

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

Direktor: Herr Prof. Dr. med. P. Falkai  
ehemaliger Direktor: Herr Prof. Dr. med. H.-J. Möller

## **Das Gen des metabotropen Glutamatrezeptors 8 und sein Einfluss auf die Schizophrenie.**

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

vorgelegt von  
Ilona Hartlmüller

aus  
Landshut

2013

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

|  |   |
|--|---|
| Berichterstatter                                   | Prof. Dr. Dan Rujescu                         |
| Mitberichterstatter                                | PD Dr. Stefan Kastenbauer                     |
| Mitbetreuung durch den promovierten<br>Mitarbeiter | PD Dr. rer. biol. hum I. Giegling             |
| Dekan  | Prof. Dr. med. Dr. h.c. M. Reiser, FACR, FRCR |
| Tag der mündlichen Prüfung                         | 19.12.13                                      |

Meinen Eltern gewidmet

# Inhaltsverzeichnis

|   |    |
|---|----|
| 1. Zusammenfassung.....   | 6  |
| 2. Einleitung.....  | 8  |
| 2.1 Schizophrenie.....  | 8  |
| 2.1.1 Klassifikation.....   | 9  |
| 2.1.2 Epidemiologie.....  | 12 |
| 2.1.3 Verlauf und Prognose.....   | 13 |
| 2.1.4 Ätiologie.....  | 14 |
| 2.1.4.1 Umweltfaktoren.....   | 15 |
| 2.1.4.2 Genetische Faktoren.....  | 16 |
| 2.1.4.3 Neurobiologische Faktoren.....  | 24 |
| 2.2 Metabotrope Glutamatrezeptoren.....   | 30 |
| 2.2.1 Struktur metabotroper Glutamatrezeptoren.....                                     | 31 |
| 2.2.2 Signaltransduktion der metabotropen Glutamatrezeptoren.....                       | 32 |
| 2.2.3 Klassifikation metabotroper Glutamatrezeptoren.....                               | 33 |
| 2.3 Metabotroper Glutamatrezeptor 8 .....   | 36 |
| 2.3.1 Genstruktur und Isoformen von GRM8.....   | 36 |
| 2.3.2 Struktur des GRM8.....  | 37 |
| 2.3.3 Lokalisation und Funktion des GRM8.....   | 38 |
| 2.3.4 Zusammenhang des metabotropen Glutamatrezeptors 8 mit der Schizophrenie.....      | 41 |
| 2.3.5 Überblick zu Referenzstudien zum GRM8 als Suszeptibilitätslocus der Schizophrenie | 43 |
| 2.4 Fragestellung.....  | 46 |
| 3. Material und Methoden.....   | 48 |
| 3.1 Studiendesign.....  | 48 |
| 3.1.1 Vorbedingungen der Studiendurchführung.....                                       | 48 |
| 3.1.2 Kontrollprobanden.....  | 48 |
| 3.1.3 Patienten .....   | 49 |
| 3.2 Laborverfahren .....  | 51 |
| 3.2.1 DNA-Extraktion.....   | 51 |
| 3.2.2 Bestimmung der DNA-Konzentration.....   | 53 |
| 3.2.3 Genotypisierung.....  | 55 |
| 3.2.3.1 Assaydesign.....  | 55 |
| 3.2.3.2 iPLEX-Verfahren.....  | 56 |
| 3.2.3.3 MALDI-TOF Massenspektrometer Analyse.....                                       | 60 |
| 3.3 Statistische Auswertung.....  | 61 |
| 4. Ergebnisse.....  | 62 |
| 4.1 Analyse des SNP rs6976644.....  | 62 |
| 4.2 Analyse des SNP rs7797614.....  | 63 |

|  |     |
|--|-----|
| 4.3 Analyse des SNP rs17149799 .....                   | 65  |
| 4.4 Analyse des SNP rs13225837.....                    | 67  |
| 4.5 Analyse des SNP rs7808001.....                     | 68  |
| 4.6 Zusammenfassung der Ergebnisse.....                | 70  |
| 5. Diskussion.....                                     | 71  |
| 5.1 Diskussion der Methoden.....                       | 71  |
| 5.2 Darstellung und Interpretation der Ergebnisse..... | 77  |
| 5.3 Ausblick.....                                      | 81  |
| 6. Abkürzungsverzeichnis.....                          | 83  |
| 7. Literaturverzeichnis.....                           | 86  |
| 8. Danksagung.....                                     | 108 |
| 9. Eidesstattliche Versicherung.....                   | 109 |

## **1. Zusammenfassung**

Die Schizophrenie ist eine der schwerwiegendsten neuropsychiatrischen Erkrankungen, die mit massiven Einschränkungen der Lebensqualität und der Leistungsfähigkeit der betroffenen Patienten einhergeht. Die Wahrscheinlichkeit an einer Schizophrenie zu erkranken liegt bei ca. 0,7% und ist unabhängig von Kultur und Ethnizität.

Die Ätiologie der Schizophrenie ist bis heute nicht genau bekannt. Es wird von einem Zusammenspiel genetischer Ursachen mit Umwelteinflüssen ausgegangen, wobei der genetische Anteil auf 80% geschätzt wird. Derzeit wird ein polygener Erbgang angenommen, bei welchem entweder viele genetische Veränderungen mit jeweils relativ geringem Einzeleffekt zusammen zu einem erhöhten Erkrankungsrisiko führen oder in ca. 1% der Fälle seltene, relativ große genomische Variationen mit einem moderat bis stark erhöhten Erkrankungsrisiko einhergehen. Mittels molekulargenetischer Untersuchungen konnten bereits einige Gene in unterschiedlichen Transmittersystemen ermittelt werden.

In der vorliegenden Arbeit wird das Gen des metabotropen Glutamatrezeptors 8, welches auf Chromosom 7q31.3-32.1 liegt, auf seinen Zusammenhang mit der Schizophrenie untersucht.

Glutamat stellt einen der wichtigsten exzitatorischen Neurotransmitter im ZNS dar, der unter anderem eine entscheidende Rolle bei der neuronalen Entwicklung, der Neuroplastizität und der Exzitotoxizität spielt. Aktuell ist die „Glutamathypothese“ neben der „Dopaminhypothese“ unter den neurobiologischen Entstehungsmodellen der Schizophrenie von großer Bedeutung. Die „Glutamathypothese“ nimmt eine hypoglutamaterge Stoffwechsellsage im ZNS schizophrener Patienten an, die wiederum das Resultat einer Vielzahl an Veränderungen, zum Beispiel Folge einer Alteration im metabotropen Glutamatrezeptor 8, sein kann.

Der metabotrope Glutamatrezeptor 8 fungiert vor allem als Autorezeptor an glutamatergen Neuronen und reguliert dadurch die Glutamatausschüttung. Somit ist die Beteiligung eines dysfunktionalen metabotropen Glutamatrezeptors 8 an einer hypoglutamatergen Stoffwechsellsage nicht unwahrscheinlich.

Bisher wurden zwei Assoziationsstudien zum GRM8-Gen im Zusammenhang mit der Schizophrenie durchgeführt. In einer der beiden Studien konnte ein Zusammenhang zwischen Polymorphismen des GRM8-Gens und der Schizophrenie in einer japanischen Stichprobe hergestellt werden. An einem britischen Kollektiv zeigte sich keine signifikante Assoziation des metabotropen Glutamatrezeptors 8 mit der Schizophrenie.

In der vorliegenden Fall-Kontroll-Studie wurden 5 Polymorphismen in den Introns 8 und 9 des

## 1. Zusammenfassung

GRM8-Gens untersucht. Dafür wurden Genanalysen von 500 schizophrenen, nicht-verwandten Patienten kaukasischer Abstammung mit denen von 605 gesunden, deutschstämmigen, nicht-verwandten Probanden verglichen. Die Untersuchungen von Allel- und Genotypenfrequenzen zeigten jedoch keine signifikante Assoziation zwischen den analysierten Markern und der Schizophrenie.

Damit repliziert diese Untersuchung insofern die bisherigen Studienergebnisse zum GRM8 und der Schizophrenie, als dass keine der 3 Studien in dem in der vorliegenden Arbeit analysierten Genbereich einen signifikanten Polymorphismus nachweisen konnte.

Allerdings wurde der in der japanischen Studie als signifikant identifizierte Genbereich im Intron 1 und 2 bisher in keiner anderen Studie untersucht.

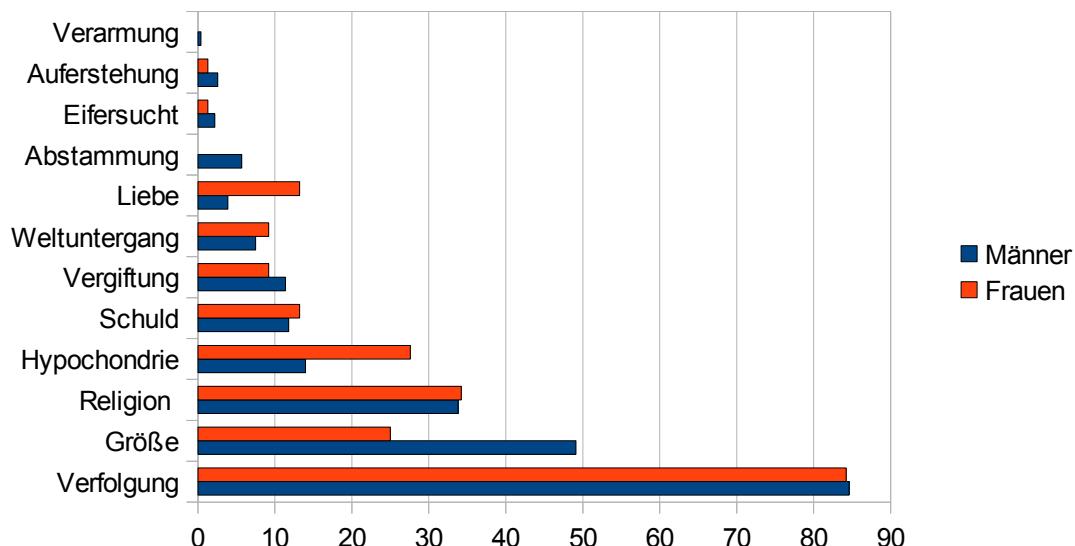
Es wäre wünschenswert in zukünftigen Studien den in der japanischen Stichprobe als signifikant identifizierten Bereich genauer zu untersuchen. Insbesondere sollten die signifikanten SNPs auch in anderen ethnischen Gruppe auf einen möglichen Zusammenhang mit der Schizophrenie bzw. einzelner Symptomenkomplexe der bezüglich der klinischen Präsentation sehr heterogenen Erkrankung getestet werden.

## 2. Einleitung

### 2.1 Schizophrenie

Die Schizophrenie gehört zur Gruppe der endogenen Psychosen und ist eine der schwerwiegendsten psychiatrischen Erkrankungen. Das klinische Bild der Schizophrenie umfasst eine Vielzahl von psychopathologischen Symptomen, wobei zwischen Positiv- und Negativsymptomen unterschieden werden kann (MacDonald et al., 2009).

Zu den Positivsymptomen werden Wahnvorstellungen (Übersicht zu den verschiedenen Wahnthemen vgl. Abbildung 1), Halluzinationen jeder Sinnesmodalität, Ich-Störungen, wie Gedankeneingebung, Gedankenentzug oder Gedankenausbreitung, positive formale Denkstörungen, zum Beispiel zerfahrenes Denken sowie desorganisiertes Verhalten, gezählt. Als Negativsymptome werden Alogie, Affektverflachung, Apathie, Anhedonie und Aufmerksamkeitsstörungen bezeichnet (Möller et al., 2009).



**Abbildung 1: Übersicht zu den häufigsten Wahnthemen im Vergleich Männer und Frauen**  
(Abbildung nach Stompe, 2008)

Diese im Bezug auf Verlauf, Symptomatik und Neuropathologie sehr heterogene Erkrankung resultiert nach heutiger Ansicht aus einer multifaktoriellen Ätiopathogenese, wobei die Genetik als entscheidender Faktor angesehen wird (Tandon et al., 2008).

