit größten Beitrag zu den DALYs (*Disability-Adjusted Life Years lost*), den durch Behinderung verlorenen gesunden Lebensjahren (World Health Organisation 2001).

#### 2.1.1. Die Definition der Schizophrenie im historischen Wandel

Obwohl angenommen wird, dass die Krankheit Schizophrenie schon einige Jahrtausende existiert, wurde sie zum ersten Mal 1896 detailliert von Emil Kraepelin unter dem Begriff *Dementia praecox* beschrieben (Kraepelin 1896). Er verstand darunter eine Erkrankung, welche sich als Katatonie, Hebephrenie oder *Dementia paranoides* äußern könne. Dieser Erkrankung stellte er das manisch-depressive

Irresein gegenüber und legte damit den Grundstein für die noch heute gültige dichotome Unterteilung der Psychosen. Kraepelin unterstrich die Bedeutung der Verlaufsbeobachtung, wobei er bei der Dementia praecox einen Beginn in der Jugend oder dem frühen Erwachsenenalter, einen Hang zur Verschlechterung und einen Endzustand der mentalen Stumpfsinnigkeit als charakteristisch ansah. Demgegenüber kennzeichneten das manisch-depressive Irresein ein periodisches Auftreten ohne Verschlechterung und eine bessere Prognose (Möller et al. 2002).

Der von Kraepelin geprägten Annahme, es handele sich bei der Dementia praecox um eine einzige Krankheit mit stets derselben Ätiopathogenese, wurde von Paul Eugen Bleuler die These gegenübergestellt, die Schizophrenie, wie er sie 1908 erstmals nannte (Fusar-Poli und Politi 2008), sei eine Gruppe von Erkrankungen (Bleuler 1911; Jablensky 2006). Bleuler legte Wert auf eine exakte Beobachtung, die ihm die Beschreibung einer Reihe von Grundsymptomen erlaubte, die seiner Ansicht nach bei jedem Patienten immer vorhanden seien, und welche er daher als essentiell für die Schizophrenie einstufte. Die von Kraepelin beschriebenen Krankheitszeichen Wahn und Halluzinationen rückten dabei als akzessorische Symptome zugunsten eines als „Bleulers vier A´s“ betitelten Bildes in den Hintergrund. Dieses Bild, welches dem heutigen Verständnis der Negativsymptomatik nahe kommt, beruhte für Bleuler auf der Desintegration der verschiedenen psychischen Funktionen und äußerte sich als Assoziationslockerung, unangemessener oder flacher Affekt, Ambivalenz und Autismus. Die „vier A´s“ sah Bleuler als fundamental für die Diagnose Schizophrenie an. Im Gegensatz zu Kraepelin beschrieb er den Verlauf und die Prognose der Erkrankung als variabel und nicht notwendigerweise deletär (Berger 2009).

Eine wiederum abweichende Ansicht stellte Karl Theodor Jaspers 1946 vor. Es standen dabei die Kommunikationsstörungen und die Unverständlichkeit des Wahnerlebens im Zentrum seiner Überlegungen (Jaspers 1946). Eine Weiterentwicklung dieser Ideen erfolgte noch in den 1940er Jahren durch Kurt Schneider (Schneider 2007), der 11 pathognomonische Erstrangsymptome definierte, welche heute der Positivsymptomatik zugezählt werden.

Elemente jeder dieser drei Ansätze finden sich noch heute in unterschiedlicher Kombination in den beiden aktuellen Diagnosesystemen wieder, so überdauerte

beispielsweise die kraepelinsche Vorstellung der Schizophrenie als chronische Erkrankung. Des Weiteren fand das Konzept der Grundsymptome nach Bleuler vor allem in den USA Anklang, wohingegen Schneiders Erstrangsymptomen im Rest der Welt mehr Bedeutung zugemessen wurde (Tandon et al. 2009). Seit den 1970er Jahren wurde im Zuge eines Versuches der Angleichung der Diagnosekriterien die Negativsymptomatik, welche in etwa den Bleulerschen Grundsymptomen entspricht, der Positivsymptomatik, wie sie von Schneider als Erstrangsymptomatik herausgearbeitet wurde, gegenübergestellt (Andreasen 1985). Operationalisiert wurde dies 1987 in der PANSS (*Positive And Negative Syndrome Scale*; Skala der positiven und negativen Syndrome; Kay et al. 1987). Aus diesen Tendenzen entwickelten sich nach zunächst unterschiedlichen Ansätzen die heute gebräuchlichen und mittlerweile in vielen Bereichen miteinander übereinstimmenden Klassifikationssysteme DSM-IV (Diagnostisches und Statistisches Handbuch Psychischer Störungen in seiner vierten Version; American Psychiatric Association 1994; Saß et al. 1996) und ICD-10, Kapitel V (Internationale statistische Klassifikation der Krankheiten in ihrer 10. Version, Kapitel V (F): Psychische und Verhaltensstörungen; World Health Organisation 2005).

### **2.1.2. Aktuelle Klassifikation der Schizophrenie**

Die Diagnose einer Schizophrenie wird anhand operationalisierter Kriterien eines der beiden anerkannten Klassifikationssysteme DSM-IV und ICD-10 gestellt. Dabei sind bei beiden mindestens ein charakteristisches Symptom oder mindestens zwei weniger charakteristische Symptome einer Reihe definierter Krankheitszeichen für die Diagnosestellung notwendig. Zudem ist der Ausschluss einer körperlichen Erkrankung, welche die Symptome verursachen könnte, obligat. Tabelle 2-1 (S. 6) gibt einen Überblick über die Kriterien.

Neben der grundsätzlichen Übereinstimmung gilt es insbesondere auch den deutlichsten Unterschied, welcher das Zeitkriterium betrifft, hervorzuheben. Nach DSM-IV wird eine sechsmonatige Krankheitsperiode gefordert, wohingegen in der ICD-10-Klassifikation die Zeitspanne von lediglich einem Monat für die Diagnose ausreichend ist.

**Tabelle 2-1** Gegenüberstellung der Kriterien für die Diagnose der Schizophrenie nach DSM-IV und ICD-10.

DSM-IV	ICD-10
Erforderlich für die Diagnose Schizophrenie: Vorhandensein jedes der folgenden Kriterien <b>A-E</b> .	Erforderlich für die Diagnose Schizophrenie: mindestens ein eindeutiges Symptom der Gruppen 1–4 oder mindestens zwei Symptome der Gruppen 5–8.
<p><b>A. Charakteristische Symptome:</b> mindestens zwei der folgenden, jedes bestehend für einen erheblichen Teil der Zeitspanne von einem Monat (oder weniger, falls erfolgreich behandelt; nur ein Symptom ist erforderlich, falls es sich um bizarren Wahn oder eine kommentierende oder dialogisierende Stimme handelt)</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Wahn</li> <li>2. Halluzinationen</li> <li>3. desorganisierte Sprechweise</li> <li>4. grob desorganisiertes oder katatones Verhalten</li> <li>5. negative Symptome (flacher Affekt, Alogie, Willensschwäche)</li> </ol>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Gedankenlautwerden, -eingebung, -entzug, -ausbreitung.</li> <li>2. Kontroll- oder Beeinflussungswahn; Gefühl des Gemachten bezüglich Körperbewegungen, Gedanken, Tätigkeiten oder Empfindungen; Wahnwahrnehmungen</li> <li>3. Kommentierende oder dialogische Stimmen</li> <li>4. Anhaltender, kulturell unangemessener oder völlig unrealistischer Wahn (bizarrer Wahn)</li> <li>5. Anhaltende Halluzinationen jeder Sinnesmodalität</li> <li>6. Gedankenabreißen oder Einschreibungen in den Gedankenfluss</li> <li>7. Katatone Symptome wie Erregung, Haltungstereotypien, Negativismus oder Stupor</li> <li>8. Negative Symptome wie auffällige Apathie, Sprachverarmung, verflachter oder inadäquater Affekt</li> </ol>
<b>B. Soziale, berufliche Leistungseinbußen</b>	-
<b>C. Dauer:</b> Zeichen des Störungsbildes halten für mindestens 6 Monate an, davon mindestens 1 Monat mit Symptomen, die das Kriterium A erfüllen.	Diese Symptome müssen fast ständig während eines Monats oder länger deutlich vorhanden gewesen sein.
<b>D. Ausschluss von schizoaffektiver und affektiver Störung</b>	-
<b>E. Ausschluss von Substanzeinfluss und medizinischem Krankheitsfaktor</b>	Bei eindeutiger Gehirnerkrankung, während einer Intoxikation oder während eines Entzuges soll keine Schizophrenie diagnostiziert werden.

Nach der Diagnosestellung kann anhand des psychopathologischen Befundes die Bestimmung des vorliegenden Subtyps der Schizophrenie erfolgen, wobei das klinische Bild und somit auch der Subtyp im Laufe der Erkrankung einer Änderung unterworfen sein können (Möller et al. 2005). Zwischen den angesprochenen Klassifikationssystemen gibt es auch bei der Definition der verschiedenen Subtypen Abweichungen, wobei in beiden – wenn auch mit zum Teil leicht divergierenden Kriterien – zwischen einem paranoiden, einem katatonen, einem undifferenzierten

und einem residualen Typ unterschieden wird. Darüber hinaus entspricht der hebephrene Subtyp in der ICD-10 in etwa dem desorganisierten Subtyp des DSM-IV. Nicht vorhanden ist in der DSM-IV-Klassifikation die Diagnose der Schizophrenia simplex, welche nur nach ICD-10 vergeben werden kann.

### **2.1.3. Symptomatik der Schizophrenie**

Die Schizophrenie ist durch ein vielfältiges Erscheinungsbild gekennzeichnet, welches Krankheitszeichen aufweist, die nach ihrem klinischen Erscheinen in Positiv- und Negativsymptomatik sowie kognitive, desorganisierte, affektive und psychomotorische Symptome unterteilt werden können (Tandon et al. 2009). Daneben gibt es weitere, weniger spezifische Symptome, welche aber ebenfalls überzufällig häufig bei schizophrenen Patienten beobachtet werden.

Zu den eindrücklichsten Symptomen der Schizophrenie gehört die Positivsymptomatik, welche durch einen Realitätsverlust gekennzeichnet ist und unter anderem inhaltliche Denkstörungen und Halluzinationen beinhaltet. Der Wahn als für die Schizophrenie charakteristische inhaltliche Denkstörung stellt dabei eine falsche Beurteilung der Realität dar, an der mit subjektiver, erfahrungsunabhängiger und damit unkorrigierbarer Gewissheit festgehalten wird. Bei 90% der schizophrenen Patienten besteht dieses Symptom zumindest einmal im Verlauf der Erkrankung (Berger 2009). Am häufigsten treten dabei Verfolgungswahn und Beziehungswahn auf. Bei den Halluzinationen dominieren solche akustischer Art, meist als dialogisierende, kommentierende oder anklagende Stimmen, es finden sich jedoch auch optische, gustatorische und taktile Halluzinationen (Möller et al. 2005).

Ein eingeschränkter bis verflachter Affekt und eine Willensschwäche, welche sich als Ambivalenz und Ambitendenz manifestiert, kennzeichnen die Negativsymptomatik. Sie kann sich zudem in Abulie, Alogie, Anhedonie, Antriebslosigkeit und Apathie äußern (Andreasen 1987) und sowohl primär durch die Schizophrenie an sich als auch sekundär durch mit der Krankheit einhergehende Komplikationen wie zum Beispiel soziale Isolation und Depression bedingt sein (Möller 2007).

Desorganisiertes Denken und Handeln sind weitere Merkmale der Schizophrenie. Nach Andreasen (1987) kann bei der Desorganisation des Denkens zwischen

positiven und negativen formalen Denkstörungen unterschieden werden. Die positiven formalen Denkstörungen können in einer leichten Ausprägung vorliegen, wie dies bei der Umständlichkeit, dem Vorbeireden oder dem Verwenden von Neologismen der Fall ist; sie können jedoch auch das Ausmaß der Inkohärenz und Schizophasie erreichen. Desorganisiertes Handeln äußert sich demgegenüber unter anderem in unangemessenem Sozialverhalten und ziellosen oder bizarren Tätigkeiten.

Zu den affektiven Symptomen, welche mit der Schizophrenie einher- oder ihr vorausgehen können, zählen vor allem Symptome einer Depression, aber gerade in akut psychotischen Phasen auch Zeichen einer Manie wie gehobene oder gereizte Stimmung. Ebenfalls charakteristisch sind Parathymie, Gefühlsarmut und ein mangelnder affektiver Rapport.

Die psychomotorische Komponente der Schizophrenie beinhaltet Symptome der verminderten Psychomotorik wie Verlangsamung, Mutismus, Katalepsie, Flexibilitas cerea und Stupor, aber auch Zeichen einer gesteigerten Psychomotorik mit Unruhe, Bewegungsstereotypien, Manierismen, Verbigerationen, Echolalie und Echopraxie bis hin zum raptusartigen Erregungszustand. Das Vollbild eines perniziösen katatonen Zustandes ist seit der Verfügbarkeit der Neuroleptika jedoch selten geworden (Stompe et al. 2002).

Weitere häufige Symptome der Schizophrenie umfassen die psychotischen Ich-Störungen mit Gedankeneingebung, -entzug, und -ausbreitung und vegetative Symptome mit Störungen des Schlafes, des Appetits und der Libido sowie ferner kognitive Defizite und mangelnde Krankheitseinsicht. Auch andere psychiatrische Symptome, wie die einer Angststörung, treten auf, wobei die klare Abgrenzung zwischen einem Symptom im Rahmen der Schizophrenie und einer eigenständigen Erkrankung Probleme bereiten kann (Maj 2005).

#### **2.1.4. Verlauf und Prognose der Schizophrenie**

Entgegen der ursprünglichen Annahme Kraepelins, die Erkrankung sei stets durch ihre schlechte Prognose geprägt, zeigt die Schizophrenie zahlreiche Verlaufsformen, bei denen Besserung unterschiedlichen Ausmaßes zu jeder Zeit möglich ist (Ciompi

1980). Dennoch lassen sich charakteristische Stadien beschreiben, welche bei der Mehrzahl der Patienten – wenn auch in variierender Intensität und Dauer – zu finden sind.

Dem Erkrankungsbeginn voraus geht dabei die prämorbid Phase, in der nicht selten unspezifische kognitive, motorische oder soziale Dysfunktionen bestehen (Cannon et al. 2002). Diese Symptome können auch bei Hochrisikopersonen, also direkten Nachkommen schizophrener Patienten, die das Prädilektionsalter der Schizophrenie noch nicht erreicht haben, vermehrt beobachtet werden (Keshavan et al. 2010). Der Übergang in die Schizophrenie gestaltet sich oft schleichend in Form einer Prodromalphase, welche Wochen bis Jahre dauern und abgeschwächte Positivsymptomatik, Negativsymptomatik sowie einen Leistungseinbruch umfassen kann (Schultze-Lutter 2009). Der ersten floride-psychotischen Phase folgen meist jahrzehntelang wiederholte Episoden mit partiellen Remissionen und zunehmenden Defiziten (Ciompi 1980). Es schließt sich eine Plateauphase mit weniger ausgeprägter Positivsymptomatik und zunehmend in den Vordergrund tretender Negativsymptomatik an, die kognitiven Defizite verschlechtern sich dabei charakteristischerweise wenig (Thara 2004).

Bezüglich der Prognose ist festzuhalten, dass jeder Ausgang der Erkrankung von uneingeschränkter Ausheilung über teilweise Remission bis hin zu einem schweren Defekt- oder einem chronisch-psychotischen Endzustand möglich ist (Harrison et al. 2001). Der Verlauf der Erkrankung zeigt sich heute im Vergleich zum letzten Jahrhundert weniger maligne, wozu auch eine bessere neuroleptische Behandlung beiträgt (Menezes et al. 2006). Dennoch weisen schizophrene Patienten noch immer eine im Vergleich zur generellen Bevölkerung verdoppelte Mortalitätsrate auf (Parks et al. 2006). Dies beruht vor allem auf einer erhöhten Suizidrate, wobei 30% der Patienten mindestens einen Suizidversuch unternehmen (Radomsky et al. 1999) und 10% durch Suizid sterben (Caldwell und Gottesman 1990). Die erhöhte Mortalitätsrate beruht aber auch auf einem größeren Risiko für Unfälle und auf – vornehmlich kardiovaskulärer – Komorbidität (Saha et al. 2007). Weltweit ist die Lebensspanne schizophrener Patienten um etwa 10 Jahre im Vergleich zu der der allgemeinen Bevölkerung verringert (World Health Organisation 2001). Obwohl eine Vorhersage des Krankheitsverlaufes im Einzelfall nicht möglich ist, gelten als prognostisch

günstige Faktoren ein akuter Krankheitsbeginn, gute prämorbid Funktionsfähigkeit, gute kognitive Funktionen, Abwesenheit eines Substanzabusus, weibliches Geschlecht und ein später Ausbruch der Erkrankung (Riecher-Rössler und Rössler 1998; Flyckt et al. 2006).

### **2.1.5. Epidemiologie der Schizophrenie**

Das Prädilektionsalter für die Erstmanifestation der Schizophrenie liegt in der Jugend und dem frühen Erwachsenenalter. Über die Hälfte aller Schizophrenien beginnt vor dem 30. Lebensjahr. Dabei zeigt sich ein leichter geschlechtsspezifischer Unterschied; bei Männern tritt die Erkrankung durchschnittlich mit 21 Jahren, bei Frauen etwa fünf Jahre später auf (Möller et al. 2005).

Die weltweit ähnliche Inzidenz der Schizophrenie liegt bei 15,2/100000/Jahr (McGrath et al. 2004). Assoziiert mit der Erkrankung zeigen sich männliches Geschlecht, ein eigener Migrationshintergrund oder ein solcher der Eltern und Leben im städtischen Umfeld (McGrath et al. 2004). Letzteres könnte mit der „Theorie des sozialen Drifts“ erklärt werden, nach welcher schizophrene Personen durch ihre Erkrankung zunehmend sozial benachteiligt sind (Dohrenwend et al. 1992) und sich in die Anonymität der Stadt zurückziehen. Neuere Studien zeigen jedoch auch einen Zusammenhang zwischen städtischer Geburt oder städtischem Aufwachsen und der Schizophrenie, wodurch die Erklärung des Risikofaktors städtisches Umfeld allein mit der Drift-Hypothese in Frage gestellt wird (Mortensen et al. 1999; Pedersen et al. 2001).

Nach einer Metaanalyse von 188 Studien aus 46 Ländern, welche im Jahre 2005 durchgeführt wurde, beträgt das Lebenszeitrisko, eine Schizophrenie zu entwickeln, im Mittel 0,7% (Saha et al. 2005), wobei Männer – entgegen früherer Annahmen, welche ein geschlechterunspezifisches Risiko postulierten – dem 1,4-fachen Risiko ausgesetzt sind (McGrath et al. 2004). Die Punktprävalenz der Schizophrenie beträgt 4,6 pro 1000, die Lebenszeitprävalenz liegt bei 4,0 pro 1000 Personen. Anders als bei den Beobachtungen bezüglich der Inzidenz lässt sich bei der Prävalenz kein erhöhtes Vorkommen bei Männern oder in der Stadt Lebenden finden, sehr wohl aber eine signifikant höhere Prävalenz in Industriestaaten, welche jedoch noch nicht abschließend erklärt werden konnte (Saha et al. 2005).

## **2.1.6. Die Theorie der multifaktoriellen Ätiologie**

Trotz intensiver Forschung bleibt die Ätiologie der Schizophrenie bis heute unklar (Tandon et al. 2008a). Als gesichert gilt jedoch, dass es sich um eine Erkrankung mit sowohl komplex genetischen als auch umweltbedingten Ursachen handelt, welche in Kombination die Grundlage für die Entstehung der Erkrankung bilden (Tsuang et al. 2004).

### **2.1.6.1. Risikofaktoren für die Schizophrenie**

Als pränatale Risikofaktoren für die Schizophrenie gelten ein Ernährungsdefizit und mütterliche Infektionen während des ersten und frühen zweiten Trimenons der Schwangerschaft (Penner und Brown 2007). Vor allem die Influenza, aber auch weitere Infektionskrankheiten, wie beispielsweise Röteln oder Toxoplasmose (Brown et al. 2001, Brown et al. 2005), stehen im Verdacht, die Erkrankungswahrscheinlichkeit zu erhöhen. Als Mechanismus für die Entstehung der Schizophrenie wird dabei eine Immunreaktion des Fötus auf die Infektion diskutiert, welche eine pränatale Hirnschädigung bedingen könnte (Penner und Brown 2007).

Komplikationen während des Geburtsvorganges oder in der perinatalen Periode, die zu einer fetalen Hypoxie führen, scheinen ebenfalls mit der Schizophrenie assoziiert zu sein (McNeil et al. 2000; Byrne 2007).

Ein höheres Alter des Vaters bei der Konzeption gilt als gesicherter Risikofaktor für das Auftreten einer Schizophrenie (Malaspina et al. 2001, Byrne et al. 2003), wobei ein Alter über 35 Jahre mit einer Verdopplung des Risikos einhergeht (Wohl und Gorwood 2007).

Wiederholt wurde die Beobachtung gemacht, dass eine Geburt im späten Winter oder frühen Frühjahr mit einem 5-10% größerem Schizophrenierisiko vergesellschaftet ist (Torrey et al. 1997; McGrath und Welham 1999; Davies et al. 2003). Wie bereits oben besprochen, erwiesen sich auch ein eigener oder elterlicher Migrationshintergrund und ein städtisches Umfeld während der Kindheit und Jugend als wichtige Risikofaktoren (McGrath et al. 2004).

Eine ätiologische Bedeutung wird auch dem Cannabiskonsum in der Jugend zugesprochen (Semple et al. 2005; Moore et al. 2007). Es wird jedoch auch diskutiert, ob der Cannabiskonsum lediglich die Rolle eines Auslösefaktors einnimmt (Barnes et al. 2006).

#### **2.1.6.2. Die Two-Hit-Hypothese der Ätiologie**

Aus dem vielfältigen klinischen Bild sowie der vergeblichen Suche nach einem einzigen, der Schizophrenie stets und in allen Fällen zugrunde liegenden Faktor resultierten zahlreiche ätiologische Krankheitsmodelle, die die Zusammenführung aller bekannten Befunde und Symptome anstreben. Eine dieses Problem behandelnde Theorie, die *Two-Hit*-Hypothese, nimmt eine Kombination von Ursachen an. Neben einer genetischen Prädisposition, dem *first hit*, sei dabei ein prä- oder postnataler umweltbedingter ätiologischer Faktor als *second hit* ebenfalls eine Voraussetzung für die spätere Entwicklung des Störungsbildes (Bayer et al. 1999). Sowohl der genetische als auch der umweltbedingte Faktor scheinen dabei heterogen zu sein, sodass eine Vielzahl von Kombinationsmöglichkeiten zu einer Veranlagung für die Erkrankung führt (Andreasen 2000). Die so erlangte Prädisposition für die Schizophrenie äußert sich bereits vor Beginn der Symptomatik als Hirnentwicklungsstörung mit neurobiologischen und neurochemischen Auffälligkeiten (siehe Abschnitt 2.1.7.1. und 2.1.7.2.).

#### **2.1.7. Vorstellungen zur Pathogenese**

Der Mechanismus und die erforderlichen weiteren Einflüsse, welche dazu führen, dass es bei Vorliegen der oben besprochenen ätiologischen Faktoren letztendlich zur klinischen Manifestation der Erkrankung kommt, sind weitgehend unklar (Tandon et al. 2008b). Gesichert ist lediglich das Auftreten einer Reihe morphologischer und biochemischer ZNS-Besonderheiten, die das Aufstellen hypothetischer Modelle zur Pathogenese der Schizophrenie zulässt.

##### **2.1.7.1. Neurobiologie der Schizophrenie**

Die neurobiologische Basis der Schizophrenie spiegelt sich in zahlreichen Befunden hirnstruktureller Veränderungen bei schizophrenen Patienten wieder. So wurde auf der Suche nach morphologischen ZNS-Abweichungen wiederholt in Studien ein

reduziertes Hirnvolumen vor allem im Bereich des Frontallappens, des medialen Temporallappens und der hippocampalen Strukturen sowie ein erweitertes Ventrikelsystem beschrieben (Wright et al. 2000). Diese Veränderungen scheinen schon bei Ausbruch der Erkrankung vorhanden zu sein; so konnte bei Studien mit Neuerkrankten bereits eine Volumenreduktion des gesamten Gehirns und des Hippocampus gezeigt werden (Steen et al. 2006). Verringert war auch das Volumen bestimmter Strukturen der weißen Substanz wie das Corpus callosum (Arnone et al. 2008) – ein Befund, der sich mit der in Abschnitt 2.3.2.1. beschriebenen Glutamathypothese der Schizophrenie vereinbaren lässt. Zudem wurde eine Verminderung oder Umkehr der normalen linksbetonten Asymmetrie des Gehirns, besonders der des Planum temporale, bei an Schizophrenie Erkrankten nachgewiesen (Shapleske et al. 1999). Mit diesem Befund kongruent ist auch die Beobachtung, dass vermehrt Beid- und Linkshänder unter den Patienten zu finden sind (Sommer et al. 2001). Als zugrunde liegende Mechanismen für die geschilderten Auffälligkeiten werden dabei eine gestörte Axonbildung, Synapsenentwicklung oder Apoptose diskutiert (Keshavan et al. 2008; Catts und Catts 2000). Hinweise dafür, dass es sich bei den vorhandenen neurobiologischen Befunden tatsächlich um das Korrelat einer Reifungsstörung des Gehirns handelt, ergeben sich neben einer meist nicht vorhandenen Progredienz aus dem Fehlen neurodegenerativer Zeichen wie beispielsweise einer Astrogliose (Woods 1998). Neuere Studien legen jedoch entgegen früheren Annahmen zumindest bei einer Subgruppe der Erkrankten eine Progression morphologischer ZNS-Befunde im Verlauf der Erkrankung und somit eine degenerative Komponente zusätzlich zu der bestehenden Entwicklungsstörung nahe (DeLisi 1997).

Neben den morphologischen ZNS-Veränderungen lassen sich auch in der Hirnfunktion Differenzen zu gesunden Kontrollprobanden zeigen. Als Hypofrontalität wird dabei die fehlende Aktivierung des dorsolateralen präfrontalen Cortex bei Aufgaben, die diese Hirnstruktur beanspruchen, bezeichnet (Hill et al. 2004). Weitere Befunde legen eine gestörte Wechselwirkung zwischen verschiedenen Hirnregionen, beispielsweise zwischen Hippocampus und präfrontalem Cortex, nahe (Meyer-Lindenberg et al. 2005).

Auffällige EEG-Befunde bei schizophrenen Patienten betreffen ereigniskorrelierte Potentiale wie die *Mismatch Negativity*. Diese stellt ein auditives ereigniskorreliertes Potential dar, welches nur dann auftritt, wenn ein neuer auditiver Stimulus im Vergleich zu zuvor gehörten, gleichartigen Stimuli präsentiert wird. Bei schizophrenen Patienten ist diese *Mismatch Negativity* in ihrer Amplitude reduziert (Umbricht und Krljes 2005). Auch die Amplitude der P300, welche 300ms nach einem applizierten Reiz auftritt, ist bei schizophrenen Patienten weniger ausgeprägt (Ford 1999).

Bei Tests zu Augenbewegungen zeigen sich pathologisch vermehrte Aufholsakkaden bei Folgebewegungen (Clementz et al. 1992; Hong et al. 2006) und gehäufte Fehler während der Antisakkaden-Aufgabe, bei der reflektive Blicke auf ein Objekt zu unterdrücken sind und stattdessen zur Gegenseite geblickt werden soll (Turetsky et al. 2007).

Einen weiteren interessanten Befund stellt die gestörte Präpulsinhibition bei schizophrenen Patienten dar. Die physiologische Präpulsinhibition, welche das Phänomen bezeichnet, dass bei einem 80-300ms zuvor aufgetretenen abgeschwächten Reiz die Reaktion auf den folgenden Schreckreiz inhibiert wird, ist ein Beispiel für eine sensomotorische Bahnung. Bei schizophrenen Patienten zeigt sich gehäuft eine reduzierte Präpulsinhibition (Bender et al. 1999). Auch die Schreckreaktion selbst, der so genannte *Startle*-Reflex, zeigt sich bei schizophrenen Patienten verändert. Bei diesem Reflex, welcher sich als Zucken der Gesichts- und Körpermuskulatur, begleitet von einem Lidschluss und einer Beschleunigung des Herzschlags manifestiert, handelt es sich um eine natürliche Reaktion des Körpers auf plötzliche und intensive akustische, visuelle oder taktile Reize zum Schutz vor Verletzungen (Koch et al. 1999). Bei schizophrenen Patienten besteht eine abnorme Sensibilisierung bei mehreren aufeinander folgenden *Startle*-Stimuli, zudem ist die Habituation verringert (Meincke et al. 2004). Diese Befunde lassen eine gemeinsame genetische Grundlage des verstärkten *Startle*-Reflexes und eines die Schizophrenie begünstigenden Faktoren denkbar erscheinen, womit auch das Gen SLC6A5 in den Fokus rückt, da es eine Erkrankung mit übersteigertem Startle-Reflex – die Hyperekplexie – bedingen kann (Eulenburg et al. 2006; Rees et al. 2006).

### 2.1.7.2. Neurochemie der Schizophrenie

Störungen in mehreren ZNS-Neurotransmittersystemen werden heute in die Theorien zur Pathogenese der Schizophrenie einbezogen. Die älteste Hypothese behandelt dabei Dopamin. Schon ab den 1960er Jahren wurden von van Rossum Überlegungen zum Zusammenhang dieses Neurotransmitters und der Schizophrenie angestellt (Moncrieff 2009), welche besagten, dass die Schizophrenie durch eine Überaktivität bestimmter dopaminerger Bereiche des Gehirns entstehen könnte. Diese Vermutung musste später wegen Widersprüchen zurückgenommen werden, woraufhin jedoch in den 1990er Jahren eine erweiterte Dopaminhypothese entwickelt wurde, welche postulierte, dass nicht nur ein Exzess, sondern auch eine in bestimmten Regionen verminderte Dopaminausschüttung jeweils der Entstehung der Positiv- und der Negativsymptomatik zu Grunde liegen könnte. Ein Überangebot an Dopamin herrsche dabei im mesolimbischen System vor, während das mesokortikale System eher durch Hypoaktivität gekennzeichnet sei (Keshavan et al. 2008). Diese These stützt sich bei Fehlen unmittelbarer Beweise noch immer vornehmlich auf indirekte Hinweise wie die Beobachtung des antipsychotischen Effektes antidopaminerger Medikamente sowie des psychotropen Effektes dopaminerger Substanzen (Guillin et al. 2007).

Andere biochemische Veränderungen des ZNS, welchen eine Rolle bei der Entstehung der Schizophrenie zugeschrieben wird, betreffen das glutamaterge System. Da Glutamat jedoch im gesamten Nervensystem vertreten ist, lassen sich die spezifischen Symptome der Schizophrenie durch eine globale Störung in diesem System nur schwer erklären (Keshavan et al. 2008). Daher steht jüngst eine Störung der exzitatorischen Neurotransmission durch spezielle N-Methyl-D-Aspartat-Glutamatrezeptoren (NMDA-Rezeptoren) im Mittelpunkt der Überlegungen (Moghaddam 2003; siehe auch Abschnitt 2.3.2.1.).

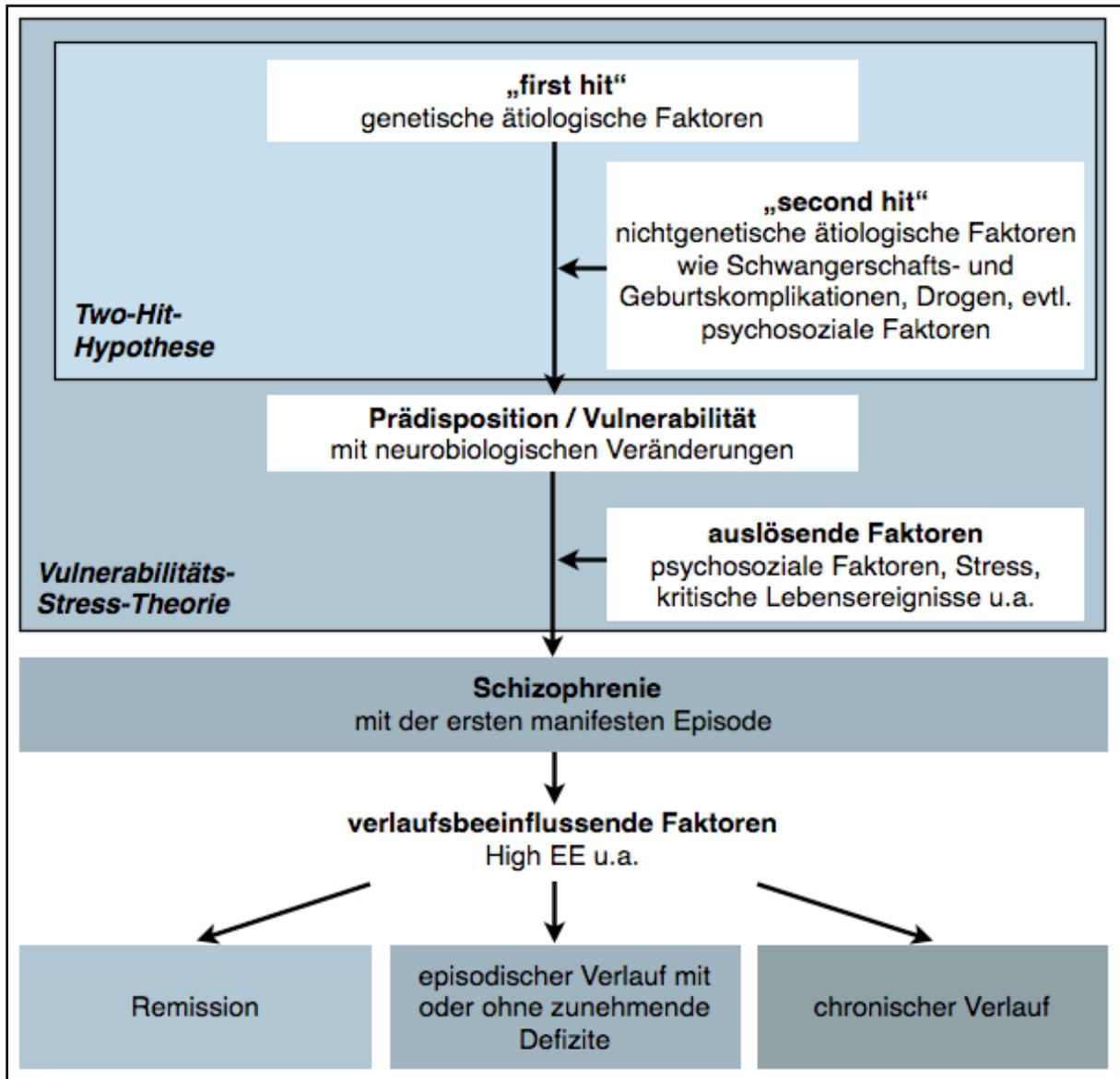
Weitere neurochemische Befunde bei Schizophrenen legen ein relatives Defizit muskarinerg Acetylcholinrezeptoren (Raedler et al. 2007) sowie eine gestörte Serotonin-Dopamin-Interaktion (Kahn 1993; Olijslagers et al. 2006) nahe. Auch GABA (*Gamma amino butyric acid*; Gammaaminobuttersäure) zählt zu den Neurotransmittern, welche mit der Schizophrenie in Verbindung gebracht werden. In

diesem Zusammenhang wird eine reduzierte GABA-Ausschüttung im präfrontalen Kortex angenommen, welche kompensatorisch zur Hochregulierung bestimmter GABA-Rezeptoren führt. Konsekutiv könnte sie für Änderungen in der neuronalen Synchronität und somit auch für Störungen des Arbeitsgedächtnisses im Rahmen der Schizophrenie verantwortlich sein (Gonzalez-Burgos und Lewis 2008).

### 2.1.7.3. Die pathogenetischen Modelle

Die beschriebenen morphologischen und biochemischen ZNS-Auffälligkeiten, welche auf Grund der genetischen und nichtgenetischen ätiologischen Faktoren entstehen, erweisen sich jedoch als gemeinsam noch immer nicht hinreichend für das Ausbilden einer Schizophrenie, da nicht alle Personen mit schizophrenietyptischen ZNS-Befunden diese Erkrankung entwickeln (Pantelis et al. 2005). Hier werden auslösende Faktoren angenommen, die letztendlich zur Manifestation der Symptome führen. Zu nennen ist dabei in erster Linie psychosozialer Stress, welcher sowohl die initiale als auch folgende Episoden auslösen kann (Norman und Malla 1993). Das Vulnerabilitäts-Stress-Modell – auch Diathese-Stress-Modell genannt – vereint schließlich die biologische Disposition und die lebensgeschichtlichen sozialen oder körperlichen Belastungen im Sinne einer biopsychosozialen Entstehung der Schizophrenie (Spring 1981). Die klare Abgrenzung zwischen krankheitsverursachenden und lediglich die Krankheit auslösenden Faktoren gestaltet sich jedoch bei dem gegenwärtigen Stand der Forschung schwierig (Tandon et al. 2008b), sodass sich die unter 2.1.6.2. besprochene *Two-Hit*-Hypothese nicht eindeutig vom Vulnerabilitäts-Stress-Modell abgrenzen lässt (Abbildung 2-1, S. 17).

Erwähnenswert ist auch das *Expressed-Emotion*-Konzept zu Auslösefaktoren für einen Rückfall, wonach das Verhalten der Familienangehörigen Einfluss auf den Verlauf der Erkrankung hat. *High Expressed-Emotion* (EE) steht dabei für Beziehungsstrukturen, bei denen Bezugspersonen dem Patienten gegenüber häufig Kritik äußern und Feindseligkeiten zeigen oder aber auch für ein Umfeld, welches durch emotionales Überengagement gekennzeichnet ist. Dies führt nachgewiesenermaßen zu einer erhöhten Rückfallwahrscheinlichkeit (Butzlaff und Hooley 1998).



**Abbildung 2-1** Ätiopathogenetisches Modell zur Entstehung der Schizophrenie unter Einbezug der Two-Hit-Hypothese (Bayer et al. 1999) und der Vulnerabilitäts-Stress-Theorie (Spring 1981).

#### 2.1.7.4. Das Konzept der Endophänotypen

Während viele der beobachteten pathologischen Veränderungen bei schizophrenen Patienten in den letzten Jahrzehnten verifiziert und repliziert werden konnten, wurde jedoch noch immer kein umfassendes Verständnis für das Zusammenspiel aller Einzelbefunde erreicht. In einem neuen Ansatz wird daher von unterschiedlichen neurobiologischen Ursachen für das gemeinsame phänomenologische Bild der Schizophrenie ausgegangen. Hierfür werden neurobiologische Krankheitskorrelate gesucht, die mit der Schizophrenie assoziiert, stabil über die Zeit und genetisch beeinflusst sind. Diese werden als Endophänotypen bezeichnet, womit ihre Lage in

der Schizophrenieforschung zwischen dem Phänotyp und dem Genotyp der Erkrankung verdeutlicht wird (Gottesman und Shields 1973). Da angenommen wird, dass diese Variablen einer weniger komplexen genetischen Determination unterliegen als der Krankheitsphänotyp und so deren zugrunde liegender Genotyp einfacher entschlüsselt werden kann, bergen sie möglicherweise Hinweise auf Suszeptibilitätsgene für die Schizophrenie in sich. Zu den am besten untersuchten Endophänotypen für die Schizophrenie gehören unter anderem neurokognitive Endophänotypen wie Störungen der Aufmerksamkeit, des deklarativen Gedächtnisses und des Arbeitsgedächtnisses sowie neurophysiologische Endophänotypen wie Störungen der Augenfolgebewegung, der Präpulsinhibition und Defizite im Antisakkaden-Test (Gottesman und Gould 2003; Zobel und Maier 2004; Braff et al. 2008).

## **2.2. Die Genetik der Schizophrenie**

### **2.2.1. Studien zur familiären Häufung der Schizophrenie**

Obwohl über zwei Drittel aller Krankheitsfälle sporadisch auftreten, ist eine familiäre Häufung der Schizophrenie erwiesen. Die Erkrankungswahrscheinlichkeit steigt dabei mit Zunahme der genetischen Verwandtschaft an. So weisen Erstgradangehörige eines Schizophrenen ein Erkrankungsrisiko von 9-18%, Zweitgradangehörige eines von 3-6% auf. Bei Drittgradangehörigen liegt das Risiko bei 2-3% und somit nur noch geringfügig höher als in der allgemeinen Bevölkerung, für welche das Risiko 0,7% beträgt (Gottesman et al. 1987; Tsuang et al. 2001). Neben genetischen Ursachen wurden bis in die 1960er Jahre hinein jedoch auch familiendynamische und umweltbedingte Begründungen für die beobachtete familiäre Häufung der Schizophrenie angeführt (Tandon et al. 2008b).

Zwingendere Hinweise auf genetische Ursachen der Schizophrenie lieferten Zwillingsstudien, die bei dizygoten Zwillingen mit 50% gleichen Genen eine Konkordanz hinsichtlich der Erkrankung von 10-15% fanden, wohingegen monozygote Zwillinge, welche nahezu identische Gene besitzen, eine Konkordanzrate von 40-50% aufwiesen (Cannon et al. 1998; Sullivan et al. 2003). Die Heritabilität, welche ein Maß für die Erbllichkeit von Erkrankungen ist, bei denen für den Phänotyp sowohl Gene als auch Umwelteinflüsse eine Rolle spielen, wurde auf 80% geschätzt

(Sullivan et al. 2003). Auch hier ließ sich ein Zugrundeliegen umweltbedingter Einflüsse jedoch nicht vollends ausschließen, da eineiige Zwillinge sich auch in nichtgenetischen Faktoren von zweieiigen Zwillingen unterscheiden. Sie sind beispielsweise durch die geteilte Plazenta den selben pränatalen Bedingungen ausgesetzt und erfahren durch ihr identisches Aussehen in einem höheren Maße gleiche Reaktionen ihrer Umwelt. Zudem zeigt die Konkordanzrate von lediglich bis zu 50% bei genetisch identischen Zwillingen, dass weitere, nichtgenetische Faktoren eine Rolle spielen.

Der Differenzierung der Theorie ausschließlich umweltbedingter Schädigung im Gegensatz zur genetisch mitbedingten Erkrankung dienten letztlich Adoptionsstudien, die das Schizophrenierisiko für Kindern schizophrener Eltern, welche jedoch nicht bei diesen aufgewachsen waren, mit dem Risiko für Kinder gesunder Eltern, welche jedoch bei schizophrenen Adoptiveltern aufwuchsen, verglich. Es konnte gezeigt werden, dass ausschließlich Kinder von schizophrenen biologischen Eltern gehäuft an der Schizophrenie erkrankten, wohingegen Kinder mit schizophrenen Adoptiveltern kein erhöhtes Risiko aufwiesen (Heston 1966; Kety et al. 1976). Hiermit galt eine genetische Grundlage der Schizophrenie als gesichert.

Neuere Familienstudien untersuchten neben der Schizophrenie an sich auch ihre unterschiedlichen klinischen Erscheinungsbilder. Dabei zeigte sich, dass die einzelnen Subtypen keine familiäre Homogenität aufwiesen (Kendler und Diehl 1993). Lediglich eine deutliche Negativsymptomatik war mit einer höheren familiären Schizophreniebelastung assoziiert, womit eine stärkere genetische Komponente der Negativsymptomatik vermutet werden kann (van Os et al. 1997).

### **2.2.2. Die Molekulargenetik der Schizophrenie**

Auf der Beobachtung, dass es sich bei der Schizophrenie um eine komplexe genetische Erkrankung handelt, welche nicht den mendelschen Vererbungsregeln folgt (Lander und Schork 1994), beruht das heute vorherrschende Modell, welches von einer polygenen Übertragung ausgeht und somit das Zusammenspiel mehrerer Genloci mit jeweils geringem Beitrag zur Schizophrenieentstehung annimmt (Owen 2000; Lichtermann et al. 2000). Zudem wird davon ausgegangen, dass es sich gemäß dem Prinzip der genetischen Heterogenität nicht stets um die selbe

Genlocikombination handelt, die das Erscheinungsbild der Schizophrenie hervorruft, sondern dass das Zusammenwirken jeweils unterschiedlicher Gene die klinisch nicht sicher zu unterscheidenden Krankheitsbilder bedingt (Kendler und Diehl 1993; Maier et al. 1999).

Da die Studien zur familiären Häufung lediglich das Vorhandensein genetischer Einflüsse feststellen und deren Ausmaß abschätzen konnten, waren in der Folge spezielle Studien für molekulargenetische Fragestellungen notwendig. Bei den beiden komplementären Ansätzen, die sich hierfür eignen, handelt es sich um Kopplungs- und Assoziationsstudien. Vor der Entwicklung moderner Verfahren, die die Genotypisierung einer großen Anzahl SNPs (*Single Nucleotide Polymorphisms*; Einzelnukleotidpolymorphismen) mit vergleichsweise geringem Aufwand ermöglichen, dienten Kopplungsstudien dem Auffinden größerer für die Schizophrenie potentiell relevanter Genregionen. Mittels Assoziationsstudien konnten darauf aufbauend bei bereits bekannten Kandidatengenregionen die jeweils mit der Schizophrenie vergesellschafteten Allel- und Genotypausprägungen einzelner Polymorphismen bestimmt werden (Maier et al. 1999). Heute ist sowohl die Durchführung genomweiter Kopplungs- als auch genomweiter Assoziationsstudien möglich, die die gleichzeitige Untersuchung hunderttausender SNPs einer Person ermöglichen, womit die Notwendigkeit der vorherigen Kenntnis bestimmter Kandidatenregionen entfällt (Rujescu 2008). Noch immer sind in der Schizophrenieforschung die Anzahl an prädisponierenden Genloci, das jeweilige anteilige Risiko und die möglichen Kombinationen und Wechselwirkungen weitgehend unbekannt, molekulargenetische Untersuchungen konnten dennoch erste Befunde erbringen.

### **2.2.2.1. Kopplungsstudien**

Das Design der Kopplungsstudien erfordert Familien mit mehreren an Schizophrenie erkrankten Mitgliedern, im Idealfall schizophrene Geschwisterpaare (Maier et al. 1999). Ziel dieser Studien ist das Auffinden chromosomaler Regionen, welche betroffene Verwandte überzufällig häufig teilen, während nicht Betroffene sie selten in ihrem Genom tragen; es soll also herausgefunden werden, ob ein Markerallel und eine Erkrankung – hier die Schizophrenie – kosegregieren (McGuffin und Owen 1996).

Bevor solche Kopplungsstudien durch die Entschlüsselung des menschlichen Genoms (Lander et al. 2001; Venter et al. 2001) ermöglicht wurden, war bereits eine Reihe struktureller chromosomaler Aberrationen bekannt, welche mit der Schizophrenie einhergehen (Rujescu 2008). Am besten gesichert und somit Kandidaten für Schizophrenierisikogene sind dabei die Deletion 22q11 (Williams et al. 2006), die balancierte reziproke Translokation 1q42/11q14 (Blackwood et al. 2001) und X-Chromosom-Anomalien (DeLisi et al. 1994).

Erste große Kopplungsstudien von 1988 ließen ein Suszeptibilitätsgen auf Chromosom 5 vermuten, dies konnte jedoch in der Folge nicht bestätigt werden (MacIntyre et al. 2003). Die widersprüchlichen Ergebnisse ließen darauf schließen, dass in der Ätiologie der Schizophrenie multiple Risikogene mit kleinem individuellen Effekt und niedriger Penetranz maßgeblich sind (Lichtermand et al. 2000) und somit größere Studienkollektive zur Aufdeckung relevanter Genloci benötigt werden.

In drei Metaanalysen konnten Regionen ausgemacht werden, welche Suszeptibilitätsgene tragen könnten. Dabei handelte es sich vor allem um chromosomale Regionen auf 8p, 13q und 22q (Badner und Gershon 2002), auf 2q, 5q, 3p, 11q, 6p, 1q, 22q, 8p, 20q und 14p (Lewis et al. 2003), wobei der Locus 2p12-q22.1 am vielversprechendsten war, sowie auf 1, 2q, 3q, 4q, 5q, 8p und 10q (Ng et al. 2009). Zusammengenommen ergeben sich aus diesen Ergebnissen jedoch sehr große Bereiche mit schätzungsweise 4.000 Genen, was einem Viertel aller bekannten Gene entspricht (Tandon et al. 2008b). Zudem können die vermuteten Gene mit kleinem Effekt auf die Schizophrenie entsprechend einer Odds Ratio von ca. 1,8 wahrscheinlich mit den derzeit vorhandenen Stichproben nicht detektiert werden (Risch und Merikangas 1996; Moldin 1997).

Aus der vermuteten genetischen Heterogenität der Erkrankung resultiert unter Umständen eine weitere Verschlechterung der Sensitivität der Kopplungsstudien (Sawa und Snyder 2002; Fanous und Kendler 2005). Diese Probleme in Verbindung mit der komplizierten Rekrutierung der benötigten Familien mit mehreren Betroffenen sowie technische Fortschritte verhalfen jüngst den Assoziationsstudien zu einer bevorzugten Herangehensweise an die Grundlagen der Schizophrenie (Tandon et al. 2008b; Rujescu 2008).

### 2.2.2.2. Assoziationsstudien

Das Prinzip der Assoziationsstudien macht sich die Tatsache zunutze, dass natürlicherweise Polymorphismen in der Sequenz des humanen Genoms bestehen, von denen einige funktionelle Auswirkungen haben, viele jedoch stumm sind. Die häufigsten Polymorphismen stellen dabei die SNPs (*Single Nucleotide Polymorphisms*; Einzelnukleotidpolymorphismen) dar, welche – unregelmäßig im Genom verteilt – durchschnittlich einmal pro Kilobase auftreten. Andere Sequenzvariationen betreffen CNVs (*gene Copy Number Variants*; Genkopiezahlvarianten), Insertionen, Deletionen und Duplikationen, wobei jedoch die SNPs aufgrund ihrer Anzahl, ihrer Stabilität und ihres über einen großen Teil des Genoms verteilten Vorkommens am besten untersucht sind (Collins et al. 1998). Dabei werden in einer Fall-Kontroll-Studie SNPs auf ihr gehäuftes Vorkommen in der Gruppe der schizophrenen Patienten hin untersucht. Im Vergleich zu den oben beschriebenen Kopplungsstudien eignen sich die Assoziationsstudien besser für die Suche nach Genen mit relativ kleinem Einfluss. Diesem Vorteil steht jedoch die größere Gefahr falsch positiver und falsch negativer Ergebnisse gegenüber (Hunter und Kraft 2007). Zudem waren bis zur Publikation des Kataloges häufiger DNA-Polymorphismen (International HapMap Consortium 2005) und der Entwicklung fortschrittlicher Genotypisierungsverfahren klare Hinweise auf Regionen mit Kandidatengenen nötig, welche aus Kopplungsstudien oder aus theoretischen Überlegungen zur Pathogenese und aus pharmakogenetischen Untersuchungen (Nnadi und Malhotra 2007) stammten.

Die frühen Assoziationsstudien stützten sich zunächst auf die Dopaminhypothese und untersuchten Genregionen, welche mit diesem Neurotransmittersystem im Zusammenhang stehen und daher funktionelle Kandidatengene für die Schizophrenie darstellen. So wurden die Lokalisationen 3q13.3, 11q23 und 22q11.21-q11.23 und damit die Gene DRD3 (Dopaminrezeptor 3), DRD2 (Dopaminrezeptor 2) und COMT (Catechol-O-Methyltransferase) als potentielle Risikogene ausgemacht (Williams et al. 1998; Arinami et al. 1997; Shifman et al. 2002). Entsprechende Überlegungen zur Serotonin- und Glutathypothese erbrachten Hinweise auf die Regionen 13q14-q21, 8p12-p21 und 6p22 mit den Genen 5-HT-2A (Serotoninrezeptor 2A), NRG1 (Neuroregulin 1) und DTNBP1 (Dysbindin) als mögliche Suszeptibilitätsgene (Straub et al. 2002; Stefansson et al. 2003; Schwab et al. 2003;

Sáiz et al. 2007). Auch die Analyse positioneller Kandidatengene erbrachte Ergebnisse. So beruhte beispielsweise die Entdeckung des möglichen Suszeptibilitätsgens RGS4 (*Regulator of G-Protein Signaling 4*) auf Chromosom 1q21-22 nicht auf ätiologischen Überlegungen, sondern auf zuvor durchgeführten Kopplungsstudien (Chowsari et al. 2002).

Heutzutage erlauben Hochdurchsatzgenotypisierungsverfahren und internationale Kollaborationen die Analyse einer großen Anzahl an Polymorphismen im Rahmen genomweiter Assoziationsstudien (GWAs). Ein entscheidender Schritt war dabei die Entwicklung sogenannter *Microarrays (Chips)*, welche die Untersuchung von mehr als 500.000 SNPs in einer einzigen Probe erlauben. Die Basis dieses Verfahrens bilden Daten des HapMap-Projektes, welches durch die Entschlüsselung des humanen Genoms ermöglicht wurde (Christensen und Murray 2007).

In einer ersten genomweiten Assoziationsstudie aus dem Jahre 2006 wurden über 25.000 SNPs in 14.000 Genen auf ihre Assoziation zur Schizophrenie hin getestet, wobei die Studienpopulation aus 320 schizophrenen Patienten mit europäischer Abstammung und 325 gematchten Kontrollprobanden bestand. Diese Studie identifizierte Plexin A2 als neues Suszeptibilitätsgen für die Schizophrenie auf Chromosom 1q32 (Mah et al. 2006). Eine Verbindung zur Ätiologie der Schizophrenie ergibt sich dabei möglicherweise daraus, dass die Führung der axonalen Migration in der ZNS-Entwicklung sowie die neuronale Plastizität und Regeneration durch den vom Plexin A2-Gen kodierten transmembranen Semaphorinrezeptor beeinflusst wird.

Im folgenden Jahr konnte ein weiterer mit der Schizophrenie assoziierter Marker nahe des CSF2RA-Gens (*Colony stimulating factor 2 receptor alpha*) im Rahmen einer etwa 500.000 SNPs testenden GWA entdeckt werden (Lencz et al. 2007). Es wurden dabei 178 Patienten mit Schizophrenie-Spektrum-Erkrankungen, welche schizophrene, schizoaffektive und schizophreniforme Störungen umfassten, sowie 144 gesunde Kontrollprobanden untersucht. Eine daraufhin durchgeführte unabhängige Fall-Kontroll-Studie dieses Gens und des benachbarten Gens IL3RA (*Interleukin 3 receptor alpha*) zeigte mehrere intronische Haplotypen und Missense-Mutationen in diesem Bereich auf, welche gehäuft bei Schizophrenen auftraten

(Lencz et al. 2007). Überlegungen zum Zusammenhang mit der Krankheitsentstehung zielten auf theoretisch aus den Mutationen resultierende Zytokinrezeptor-Anomalien ab.

Diesen ersten Befunden folgten drei weitere GWAs im Jahre 2008. Im Rahmen der CATIE-Studie (*Clinical Antipsychotic Trial of Intervention Effectiveness*) wurde eine Genotypisierung von 738 Patienten und 733 Kontrollen durchgeführt. 492.000 SNPs wurden auf ihre Vergesellschaftung mit der Schizophrenie hin überprüft, wobei einige Marker in der Region der Gene DISC1 (*Disrupted in schizophrenia 1*) und COMT vielversprechend waren, keiner jedoch genomweite statistische Signifikanz erreichte (Sullivan et al. 2008).

Shifman et al. (2008) konzentrierten sich in ihrer Studie an einer jüdischen Population auf geschlechtsspezifische Unterschiede. In der weiblichen Studienpopulation fand sich dabei ein SNP des Reelin-Gens (RELN), welches in vier zusätzlichen Populationen mit insgesamt 2.274 Patienten und 4.401 Kontrollen als Suszeptibilitätslocus lediglich für Frauen repliziert werden konnte (Shifman et al. 2008).

Die dritte genomweite Assoziationsstudie des Jahres 2008 mit 497 Patienten und 2937 Kontrollprobanden fand das Suszeptibilitätsgen ZNF804A (*Zinc finger protein 804A*) in der chromosomalen Region 2q32.1, welches auch in einer unabhängigen Population mit 16.726 Studienteilnehmern repliziert werden konnte. Zusätzlich zeigen sich die Loci 11p14.1 und 16p13.12 als interessante Kandidaten für weitere Studien (O'Donovan et al. 2008).

Bei der von Need et al. 2009 durchgeführten GWA mit 871 Patienten und 863 Kontrollprobanden europäischen Ursprungs zeigte sich jedoch unter den getesteten SNPs weder ein neuer Suszeptibilitätslocus, noch konnten bereits berichtete Loci repliziert werden. Die mit untersuchten CNVs waren demgegenüber vielversprechender. Hier wurden 1.013 Schizophrene und 1.084 Kontrollen ebenfalls europäischen Ursprungs sowie 60 Patienten und 63 Kontrollen afrikanischer Herkunft in die Studie eingeschlossen, woraufhin CNVs wie die in NRXN1 (Neurexin 1) – welche auch von Rujescu et al. (2009) beschrieben wurden – und APBA2 (*Amyloid beta A4 precursor protein-binding A2*) bestätigt werden konnten (Need et al. 2009).

Ebenfalls 2009 zeigten Shi et al., dass eine signifikante Assoziation zwischen SNPs der erweiterten MHC-Region (*Major Histocompatibility Complex*-Region) auf Chromosom 6p22.1 und der Schizophrenie besteht (Shi et al. 2009). Dieser Zusammenhang wurde in einer Metaanalyse europäischstämmiger Personen mit 8.008 schizophrenen Patienten und 19.077 Kontrollprobanden aufgetan.

Diese Erkenntnisse konnten auch Stefansson et al. (2009) bestätigen, welche Daten mehrerer großer Assoziationsstudien kombinierten und so die MHC-Region auf Chromosom 6p21.3-22.1 als potentielle Suszeptibilitätsgenregion identifizieren konnten. Hierin sahen sie einen Hinweis auf eine immunologische Komponente der Ätiologie der Schizophrenie. Zudem fanden sie signifikante Ergebnisse für Marker nahe des Neurograningens (NRGN) auf 11q24.2 und im Gen des Transkriptionsfaktors 4 (TCF4) auf 18q21.2, welche sich als Störungen in der Entwicklung des Gehirns, des Gedächtnisses und der kognitiven Funktionen manifestieren könnten (Stefansson et al. 2009).

Zeitgleich publizierte das International Schizophrenia Consortium ihre Daten, welche mit den Ergebnissen der beiden zuletzt beschriebenen GWAs in Einklang standen. In dem europäischen Kollektiv mit 3.322 Schizophrenen und 3.587 Kontrollen deuteten wiederum Marker in der MHC-Region auf Suszeptibilitätsgene hin (International Schizophrenia Consortium 2009).

Die letzte der 2009 veröffentlichten GWA-Studien betrachtete 605 Kontrollprobanden, 574 Patienten und alle Eltern dieser Patienten. Die stärkste Assoziation mit der Schizophrenie zeigte hier ein SNP des Gens *CCDC60* (*Coiled-coil domain containing 60*) auf Chromosom 12 (Kirov et al. 2009).

Eine der beiden neuesten GWA-Studien wurde von Athanasiu et al. (2010) an 2.663 schizophrenen Patienten und 13.780 Kontrollen einer europäischen Population innerhalb der SGENE-plus Studie durchgeführt. Dabei wurden 572.888 Marker geprüft. Die Loci mit der stärksten Assoziation zur Schizophrenie waren das *PLAA*-Gen (*Phospholipase A-2-activating protein*) auf 9p21, das *ACSM1*-Gen (*Acyl-CoA synthetase medium-chain 1*) auf 16p12 und das *ANK3*-Gen (*Ankyrin-3*) auf 10q21. *PLAA* wurde dabei erstmals mit der Schizophrenie in Verbindung gebracht, wohingegen die *ACSM1*-Genregion bereits vorher in diesem Zusammenhang

beschrieben wurde (O'Donovan et al. 2008) und ANK3 auch mit der bipolaren Störung in Beziehung zu stehen scheint (Athanasias et al. 2010).

Die zum heutigen Zeitpunkt aktuellste GWA-Studie psychischer Erkrankungen untersuchte sowohl schizophrene Patienten als auch solche mit einer bipolaren Störung, erbrachte jedoch bezüglich der Schizophrenie keine neuen Befunde (Djurovic et al. 2010).

Bei sehr divergenten Ergebnissen der bisher durchgeführten GWAs konnten somit dennoch einige Gene und Loci identifiziert werden, welche im Mittelpunkt des Interesses stehen. Darunter befinden sich unter anderem die durch Assoziationsstudien wiederholt mit der Schizophrenie in Verbindung gebrachten Gene NRG1 (Neuroregulin 1), DTNBP1 (Dysbindin), DRD2 und DRD3 (Dopaminrezeptoren D2 und D3), DISC1 (*Disrupted in Schizophrenia 1*) und COMT (Catechol-O-Methyltransferase) sowie SNPs der MHC-Region.

### **2.3. Der Glycintransporter 2 und die Schizophrenie**

Das Gen SLC6A5 kodiert für den Glycintransporter 2 (GLYT2). Im Kontext der Ätiologie der Schizophrenie gründet das Interesse am glycinergen Neurotransmittersystem auf der Erkenntnis, dass Glycin den NMDA-Rezeptor, der in der Glutamathypothese der Schizophrenie eine zentrale Rolle spielt, moduliert. Zudem konnten mehrere pharmakologische Studien die Wirksamkeit einer Glycinmedikation in der Behandlung der Schizophrenie, insbesondere bei Patienten mit vorherrschender Negativsymptomatik und ausgeprägten kognitiven Defiziten, belegen (Heresco-Levy 1999). Auch erhärtete der Nachweis erniedrigter Glycinspiegel im Blut schizophrener Patienten (Hons et al. 2010) die Hinweise auf eine ätiologische Relevanz des Neurotransmitters Glycin.

#### **2.3.1. Glycin als inhibitorischer Neurotransmitter**

Glycin wirkt am strychnin-sensitiven Glycinrezeptor (GlyR) als inhibitorischer Neurotransmitter des zentralen Nervensystems. Dieser Mechanismus ist ein zentraler Bestandteil der Verarbeitung motorischer und sensorischer Informationen, welche Bewegungen, Sehen und Hören ermöglicht. Dabei agiert Glycin in einigen Hirnregionen als Cotransmitter von GABA (López-Corcuera et al. 2001). Während

der ZNS-Entwicklung tritt die glycinerge Neurotransmission bereits in einem frühen Stadium auf, wobei sie zu dieser Zeit eine Depolarisation und nicht wie später eine Hyperpolarisation auslöst (Aragón und López-Corcuera 2003). Erst etwa ab dem zehnten postnatalen Tag führt eine Abnahme des intrazellulären  $\text{Cl}^-$  durch die Expression eines  $\text{K}^+/\text{Cl}^-$ -Cotransporters zu einer Hyperpolarisation durch den GlyR. Es wird davon ausgegangen, dass die lediglich in frühen Entwicklungsstadien vorhandene Depolarisation durch einen  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom entscheidend zur Maturation der inhibitorischen Synapsen beiträgt. Zudem wird eine Rolle des Glycins bei dem Zusammenspiel von Neuronen und Oligodendrozyten-Vorläuferzellen während der Hirnentwicklung vermutet (Aragón und López-Corcuera 2003). Auch auf die Plastizität des Gehirns scheinen inhibitorische Glycinrezeptoren einen Einfluss auszuüben, so spielen sie eine Rolle bei der hippocampalen Langzeitpotenzierung (Brackmann et al. 2004). Über diese Mechanismen könnten somit bei fehlerhafter Funktion der inhibitorischen Glycinneurotransmission Störungen in der ZNS-Entwicklung und Plastizität resultieren, wie sie auch in der Ätiopathogenese der Schizophrenie beobachtet werden.

Für die glycinerge Neurotransmission ist die Wiederaufnahme des Neurotransmitters aus dem synaptischen Spalt in die Präsynapse essenziell. Nur so kann bei unzureichender Neusynthese des Transmitters, wie dies bei Glycin physiologischerweise der Fall ist, eine ausreichende Konzentration in der Präsynapse aufrechterhalten und somit die fehlerfreie Übertragung nachfolgender Reize garantiert werden (Rousseau et al. 2008). Bei dieser Wiederaufnahme spielt der Glycintransporter GLYT2 eine zentrale Rolle (siehe Abschnitt 2.3.3).

### **2.3.2. Glycin als exzitatorischer Neurotransmitter**

Die Modulation der exzitatorischen glutamatergen Neurotransmission durch Glycin weist einen noch deutlicheren Zusammenhang mit der Schizophrenie auf, als dies bei der inhibitorischen glycinergen Neurotransmission nach dem derzeitigen Stand der Forschung der Fall ist. Dabei ist Glycin durch Modulation des NMDA-Rezeptors indirekt an der exzitatorischen Neurotransmission im Rahmen der Glutamat-hypothese der Schizophrenie beteiligt.

### 2.3.2.1. Glutamat und der NMDA-Rezeptor in der Schizophrenie

Bei vielen mit der oben erwähnten erweiterten Dopaminhypothese in Einklang stehenden Befunden stößt diese Theorie dennoch zunehmend an ihre Grenzen. So zeigen sich beispielsweise antidopaminerge atypische Neuroleptika nicht in dem Ausmaß wirksam, wie es diese Hypothese vermuten lassen würde (Moghaddam 2003). Auf der Suche nach einem umfassenderen Modell wurde daher der Schwerpunkt auf das vielfältige neurobiologische und klinische Bild der Erkrankung gelegt, welches auf eine Störung in den meisten, wenn nicht allen frontalen kortikalen, limbischen und thalamischen Neurotransmittersystemen sowie denen der Basalganglien hinweist. Wechselwirkungen zwischen diesen Systemen werden überwiegend, teils sogar ausschließlich durch Glutamat vermittelt, womit dieser Neurotransmitter einen vielversprechenden Ansatz neuer Schizophreniemodelle darstellt (Moghaddam 2003). Diese Theorie steht in Anbetracht der multiplen Wechselwirkungen zwischen den beiden Neurotransmittersystemen auch nicht notwendigerweise im Widerspruch zur Dopaminhypothese (Goff und Coyle 2001).

Schon seit den 1980er Jahren legten ein abnormer Glutamatspiegel im zerebrospinalen Liquor schizophrener Patienten (Kim et al. 1980) und frühe *Post-Mortem*-Untersuchungen mit reduzierter Glutamatkonzentration im präfrontalen Kortex und im Hippocampus eine ätiopathogenetische Relevanz dieses Transmitters nahe, doch limitierten divergente Ergebnisse nachfolgender Studien die Aussagekraft dieser Befunde (Moghaddam 2003). Zudem stellte eine generalisierte glutamaterge Störung auf Grund des ubiquitären Vorkommens dieses wichtigsten exzitatorischen Neurotransmitters im zentralen Nervensystem keine plausible Erklärung für die spezifische Symptomatik der Schizophrenie dar (Goff und Coyle 2001). Erst durch neuere *Post-Mortem*-Untersuchungen an Gehirnen schizophrener Patienten, welche eine erhöhte Anzahl an einem bestimmten Subtyp der Glutamatrezeptoren, dem NMDA-Rezeptor (N-Methyl-D-Aspartat-Rezeptor), in Putamen und Kortex fanden (Konradi und Heckers 2003), konnte die Glutamathypothese erhärtet werden. Eine interessante Beobachtung stellte in diesem Zusammenhang auch die Entdeckung der nichtkompetitiven antagonistischen Wirkung der psychotropen Substanz PCP (Phencyclidin) am NMDA-Rezeptor dar. Diese Substanz induziert, wie auch sein ursprünglich als Anästhetikum gedachtes Analogon Ketamin, Halluzinationen und

Wahnvorstellungen und kann bei schizophrenen Patienten eine neue psychotische Episode hervorrufen (Jentsch und Roth 1999). Bemerkenswert ist dabei die Bandbreite der ausgelösten schizophreniformen Symptome, welche neben der Positivsymptomatik auch – und dies im Gegensatz zu Beobachtungen bei dopaminergen Substanzen wie den Amphetaminen (Krystal et al. 2005; Javitt 2010) – negative sowie kognitive Aspekte umfasst (Lahti et al. 1995). Dies ließ eine Hypofunktion des NMDA-Rezeptors als pathogenetisch relevant erscheinen und motivierte Untersuchungen an Tiermodellen, welche auf einer solchen Hypofunktion basierten und wiederum eindrücklich das breite Spektrum der so hervorgerufenen schizophrenieähnlichen Störungen zeigten (Rujescu et al. 2006).

Bei dem NMDA-Rezeptor handelt es sich um einen ionotropen Glutamatrezeptor, der seinen Namen dem natürlicherweise im menschlichen Körper nicht vorkommenden, für ihn spezifischen Agonisten N-Methyl-D-Aspartat verdankt. Der NMDA-Rezeptor ist bei Vorherrschen eines Ruhemembranpotentials blockiert und öffnet sich nur bei Änderung des elektrischen Potentials im Sinne einer Depolarisation, welche durch andere ionotrope Glutamatrezeptoren wie den AMPA- ( $\alpha$ -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazol-Propionsäure) oder Kainat-Rezeptoren hervorgerufen werden kann. Zudem ist das zeitgleiche Einwirken der beiden Liganden Glutamat und Glycin für diesen Vorgang erforderlich (Goff und Coyle 2001). Der so hervorgerufene  $\text{Na}^+$ - und  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom trägt zum Phänomen der Langzeitpotenzierung bei, welche bei kognitiven Funktionen von Bedeutung ist (Bliss und Collingridge 1993).

Die Hinweise darauf, dass die den NMDA-Rezeptor betreffenden Veränderungen dabei nicht in großen strukturellen Anomalien dieses Rezeptors, sondern in Proteinen mit direkt oder indirekt modulierendem Effekt auf den Rezeptor zu finden sind, könnten dabei auch den Einwand entkräften, eine NMDA-Rezeptor-Störung könne durch dessen ubiquitäres Vorkommen im Nervensystem keine spezifischen ZNS-Symptome hervorrufen und müsse sich – anders als die Schizophrenie dieses tut – schon früh in der Entwicklung manifestieren (Moghaddam 2003). Diese Aussage stützen auch molekulargenetische Studien, welche für eine Assoziation der Schizophrenie mit Polymorphismen in bestimmten Genen, die für solche NMDA-Rezeptor-Funktion modulierende Proteine kodieren, sprechen. So reguliert beispielsweise das Gen Neuroregulin 1, welches mit der Schizophrenie in

Verbindung gebracht werden konnte, die Expression von Glutamatrezeptor-untereinheiten und aktiviert zusätzlich den mit dem NMDA-Rezeptor kolokalisierten ErbB4-Rezeptor (*v-erb-a erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 4*-Rezeptor; Stefansson et al. 2003).

### **2.3.2.2. Modulation der NMDA-Rezeptor-Aktivität durch Glycin**

Eine der Komponenten, die eine Modulation am NMDA-Rezeptor (NMDAR) bewirkt und somit auch eine partielle Störung seiner Funktion hervorrufen könnte, stellt dessen Glycinbindungsstelle dar. Bei der als Neurotransmitter fungierenden Aminosäure Glycin handelt es sich um einen für die Aktivierung des NMDA-Rezeptors obligaten Koagonisten neben Glutamat (Kleckner und Dingledine 1988). Die Glycinbindungsstelle des NMDA-Rezeptors ist, anders als der oben erwähnte inhibitorische Glycinrezeptor (GlyR), strychnin-insensitiv (Jansen und Dannhardt 2003). An dieser Stelle gebunden, potenziert Glycin die exzitatorische Neurotransmission durch einen positiven allosterischen Effekt, der die Bindung des Glutamats fördert und die Bindung eines Antagonisten erschwert (López-Corcuera et al. 2001). Im Jahre 1987 entdeckte man die Glycinbindungsstelle neue Möglichkeiten pharmakologischer Ansätze durch antikonvulsive und neuroprotektive Antagonisten, welche eine größere therapeutische Breite aufweisen als andere NMDA-Rezeptor-Blocker (Kemp und Leeson 1993). Die für die Behandlung der Schizophrenie interessanten Agonisten an der Glycinbindungsstelle weisen ebenfalls Vorteile gegenüber direkten NMDAR-Agonisten auf. Zu nennen ist dabei vor allem das geringere Risiko einer Exzitotoxizität, bei welcher zu hohe Agonistenspiegel zum Nervenzelluntergang durch Apoptose führen (Jansen und Dannhardt 2003).

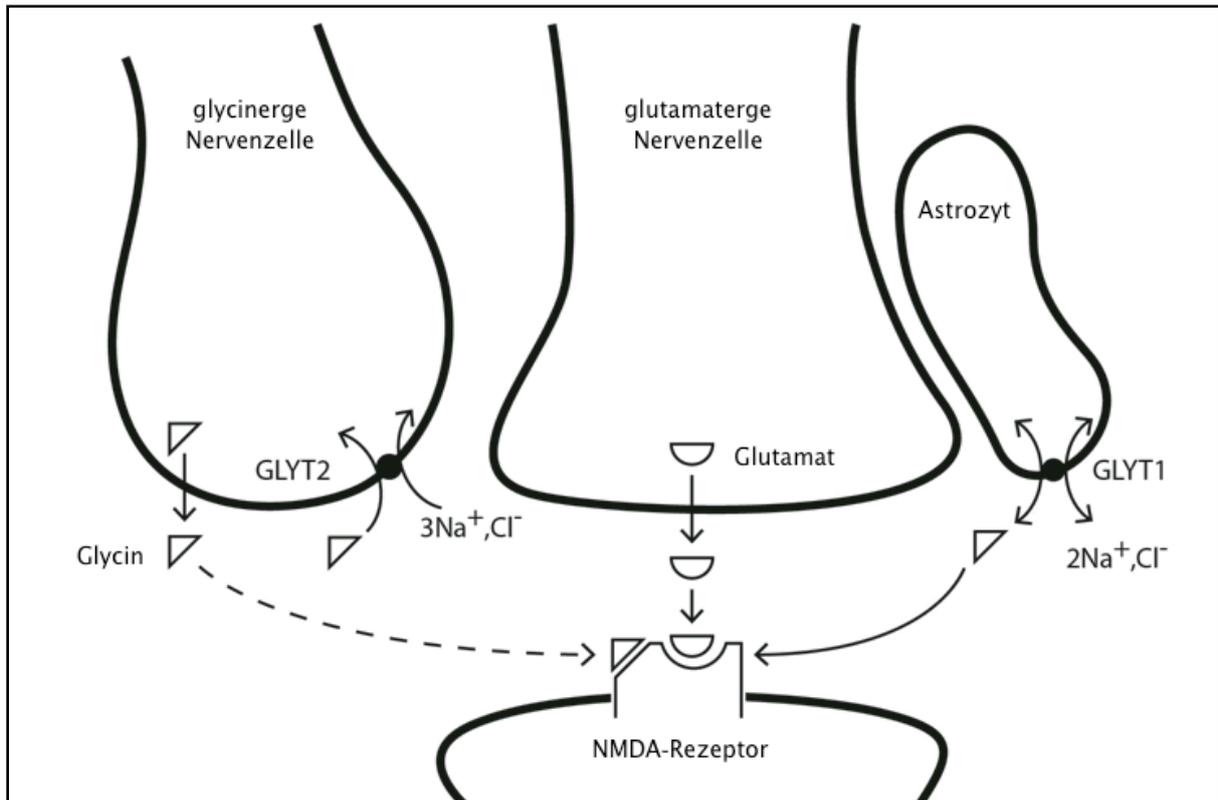
Im Fokus steht bei der Therapie mit NMDAR-Agonisten die Negativsymptomatik, welche zu einem großen Teil für chronische Beeinträchtigungen Schizophrener verantwortlich und auch durch atypische Neuroleptika nicht immer zufriedenstellend behandelbar ist (Möller 2007). Die als *Add-on*-Therapie verabreichten NMDA-Rezeptor-stimulierenden Substanzen wie hochdosiertes Glycin, aber auch D-Serin (Tsai et al. 1998) und D-Cycloserin zeigten in diesem Zusammenhang in Studien eine Besserung der Negativsymptomatik (Jansen und Dannhardt 2003). Für den partiellen Agonisten D-Cycloserin galt dies allerdings nur bei Gabe im Rahmen einer

Therapie mit konventionellen Neuroleptika oder Risperidon, nicht aber bei Kombination mit Clozapin (Evins et al. 2002). Insgesamt zeigte sich in diesen Studien eine Besserung, welche mit jener unter Clozapintherapie vergleichbar, dieser jedoch nicht eindeutig überlegen war (Jansen und Dannhardt 2003).