### **2.1.1 Klassifikation**

Obwohl die Schizophrenie als Krankheit schon lange bekannt ist, wurden im Laufe des letzten Jahrhunderts die Beschreibungen und Definitionen einem häufigen Wandel unterzogen. Erstmals hat Emil Kraepelin 1899 (Kraepelin, 1899) die Symptome der Schizophrenie unter dem Begriff „Dementia praecox“ zusammengefasst, wobei er vor allen Dingen auf den chronisch progredienten Verlauf und die kognitiven Defizite, sowie Persönlichkeitsveränderungen aufmerksam machen wollte. Der Begriff der „Dementia praecox“ wurde schließlich von Eugen Bleuler 1911 erstmals durch den Begriff der Schizophrenie ersetzt. Dabei standen in Bleulers Beschreibung der Schizophrenie die „4 großen A“ (Assoziation, Affektivität, Ambivalenz, Autismus) als Hauptsymptome im Mittelpunkt (Bleuler, 1911). Er empfand damit insbesondere die Negativsymptomatik als pathognomonisch. Eine weitere wichtige Definition der Schizophrenie lieferte Kurt Schneider 1959 mit seiner Lehre von Symptomen ersten und zweiten Ranges (Schneider, 1957), die sich besonders auf die Positivsymptomatik bezogen.

In den beiden heute gängigen Klassifikationssystemen der WHO (ICD-10) und der American Psychiatric Association (DSM-IV) finden sich alle drei Ansätze in modifizierter Form wieder (Tandon et al., 2009).

Tabelle 1: diagnostische Kriterien von ICD-10 und DSM-IV

| <b>DSM IV (erschienen 1994)</b>  | <b>ICD 10 (erschienen 1992)</b>  |
|--|--|
| Symptome   |  |
| (A) Charakteristische Symptome: mind. 2 der folgenden Symptome müssen für einen Monat oder länger bestehen (bei Behandlung auch kürzer): <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Wahn</li> <li>2. Halluzinationen</li> <li>3. desorganisierte Sprechweise</li> <li>4. grob desorganisiertes oder katatonisches Verhalten</li> <li>5. negative Symptome, d.h flacher Affekt, Alogie oder Willensschwäche</li> </ol> (es ist nur ein A-Symptom nötig, wenn der Wahn bizarr ist oder die Halluzinationen aus kommentierenden oder dialogisierenden Stimmen besteht) | Mind. eines der Symptome 1.-4. oder zwei der Symptome 5.-9. müssen für einen Monat oder länger bestehen: <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Gedankenlautwerden, Gedankenentzug oder Gedankeneingebung, Gedankenausbreitung</li> <li>2. Kontrollwahn, Beeinflussungswahn, Gefühl des Gemachten, Wahnwahrnehmung</li> <li>3. kommentierende oder dialogisierende Stimmen</li> <li>4. bizarre Wahn</li> <li>5. anhaltende Halluzinationen</li> <li>6. formale Denkstörungen</li> <li>7. katatonisches Verhalten</li> <li>8. Negativsymptome</li> <li>9. signifikante und durchgängige Änderung im Verhalten</li> </ol> |
| (B) Soziale/Berufliche Leistungseinbußen   |  |

## 2. Einleitung

| <b>DSM IV (erschienen 1994)</b>   | <b>ICD 10 (erschienen 1992)</b>  |
|---|--|
| Dauer   |  |
| (C) Mind. 6 Monate, wobei mind. einen Monat floride Symptome (= A-Symptome) vorhanden sein müssen | Mind. ein Monat  |
| Ausschlusskriterien   | <p>(D) Ausschluss einer schizoaffektiven oder affektiven Störung</p> <p>(E) Ausschluss von Substanzeinfluss/medizinischen Krankheitsfaktoren</p> <p>(F) Beziehung zu tiefergreifender Entwicklungsstörung (z.B. Autismus): Diagnose Schizophrenie nur wenn einen Monat lang (bei Behandlung auch kürzer) ausgeprägter Wahn oder Halluzinationen vorhanden sind</p> <p>Ausschluss von</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• affektiven Symptomen, es sei denn sie traten erst nach den Symptomen einer Schizophrenie auf</li> <li>• eindeutigen neurologischen Erkrankungen</li> <li>• Intoxikation/ Entzugssyndromen</li> </ul> |

Bei genauerer Betrachtung der beiden Klassifikationssysteme fällt auf, dass die Kriterien des DSM-IV strenger gefasst sind (vgl Tabelle 1). Diese Aussage stützt sich vor allem auf das Kriterium der Dauer, wobei DSM-IV 6 Monate, ICD-10 dagegen nur einen Monat fordert. Außerdem sind nach der DSM-IV-Klassifikation Leistungseinbußen im sozialen oder beruflichen Bereich zur Diagnosestellung erforderlich (Cheniaux et al., 2009).

Daraus ergeben sich auch die bevorzugten Verwendungen, so wird das ICD-10 vermehrt im klinischen Bereich eingesetzt und das DSM-IV eignet sich aufgrund strengerer Kriterien besser im Bereich der Forschung (Mezzich, 2002).

Trotz der detaillierten Definition der Schizophrenie anhand der beiden Klassifikationssysteme obliegt die Diagnose letztendlich der subjektiven Einschätzung des Diagnosestellenden, woraus eine gewisse diagnostische Instabilität resultiert. Bromet und Kollegen untersuchten in einer Studie die Validität der psychiatrischen Diagnostik indem sie 470 Patienten mit Erstmanifestation einer Psychose im Alter zwischen 15 und 60 Jahren mittels mehrerer klinischer Rating-Systemen unter anderem des SCID-Moduls durch zwei von einander unabhängige Psychiater (bei Inkonsistenz der Diagnose wurde ein dritter Psychiater zu Rate gezogen) untersuchen ließen (Bromet et al., 2011). Klinische Interviews wurden zum Aufnahmezeitpunkt, nach 6 Monaten, nach zwei und zehn Jahren durchgeführt. Bezüglich der Schizophrenie zeigte sich eine 90%ige Erstdiagnosestabilität, welche als sehr hoch einzuschätzen ist, jedoch auch zeigt, dass eine Restinstabilität bezüglich der

## 2. Einleitung

Diagnose Schizophrenie bestehen bleibt.

Laut DSM-IV können der paranoide, der desorganisierte, der katatone, der undifferenzierte und der residuale Typ unterschieden werden.

Dabei kommt die paranoide Schizophrenie mit den Hauptsymptomen Wahn oder Halluzinationen am häufigsten vor (Tandon et al., 2009; Möller et al., 2009). Der desorganisierte Typ beginnt meist schon im Jugendalter, es stehen Störungen des Affekts, die sich vor allem in einem verflachten oder parathymen Affekt zeigen, formale Denkstörungen und grob desorganisiertes Verhalten im Vordergrund (Tandon et al., 2009; Möller et al., 2009). Einen relativ seltenen Schizophrenietyp stellt die Katatonie dar, welche durch psychomotorische Symptome, wie Haltungsstereotypien, katatonen Stupor, Erregungszustände oder Negativismus, gekennzeichnet ist. Die Diagnose der undifferenzierten Schizophrenie wird gestellt, wenn der Patient schizophrenerische Symptome aufweist, sich jedoch keinem Subtypen eindeutig zuordnen lässt (Tandon et al., 2009). Der residuale Subtyp wird dann diagnostiziert, wenn einmal eine floride Phase einer Schizophrenie vorgelegen hat und es zum Zeitpunkt der Diagnosestellung Hinweise dafür gibt, dass die Störung fortwährt. Diese Symptome können sich in anhaltender Negativsymptomatik oder in Form von abgeschwächten Symptomen des Kriteriums A, zum Beispiel eigenständlichen Vorstellungen oder ungewöhnlichen Wahrnehmungserlebnisse, zeigen (Tandon et al., 2009).

Ein alternativer Klassifikationsansatz zu den klinischen, pathophysiologischen Phänotypen stellt der Endophänotypenansatz dar. Der klassische Phänotyp der Schizophrenie ist durch ausgeprägte sowohl klinische als auch ätiologische Heterogenität gekennzeichnet, welche in molekulargenetischen Studien für divergierende Studienergebnisse verantwortlich sein kann. Aus diesem Grund gewinnt die Untersuchung von Endophänotypen in der Schizophrenieforschung zunehmend an Bedeutung, da davon ausgegangen wird, dass diese messbare neurobiologische Krankheitskorrelate repräsentieren und sich durch eine einfachere genetische Determination auszeichnen. Dabei wird angenommen, dass Endophänotypen genauso wie die Schizophrenie das Endprodukt einer multiloculären genetischen Ätiologie darstellen, wobei aber ursächlich eine geringere Anzahl an Genen mit einer höheren Penetranz und einem geringeren umweltbedingtem Einfluss postuliert werden (Chan et al., 2008; Braff et al., 2008). Endophänotypen der Schizophrenie zeichen sich durch eine Assoziation zur Schizophrenie, Heritabilität, Krankheitsphasen-Unabhängigkeit und das Vorkommen in nicht-erkrankten Familienmitgliedern aus. Bei der Schizophrenieforschung werden unter anderem neurokognitive, neuroanatomische und neurophysiologische Endophänotypen untersucht (Braff et al., 2007).

### **2.1.2 Epidemiologie**

Die Wahrscheinlichkeit im Laufe des Lebens an Schizophrenie zu erkranken liegt bei circa 0,7% (Saha et al., 2005; McGrath et al., 2008), wobei die durchschnittliche jährliche Neuerkrankungsrate bei 15,2 von 100000 (McGrath et al., 2008, Saha et al., 2008) liegt und die Punktprävalenz im Mittelwert mit 0,46% angegeben wird (Saha et al., 2005).

Die Schizophrenie ist bei Männern und Frauen gleich prävalent (Saha et al., 2005), bei der Inzidenz zeigen sich jedoch signifikante Unterschiede. So stellten McGrath und Kollegen in systematischen Reviews über die Inzidenz der Schizophrenie fest, dass Männer 1,4mal häufiger neu erkranken (McGrath et al., 2004, McGrath et al., 2006, McGrath et al., 2008). Dieser Unterschied zwischen Inzidenz und Prävalenz könnte an einer höheren krankheitsbedingten Mortalität oder an einer günstigeren Prognose bei Männern liegen (Tandon et al., 2008). Eine höhere Mortalität bei schizophrenen Männern im Vergleich zu schizophrenen Frauen konnte jedoch in einem systematischen Review nicht bestätigt werden (McGrath et al., 2008). Auch der Erklärungsversuch durch die günstigere Prognose bei Männern erscheint unter dem Gesichtspunkt, dass das weibliche Geschlecht ein Prädiktor für besseres Outcome ist, unwahrscheinlich (Grossman et al., 2008).

Als allgemein anerkannter Unterschied zwischen Männern und Frauen im Bezug auf die Schizophrenie gilt, dass Männer im Schnitt 3-5 Jahre früher erkranken als Frauen (MacDonald et al., 2009). Das Haupterkrankungsalter liegt zwischen dem 15. und dem 30. Lebensjahr, wobei bei Frauen nach der Menopause die Erkrankungswahrscheinlichkeit noch einmal zunimmt (Tandon et al., 2008).

Des Weiteren scheinen Migranten häufiger an Schizophrenie zu erkranken (McGrath, 2004; Saha, 2005; McGrath et al. 2008; van Os et al., 2009). Eine höhere Prävalenz bei gleicher Inzidenz wurde in Industrielanden und in der gesellschaftlichen Unterschicht gefunden, wobei eine mögliche Erklärung für die höhere Prävalenz in wirtschaftlich schwachen Bevölkerungsschichten die Sozial-Drift-Theorie darstellt (Tandon et al., 2008).

Außerdem fiel eine signifikant höhere Inzidenz bei Personen, die in der Stadt geboren und aufgewachsen sind auf, welcher durch Großstadt assoziierte Risikofaktoren, wie höherer Cannabiskonsum, größerer sozialer Stress, höhere Belastung durch Umweltgifte oder häufiger vorkommender Vitamin-D-Mangel, zu erklären sein könnte (Tandon et al., 2008; van Os et al., 2009).

### **2.1.3 Verlauf und Prognose**

#### Verlauf

Die Schizophrenie zeigt sehr unterschiedliche Verläufe und Ausgänge, welche von episodischen Verläufen mit Vollremission bis zu chronischen Verläufen reichen.

Der Verlauf lässt sich grob in folgende Stadien einteilen (Tandon et al., 2009):

Meist sind bereits vor Erkrankungsbeginn diskrete unspezifische Veränderungen zu erkennen. Diese prämorbid Phase ist vor allem gekennzeichnet durch Beeinträchtigungen der Kognition, des Antriebs und des Sozialverhaltens.

Die eigentliche Erkrankung beginnt mit der Prodromalphase, die im Schnitt zwischen wenigen Monaten und fünf Jahren dauert. In diesem Stadium erleben die Patienten meist einen Leistungsknick, außerdem kommen häufig affektive Symptome, Negativsymptome und/oder kognitive Defizite vor. Zum Teil treten schon Positivsymptome in abgeschwächter Form auf.

Die Prodromalphase geht dann akut oder schleichend in die floride psychotische Phase über. Dabei stehen Schizophrenie-typische Symptome, zum Beispiel in Form von Wahnvorstellungen, Halluzinationen, formalen Denkstörungen oder desorganisiertem Verhalten, im Vordergrund. Die Dauer der akuten Phase variiert stark und hängt hauptsächlich von der Behandlung ab.

Nach Abklingen der Positivsymptomatik schließt sich die Residualphase an, welche besonders durch Negativsymptomatik, wie Antriebsmangel, Alogie und Affektverflachung, und kognitive Defizite, gekennzeichnet ist.

#### Prognose

In Langzeitstudien zeigte sich, dass ungefähr 50% der Patienten eine gute Prognose haben (Harrison et all, 2001) und circa 25% eine Vollremission erreichen (Tandon et al., 2009). Allerdings bleibt ein Drittel der Patienten symptomatisch (van Os et al., 2009). Als günstige prognostische Faktoren gelten ein akuter Krankheitsbeginn, gute prämorbid soziale und kognitive Fähigkeiten, weibliches Geschlecht, spätes Erkrankungsalter und das Fehlen eines Substanzabusus (Tandon et al., 2009; Flyckt et al., 2006).

Außerdem wird eine kurze Dauer einer unbehandelten Psychose in vielen Studien als positiver Faktor für einen günstigen Verlauf der Erkrankung diskutiert (Perkins et al., 2005; Barnes et al., 2008; Farooq et al., 2009). Dieser Aspekt ist aufgrund seiner Beeinflussbarkeit und der Konsequenzen für die Therapie sehr interessant, da durch einen frühen Behandlungsbeginn die Prognose der Erkrankung verbessert werden könnte.

#### Mortalität

Die nach Lebensalter genormte Mortalitätsrate schizophrener Patienten ist mit 2,6 bezogen auf alle

## 2. Einleitung

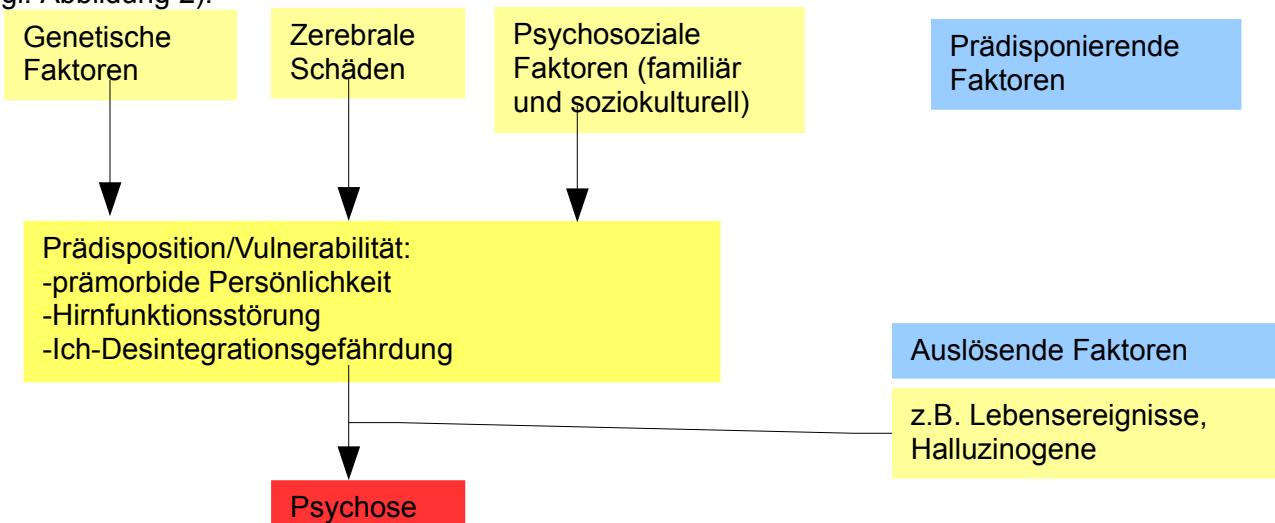
Todesursachen im Vergleich zur Allgemeinbevölkerung erhöht. Dabei stellt die Mortalitätsrate für Suizide die höchste dar (12,9) (McGrath et al., 2008). Ungefähr 5% der schizophrenen Patienten begehen Selbstmord, wobei junge, arbeitslose Männer mit hohem prämorbidem Intelligenzquotienten am gefährdetsten sind. Als krankheitsassoziierte Risikofaktoren für Suizidalität gelten Depressionen, Suizidversuche in der Vergangenheit und eine floride Positivsymptomatik (Hor et al., 2010). Insgesamt betrachtet sterben Menschen, die an einer Schizophrenie erkrankt sind, ungefähr 12-15 Jahre früher als der Durchschnitt der Bevölkerung (van Os et al., 2009).

Im Verlauf der letzten Jahrzehnte konnte ein Anstieg der Mortalitätsraten verzeichnet werden (1970: 1,8; 1980: 3,0; 1990: 3,2) (McGrath et al., 2008). Als möglicher Grund dafür wird unter anderem die Einführung der atypischen Neuroleptika und die damit häufiger verbundene Entwicklung eines metabolischen Syndroms und der damit einhergehenden kardiovaskulären Erkrankungen angeführt (McGrath et al., 2008).

### 2.1.4 Ätiologie

Die Ätiopathogenese der Schizophrenie ist bis heute trotz intensiver Forschung nur ansatzweise geklärt (Tandon et al., 2008). Es wird von einer multifaktoriellen Entstehung der Erkrankung ausgegangen, bei welcher genetische, neurobiologische und Umweltfaktoren zusammenwirken.

Das Vulnerabilitäts-Stress-Modell stellt eine der wichtigsten Hypothesen dar: Es wird angenommen, dass durch bestimmte Faktoren eine Vulnerabilität für die Entwicklung einer Schizophrenie besteht. Durch verschiedene Auslöser, wie zum Beispiel Cannabiskonsum oder kritische Lebensereignisse, kann sich daraus eine akute Psychose entwickeln (Möller et al., 2009; vgl. Abbildung 2).



**Abbildung 2: Vulnerabilitäts-Stress-Modell der Schizophrenie** (Abbildung verändert nach Möller et al., 2009)

#### **2.1.4.1 Umweltfaktoren**

Dass es bei der Entstehung der Schizophrenie neben genetischen Ursachen auch andere ätiologische Faktoren geben muss, zeigt sich in Zwillingsstudien. Dabei ergab sich für den monozygoten Zwilling eines schizophrenen Patienten nur ein 50%iges Risiko ebenfalls zu erkranken, trotz nahezu identischen Erbguts (Cardno et al., 2000).

Heute werden die Einflüsse vieler unterschiedlicher Umweltfaktoren diskutiert.

Bereits während der Schwangerschaft sollen zum Beispiel Infektionen der Mutter oder eine Unterernährung vor allem während des ersten und frühen zweiten Trimenons das Risiko des Kindes, später an einer Schizophrenie zu erkranken, erhöhen (Penner et al., 2007; Meyer et al., 2007). Der genaue neurobiologische Mechanismus ist unbekannt, es wird vermutet, dass Infektionen durch Zytokinwirkung und abnorme Immunreaktionen negative Einflüsse auf die fetale Gehirnentwicklung haben könnten (Ashdown et al., 2006).

Des weiteren können Geburtskomplikationen das Erkrankungsrisiko verdoppeln, dabei wird am häufigsten die fetale Hypoxie als kausaler Mechanismus angeführt (Byrne et al., 2007).

Auch ein hohes Alter des Vaters zum Konzeptionszeitpunkt wird unter dem Aspekt der beeinträchtigten Spermatogenese mit einer höheren Wahrscheinlichkeit von *de novo*-Mutationen und abnormen epigenetischen Regulationen diskutiert (Tandon et al., 2008; van Os et al., 2009).

Kontrovers werden Kindheitstraumata als Risikofaktor diskutiert. Verursachende Mechanismen werden im Mausmodell gesucht. Bei jungen Mäusen kann eine durch Traumata ausgelöste Dopaminhyperaktivität im mesolimbischen System beobachtet werden, die zu einer Sensibilisierung des dopaminergen Systems führen könnte (Morgan et al., 2007). Auch bei Menschen konnten ähnliche Reaktionen nachgewiesen werden, so zeigten sich bei Frauen und Mädchen mit sexuellem Missbrauch häufiger neben Hypothalamus-Hypophysen-Nebenieren-Fehlregulationen auch ein erhöhter Dopaminstoffwechsel (Morgan et al., 2007). In einem aktuellen Review werden Kindheitstraumata als Risikofaktor in Kombination mit genetischer Prädisposition und zusätzlichen Umweltfaktoren gesehen, wobei insbesondere aufgrund multipler *Confounder* zum Beispiel erhöhtem Substanzabusus oder häufiger Migration jedoch zur genauen Einschätzung der Risikoerhöhung weitere Studien nötig sind (Sideli et al., 2012).

Als weiterer häufig diskutierter, möglicher Risikofaktor gilt der Missbrauch bzw. die Abhängigkeit von psychotropen Substanzen, wobei Cannabis eine führende Rolle spielen soll. Dabei gibt es die Annahme, dass bei prädisponierten Personen durch den Konsum von Cannabis leichter eine vorübergehende Psychose ausgelöst werden kann als bei gesunden Kontrollprobanden (van Os et

## 2. Einleitung

al., 2009). Damit scheint Cannabis eher Auslöser als Ursache der Schizophrenie zu sein. Dafür finden sich auch Belege in neueren Studien, welche den Zusammenhang zwischen verschiedenen Genotypen und Umweltstressoren untersuchen. In diesen Studien konnte eine Assoziation zwischen einem bestimmten Genotyp des Catecholamin-O-Methyltransferase-Gens (COMT) in Verbindung mit Cannabiskonsum und der Entwicklung einer Psychose entdeckt werden. Damit konnte eine genetische Vulnerabilität eines Polymorphismus im COMT-Gen nachgewiesen werden, die durch Cannabiskonsum zu einer Psychose führen kann (Caspi et al., 2005; Henquet et al., 2009).

### 2.1.4.2 Genetische Faktoren

Die Hypothese, dass bei der Ätiopathogenese der Schizophrenie genetische Faktoren eine wesentliche Rolle spielen könnten, wurde schon 1946 von Franz Josef Kallman aufgestellt (Kallman, 1946). In den 1960er Jahren wurde mittels Zwillings- und Adoptionsstudien begonnen, diese Annahme zu untermauern (Tandon et al., 2008).

Heute wird eine Heritabilität der Schizophrenie von bis zu 80% angenommen, wobei von einem polygenen Erbgang ausgegangen wird, bei welchem entweder viele genetische Veränderungen mit jeweils relativ geringem Effekt zusammen zu einem erhöhten Erkrankungsrisiko führen oder in ca. 1% der Fälle seltene, relativ große genomische Veränderungen mit moderat bis stark erhöhtem Erkrankungsrisiko einhergehen (Owen et al., 2009). Bei den seltenen Veränderungen handelt es sich meist um *Copy Number Variations* (CNV), welche als Duplikation oder als Deletion auftreten können und meist eine Länge von 1000 bis 3 Millionen Basen aufweisen (Redon et al., 2006).

Im Zuge dieses Entstehungsmodells der Schizophrenie werden seit circa 20 Jahren funktionelle und positionelle Kandidatengene mit unterschiedlichem Erfolg auf ihren Zusammenhang mit der Erkrankung geprüft (Lang et al., 2007; Tandon et al., 2008) und seit kurzem wird das Genom von Erkrankten auch auf CNVs überprüft.

Ein weiterer Ansatz zur Klärung der Pathophysiologie der Schizophrenie stellen epigenetische Studien dar. Dabei wird nicht nur von einer Vererbung der Erkrankung auf DNA-Ebene ausgegangen, sondern auch auf Basis der Regulation der Genexpression. Epigenetische Mechanismen können vererbt werden, sich aber auch durch Umwelteinflüsse verändern. Dadurch ließe sich das Zusammenspiel von Umweltfaktoren und Genen erklären (Crow, 2007; Roth et al., 2009).