### **2.3.3. Die Rolle des GLYT2 im Glycinneurotransmittersystem**

Obwohl bis zum heutigen Zeitpunkt vornehmlich die Glycinbindungsstelle selbst Ziel experimenteller und therapeutischer Überlegungen und Untersuchungen war, scheinen auch andere Komponenten des Glycinneurotransmittersystems von Interesse für die Konzeptualisierung und Behandlung der Schizophrenie zu sein. Einen Schwerpunkt bilden dabei die Na<sup>+</sup>/Cl<sup>-</sup>-abhängigen Glycintransporter 1 und 2 (GLYT1 und GLYT2), welche die glycinerge Neurotransmission durch aktive Aufnahme des Glycins in die Nervenendigungen glycinерger Zellen und in umliegendes gliales Gewebe beenden (Abbildung 2-2, S. 32). GLYT1 scheint dabei für die Entfernung des Glycins aus dem synaptischen Spalt glycinерger Zellen durch Transport in Gliazellen und somit für die Regulierung der extrazellulären Glycinkonzentration verantwortlich zu sein. GLYT2 wird demgegenüber eine zentrale Rolle bei der Wiederaufnahme des Neurotransmitters in das präsynaptische Zytosol und somit letztlich auch bei der Wiederbeladung präsynaptischer Vesikel zugesprochen (López-Corcuera et al. 2001; Betz et al. 2006).

Wie bei GlyT2-defizienten Mäusen gezeigt werden konnte, bewirkt ein Fehlen dieses Transporters eine verminderte glycinerge Neurotransmission, welche sich durch unzureichend wiederbeladene Vesikel und verminderte Glycinausschüttung bei nachfolgenden Übertragungsvorgängen erklären lässt (Gomez et al. 2003). Bei den GlyT2-*Knockout*-Mäusen resultierte ein Phänotyp, der durch fehlende Inhibition – für die Glycin wie oben erwähnt neben seiner Funktion am NMDA-Rezeptor hauptsächlich verantwortlich zeichnet – geprägt war. Das Bild ähnelte dabei mit Spastik, gestörter motorischer Koordination und Tremor dem der Hyperekplexie (Eulenburg et al. 2005). Obwohl beim Menschen meist durch eine Mutation der  $\alpha$ 1-Untereinheit des Glycinrezeptors (GLRA1) verursacht, wurden jüngst auch Mutationen im GLYT2-Gen SLC6A5 entdeckt, die dieses Erkrankungsbild hervorrufen (Eugenburg et al. 2006; Rees et al. 2006).



**Abbildung 2-2** Die Rolle des GLYT2 in der glycinergen Neurotransmission (nach Stahl 2007).

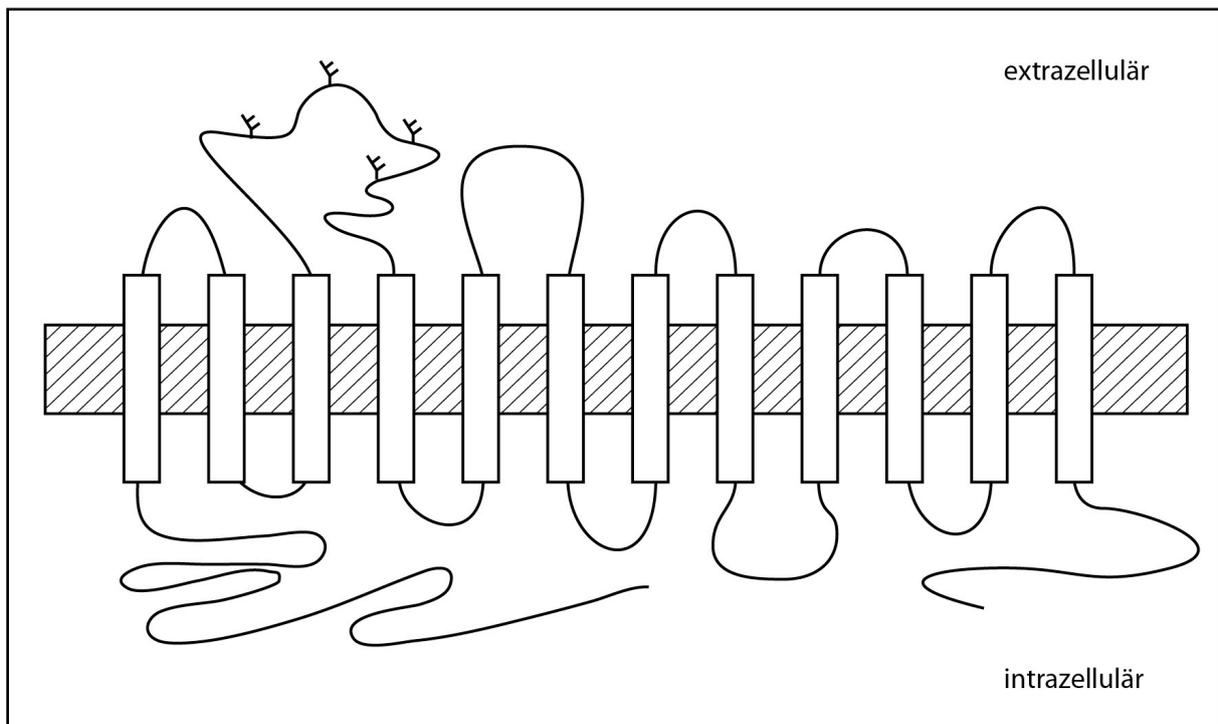
Eine weitere Studie betrachtete Mäuse, die bezüglich einer spontanen *Loss-of-function*-Mutation (Funktionsverlustmutation) im GlyT2-Gen heterozygot waren und bei denen somit die Verringerung der Glycinausschüttung weniger ausgeprägt war. Hier dominierten nicht motorische Störungsbilder, sondern Verhaltensauffälligkeiten wie Hyperaktivität und repetitive Bewegungen. Diese Verhaltensauffälligkeiten wurden auch in anderen Maus-Modellen für die Schizophrenie beobachtet, sodass ein Zusammenhang zwischen Mutationen im GLYT2-Gen und der Schizophrenie vermutet werden kann (Bogdanik et al. 2012).

Die Auswirkungen der mangelhaften Glycinfreisetzung auf andere Rezeptoren neben dem inhibitorischen Glycinrezeptor sind dagegen weniger gut untersucht. Ein Effekt der reduzierten Neurotransmitterfreisetzung auf die Funktion des für die Schizophrenie mutmaßlich relevanten NMDA-Rezeptors konnte bisher nicht nachgewiesen werden, ist über die Glycinbindungsstelle jedoch denkbar. Gegen eine direkte Auswirkung eines fehlerhaften GLYT2 auf die NMDAR-Funktion spricht zum gegenwärtigen Zeitpunkt, dass GLYT2 bislang hauptsächlich in glycinergen Zellen, nicht jedoch in glutamatergen Zellen mit NMDA-Rezeptoren gefunden werden konnte (Zafra et al. 1995).

## 2.3.4. Das Transportprotein GLYT2

### 2.3.4.1. Die Struktur des GLYT2

Wie auch die Serotonin-, Noradrenalin-, Dopamin- und GABA-Transporter, gehören die Glycintransporter zu den Na<sup>+</sup>/Cl<sup>-</sup>-abhängigen Transportproteinen. Sie alle besitzen einen ähnlichen strukturellen Aufbau mit 12 transmembranen Domänen (TMDs), welche wie in Abbildung 2-3 dargestellt durch sechs extrazelluläre und fünf intrazelluläre Schleifen (*Loops*) kommunizieren (Eulenburg et al. 2005).



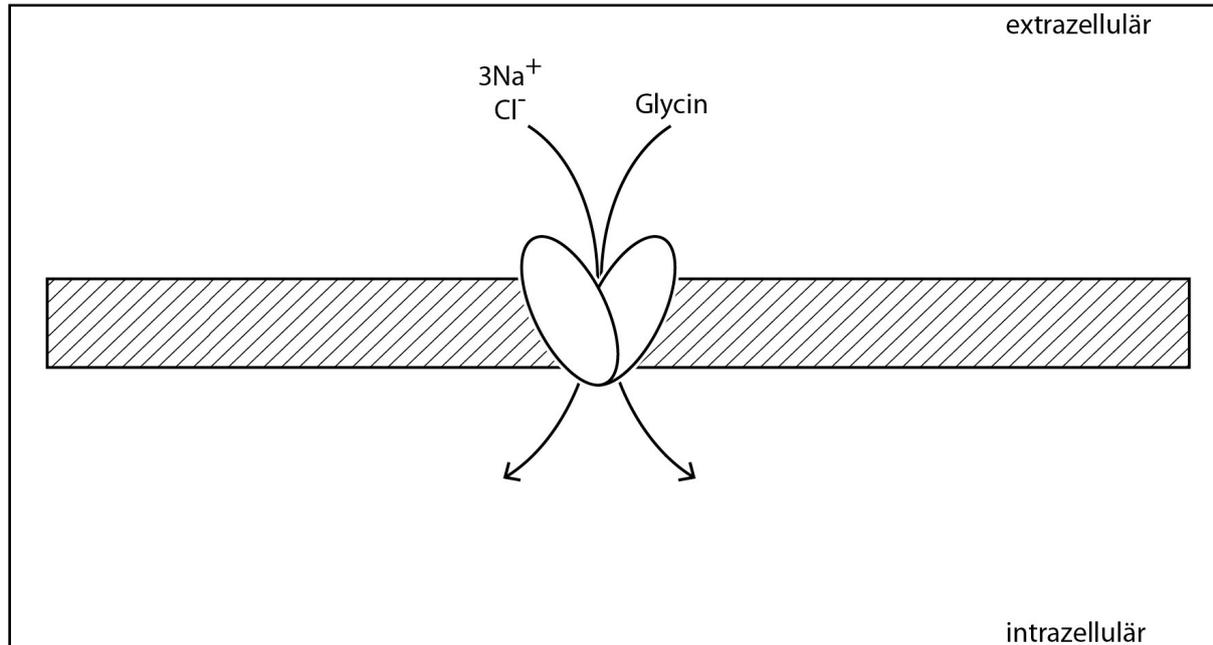
**Abbildung 2-3** Die Struktur des GLYT2 (nach Eulenburg et al. 2005).

Der humane GLYT2 konnte 1998 aus mittels reverser Transkription erhaltener cDNA (*complementary DNA*) kloniert werden (Morrow et al. 1998), nachdem schon einige Jahre zuvor der im Rattengehirn vorkommende GlyT2 beschrieben worden war (Liu et al. 1993). Die Primerauswahl beruhte dabei auf konservierten Regionen des GlyT2-Rattengens. Das PCR-Produkt entsprach dem 797 Aminosäuren langen humanen GLYT2. Dies gab Aufschluss darüber, dass sich GLYT2 und der schon früher bekannt gewordene GLYT1 etwa 50% sowohl ihrer Nukleotid- als auch ihrer Aminosäuresequenz teilen (Morrow et al. 1998; Gallagher et al. 1999). Das GLYT2-Protein besitzt jedoch eine circa 200 Aminosäuren zählende Domäne am N-Terminus, welche einzigartig in dieser Transporterfamilie ist. Zudem konnte gezeigt

werden, dass sowohl der C- als auch der N-Terminus des Proteins intrazellulär lokalisiert sind (Eulenburg et al. 2005). Zwei beschriebene und exprimierte Spleißvarianten des humanen GLYT2 zeigten sich nicht funktionsfähig, dabei handelte es sich um eine Isoform, der die ersten 234 Aminosäuren am N-Terminus fehlten, sowie um eine Isoform mit einer Deletion im intrazellulären *Loop* zwischen Transmembrandomäne 6 und 7 (Gallagher et al. 1999).

#### 2.3.4.2. Die Funktionsweise des GLYT2

Glycintransporter, so auch der GLYT2, sind verantwortlich für die Glycinaufnahme aus dem extrazellulären Raum in das Zytosol. Diese bedarf eines transmembranen Natriumgradienten, welcher durch die  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase aufrecht erhalten wird. Es wird angenommen, dass die extrazelluläre Bindung von  $3\text{Na}^+$ ,  $\text{Cl}^-$  und Glycin eine Konformationsänderung des GLYT2 induziert, wodurch die Glycinbindungsstelle Kontakt mit dem Zytosol erhält, der Neurotransmitter dort freigesetzt werden kann und GLYT2 daraufhin wieder in die Anfangskonformation zurückwechselt (Eulenburg et al. 2005). Abbildung 2-4 veranschaulicht dieses Modell.



**Abbildung 2-4** Die Funktionsweise des GLYT2 (nach Eulenburg et al. 2005).

Die genaue Lokalisation der Substratbindungsstellen und der Mechanismus des Transports sind bei fehlenden Informationen zur dreidimensionalen Struktur der Proteine noch wenig verstanden. Die N- und C-terminalen Domänen scheinen hierfür

jedoch nicht essentiell zu sein, wohingegen der erste extrazelluläre *Loop* (EL1; *extracellular loop 1*) durchaus eine zentrale Rolle spielen könnte (Eulenburg et al. 2005). Bekannt ist auch, dass die N-Glykosylierung des zweiten, großen extrazellulären *Loops* (EL2) notwendig für die Stabilisierung der aktiven Konformation ist (Eulenburg et al. 2005).

#### **2.3.4.3. Lokalisation und Regulierung des GLYT2**

Northern-Blot-Analysen konnten zeigen, dass GLYT2-mRNA besonders zahlreich in kaudalen Abschnitten des ZNS wie dem Rückenmark, dem Stammhirn und dem Cerebellum exprimiert wird (Morrow et al. 1998). GLYT2 wird dabei bevorzugt in inhibitorischen glycinergen Neuronen gefunden. Er ist fast ausschließlich in der Membran der Axone und dort vor allem in den terminalen Nervenendigungen der Präsynapse lokalisiert (Zafra et al. 1997; López-Corcuera et al. 2001). Für die Insertion des Proteins in die Plasmamembran der Synapse scheint dabei ein C-terminal lokalisiertes PDZ-Bindungsmotiv verantwortlich zu sein (Eulenburg et al. 2005). Auch in extraneuronalem Gewebe konnte GLYT2 nachgewiesen werden, so beispielsweise in den A-Zellen der Langerhansinseln des Pankreas (Eulenburg et al. 2005).

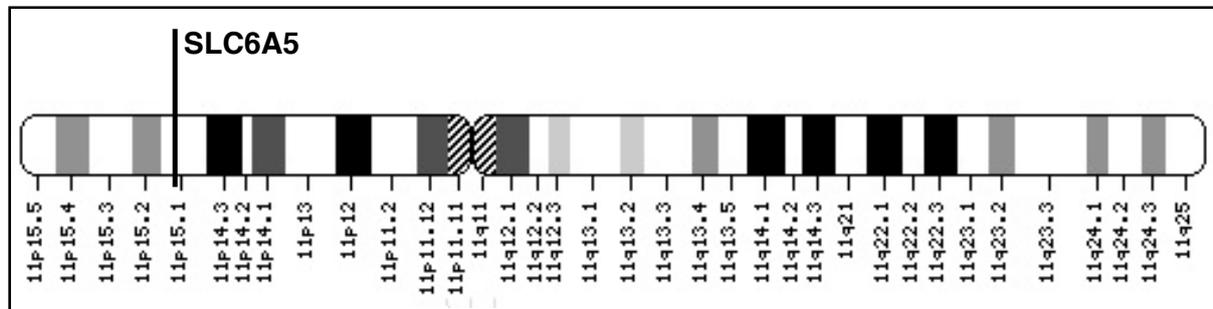
Die Regulierung der Glycintransporter scheint mehreren Mechanismen zu unterliegen. Bekannt ist dabei unter anderem, dass die intrazelluläre  $Ca^{2+}$ -Konzentration die Anzahl der GLYT2-Moleküle auf der Zelloberfläche beeinflusst, wobei bei Erhöhung der Konzentration eine Internalisierung der Transporter erfolgt. Auch Syntaxin 1A, welches für den Einbau in die Membran, nicht jedoch für die Entfernung aus derselben notwendig zu sein scheint, bewirkt eine temporäre Zunahme der Anzahl von GLYT2-Molekülen in der Plasmamembran, auf die eine längerdauernde Herabregulation unbekannter Funktion folgt (Geerlings et al. 2001).

#### **2.3.5. Das GLYT2-Gen SLC6A5**

##### **2.3.5.1. Chromosomale Position und genomische Organisation**

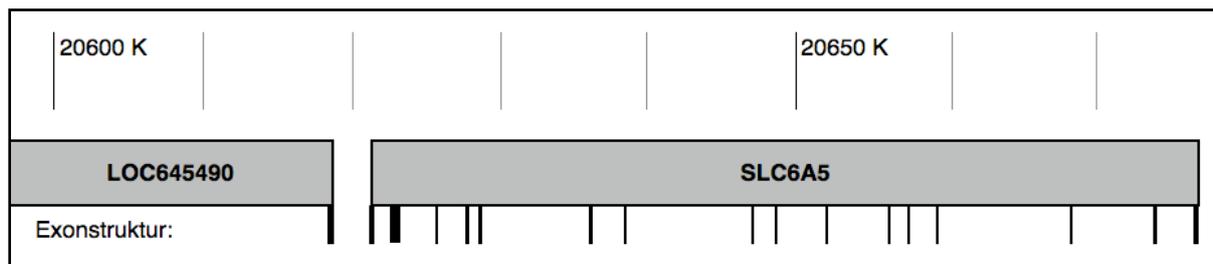
Das für GLYT2 kodierende Gen SLC6A5 (*Solute Carrier Family 6 [Neurotransmitter Transporter, Glycine], member 5*) konnte mittels *Radiation-Hybrid-Analyse* auf dem kurzen Arm des Chromosom 11 bei 11p15.1-15.2 lokalisiert werden (Morrow et al.

1998). Laut der Datenbank Entrez Gene, welche auf Daten der NCBI (*National Center for Biotechnology Information*, Bethesda, USA) beruht (Maglott et al. 2007), beginnt das Gen 20.620.946 bp (Basenpaare) vom p-terminalen Ende des Chromosoms entfernt und endet 20.676.610 bp vom p-terminalen Ende entfernt. Damit umfasst es 55.665 Basen und wird vom positiven Strang transkribiert (Entrez Gene 2010). Abbildung 2-5 verdeutlicht die chromosomale Position des SLC6A5.



**Abbildung 2-5** Die Position des SLC6A5-Gens auf Chromosom 11 (ergänzt nach Entrez Gene 2010).

Das Gen SLC6A5 enthält 16 Exons, welche ein 2.863 Basen langes mRNA-Produkt ergeben (Abbildung 2-6). In der 5'-Region befindet sich das benachbarte Gen LOC645490, über welches noch wenig bekannt ist (Entrez Gene 2010).



**Abbildung 2-6** Die genomische Organisation des SLC6A5-Gens (nach Entrez Gene 2010).

### 2.3.5.2. Molekulargenetische Studien zu SLC6A5

Molekulargenetische Untersuchungen zu Varianten des SLC6A5-Gens beziehen sich vornehmlich auf die Bedeutung des Gens für die Hyperekplexie, die oben bereits erwähnt wurde. Rees et al. (2006) konnten zeigen, dass – neben den bekannten Hyperekplexie verursachenden Mutationen im Gen des Glycinrezeptors und seltenen anderen Mutationen – auch Veränderungen im GLYT2-Gen diese Erkrankung hervorrufen können. Es handelt sich dabei um *Missense*-, *Nonsense*- und *Frameshift*-Mutationen in SLC6A5, welche zu einer gestörten Glycinaufnahme oder zu einer falschen Lokalisation des GLYT2 führen. Die betroffenen Patienten zeigen ein

Krankheitsbild mit muskulärer Hypertonie, übersteigter Schreckreaktion auf taktile oder akustische Stimulation und neonatalen Apnoephasen (Rees et al. 2006).

Dagegen sind Studien, die das Gen SLC6A5 im Kontext der Schizophrenie untersuchen, noch wenig zahlreich. Eine neue Studie aus dem Jahre 2012 kommt zu dem Schluss, dass bei Mäusen, welche heterozygot für eine *Loss-of-function*-Mutation im GlyT2-Gen sind und somit eine verminderte Glycinausschüttung besitzen, schizophreientypische Verhaltensauffälligkeiten wie stereotype Bewegungen und Hyperaktivität beobachtet werden können (Bogdanik et al. 2012). Inwieweit sich diese Ergebnisse jedoch auf den Menschen übertragen lassen, ist derzeit noch unklar.

Unter den Studien, die gezielt Assoziationen von Einzelnukleotidpolymorphismen mit der Schizophrenie betrachten, schließen bisher lediglich die zwei im Folgenden beschriebenen auch das SLC6A5-Gen mit ein. Dem SLC6A5-Gen rechnet das NCBI dabei derzeit 780 SNPs, darunter 26 kodierende SNPs, zu (Entrez SNP 2010).

Die bis zum heutigen Zeitpunkt einzige das SLC6A5-Gen betrachtende Fall-Kontroll-Studie an einem kaukasischen Kollektiv wurde 2006 durchgeführt. Jamra et al. (2006) untersuchten vier SNPs des SLC6A5-Gens in einer deutschen Population mit 328 schizophrenen Patienten und 307 Kontrollprobanden. Es handelte sich dabei um rs2241940 im Intron 1, rs2289683 im Intron 6, rs3740871, welcher heute als rs1805091 bezeichnet wird und im Exon 8 lokalisiert ist, und rs2000959 im Intron 11. Sie konnten in diesem Studienkollektiv keine Assoziation des SLC6A5-Gens mit der Schizophrenie nachweisen (Jamra et al. 2006).

Eine Fall-Kontroll-Studie an einem asiatischen Kollektiv konnte jedoch im Jahre 2008 eine solche Assoziation feststellen. Deng et al. (2008) untersuchten insgesamt 21 SNPs der Gene SLC1A4, SLC1A5, SLC6A5 und SLC6A9 bei 100 schizophrenen Patienten und 100 Kontrollprobanden einer japanischen Studienpopulation. Drei der sechs getesteten Marker des SLC6A5-Gens, welche in der intergenischen Region sowie im Intron 5 und 8 des Gens lagen, wurden bei vielversprechendem Ergebnis im Anschluss noch in einer übergeordneten Population überprüft. Diese bestand aus 400 schizophrenen Patienten und 420 gesunden Probanden. Der SNP rs894747, welcher in der intergenischen Region 2355 bp 5' des SLC6A5-Gens lokalisiert war,

konnte dabei auch in der größeren Studienpopulation Signifikanz bezüglich der Assoziation mit der Schizophrenie erreichen. Aus diesen Ergebnissen lässt sich schließen, dass sich ein Suszeptibilitätslocus der Schizophrenie für das japanische Studienkollektiv nahe oder in SLC6A5 befinden könnte, wobei diese Erkenntnis jedoch für Populationen mit anderem ethnischen Hintergrund validiert werden müsste (Deng et al. 2008).

### 3. Fragestellung

Nachdem eine genetische Komponente in der Ätiologie der Schizophrenie mittels Familienstudien gesichert werden konnte, gilt das Interesse der Forschung heute der Aufdeckung der Gene, die die Suszeptibilität für die Erkrankung erhöhen, der Quantifizierung der jeweiligen Risikoerhöhung und der Verbesserung des Verständnisses der Interaktion der Gene sowohl untereinander als auch mit den ätiopathogenetisch relevanten Umweltfaktoren. Als geeignete Untersuchung, um diesen Zielen näher zu kommen, haben sich die Fall-Kontroll-Assoziationsstudien durchgesetzt, welche Genvariationen mit kleinem Effekt detektieren können (Christensen und Murray 2007).

Die Vermutung einer möglichen Relevanz der Glycine im Rahmen der Ätiologie der Schizophrenie gründet auf mehreren Überlegungen. Zum einen besitzt Glycin modulierende Eigenschaften am NMDA-Rezeptor, welcher eine zentrale Rolle in der Glutathypothese der Schizophrenie einnimmt. In diesem Zusammenhang ist auch das Gen SLC6A5 des Glycintransporters GLYT2, welcher für die Wiederaufnahme des Glycins aus dem Zytosol in die Präsynapse verantwortlich ist und damit die extrazelluläre Glycinkonzentration beeinflusst, von Interesse. Zum anderen hat die inhibitorische glycinerge Neurotransmission, für welche die GLYT2-Funktion essentiell ist, vermutlich Auswirkungen auf die neuronale Plastizität und die ZNS-Entwicklung. Störungen dieser zentralen Vorgänge werden auch in der Entstehung der Schizophrenie angenommen. Darüber hinaus weisen Erkrankungen, welche nachweislich durch SLC6A5-Mutationen hervorgerufen werden, in ihrer Symptomatik Übereinstimmungen mit der Schizophrenie auf. Zu nennen ist dabei in erster Linie die gestörte *Startle*-Reaktion, welche bei einer Vielzahl schizophrener Patienten beobachtet werden kann. Diese Berührungspunkte lassen eine genauere Untersuchung des Gens und der umliegenden Region auf Chromosom 11 vielversprechend erscheinen.

Bisher liegen widersprüchliche Daten zu diesem Gen im Bezug auf die Schizophrenie vor; eine Studie, welche eine mögliche Relevanz des SLC6A5-Gens annimmt (Deng et al. 2008), steht dabei einer Untersuchung mit negativem Ergebnis

(Jamra et al. 2006) gegenüber. Die Bedeutung dieses Gens für die Schizophrenie konnte somit noch nicht abschließend geklärt werden.

Daher war es Ziel der vorliegenden Fall-Kontroll-Assoziationsstudie mit 510 schizophrenen Patienten und 618 Kontrollprobanden, Marker-Polymorphismen des SLC6A5-Gens, welches für den Glycintransporter GLYT2 kodiert, zu analysieren. Sechs SNPs (*Single Nucleotide Polymorphisms*; Einzelnukleotidpolymorphismen) wurden auf ein unterschiedlich häufiges Vorkommen der Allele und Genotypen in der Patientengruppe im Vergleich mit der Kontrollprobandengruppe hin untersucht, um die Frage nach einer möglichen Assoziation der Polymorphismen des SLC6A5-Gens mit der Schizophrenie beantworten zu können und somit zur Klärung der Rolle des GLYT2-Gens in der Ätiologie dieser Erkrankung beizutragen.

## 4. Material und Methoden

### 4.1. Vorbedingungen

Vor Beginn der Studie erfolgte die Überprüfung der ethisch-rechtlichen Unbedenklichkeit durch die lokale Ethikkommission. Die Aufklärung der Studienteilnehmer wurde durch ausführliche Information zu Ziel und Inhalt der Studie, den Risiken, der Freiwilligkeit der Teilnahme und dem Prozedere der Daten- und Probenanonymisierung gewährleistet und in der Einverständniserklärung dokumentiert. Ein Widerruf dieses Einverständnisses und damit Ausschluss aus der Studie war jederzeit ohne Angabe von Gründen möglich.

### 4.2. Datengewinnung

Aufgrund des im Rahmen einer Assoziationsstudie für verwertbare Ergebnisse benötigten Umfangs der Studienpopulation wurden die Aufgabenbereiche zur Generierung und Erfassung der Daten innerhalb der Sektion für Molekulare und klinische Neurobiologie aufgeteilt.

Das eigene Aufgabengebiet während der Mitarbeit in der Arbeitsgruppe, welche sechs Monate in Vollzeit betrug, umfasste vorrangig die Durchführung der ca. vierstündigen klinischen Interviews mit etwa 50 der schizophrenen Patienten der Studiengruppe. Neben der unter 4.3.2. beschriebenen ausführlichen Anamnese standen dabei die Erhebung des Strukturierten Klinischen Interviews für DSM-IV (SKID I und II; First et al. 1997; Wittchen et al. 1997; Fydrich et al. 1997) und der *Positive and Negative Syndrome Scale for Schizophrenia* (PANSS; Kay et al., 1987) im Vordergrund.

Des Weiteren gehörten die Digitalisierung und Auswertung der erhobenen klinischen Daten, die telefonische Rekrutierung der Patienten, deren Aufklärung sowie die für die Gewinnung der molekulargenetischen Untersuchungen erforderlichen Blutabnahmen zu den übernommenen Tätigkeiten.

Die eigenen, so gewonnenen Daten flossen einem Pool zu, der auch Daten anderer Mitarbeiter der Arbeitsgruppe enthielt, so beispielsweise die unten wiedergegebenen

Daten zur Untersuchung der Kontrollprobanden und der molekulargenetischen Untersuchungen. Dieser Pool ermöglichte es, die für eine Assoziationsstudie notwendige Anzahl an Studienteilnehmern zu erreichen und somit aussagekräftige Daten zu dem hier besprochenen Gen SLC6A5 zu generieren.

### 4.3. Studienteilnehmer

Das Studienkollektiv bestand aus zwei Gruppen, den an einer Schizophrenie erkrankten Patienten und den gesunden Kontrollprobanden. Einen Überblick über die Beschaffenheit der Gruppen gibt Tabelle 4-1.

**Tabelle 4-1** Übersicht über die Studienteilnehmer

	Alter in Jahren als Mittelwert (SD)	Geschlecht als Anzahl (%)		Gesamt als Anzahl
		männlich	weiblich	
Kontrollen	45,23 (15,25)	283 (45,8)	335 (54,2)	618
Patienten	37,85 (11,36)	331 (64,9)	179 (35,1)	510
Gesamt		614 (54,4)	514 (45,6)	1128

#### 4.3.1. Kontrollprobanden

Die aus 618 Personen bestehende Kontrollgruppe setzte sich aus 335 (54,2%) weiblichen und 283 (45,8%) männlichen, nicht verwandten Erwachsenen zusammen, deren Alter im Mittel 45,23 Jahre betrug. Die Kontrollprobanden waren zwischen 18 und 79 Jahre alt, woraus sich eine Standardabweichung von 15,25 Jahren ergab. 46,6% dieser Probanden besaßen einen dem Abitur vergleichbaren Schulabschluss, 33,8% einen mittleren Bildungsabschluss und 19,6% eine nicht über den Hauptschulabschluss hinausgehende schulische Qualifikation.

Der Erstkontakt wurde durch das Einwohnermeldeamt München hergestellt, indem mögliche Kontrollprobanden nach dem Zufallsprinzip aus der allgemeinen Bevölkerung des Großraums München ausgewählt wurden. Nach schriftlicher Information und Einladung zur Teilnahme an der Studie wurde bei Interesse über ein Telefonscreening die grundsätzliche Eignung für die Studienteilnahme geprüft. Diese

Prüfung umfasste eine Eigen- und Familienanamnese des potentiellen Probanden. Zum Ausschluss führten dabei hirnrorganische und psychische Erkrankungen des Probanden oder dessen Erstgradangehörigen. Zu eruiieren waren hier in erster Linie affektive oder schizophrene Störungen, Angststörungen, Suizidversuche und ein Substanzabusus. Als Einschlusskriterium wurde die deutsche Herkunft des Probanden verifiziert.

Bei Erfüllung aller Voraussetzungen und Einwilligung des Probanden erfolgte in einem persönlichen Gespräch neben einer ausführlichen allgemeinen und psychiatrischen Anamnese die Durchführung des Strukturierten Klinischen Interviews für DSM-IV (SKID), wobei sowohl SKID I (Achse I; Psychische Störungen), als auch SKID II (Achse II; Persönlichkeitsstörungen) Anwendung fanden (First et al. 1997; Wittchen et al. 1997; Fydrich et al. 1997). Grundlage für den SKID sind die oben beschriebenen Diagnosekriterien nach DSM-IV (siehe Abschnitt 2.1.2.). Zusätzlich wurden psychosoziale Belastungsfaktoren entsprechend der Achse IV nach DSM-IV erfragt. Anhand der GAF-Skala (*Global Assessment of Functioning*-Skala; Achse V nach DSM-IV) wurde das globale Funktionsniveau auf einem hypothetischen Kontinuum zwischen seelischer Gesundheit und Krankheit eingeschätzt. Anschließend wurden psychiatrische Diagnosen bei erstgradig Verwandten mittels *Family History Assessment Modules* beurteilt (Rice et al. 1995). Zuletzt wurde das Leipziger Ereignis- und Belastungsinventar (LEBI) durchgeführt (Richter und Guthke 1996). Konnten so SKID Achse I und II Störungen, relevante somatische Erkrankungen sowie psychiatrische Erkrankungen bei Erstgradangehörigen ausgeschlossen werden, erfolgte der Einschluss in die Gruppe der Kontrollprobanden.

#### **4.3.2. Patienten**

Die Gruppe der Patienten umfasste 510 Erwachsene mit der Diagnose Schizophrenie, davon waren 179 (35,1%) weiblich und 331 (64,9%) männlich. Die Gruppe wies ein mittleres Alter von 37,85 Jahre bei einer Standardabweichung von 11,36 Jahren auf. Die Altersspanne betrug dabei 18 bis 67 Jahre. Bezüglich der schulischen Bildung besaßen 29,2% der Patienten die Hochschulreife, 27,3% einen mittleren Bildungsabschluss und 43,5% höchstens einen Hauptschulabschluss.

Erhoben wurde eine standardisierte Anamnese aller chronischen somatischen, neurologischen und psychiatrischen Erkrankungen einschließlich deren Medikation und stationärer oder ambulanter Behandlung. Ein weiterer Teil der Anamnese befasste sich mit der Lebensgeschichte, dabei wurde unter anderem die ethnische Herkunft, die familiäre Situation sowie der schulische und berufliche Werdegang abgefragt. Das Vorliegen einer substanzinduzierten oder organischen psychotischen Störung führte ebenso zum Ausschluss von der Studie wie die Diagnose einer Demenz, einer Epilepsie, eines Morbus Parkinson sowie eines Alkohol-, Drogen-, oder Medikamentenmissbrauchs. Differentialdiagnostisch zur Schizophrenie waren eine schizoaffektive Störung und im ebenfalls durchgeführten SKID II eine schizotype Persönlichkeitsstörung auszuschließen.

Die Diagnose Schizophrenie, die ein Einschlusskriterium darstellte, wurde anhand des SKID I gesichert. Dabei forderten die Kriterien des DSM-IV zwei der charakteristischen Merkmale der Schizophrenie über sechs Monate mit mindestens einem Monat Positivsymptomatik (siehe Abschnitt 2.1.2). Zu den geforderten Merkmalen zählten Wahnvorstellungen, Halluzinationen, desorganisierte Sprechweise, grob desorganisiertes oder katatonies Verhalten und Negativsymptomatik, welche unter anderem Antriebshemmung, Alogie und einen flachen Affekt einschloss; bei bizarren Wahnvorstellungen, kommentierenden oder dialogisierenden Stimmen war dies als einziges Merkmal ausreichend (Saß et al. 1996). Des Weiteren erfolgte die Unterscheidung zwischen paranoidem, katatonem, desorganisiertem und undifferenziertem Subtyp der Schizophrenie. Beurteilt wurden außerdem der Schweregrad aktuell und zum Zeitpunkt der schlimmsten Ausprägung sowie das Alter bei Einsetzen der Prodromalsymptomatik, das Alter bei Erstmanifestation der psychotischen Symptome und das Verlaufsmuster.

Weitere Teile des SKIDs befassten sich mit eventuell vorliegenden Komorbiditäten wie einem Alkohol- und Drogenabusus, einer posttraumatischen Belastungsreaktion, einer affektiven Störung, einer Panik-, Zwangs-, Angst-, Anpassungs-, Essstörung sowie einer somatoformen Störung. Die Einschätzung der Achse IV (psychosoziale Beeinträchtigung) und V (globale Beurteilung der Leistungsfähigkeit) nach DSM-IV wurde bei den Patienten jeweils für den Zustand zum Untersuchungszeitpunkt und jenem während der schlimmsten Phase der Erkrankung erhoben. Anschließend

wurden mit der PANSS (*Positive and Negative Syndrome Scale for Schizophrenia*; Kay et al. 1987) Positiv- und Negativsymptome sowie allgemeine psychopathologische Symptome auf ihr Vorhandensein hin geprüft und in 7 Abstufungen in ihrem Schweregrad bewertet.

#### 4.4. Untersuchte Einzelnukleotidpolymorphismen

Ziel der Arbeit war die Prüfung der Allel- und Genotypausprägung bestimmter Einzelnukleotidpolymorphismen auf ihre mögliche Assoziation zur Schizophrenie hin. Bei den ausgewählten sechs SNPs (*Single Nucleotide Polymorphisms*; Einzelnukleotidpolymorphismen) handelte es sich um rs4923219, rs4923220, rs11025642, rs16906511, rs10500882 und rs1373165, welche alle Marker des Gens SLC6A5 darstellen (Tabelle 4-2).

**Tabelle 4-2** Untersuchte Einzelnukleotidpolymorphismen. Die Angabe der chromosomalen Position (chrom. Pos.) bezieht sich auf den NCBI build 36.3 (Entrez SNP 2010).

	Gen	Chromosom	Allele	Funktion	chrom. Pos.
<b>rs4923219</b>	SLC6A5	11	A/G	5'-Genregion	20568026
<b>rs4923220</b>	SLC6A5	11	C/T	5'-Genregion	20568187
<b>rs11025642</b>	SLC6A5	11	A/T	5'-Genregion	20569334
<b>rs16906511</b>	SLC6A5	11	A/T	5'-Genregion	20574611
<b>rs10500882</b>	SLC6A5	11	A/G	Intron 5	20586413
<b>rs1373165</b>	SLC6A5	11	C/T	Intron 5	20586739

Die in dieser Arbeit besprochenen SNPs wurden im Rahmen einer groß angelegten Fall-Kontroll-Studie genotypisiert. Die Auswahl geeigneter SNPs beruhte auf der Berücksichtigung bereits publizierter SNPs und dem Bestreben, Polymorphismen aus unterschiedlichen Haplotypblöcken auszuwählen. SNPs eines Haplotypblockes korrelieren innerhalb einer Population sehr stark, was auch als Kopplungsungleichgewicht bezeichnet wird (Attia et al. 2009a). Da somit bei Kenntnis eines SNPs auf die Ausprägung anderer Polymorphismen des selben Haplotypblockes geschlossen werden kann, ermöglicht die Analyse einer relativ kleinen Anzahl an SNPs einen maximalen Informationsgewinn (International HapMap Consortium 2003 und 2007).