Im folgenden werden die unterschiedlichen genetischen Studienmodelle mit jeweils wichtigen Ergebnissen vorgestellt:

## 2. Einleitung

### Familien-, Zwillings- und Adoptionsstudien

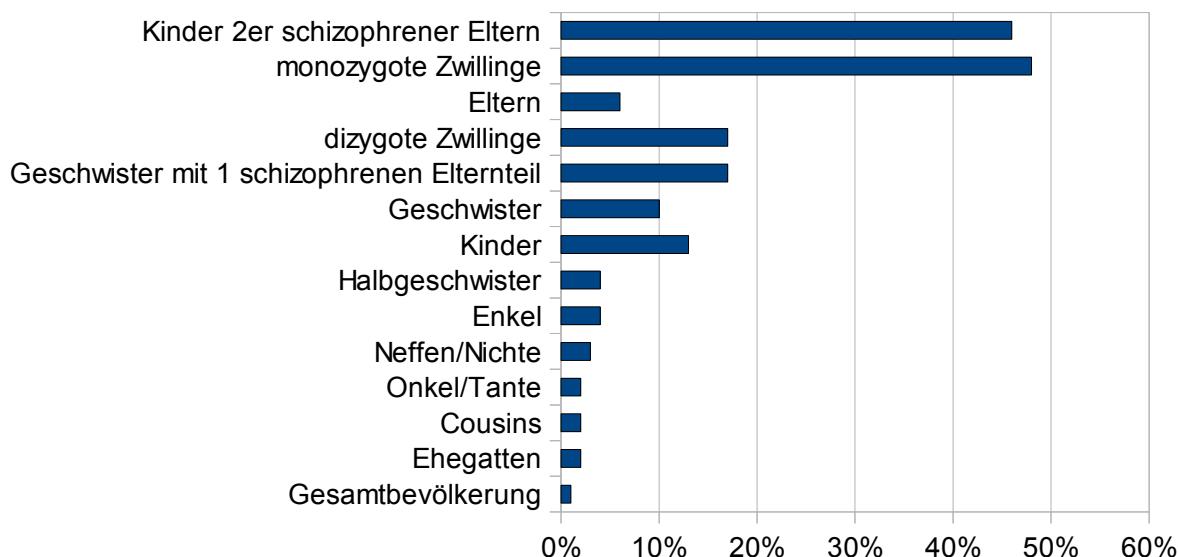
In Adoptionsstudien wurde eine genetische Ursache der Schizophrenie belegt, indem Kinder von erkrankten Eltern, die von gesunden Adoptiveltern aufgezogen wurden, mit Kindern gesunder Eltern, die bei erkrankten Adoptiveltern aufgewachsen sind, hinsichtlich der Wahrscheinlichkeit eine Schizophrenie zu entwickeln, verglichen werden. Die Ergebnisse dieser Studien zeigten, dass das erhöhte Risiko an einer Schizophrenie zu erkennen ist mit schizophrenen leiblichen Eltern, nicht mit erkrankten Adoptiveltern zusammenhängt (Kety et al., 1994).

Bei Zwillingsstudien werden monozygote Zwillinge, welche genetisch zu fast 100% identisch sind, mit dizygoten Zwillingen, die genetisch zu 50% konkordant sind, verglichen. Dabei wurde für einen monozygoten Zwilling mit schizophremem Geschwister ein 50-70%iges Erkrankungsrisiko festgestellt. Für dizygote Zwillinge ergab sich ein ähnliches Risiko, wie für Erstgradangehörige, von 9-18% (Sullivan et al., 2003; Schosser et al., 2008).

Aus Familienanalysen konnte für Zweitgradangehörige ein 3-6%iges, für Drittgradangehörige ein 2-3%iges und für Kinder von zwei schizophrenen Eltern ein 40-60%iges Erkrankungsrisiko ermittelt werden (Sullivan et al., 2003; Schosser et al., 2008; vgl. Abbildung 3).

Durch Familien-, Zwillings- und Adoptionsstudien konnte eine entscheidende Rolle der Genetik in der Ätiopathogenese der Schizophrenie nachgewiesen werden. Allerdings lassen sich durch diese Studien keine einzelnen, verursachenden Gene identifizieren, die auf die Pathophysiologie der Erkrankung schließen lassen.

Eine wichtige Erkenntnis aus diesen Studien stellt der signifikante Einfluss von nichtgenetischen Faktoren dar.



**Abbildung 3: Lifetime Risiko für Schizophrenie (Abbildung nach Schosser et al., 2006)**

## 2. Einleitung

### Kopplungsstudien

In Kopplungsstudien werden Familien mit einem erkrankten Indexfall untersucht. Es wird versucht über Markerallele die mit der Schizophrenie gekoppelten Genloci zu identifizieren. Dafür wird das Genom in Abschnitte eingeteilt, die jeweils durch bestimmte Markerallele auf die Assoziation mit einem bestimmten Phänotyp getestet werden. Es wird dabei postuliert, dass die Vererbung von einer, den Phänotypen prägenden DNA-Sequenz zusammen mit dem Markerallel umso wahrscheinlicher ist, je näher die beiden Genomabschnitte beieinander liegen (Böddeker et al., 2000).

So kann durch die Bestimmung von vergleichsweise wenigen Markern das gesamte Genom auf signifikante genetische Veränderungen von erkrankten Probanden gescreent werden.

Einen weiteren Vorteil von Kopplungsstudien stellt die Untersuchung von Familien dar, dadurch können Verfälschungen durch zu große genetische Heterogenität vermieden werden.

Als Nachteil von Kopplungsstudien werden relativ geringe Fallzahlen aufgrund von Rekrutierungsschwierigkeiten von multipel betroffenen Familien angesehen. Außerdem können mittels dieses Studiendesigns keine spezifischen mit der Krankheit assoziierten Gene identifiziert werden, sondern nur betroffene Regionen im Genom. Auch ist es schwieriger mit Kopplungsstudien Gene mit relativ geringem Effekt zu detektieren (Tandon et al., 2008).

Bei den ersten Kopplungsstudien wurde von der Annahme ausgegangen, dass einige Gene mit einer Hauptwirkung bei der Entstehung der Schizophrenie identifizierbar seien. So stellten Sherrington et al. (1988) einen mit der Schizophrenie assoziierten Genlocus auf Chromosom 5 fest. In darauffolgenden Studien konnte dies allerdings nicht repliziert werden (Crow et al., 2007).

Das Problem der geringen Replizierbarkeit der Ergebnisse war auch in den vielen folgenden genomweiten Kopplungsstudien gegeben (Lewis et al., 2003).

In großangelegten Metaanalysen konnten jedoch größere Übereinstimmungen in den Ergebnissen der bisherigen Kopplungsstudien gezeigt werden, als erwartet wurde (Lewis et al., 2003). Allerdings divergieren letztendlich auch die Daten der 3 Metaanalysen bezüglich ihrer Ergebnisse (Crow et al., 2007; siehe Tabelle 2, Seite 19). So kamen die beiden Metaanalysen von Badner und Gershon (2002) und Lewis et al. (2003), obwohl sie 500 gleiche Stammbäume von 681 (Badner und Gershon) und 1208 Familien (Lewis et al.) in die Studie einschlossen, nur bei 2 von 10 Genomabschnitten (8p und 22q; siehe Tabelle 2, Seite 19) zu übereinstimmenden Ergebnissen.

## 2. Einleitung

Tabelle 2: Übersicht zu Metaanalysen von genomweiten Kopplungsstudien

| <b>Studie</b>   | <b>Anzahl der Familien</b> | <b>Anzahl der Probanden</b> | <b>Signifikante Ergebnisse</b>   |
|---|----------------------------|-----------------------------|--|
| Badner et al. (2002)  | 681                        | 1929                        | <b>8p, 13q, 22q</b>  |
| Lewis et al. (2003)   | 1208                       | 2945                        | <b>2q, 5q, 3p, 11q, 6p, 1q, 22q, 8p, 20q, 14p, 16q, 18q, 10p, 15q, 6q, 17q</b> |
| Ng et al. (2009)<br>alle Probanden<br>Probanden europäischer Herkunft | 3255<br>1813               | 7413<br>4094                | <b>5q, 2q, Chr1, 3q, 4q, 8p, 10q, 8p</b>                                       |

### Assoziationsstudien

Bei Assoziationsstudien handelt es sich um ein Fall-Kontrollstudiendesign, welches die Häufigkeit von Polymorphismen bei schizophrenen Patienten im Vergleich zu Kontrollprobanden untersucht. Dafür werden meist SNPs (*single nucleotide polymorphism*) in Kandidatengenen, von welchen angenommen wird, dass sie bei der Krankheitsentwicklung eine Rolle spielen, analysiert (Böddeker et al., 2000).

Der entscheidende Vorteil von Assoziationsstudien ist die Möglichkeit auch Gene mit geringem Effekt auf die Entstehung einer Erkrankung nachweisen zu können. Allerdings besteht ein erhöhtes Risiko von falsch positiven und falsch negativen Ergebnissen, welche zum Beispiel durch die Untersuchung einer zu heterogenen Stichprobe bedingt sein können (Tandon et al., 2008). Dabei basieren solche Ergebnisverfälschungen besonders auf Populationsstratifikationseffekten (Cardon et al., 2003), aber auch eine ungleiche Geschlechterverteilung kann in manchen Fällen zu falsch positiven bzw. falsch negativen Ergebnissen führen. In einigen genetischen Studien zur Schizophrenie konnte zum Beispiel eine Assoziation von bestimmten Polymorphismen nur bei Frauen nachgewiesen werden (Shifman et al., 2002 und 2008; Chen et al., 2006 und 2007; Tan et al., 2005).

Um aussagekräftige Assoziationsstudien durchzuführen, ist auf eine homogene Stichprobe, vor allem bezüglich der Ethnizität (Cardon et al., 2003), klar definierte Ein- und Ausschlusskriterien (Böddeker et al., 2000), dies ist besonders bei heterogenen Erkrankungen wie der Schizophrenie wichtig, und auf eine ausreichend große Anzahl von Studienteilnehmern (Shi et al., 2008) zu achten.

In den letzten Jahren wurden 1727 Assoziationsstudien zu insgesamt 1008 Genen und 8788 Polymorphismen publiziert (Schizophreniaforum, 2011). Dabei trat wiederholt das Problem, der fehlenden Replizierbarkeit von positiven Ergebnissen, auf. Als mögliche Ursachen für die

## 2. Einleitung

inkonsistente Datenlage werden unter anderem die klinische und genetische Heterogenität oder zu geringe Fallzahlen und damit eine zu geringe statistische Power gesehen (Shi et al., 2008). Aus diesem Grund wird versucht durch systematische Auswertungen dieser Vielzahl an oft widersprüchlichen Daten in Metaanalysen die genetischen Effekte der einzelnen Polymorphismen besser einschätzen zu können (Shi et al., 2008). Bei den inzwischen über 100 Metaanalysen zeigten 24 genetische Polymorphismen in 16 verschiedenen Genen eine signifikante Assoziation (Allen et al., 2008; vgl. Tabelle 3).

Tabelle 3: Darstellung der Ergebnisse der Metaanalyse von Allen et al., 2008

| <b>Pathobiologisches Modell der Schizophrenie</b> | <b>Gen</b>                    | <b>Polymorphismus</b>              | <b>p-Wert</b> |
|---|-------------------------------|------------------------------------|---------------|
| Dopaminhypothese                                  | <b>COMT</b> (22q11.21-q11.23) | rs165599                           | 0,019         |
|   |                               | rs737865                           | 0,039         |
|   | <b>DAO</b> (12q24)            | rs4623951                          | 0,026         |
|   | <b>DRD1</b> (5q35.1)          | rs4532 (DRD_48A/G)                 | 0,037         |
|   | <b>DRD2</b> (11q23)           | rs1801028 (S311C)                  | 0,013         |
|   |                               | rs6277 (P319P)                     | <0,00004      |
| Glutamathypothese                                 | <b>DTNBP1</b> (6p22)          | rs1800955 (521T/C)                 | 0,003         |
|   |                               | 120-bp TR                          | 0,005         |
|   | <b>GRIN2B</b> (12p12)         | rs1011313 (p1325)                  | 0,003         |
|   |                               | rs7301328 (366G/C)                 | 0,034         |
|   |                               | rs1019385 (200T/G)                 | 0,003         |
| GABA-Hypothese                                    | <b>GABRB2</b> (5q34)          | rs1816072                          | 0,002         |
|   |                               | rs1816071                          | 0,002         |
|   |                               | rs194072                           | 0,048         |
|   |                               | rs6556547                          | 0,022         |
| Serotoninhypothese                                | <b>SLC6A4</b> (17q11.2)       | 5-HTVNTR                           | 0,036         |
|   | <b>TPH1</b> (11p15.3-14)      | rs1800532 (218A/C)                 | <0,00008      |
| Sonstige  | <b>APOE</b> (19q13.2)         | APOE ( $\epsilon$ 2/3/4) E4 vs. E3 | 0,043         |
|   | <b>HP</b> (16q22.1)           | Hp1/2                              | 0,016         |
|   | <b>IL1B</b> (2q14)            | rs16944 (C511T)                    | 0,006         |
|   | <b>MTHTR</b> (1p36.3)         | rs1801133 (C677T)                  | 0,005         |
|   |                               | rs1801131 (A1298C)                 | 0,002         |
|   | <b>PLXNA2</b> (1q32.2)        | rs752016                           | 0,037         |
|   | <b>TP53</b> (17p13.1)         | rs1042522                          | 0,029         |

### Genomweite Assoziationsstudien (GWAS)

Genomweite Assoziationsstudien (GWAS) stellen eine Sonderform der Assoziationsstudien dar,

## 2. Einleitung

welche sich durch einen hypothesenfreien Ansatz auszeichnen. Somit müssen im Vorfeld keine Gene identifiziert werden, die in funktionellem oder positionellem Zusammenhang mit der Erkrankung stehen könnten. Das hypothesenfreie Testen erscheint gerade bei der genetischen Ursachenforschung von psychiatrischen Erkrankungen als sehr sinnvoll, da die genaue Pathophysiologie unbekannt ist (Psychiatric GWAS Consortium Coordinating Committee, 2009).