## 4.5. Laborverfahren

Die Laborverfahren wurden nach Standardprotokollen der Sektion Molekulare und klinische Neurobiologie der Ludwig-Maximilians-Universität München durchgeführt.

### 4.5.1. DNA-Extraktion

Ziel der DNA-Extraktion war die Herstellung einer gereinigten DNA, welche eine Voraussetzung für die nachfolgende PCR (*Polymerase Chain Reaction*; Polymerase-Kettenreaktion) und das iPlex-Verfahren (Firma Sequenom, San Diego) zur Hochdurchsatzgenotypisierung darstellte.

Um zu gewährleisten, dass die DNA frei von nukleinsäurebindenden Proteinen, RNA, Nukleasen und anderen Verunreinigungen war, wurde die DNA nach dem Protokoll des *QIAamp DNA Blood Maxi Kits* extrahiert (Qiagen 2005). Die angewandte Methode macht sich die proteindenaturierenden und -inaktivierenden Eigenschaften chaotroper Salze zunutze, wobei in diesem Fall Guanidiniumhydrochlorid zum Einsatz kam.

Das Verfahren gliederte sich in einen DNA-Lyseschritt, welchem die Bindung der DNA an eine Silikamembran folgte. Weitere Schritte waren zwei Waschgänge und letztlich die Freisetzung der DNA aus der Silikamembran, womit die DNA für die anschließende PCR vorbereitet war. Diese Schritte werden im Folgenden detaillierter beschrieben. Einen Überblick über die für die Extraktion der Proben-DNA der Patienten und Kontrollprobanden verwendeten Materialien gibt Tabelle 4-3 (S. 47).

Die Proben aller Studienteilnehmer bestanden aus venösem Blut in 7ml-EDTA-Monovetten, welche bei -80°C gelagert wurden. Das Vollblut wurde für die weitere Verarbeitung zunächst bei Raumtemperatur aufgetaut und anschließend bei 3000rpm (*revolutions per minute*; Umdrehungen pro Minute) für 10min in der Rotixa RP Standzentrifuge zentrifugiert. Der so entstandene Blutkuchen wurde bei -20°C gelagert, bis er zur Extraktion bei Raumtemperatur aufgetaut und mit PBS-Puffer (*Phosphate Buffered Saline*-Puffer; phosphatgepufferte Salzlösung) auf ein Volumen von 10ml gebracht wurde.

**Tabelle 4-3** Materialien, Reagenzien und Geräte zur DNA-Extraktion

Material, Reagenz, Gerät	Verwendungszweck	Hersteller
10x PBS-Puffer: 80g NaCl, 2g KCl, 14,4g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 2,4g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> . Ad 1l mit Aqua dest. Mit NaOH auf pH 7,4	Herstellung des 1x PBS-Puffers	Carl Roth, Hamburg
1x PBS-Puffer: 100ml 10x PBS-Puffer, 900ml Aqua dest.	Resuspendierung des Blutkuchens	eigene Herstellung
50ml Zentrifugenröhre	Auffangen der Eluate	Sarstedt, Nümbrecht
Sammelgefäße	Auffangen der DNA	Qiagen, Hilden
EDTA Dinatriumsalz-Dihydrat (Titrierkomplex III)	Herstellung des 10x BPS-Puffers	Carl Roth, Hamburg
EDTA Monovette	Blutentnahme	Sarstedt, Nümbrecht
Eppendorf <i>Research</i> Pipette (100-1000µl)	Pipettierung der DNA	Eppendorf, Hamburg
Ethanol Rotipuran >99,8% p. a.	Entfernung der DNA-Hydrathülle	Carl Roth, Hamburg
Mikroschraubröhre 2,0ml	Lagerung der DNA	Sarstedt, Nümbrecht
Puffer AE	Elution der DNA	Qiagen, Hilden
Puffer AL	Zellyse	Qiagen, Hilden
Puffer AW1	Entfernung von Zellrückständen	Qiagen, Hilden
Puffer AW2	Entfernung von Zellrückständen	Qiagen, Hilden
<i>QIAamp Maxi Spin Columns</i>	Bindung der DNA	Qiagen, Hilden
Qiagen-Protease	Abbau von Zellproteinen	Qiagen, Hilden
Rotixa RP Standzentrifuge	alle Zentrifugationschritte	Hettich, Tuttlingen
Vortex Genie	Durchmischung von Blut-Puffer-Suspensionen	Scientific Industries, New York
WB Wasserbad	Inkubation bei 70°C der Blut-Puffer-Suspension	Memmert, Schabhausen

Für die Lyse der Leukozyten wurde die so vorbereitete Suspension mit 500µl Qiagen-Protease und nach Vermischung mit 12ml Puffer AL versetzt, woraufhin sie für 60s auf einem Vortexer homogenisiert wurde. Der Puffer AL enthielt dabei Guanidiniumhydrochlorid, welches zu den oben erwähnten chaotropen Salzen zählt und neben den Kontaminationen auch die Hydrathülle der DNA denaturiert, was für die geplante Bindung der DNA an die Silikagelmembran erforderlich war. Die entstandene Lösung wurde für 30min bei 70°C inkubiert, um den DNA-Ertrag zu maximieren.

In einem nächsten Schritt wurden 10ml 96-100%iges Ethanol hinzugefügt und die Probe in zwei Portionen in der QIAamp Maxi Säule mit 3000rpm für 3min zentrifugiert. Ziel war dabei die Fällung der DNA aus der Lösung und die anschließende Bindung der von RNA und Proteinen gereinigten DNA an die in der QIAamp Maxi Säule enthaltene Silikagelmembran.

In zwei Waschgängen wurde nach Hinzugabe von 5ml Puffer AW1 bei 4000rpm für 2min und nach Hinzugabe von 5ml ethanolhaltigem, salzarmen Puffer AW2 für weitere 15min zentrifugiert. Dabei diente Ersteres der Entfernung verbliebener Protein- und RNA-Verunreinigungen, wohingegen Letzteres durch Auswaschen der chaotropen Salze auf die folgende Elution vorbereitete.

Zur Elution der DNA von der Silikagelmembran kamen 1,5ml des basischen Trisaminomethan-haltigen Puffers AE zum Einsatz. Dieser wurde der Probe zugesetzt, woraufhin zweifach bei Raumtemperatur inkubiert und in der Folge für 2min bei 5000rpm zentrifugiert wurde. Die Lagerung der Proben bis zur weiteren Verwendung erfolgte bei -80°C in 2,0ml Mikroschraubröhrchen.

#### **4.5.2. Konzentrationsmessung und -einstellung der DNA**

Die nach oben beschriebenen Verfahren gewonnene DNA lag in einer unbekanntem Konzentration von 50-300ng/µl vor, weshalb die genaue Konzentration roboter-gestützt mit Hilfe des PicoGreen-Verfahrens ermittelt und auf 50ng/µl eingestellt werden musste. Bei PicoGreen (Firma Invitrogen, Karlsruhe) handelt es sich um einen Fluoreszenzfarbstoff, welcher hochselektiv an doppelsträngige DNA bindet (Rengarajan et al. 2002) und eine quantitative Analyse ermöglicht, da die Anzahl der emittierten Lichtquanten direkt proportional zur Menge der vorhandenen DNA ist. Die verwendeten Materialien für die PicoGreen-Konzentrationsmessung und die nachfolgende Konzentrationseinstellung fasst Tabelle 4-4 (S. 49) zusammen.

Vorbedingung für die Konzentrationsbestimmung war die Herstellung einer Standardverdünnungsreihe mit bekannten DNA-Konzentrationen. Es handelte sich dabei um eine 1:2 Verdünnungsreihe eines 100ng/µl DNA-Standards, welche in die Vertiefungen A1 bis H1 einer *Thermo Fast 96 well Platte* pipettiert wurde.

**Tabelle 4-4** Materialien, Reagenzien und Geräte zur DNA-Konzentrationsbestimmung

Material, Reagenz, Gerät	Verwendungszweck	Hersteller
20µl <i>Conductive Roborack Tips</i>	Pipettierung	Perkin Emer, Massachusetts
200µl <i>Conductive Roborack Tips</i>	Pipettierung	Perkin Emer, Massachusetts
1000µl <i>Conductive Roborack Tips</i>	Pipettierung	Perkin Emer, Massachusetts
<i>96 well Flat Bottom Plate Black</i>	Vorlagenplatte für DNA	Greiner Bio-one, Frickenhausen
<i>Human genomic DNA 100ng/µl</i>	Standardverdünnungsreihe	Clontech, Mountain View
<i>Janus Automated Workstation</i>	Durchführung der Pipettierungsschritte	Perkin Emer, Massachusetts
Micro Schraubröhre 2,0ml	Lagerung der DNA	Sarstedt, Nümbrecht
<i>Quant iT PicoGreen dsDNA reagent</i>	Fluoreszenzmessung der DNA	Invitrogen, Karlsruhe
<i>Thermo Fast 96 well Plate</i>	Vorverdünnung der DNA	ABgene, Hamburg
<i>Victor<sup>3</sup> Multilabel Counter 1420</i>	Fluoreszenzmessung der DNA	Perkin Emer, Massachusetts
<i>Wallac 1420 Workstation</i>	Software für Victor <sup>3</sup> Multilabel Counter	Perkin Emer, Massachusetts
WinPREP	Software für Janus Workstation	Perkin Emer, Massachusetts

Die zu messende DNA wurde 1:10 mit autoklaviertem, destilliertem Wasser vorverdünnt, um Konzentrationen zu vermeiden, welche den Messbereich der Standardverdünnungsreihe überstiegen. Dazu wurden per Roboter *Janus Automated Workstation* auf einer *96 well Flat Bottom Plate* 5µl jeder DNA-Probe sowie 45µl destilliertes Wasser pipettiert. Das gefrorene PicoGreen-Reagenz wurde vorbereitet, indem es eine Stunde bei Raumtemperatur aufgetaut und anschließend in einem 50ml-Röhrchen mit Tris-EDTA-Puffer im Verhältnis 1:156 verdünnt wurde. Dabei wurde darauf geachtet, den Lichteinfall möglichst gering zu halten.

Nach diesen Vorbereitungen wurden alle folgenden Schritte mit dem oben genannten Roboter ausgeführt. Auf einer weiteren *96 well* Platte wurden 50µl autoklaviertes, destilliertes Wasser je *well* (Vertiefung) vorgelegt. Je 5µl der vorbereiteten Standardverdünnungsreihe wurden in absteigender Konzentration in die Vertiefungen A bis G der Spalte 1 gebracht. Dies wurde in der Spalte 2 wiederholt, sodass die Standardverdünnungsreihe als Duplikat vorhanden war. Die vorverdünnte Proben-DNA unbekannter Konzentration wurde nun, wie die Standardverdünnungsreihe

ebenfalls in Duplikaten, beginnend bei Vertiefung A3 auf die Platte pipettiert. Je Platte konnten auf diese Weise 40 DNA-Proben unbekannter Konzentration aufgebracht werden (Tabelle 4-5). Anschließend wurden pro Vertiefung 145µl des PicoGreen-Gemisches hinzugefügt, womit sich für dieses eine Konzentration von 1:200 ergab.

**Tabelle 4-5** Plattendesign für die DNA-Konzentrationsmessung

	Standard		DNA-Proben unbekannter Konzentration									
Well	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<b>A</b>	100 ng/µl	100 ng/µl	DNA1	DNA1	DNA9	DNA9	DNA17	DNA17	DNA25	DNA25	DNA33	DNA33
<b>B</b>	50 ng/µl	50 ng/µl	DNA2	DNA2	DNA10	DNA10	DNA18	DNA18	DNA26	DNA26	DNA34	DNA34
<b>C</b>	25 ng/µl	25 ng/µl	DNA3	DNA3	DNA11	DNA11	DNA19	DNA19	DNA27	DNA27	DNA35	DNA35
<b>D</b>	12,5 ng/µl	12,5 ng/µl	DNA4	DNA4	DNA12	DNA12	DNA20	DNA20	DNA28	DNA28	DNA36	DNA36
<b>E</b>	6,25 ng/µl	6,25 ng/µl	DNA5	DNA5	DNA13	DNA13	DNA21	DNA21	DNA29	DNA29	DNA37	DNA37
<b>F</b>	3,125 ng/µl	3,125 ng/µl	DNA6	DNA6	DNA14	DNA14	DNA22	DNA22	DNA30	DNA30	DNA38	DNA38
<b>G</b>	1,5625 ng/µl	1,5625 ng/µl	DNA7	DNA7	DNA15	DNA15	DNA23	DNA23	DNA31	DNA31	DNA39	DNA39
<b>H</b>	Blind	Blind	DNA8	DNA8	DNA16	DNA16	DNA24	DNA24	DNA32	DNA32	DNA40	DNA40

Nachdem ein Greifer die Platte in das Fluoreszenzmessgerät *Victor<sup>3</sup> Multilabel Counter 1420* transportiert hatte, wurde sie dort 30s in horizontalen Doppellellipsen rotiert. Die Anregung des PicoGreens erfolgte bei Licht mit der Wellenlänge 485nm, die Emissionsmessung bei 535nm. Pro Vertiefung betrug die Messzeit dabei 0,1s und konnte mit der *Wallac 1420 Workstation Software* verfolgt werden. Die Konzentrationsberechnung übernahm anschließend der Computer *Optiplex GX620 Pentium 4HT* (Firma Dell, Frankfurt). Dazu wurde der Mittelwert der Vertiefungen beider Duplikate einer DNA-Probe gebildet und durch Vergleich mit der Standardverdünnungsreihe die Konzentration der Probe bestimmt.

Die Konzentrationseinstellung der einzelnen Proben auf 50ng/µl erfolgte als letzter Schritt abermals durch den Roboter *Janus Automated Workstation*. Dieser

berechnete anhand der ermittelten Konzentrationswerte automatisch das Verhältnis von destilliertem Wasser zu DNA-Volumen, welches für die angestrebte Konzentration benötigt wurde, und fügte dieses der Probe hinzu. Für die anschließende Genotypisierung wurden die konzentrationseingestellten DNA-Proben bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

### **4.5.3. Genotypisierung**

Die Genotypisierung erfolgte automatisiert durch die Kombination des iPlex-Verfahrens mit der MALDI-TOF MS (*Matrix Assisted Laser Desorption/Ionisation-Time Of Flight Mass Spectrometry*; matrixgestützte Flugzeit-Massenspektrometrie). Dabei handelt es sich bei Ersterem um eine Methode der SBE (*Single Base Extension*; Einzelbasenverlängerung) und bei Letzterem um ein Verfahren zur Massenanalyse niedermolekularer Substanzen.

#### **4.5.3.1. iPlex-Verfahren**

Der iPlex-Assay (Firma Sequenom, San Diego) gliederte sich in drei Schritte. Zunächst erfolgte eine Multiplex-PCR-Amplifikation des Genombereiches, in dem die SNPs lagen, woraufhin sich eine SAP-Behandlung (*Shrimp Alkaline Phosphatase*-Behandlung) anschloss, um überschüssige Nukleotide zu dephosphorylieren. Abschließend wurde die eigentliche iPlex-Extensionsreaktion durchgeführt, bei welcher die eingesetzten Extensionsprimer je nach Allelausprägung des SNPs durch Einzelbasenverlängerung unterschiedliche Massen erhielten.

Diese Massenunterschiede ermöglichten in der folgenden MALDI-TOF Massenspektrometrie die Erkennung der vorliegenden Allelausprägung.

##### **4.5.3.1.1. Multiplex-Polymerase-Kettenreaktion**

Die Amplifikation der DNA-Fragmente, welche die gewünschten SNPs enthielten, erfolgte mittels PCR (*Polymerase Chain Reaction*; Polymerase-Kettenreaktion). Tabelle 4-6 (S. 52) gibt einen Überblick über die verwendeten Materialien, Reagenzien und Geräte.

**Tabelle 4-6** Materialien, Reagenzien und Geräte für die Multiplex-PCR

<b>Material, Reagenz, Gerät</b>	<b>Verwendungszweck</b>	<b>Hersteller</b>
<i>Centrifuge 5810 R</i>	Zentrifugieren der 96- und 384- <i>well</i> Platten	Eppendorf, Hamburg
Dan Klorix	Verhinderung von DNA-Kontamination	Colgate-Palmolive, Hamburg
dNTP-Set, 100mM	Herstellung des Multiplex-PCR-Mastermix	ABgene, Hamburg
<i>Easy Peel Heat Sealing Foil</i>	Verschluss der 96- und 384- <i>well</i> Platten	ABgene, Hamburg
Eppendorf <i>Research</i> Pipetten	Pipettierung der Reagenzien	Eppendorf, Hamburg
e.T.I.P.S. Pipettenspitzen (0,5-20µl; 2-200µl; 50-1000µl)	Pipettierung der Reagenzien	Eppendorf, Hamburg
<i>Gene Amp PCR System 9700</i>	Multiplex-PCR	Applied Biosystems, Foster City
<i>Heat Sealer ALPS-300</i>	Verschluss der 96- und 384- <i>well</i> Platten	ABgene, Hamburg
<i>HotStar Taq DNA-Polymerase</i> (5U/µl)	Multiplex-PCR	Qiagen, Hilden
MgCl <sub>2</sub> , 25mM	Herstellung des Multiplex-PCR-Mastermix	Qiagen, Hilden
MICROLAB MPH 96	Pipettierroboter	Hamilton, Reno
Mikrotestplatte 96 K	Pipettierung des Multiplex-PCR-Mastermix	Sarstedt, Nümbrecht
Pipettierwanne für Mehrkanalpipetten	Pipettierung des Multiplex-PCR-Mastermix	Ratiolab, Dreieich
PCR-Puffer 10x	Herstellung des Multiplex-PCR-Mastermix	Qiagen, Hilden
<i>Purelab Ultra</i>	Reinstwasseranlage	ELGA, Celle
Spritzen, 50ml	Wasserfiltration	BD Bioscience, Heidelberg
Spritzenvorsatzfilter, 0,22µM	Wasserfiltration	Qualilab, Olivet
<i>Thermo Fast 384 well Plate</i>	Multiplex-PCR	ABgene, Hamburg

Das PCR-Verfahren wurde 1983 von Kary Mullis und seinen Mitarbeitern entwickelt, um DNA *in vitro* nachzuweisen (Mullis 1990). Eine DNA-Polymerase repliziert dabei in wiederholten Zyklen die DNA-Matrize. Benötigt werden hierfür kurze Oligonukleotide, welche als Primer für die DNA-Polymerase fungieren und mit der Matrize am Beginn und – auf dem komplementären Strang – am Ende der gewünschten Sequenz hybridisieren (Tabelle 4-7, S. 53). Da die Reaktion ein Erhitzen erfordert, ist dabei die Verwendung der Taq-Polymerase, einer

thermostabilen DNA-Polymerase aus dem Eubakterium *Thermophilus aquaticus*, von Vorteil. Neben der DNA-Matrize, den Primern und der Taq-Polymerase werden Desoxynukleosid-triphosphate (dNTPs) im Überschuss benötigt, um der Polymerase die Verlängerung am 3'-OH-Ende der Primer zu ermöglichen.

**Tabelle 4-7**      Verwendete PCR-Primer für die untersuchten SNPs

	<b>PCR-Primer 1</b>	<b>PCR-Primer 2</b>
<b>rs4923219</b>	ACGTTGGATGCACGGGCAATTAAGGTGATG	ACGTTGGATGACAAAAGACCTTGTAATGCC
<b>rs4923220</b>	ACGTTGGATGAAGAGTCTGGGTGATTGGTG	ACGTTGGATGGTGCATCGTCACAGACAATC
<b>rs11025642</b>	ACGTTGGATGTAGCATGATCTCGATTTTG	ACGTTGGATGATACACATTCTATCTAGCC
<b>rs16906511</b>	ACGTTGGATGTTGAAAACGCGTGCCACTC	ACGTTGGATGTGTCTTGGCAGTAACACTGG
<b>rs10500882</b>	ACGTTGGATGAGAAGAGGGCAAGATACTGG	ACGTTGGATGAGCTGACACTTTCTGCCAAG
<b>rs1373165</b>	ACGTTGGATGCCTAGCTGAGGAGAATTAAC	ACGTTGGATGGGTGCTAGTAGCAGTCACTT

Eine Weiterentwicklung der klassischen PCR stellt die hier zur Anwendung gekommene Multiplex-PCR dar, die die gleichzeitige Amplifikation mehrerer DNA-Fragmente in einem einzigen Reaktionsansatz erlaubt. Daraus resultieren ein höherer Durchsatz sowie geringere Kosten (Oeth et al. 2005).

Der verwendete Ansatz enthielt 1,850µl autoklaviertes H<sub>2</sub>O, 0,625µl PCR-Puffer, 0,325µl à 25 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,1µl à 25mM dNTP, 1,0µl à 500nM Primer-Mix und 0,1µl à 5 U/µl *HotStar* Taq-Polymerase. Zu diesem Ansatz wurden jeweils 2,5µl à 5-10ng/µl genomischer DNA pipettiert.

Nach Zentrifugation wurde die PCR bei geeigneten Puffer-Bedingungen in Zyklen mit jeweils drei Schritten im Thermocycler (Firma Applied Biosystems, Foster City) durchgeführt. Dem ersten PCR-Zyklus wurde dabei eine 15-minütige initiale Denaturierung bei 94°C vorgeschaltet, um optimale Bedingungen für die PCR zu schaffen.

Im ersten Schritt, der Denaturierung, wurde durch eine Hitzebehandlung für 20s bei 94°C das Auftrennen der doppelsträngigen DNA erreicht. Der zweite Schritt bestand in einer Abkühlung auf 56°C für 30s, bei der es zur Hybridisierung der Primer mit den komplementären Sequenzen auf der nun einzelsträngigen DNA kam. Dieser Vorgang

wird auch als *Annealing* bezeichnet. Bei der Elongation verwendete die DNA-Polymerase im dritten Schritt die dNTPs zur von den Primern ausgehenden DNA-Synthese. Für optimale Bedingungen erfolgte dies bei 72°C für 60s.

Dieser Zyklus aus drei Schritten wurde nun 45-fach wiederholt, bevor eine abschließende dreiminütige Elongation bei 72°C (*final elongation*) die PCR beendete. Das mittels dieses Verfahrens amplifizierte DNA-Fragment entsprach der Sequenz auf der DNA-Matrize zwischen den beiden Primern inklusive der Sequenz dieser Primer selbst. Da die Replikationsprodukte eines Zyklus dabei im nächsten Zyklus ihrerseits als Matrize dienten, kam es zu einer exponentiellen Amplifikation der DNA-Kopien, welche die SNPs enthielten.

#### **4.5.3.1.1. SAP-Behandlung**

Da für ein optimales Resultat die dNTPs bei der PCR im Überschuss zugegeben wurden, musste ausgeschlossen werden, dass diese in der anschließenden iPlex-Reaktion zu ungewünschten Extensionsreaktionen führten. Zu diesem Zweck wurde zu je 5µl des PCR-Produktes ein Gemisch aus 1,530µl autoklaviertem H<sub>2</sub>O, 0,300µl (1U/µl) SAP (*Shrimp Alkaline Phosphatase*; Firma Sequenom, San Diego) und 0,170µl 10xSAP Puffer (Firma Sequenom, San Diego) hinzugegeben. Das Enzym SAP gewährleistete dabei, dass noch vorhandene dNTPs dephosphoryliert und somit inaktiviert wurden. Dafür wurden die Proben für 40min bei 37°C inkubiert und in der Folge für 10min auf 85°C erhitzt, um die Inaktivierung des Enzyms zu ermöglichen. Anschließend wurden die PCR-Produkte bis zur Weiterverwendung gekühlt bei 4°C aufbewahrt.

#### **4.5.3.1.1. iPlex-Extensionsreaktion**

Die für die iPlex-Reaktion und die anschließende Entsalzung benötigten Materialien, Reagenzien und Geräte listet Tabelle 4-8 (S. 55) auf. Bei der iPlex-Extensionsreaktion handelt es sich um ein Verfahren, welches auf der Didesoxymethode zur DNA-Sequenzierung beruht. Erstmals wurde dieses Prinzip 1997 von Haff und seinen Mitarbeitern mit dem PinPoint-Assay realisiert (Haff et al. 1997).

**Tabelle 4-8** Materialien, Reagenzien und Geräte für die iPlex-Extensionsreaktion

Material, Reagenz, Gerät	Verwendungszweck	Hersteller
<i>Centrifuge 5810 R</i>	Zentrifugieren der 96- und 384- <i>well</i> Platten	Eppendorf, Hamburg
<i>Clean Resin</i>	Entsalzung der Extensionsprodukte	Sequenom, San Diego
<i>Dimple Plates</i>	Entsalzung der Extensionsprodukte	Sequenom, San Diego
<i>Easy Peel Heat Sealing Foil</i>	Verschluss der 96- und 384- <i>well</i> Platten	ABgene, Hamburg
Eppendorf <i>Research</i> Pipetten	Pipettierung der Reagenzien	Eppendorf, Hamburg
e.T.I.P.S. Pipettenspitzen (0,5-20µl; 2-200µl; 50-1000µl)	Pipettierung der Reagenzien	Eppendorf, Hamburg
<i>Gene Amp PCR System 9700</i>	Multiplex-Extend-Reaktion	Applied Biosystems, Foster City
<i>Heat Sealer ALPS-300</i>	Verschluss der 96- und 384- <i>well</i> Platten	ABgene, Hamburg
<i>iPLEX Buffer Plus</i>	Multiplex-Extend-Reaktion	Sequenom, San Diego
<i>iPLEX Enzyme</i>	Multiplex-Extend-Reaktion	Sequenom, San Diego
<i>iPLEX Termination Mix</i>	Multiplex-Extend-Reaktion	Sequenom, San Diego
Mikrotestplatte	Pipettierung des Multiplex-Extend-Mastermix	Ratiolab, Dreieich
Multimek Pipettierroboter	Wasserzugabe für Entsalzung	Beckmann, Fullerton
<i>Purelab Ultra</i>	Reinstwasseranlage	ELGA, Cele
Spritzen, 50ml	Wasserfiltration	BD Bioscience, Heidelberg
Spritzenvorsatzfilter, 0,22µM	Wasserfiltration	Qualilab, Olivet
<i>Thermo Fast 384 well Plate</i>	Multiplex-Extend-Reaktion	ABgene, Hamburg

Bei diesem Verfahren kommt es analog zur klassischen PCR zu einer DNA-Amplifikation, jedoch als Besonderheit nur in Form einer Einzelbasenextension. Dies beruht auf der Verwendung von Didesoxyribonukleosidtriphosphaten (ddNTPs), welche nach ihrem Einbau auf Grund der fehlenden 3'-OH-Gruppe die weitere Polymerisationsreaktion verhindern. Die Primer für diese Reaktion müssen dabei so gewählt werden, dass sie unmittelbar 5' vor dem interessierenden SNP an die DNA binden, damit die einzige Base, um welche der Primer verlängert wird, zum gesuchten SNP komplementär ist (Tabelle 4-9, S. 56). Durch unterschiedliche Massen der eingebauten ddNTPs lässt sich hiernach mit Hilfe des MALDI-TOF Massenspektrometers die eingebaute Base erkennen und somit der dazu komplementäre SNP bestimmen.

**Tabelle 4-9** Verwendete Extendprimer für die untersuchten SNPs

	<b>Extendprimersequenz</b>	<b>mögliche Verlängerung</b>
<b>rs4923219</b>	tTGACAGAATAGAGTTCTAAGGGA	A/G (Adenin/Guanin)
<b>rs4923220</b>	ACAATCACACTCCCCAAATGCTCTCAC	C/T (Cytosin/Thymin)
<b>rs11025642</b>	GGTGTAGAGCTTCCTAG	A/T (Adenin/Thymin)
<b>rs16906511</b>	TCACCGGATGGCCTGTTTTTCAG	A/T (Adenin/Thymin)
<b>rs10500882</b>	tGCCTCAAGTCCCAATCTATTTTCACAT	A/G (Adenin/Guanin)
<b>rs1373165</b>	AGTAGCAGTCACTTTGGAAG	C/T (Cytosin/Thymin)

Die SAP-behandelten PCR-Produkte wurden einer zuvor hergestellten Mischung zugesetzt. Diese bestand aus 0,755µl autoklaviertem H<sub>2</sub>O, 0,200µl iPLEX-Puffer, 0,200µl iPLEX-Abbruch-Mix, 0,804µl à 7-14µM Primer-Mix und 0,041µl iPLEX-Enzym.

Die Kettenreaktion wurde daraufhin wie zuvor die klassische PCR im Thermocycler durchgeführt. Dabei kam zuerst eine übergeordnete Zyklusschleife 40-fach zur Anwendung. In diese war eine untergeordnete Zyklusschleife eingebettet, welche sich 5-fach wiederholte, bevor zur übergeordneten Schleife zurückgekehrt wurde. Insgesamt wurden somit 200 Zyklen in zwei Zyklusschleifen durchlaufen (Abbildung 4-1).

1. Initiale Denaturierung	94°C	30s		
2. Denaturierung	94°C	5s		] 40 Zyklen
3. Annealing	52°C	5s	] 5 Zyklen	
4. Extension	80°C	5s		
5. Finale Extension	72°C	3min		
6. Aufbewahrung	4°C	bis zur Weiterverarbeitung		

**Abbildung 4-1** Das iPlex-Programm

Vor Beginn der Zyklusschleifen wurden die Proben zur initialen Denaturierung für 30s auf 94°C erwärmt. Anschließend begann die übergeordnete Zyklusschleife, welche insgesamt 40-fach durchlaufen wurde. Zur Denaturierung wurde die Probe dabei für 5s auf 94°C erhitzt, woraufhin bei 52°C für 5s das Annealing und bei 80°C für

abermals 5s die Extension erfolgten. Der Annealing- und der Extensionsschritt bildeten die untergeordnete Zyklusschleife, welche 5-fach wiederholt wurde, bevor erneut die übergeordnete Zyklusschleife mit einer Denaturierung begann. Abschließend kam es zu einer letzten dreiminütigen Extensionsphase bei 72°C. Die Lagerung der Proben erfolgte erneut bei 4°C (Abbildung 4-1, S. 56).

Um Störsignale in der angestrebten MALDI-TOF-Massenspektrometrie zu vermeiden, wurde die Probe im Anschluss mit der ionenaustauscherharzhaltigen Substanz *Clean Resin* einer quantitativen Entsalzung unterzogen. Dafür wurde jeder Probe mit einer *dimple plate* 6mg *Clean Resin* und mit Hilfe des Multimek Pipettierroboters (Firma Beckmann, Fullerton) 25µl H<sub>2</sub>O zugesetzt. Nach Bildung einer homogenen Suspension konnte diese bei 4000rpm für 5min zentrifugiert werden, wodurch sich das *Clean Resin* am Boden der *wells* absetzte.

#### 4.5.3.2. MALDI-TOF Massenspektrometrie

Die Genotypisierung der SNPs wurde mittels MALDI-TOF Massenspektrometrie durchgeführt. Basierend auf der herkömmlichen Massenspektrometrie, stellt MALDI (*Matrix Assisted Laser Desorption/Ionisation*) dabei eine von Karas und Hillenkamp 1988 vorgestellte Weiterentwicklung der Massenspektrometrie für größere und empfindlichere Moleküle dar (Karas et al. 1988). Dieses Verfahren wurde mit der TOF *mass spectrometry* (*Time Of Flight*; Flugzeitspektrometrie) kombiniert, um letztlich die Allelausprägung der Einzelnukleotidpolymorphismen bestimmen zu können. Die verwendeten Materialien und Geräte sind aus Tabelle 4-10 (S. 58) ersichtlich.

Der MassARRAY Nanodispenser (Firma Sequenom, San Diego) diente dem Aufbringen des Analyten auf den *SpectroCHIP* (Firma Sequenom, San Diego), einen Siliziumchip mit 384 Matrixpunkten für die Proben und 8 Kalibrierungspunkten. Nach Einbringen in das Vakuum des Autoflex-Massenspektrometers (Firma Bruker Daltonics, Bremen) wurde die Probe einer gepulsten Laserbestrahlung von mehreren Nanosekunden ausgesetzt. Dies führte zur Desorption, dem Überführen von Neutralteilchen aus der kondensierten in die gasförmige Phase. Hierbei erfolgte auch die Ionisation in hauptsächlich einfach geladene, unfragmentierte Ionen.

**Tabelle 4-10** Materialien, Reagenzien und Geräte für die MALDI-TOF Massenspektrometrie

<b>Material, Reagenz, Gerät</b>	<b>Verwendungszweck</b>	<b>Hersteller</b>
<i>3 Point Calibrant</i>	Kalibrieren der Massenspektren	Sequenom, San Diego
<i>AssayEditor 3.4.0.7</i>	Assayimport	Sequenom, San Diego
<i>FLEXControl</i>	MALDI-Steuerung	Bruker Daltonics, Bremen
<i>MassARRAY POINT Nanodispenser</i>	Applikation der Extensionsprodukte aus SpectroCHiPs	Sequenom, San Diego
MNL 200 Stickstofflaser	Massenspektrometrische Analyse der Extensionsprodukte	LTB Laser Technik, Berlin
Autoflex Massenspektrometer	Massenspektrometrische Analyse der Extensionsprodukte	Bruker Daltonics, Bremen
<i>Nitrogen Generator</i>	Stickstoffversorgung des Lasers	Parker Balston, Haverhill
<i>PlateEditor 3.4.0.48</i>	Plattenzusammenstellung	Sequenom, San Diego
<i>RT Workstation 3.4, Chiplinker</i>	Datenverlinkung	Sequenom, San Diego
<i>SpectroAcquire 3.3.1.3</i>	MALDI-Steuerung	Sequenom, San Diego
<i>SpectroChips</i>	Probenträger mit <i>Matrixdroplets</i>	Sequenom, San Diego
<i>SpectroTARGET</i>	Träger für <i>SpectroCHiPs</i>	Sequenom, San Diego
<i>TyperAnalyzer 3.4.0.18</i>	Spektrenauswertung	Sequenom, San Diego

In einem zweiten Schritt schloss sich die TOF *mass spectrometry* (*Time Of Flight*; Flugzeitspektrometrie) an. Die entstandenen Ionen wurden durch ein elektrisches Feld beschleunigt und traten dann in eine feldfreie Driftstrecke ein, wobei die Flugzeit ab Laserbeschuss gemessen werden konnte. Die Flugzeiten unterschieden sich dabei gemäß des unterschiedlichen Verhältnis von Masse zu Ladung, welches die Ionen aufwiesen.

Aus den resultierenden Spektren war somit abschließend die Zuordnung der sich in der letzten Base unterscheidenden DNA-Fragmente zu der jeweiligen Allelausprägung des SNPs möglich.

#### **4.6. Statistische Auswertung**

Alle SNPs wurden ob des Vorliegens des Hardy-Weinberg-Equilibriums (HWE) überprüft, welches als Einschätzung bezüglich einer stabilen Verteilung der untersuchten Genotypen in der Population dient. Das HWE ist ein mathematisches Modell, welches von einer fiktiven idealen Population ausgeht, in der die Genotypfrequenzen nicht von Evolutionsfaktoren beeinflusst werden, sondern stets

in einem genetischen Gleichgewicht liegen. Dabei wurde im verwendeten F-Test ein Grenzwert von  $p = 0,05$  festgelegt. Bei Werten von  $p < 0,05$  galt das Hardy-Weinberg-Gleichgewicht als nicht erfüllt. Eine Verteilung der Genotypen außerhalb des Hardy-Weinberg-Gleichgewichts kann zum einen biologische Ursachen haben, zum anderen jedoch auch auf Genotypisierungsfehler hinweisen, womit das Hardy-Weinberg-Equilibrium der Qualitätskontrolle dient (Hosking et al. 2004).

Die statistische Auswertung hinsichtlich der unterschiedlichen Allel- und Genotypverteilung der SNPs des SLC6A5-Gens bei schizophrenen Patienten versus gesunden Kontrollprobanden wurde mit der SPSS 14.0 Software (*Statistical Package for Social Sciences; Firma SPSS, Chicago*) durchgeführt. Zur Überprüfung der Signifikanz des Unterschiedes kam der zweiseitigen Chi-Quadrat-Test zur Anwendung. Als Signifikanzniveau wurde  $p < 0,05$  festgelegt, wobei  $p < 0,1$  als Trend gewertet wurde.

## 5. Ergebnisse

Die untersuchten Marker auf Chromosom 11 sind in einer Region zu finden, in welcher das SLC6A5-Gen, bei dem es sich um das Gen für den Glycintransporter GLYT2 handelt, lokalisiert ist. Nahe oder in diesem Gen wurde in einer japanischen Population ein Suszeptibilitätslocus für die Schizophrenie vermutet (Deng et al. 2008).

Um diese Vermutung in einer europäischen Population zu verifizieren, wurden bei 618 deutschen Kontrollprobanden und 510 kaukasischen schizophrenen Patienten die sechs SNPs rs4923219, rs4923220, rs11025642, rs16906511, rs10500882 und rs1373165 genotypisiert.

Zwei der untersuchten Marker-SNPs für SLC6A5, rs1373165 und rs10500882, befinden sich direkt innerhalb des Gens, beide sind dabei in Intron 5 lokalisiert.

Die übrigen SNPs befinden sich 5' der Genregion im benachbarten Gen LOC645490, über welches noch wenig bekannt ist. Die SNPs rs4923219, rs4923220 und rs11025642 liegen dabei im Intron 6, der SNP rs16906511 im Exon 7 des Gens. Dem SLC6A5-Gen am fernsten liegt rs4923219, welches an Position 20.611.450 bp vom p-terminalen Ende und somit 9.496 bp vor dem 5'-Ende des SLC6A5-Gens lokalisiert ist (Entrez SNP 2010). Abbildung 5-1 zeigt die Position der untersuchten SNPs in Bezug zum Gen SLC6A5.



**Abbildung 5-1** Das SLC6A5-Gen mit der Position der untersuchten SNPs (nach Entrez SNP 2010).

## 5.1. Analyse des Polymorphismus rs4923219

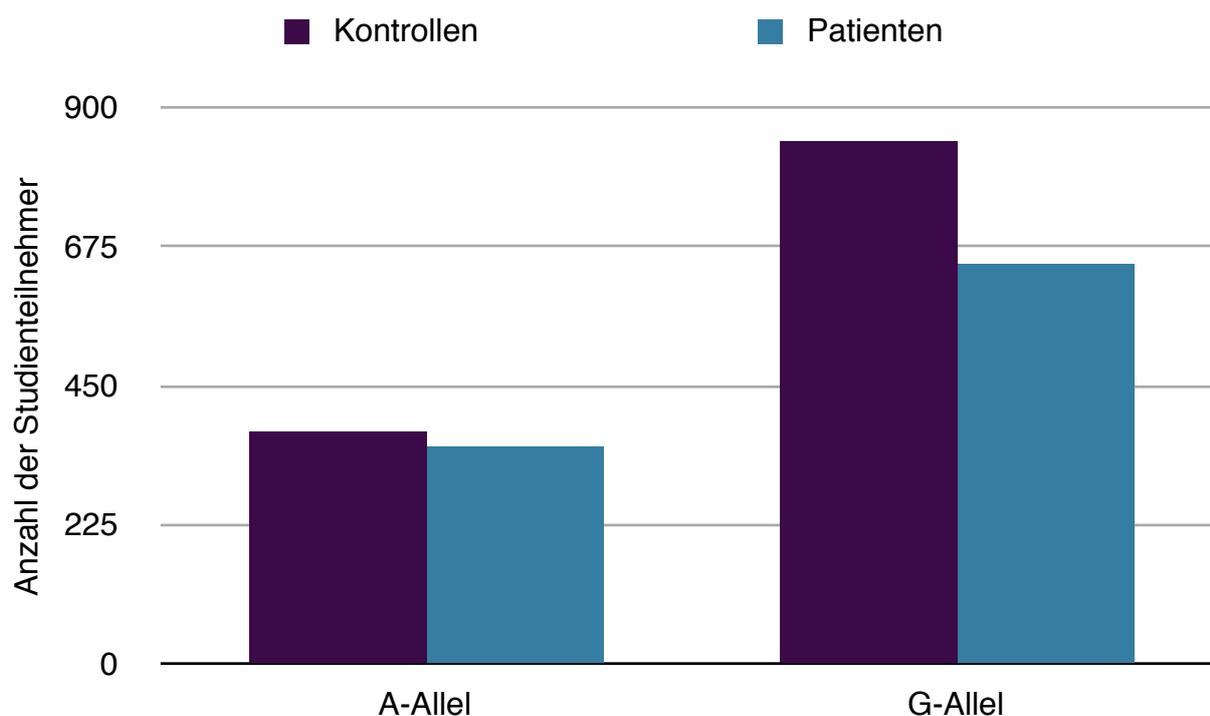
### 5.1.1. Allelverteilung des SNPs rs4923219

Bei der statistischen Auswertung der Daten des SNP rs4923219 interessierten zunächst Unterschiede bezüglich der Allelhäufigkeit in der Kontrollprobanden- und der Patientengruppe. Es ergab sich die in Tabelle 5-1 veranschaulichte Verteilung.

**Tabelle 5-1** Allelverteilung des Einzelnukleotidpolymorphismus rs4923219

	A-Allel n (%)	G-Allel n (%)	Gesamt n (%)
Kontrollprobanden	376 (30,8)	846 (69,2)	1222 (100,0)
Patienten	352 (35,2)	648 (64,8)	1000 (100,0)
Gesamt	728 (32,8)	1494 (67,2)	2222 (100,0)

Es konnte ein signifikant häufigeres Vorkommen des A-Allels in der Gruppe der schizophrenen Patienten verglichen mit der Gruppe der Kontrollprobanden aufgezeigt werden ( $\chi^2=4,901$ ; OR=0,818 (CI=0,685-0,977); df=1; p=0,027). Abbildung 5-2 verdeutlicht diesen Unterschied.



**Abbildung 5-2** Graphische Darstellung der Allelverteilung des SNPs rs4923219 in der Kontroll- und Patientengruppe.

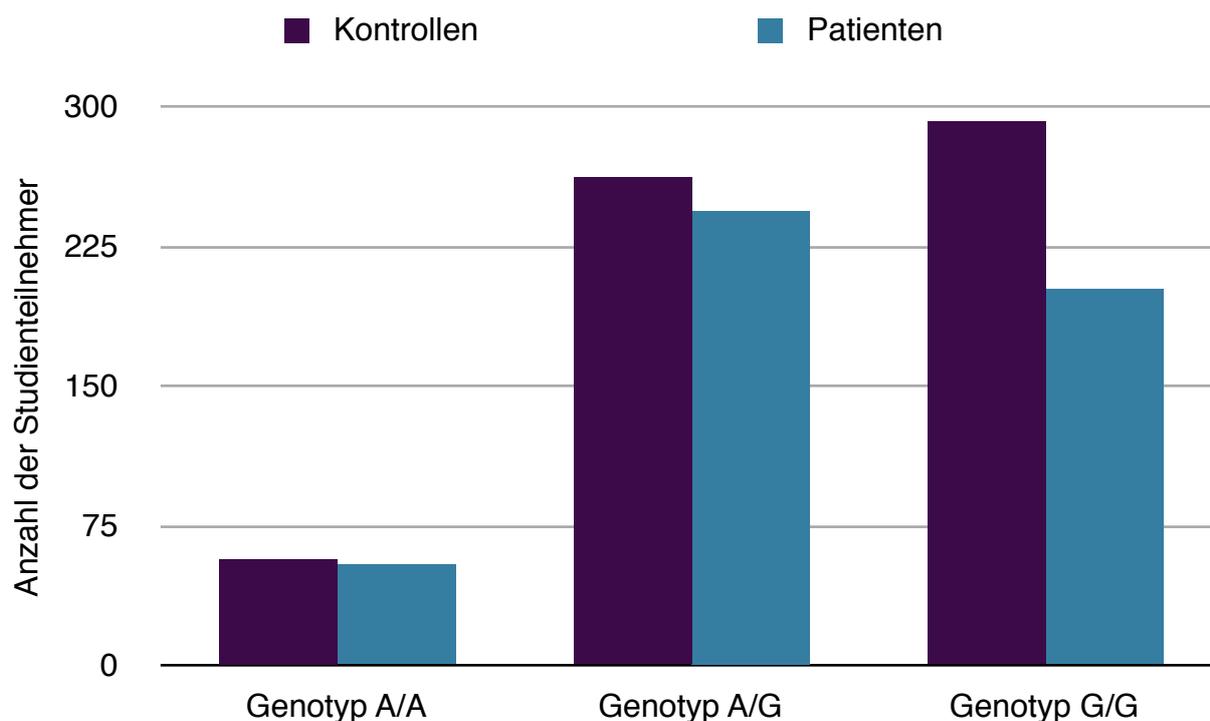
### 5.1.2. Genotypverteilung des SNPs rs4923219

Der Analyse der Allelverteilung schloss sich die Auswertung der Genotypen des Polymorphismus rs4923219 an. Die möglichen Genotypen A/A, A/G und G/G und ihre Häufigkeiten in den beiden Studiengruppen zeigt Tabelle 5-2.

**Tabelle 5-2** Genotypverteilung des Einzelnukleotidpolymorphismus rs4923219

	Genotyp A/A n (%)	Genotyp A/G n (%)	Genotyp G/G n (%)	Gesamt n (%)
<b>Kontrollprobanden</b>	57 (9,3)	262 (42,9)	292 (47,8)	611 (100,0)
<b>Patienten</b>	54 (10,8)	244 (48,8)	202 (40,4)	500 (100,0)
<b>Gesamt</b>	111 (10,0)	506 (45,5)	494 (44,5)	1111 (100,0)

Festgestellt werden konnte erneut ein statistisch signifikanter Unterschied. In der Gruppe der schizophrenen Patienten war dabei der homozygote Genotyp A/A häufiger, der Genotyp G/G seltener repräsentiert ( $\chi^2=6,089$ ;  $df=2$ ;  $p=0,048$ ). Es fand sich somit für diese Studienpopulation eine Assoziation des Genotyps A/A mit der Schizophrenie. Abbildung 5-3 veranschaulicht diesen Sachverhalt.



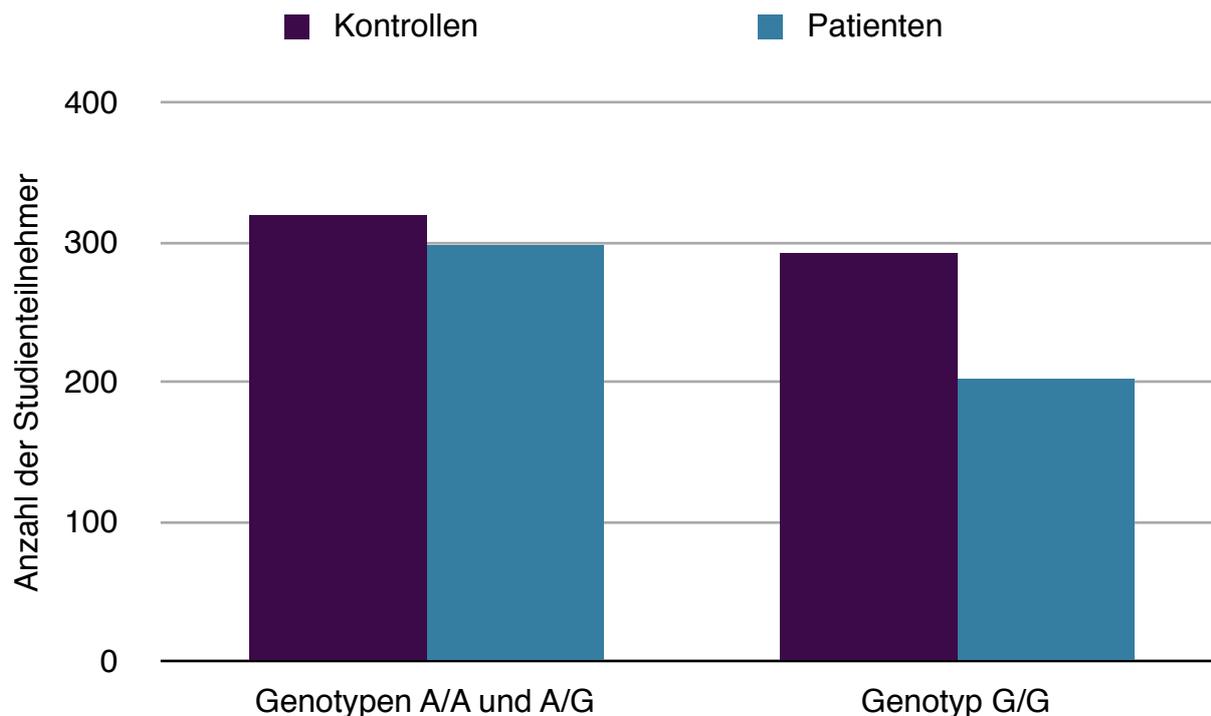
**Abbildung 5-3** Graphische Darstellung der Verteilung der Genotypen des SNPs rs4923219.

Um differenziertere Aussagen über die Genotypverteilung treffen zu können, wurden in einem nächsten Schritt sämtliche Träger mindestens eines A-Allels und somit die Genotypen A/A und A/G zusammengefasst und den homozygoten G-Allelträgern gegenübergestellt (Tabelle 5-3).

**Tabelle 5-3** Häufigkeit der A-Träger (Genotyp A/A und A/G) gegenüber den homozygoten G-Trägern (Genotyp G/G)

	Genotypen A/A und A/G n (%)	Genotyp G/G n (%)	Gesamt n (%)
<b>Kontrollprobanden</b>	319 (52,2)	292 (47,8)	611 (100,0)
<b>Patienten</b>	298 (59,6)	202 (40,4)	500 (100,0)
<b>Gesamt</b>	617 (55,5)	494 (44,5)	1111 (100,0)

Auch hier konnte ein signifikanter Unterschied belegt werden. Der homozygote Genotyp G/G kam dabei in der Gruppe der schizophrenen Patienten seltener vor ( $\chi^2=6,082$ ; OR=0,741 (CI=0,583-0,940); df=1; p=0,014). Die Abbildung 5-4 stellt diese Verteilung dar.



**Abbildung 5-4** Graphische Darstellung der Gegenüberstellung der Träger mindestens eines A-Allels und der homozygoten G-Träger.

Die entsprechende Gegenüberstellung der Träger mindestens eines G-Allels und der homozygoten A-Allel-Träger wird aus Tabelle 5-4 ersichtlich. Dabei konnte jedoch kein signifikanter Unterschied zwischen der Kontrollprobandengruppe und der Patientengruppe festgestellt werden ( $\chi^2=0,662$ ; OR=0,850 (CI=0,574-1,258); df=1; p=0,416).

**Tabelle 5-4** Häufigkeit der homozygoten A-Träger (Genotyp A/A) gegenüber den G-Trägern (Genotyp A/G und G/G)

	Genotyp A/A n (%)	Genotypen A/G und G/G n (%)	Gesamt n (%)
<b>Kontrollprobanden</b>	57 (9,3)	554 (90,7)	611 (100,0)
<b>Patienten</b>	54 (10,8)	446 (89,2)	500 (100,0)
<b>Gesamt</b>	111 (10,0)	1000 (90,0)	1111 (100,0)

## 5.2. Analyse des Polymorphismus rs4923220

### 5.2.1. Allelverteilung des SNPs rs4923220

Bei der Analyse des SNPs rs4923220 wurden die Kontrollprobanden- sowie die Patientengruppe wiederum zunächst auf Unterschiede in der Häufigkeit des Vorkommens der beiden Allele hin untersucht. Die ermittelte Verteilung gibt Tabelle 5-5 wieder.

**Tabelle 5-5** Allelverteilung des Einzelnukleotidpolymorphismus rs4923220

	C-Allel n (%)	T-Allel n (%)	Gesamt n (%)
<b>Kontrollprobanden</b>	698 (59,5)	476 (40,5)	1174 (100,0)
<b>Patienten</b>	624 (62,3)	378 (37,7)	1002 (100,0)
<b>Gesamt</b>	1322 (60,8)	854 (39,2)	2176 (100,0)

Hier konnte kein signifikanter Unterschied bezüglich des Vorkommens des C- und des T-Allels in den beiden Gruppen und somit keine Assoziation eines Allels mit der Schizophrenie nachgewiesen werden ( $\chi^2=1,804$ ; OR=0,888 (CI=0,747-1,056); df=1; p=0,179).

### 5.2.2. Genotypverteilung des SNPs rs4923220

Die Analyse der Frequenz der Genotypen C/C, C/T und T/T in der Kontroll- und der Patientengruppe (Tabelle 5-6) zeigte keinen signifikanten Unterschied ( $\chi^2=1,863$ ;  $df=2$ ;  $p=0,394$ ).

**Tabelle 5-6** Genotypverteilung des Einzelnukleotidpolymorphismus rs4923220

	Genotyp C/C n (%)	Genotyp C/T n (%)	Genotyp T/T n (%)	Gesamt n (%)
<b>Kontrollprobanden</b>	208 (35,4)	282 (48,0)	97 (16,5)	587 (100,0)
<b>Patienten</b>	193 (38,5)	238 (47,5)	70 (14,0)	501 (100,0)
<b>Gesamt</b>	401 (36,9)	520 (47,8)	167 (15,3)	1088 (100,0)

Auch für diesen SNP wurden die homozygoten T-Träger den Trägern mindestens eines C-Allels gegenübergestellt (Tabelle 5-7). Es konnte keine Differenz nachgewiesen werden ( $\chi^2=1,356$ ;  $OR=0,820$  ( $CI=0,588-1,145$ );  $df=1$ ;  $p=0,244$ ).

**Tabelle 5-7** Häufigkeit der C-Träger (Genotyp C/C und C/T) gegenüber den homozygoten T-Trägern (T/T)

	Genotypen C/C und C/T n (%)	Genotyp T/T n (%)	Gesamt n (%)
<b>Kontrollprobanden</b>	490 (83,5)	97 (16,5)	587 (100,0)
<b>Patienten</b>	431 (86,0)	70 (14,0)	501 (100,0)
<b>Gesamt</b>	921 (84,7)	167 (15,3)	1088 (100,0)

Die entgegengesetzte Gegenüberstellung (Tabelle 5-8) erbrachte erneut keinen signifikanten Unterschied ( $\chi^2=1,108$ ;  $OR=0,876$  ( $CI=0,684-1,121$ );  $df=1$ ;  $p=0,293$ ).

**Tabelle 5-8** Häufigkeit der homozygoten C-Träger (Genotyp C/C) gegenüber den T-Trägern (Genotyp C/T und T/T)

	Genotyp C/C n (%)	Genotypen C/T und T/T n (%)	Gesamt n (%)
<b>Kontrollprobanden</b>	208 (35,4)	379 (64,6)	587 (100,0)
<b>Patienten</b>	193 (38,5)	308 (61,5)	501 (100,0)
<b>Gesamt</b>	401 (36,9)	687 (63,1)	1088 (100,0)

### 5.3. Analyse des Polymorphismus rs11025642

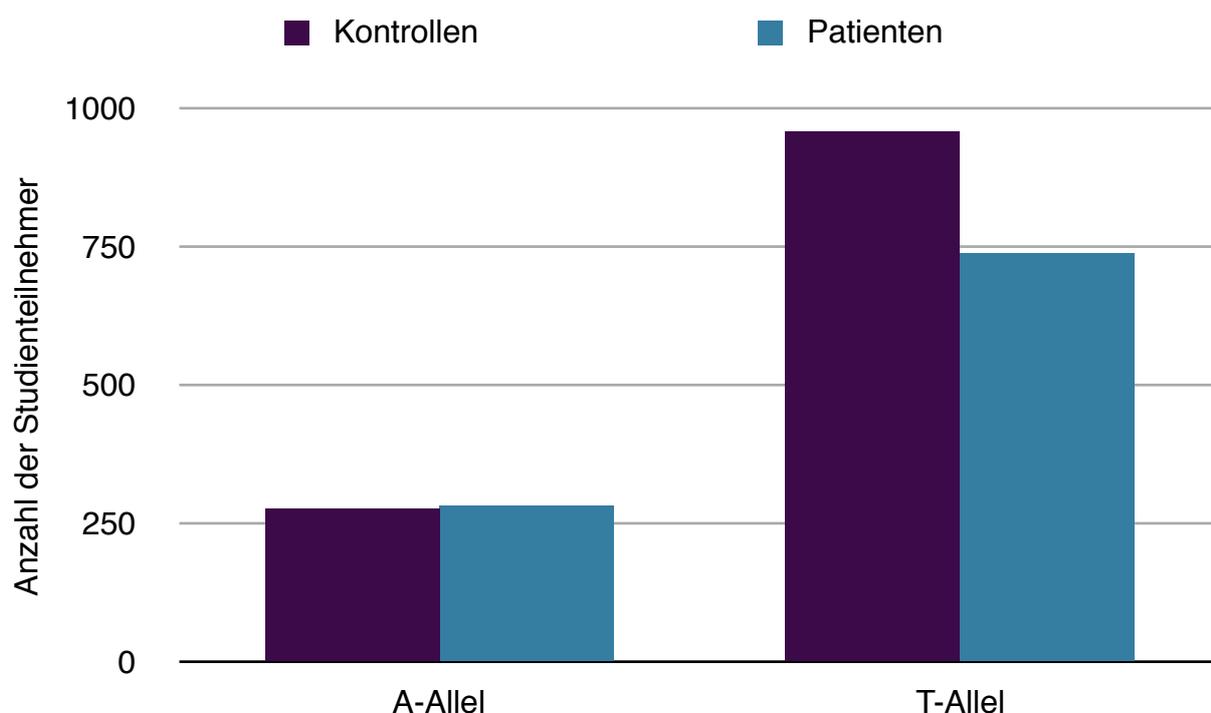
#### 5.3.1. Allelverteilung des SNPs rs11025642

Die Datenauswertung des Markers rs11025642 zeigte die in Tabelle 5-9 dargestellten Allelhäufigkeiten.

**Tabelle 5-9** Allelverteilung des Einzelnukleotidpolymorphismus rs11025642

	A-Allel n (%)	T-Allel n (%)	Gesamt n (%)
Kontrollprobanden	277 (22,4)	959 (77,6)	1236 (100,0)
Patienten	282 (27,6)	738 (72,4)	1020 (100,0)
Gesamt	559 (24,8)	1697 (75,2)	2256 (100,0)

Es zeigte sich ein signifikanter Unterschied in den Allelhäufigkeiten mit einem häufigeren Vorkommen des A-Allels in der Patientengruppe ( $\chi^2=8,220$ ; OR=0,756 (CI=0,624-0,916); df=1; p=0,004). Abbildung 5-5 veranschaulicht diese Assoziation des A-Allels mit der Gruppe der schizophrenen Patienten.



**Abbildung 5-5** Graphische Darstellung der Allelverteilung des SNPs rs11025642 in der Kontroll- und Patientengruppe.

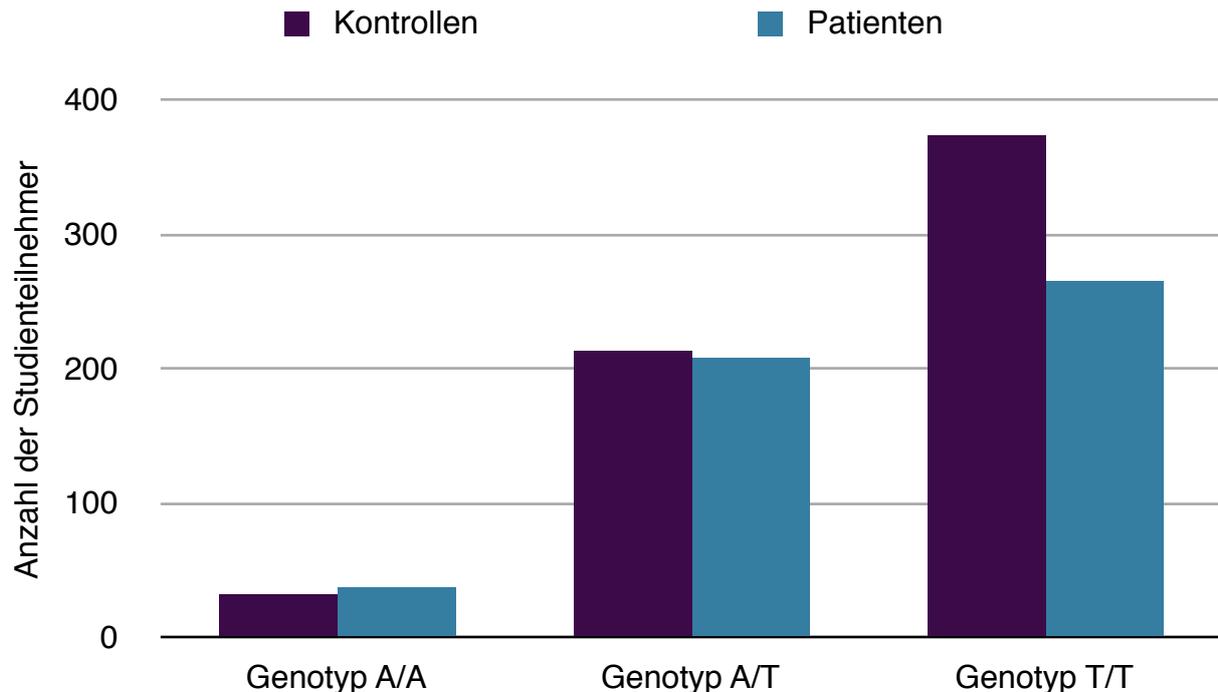
### 5.3.2. Genotypverteilung des SNPs rs11025642

Die anschließende Untersuchung der Genotypverteilung für den SNP rs11025642 bei den möglichen Genotypen A/A, A/T und T/T ergab die in Tabelle 5-10 aufgeführten Häufigkeiten.

**Tabelle 5-10** Genotypverteilung des Einzelnukleotidpolymorphismus rs11025642

	Genotyp A/A n (%)	Genotyp A/T n (%)	Genotyp T/T n (%)	Gesamt n (%)
<b>Kontrollprobanden</b>	32 (5,2)	213 (34,5)	373 (60,4)	618 (100,0)
<b>Patienten</b>	37 (7,3)	208 (40,8)	265 (52,0)	510 (100,0)
<b>Gesamt</b>	69 (6,1)	421 (37,3)	638 (56,6)	1128 (100,0)

Es ergab sich ein signifikanter Unterschied bei häufigerem Vorkommen des homozygoten Genotyps A/A. Der Genotyp T/T war in der Patientengruppe dagegen deutlich unterrepräsentiert ( $\chi^2=8,441$ ;  $df=2$ ;  $p=0,015$ ). Abbildung 5-6 stellt diesen Sachverhalt dar.



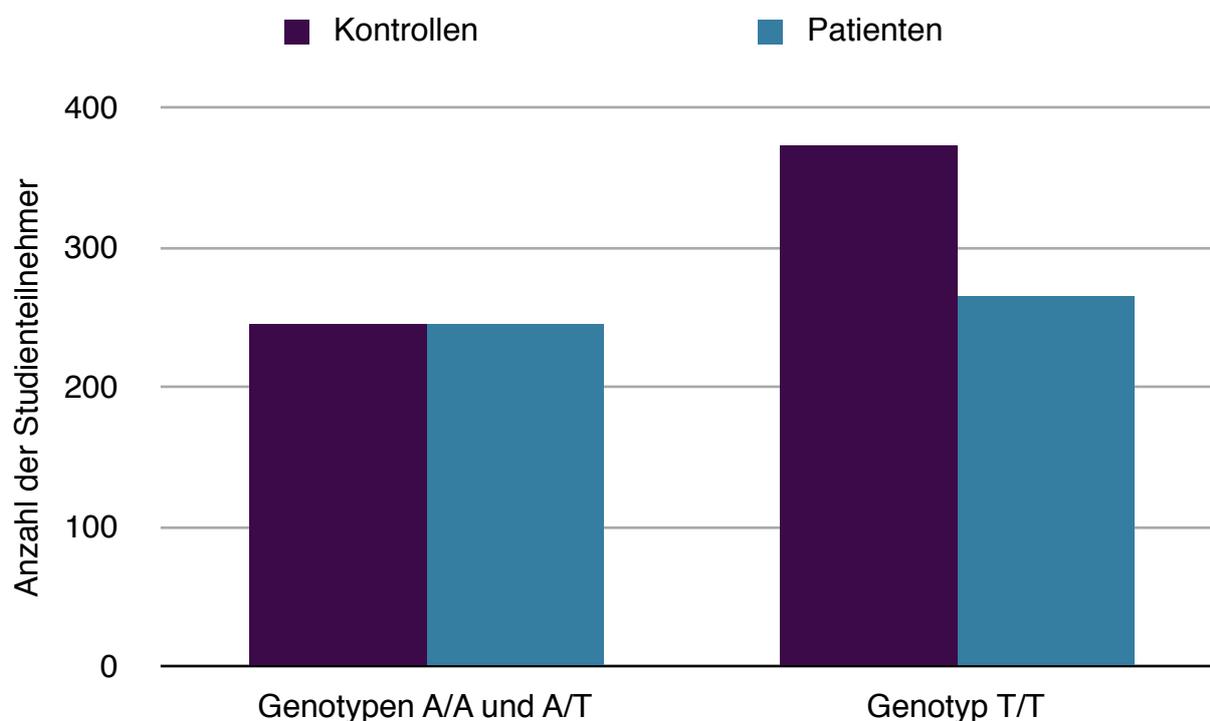
**Abbildung 5-6** Graphische Darstellung der Verteilung der Genotypen des SNPs rs11025642.

Nun interessierte der Vergleich der Träger mindestens eines A-Allels mit den ausschließlich T-Allel-Trägern. Die Genotypen A/A und A/T wurden daher dem Genotyp T/T gegenübergestellt (Tabelle 5-11).

**Tabelle 5-11** Häufigkeit der A-Träger (Genotyp A/A und A/T) gegenüber den homozygoten T-Trägern (T/T)

	Genotypen A/A und A/T n (%)	Genotyp T/T n (%)	Gesamt n (%)
<b>Kontrollprobanden</b>	245 (39,6)	373 (60,4)	618 (100,0)
<b>Patienten</b>	245 (48,0)	265 (52,0)	510 (100,0)
<b>Gesamt</b>	490 (43,4)	638 (56,6)	1128 (100,0)

Wiederum konnte ein signifikanter Unterschied belegt werden. Der homozygote Genotyp T/T kam dabei in der Gruppe der schizophrenen Patienten seltener vor ( $\chi^2=8,015$ ; OR=0,710 (CI=0,561-0,900); df=1; p=0,005). Abbildung 5-7 illustriert diese Verteilung.



**Abbildung 5-7** Graphische Darstellung der Gegenüberstellung der Träger mindestens eines A-Allels und der homozygoten T-Träger.

Die komplementäre Gruppierung zeigt die Träger mindestens eines T-Allels gegenüber den homozygoten A-Trägern (Tabelle 5-12, S. 69).

**Tabelle 5-12** Häufigkeit der homozygoten A-Träger (Genotyp A/A) gegenüber den T-Trägern (Genotyp A/T und T/T)

	Genotyp A/A n (%)	Genotypen A/T und T/T n (%)	Gesamt n (%)
<b>Kontrollprobanden</b>	32 (5,2)	586 (94,8)	618 (100,0)
<b>Patienten</b>	37 (7,3)	473 (92,7)	510 (100,0)
<b>Gesamt</b>	69 (6,1)	1059 (93,9)	1128 (100,0)

Hier zeigte sich kein statistisch signifikanter Unterschied ( $\chi^2=2,099$ ; OR=0,698 (CI=0,428-1,138); df=1; p=0,147).

## 5.4. Analyse des Polymorphismus rs16906511

### 5.4.1. Allelverteilung des SNPs rs16906511

Die Überprüfung des Allelvorkommens für den SNP rs16906511 bezüglich eines Unterschiedes zwischen der Kontrollprobanden- und der Patientengruppe ist in Tabelle 5-13 dargestellt.

**Tabelle 5-13** Allelverteilung des Einzelnukleotidpolymorphismus rs16906511

	A-Allel n (%)	T-Allel n (%)	Gesamt n (%)
<b>Kontrollprobanden</b>	1124 (91,2)	108 (8,8)	1232 (100,0)
<b>Patienten</b>	920 (90,9)	92 (9,1)	1012 (100,0)
<b>Gesamt</b>	2044 (91,1)	200 (8,9)	2244 (100,0)

Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied in der Allelverteilung zwischen den Gruppen ( $\chi^2=0,072$ ; OR=1,041 (CI=0,778-1,393); df=1; p=0,788). Das T-Allel war in beiden Gruppen nur in weniger als 10% der Fälle vorhanden.

### 5.4.2. Genotypverteilung des SNPs rs16906511

Nachfolgende Tabelle 5-14 (S. 70) zeigt die Verteilung der Genotypen A/A, A/T und T/T in der Kontrollprobanden- und der Patientengruppe. Hier wurde ebenfalls kein signifikanter Unterschied deutlich ( $\chi^2=0,892$ ; df=2; p=0,640).

**Tabelle 5-14** Genotypverteilung des Einzelnukleotidpolymorphismus rs16906511

	Genotyp A/A n (%)	Genotyp A/T n (%)	Genotyp T/T n (%)	Gesamt n (%)
<b>Kontrollprobanden</b>	513 (83,3)	98 (15,9)	5 (0,8)	616 (100,0)
<b>Patienten</b>	421 (83,2)	78 (15,4)	7 (1,4)	506 (100,0)
<b>Gesamt</b>	934 (83,2)	176 (15,7)	12 (1,1)	1122 (100,0)

Wie aus Tabelle 5-15 ersichtlich wurden anschließend wiederum alle Träger mindestens eines A-Allels den homozygoten T-Trägern gegenübergestellt. Hier ließ sich erneut kein statistisch signifikanter Unterschied belegen ( $\chi^2=0,858$ ; OR=1,714 (CI=0,541-5,434); df=1; p=0,354).

**Tabelle 5-15** Häufigkeit der A-Träger (Genotyp A/A und A/T) gegenüber den homozygoten T-Trägern (T/T)

	Genotypen A/A und A/T n (%)	Genotyp T/T n (%)	Gesamt n (%)
<b>Kontrollprobanden</b>	611 (99,2)	5 (0,8)	616 (100,0)
<b>Patienten</b>	499 (98,6)	7 (1,4)	506 (100,0)
<b>Gesamt</b>	1110 (98,9)	12 (1,1)	1122 (100,0)

Zuletzt wurde für diesen SNP die Gegenüberstellung aller T-Allel-Träger versus der homozygoten A-Träger realisiert (Tabelle 5-16). Diese Verteilung wies ebenfalls keinen signifikanten Unterschied zwischen der Kontrollprobanden- und der Patientengruppe auf ( $\chi^2=0,001$ ; OR=1,006 (CI=0,734-1,378); df=1; p=0,972).

**Tabelle 5-16** Häufigkeit der homozygoten A-Träger (Genotyp A/A) gegenüber den T-Trägern (Genotyp A/T und T/T)

	Genotyp A/A n (%)	Genotypen A/T und T/T n (%)	Gesamt n (%)
<b>Kontrollprobanden</b>	513 (83,3)	103 (16,7)	616 (100,0)
<b>Patienten</b>	421 (83,2)	85 (16,8)	506 (100,0)
<b>Gesamt</b>	934 (83,2)	188 (16,8)	1122 (100,0)

## 5.5. Analyse des Polymorphismus rs10500882

### 5.5.1. Allelverteilung des SNPs rs10500882

Die Allelverteilung des Polymorphismus rs10500882 stellte sich wie aus Tabelle 5-17 ersichtlich dar. Es ließ sich kein signifikanter Unterschied zwischen der Kontrollprobanden- und der Patientengruppe aufzeigen ( $\chi^2=0,649$ ; OR=1,078 (CI=0,898-1,294); df=1; p=0,420).

**Tabelle 5-17** Allelverteilung des Einzelnukleotidpolymorphismus rs10500882

	A-Allel n (%)	G-Allel n (%)	Gesamt n (%)
<b>Kontrollprobanden</b>	371 (30,4)	851 (69,6)	1222 (100,0)
<b>Patienten</b>	292 (28,8)	722 (71,2)	1014 (100,0)
<b>Gesamt</b>	663 (29,7)	1573 (70,3)	2236 (100,0)

### 5.5.2. Genotypverteilung des SNPs rs10500882

Die möglichen Genotypen A/A, A/G und G/G verteilten sich in der Studienpopulation wie in Tabelle 5-18 dargestellt. Die statistische Auswertung ergab keinen signifikanten Unterschied zwischen der Kontrollprobanden- und der Patientengruppe ( $\chi^2=3,795$ ; df=2; p=0,150).

**Tabelle 5-18** Genotypverteilung des Einzelnukleotidpolymorphismus rs10500882

	Genotyp A/A n (%)	Genotyp A/G n (%)	Genotyp G/G n (%)	Gesamt n (%)
<b>Kontrollprobanden</b>	64 (10,5)	243 (39,8)	304 (49,8)	611 (100,0)
<b>Patienten</b>	37 (7,3)	218 (43,0)	252 (49,7)	507 (100,0)
<b>Gesamt</b>	101 (9,0)	461 (41,2)	556 (49,7)	1118 (100,0)

Wie schon zuvor wurden daraufhin alle Träger mindestens eines A-Allels den homozygoten G-Trägern gegenübergestellt (Tabelle 5-19, S. 72). Es zeigten sich keine signifikanten Differenzen zwischen den beiden Studiengruppen ( $\chi^2=0,000$ ; OR=0,998 (CI=0,789-1,263); df=1; p=0,987).

**Tabelle 5-19** Häufigkeit der A-Träger (Genotyp A/A und A/G) gegenüber den homozygoten G-Trägern (G/G)

	Genotypen A/A und A/G n (%)	Genotyp G/G n (%)	Gesamt n (%)
<b>Kontrollprobanden</b>	307 (50,2)	304 (49,8)	611 (100,0)
<b>Patienten</b>	255 (50,3)	252 (49,7)	507 (100,0)
<b>Gesamt</b>	562 (50,3)	556 (49,7)	1118 (100,0)

Zuletzt wurden für diesen SNP die Träger mindestens eines G-Allels mit den homozygoten A-Allel-Trägern verglichen. Die ermittelten Häufigkeiten gibt Tabelle 5-20 wieder.

**Tabelle 5-20** Häufigkeit der homozygoten A-Träger (Genotyp A/A) gegenüber den G-Trägern (Genotyp A/G und G/G)

	Genotyp A/A n (%)	Genotypen A/G und G/G n (%)	Gesamt n (%)
<b>Kontrollprobanden</b>	64 (10,5)	547 (89,5)	611 (100,0)
<b>Patienten</b>	37 (7,3)	470 (92,7)	507 (100,0)
<b>Gesamt</b>	101 (9,0)	1017 (91,0)	1118 (100,0)

Hierbei zeigte sich kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den beiden untersuchten Studiengruppen bezüglich der Genotyphäufigkeiten. Es ließ sich jedoch ein Trend in Richtung des selteneren Vorkommens des homozygoten Genotyps A/A in der Patientengruppe feststellen ( $\chi^2=3,403$ ; OR=1,486 (CI=0,973-2,269); df=1; p=0,065).

## 5.6. Analyse des Polymorphismus rs1373165

### 5.6.1. Allelverteilung des SNPs rs1373165

Die Häufigkeit des Vorkommens der beiden Allele C und T des SNPs rs1373165 in der Gruppe der Kontrollprobanden und jener der schizophrenen Patienten gibt Tabelle 5-21 (S. 73) wieder.

**Tabelle 5-21** Allelverteilung des Einzelnukleotidpolymorphismus rs1373165

	C-Allel n (%)	T-Allel n (%)	Gesamt n (%)
<b>Kontrollprobanden</b>	996 (81,0)	234 (19,0)	1230 (100,0)
<b>Patienten</b>	824 (80,9)	194 (19,1)	1018 (100,0)
<b>Gesamt</b>	1820 (81,0)	428 (19,0)	2248 (100,0)

Die Auswertung ergab keinen signifikanten Unterschied in der Verteilung ( $\chi^2=0,000$ ; OR=1,002 (CI=0,811-1,238); df=1; p=0,984).