GWAS wurden vor allem durch die Fortschritte auf dem Feld der Genchip-Technologie ermöglicht, welche die zeitgleiche Genotypisierung mehrerer hunderttausender SNPs einer Testperson zulassen. Um den Genotypisierungsaufwand und die Kosten dieser Studien zu senken, wurden neben GWAS mit individueller Genotypisierung auch Analysen basierend auf gepoolter DNA durchgeführt. Dabei wird ein Fall- und ein Kontroll-Pool aus äquimolaren Anteilen der individuellen DNA gebildet, welche auf Unterschiede der Allelfrequenzen untersucht werden.

GWAS mit gepoolter DNA wurden zum Beispiel von Kirov et al. (2008) und Shifman et al. (2008) durchgeführt (vgl. Tabelle 4, Seite 23). Dabei erreichten Kirov und Kollegen mit ihrem besten SNP im Gen CCDC60 kein genomweit-signifikantes Ergebnis, als eine mögliche Ursache wird von den Autoren eine zu geringe statistische Power ihrer Stichprobe bestehend aus 574 Trios angeführt (Kirov et al., 2008). Der Frauen-spezifisch signifikante Marker in der Studie von Shifman und Kollegen im RELN-Gen hielt der Bonferroni-Korrektur für multiples Testen nicht stand (Shifman et al., 2008).

Die erste GWAS mit individueller Genotypisierung zur Schizophrenie wurde 2007 von Lencz und Kollegen veröffentlicht, der Marker mit der stärksten Assoziation war ein SNP im Gen CSF2RA mit einem p-Wert von  $3,7 \times 10^{-7}$  (vgl. Tabelle 4, Seite 23).

Die 2008 publizierte CATIE-Studie erbrachte kein genomweit signifikantes Ergebnis, die Autoren führten dies insbesondere auf eine zu geringe Fallzahl zurück, zu bemerken ist jedoch auch, dass die Studie auf einer ethnisch heterogenen Stichprobe basiert (Sullivan et al., 2008; vgl. Tabelle 4, Seite 23).

Das Ergebnis der von O'Donovan und Kollegen (2008) vorgelegten Arbeit ist insofern interessant, als dass deren erfolgversprechendster Marker im ZNF804A-Gen (p-Wert  $1,95 \times 10^{-7}$ ) auch eine Assoziation zur Bipolaren Störung aufwies (vgl. Tabelle 4, Seite 23).

Mitte 2009 gelang durch die Kollaboration drei großer Konsortien (*International Schizophrenia Consortium* (ISG), *Molecular Genetics of Schizophrenia* (MGS) und *SGENE Consortium*) erstmals der Nachweis einer genomweiten Assoziation eines Markers in der MHC-Region (Shi et al. (MGS), 2009; Stefansson et al. (SGENE), 2009; Purcell et al. (ISC), 2009; vgl. Tabelle 4, Seite 23). Ergebnisse mit genomweiter Signifikanz konnten dabei erst durch die Untersuchung der

## 2. Einleitung

zusammengelegten Stichproben-Daten erzielt werden. Dies verdeutlicht, dass bei den angenommenen Effektstärken der Risikogene für die Entwicklung einer Schizophrenie von kleiner 1,2 sehr große Stichproben nötig sind, um signifikante Ergebnisse zu erreichen (Bergen et al., 2012).

Ripke und Kollegen initiierten 2011 eine Mega-Analyse indem sie zunächst die Daten von 17 GWAS in ihre Studie einschlossen (9394 Fälle und 12462 Kontrollen) und im Anschluss daran führten sie an 19 GWAS-Stichproben eine Replikationsanalyse (8442 Fälle und 21397 Kontrollen) durch (Ripke et al., 2011, vgl. Tabelle 4, Seite 23). Die Studienteilnehmer waren alle europäischer Herkunft. Sie konnten für 7 Loci eine genomweite Assoziation zur Schizophrenie nachweisen, davon wurden 5 Loci erstmals mit der Schizophrenie in Zusammenhang gebracht. Das beste Ergebnis unter den 5 neuen Loci erzielte das Gen MIR137 ( $p$ -Wert  $1,6 \times 10^{-11}$ ), ein bekannter Regulator der neuronalen Entwicklung (Ripke et al., 2011). Ein weiteres Ergebnis der Studie stellt der erneute Nachweis von genetischen Gemeinsamkeiten der Schizophrenie und der Bipolaren Störung dar (Ripke et al., 2011).

2012 wurde von Fanous und Kollegen erstmals eine genomweite Assoziationsstudie zu Symptomenkomplexen der Schizophrenie durchgeführt. Dabei wurden Berechnungen zu positiven, negativen/desorganisierten und affektiven Symptomen an der MGS- und PCG-Stichprobe durchgeführt. Es konnte kein genomweit signifikantes Ergebnis erzielt werden, die SNPs mit den signifikantesten Ergebnissen waren jeweils in Genen mit Einfluss auf die neuronale Entwicklung, Neuroprotektion und Neurotransmission lokalisiert. Es gab auch Hinweise auf einen polygenen Effekt auf negativ und desorganisierte Symptome (Fanous et al., 2012).

Im Verlauf der letzten Jahre konnte durch genomweite Assoziationsstudien ein Fortschritt in der genetischen Schizophrenieforschung verzeichnet werden, dieser gelang insbesondere durch das hypothesenfreie Testen sehr großer Stichproben.

Dennoch können auch mit genomweiten Assoziationsstudien möglicherweise nicht sämtliche genetische Risikofaktoren identifiziert werden, beispielsweise aufgrund zu geringer Risikoerhöhung eines einzelnen SNPs oder zu selten auftretender Polymorphismen (Psychiatric GWAS Consortium Coordinating Committee, 2009).

## 2. Einleitung

Tabelle 4: Übersicht zu ausgewählten GWAS und ihren wichtigsten Ergebnissen

| <b>Studie</b>                       | <b>Signifikante Ergebnisse<br/>(p-Wert)</b> | <b>p-Wert</b>                              | <b>Anzahl der untersuchten SNPs</b> | <b>Stichprobengröße Fäle/Kontrollen</b>  |
|-------------------------------------|---|--|-------------------------------------|--|
| Lencz et al.<br>(2007)              | CSF2RA                                      | $3,7 \times 10^{-7}$                       | 439511                              | 178 (SCZ, SZAD, SCZ)/144 (EA)  |
| Kirov et al.<br>(2008)              | CCDC60                                      | $1,2 \times 10^{-6}$                       | 433680 (gepoolte DNA)               | 574 (SCZ)/1753 (Trios; EA)   |
| Shifman et al. (2008)               | RELN  | $2,9 \times 10^{-5}$                       | 510552 (gepoolte DNA)               | 660 (SCZ)/2771 (EA)  |
| Sullivan et al. (2008)              | Keine signifikanten Ergebnisse              |  | 492900                              | 738 (SCZ)/733 (EA, AA)   |
| O'Donovan et al. (2008)             | ZNF804A                                     | $1,95 \times 10^{-7}$                      | 362532                              | 7308 (SCZ, BP)/12834 (EA)  |
| Shi et al.<br>(2009)<br>(MGS)       | MHC Region <sup>a</sup>                     | $1,06-4,35 \times 10^{-8}$                 | 696788-843798                       | 2681/2653 (EA; SCZ, SZAD)<br>1286/973 (AA; SCZ, SZAD);<br>8008/19 077 (MGS, SGENE und ISC) |
| Stefansson et al. (2009)<br>(SGENE) | MHC Region <sup>b</sup> ,                   | $1,1 \times 10^{-9} - 1,4 \times 10^{-12}$ | 314868                              | 2663/13498 (EA)<br>4999/15555 (Follow up; EA)  |
|                                     | NRGN <sup>b</sup>                           | $2,4 \times 10^{-9}$                       |                                     |  |
|                                     | TCF4 <sup>b</sup>                           | $4,1 \times 10^{-9}$                       |                                     |  |
| Purcell et al. (2009) (ISC)         | MHC Region <sup>a</sup>                     | $9,5 \times 10^{-9}$                       | 739995                              | 3322/3587 (EA)   |
| Ripke et al.<br>(2011)<br>(PGC)     | MIR137                                      | $1,6 \times 10^{-11}$                      | 1252901                             | 9394/12462 (EA, Stage1);<br>8442/21397 (EA, Stage2)  |
|                                     | PCGEM1                                      | $4,7 \times 10^{-8}$                       |                                     |  |
|                                     | TRIM26/MHC-Region                           | $2,2 \times 10^{-12}$                      |                                     |  |
|                                     | CSMD1                                       | $4,1 \times 10^{-8}$                       |                                     |  |
|                                     | MMP16                                       | $2,8 \times 10^{-8}$                       |                                     |  |
|                                     | CNNM2                                       | $1,8 \times 10^{-9}$                       |                                     |  |
|                                     | NT5C2                                       | $1,1 \times 10^{-8}$                       |                                     |  |
|                                     | CCDC68                                      | $2,6 \times 10^{-10}$                      |                                     |  |
|                                     | TCF4  | $2,4 \times 10^{-8e}$                      |                                     |  |
|                                     | STT3A                                       | $2,9 \times 10^{-8e}$                      |                                     |  |

<sup>a</sup> kombinierte Analyse von ISC, SGENE-plus und MGS

<sup>b</sup> kombinierte Analyse von ISC, MGS und SGENE-plus und follow up Stichproben

(EA= europäische Abstammung; AA= afroamerikanische Abstammung; SCZ= Pat. mit Schizophrenie; SZAD= Pat. mit schizoaffektiven Störung; SCZF= Pat. mit schizophreniformen Störung; BP= Pat. mit bipolarer Störung)

## 2. Einleitung

Insgesamt gestaltet sich die Identifikation von genetischen Erkrankungsursachen nach wie vor schwierig, dafür werden insbesondere die phänotypische und die genetische Heterogenität der Schizophrenie verantwortlich gemacht. Bisher konnte für keine genetische Variationen, die im Zusammenhang mit der Schizophrenie diskutiert wird, ein direkt pathogen wirkendes Genprodukt nachgewiesen werden, so dass zum jetzigen Zeitpunkt die pathobiologische Grundlage der Schizophrenie in vielen Aspekten ungeklärt bleibt (Lang et al., 2007). Allerdings können bei schizophrenen Patienten neuroanatomische, neurophysiologische und neurochemische Veränderungen beobachtet werden. Inwieweit diese jedoch kausal oder krankheits- bzw. therapiebedingt auftreten, muss noch abschließend geklärt werden (Keshavan et al., 2008).

### 2.1.4.3 Neurobiologische Faktoren

Neurobiologische Erklärungen für die Entstehung der Schizophrenie werden auf neuroanatomischer, neurophysiologischer und neurochemischer Ebene gesucht.

#### Neuroanatomische Befunde

Die ersten neuroanatomischen Befunde bei schizophrenen Patienten wurden bereits in den 1920ern entdeckt. So berichteten 1927 Jakobi und Winkler über eine Volumenreduktion des Gehirns bei an Schizophrenie erkrankten Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollprobanden (Jakobi et al., 1927).

In den letzten Jahrzehnten konnten mit Hilfe moderner bildgebender Verfahren Hirnregionen entdeckt werden, die bei schizophrenen Patienten besonders von einer Volumenreduktion betroffen sind: der Temporallappen, besonders der Hippocampus, die Amygdala und der Gyrus temporalis superior, der präfrontale Kortex, der Thalamus, das anteriore Cingulum und das Corpus callosum. Die Volumenreduktion betrifft dabei besonders die linke Gehirnhälfte. (Keshavan et al., 2008; Ross et al., 2006). Eine weitere strukturelle Veränderung im Gehirn von schizophrenen Probanden besteht in der Vergrößerung des Ventrikelsystems, wobei die Seitenventrikelgröße den größten Unterschied zur Norm darstellt (Lawrie et al., 1998; Wright et al., 2000).

Zudem konnte eine allgemeine Desorganisation der neuronalen Verbindungen und Abweichungen in der Zytarchitektur in Gehirnen schizophrener Patienten nachgewiesen werden. Dazu zählen eine Reduktion des Neuropils, eine verringerte Dichte von dendritischen Spines und Länge der Dendriten und eine veränderte Glia- und Neuronendichte (de Bois et al., 2007; Konradi et al., 2003; Glantz et al., 2006).

Eine Störung in der cerebralen Asymmetrieentwicklung und der Dominanzverlust einer Hemisphäre sind ebenfalls entscheidende strukturelle Auffälligkeiten bei Schizophreniepatienten. Die reduzierte hemisphärische Asymmetrie scheint dabei ein relativ spezifisches Strukturmerkmal der

## 2. Einleitung

Schizophrenie zu sein. Außerdem wird eine Assoziation mit einem frühen Erkrankungsbeginn vermutet. (Keshavan et al., 2008)

Aktuell werden vermehrt Studien durchgeführt, die einzelne schizophrene Symptome mit Veränderungen in spezifischen Hirnregionen in Verbindung bringen. Zum Beispiel sind akustische Halluzinationen und Denkstörungen vor allem mit einer Volumenreduktion im Gyrus temporalis superior, meist links ausgeprägter als rechts, assoziiert (Sun et al., 2009). Eine Reduktion der weißen Substanz, beispielsweise im Corpus callosum, wird mit formalen Denkstörungen und kognitiven Defiziten in Verbindung gebracht (Keshavan et al., 2008; Bernstein et al., 2009).

Als eine mögliche Ursache der strukturellen Veränderungen in der Hirnarchitektur, insbesondere der Zytotarchitektur, schizophrener Patienten wird eine zugrunde liegende Entwicklungsstörung vermutet (du Bois et al., 2007).

Neben dem Modell der Entwicklungsstörung werden neurodegenerative Prozesse als Ursache der Schizophrenie gesehen. Einen bedeutenden Beitrag zur Unterstützung dieser Hypothese lieferten Thompson und Kollegen (2001) mit ihrer prospektiven 5-Jahresstudie an Patienten mit juvenilem Beginn der Schizophrenie. Diese Studie zeigte erstmals auf der Basis moderner voxelbasierter morphometrischer Analyse des Gehirns, dass es zu Beginn der Erkrankung zu einem progredienten Verlust an grauer Substanz im Bereich des Parietallappens kommt, der sich sukzessive nach temporal und frontal ausbreitet (Thomson et al., 2001).

Obwohl strukturelle cerebrale Auffälligkeiten bei schizophrenen Patienten meist beobachtet werden können und sogar schon vor Beginn der psychotischen Symptome nachweisbar sind (Ross et al., 2006), erscheinen sie als diagnostisches Kriterium ungeeignet, da zum Beispiel auch bei Patienten mit affektiven Störungen oder auch bei Angehörigen der Patienten ähnliche Veränderungen nachgewiesen werden können (Keshavan et al., 2008). Allerdings können neuroanatomische Auffälligkeiten als Endophänotypen verwendet werden (Braff et al., 2007).

### Neurophysiologische Befunde

Schizophrene Patienten zeigen häufig Veränderungen von psychophysiologicalen Reaktionsmustern und -abläufen. Zum Beispiel kann bei Schizophrenen ein schlechteres Abschneiden bei der Messung von langsamen Augenfolgenbewegungen oder Antisakkaden gemessen werden. Bei der Antisakkaden-Testung müssen die Probanden eine Augenbewegung in die entgegengesetzte Richtung eines dargebotenen Reizes ausführen. Damit soll die frontale-striatale Funktion geprüft werden (Ross et al., 2006).

Auch bei der Prepulse Inhibition (PPI) schneiden schizophrene Patienten schlechter ab. Unter der

## 2. Einleitung

PPI wird die Reduktion der Amplitude einer Schreckreaktion auf einen intensiven Reiz verstanden, wenn dem unkonditionierten Reiz ein schwacher Reiz unmittelbar vorausgeht. Dabei wird die PPI als Korrelat des Prozesses des sensomotorischen Gatings gesehen. In der Erforschung der Schizophrenie ist die PPI deshalb so interessant, weil sie zum Beispiel durch NMDA-Rezeptorantagonisten oder Dopaminagonisten verschlechtert werden kann, aber auch durch Gabe von einigen atypischen Neuroleptika, besonders Clozapin, wieder normalisiert werden kann (Keshavan et al., 2008).

Neben den exemplarisch dargestellten neurophysiologischen Befunden können noch eine Reihe anderer veränderter psychophysiologischer Reaktionen gemessen werden. Diese spezifischen Tests zum Beispiel die PPI können als Endophänotypen verwendet werden (Ross et al., 2006; Braff et al., 2007).

### Neurochemische Befunde

Obwohl die neurobiologische Ursache für die Entstehung einer Schizophrenie nicht bekannt ist, lassen sich Auffälligkeiten in einigen Transmittersystemen feststellen. Zum Beispiel werden einer Hypofunktion des GABA-Systems (Charych et al., 2009) oder einer Dysfunktion des serotonergen Stoffwechsels (Keshavan et al., 2008) eine Rolle bei der Schizophrenieentwicklung zugeschrieben.

Die Dopaminhypothese stellt die älteste Theorie zur Pathophysiologie der Schizophrenie dar. Diese These kann jedoch hauptsächlich durch indirekte Hinweise untermauert werden, einerseits durch die Wirkung von Amphetaminen, welche über eine dopaminerge Überaktivierung im mesolimbischen System psychotische Symptome auslösen können, und andererseits durch positive Therapieeffekte über eine Dopaminrezeptor-2-Blockade (Keshavan et al., 2008).

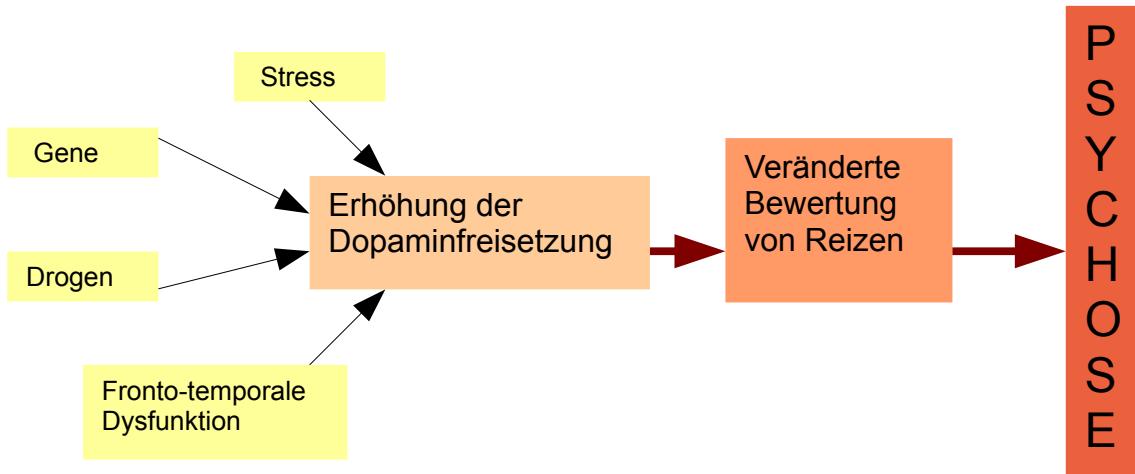
Nach heutiger Ansicht spielt ein Dopaminungleichgewicht mit einer Dopaminrezeptor 2 (D2)-Überstimulation im mesolimbischen System und einer Dopaminrezeptor 1 (D1)-Unterstimulation im präfrontalen Kortex eine Hauptrolle bei der Pathophysiologie der Schizophrenie. Dabei sollen durch die D2-Überstimulation die Positivsymptome ausgelöst werden und die Unterstimulation an D1-Rezeptoren zu negativen Symptomen führen (Dawe et al., 2009; Desbonnet et al., 2009).

In einem Überblicksartikel von Howes und Kapur wird die Dopaminhypothese der Schizophrenie als gemeinsame pathophysiologische „Endstrecke“ postuliert. Die Autoren fassen die Dopaminhypothese in 4 Hauptpunkten zusammen (Howes et al., 2009):

Erstens wird dabei von einer dopaminergen Dysregulation ausgegangen, die mit psychotischen Symptomen einhergeht und auf verschiedenen Veränderungen basiert. Als Ursachen für eine erhöhte Dopaminfreisetzung werden von den Autoren zum Beispiel genetische Veränderungen, Drogen, insbesondere MDMA aber auch Cannabis, und eine durch Stress ausgelöste „Dopaminüberaktivität“ im mesostriatalen System genannt. Dabei kann der Stress unter anderem

## 2. Einleitung

in Form von Schangerschafts- oder Geburtskomplikationen auftreten. Zweitens wird die Hypothese aufgestellt, dass die Dopamindysregulation weniger aufgrund einer dysfunktionalen D2-Rezeptorantwort basiert, als viel mehr auf Basis der präsynaptischen Transmitterfreisetzung. Drittens wird die Dopaminhypothese eher als Ursache der Psychose als speziell der Schizophrenie gesehen. Und Viertens wird angenommen, dass die Dopamindysregulation über die veränderte Bewertung von Reizen zu psychotischen Symptomen führt (vgl. Abbildung 4).



**Abbildung 4: Die Dopaminhypothese als gemeinsame pathophysiologische "Endstrecke":** verschiedene Störungen führen zu einer Dopamindysregulation, welche über eine veränderte Bewertung von Reizen zu psychotischen Symptomen führt (Abbildung verändert nach Howes et al., 2009)

Eine ebenfalls wichtige Rolle bei der Schizophrenientwicklung nimmt nach aktueller Studienlage das Glutamatsystem ein. Die Glutamathypothese geht von einer Unterfunktion des glutamatergen Systems aus. Diese These wird durch eine niedrigere Glutamatkonzentration im Liquor, eine Verminderung glutamaterger Marker in der Magnetresonanzspektroskopie und eine Veränderung der Glutamatrezeptoren im Gehirn bezüglich Dichte und Zusammensetzung der Untereinheiten in *post mortem* Studien bei schizophrenen Patienten im Vergleich zu Kontrollprobanden gestützt (Sodhi et al., 2008; Watis et al., 2008; Meador-Woodruff et al., 2000; Meador-Woodruff et al., 2003).

Des Weiteren können bei Verabreichung von nicht-kompetitiven Antagonisten am NMDA-Rezeptor, zum Beispiel durch Ketamin oder Phencyclidine, schizophenietypische Symptome in Form von Positiv- und Negativsymptomen und kognitive Defizite beobachtet werden, außerdem exazerbieren Positiv- und Negativsymptome bei schizophrenen Patienten (Javitt et al., 1991; Krystal et al., 1994; Breier et al., 1997). Insgesamt wird davon ausgegangen, dass durch Ketamin

## 2. Einleitung

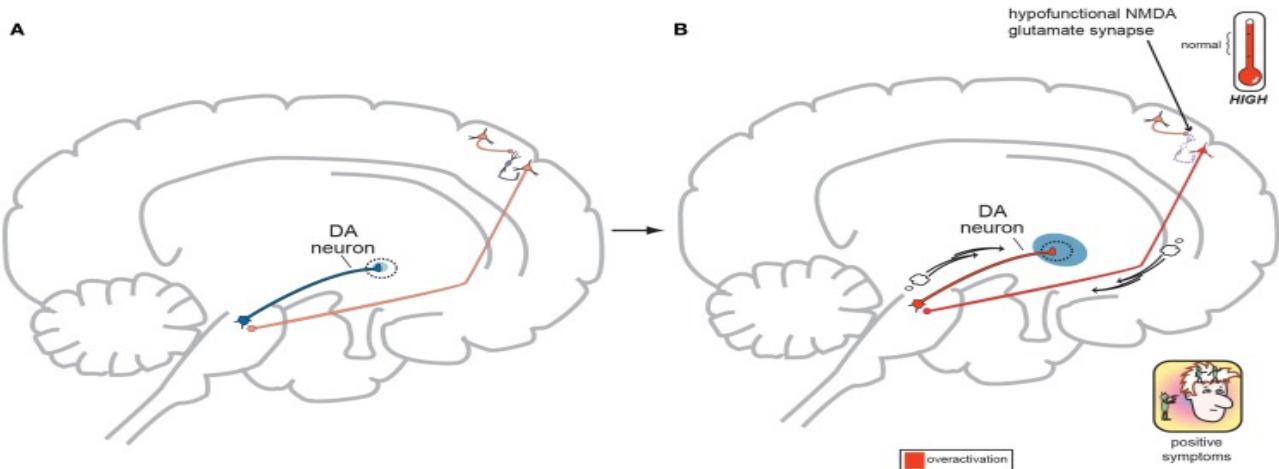
oder PCP und eine damit hervorgerufene Dysfunktion des glutamatergen Systems die Symptome der Schizophrenie besser simuliert werden können, als dies mit Substanzen, die auf andere Transmittersysteme, zum Beispiel dopaminerige oder serotonerge Substanzen, wirken, der Fall ist (Sodhi et al., 2008).