### 5.6.2. Genotypverteilung des SNPs rs1373165

Die Frequenzen der drei Genotypen C/C, C/T und T/T in der Kontroll- und Patientengruppe wird aus Tabelle 5-22 ersichtlich. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen Kontroll- und Patientenkollektiv bei den Genotypfrequenzen ( $\chi^2=0,036$ ; df=2; p=0,982).

**Tabelle 5-22** Genotypverteilung des Einzelnukleotidpolymorphismus rs1373165

	Genotyp C/C n (%)	Genotyp C/T n (%)	Genotyp T/T n (%)	Gesamt n (%)
<b>Kontrollprobanden</b>	404 (65,7)	188 (30,6)	23 (3,7)	615 (100,0)
<b>Patienten</b>	335 (65,8)	154 (30,3)	20 (3,9)	509 (100,0)
<b>Gesamt</b>	739 (65,7)	342 (30,4)	43 (3,8)	1124 (100,0)

In der Folge wurden wiederum alle C-Träger den homozygoten T-Trägern gegenübergestellt (Tabelle 5-23). Kein signifikanter Unterschied zwischen Kontroll- und Patientengruppe konnte aufgezeigt werden ( $\chi^2=0,027$ ; OR=1,053 (CI=0,571-1,940); df=1; p=0,869).

**Tabelle 5-23** Häufigkeit der C-Träger (Genotyp C/C und C/T) gegenüber den homozygoten T-Trägern (T/T)

	Genotypen C/C und C/T n (%)	Genotyp T/T n (%)	Gesamt n (%)
<b>Kontrollprobanden</b>	592 (96,3)	23 (3,7)	615 (100,0)
<b>Patienten</b>	489 (96,1)	20 (3,9)	509 (100,0)
<b>Gesamt</b>	1081 (96,2)	43 (3,8)	1124 (100,0)

Zuletzt wurden die Träger mindestens eines T-Allels den homozygoten C-Trägern gegenübergestellt (Tabelle 5-24).

**Tabelle 5-24** Häufigkeit der homozygoten C-Träger (Genotyp C/C) gegenüber den T-Trägern (Genotyp C/T und T/T)

	Genotyp C/C n (%)	Genotypen C/T und T/T n (%)	Gesamt n (%)
<b>Kontrollprobanden</b>	404 (65,7)	211 (34,3)	615 (100,0)
<b>Patienten</b>	335 (65,8)	174 (34,2)	509 (100,0)
<b>Gesamt</b>	739 (65,7)	385 (34,3)	1124 (100,0)

Hier zeigte sich ebenfalls kein signifikanter Unterschied zwischen der Kontroll- und der Patientengruppe ( $\chi^2=0,002$ ; OR=0,994 (CI=0,776-1,274); df=1; p=0,965).

### 5.7. Das Hardy-Weinberg-Equilibrium

Nach abgeschlossener Hochdurchsatzgenotypisierung erfolgte für jeden Einzelnukleotidpolymorphismus die Überprüfung der ermittelten Genotypverteilungen auf das Vorliegen des Hardy-Weinberg-Gleichgewichts. Die Ergebnisse deuteten bei ausschließlichem Vorkommen von p-Werten  $> 0,05$  auf einer Verteilung aller Marker innerhalb des Hardy-Weinberg-Equilibriums hin. Es ergab sich somit eine sehr niedrige Wahrscheinlichkeit für systematische Genotypisierungsfehler wie beispielsweise dem schlechten Erkennen eines bestimmten Allels durch das angewandte Genotypisierungsverfahren (Tabelle 5-25).

**Tabelle 5-25** Überprüfung der Genotypverteilung auf Vorliegen des Hardy-Weinberg-Equilibriums

	F	df	p-Wert (Pearson)
<b>rs4923219</b>	-0,034	1	0,26
<b>rs4923220</b>	-0,002	1	0,94
<b>rs11025642</b>	-0,001	1	0,97
<b>rs16906511</b>	0,034	1	0,26
<b>rs10500882</b>	0,012	1	0,70
<b>rs1373165</b>	0,013	1	0,66

## 5.8. Übersichtstabelle der signifikanten Ergebnisse

Die statistisch signifikanten Ergebnisse der Datenauswertung aller sechs SNPs fasst Tabelle 5-26 zusammen.

**Tabelle 5-26** Zusammenfassende Darstellung der signifikanten Ergebnisse für die einzelnen SNPs

	<b>Signifikanz der Allelverteilung (p-Wert)</b>	<b>Signifikanz der Genotypverteilung (p-Wert)</b>	<b>Signifikanz der homozygoten Allelträger (p-Wert)</b>
<b>rs4923219</b>	signifikant häufigeres Vorkommen des A-Allels bei Schizophrenen (p=0,027)	signifikant häufigeres Vorkommen des A/A Genotyps bei Schizophrenen (p=0,048)	signifikant selteneres Vorkommen des G/G Genotyps bei Schizophrenen (p=0,014)
<b>rs4923220</b>	-	-	-
<b>rs11025642</b>	signifikant häufigeres Vorkommen des A-Allels bei Schizophrenen (p=0,004)	signifikant häufigeres Vorkommen des A/A Genotyps bei Schizophrenen (p=0,015)	signifikant selteneres Vorkommen des T/T Genotyps bei Schizophrenen (p=0,005)
<b>rs16906511</b>	-	-	-
<b>rs10500882</b>	-	-	Trend in Richtung des selteneren Vorkommens des A/A Genotyps bei Schizophrenen (p=0,065)
<b>rs1373165</b>	-	-	-

## 6. Diskussion

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, durch Untersuchung ausgewählter Einzel-nukleotidpolymorphismen des SLC6A5-Gens deren mögliche Assoziation mit der Erkrankung der Schizophrenie nachzuweisen.

Zusammenfassend belegen die Daten in diesem Studienkollektiv ein statistisch signifikantes Ergebnis für zwei der sechs untersuchten SNPs. Bei SNP rs4923219 zeigte sich ein signifikanter Häufigkeitsunterschied bezüglich der Allel- und Genotypverteilung mit einem häufigeren Auftreten des A-Allels beziehungsweise des A/A-Genotyps in der Gruppe der schizophrenen Patienten. Die Auswertung des SNP rs11025642 ergab ein ebenfalls signifikant häufigeres Vorkommen des A-Allels und des A/A-Genotyps bei den schizophrenen Patienten. Des Weiteren konnte ein Trend in Richtung des häufigeren Vorkommens der homozygoten A-Träger für den Polymorphismus rs10500882 gefunden werden. Die Analyse der übrigen SNPs, rs4923220, rs16906511 und rs1373165, erbrachte kein statistisch signifikantes Ergebnis.

### 6.1. Diskussion des Studiendesigns

#### *Auswahl der Einzelnukleotidpolymorphismen*

Die sechs Polymorphismen wurden im Rahmen einer großen Assoziationsstudie untersucht, wobei sie alle als Marker für das SLC6A5-Gen galten. Das Interesse der Ätiologieforschung im Bereich der Schizophrenie bezüglich dieses Gens beruht auf mehreren Überlegungen.

Relevant erscheint zum einen die mögliche Verbindung des Produktes des untersuchten Gens, dem Glycintransporter GLYT2, mit dem NMDA-Rezeptor. Im Rahmen der vielbeachteten Glutamathypothese der Schizophrenie ist dabei eine Auswirkung der GLYT2-Funktion auf die Verfügbarkeit des für den NMDA-Rezeptor essenziellen Glycins denkbar. Diese Annahme gründet auf der Funktion des Transporters, welche in der Wiederaufnahme des Glycins aus dem Zytosol in die Präsynapse besteht und somit eine Voraussetzung für die Wiederbeladung

präsynaptischer Vesikel und deren Ausschüttung bei folgenden Übertragungsvorgängen darstellt (López-Corcuera et al. 2001; Betz et al. 2006).

Zum anderen hat die glycinerge Neurotransmission am inhibitorischen Glycinrezeptor, die durch die GLYT2-Funktion beeinflusst wird, vermutlich Auswirkungen auf die neuronale Plastizität und die ZNS-Entwicklung, welche auch bei der Schizophrenie gestört zu sein scheinen (Aragón und López-Corcuera 2003; Brackmann et al. 2004).

Darüber hinaus muten Symptome, welche bei Mutationen im SLC6A5-Gen auftreten, wie bestimmte Aspekte der Schizophreniesymptomatik an. Zu nennen ist dabei in erster Linie die gestörte *Startle*-Reaktion, welche bei einer Vielzahl schizophrener Patienten beobachtet werden kann (Meincke et al. 2004). Diese abnorme *Startle*-Reaktion kennzeichnet auch das Krankheitsbild der Hyperekplexie, welche bekanntermaßen durch GLYT2-Mutationen bedingt sein kann (Eulenburg et al. 2006; Rees et al. 2006).

Auch bei Mäusen, die heterozygot bezüglich einer *Loss-of-Function*-Mutation im GlyT2-Gen waren, zeigten sich Verhaltensauffälligkeiten wie Hyperaktivität und repetitive Bewegungen, welche darauf hindeuten, dass das GLYT2-Gen einen Rolle in der Schizophrenieentstehung spielen könnte (Bogdanik et al. 2012).

Das Interesse an Glycingenen in der Schizophrenieforschung wurde auch durch mehrere Studien geweckt, welche Therapieeffekte bei der Glycin- oder der Glycinanalogagabe im Rahmen einer Neuroleptikatherapie untersuchten. Es zeigte sich besonders bei der Negativsymptomatik eine Besserung, wenn die *Add-on*-Therapie neben konventionellen Neuroleptika verabreicht wurde. Dabei wirken Glycin, aber auch D-Serin und D-Cycloserin als NMDA-Stimulatoren (Tsai et al. 1998; Jansen und Dannhardt 2003).

All diese Übereinstimmungen lassen eine ätiologische Relevanz des GLYT-Gens für die Schizophrenie denkbar erscheinen und rechtfertigen eine genauere molekulargenetische Untersuchung des Gens im Kontext dieser Erkrankung.

### Studienpopulation

Neben der Auswahl eines interessanten Gens und für dieses geeignete Marker-Polymorphismen ist die Planung und Zusammenstellung der Studienpopulation von großer Bedeutung für die Erzielung aussagekräftiger Ergebnisse. Einen relevanten Aspekt stellt dabei die ethnische Herkunft der Studienteilnehmer dar. Diesbezügliche Unterschiede zwischen der Patienten- und der Kontrollprobandengruppe ergeben ein gewichtiges Problem für die Verwertbarkeit der Ergebnisse (Attia et al. 2009b). Dieser Confounder, auch Populationsstratifikation genannt, tritt auf, wenn ein Allel in seiner Frequenz zwischen ethnischen Gruppen variiert, ohne dass dies im Bezug zur interessierenden Erkrankung steht. Einen Überblick über die teilweise erheblichen Unterschiede der Allel- und Genotypfrequenzen der untersuchten Marker in verschiedenen Population gibt Tabelle 6-1. So ist an Position rs4923220 in der europäischen Bevölkerung das T-Allel beispielsweise bei 40,8% der Personen vorhanden, während nur 5,0% der Afrikaner dieses Allel tragen. Bei Überwiegen afrikanischstämmiger Personen in der Kontrollgruppe und Europäern in der Patientengruppe könnte somit ein häufigeres Vorkommen des T-Allels fälschlicherweise der Schizophrenie zugeschrieben werden. Ein vorrangiges Ziel im Studiendesign zur Vermeidung falsch-positiver Ergebnisse sollte daher die größtmögliche ethnische Homogenität der Patienten- und Kontrollprobandengruppe sein. Um das Risiko des Auftretens dieses Confounders zu minimieren, wurden in die vorliegende Studie demnach nur Patienten und Probanden kaukasischer Abstammung eingeschlossen.

**Tabelle 6-1** Genotyp- und Allelfrequenzvergleich der Polymorphismen in unterschiedlichen Populationen anhand der International HapMap-Daten (Entrez SNP 2010).

**CEU** = Europäer (Bewohner Utahs mit Nord- und Westeuropäischer Herkunft); **HCB** = Han Chinesen (Beijing); **JPT** = Japaner (Tokyo); **YRI** = Yoruba Afrikaner (Ibadan, Nigeria).

rs4923219	Genotyp A/A	Genotyp A/G	Genotyp G/G	Allel A	Allel G
<b>Kontrollen</b>	9,3%	42,9%	47,8%	30,8%	69,2%
<b>Patienten</b>	10,8%	48,8%	40,4%	35,2%	64,8%
<b>HapMap-CEU</b>	10,0%	40,0%	50,0%	30,0%	70,0%
<b>HapMap-HCB</b>	20,0%	51,1%	28,9%	45,6%	54,4%
<b>HapMap-JPT</b>	4,4%	37,8%	57,8%	23,3%	76,7%
<b>HapMap-YRI</b>	11,7%	46,7%	41,7%	35,0%	65,0%

Tabelle 6-1 (Fortsetzung)

rs4923220	Genotyp C/C	Genotyp C/T	Genotyp T/T	Allel C	Allel T
Kontrollen	35,4%	48%	16,5%	59,5%	40,5%
Patienten	38,5%	47,5%	14%	62,3%	37,7%
HapMap-CEU	41,7%	35%	23,3%	59,2%	40,8%
HapMap-HCB	64,4%	28,9%	6,7%	78,9%	21,1%
HapMap-JPT	55,6%	37,8%	6,7%	74,4%	25,6%
HapMap-YRI	90%	10%	-	95%	5%
rs11025642	Genotyp A/A	Genotyp A/T	Genotyp T/T	Allel A	Allel T
Kontrollen	5,2%	34,5%	60,4%	22,4%	77,6%
Patienten	7,3%	40,8%	52,0%	27,6%	72,4%
HapMap-CEU	5,1%	39,0%	55,9%	24,6%	75,4%
HapMap-HCB	20,5%	47,7%	31,8%	44,3%	55,7%
HapMap-JPT	4,4%	44,4%	51,1%	26,7%	73,3%
HapMap-YRI	12,1%	48,3%	39,7%	36,2%	63,8%
rs16906511	Genotyp A/A	Genotyp A/T	Genotyp T/T	Allel A	Allel T
Kontrollen	83,3%	15,9%	0,8%	91,2%	8,8%
Patienten	83,2%	15,4%	1,4%	90,9%	9,1%
HapMap-CEU	73,3%	26,7%	-	86,7%	13,3%
HapMap-HCB	97,8%	2,2%	-	98,9%	1,1%
HapMap-JPT	97,8%	2,2%	-	98,9%	1,1%
HapMap-YRI	53,3%	40,0%	6,7%	73,3%	26,7%
rs10500882	Genotyp A/A	Genotyp A/G	Genotyp G/G	Allel A	Allel G
Kontrollen	10,5%	39,8%	49,8%	30,4%	69,6%
Patienten	7,3%	43,0%	49,7%	28,8%	71,2%
HapMap-CEU	6,8%	44,1%	49,2%	28,8%	71,2%
HapMap-HCB	2,2%	2,2%	95,6%	3,3%	96,7%
HapMap-JPT	-	2,2%	97,8%	1,1%	98,9%
HapMap-YRI	-	16,7%	83,3%	8,3%	91,7%
rs1373165	Genotyp C/C	Genotyp C/T	Genotyp T/T	Allel C	Allel T
Kontrollen	65,7%	30,6%	3,7%	81,0%	19,0%
Patienten	65,8%	30,3%	3,9%	80,9%	19,1%
HapMap-CEU	55,0%	43,3%	1,7%	76,7%	23,3%
HapMap-HCB	95,6%	4,4%	-	97,8%	2,2%
HapMap-JPT	97,8%	2,2%	-	98,9%	1,1%
HapMap-YRI	73,3%	25,0%	1,7%	85,8%	14,2%

Einen Nachteil der Begrenzung der Studienpopulation auf kaukasischstämmige Personen stellt die Einschränkung der Aussagekraft der Ergebnisse auf eben diese Bevölkerung dar. Rückschlüsse auf deren Gültigkeit bei Personen anderer ethnischer Herkunft lassen sich nicht treffen. Statistisch signifikante Ergebnisse müssen daher in nachfolgenden Studien für anderer Populationen validiert werden.

Auch das Alter der Studienteilnehmer kann eine Verfälschung der Ergebnisse nach sich ziehen. Das Durchschnittsalter der beiden Gruppen unterschied sich in dieser Studie mit 7,38 Jahren signifikant, was ein potentiell Problem bei der Interpretation der Ergebnisse darstellt. Dabei ist jedoch vor allem ein Durchschnittsalter der Teilnehmer unter dem typischen Erstmanifestationsalter für die Erkrankung zu vermeiden. Andernfalls besteht das Risiko, dass einigen der gesunden Kontrollprobanden der Krankheitsausbruch noch bevorsteht, was falsch-negative Ergebnisse bedingen könnte. Im Falle der Schizophrenie kann dabei von einem Prädilektionsalter zwischen dem 21. und 26. Lebensjahr ausgegangen werden (Möller et al. 2005). Mit 45,23 Jahren in der Kontrollprobanden- und 37,85 Jahren in der Patientengruppe lag das Durchschnittsalter trotz des signifikanten Unterschiedes in beiden Fällen oberhalb dieser kritischen Grenze. Dies schließt ein späteres Erkranken eines Kontrollprobanden nicht vollends aus, minimiert jedoch das Risiko falsch-negativer Ergebnisse.

Betrachtet werden muss zudem die Größe der Studienpopulation, da bei seltenen Polymorphismen eine große Stichprobe zur Aufdeckung eines Unterschiedes unerlässlich ist (Hunter und Kraft 2007). Eine durch die kleine Teilnehmerzahl bedingte geringe Power birgt daher das Risiko falsch-negativer Studienergebnisse (O'Donovan und Owen 1999). Da die angenommene genetische Heterogenität der Erkrankung konkrete Aussagen zu benötigten Fallzahlen erschwert, bietet sich ein Vergleich mit ähnlichen Studien an. Hier lässt sich eine Tendenz zu immer größeren Teilnehmerzahlen feststellen. So zählten erste genomweite Assoziationsstudien geringe Teilnehmerzahlen von insgesamt bis zu 700 Personen (Mah et al. 2006; Lencz et al. 2007), wohingegen in neueren Studien die Gruppen jeweils mehr als 1000 Personen umfassen (Shifman et al. 2008; Shi et al. 2009; International Schizophrenia Consortium 2009; Athanasiu et al. 2010). Mit 618 Kontrollprobanden und 510 Patienten nimmt diese Studie dabei eine mittlere Position ein.

*Instrumente der Diagnosestellung und des Diagnoseausschlusses*

Noch immer ist unklar, inwieweit die verschiedenen psychiatrischen Erkrankungen, wie sie heute nach DSM-IV und ICD-10 definiert werden, auf den selben genetischen Faktoren beruhen. So gibt es beispielsweise neben der teils ähnlichen Symptomatik, die eine einzige Grundlage vermuten lässt, seit einigen Jahren konkrete Hinweise auf Risikogene, welche der bipolaren Störung und der Schizophrenie gemeinsam sind (Hodgkinson et al. 2004; Craddock et al. 2005; Green et al. 2010; Giegling et al. 2010). Auch die affektive und die schizoaffektive Störung scheinen einige genetische Veränderungen mit der Schizophrenie zu teilen (Hodgkinson et al. 2004; Green et al. 2010). Da sich jedoch zum heutigen Zeitpunkt keine abschließenden Feststellungen dazu treffen lassen, inwieweit diese Erkrankungen ein Kontinuum bilden (Möller 2008a), wurden ausschließlich Patienten mit der Diagnose einer Schizophrenie in diese Studie eingeschlossen. Vergleichbare Studien handhaben dies teils anders, so betrachten Lencz et al. (2007) auch Schizophrenie-Spektrum-Störungen, zu denen sie schizophrene, schizoaffektive und schizophreniforme Störungen zählen. In der vorliegenden Studie wurde zugunsten differenzierter Ergebnisse auf eine höhere Fallzahl durch Einschluss von Erkrankungen aus dem schizophrenen Spektrum verzichtet.

Die Diagnosestellung erfolgte wie oben beschrieben anhand des SKID I, welcher die Kriterien nach DSM-IV heranzieht. Das DSM-IV-System stellt neben der ICD-10-Klassifikation, welche in Deutschland verbindlich ist, eines der beiden wichtigsten Diagnosesysteme dar und wird in der internationalen wissenschaftlichen Literatur bevorzugt (Möller et al. 2005). In Anbetracht der für Assoziationsstudien besonders wichtigen internationalen Vergleichbarkeit der Studienergebnisse, beispielsweise für die Berücksichtigung in Metaanalysen, fand das DSM-IV daher auch hier Verwendung. Bezüglich der Interrater-Reliabilität des SKID I stellten Skre et al. (1991) sehr gute Übereinstimmungen für die Schizophrenie fest, eine weitere Studie fand jedoch nur eine ausreichende Test-Retest-Reliabilität (Williams et al. 2001). Die Validität, welche sich an einem Goldstandard orientiert und daher bei psychiatrischen Erkrankungen schwer zu ermitteln ist, scheint im Vergleich zur unstrukturierten Diagnosefindung deutlich höher zu liegen (Ramirez Basco et al. 2000). Der SKID I konnte sich in den letzten Jahren in der internationalen Schizophrenieforschung

etablieren, so nutzten ein Großteil der in den letzten Jahren publizierten und oben erwähnten genomweiten Assoziationsstudien übereinstimmend dieses Instrument (AthanasIU et al. 2010; Lencz et al. 2007; Sullivan et al. 2008; Shifman et al. 2008; Need et al. 2009; Djurovic et al. 2010).

Neben dem SKID I wurde in der Gruppe der schizophrenen Patienten die PANSS durchgeführt, welche die Diagnose sichern und die Ausprägung der positiven und negativen Symptome spezifizieren sollte. Auch die PANSS zeigt dabei gute Interrater-Reliabilität und Validität (Kay et al. 1988; Peralta und Cuesta 1994; Möller 2009).

In der Gruppe der Kontrollprobanden war der möglichst sichere Ausschluss einer psychiatrischen Erkrankung, allem voran einer Schizophrenie, von entscheidender Bedeutung. Diesem Ziel dienten zum einen die stufenweise Rekrutierung mittels Telefonscreening und persönlichem Gespräch. Zum anderen fand wie auch in der Patientengruppe der SKID I Anwendung, zusätzlich wurden der SKID II, die *Family History Assessment Modules* sowie das LEBI durchgeführt. Diese aufwendige Testkombination sollte das Risiko der Aufnahme einer Person mit psychiatrischen oder neurologischen Erkrankungen in die Kontrollprobandengruppe minimieren.

#### *Eignung des Studientyps und der Laborverfahren*

Die heute vorherrschende Vorstellung zur Genetik der Schizophrenie impliziert ein Zusammenspiel vieler häufiger Polymorphismen, welche einzeln jeweils nur eine geringe Risikoerhöhung bewirken (Chakravarti 1999). Da das Verfahren der Assoziationsstudie gut geeignet ist, um diese Gene mit kleinem Effekt zu finden (Owen 2000), wurde diese Methode für die vorliegende Studie gewählt. Im Gegenzug ist jedoch das Risiko falsch-positiver Ergebnisse höher als bei anderen Studiendesigns. Dies beruht vor allem auf der gleichzeitigen Analyse sehr vieler SNPs. Jede signifikante Assoziation bedarf daher der Replikation in folgenden groß angelegten Studien (Owen 2000; Hunter und Kraft 2007). Auch falsch-negative Ergebnisse können nicht ausgeschlossen werden, da die vermutete genetische Heterogenität der Erkrankung dazu führt, dass eventuell nicht ausreichend Patienten mit einer bestimmten Variation eingeschlossen wurden, um ein signifikantes Ergebnis zu erzielen (McClellan et al. 2007). Dies verdeutlicht wiederum die Notwendigkeit

einer großen Studienpopulation und erklärt zudem die teils widersprüchlichen Ergebnisse verschiedener Assoziationsstudien. Bezogen auf GLYT2 könnte beispielsweise der fehlende Hinweis auf eine Assoziation mit der Schizophrenie in der Studie von Jamra et al. (2006) ein falsch-negatives Ergebnis darstellen, da die Studienpopulation mit 635 Personen als eher klein anzusehen ist.

Das in dieser Studie verwendete iPlex-Verfahren, welches auf einer Einzelbasenextensionsreaktion basiert, eignet sich durch seine hohe Präzision sehr gut für die Hochdurchsatzgenotypisierung. Bei 200 durchlaufenen Zyklen liegt die Übereinstimmung der Resultate mit dem älteren *homogenous MassEXTEND*-Verfahren bei 100%, wobei die Kosten reduziert und die Durchsatzraten erhöht werden konnten (Oeth et al. 2005). Die im Anschluss durchgeführte MALDI-TOF Massenspektrometrie zur Detektion der Allelausprägung besitzt eine hohe Sensitivität und Geschwindigkeit, weshalb sie sich bei den Hochdurchsatzgenotypisierungsverfahren durchgesetzt hat (Ding 2006). Die Qualitätssicherung der erhaltenen Daten erfolgte mittels *TyperAnalyzer* (Firma Sequenom, San Diego), der die Darstellung der generierten Spektren in *clusterplots* (Abbildung aller Proben eines SNPs sortiert nach dessen Genotypen) und somit die Beurteilung hinsichtlich der Qualität und Validität der Ergebnisse erlaubt. Des Weiteren konnte eine in jeder 96-*well*-Platte vorhandene Blindprobe Artefakte oder Verunreinigungen aufdecken, was dann zum Verwerfen der Ergebnisse führte. Ebenfalls ausgeschlossen wurden Ergebnisse von Probanden, die eine *callrate* (Rate an erfolgreich bestimmten Genotypen) von unter 0,8 aufwiesen, sowie von Polymorphismen, die eine *SNP-callrate* von  $< 0,95$  besaßen. Auch die auf jeder 96-*well*-Platte vorhandene Kontrollprobe musste das erwartete Genotypisierungsergebnis liefern, damit die SNPs ihre Gültigkeit behielten. Eine weitere Überprüfung wurde für jeden Multiplex-PCR-Ansatz anhand der CEPH-Probe (*Centre d'Étude du Polymorphisme Humain*-Probe) durchgeführt. Deren ermittelte Genotypen wurden mit der Hapmap-Datenbank abgeglichen und führten nur bei einer Übereinstimmung von  $> 98,9\%$  zu einer Bestätigung der Validität der Ergebnisse des jeweiligen Plexes. Alle hier besprochenen sechs SNPs konnten diese Qualitätstestung erfolgreich durchlaufen, womit das Risiko eines Genotypisierungsfehler minimiert wurde.

Auch die durchgeführte Testung auf das Vorliegen des Hardy-Weinberg-Equilibriums ist ein geeignetes Instrument, um generelle Assayfehler aufzudecken (Hosking et al. 2004). Alle hier analysierten SNPs zeigten eine Verteilung innerhalb des Hardy-Weinberg-Equilibriums, womit beispielsweise ein methodenbedingtes schlechtes Erkennen eines bestimmten Allels unwahrscheinlich ist.

## 6.2. Diskussion der Ergebnisse

### *Übersicht über die Daten der einzelnen Polymorphismen*

Bei den hier untersuchten SNPs handelt es sich fast ausschließlich um nicht-kodierende, in Introns gelegene SNPs, eine Ausnahme hiervon bildet lediglich rs16906511, der im Exon 7 des LOC645490 zu finden ist.

Der am weitesten 5´ des Gens SLC6A5 gelegene SNPs, rs4923219, zeigte sowohl in der Allel- und Genotypverteilung als auch bei dem Vergleich der homozygoten G-Allelträger mit den Trägern mindestens eines A-Allels signifikante Unterschiede zwischen Patienten- und Kontrollprobandengruppe. Zusammenfassend war das A-Allel bei den Patienten häufiger, das G-Allel seltener als bei den Kontrollprobanden vorzufinden. Lediglich bei dem Vergleich zwischen homozygoten A-Allelträgern und den G-Trägern blieb der Nachweis eines signifikanten Unterschiedes aus.

Bei dem nächsten SNP in 3´ Richtung handelt es sich um rs4923220, bei dem keine signifikanten Ergebnisse erzielt werden konnten.

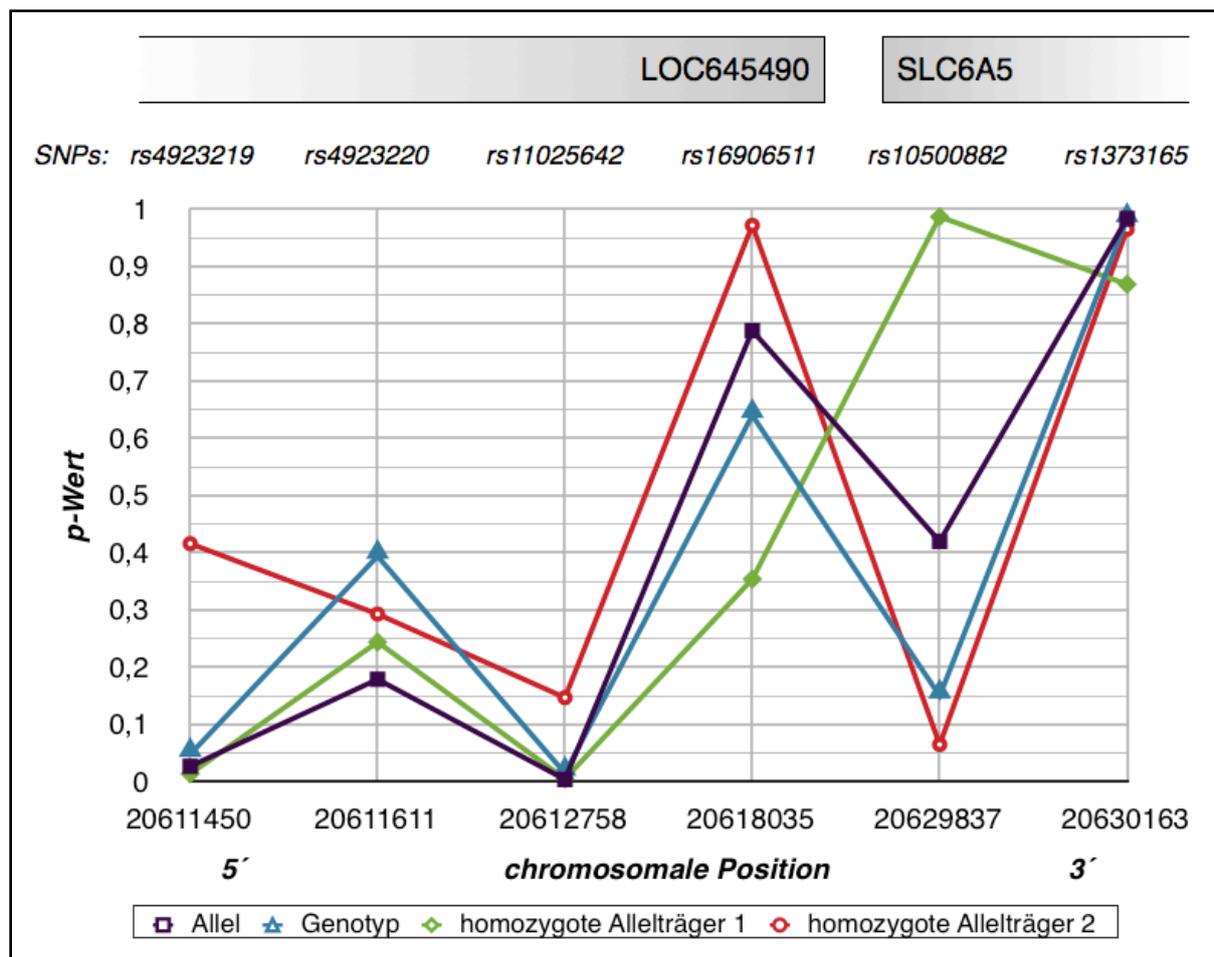
Der SNP rs11025642 zeigte dagegen wieder eine ähnliche Konstellation wie der erste SNP. Die Allel- und Genotypfrequenzen sowie die homozygote Gruppe der T-Allelträger verglichen mit den A-Trägern unterschieden sich signifikant, wobei bei den schizophrenen Patienten jeweils das A-Allel häufiger und das T-Allel seltener als in der Kontrollgruppe auftrat.

Der letzte 5´ von SLC6A5 liegende Polymorphismus war der einzige hier untersuchte SNP, welcher sich in einem Exon befindet. Bei diesem SNP rs16906511 konnte keine signifikante Assoziation erkannt werden. Die Ergebnisse dieses Polymorphismus sind jedoch bei insgesamt relativ seltenem Vorkommen der Ausprägung des T-Allels weniger aussagekräftig als die restlichen Ergebnisse.

Die beiden innerhalb des SLC6A5-Gens gelegenen Polymorphismen rs10500882 und rs1373165 zeigten ebenfalls keine signifikanten Assoziationen, lediglich bei rs10500882 konnte ein Trend in Richtung des selteneren Vorkommens des homozygoten Genotyps A/A in der Patientengruppe nachgewiesen werden.

### Beurteilung der experimentellen Ergebnisse

Die zwei SNPs, die ein signifikantes Ergebnis erzielen konnten, liegen beide im Intron 6 des dem SLC6A5 benachbarten Gen LOC645490. Zwar wies ein von seiner chromosomalen Position her zwischen diesen SNPs lokalisierter Polymorphismus keine Assoziation auf, insgesamt kleinere p-Werte konnten jedoch in 5'-Richtung des SLC6A5-Gens beobachtet werden (Abbildung 6-1).



**Abbildung 6-1** Veranschaulichung der p-Werte der Allele, Genotypen und homozygoten Allelträger im Bezug auf die chromosomale Position der SNPs.

Als „homozygote Allelträger 1“ sind dabei die Werte der Tabellen 5-3, 5-7, 5-11, 5-15, 5-19 und 5-23 aufgetragen; „homozygote Allelträger 2“ betrifft entsprechend die Tabellen 5-4, 5-8, 5-12, 5-16, 5-20 und 5-24.

Auch die außerhalb des SLC6A5-Gens gelegenen SNPs gelten als Marker für das GLYT2-Gen, da speziell in der 5'-Region, die als potenzielle Promoterregion gilt, funktionelle Variationen im Hinblick auf die mRNA-Expression erwartet werden können.

Die Position der signifikanten Polymorphismen lässt dennoch eine genauere Betrachtung des LOC645490-Gens beziehungsweise der erweiterten Region 5' des GLYT2-Gens in Assoziationsstudien vielversprechend erscheinen. Da zur Funktion des LOC645490 wenig bekannt ist, können zur Zeit noch keine Aussagen zu möglichen pathophysiologischen Auswirkungen auf die Schizophrenieentstehung getroffen werden, weshalb sich auch Untersuchungen zur Funktion dieses Gens anschließen sollten.

Von den untersuchten Polymorphismen befand sich nur einer, rs16906511, im Exon eines Gens und könnte demnach direkten Einfluss auf die mRNA- und letztlich auch auf die Proteinsequenz haben. Er führt dabei zu einem Austausch der Aminosäure Arginin zu Serin und stellt daher eine *Missense*-Mutation dar. Dieser SNP zeigte jedoch keine Assoziation mit der Schizophrenie, sodass ein direkter Einfluss dieser Genveränderung auf die Erkrankung unwahrscheinlich erscheint.

Ein Schlüsselpunkt des Konzeptes der Assoziationsstudien ist die Auswahl bestimmter Marker-SNPs, welche nicht nur ein Gen charakterisieren, sondern auch Hinweise zu der erweiterten Genregion, in der sie liegen, liefern können. So ist es denkbar, dass die hier gefundenen SNPs zwar mit der Schizophrenie assoziiert, jedoch nicht selbst an der Krankheitsentstehung beteiligt sind, sondern stattdessen bevorzugt mit dem in chromosomaler Nähe liegenden, ätiologisch relevanten Gen zusammen vererbt werden. Diese chromosomalen Regionen, welche meist zusammen weiter vererbt werden und daher im so genannten Kopplungsungleichgewicht stehen, werden Haplotypblöcke genannt (Goldberg und Weinberger 2004; Attia et al. 2009a). Im Falle der vorliegenden Studie ergibt sich somit kein direkter Hinweis auf die unmittelbare ätiologische Relevanz des SLC6A5-Gens für die Schizophrenie, wohl aber auf die mögliche Lokalisation eines Suszeptibilitätsgens in dieser chromosomalen Region.

### *Die Ergebnisse im Kontext der Literatur*

Die hier dargelegten Studienergebnisse leisten ihren Beitrag zu einem erst seit einigen Jahren zu verzeichnenden rasanten Anstieg der Datenfülle zu Assoziationsstudien der Schizophrenie. Die Bemühungen, mittels internationaler Kooperationen und durch immer größere Studienpopulationen bereits beschriebene Assoziationen zu replizieren, gründen auf der Tatsache, dass eine statistisch signifikante Assoziation jeweils nur für die eigene Studienpopulation und auch für diese nur unter Vorbehalt gilt. Die gefundenen Gene bewirken jeweils lediglich eine geringe Risikoerhöhung und trotz intensiver Forschung lässt sich bis heute keine sichere Aussage zu den wichtigsten Risikogenen für die Schizophrenieentstehung machen. Selbst für die vielversprechendsten Gene NRG1 (Neuroregulin 1), DTNBP1 (Dysbindin), DRD2-3 (Dopaminrezeptoren D2 und D3), DISC1 (Disrupted in Schizophrenia 1) und COMT (Catechol-O-Methyltransferase) wurden in Replikationsstudien widersprüchliche Ergebnisse erzielt (Tandon et al. 2008b). In der Literatur herrscht weiterhin Uneinigkeit darüber, warum dem so ist.