Momentan werden verschiedene Mechanismen zur Glutamathypothese als pathophysiologische Ursache der Schizophrenie diskutiert: Zum Beispiel führt ein Glutamatdefizit zu einer gestörten neuronalen Entwicklung und zu einer verminderten synaptischen Plastizität (du Bois et al., 2007; Konradi et al., 2003). Damit wären die pathognomonischen kognitiven Defizite erklärbar. Einen weiteren wichtigen pathophysiologischen Ansatz stellt die verminderte GABA-Freisetzung durch eine NMDA-Rezeptorunterfunktion an GABAergen Neuronen dar, welches wiederum zu einer Disinhibition nachgeschalteter Neuronen führt (Gaspar et al., 2009, Konradi et al., 2003; Ferraguti et al., 2005). Bei nachgeschalteten glutamatergen Neuronen kann dies zu Exzitotoxizität führen, welche die Apoptose von Neuronen aufgrund einer übermäßigen neuronalen Stimulation beschreibt.

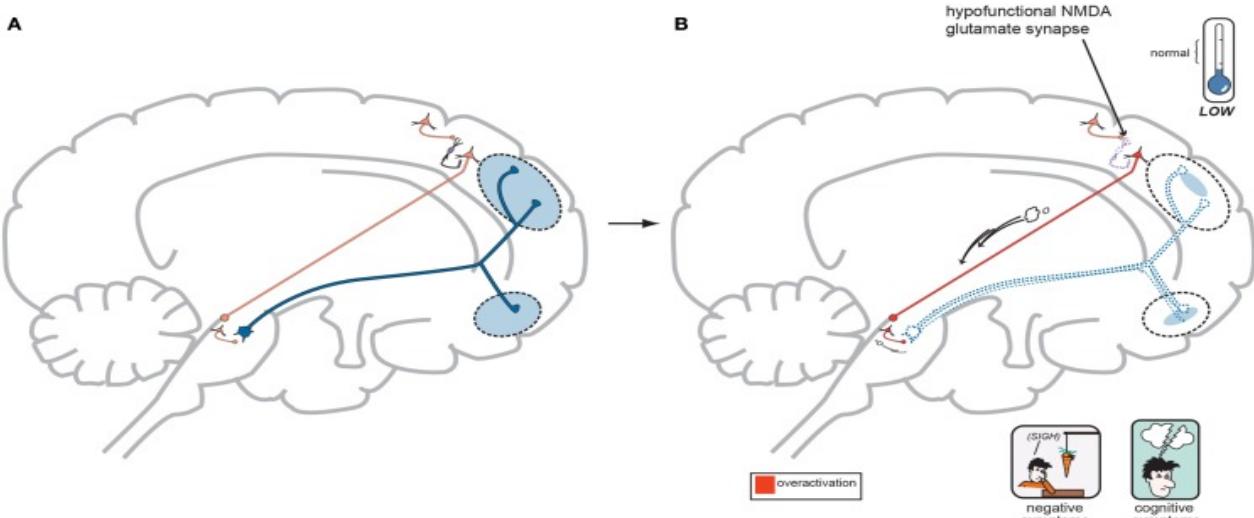
In einem 2012 erschienenen Überblicksartikel zur Glutamathypothese der Schizophrenie von Schwartz und Kollegen wird die Entstehung von Positiv- und Negativsymptomen durch ein Zusammenspiel von Glutamat, Dopamin und GABA erklärt (vgl. Abbildung 5 und 6, Seite 29). Dabei integrieren die Autoren die Dopaminhypothese ebenfalls wie zuvor bereits von Howes und Kollegen (2009) vorgeschlagen als pathophysiologische Endstrecke.

Zusammenfassend kann somit gezeigt werden, dass die beiden neurochemischen Haupthypothesen, die Dopamin- und die Glutamathypothese, gut miteinander vereinbar sind zur Erklärung der Symptomentstehung der Schizophrenie (Konradi et al., 2003; Coyle, 2006; Gasper et al., 2009).

## 2. Einleitung



**Abbildung 5: Die Glutamathypothese und die Entstehung der Positivsymptomatik:** Abbildung A zeigt den normalen Glutamat-GABA-Glutamat-Dopamin-Kreislauf: Ein glutamaterges Neuron im frontalen Cortex setzt Glutamat frei, welches durch einen NMDA-Rezeptor ein GABAerges Neuron im frontalen Cortex zur Freisetzung von GABA stimuliert. Diese Neuron wiederum hemmt durch die GABA-Freisetzung ein glutamaterges Neuron im Hirnstamm, welches schließlich auf ein mesolimbisch gelegenes dopaminerges Neuron projiziert. In Abbildung B, führt ein hypofunktionaler NMDA-Rezeptor am GABA-Neuron im frontalen Cortex zu einer Dysinhibition des im Hirnstamm liegenden glutamatergen Neurons, woraus letztendlich eine exzessive mesolimbische Dopamin-Freisetzung resultiert und damit Positivsymptome einer Schizophrenie auslöst. (Abbildung nach Schwartz et al., 2012)



**Abbildung 6: Die Glutamathypothese und die Entstehung der Negativsymptomatik:** Abbildung A zeigt den normalen Glutamat-GABA-Glutamat-Dopamin-Kreislauf: Ein glutamaterges Neuron im frontalen Cortex projiziert auf ein GABAerges Neuron im frontalen Cortex, welches hemmend auf ein glutamaterges Neuron im Hirnstamm wirkt und dadurch eine GABAerge Nervenzelle im Hirnstamm erregt, welche auf ein dopaminerges Neuron im frontalen Cortex projiziert. In Abbildung B besitzt das GABAerge Neuron im frontalen Cortex wiederum einen hypofunktionalen NMDA-Rezeptor, wodurch es zu einer Dysinhibition eines glutamatergen Neurons im Hirnstamm kommt, welches das nachgeschaltete GABAerge Neuron zur erhöhten GABA-Freisetzung veranlasst. Dadurch kommt es zur Hemmung der Dopaminfreisetzung im frontalen Cortex, woraus die Negativsymptomatik der Schizophrenie resultiert. (Abbildung nach Schwartz et al., 2012)

## 2. Einleitung

Die Glutamathypothese basiert, wie in den beiden Abbildungen 5 und 6 (vgl. Seite 29) verdeutlicht wird, im speziellen auf einer Hypofunktion des NMDA-Rezeptors, welcher einen der drei ionotropen Glutamatrezeptoren im zentralen Nervensystem darstellt. Als Ursachen dieser Unterfunktion werden mehrere Faktoren diskutiert: so könnte einerseits der Rezeptor selbst eine Funktionseinschränkung aufweisen, andererseits könnten Co-Agonisten in zu geringem Ausmaß oder eine zu hohe Konzentration von modulatorische Antagonisten zu der NMDA-Rezeptor-Dysfunktion führen (Coyle, 2006; Konradi et al., 2003). Eine weitere Möglichkeit ist eine reduzierte Glutamatfreisetzung, welche durch präsynaptische metabotrope Glutamatrezeptoren (GRM, mGluR), die als Autorezeptoren fungieren, bewirkt werden könnte. Aber auch die postsynaptisch lokalisierten GRM könnten durch ihre modulatorische Wirkung an ionotropen Glutamatrezeptoren zu einer Dysfunktion des NMDA-Rezeptors führen (Krivoy et al., 2008). Metabotrope Glutamatrezeptoren stellen ein interessantes Thema der Schizophrenieforschung dar, weil sie einerseits durch Funktionsstörungen zur Pathophysiologie der Schizophrenie beitragen könnten und andererseits als vielversprechender neuer therapeutischer Ansatzpunkt gelten (Gaspar et al., 2009).

### **2.2 Metabotrope Glutamatrezeptoren**

Glutamat ist einer der wichtigsten exzitatorischen Neurotransmitter im zentralen Nervensystem, der zwei Rezeptorklassen aktivieren kann, die ionotropen und die metabotropen Glutamatrezeptoren.

Bei den ionotropen Glutamatrezeptoren handelt es sich um schnelle ligandengesteuerte Ionenkanäle, bei welchen durch Bindung von Glutamat eine Konformationsänderung zur Öffnung eines Kanals führt, welcher die Passage von Ionen durch die Zellmembran gewährt. Es können drei ionotope Rezeptortypen unterschieden werden, AMPA- (*α-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid*), NMDA(*N-Methyl-D-Aspartat*)- und Kainat-Rezeptoren (Coutinho et al., 2002).

Die metabotropen Glutamatrezeptoren gehören zur Familie der G-Protein gekoppelten Rezeptoren (GPCR). Diese Rezeptoren stellen eine der größten im menschlichen Genom kodierten Proteingruppen dar (ca. 800 Gene). Alle GPCRs bestehen aus sieben  $\alpha$ -helikalen Transmembrandomänen, die mit drei intrazellulären und vier extrazellulären Schleifen verbunden sind, einem extrazellulären N-Terminus, der für die Ligandenbindung verantwortlich ist, und einem intrazellulären C-Terminus, welcher unter anderem an der Kopplung des G-Proteins beteiligt ist. Aufgrund von Ähnlichkeiten der Transmembrandomänen, können die G-Protein gekoppelten Rezeptoren in 5 Untergruppen eingeteilt werden: die Rhodopsin-Familie, die Sekretin-Familie, die Glutamat-Familie, die Adhäsion-Familie und die Frizzled-Taste2-Familie (Kobilka, 2007).

## 2. Einleitung

Die Hauptaufgabe der metabotropen Glutamatrezeptoren im zentralen Nervensystem besteht in der Modulation der Exzitabilität (Schoepp, 2001). Die modulatorische Wirkung erreichen sie, indem sie Aktionspotentiale im somato-dendritischen Bereich generieren, die präsynaptisch die Transmitterfreisetzung regulieren und/oder die postsynaptische Zellantwort beeinflussen (Durand et al., 2008).

Aufgrund dieser Funktion wurde den mGluRs unter anderem eine wichtige Rolle bei der Modulation von neuronaler Plastizität, Lernen und Gedächtnis (Gerlai et al., 2002) und bei der Kontrolle von neuroendokrinen Funktionen zugeschrieben (Durand et al., 2008).

### **2.2.1 Struktur metabotroper Glutamatrezeptoren**

Die Struktur metabotroper Glutamatrezeptoren besteht wie bei allen GPCRs aus einem extrazellulären N-Terminus, sieben Transmembrandomänen und einem intrazellulären C-Terminus.

Dabei treten metabotrope Glutamatrezeptoren nicht als Monomere auf, sondern weisen eine homodimere Struktur auf (Yanagawa et al., 2009). Es wird angenommen, dass die Dimerbildung zur Aktivierung der Transmembrandomänen und damit zur Aktivierung des G-Proteins nötig ist (Pin et al., 2009).

Die Besonderheit der Glutamatfamilie stellt der lange extrazelluläre N-Terminus (500-600 Aminosäuren; Coutinho et al., 2002) dar, welcher aus einem Liganden-bindenden Abschnitt und aus einer Cystein-reichen Region besteht. Der Liganden-bindende Abschnitt ist aus zwei Lappen aufgebaut, welcher in der Form einer Venusfliegenfalle ähnelt. Die beiden Lappen können im ligandenfreien Zustand in offenem und in geschlossenem Zustand vorliegen, wobei durch Ligandenbindung die geschlossene Konformation stabiler ist und dadurch die Signalweiterleitung bewirkt wird. Bei GPCRs der anderen Familien erfolgt die Ligandenbindung an einer von den Transmembranhelices gebildeten Tasche (Pin et al., 2003, vgl. Abbildung 7, Seite 32).