In den meisten Erklärungsversuchen für die uneinheitlichen Befunde wird davon ausgegangen, dass die Schizophrenie eine genetisch komplexe Erkrankung ist (Owen et al. 2005; Lichtermann et al. 2000), bei der die vielen beteiligten Gene nur einen kleinen Effekt haben und daher notwendigerweise schwer zu detektieren sind. Diese Gene könnten zudem zwischen Populationen mit unterschiedlichem ethnischen Hintergrund variieren und auch innerhalb einer Gruppe der gleichen Herkunft eine Heterogenität aufweisen (Chakravarti 1999). In diesem Sinne handelt es sich bei der Schizophrenie um eine Erkrankung, welche sich mit anderen genetisch komplexen Erkrankungen, für die Assoziationsstudien erfolgreich waren, wie Asthma, Morbus Crohn, der rheumatoiden Arthritis, Psoriasis, Diabetes mellitus Typ 1 und Typ 2 sowie der Hyperlipidämie (Hindorff et al. 2009) vergleichen lässt.

Einerseits könnte dies dafür sprechen, dass die fehlenden Ergebnisse bezüglich der Schizophrenie auf einer zu konservativen Handhabung der Signifikanzschwelle beruhen. Einige Autoren fordern daher, dass jedem Hinweis auf eine Assoziation nachgegangen werden sollte (Straub und Weinberger 2006), obwohl dadurch das Risiko der Weiterverfolgung falsch-positiver Ergebnisse steigt.

Andererseits sind jedoch die größeren Fortschritte beispielsweise in der Genetik der koronaren Herzerkrankung, des Morbus Crohn, der rheumatoiden Arthritis und des Diabetes mellitus Typ 1 und 2 (Wellcome Trust Case Control Consortium 2007) zu bedenken. Da für diese Erkrankungen eine ähnlich komplexe Genetik angenommen wird, ist eine vermehrte Inkaufnahme falsch-positiver Ergebnisse für die Schizophrenie nicht zu rechtfertigen. Von anderer Seite wird daher die Forderung nach einer stärkeren Berücksichtigung dieses Fehlers 1. Art (Zurückweisen einer zutreffenden Nullhypothese) gestellt, um immer unübersichtlichere Datenmengen zu vermeiden (Ioannidis 2005; Sullivan 2007).

Den beiden Ansätzen gemein ist ihre Forderung nach großen Replikationsstudien (Tandon et al. 2008b) und Metaanalysen vorhandener Daten. Dies ist auch insofern unabdingbar, als beobachtet wurde, dass initiale Studien einen gefundenen genetischen Effekt oft überbewerten, sodass Folgestudien zur benötigten Relativierung beitragen können (Ioannidis et al. 2001). Im diesem Kontext ist auch der nun folgende Vergleich der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit mit bereits beschriebenen Befunden essenziell.

Für die Betrachtung der hier dargestellten Ergebnisse im Speziellen existieren bislang lediglich zwei Studien, die das GLYT2-Gen im Zusammenhang mit der Schizophrenie untersucht haben.

Der fehlende Hinweis auf eine Assoziation in einer Studie an einem kaukasischen Kollektiv (Jamra et al. 2006) steht dabei im Gegensatz zu der hier beobachteten signifikanten Assoziation zweier SNPs. Mögliche Ursachen dieser Diskrepanz ergeben sich aus den erläuterten Überlegungen zum Studiendesign. So könnte die geringere Größe der Studienpopulation, welche insgesamt nur 635 Personen umfasst, mitverantwortlich für ein falsch-negatives Ergebnis in der von Jamra et al. (2006) durchgeführten Studie sein. Zudem wurden andere SNPs untersucht, welche sich im Intron 1, 6 und 11 sowie im Exon 8 des Gens und somit tendenziell weiter 3' als die hier untersuchten Polymorphismen befanden. Daher könnte eine andere Erklärung für die divergierenden Ergebnisse die Lokalisation des potentiellen Suszeptibilitätsgens weiter 5' und somit in einem Haplotypblock außerhalb der von Jamra et al. untersuchten Marker sein.

Die einzige weitere Studie zum Einfluss des SLC6A5 auf die Schizophrenie konnte eine Assoziation feststellen (Deng et al. 2008). Interessant ist dabei die Tatsache, dass der Marker mit der höchsten Signifikanz 5' des Gens nahe LOC645490 lokalisiert war, was mit den Daten der vorliegenden Studie im Einklang steht. Dies könnte auf funktionell bedeutsame Variationen in der Promoterregion des Gens SLC6A5 oder auf eine Relevanz des benachbarten Gens LOC645490 hinweisen. Die auch hier eher kleine Population mit 840 Personen stellt jedoch eine Einschränkung in der Aussagekraft der Studie dar. Die Daten von Deng et al. (2008) wurden zudem an einem asiatischen Kollektiv erhoben, was einen Vergleich erschwert. Auf der anderen Seite könnte gerade das Vorkommen signifikant mit der Schizophrenie assoziierter Marker-SNPs dieses Gens in einer ethnisch andersartigen Population auf eine populationsübergreifende Relevanz dieses Genabschnittes in der Ätiologie der Schizophrenie hindeuten.

Angesichts der divergierenden Ergebnisse lässt sich festhalten, dass genauere Aussagen zur Relevanz dieser Genregion Replikationsstudien zur Validierung bedürfen. Dabei sollten größere Studienkollektive unabhängiger Populationen mit dem selben ethnischen Hintergrund gewählt werden. Auch in Populationen mit anderer Herkunft ist eine Analyse dieser Genregion sinnvoll, doch muss eine fehlende Assoziation in diesem Falle kein falsch-positives Ergebnis der ursprünglichen Studie bedeuten (Sebastiani et al. 2009). Auch Metaanalysen tragen zur Detektierung und Validierung vielversprechender Genloci bei (Allen et al. 2008).

Neben der Replikation zur Vermeidung eines falsch-positiven Ergebnisses bedürfen die Befunde Untersuchungen der Genregion hinsichtlich der Funktion der hier lokalisierten Gene. Während das Gen SLC6A5 und sein Protein bekannt sind, existieren umliegende Genabschnitte, zu denen weniger Informationen vorliegen. Die mögliche ätiologische Relevanz des GLYT2 wurde hier dargelegt, mögliche weitere interessante Gene der Region wie das LOC645490 könnten bei bekannter Gen- und Proteinfunktion eventuell ebenfalls in Modelle der Schizophrenie eingearbeitet werden. Dabei ist auch von Interesse, ob das Genprodukt im Gehirn exprimiert wird und ob die beobachteten Mutationen eine Funktionsänderung oder -auslöschung bewirken. Bei so generierten Vorstellungen des Gens in der Pathophysiologie der

Schizophrenie ergäben sich Hypothesen, welche einer erneuten Testung unterzogen werden könnten (Tandon et al. 2008b).

Zusammenfassend lässt sich bei beobachteter Assoziation zweier der sechs untersuchten SNPs in der 5´-Region des SLC6A5 die Forderung nach Replikationsstudien sowohl in kaukasischen als auch in ethnisch differierenden Populationen stellen, welche Polymorphismen dieses Gens mit betrachten. Dabei rechtfertigen die schon bekannten Daten einen Einschluss weiterer SNPs in der Region 5´ des GLYT2-Gens, da sich Hinweise auf ein hier lokalisiertes Suszeptibilitätsgen verdichten. Zudem sollten noch unerforschte Gene dieser Region auf ihre Funktion hin untersucht werden, um deren potenzielle Relevanz für die Ätiologie der Schizophrenie erkennen zu können.

### **6.3. Ausblick**

Die hier und schon zuvor berichtete Assoziation einzelner Marker-SNPs des SLC6A5-Gens, welches für den Glycintransporter GLYT2 kodiert, bestätigt Hinweise auf eine mögliche Relevanz dieses Genabschnittes für die Ätiologie der Schizophrenie. Die Befunde bedürfen jedoch weiterer Studien und werfen darüber hinaus viele Fragen auf. Die vorliegende Studie ist dabei im Kontext der zahlreichen Bemühungen zu betrachten, die Ätiopathogenese der Schizophrenie zu erhellen. In diesem Feld ist diese Studie als ein Baustein der molekulargenetischen Forschung anzusehen, welche selbst nur eine der vielen Disziplinen ist, die an der Aufschlüsselung der Ätiopathogenese der komplexen Erkrankung der Schizophrenie beteiligt sind.

Auf der Suche nach der Ursache für die noch immer fehlenden Zusammenhänge in der Ätiologieforschung der Schizophrenie im Allgemeinen und deren molekulargenetischer Komponente im Speziellen lässt sich zuallererst die grundsätzliche Schwierigkeit feststellen, die Schizophrenie zu definieren. Meist wird sie als eine der multifaktoriell bedingten, genetisch komplexen Erkrankungen angesehen, zu denen unter anderem auch Diabetes mellitus Typ 1 und 2, Morbus Crohn, die koronare Herzerkrankung, die rheumatoide Arthritis, die arterielle Hypertonie und die bipolare Störung zählen (Wellcome Trust Case Control Consortium 2007). Obwohl dies das vorherrschende Konzept darstellt, besteht weiterhin Uneinigkeit darüber, inwieweit

die Schizophrenie als eine einzige Krankheit gelten kann. So deutet das vielfältige psychopathologische Bild neben den zahlreichen ätiologischen Faktoren und pathogenetischen Mechanismen darauf hin, dass es sich um eine Gruppe von Erkrankungen handeln könnte, welche lediglich einen ähnlichen Phänotyp besitzen (Tandon et al. 2009). Andererseits ist die Diagnose der Schizophrenie trotz der beschriebenen Unklarheiten über die Zeit sehr stabil (Veen et al. 2004; Baca-Garcia et al. 2007; Möller et al. 2011) und besitzt eine hohe Interrater-Reliabilität (Tandon et al. 2009). Diese Tatsachen könnten auf die Richtigkeit der Annahme einer einzigen Erkrankung hindeuten und halten von der Aufgabe des Konzeptes der Schizophrenie als definierte Entität ab (Möller 2008a).

Bei immer noch bestehender Uneinigkeit bezüglich der diagnostischen Bestimmung der Schizophrenie erscheinen die Schwierigkeiten der molekulargenetischen Forschung, welche auf eine klare Definition der zu untersuchenden Erkrankung angewiesen ist, nicht verwunderlich. Neuere Forderungen bestehen daher in einer Modifizierung der Diagnosekriterien mit bevorzugtem Einschluss bestimmter oben beschriebener Endophänotypen, welche als neurobiologische Veränderungen mit der Schizophrenie einhergehen. Hier wären beispielsweise die Berücksichtigung kognitiver Störungen (Möller 2008b), struktureller ZNS-Veränderungen (Prasad und Keshavan 2008) oder neurophysiologischer Veränderungen wie Störungen der Augenfolgebewegung oder der Präpulsinhibition (Braff et al. 2008) denkbar.

Auch die heute übliche Subtypisierung steht in der Kritik, da sie über die Zeit nicht stabil ist (Helmes und Landmark 2003). Diese Subtypen, nach denen traditionell unterschieden wird, ergeben sich allein aus dem klinischen Bild und lassen keine Aussage über Therapieerfolg oder Prognose zu (Regier 2007). Auch lässt sich aus ihnen keine Erklärung der ätiopathogenetischen Heterogenität der Schizophrenie ableiten (Jablensky 2006; Fanous und Kendler 2008). Somit ist die Zweckmäßigkeit der nosologischen Unterteilung in verschiedene Subtypen kritisch zu hinterfragen und es wird vielfach eine Aufgabe der sich ausschließenden Kategorien zu Gunsten nebeneinander existierenden Dimensionen gefordert (Tandon et al. 2009). All diese Modifizierungen könnten möglicherweise eine Entdeckung der der Schizophrenie zu Grunde liegenden ätiopathogenetischen Faktoren erleichtern (Greenwood et al. 2007).

Für die molekulargenetische Schizophrenieforschung im Speziellen gilt es zu erklären, warum Schätzungen zufolge die bisher gefundenen potentiellen Risikogene lediglich 10% der genetischen Suszeptibilität der Schizophrenie ausmachen (Möller 2008a). Hier wird von einigen Autoren ein grundsätzliches Überdenken der heute vorherrschenden Meinung gefordert, dass die in der Schizophrenie relevanten Mutationen in der Bevölkerung häufig vorkommen und jeweils nur einen kleinen Beitrag zur Risikoerhöhung leisten. Stattdessen stellen McClellan und King (2010) beispielsweise die Theorie auf, es handele sich um seltene Mutationen mit großem Effekt. Ein anderer Erklärungsversuch weist auf die Möglichkeit hin, dass Interaktionen zwischen den Allelen oder zwischen verschiedenen Genen für eine Risikoerhöhung verantwortlich sein könnten, weshalb diese Interaktionen vermehrt untersucht werden sollten (Song et al. 2010). Wieder andere Wissenschaftler verweisen auf die mögliche Relevanz epigenetischer Mechanismen wie einer veränderten Expression bestimmter Gene (DeLisi et al. 2002; Crow 2007; Mill et al. 2008). Auch die Interaktion ätiologisch bedeutsamer Umweltfaktoren mit Genen, welche isoliert betrachtet keine Risikoerhöhung bewirken, bedarf weiterer Untersuchungen (Straub und Weinberger 2006; Gohlke et al. 2009).

Bezüglich des SLC6A5-Gens erfordern die Ergebnisse daher neben aussagekräftigen Replikationsstudien und Metaanalysen der einzelnen Polymorphismen, des SLC6A5 und der Region 5' des Gens auch jenseits der Assoziationsstudien weitere Untersuchungen. Die Bestimmung der Funktion jener Gene, welche im Kopplungsungleichgewicht mit den hier mit der Schizophrenie assoziierten Polymorphismen stehen, bildet dabei die Grundlage für weiterführende Analysen (Tandon et al. 2008b). Darüber hinaus sind potentielle Gen-Gen-Interaktionen ebenso von Interesse wie die Epigenetik des GLYT2-Gens und benachbarter Gene. So sollte beispielsweise die Expression der Gene im ZNS untersucht werden (Crow 2007; Song et al. 2010). Auch die Möglichkeit der protektiven Wirkung eines Allels, beispielsweise wiederum durch Interaktion mit einem Risikogen, darf nicht außer Acht gelassen werden.

All diesen Bestrebungen ist das Ziel gemein, nicht nur die Ätiopathogenese der Schizophrenie zu ergründen, sondern mit den gewonnenen Erkenntnissen auch die Behandlung und möglicherweise sogar die Prävention dieser belastenden

Erkrankung zu ermöglichen. Dabei konnten bereits erste Erfolge verzeichnet werden, in Bezug auf den hier relevanten Neurotransmitter ist beispielsweise die Wirksamkeit der hochdosierten Glycinegabe als *Add-on*-Medikation zu nennen (Jansen und Dannhardt 2003). Ein besseres Verständnis der Zusammenhänge könnte weitere Möglichkeiten der präzisen, nebenwirkungsarmen und möglicherweise sogar den individuell zu Grunde liegenden genetischen Faktoren angepassten Therapie eröffnen. Gerade die Prävention der Erkrankung scheint zum jetzigen Zeitpunkt jedoch noch weit entfernt. An dieser Stelle sei daher an die eingangs erwähnte erhebliche Einschränkung der Lebensqualität des Betroffenen und die große Belastung der Familie, mit der die Schizophrenie einhergeht (Rössler et al. 2005), erinnert, da dies weitere Forschungsanstrengungen im Bereich der Ätiologie der Schizophrenie motivieren sollte.

## 7. Abkürzungsverzeichnis

<b>5-HT-2A</b>	Serotoninrezeptor 2A-Gen
<b>A</b>	Adenin
<b>ACSM1</b>	Acyl-CoA synthetase medium-chain 1-Gen
<b>AMPA</b>	$\alpha$ -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazol-Propionsäure
<b>ANK3</b>	Ankyrin-3-Gen
<b>APBA2</b>	Amyloid beta A4 precursor protein-binding A2-Gen
<b>Assay</b>	molekularbiologisches Nachweisverfahren
<b>ATPase</b>	Adenosintriphosphatase
<b>bp</b>	Basenpaar
<b>C</b>	Cytosin
<b>Ca<sup>2+</sup></b>	Kalziumion
<b>CATIE</b>	CATIE-Studie (Clinical Antipsychotic Trial of Intervention Effectiveness)
<b>CCDC60</b>	Coiled-coil domain containing 60-Gen
<b>cDNA</b>	complementary DNA (aus RNA mittels reverser Transkription erhaltene DNA)
<b>chrom. Pos.</b>	chromosomale Position
<b>CI</b>	Konfidenzintervall
<b>Cl<sup>-</sup></b>	Chloridion
<b>CNV</b>	gene Copy Number Variants (Genkopiezahlvarianten)
<b>COMT</b>	Catechol-O-Methyltransferase-Gen
<b>CSF2RA</b>	Colony stimulating factor 2 receptor alpha-Gen
<b>DALY</b>	Disability-Adjusted Life Years lost (durch Behinderung verlorene gesunde Lebensjahre)
<b>dNTP</b>	Desoxyribonukleosidtriphosphat
<b>ddNTP</b>	Didesoxyribonukleosidtriphosphat
<b>dest.</b>	destilliert
<b>df</b>	degrees of freedom (Freiheitsgrade)

<b>DISC1</b>	Disrupted in schizophrenia 1-Gen
<b>DNA</b>	Deoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)
<b>dNTP</b>	Desoxyribonukleosidtriphosphat
<b>DRD1-4</b>	Dopaminrezeptor D1-D4-Gene
<b>dsDNA</b>	doppelsträngige DNA
<b>DSM-IV</b>	Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders (Diagnostisches und Statistisches Handbuch Psychischer Störungen), vierte Edition
<b>DTNBP1</b>	Dysbindin-Gen
<b>EDTA</b>	Ethylendiamintetraacetat
<b>EE</b>	Expressed Emotion
<b>EEG</b>	Elektroenzephalogramm
<b>EL</b>	extracellular loop (extrazelluläre Schleife)
<b>F</b>	F-Wert (Prüfwert des F-Tests)
<b>G</b>	Guanin
<b>GABA</b>	Gamma amino butyric acid (Gammaaminobuttersäure)
<b>GLRA1</b>	$\alpha$ 1-Untereinheit des inhibitorischen Glycinrezeptors
<b>GlyR</b>	inhibitorischer Glycinrezeptor
<b>GlyT2</b>	nicht-humaner Glycintransporter 2
<b>GLYT2</b>	humaner Glycintransporter 2
<b>GWA</b>	genomweite Assoziationsstudie
<b>H<sub>2</sub>O</b>	Wasser
<b>HWE</b>	Hardy-Weinberg-Equilibrium
<b>ICD-10</b>	International Statistical Classification of Diseases (Internationale statistische Klassifikation der Krankheiten)
<b>IL3RA</b>	interleukin 3 receptor alpha-Gen
<b>iPlex</b>	eine Methode der Einzelbasenverlängerung
<b>K<sup>+</sup></b>	Kaliumion
<b>KCl</b>	Kaliumchlorid
<b>KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></b>	Kaliumdihydrogenphosphat

<b>MALDI-TOF MS</b>	Matrix Assisted Laser Desorption/Ionisation-Time Of Flight Mass Spectrometry (matrixgestützte Flugzeit-Massenspektrometrie)
<b>MgCl<sub>2</sub></b>	Magnesiumchlorid
<b>min</b>	Minute
<b>mRNA</b>	messenger RNA
<b>n</b>	Anzahl
<b>Na<sup>+</sup></b>	Natriumion
<b>Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub></b>	Dinatriumhydrogenphosphat
<b>NaCl</b>	Natriumchlorid
<b>NaOH</b>	Natriumhydroxid
<b>NCBI</b>	National Center for Biotechnology Information
<b>NMDA</b>	N-Methyl-D-Aspartat
<b>NRG1</b>	Neuroregulin 1-Gen
<b>NRGN</b>	Neurogranin
<b>NRXN1</b>	Neurexin 1-Gen
<b>OR</b>	Odds Ratio
<b>p</b>	p-Wert; probability-Wert (Signifikanzwert)
<b>p. a.</b>	pro analysi (für die Analyse; Chemikalie mit hoher Reinheit)
<b>PANSS</b>	Positive and Negative Syndrome Scale (Skala der positiven und negativen Syndrome)
<b>PBS-Puffer</b>	Phosphate Buffered Saline-Puffer (phosphatgepufferte Salzlösung)
<b>PCP</b>	Phencyclidin
<b>PCR</b>	Polymerase-Kettenreaktion
<b>PDZ-Bindemotiv</b>	Proteininteraktionsdomäne
<b>pH</b>	pH-Wert (Maß für die saure oder alkalische Reaktion einer wässrigen Lösung)
<b>PLAA</b>	Phospholipase A-2-Activating Protein-Gen
<b>RELN</b>	Reelin-Gen
<b>RGS4</b>	Regulator of G-Protein Signaling 4-Gen

<b>RNA</b>	Ribonucleic acid (Ribonukleinsäure)
<b>rpm</b>	Revolutions per minute (Umdrehungen pro Minute)
<b>s</b>	Sekunde
<b>S.</b>	Seite
<b>SAP</b>	Shrimp Alkaline Phosphatase
<b>SBE</b>	Single Base Extension (Einzelbasenverlängerung)
<b>SD</b>	Standardabweichung
<b>SGENE</b>	eine groß angelegte GWA der Schizophrenie
<b>SKID I</b>	Strukturiertes Klinisches Interview für DSM-IV Achse I
<b>SKID II</b>	Strukturiertes Klinisches Interview für DSM-IV Achse II
<b>SLC6A5</b>	Solute Carrier Family 6 (Neurotransmitter Transporter, Glycine), Member 5-Gen
<b>SNP</b>	Single Nucleotide Polymorphism (Einzelnukleotidpolymorphismus)
<b>T</b>	Thymin
<b>Taq-Polymerase</b>	Thermophilus aquaticus DNA-Polymerase
<b>TCF4</b>	Transkriptionsfaktor 4-Gen
<b>TMS</b>	transmembrane Domäne
<b>Tris</b>	Trisaminomethan
<b>u.a.</b>	und andere
<b>WHO</b>	World Health Organisation (Weltgesundheitsorganisation)
<b>ZNF804A</b>	Zinc finger protein 804A-Gen
<b>ZNS</b>	zentrales Nervensystem

## 8. Literaturverzeichnis

Allen NC, Bagade S, McQueen MB, Ioannidis JP, Kavvoura FK, Khoury MJ, Tanzi RE, Bertram L (2008) Systematic meta-analyses and field synopsis of genetic association studies in schizophrenia: the SzGene database. *Nat Genet.* 40(7): 827-34.

American Psychiatric Association (1994) Diagnostic and statistical manual of mental health disorders (4th edition). Washington DC: Author.

Andreasen NC (1985) Positive vs. negative schizophrenia: a critical evaluation. *Schizophr Bull.* 11(3):380-9.

Andreasen NC (1987) The diagnosis of schizophrenia. *Schizophr Bull.* 13(1):9-22.

Andreasen NC (2000) Schizophrenia: the fundamental questions. *Brain Res Brain Res Rev.* 31(2-3):106-12.

Aragón C, López-Corcuera B (2003) Structure, function and regulation of glycine neurotransmitters. *Eur J Pharmacol.* 479(1-3):249-62.

Arinami T, Gao M, Hamaguchi H, Toru M (1997) A functional polymorphism in the promoter region of the dopamine D2 receptor gene is associated with schizophrenia. *Hum Mol Genet.* 6(4):577-82.

Arnone D, McIntosh AM, Tan GM, Ebmeier KP (2008) Meta-analysis of magnetic resonance imaging studies of the corpus callosum in schizophrenia. *Schizophr Res.* 101(1-3):124-32.

Athanasou L, Mattingsdal M, Kähler AK, Brown A, Gustafsson O, Agartz I, Giegling I, Muglia P, Cichon S, Rietschel M, Pietiläinen OP, Peltonen L, Bramon E, Collier D, Clair DS, Sigurdsson E, Petursson H, Rujescu D, Melle I, Steen VM, Djurovic S, Andreassen OA (2010) Gene variants associated with schizophrenia in a Norwegian genome-wide study are replicated in a large European cohort. *J Psychiatr Res.* 44 (12):748-53.

Attia J, Ioannidis JP, Thakkinstian A, McEvoy M, Scott RJ, Minelli C, Thompson J, Infante-Rivard C, Guyatt G (2009a) How to use an article about genetic association: A: Background concepts. *JAMA* 301(1):74-81.

Attia J, Ioannidis JP, Thakkinstian A, McEvoy M, Scott RJ, Minelli C, Thompson J, Infante-Rivard C, Guyatt G (2009b) How to use an article about genetic association: B: Are the results of the study valid? *JAMA* 301(2):191-7.

Baca-Garcia E, Perez-Rodriguez MM, Basurte-Villamor I, Fernandez del Moral AL, Jimenez-Arriero MA, Gonzalez de Rivera JL, Saiz-Ruiz J, Oquendo MA (2007) Diagnostic stability of psychiatric disorders in clinical practice. *Br J Psychiatry* 190:210-6.

Badner JA, Gershon ES (2002) Meta-analysis of whole-genome linkage scans of bipolar disorder and schizophrenia. *Mol Psychiatry* 7(4):405-11.

Barnes TR, Mutsatsa SH, Hutton SB, Watt HC, Joyce EM (2006) Comorbid substance use and age at onset of schizophrenia. *Br J Psychiatry* 188:237-42.

Bayer TA, Falkai P, Maier W (1999) Genetic and non-genetic vulnerability factors in schizophrenia: the basis of the "two hit hypothesis". *J Psychiatr Res.* 33(6):543-8.

Bender S, Schall U, Wolstein J, Grzella I, Zerbin D, Oades RD (1999) A topographic event-related potential follow-up study on 'prepulse inhibition' in first and second episode patients with schizophrenia. *Psychiatry Res.* 90(1):41-53.

Berger M Hrsg. (2009) *Psychische Erkrankungen - Klinik und Therapie*, 3. Auflage. München, Jena: Urban & Fischer Verlag/Elsevier GmbH.

Betz H, Gomeza J, Armsen W, Scholze P, Eulenburg V (2006) Glycine transporters: essential regulators of synaptic transmission. *Biochem Soc Trans.* 34(Pt 1):55-8.

Blackwood DH, Fordyce A, Walker MT, St Clair DM, Porteous DJ, Muir WJ (2001) Schizophrenia and affective disorders--cosegregation with a translocation at chromosome 1q42 that directly disrupts brain-expressed genes: clinical and P300 findings in a family. *Am J Hum Genet.* 69(2):428-33.

Bleuler E (1911) *Dementia praecox oder Gruppe der Schizophrenien*. Leipzig und Wien: F. Deuticke.

Bliss TV, Collingridge GL (1993) A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. *Nature* 361(6407):31-9.

Böddeker I, Ziegler A (2000) Assoziations- und Kopplungsstudien zur Analyse von Kandidatengenen. *Dtsch Med Wochenschr* 125: 810–815.

Bogdanik LP, Chapman HD, Miers KE, Serreze DV, Burgess RW (2012) A MusD retrotransposon insertion in the mouse *Slc6a5* gene causes alterations in neuromuscular junction maturation and behavioral phenotypes. *PloS One* 2012;7 (1):e30217.

Brackmann M, Zhao C, Schmieden V, Braunewell KH (2004) Cellular and subcellular localization of the inhibitory glycine receptor in hippocampal neurons. *Biochem Biophys Res Commun.* 324(3):1137-42.

Braff DL, Greenwood TA, Swerdlow NR, Light GA, Schork NJ, The Investigators of the Consortium on the Genetics of Schizophrenia (2008) Advances in endophenotyping schizophrenia. *World Psychiatry* 7(1):11-18.

Brown AS, Cohen P, Harkavy-Friedman J, Babulas V, Malaspina D, Gorman JM, Susser ES (2001) Prenatal rubella, premorbid abnormalities, and adult schizophrenia. *Biol Psychiatry* 49(6):473-86.

Brown AS, Schaefer CA, Quesenberry CP Jr, Liu L, Babulas VP, Susser ES (2005) Maternal exposure to toxoplasmosis and risk of schizophrenia in adult offspring. *Am J Psychiatry* 162(4):767-73.

Butzlaff RL, Hooley JM (1998) Expressed emotion and psychiatric relapse: a meta-analysis. *Arch Gen Psychiatry* 55(6):547-52.

Byrne M, Agerbo E, Bennedsen B, Eaton WW, Mortensen PB (2007) Obstetric conditions and risk of first admission with schizophrenia: a Danish national register based study. *Schizophr Res.* 97(1-3):51-9.

Byrne M, Agerbo E, Ewald H, Eaton WW, Mortensen PB (2003) Parental age and risk of schizophrenia: a case-control study. *Arch Gen Psychiatry* 60(7):673-8.

Caldwell CB, Gottesman II (1990) Schizophrenics kill themselves too: a review of risk factors for suicide *Schizophr Bull.* 16(4):571-89.

Cannon M, Caspi A, Moffitt TE, Harrington H, Taylor A, Murray RM, Poulton R (2002) Evidence for early-childhood, pan-developmental impairment specific to schizophreniform disorder: results from a longitudinal birth cohort. *Arch Gen Psychiatry* 59(5):449-56.

Cannon TD, Kaprio J, Lönnqvist J, Huttunen M, Koskenvuo M (1998) The genetic epidemiology of schizophrenia in a Finnish twin cohort. A population-based modeling study. *Arch Gen Psychiatry* 55(1):67-74.

Catts VS, Catts SV (2000) Apoptosis and schizophrenia: is the tumour suppressor gene, p53, a candidate susceptibility gene? *Schizophr Res.* 41(3):405-15.

Chakravarti A (1999) Population genetics--making sense out of sequence. *Nat Genet.* 21(1 Suppl):56-60.

Chowdari KV, Mirnics K, Semwal P, Wood J, Lawrence E, Bhatia T, Deshpande SN, B K T, Ferrell RE, Middleton FA, Devlin B, Levitt P, Lewis DA, Nimgaonkar VL (2002) Association and linkage analyses of RGS4 polymorphisms in schizophrenia. *Hum Mol Genet.* 11(12):1373-80.

Christensen K, Murray JC (2007) What genome-wide association studies can do for medicine. *N Engl J Med.* 356(11):1094-7.

Ciampi L (1980) The natural history of schizophrenia in the long term. *Br J Psychiatry* 136:413-20.

Clementz BA, Grove WM, Iacono WG, Sweeney JA (1992) Smooth-pursuit eye movement dysfunction and liability for schizophrenia: implications for genetic modeling. *J Abnorm Psychol.* 101(1):117-29.

Collins FS, Patrinos A, Jordan E, Chakravarti A, Gesteland R, Walters L (1998) New goals for the U.S. Human Genome Project: 1998-2003. *Science* 282(5389):682-9.

Craddock N, O'Donovan MC, Owen MJ (2005) The genetics of schizophrenia and bipolar disorder: dissecting psychosis. *J Med Genet.* 42(3):193-204.

Crow TJ (2007) How and why genetic linkage has not solved the problem of psychosis: review and hypothesis. *Am J Psychiatry* 164(1):13-21.

Davies G, Welham J, Chant D, Torrey EF, McGrath J (2003) A systematic review and meta-analysis of Northern Hemisphere season of birth studies in schizophrenia. *Schizophr Bull.* 29(3):587-93.

DeLisi LE (1997) Is schizophrenia a lifetime disorder of brain plasticity, growth and aging? *Schizophr Res.* 23(2):119-29.

DeLisi LE, Friedrich U, Wahlstrom J, Boccio-Smith A, Forsman A, Eklund K, Crow TJ (1994) Schizophrenia and sex chromosome anomalies. *Schizophr Bull.* 20(3):495-505.

DeLisi LE, Shaw SH, Crow TJ, Shields G, Smith AB, Larach VW, Wellman N, Loftus J, Nanthakumar B, Razi K, Stewart J, Comazzi M, Vita A, Heffner T, Sherrington R (2002) A genome-wide scan for linkage to chromosomal regions in 382 sibling pairs with schizophrenia or schizoaffective disorder. *Am J Psychiatry* 159(5):803-12.

Deng X, Sagata N, Takeuchi N, Tanaka M, Ninomiya H, Iwata N, Ozaki N, Shibata H, Fukumaki Y (2008) Association study of polymorphisms in the neutral amino acid transporter genes SLC1A4, SLC1A5 and the glycine transporter genes SLC6A5, SLC6A9 with schizophrenia. *BMC Psychiatry* 8:58.

Ding C (2006) Qualitative and quantitative DNA and RNA analysis by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Methods Mol Biol.* 336:59-71.

Djurovic S, Gustafsson O, Mattingsdal M, Athanasiu L, Bjella T, Tesli M, Agartz I, Lorentzen S, Melle I, Morken G, Andreassen OA (2010) A genome-wide association

study of bipolar disorder in Norwegian individuals, followed by replication in Icelandic sample. *J Affect Disord.* 126(1-2):312-6.

Dohrenwend BP, Levav I, Shrout PE, Schwartz S, Naveh G, Link BG, Skodol AE, Stueve A (1992) Socioeconomic status and psychiatric disorders: the causation-selection issue. *Science* 255(5047):946-52.

Entrez Gene (2010) <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene>

Entrez SNP (2010) <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/>

Eulenburg V, Armsen W, Betz H, Gomez J (2005) Glycine transporters: essential regulators of neurotransmission. *Trends Biochem Sci.* 30(6):325-33.

Eulenburg V, Becker K, Gomez J, Schmitt B, Becker CM, Betz H (2006) Mutations within the human GLYT2 (SLC6A5) gene associated with hyperekplexia. *Biochem Biophys Res Commun.* 348(2):400-5.

Evins AE, Amico E, Posever TA, Toker R, Goff DC (2002) D-Cycloserine added to risperidone in patients with primary negative symptoms of schizophrenia. *Schizophr Res.* 56(1-2):19-23.

Fanous AH, Kendler KS (2005) Genetic heterogeneity, modifier genes, and quantitative phenotypes in psychiatric illness: searching for a framework. *Mol Psychiatry* 10(1):6-13.

Fanous AH, Kendler KS (2008) Genetics of clinical features and subtypes of schizophrenia: a review of the recent literature. *Curr Psychiatry Rep.* 10(2):164-70.

First MB, Gibbon M, Spitzer RL, Williams JBW, Benjamin LS (1997) Structured Clinical Interview for DSM-IV Axis II Personality Disorders, (SCID-II). Washington, D.C.: American Psychiatric Press, Inc.

First MB, Spitzer RL, Gibbon M, Williams JBW (1996) Structured Clinical Interview for DSM-IV Axis I Disorders, Clinician Version (SCID-CV). Washington, D.C.: American Psychiatric Press, Inc.

- Flyckt L, Mattsson M, Edman G, Carlsson R, Cullberg J (2006) Predicting 5-year outcome in first-episode psychosis: construction of a prognostic rating scale. *J Clin Psychiatry* 67(6):916-24.
- Ford JM (1999) Schizophrenia: the broken P300 and beyond. *Psychophysiology* 36(6):667-82.
- Fusar-Poli P, Politi P (2008) Paul Eugen Bleuler and the birth of schizophrenia (1908) *Am J Psychiatry* 165(11):1407.
- Fydrich T, Renneberg B, Schmitz B, Wittchen H-U (1997) SKID-II. Strukturiertes Klinisches Interview für DSM-IV. Achse II: Persönlichkeitsstörungen. Göttingen: Hogrefe.
- Gallagher MJ, Burgess LH, Brunden KR (1999) Characterization of multiple forms of the human glycine transporter type-2. *Brain Res Mol Brain Res.* 70(1):101-15.
- Geerlings A, Núñez E, López-Corcuera B, Aragón C (2001) Calcium- and syntaxin 1-mediated trafficking of the neuronal glycine transporter GLYT2. *J Biol Chem.* 276(20):17584-90.
- Giegling I, Genius J, Benninghoff J, Rujescu D (2010) Genetic findings in schizophrenia patients related to alterations in the intracellular Ca-homeostasis. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 34(8):1375-80.
- Goff DC, Coyle JT (2001) The emerging role of glutamate in the pathophysiology and treatment of schizophrenia. *Am J Psychiatry* 158(9):1367-77.
- Gohlke JM, Thomas R, Zhang Y, Rosenstein MC, Davis AP, Murphy C, Becker KG, Mattingly CJ, Portier CJ (2009) Genetic and environmental pathways to complex diseases. *BMC Syst Biol.* 3:46.
- Gomez J, Ohno K, Hülsmann S, Armsen W, Eulenburg V, Richter DW, Laube B, Betz H (2003) Deletion of the mouse glycine transporter 2 results in a hyperekplexia phenotype and postnatal lethality. *Neuron* 40(4):797-806.

Gonzalez-Burgos G, Lewis DA (2008) GABA neurons and the mechanisms of network oscillations: implications for understanding cortical dysfunction in schizophrenia. *Schizophr Bull.* 34(5):944-61.

Gottesman II, Gould TD (2003) The endophenotype concept in psychiatry: etymology and strategic intentions. *Am J Psychiatry* 160(4):636-45.

Gottesman II, McGuffin P, Farmer AE (1987) Clinical genetics as clues to the "real" genetics of schizophrenia (a decade of modest gains while playing for time). *Schizophr Bull.* 13(1):23-47.

Gottesman II, Shields J (1973) Genetic theorizing and schizophrenia. *Br J Psychiatry* 122(566):15-30.

Green EK, Grozeva D, Jones I, Jones L, Kirov G, Caesar S, Gordon-Smith K, Fraser C, Forty L, Russell E, Hamshere ML, Moskvina V, Nikolov I, Farmer A, McGuffin P; Wellcome Trust Case Control Consortium, Holmans PA, Owen MJ, O'Donovan MC, Craddock N (2010) The bipolar disorder risk allele at CACNA1C also confers risk of recurrent major depression and of schizophrenia. *Mol Psychiatry* 15(10):1016-22.

Greenwood TA, Braff DL, Light GA, Cadenhead KS, Calkins ME, Dobie DJ, Freedman R, Green MF, Gur RE, Gur RC, Mintz J, Nuechterlein KH, Olincy A, Radant AD, Seidman LJ, Siever LJ, Silverman JM, Stone WS, Swerdlow NR, Tsuang DW, Tsuang MT, Turetsky BI, Schork NJ (2007) Initial heritability analyses of endophenotypic measures for schizophrenia: the consortium on the genetics of schizophrenia. *Arch Gen Psychiatry* 64(11):1242-50.

Guillin O, Abi-Dargham A, Laruelle M (2007) Neurobiology of dopamine in schizophrenia. *Int Rev Neurobiol.* 78:1-39.

Haff LA, Smirnov IP (1997) Single-nucleotide polymorphism identification assays using a thermostable DNA polymerase and delayed extraction MALDI-TOF mass spectrometry. *Genome Res.* 7(4):378-88.

Harrison G, Hopper K, Craig T, Laska E, Siegel C, Wanderling J, Dube KC, Ganey K, Giel R, an der Heiden W, Holmberg SK, Janca A, Lee PW, León CA, Malhotra S, Marsella AJ, Nakane Y, Sartorius N, Shen Y, Skoda C, Thara R, Tsirkin SJ, Varma

- VK, Walsh D, Wiersma D (2001) Recovery from psychotic illness: a 15- and 25-year international follow-up study. *Br J Psychiatry* 178:506-17.
- Heresco-Levy U, Javitt DC, Ermilov M, Mordel C, Silipo G, Lichtenstein M (1999) Efficacy of high-dose glycine in the treatment of enduring negative symptoms of schizophrenia. *Arch Gen Psychiatry* 56(1):29-36.
- Heston LL (1966) Psychiatric disorders in foster home reared children of schizophrenic mothers. *Br J Psychiatry* 112(489):819-25.
- Hill K, Mann L, Laws KR, Stephenson CM, Nimmo-Smith I, McKenna PJ (2004) Hypofrontality in schizophrenia: a meta-analysis of functional imaging studies. *Acta Psychiatr Scand.* 110(4):243-56.
- Hindorff LA, Sethupathy P, Junkins HA, Ramos EM, Mehta JP, Collins FS, Manolio TA (2009) Potential etiologic and functional implications of genome-wide association loci for human diseases and traits. *Proc Natl Acad Sci USA* 106(23):9362-7.
- Hodgkinson CA, Goldman D, Jaeger J, Persaud S, Kane JM, Lipsky RH, Malhotra AK (2004) Disrupted in schizophrenia 1 (DISC1): association with schizophrenia, schizoaffective disorder, and bipolar disorder. *Am J Hum Genet.* 75(5):862-72.
- Hong LE, Mitchell BD, Avila MT, Adami H, McMahon RP, Thaker GK (2006) Familial aggregation of eye-tracking endophenotypes in families of schizophrenic patients. *Arch Gen Psychiatry* 63(3):259-64.
- Hons J, Zirko R, Ulrychova M, Cermakova E, Doubek P, Libiger J (2010) Glycine serum level in schizophrenia: relation to negative symptoms. *Psychiatry Res.* 176 (2-3):103-8.
- Hosking L, Lumsden S, Lewis K, Yeo A, McCarthy L, Bansal A, Riley J, Purvis I, Xu CF (2004) Detection of genotyping errors by Hardy-Weinberg equilibrium testing. *Eur J Hum Genet.* 12(5):395-9.
- Hunter DJ, Kraft P (2007) Drinking from the fire hose--statistical issues in genomewide association studies. *N Engl J Med.* 357(5):436-9.

International HapMap Consortium (2003) The International HapMap Project. *Nature* 426(6968):789-96.

International HapMap Consortium (2005) A haplotype map of the human genome. *Nature* 437(7063):1299-320.

International HapMap Consortium (2007) A second generation human haplotype map of over 3.1 million SNPs. *Nature* 449(7164):851-861.

International Schizophrenia Consortium, Purcell SM, Wray NR, Stone JL, Visscher PM, O'Donovan MC, Sullivan PF, Sklar P (2009) Common polygenic variation contributes to risk of schizophrenia and bipolar disorder. *Nature* 460(7256):748-52.

Ioannidis JP (2005) Why most published research findings are false. *PLoS Med.* 2 (8):e124.

Ioannidis JP, Ntzani EE, Trikalinos TA, Contopoulos-Ioannidis DG (2001) Replication validity of genetic association studies. *Nat Genet.* 29(3):306-9.

Jablensky A (2006) Subtyping schizophrenia: implications for genetic research. *Mol Psychiatry* 11(9):815-36.

Jamra RA, Vilella AW, Klein K, Becker T, Schulze TG, Schmael C, Deschner M, Klopp N, Illig T, Propping P, Cichon S, Rietschel M, Nöthen MM, Schumacher J (2006) No association between genetic variants at the GLYT2 gene and bipolar affective disorder and schizophrenia. *Psychiatr Genet.* 16(3):91.

Jansen M, Dannhardt G (2003) Antagonists and agonists at the glycine site of the NMDA receptor for therapeutic interventions. *Eur J Med Chem.* 38(7-8):661-70.

Jaspers K (1946) *Allgemeine Psychopathologie*, 4. Aufl. Heidelberg: Springer.

Javitt DC (2010) Glutamatergic theories of schizophrenia. *Isr J Psychiatry Relat Sci.* 47(1):4-16.

Jentsch JD, Roth RH (1999) The neuropsychopharmacology of phencyclidine: from NMDA receptor hypofunction to the dopamine hypothesis of schizophrenia. *Neuropsychopharmacology* 20(3):201-25.

- Johnson JW, Ascher P (1987) Glycine potentiates the NMDA response in cultured mouse brain neurons. *Nature* 325(6104):529-31.
- Kahn RS, Davidson M (1993) Serotonin, dopamine and their interactions in schizophrenia. *Psychopharmacology (Berl)* 112(1 Suppl):S1-4.
- Karas M, Hillenkamp F (1988) Laser desorption ionisation of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons. *Anal Chem.* 60(20):2299-301.
- Kay SR, Fiszbein A, Opler LA (1987) The positive and negative syndrome scale (PANSS) for schizophrenia. *Schizophr Bull* 13(2): 261-76.
- Kay SR, Opler LA, Lindenmayer JP (1988) Reliability and validity of the positive and negative syndrome scale for schizophrenics. *Psychiatry Res.* 23(1):99-110.
- Kemp JA, Leeson PD (1993) The glycine site of the NMDA receptor--five years on. *Trends Pharmacol Sci.* 14(1):20-5.
- Kendler KS, Diehl SR (1993) The genetics of schizophrenia: a current, genetic-epidemiologic perspective. *Schizophr Bull.* 19(2):261-85.
- Keshavan MS, Kulkarni S, Bhojraj T, Francis A, Diwadkar V, Montrose DM, Seidman LJ, Sweeney J (2010) Premorbid cognitive deficits in young relatives of schizophrenia patients. *Front Hum Neurosci.* 3:62.
- Keshavan MS, Tandon R, Boutros NN, Nasrallah HA (2008) Schizophrenia, "just the facts": what we know in 2008 Part 3: neurobiology. *Schizophr Res.* 106(2-3):89-107.
- Kety SS, Rosenthal D, Wender PH, Schulsinger F, Jacobsen B (1976) Mental illness in the biological and adoptive families of adopted individuals who have become schizophrenic. *Behav Genet.* 6(3):219-25.
- Kim JS, Kornhuber HH, Schmid-Burgk W, Holzmüller B (1980) Low cerebrospinal fluid glutamate in schizophrenic patients and a new hypothesis on schizophrenia. *Neurosci Lett.* 20(3):379-82.
- Kirkbride JB, Fearon P, Morgan C, Dazzan P, Morgan K, Tarrant J, Lloyd T, Holloway J, Hutchinson G, Leff JP, Mallett RM, Harrison GL, Murray RM, Jones PB (2006)

Heterogeneity in incidence rates of schizophrenia and other psychotic syndromes: findings from the 3-center AeSOP study. *Arch Gen Psychiatry* 63(3):250-8.

Kirov G, Zaharieva I, Georgieva L, Moskvina V, Nikolov I, Cichon S, Hillmer A, Toncheva D, Owen MJ, O'Donovan MC (2009) A genome-wide association study in 574 schizophrenia trios using DNA pooling. *Mol Psychiatry* 14(8):796-803.

Kleckner NW, Dingledine R (1988) Requirement for glycine in activation of NMDA-receptors expressed in *Xenopus* oocytes. *Science* 241(4867):835-7.

Koch M (1999) The neurobiology of startle. *Prog Neurobiol.* 59(2):107-28.

Konradi C, Heckers S (2003) Molecular aspects of glutamate dysregulation: implications for schizophrenia and its treatment. *Pharmacol Ther.* 97(2):153-79.

Kraepelin E (1896) *Psychiatrie - Ein Lehrbuch für Studierende und Ärzte.* 5., vollst. umgearb. Aufl. Leipzig: Barth.

Krystal JH, Perry EB Jr, Gueorguieva R, Belger A, Madonick SH, Abi-Dargham A, Cooper TB, Macdougall L, Abi-Saab W, D'Souza DC (2005) Comparative and interactive human psychopharmacologic effects of ketamine and amphetamine: implications for glutamatergic and dopaminergic model psychoses and cognitive function. *Arch Gen Psychiatry* 62(9):985-94.

Lahti AC, Koffel B, LaPorte D, Tamminga CA (1995) Subanesthetic doses of ketamine stimulate psychosis in schizophrenia. *Neuropsychopharmacology* 13(1): 9-19.

Lander ES, Linton LM, Birren B, Nusbaum C, Zody MC, Baldwin J, Devon K, Dewar K, Doyle M, FitzHugh W, Funke R, Gage D, Harris K, Heaford A, Howland J, Kann L, Lehoczky J, LeVine R, McEwan P, McKernan K, Meldrim J, Mesirov JP, Miranda C, Morris W, Naylor J, Raymond C, Rosetti M, Santos R, Sheridan A, Sougnez C, Stange-Thomann N, Stojanovic N, Subramanian A, Wyman D, Rogers J, Sulston J, Ainscough R, Beck S, Bentley D, Burton J, Clee C, Carter N, Coulson A, Deadman R, Deloukas P, Dunham A, Dunham I, Durbin R, French L, Grafham D, Gregory S, Hubbard T, Humphray S, Hunt A, Jones M, Lloyd C, McMurray A, Matthews L, Mercer S, Milne S, Mullikin JC, Mungall A, Plumb R, Ross M, Shownkeen R, Sims S,

Waterston RH, Wilson RK, Hillier LW, McPherson JD, Marra MA, Mardis ER et al.; International Human Genome Sequencing Consortium (2001) Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 409(6822):860-921.

Lander ES, Schork NJ (1994) Genetic dissection of complex traits. *Science* 265(5181):2037-48.

Lencz T, Morgan TV, Athanasiou M, Dain B, Reed CR, Kane JM, Kucherlapati R, Malhotra AK (2007) Converging evidence for a pseudoautosomal cytokine receptor gene locus in schizophrenia. *Mol Psychiatry* 12(6):572-80.

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, Lönnqvist 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, Zoëga T, Helgason T (2003) Genome scan meta-analysis of schizophrenia and bipolar disorder, part II: Schizophrenia. *Am J Hum Genet.* 73(1):34-48.

Lichtermand D, Karbe E, Maier W (2000) The genetic epidemiology of schizophrenia and of schizophrenia spectrum disorders. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci.* 250(6): 304-10.

Liu QR, López-Corcuera B, Mandiyan S, Nelson H, Nelson N (1993) Cloning and expression of a spinal cord- and brain-specific glycine transporter with novel structural features. *J Biol Chem.* 268(30):22802-8.

López-Corcuera B, Geerlings A, Aragón C (2001) Glycine neurotransmitter transporters: an update. *Mol Membr Biol.* 18(1):13-20.

MacIntyre DJ, Blackwood DH, Porteous DJ, Pickard BS, Muir WJ (2003) Chromosomal abnormalities and mental illness. *Mol Psychiatry* 8(3):275-87.

- Maglott D, Ostell J, Pruitt KD, Tatusova T (2007) Entrez Gene: gene-centered information at NCBI. *Nucleic Acids Res.* 35(Database issue):D26-31.
- Mah S, Nelson MR, Delisi LE, Reneland RH, Markward N, James MR, Nyholt DR, Hayward N, Handoko H, Mowry B, Kammerer S, Braun A (2006) Identification of the semaphorin receptor PLXNA2 as a candidate for susceptibility to schizophrenia. *Mol Psychiatry* 11(5):471-8.
- Maier W, Lichtermann D, Rietschel M, Held T, Falkai P, Wagner M, Schwab S (1999) Genetik schizophrener Störungen Neuere Konzepte und Befunde. *Nervenarzt* 70(11): 955-69.
- Maj M (2005) „Psychiatric comorbidity“: an artefact of current diagnostic systems? *Br J Psychiatry* 186:182-4.
- Malaspina D, Harlap S, Fennig S, Heiman D, Nahon D, Feldman D, Susser ES (2001) Advancing paternal age and the risk of schizophrenia. *Arch Gen Psychiatry* 58 (4):361-7.
- McClellan J, King MC (2010) Genetic heterogeneity in human disease. *Cell* 141(2): 210-7.
- McClellan JM, Susser E, King MC (2007) Schizophrenia: a common disease caused by multiple rare alleles. *Br J Psychiatry* 190:194-9.
- McGrath J, Saha S, Welham J, El Saadi O, MacCauley C, Chant D (2004) A systematic review of the incidence of schizophrenia: the distribution of rates and the influence of sex, urbanicity, migrant status and methodology. *BMC Med* 2:13.
- McGrath JJ, Welham JL (1999) Season of birth and schizophrenia: a systematic review and meta-analysis of data from the Southern Hemisphere. *Schizophr Res.* 35 (3):237-42.
- McNeil TF, Cantor-Graae E, Weinberger DR (2000) Relationship of obstetric complications and differences in size of brain structures in monozygotic twin pairs discordant for schizophrenia. *Am J Psychiatry* 157(2):203-12.

Meincke U, Light GA, Geyer MA, Braff DL, Gouzoulis-Mayfrank E (2004) Sensitization and habituation of the acoustic startle reflex in patients with schizophrenia. *Psychiatry Res.* 126(1):51-61.

Menezes NM, Arenovich T, Zipursky RB (2006) A systematic review of longitudinal outcome studies of first-episode psychosis. *Psychol Med.* 36(10):1349-62.

Meyer-Lindenberg AS, Olsen RK, Kohn PD, Brown T, Egan MF, Weinberger DR, Berman KF (2005) Regionally specific disturbance of dorsolateral prefrontal-hippocampal functional connectivity in schizophrenia. *Arch Gen Psychiatry* 62(4): 379-86.

Mill J, Tang T, Kaminsky Z, Khare T, Yazdanpanah S, Bouchard L, Jia P, Assadzadeh A, Flanagan J, Schumacher A, Wang SC, Petronis A (2008) Epigenomic profiling reveals DNA-methylation changes associated with major psychosis. *Am J Hum Genet.* 82(3):696-711.

Möller HJ (2007) Clinical evaluation of negative symptoms in schizophrenia. *Eur Psychiatry* 22(6):380-6.

Möller HJ (2008a) Systematic of psychiatric disorders between categorical and dimensional approaches: Kraepelin's dichotomy and beyond. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci.* 258 Suppl 2:48-73.

Möller HJ (2008b) The assessment of cognitive impairment would be a relevant addition to the criteria for diagnosing schizophrenia. *World Psychiatry* 7(1):35-6.

Möller HJ (2009) Standardised rating scales in psychiatry: methodological basis, their possibilities and limitations and descriptions of important rating scales. *World J Biol Psychiatry* 10(1):6-26.

Möller HJ, Bottlender R, Gross A, Hoff P, Wittmann J, Wegner U, Strauss A (2002) The Kraepelinian dichotomy: preliminary results of a 15-year follow-up study on functional psychoses: focus on negative symptoms. *Schizophr Res.* 56(1-2):87-94.

Möller HJ, Jäger M, Riedel M, Obermeier M, Strauss A, Bottlender R (2011) The Munich 15-year follow-up study (MUFUSSAD) on first-hospitalized patients with

schizophrenic or affective disorders: Assessing courses, types and time stability of diagnostic classification. *Eur Psychiatry* 26(4):231-43.

Möller HJ, Laux G, Deister A (2005) *Psychiatrie und Psychotherapie*, 3., überarbeitete Auflage. Stuttgart: Thieme.

Moghaddam B (2003) Bringing order to the glutamate chaos in schizophrenia. *Neuron* 40(5):881-4.

Moldin SO (1997) The maddening hunt for madness genes. *Nat Genet.* 17(2):127-9.

Moncrieff J (2009) A critique of the dopamine hypothesis of schizophrenia and psychosis. *Harv Rev Psychiatry* 17(3):214-25.

Moore TH, Zammit S, Lingford-Hughes A, Barnes TR, Jones PB, Burke M, Lewis G (2007) Cannabis use and risk of psychotic or affective mental health outcomes: a systematic review. *Lancet* 370(9584):319-28.

Morrow JA, Collie IT, Dunbar DR, Walker GB, Shahid M, Hill DR (1998) Molecular cloning and functional expression of the human glycine transporter GlyT2 and chromosomal localisation of the gene in the human genome. *FEBS Lett.* 439(3): 334-40.

Mortensen PB, Pedersen CB, Westergaard T, Wohlfahrt J, Ewald H, Mors O, Andersen PK, Melbye M (1999) Effects of family history and place and season of birth on the risk of schizophrenia. *N Engl J Med.* 340(8):603-8.

Mullis KB (1990) The unusual origin of the polymerase chain reaction. *Sci Am* 262(4): 56-61, 64-5.

Need AC, Ge D, Weale ME, Maia J, Feng S, Heinzen EL, Shianna KV, Yoon W, Kasperaviciute D, Gennarelli M, Strittmatter WJ, Bonvicini C, Rossi G, Jayathilake K, Cola PA, McEvoy JP, Keefe RS, Fisher EM, St Jean PL, Giegling I, Hartmann AM, Möller HJ, Ruppert A, Fraser G, Crombie C, Middleton LT, St Clair D, Roses AD, Muglia P, Francks C, Rujescu D, Meltzer HY, Goldstein DB (2009) A genome-wide investigation of SNPs and CNVs in schizophrenia. *PLoS Genet.* 5(2):e1000373.

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, Mérette C, Pato CN, Pato MT, Roos JL, Kohn Y et al. (2009) Meta-analysis of 32 genome-wide linkage studies of schizophrenia. *Mol Psychiatry* 14(8):774-85.

Nnadi CU, Malhotra AK (2007) Individualizing antipsychotic drug therapy in schizophrenia: the promise of pharmacogenetics. *Curr Psychiatry Rep.* 9(4):313-8.

Norman RM, Malla AK (1993) Stressful life events and schizophrenia. I: A review of the research. *Br J Psychiatry* 162:161-6.

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, Möller 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, Nöthen 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; Molecular Genetics of Schizophrenia Collaboration (2008) Identification of loci associated with schizophrenia by genome-wide association and follow-up. *Nat Genet.* 40(9):1053-5.

O'Donovan MC, Owen MJ (1999) Candidate-gene association studies of schizophrenia. *Am J Hum Genet.* 65(3):587-92.

Oeth P, Beaulieu M, Park C, Kosman D, del Mistro G, van den Boom D, Jurinke C (2005) iPLEX™ assay: increased plexing efficiency and flexibility for MassARRAY

system through single base primer extension with mass-modified terminators. Sequenom application note. San Diego (CA): Sequenom.

Olijslagers JE, Werkman TR, McCreary AC, Kruse CG, Wadman WJ (2006) Modulation of midbrain dopamine neurotransmission by serotonin, a versatile interaction between neurotransmitters and significance for antipsychotic drug action. *Curr Neuropharmacol.* 4(1):59-68.

Owen MJ (2000) Molecular genetic studies of schizophrenia. *Brain Res Brain Res Rev.* 31(2-3):179-86.

Owen MJ, Craddock N, O'Donovan MC (2005) Schizophrenia: genes at last? *Trends Genet.* 21(9):518-25.

Pantelis C, Yücel M, Wood SJ, Velakoulis D, Sun D, Berger G, Stuart GW, Yung A, Phillips L, McGorry PD (2005) Structural brain imaging evidence for multiple pathological processes at different stages of brain development in schizophrenia. *Schizophr Bull.* 31(3):672-96.

Parks J, Svendsen D, Singer P, Foti M (2006) Morbidity and Mortality in People with Serious Mental Illness. National Association of State Mental Health Program Directors (NASMHPD) Medical Directors Council Alexandria, Virginia.

Pedersen CB, Mortensen PB (2001) Family history, place and season of birth as risk factors for schizophrenia in Denmark: a replication and reanalysis. *Br J Psychiatry* 179:46-52.

Penner JD, Brown AS (2007) Prenatal infectious and nutritional factors and risk of adult schizophrenia. *Expert Rev Neurother.* 7(7):797-805.

Peralta V, Cuesta MJ (1994) Psychometric properties of the positive and negative syndrome scale (PANSS) in schizophrenia. *Psychiatry Res.* 53(1):31-40.

Prasad KM, Keshavan MS (2008) Structural cerebral variations as useful endophenotypes in schizophrenia: do they help construct "extended endophenotypes"? *Schizophr Bull.* 34(4):774-90.

- Qiagen (2005) QIAamp DNA Blood Midi/Maxi Handbook 2nd Edition. Hilden: Qiagen.
- Radomsky ED, Haas GL, Mann JJ, Sweeney JA (1999) Suicidal behavior in patients with schizophrenia and other psychotic disorders. *Am J Psychiatry* 156(10):1590-5.
- Raedler TJ, Bymaster FP, Tandon R, Copolov D, Dean B (2007) Towards a muscarinic hypothesis of schizophrenia. *Mol Psychiatry* 12(3):232-46.
- Ramirez Basco M, Bostic JQ, Davies D, Rush AJ, Witte B, Hendrickse W, Barnett V (2000) Methods to improve diagnostic accuracy in a community mental health setting. *Am J Psychiatry* 157(10):1599-605.
- Rees MI, Harvey K, Pearce BR, Chung SK, Duguid IC, Thomas P, Beatty S, Graham GE, Armstrong L, Shiang R, Abbott KJ, Zuberi SM, Stephenson JB, Owen MJ, Tijssen MA, van den Maagdenberg AM, Smart TG, Supplisson S, Harvey RJ (2006) Mutations in the gene encoding GlyT2 (SLC6A5) define a presynaptic component of human startle disease. *Nat Genet.* 38(7):801-6.
- Regier DA (2007) Time for a Fresh Start? Rethinking Psychosis in DSM-V. *Schizophr Bull.* 33(4):843-5.
- Rengarajan K, Cristol SM, Mehta M, Nickerson JM (2002) Quantifying DNA concentrations using fluorometry: A comparison of fluorophores. *Mol Vis* 8:416-421
- Rice JP, Reich T, Bucholz KK, Neuman RJ, Fishman R, Rochberg N, Hesselbrock VM, Nurnberger JI, Jr., Schuckit MA, Begleiter H (1995) Comparison of direct interview and family history diagnoses of alcohol dependence. *Alcsm Clin. Exp. Res.* 19:1018–1023.
- Richter V, Guthke J (1996) Leipziger Ereignis- und Belastungsinventar (LEBI). Göttingen, Hogrefe.
- Riecher-Rössler A, Rössler W (1998) The course of schizophrenic psychoses: what do we really know? A selective review from an epidemiological perspective. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci.* 248(4):189-202.

Risch N, Merikangas K (1996) The future of genetic studies of complex human diseases. *Science* 273(5281):1516-7.

Rössler W, Salize HJ, van Os J, Riecher-Rössler A (2005) Size of burden of schizophrenia and psychotic disorders. *Eur Neuropsychopharmacol.* 15(4):399-409.

Rousseau F, Aubrey KR, Supplisson S (2008) The glycine transporter GlyT2 controls the dynamics of synaptic vesicle refilling in inhibitory spinal cord neurons. *J Neurosci.* 28(39):9755-68.

Rujescu D (2008) Is the roller coaster ride in schizophrenia genetics coming to an end? breakthrough or wishful thinking? *World J Biol Psychiatry* 9(3):162-4.

Rujescu D, Bender A, Keck M, Hartmann AM, Ohl F, Raeder H, Giegling I, Genius J, McCarley RW, Möller HJ, Grunze H (2006) A pharmacological model for psychosis based on N-methyl-D-aspartate receptor hypofunction: molecular, cellular, functional and behavioral abnormalities. *Biol Psychiatry* 59(8):721-9.

Rujescu D, Ingason 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, Lonqvist J, Suvisaari J, Tuulio-Henriksson A, Djurovic S, Melle I, Andreassen OA, Hansen T, Werge T, Kiemenev 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 (2009) Disruption of the neurexin 1 gene is associated with schizophrenia. *Hum Mol Genet.* 18(5):988-96.

Saha S, Chant D, McGrath J (2007) A systematic review of mortality in schizophrenia: is the differential mortality gap worsening over time? *Arch Gen Psychiatry* 64(10):1123-31.

Saha S, Chant D, Welham J, McGrath J (2005) A systematic review of the prevalence of schizophrenia. *PLoS Med.* 2(5):e141.

Sáiz PA, García-Portilla MP, Arango C, Morales B, Alvarez V, Coto E, Fernández JM, Bascarán MT, Bousoño M, Bobes J (2007) Association study of serotonin 2A receptor (5-HT<sub>2A</sub>) and serotonin transporter (5-HTT) gene polymorphisms with schizophrenia. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 31(3):741-5.

Saß H, Wittchen U, Zaudig M, (1996) Diagnostisches und Statistisches Manual Psychischer Störungen – DSM-IV. Göttingen: Hogrefe.

Sawa A, Snyder SH (2002) Schizophrenia: diverse approaches to a complex disease. *Science* 296(5568):692-5.

Schneider K (2007) Klinische Psychopathologie. 15. Auflage. Stuttgart: Thieme.

Schultze-Lutter F (2009) Subjective Symptoms of Schizophrenia in Research and the Clinic: The Basic Symptom Concept. *Schizophr Bull.* 35(1):5-8.

Schwab SG, Knapp M, Mondabon S, Hallmayer J, Borrmann-Hassenbach M, Albus M, Lerer B, Rietschel M, Trixler M, Maier W, Wildenauer DB (2003) Support for association of schizophrenia with genetic variation in the 6p22.3 gene, dysbindin, in sib-pair families with linkage and in an additional sample of triad families. *Am J Hum Genet.* 72(1):185-90.

Sebastiani P, Timofeev N, Dworkis DA, Perls TT, Steinberg MH (2009) Genome-wide association studies and the genetic dissection of complex traits. *Am J Hematol.* 84(8):504-15.

Semple DM, McIntosh AM, Lawrie SM (2005) Cannabis as a risk factor for psychosis: systematic review. *J Psychopharmacol.* 19(2):187-94.

Shapleske J, Rossell SL, Woodruff PW, David AS (1999) The planum temporale: a systematic, quantitative review of its structural, functional and clinical significance. *Brain Res Brain Res Rev.* 29(1):26-49.

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 (2009) Common variants on chromosome 6p22.1 are associated with schizophrenia. *Nature* 460(7256):753-7.

Shifman S, Bronstein M, Sternfeld M, Pisanté-Shalom A, Lev-Lehman E, Weizman A, Reznik I, Spivak B, Grisaru N, Karp L, Schiffer R, Kotler M, Strous RD, Swartz-Vanetik M, Knobler HY, Shinar E, Beckmann JS, Yakir B, Risch N, Zak NB, Darvasi A (2002) A highly significant association between a COMT haplotype and schizophrenia. *Am J Hum Genet.* 71(6):1296-302.

Shifman S, Johannesson M, Bronstein M, Chen SX, Collier DA, Craddock NJ, Kendler KS, Li T, O'Donovan M, O'Neill FA, Owen MJ, Walsh D, Weinberger DR, Sun C, Flint J, Darvasi A (2008) Genome-wide association identifies a common variant in the reelin gene that increases the risk of schizophrenia only in women. *PLoS Genet.* 4(2):e28.

Skre I, Onstad S, Torgersen S, Kringlen E (1991) High interrater reliability for the Structured Clinical Interview for DSM-III-R Axis I (SCID-I). *Acta Psychiatr Scand.* 84 (2):167-73.

Sommer I, Ramsay N, Kahn R, Aleman A, Bouma A (2001) Handedness, language lateralisation and anatomical asymmetry in schizophrenia: meta-analysis. *Br J Psychiatry* 178:344-51.

Song YS, Wang F, Slatkin M (2010) General Epistatic Models of the Risk of Complex Diseases. *Genetics* 186(4):1467-73.

Spring B (1981) *Schizophr Bull.* Stress and schizophrenia: some definitional issues. 7 (1):24-33.

Stahl SM (2007) Novel therapeutics for schizophrenia: targeting glycine modulation of NMDA glutamate receptors. *CNS Spectr.* 12(6):423-7.

Steen RG, Mull C, McClure R, Hamer RM, Lieberman JA (2006) Brain volume in first-episode schizophrenia: systematic review and meta-analysis of magnetic resonance imaging studies. *Br J Psychiatry* 188:510-8.

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, Lonqvist J, Paunio T, Børglum AD, Hartmann A, Fink-Jensen A, Nordentoft M, Hougaard D, Norgaard-Pedersen B, Böttcher Y, Olesen J, Breuer R, Möller HJ, Giegling I, Rasmussen HB, Timm S, Mattheisen M, Bitter I, Réthelyi 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; Genetic Risk and Outcome in Psychosis (GROUPE), Melle I, Djurovic S, Abramova L, Kaleda V, Sanjuan J, de Frutos R, Bramon E, Vassos E, Fraser G et al. (2009) Common variants conferring risk of schizophrenia. *Nature* 460(7256): 744-7.

Stefansson H, Sarginson J, Kong A, Yates P, Steinthorsdottir V, Gudfinnsson E, Gunnarsdottir S, Walker N, Petursson H, Crombie C, Ingason A, Gulcher JR, Stefansson K, St Clair D (2003) Association of neuregulin 1 with schizophrenia confirmed in a Scottish population. *Am J Hum Genet.* 72(1):83-7.

Stompe T, Ortwein-Swoboda G, Ritter K, Schanda H, Friedmann A (2002) Are we witnessing the disappearance of catatonic schizophrenia? *Compr Psychiatry* 43(3): 167-74.

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 (2002) Genetic variation in the 6p22.3 gene DTNBP1, the human ortholog of the mouse dysbindin gene, is associated with schizophrenia. *Am J Hum Genet.* 71(2):337-48.

Straub RE, Weinberger DR (2006) Schizophrenia genes - famine to feast. *Biol Psychiatry* 60(2):81-3.

Sullivan PF (2007) Spurious genetic associations. *Biol Psychiatry* 61(10):1121-6.

Sullivan PF, Kendler KS, Neale MC (2003) Schizophrenia as a complex trait: evidence from a meta-analysis of twin studies. *Arch Gen Psychiatry* 60(12):1187-92.

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 (2008) Genomewide association for schizophrenia in the CATIE study: results of stage 1. *Mol Psychiatry* 13(6):570-84.

Swerdlow NR, Weber M, Qu Y, Light GA, Braff DL (2008) Realistic expectations of prepulse inhibition in translational models for schizophrenia research. *Psychopharmacology (Berl)*. 199(3):331-88.

Tandon R, Keshavan MS, Nasrallah HA (2008a) Schizophrenia, „just the facts“ 1. Overview. *Schizophr Res*. 100(1-3):4-19

Tandon R, Keshavan MS, Nasrallah HA (2008b). Schizophrenia, "just the facts" 2. Epidemiology and etiology. *Schizophr Res*. 102(1-3):1-18.

Tandon R, Nasrallah HA, Keshavan MS (2009) Schizophrenia, „just the facts“ 4. Clinical features and conceptualisation. *Schizophr Res*. 110(1-3):1-23.

Thara R (2004) Twenty-year course of schizophrenia: the Madras Longitudinal Study. *Can J Psychiatry* 49(8):564-9.

Torrey EF, Miller J, Rawlings R, Yolken RH (1997) Seasonality of births in schizophrenia and bipolar disorder: a review of the literature. *Schizophr Res*. 28(1): 1-38.

Tsai G, Yang P, Chung LC, Lange N, Coyle JT (1998) D-serine added to antipsychotics for the treatment of schizophrenia. *Biol Psychiatry* 44(11):1081-9.

Tsuang MT, Bar JL, Stone WS, Faraone SV (2004) Gene-environment interactions in mental disorders. *World Psychiatry* 3(2):73-83.

Tsuang MT, Stone WS, Faraone SV (2001) Genes, environment and schizophrenia. *Br J Psychiatry Suppl*. 40:s18-24.

Turetsky BI, Calkins ME, Light GA, Olincy A, Radant AD, Swerdlow NR (2007) Neurophysiological endophenotypes of schizophrenia: the viability of selected candidate measures. *Schizophr Bull*. 33(1):69-94.

Umbricht D, Krljes S (2005) Mismatch negativity in schizophrenia: a meta-analysis. *Schizophr Res.* 76(1):1-23.

van Os J, Marcelis M, Sham P, Jones P, Gilvarry K, Murray R (1997) Psychopathological syndromes and familial morbid risk of psychosis. *Br J Psychiatry* 170:241-6.

Veen ND, Selten JP, Schols D, Laan W, Hoek HW, van der Tweel I, Kahn RS (2004) Diagnostic stability in a Dutch psychosis incidence cohort. *Br J Psychiatry* 185:460-4.

Venter JC, Adams MD, Myers EW, Li PW, Mural RJ, Sutton GG, Smith HO, Yandell M, Evans CA, Holt RA, Gocayne JD, Amanatides P, Ballew RM, Huson DH, Wortman JR, Zhang Q, Kodira CD, Zheng XH, Chen L, Skupski M, Subramanian G, Thomas PD, Zhang J, Gabor Miklos GL, Nelson C, Broder S, Clark AG, Nadeau J, McKusick VA, Zinder N, Levine AJ, Roberts RJ, Simon M, Slayman C, Hunkapiller M, Bolanos R, Delcher A, Dew I, Fasulo D, Flanigan M, Florea L, Halpern A, Hannenhalli S, Kravitz S, Levy S, Mobarry C, Reinert K, Remington K, Abu-Threideh J, Beasley E, Biddick K, Bonazzi V, Brandon R, Cargill M, Chandramouliswaran I, Charlab R, Chaturvedi K, Deng Z, Di Francesco V, Dunn P, Eilbeck K, Evangelista C, Gabrielian AE, Gan W, Ge W, Gong F, Gu Z, Guan P, Heiman TJ, Higgins ME, Ji RR, Ke Z et al. (2001) The sequence of the human genome. *Science* 291(5507):1304-51.

Wellcome Trust Case Control Consortium (2007) Genome-wide association study of 14,000 cases of seven common diseases and 3,000 shared controls. *Nature* 447 (7145):661-78.

Williams J, Spurlock G, Holmans P, Mant R, Murphy K, Jones L, Cardno A, Asherson P, Blackwood D, Muir W, Meszaros K, Aschauer H, Mallet J, Laurent C, Pekkarinen P, Seppala J, Stefanis CN, Papadimitriou GN, Macciardi F, Verga M, Pato C, Azevedo H, Crocq MA, Gurling H, Kalsi G, Curtis D, McGuffin P, Owen MJ (1998) A meta-analysis and transmission disequilibrium study of association between the dopamine D3 receptor gene and schizophrenia. *Mol Psychiatry* 3(2):141-9.

Williams JB, Gibbon M, First MB, Spitzer RL, Davies M, Borus J, Howes MJ, Kane J, Pope HG Jr, Rounsaville B (1992) The Structured Clinical Interview for DSM-III-R (SCID). II. Multisite test-retest reliability. *Arch Gen Psychiatry* 49(8):630-6.

Williams NM, O'Donovan MC, Owen MJ (2006) Chromosome 22 deletion syndrome and schizophrenia. *Int Rev Neurobiol.* 73:1-27.

Wittchen H-U, Wunderlich U, Gruschwitz S, Zaudig M. (1997) SKID-I. Strukturiertes Klinisches Interview für DSM-IV. Achse I: Psychische Störungen. Göttingen: Hogrefe.

Wohl M, Gorwood P (2007) Paternal ages below or above 35 years old are associated with a different risk of schizophrenia in the offspring. *Eur Psychiatry* 22(1): 22-6.

Woods BT (1998) Is schizophrenia a progressive neurodevelopmental disorder? Toward a unitary pathogenetic mechanism. *Am J Psychiatry* 155(12):1661-70.

World Health Organisation (2001) The World health report 2001: Mental health: new understanding, new hope. Genf: World Health Organisation.

World Health Organisation (2005) ICD 10 International Statistical Classification of Diseases And Related Health Problems: Tenth Revision. Genf: World Health Organisation.

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

Zafra F, Aragón C, Giménez C (1997) Molecular biology of glycinergic neurotransmission. *Mol Neurobiol.* 14(3):117-42.

Zafra F, Aragón C, Olivares L, Danbolt NC, Giménez C, Storm-Mathisen J (1995) Glycine transporters are differentially expressed among CNS cells. *J Neurosci.* 15(5 Pt 2):3952-69.

Zobel A, Maier W (2004) Endophänotypen — ein neues Konzept zur biologischen Charakterisierung psychischer Störungen. *Nervenarzt* 75(3):205-14.

## 9. Danksagung

Herrn Prof. Dr. med. Falkai danke ich für die Möglichkeit, diese Arbeit an der von ihm geleiteten Klinik für Psychiatrie und Psychotherapie der Ludwig-Maximilians-Universität München zu realisieren.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. Rujescu und Frau Dr. biol. hum. Ina Giegling für die Betreuung der Dissertation in ihrer Forschungsgruppe Molekulare und klinische Neurobiologie sowie für die Vergabe des Themas und die unentbehrliche Hilfe bei der statistischen Auswertung der Ergebnisse.

Ausdrücklich möchte ich mich bei Frau Dr. biol. hum. Annette Hartmann bedanken. Ihre umfangreiche Unterstützung bei der Korrektur, insbesondere auch bei der Überarbeitung des Kapitels Material und Methoden, war von größter Wichtigkeit für das Gelingen der Arbeit.

Frau Dr. biol. hum. Heike Konnerth danke ich für ihre wertvolle Betreuung während der Monate der wissenschaftlichen Arbeit in der psychiatrischen Klinik. Ihr verdanke ich es, dass ich viel an Wissen und Erfahrung hinzugewinnen konnte. Diese Zeit hat mich persönlich sehr geprägt und in meinen Zielen bestärkt. Vielen Dank.

Mein persönlicher Dank geht an alle, die die Dissertation auf inhaltliche, sprachliche, grammatikalische und orthographische Ungereimtheiten hin gelesen haben, denn für die eigenen Fehler ist man nicht selten blind.

Ich danke meiner Familie.