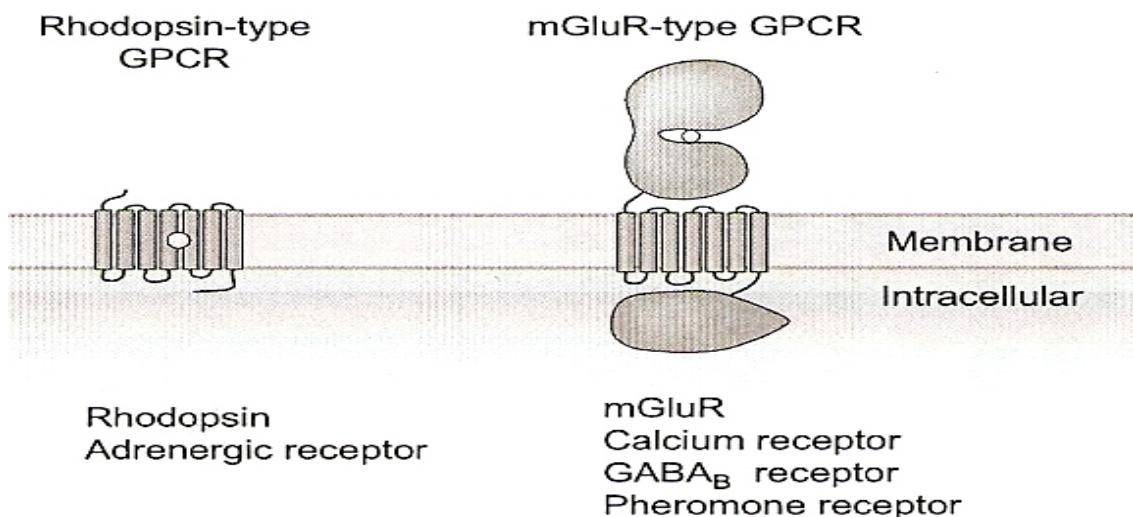
Die Signalfortleitung von der Liganden-bindenden Region zu der Transmembrandomäne wird unter anderem durch die Cystein-reiche Region ausgeführt. Außerdem wird der Cystein-reichen Region eine wichtige Rolle bei der Bildung der Dimerstruktur zugeschrieben (Jingami et al., 2003; Muto et al., 2007).

Bezüglich der Transmembrandomänen unterscheiden sich die mGluR von den klassischen GPCRs durch das Fehlen einer Aminosäuresequenz-Homologie zu GPCRs anderer Familien (Jingami et al., 2003). Weitere Besonderheiten der die Zellmembran durchspannenden Polypeptidkette sind die sehr kurzen und hochkonservierten intrazellulären Schleifen, wobei die dritte Schleife am höchsten konserviert ist und die zweite Schleife am variabelsten ist und damit für

## 2. Einleitung

die selektive Bindung des G-Proteins zuständig ist. Bei anderen G-Protein gekoppelten Rezeptoren wird die Selektivität der G-Protein-Bindung durch die dritte Schleife definiert (Jingami et al., 2003; Havlickova et al., 2003).

Der intrazelluläre C-Terminus, welcher auch bei der G-Protein-Bindung eine Rolle spielt, weist Rezeptor-abhängig unterschiedliche Längen (zwischen 32 und 377 Aminosäuren) und Strukturen auf. Eine weitere Aufgabe des C-Terminus ist die Bindung von Proteinen, die durch den Rezeptor reguliert werden können oder ihrerseits den Rezeptor beeinflussen (Enz, 2007).



**Abbildung 7: Struktur und Ligandenbindungsstelle von G-Protein gekoppelten Proteinen:** Ein Vertreter der Rhodopsin-Familie (links) und ein Vertreter der Glutamatfamilie (rechts) sind schematisch dargestellt. Rezeptoren der Rhodopsinfamilie bilden ihre Ligandenbindungsdomäne mit ihren Transmembranhelices, während Vertreter der Glutamatfamilie Liganden am extrazellulären N-Terminus binden. (Abbildung und Text verändert nach Jingami et al., 2003)

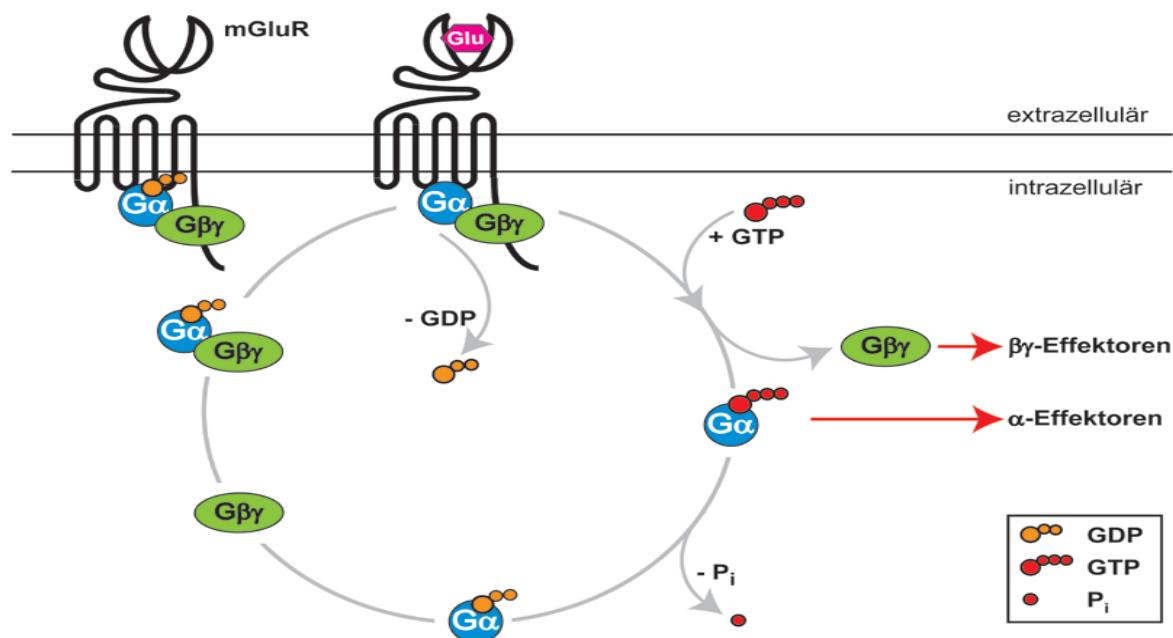
### 2.2.2 Signaltransduktion der metabotropen Glutamatrezeptoren

Die Signaltransduktion erfolgt mittels des G-Proteins, welches an den zweiten und dritten intrazellulären Loop und den C-Terminus gekoppelt ist. Das heterotrimere G-Protein besteht aus drei Untereinheiten ( $\alpha$ ,  $\beta$  und  $\gamma$ ). Wenn ein entsprechender Ligand an den Rezeptor bindet, erfolgt eine Konfigurationsänderung der helikalen Transmembrandomänen und damit der das G-Protein bindenden Strukturen, was zu einer Aktivierung des G-Proteins führen kann (Yanagawa et al., 2009). Dies geschieht durch Austauschen des gebundenen GDP durch GTP. Dadurch zerfällt das heterotrimere G-Protein in zwei Teile, die  $\alpha$ -Einheit, an welcher das GTP gebunden ist, und die  $\beta\gamma$ -Einheit. Nun kann das aktivierte G-Protein Effektormoleküle aktivieren oder inhibieren. Bei den

## 2. Einleitung

nachgeschalteten Effektmolekülen handelt es sich um Enzyme, welche die Biosynthese von *Second Messenger-Proteinen* (zum Beispiel zyklisches Adenosinmonophosphat, cAMP) katalysieren oder um Ionenkanäle zu steuern (zum Beispiel spannungsabhängige Kalziumkanäle). Die Beendigung des Signals erfolgt durch Hydrolyse des an der  $\alpha$ -Einheit gebundenen GTP, durch die intrinsische GTPase-Aktivität der  $\alpha$ -Untereinheit. Dadurch verbinden sich die Untereinheiten des heterotrimeren G-Proteins wieder und liegen somit wieder im inaktiven Zustand vor (Horn et al., 2003; Preininger et al., 2004, vgl. Abbildung 8).

Durch die Kopplung von unterschiedlichen G-Proteinen können GPCRs mittels verschiedener Signalkaskaden eine Vielfalt an Effekten innerhalb der Zelle bewirken.

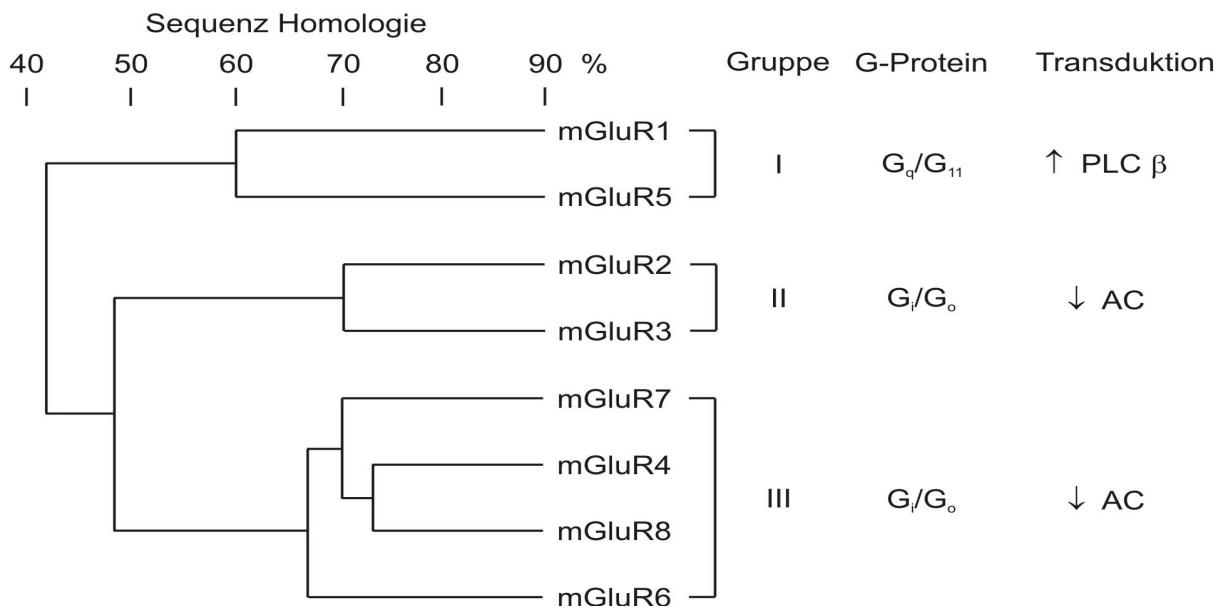


**Abbildung 8:** Überblick über den Aktivierungszyklus eines G-Proteins (Abbildung und Text verändert nach Preininger et al., 2004)

### 2.2.3 Klassifikation metabotroper Glutamatrezeptoren

Aktuell sind 8 verschiedene metabotrope Glutamatrezeptoren bekannt, die im Bezug auf ihre Struktur, ihre *Second Messenger* und ihres pharmakologischen Profils in drei Gruppen eingeteilt werden können. Innerhalb ihrer Gruppen weisen die Rezeptoren eine Aminosäure-Identität von circa 70% auf, wobei die verschiedenen Gruppen bezüglich ihrer Aminosäuresequenz nur zu ungefähr 45% identisch sind (Duvoisin et al., 1995, vgl. Abbildung 9, Seite 34).

## 2. Einleitung



**Abbildung 9: Dendrogramm und pharmakologische Klassifikation der mGluR-Subtypen**  
(Abbildung und Text nach Duvoisin et al., 1995 und Kirvoy et al., 2008)

Zur Gruppe I der metabotropen Glutamatrezeptoren gehören mGluR1 und mGluR5. Bei Ligandenbindung wird mittels des gekoppelten G-Proteins die Phospholipase C aktiviert, welche die Produktion des Botenstoffes Inositol-3-Phosphat katalysiert oder Kalziumsignale generiert. Die Gruppe I mGluR sind postsynaptisch an glutamatergen Synapsen lokalisiert und interagieren mit ionotropen Glutamatrezeptoren oder anderen Ionenkanälen, wodurch sie eine erhöhte Exzitabilität im zentralen Nervensystem bewirken (Durand et al., 2008; Pin et al., 2003; Konradi et al., 2003). Bei Untersuchungen der mGluR Gruppe I konnte bisher vor allem der Rezeptorsubtyp 5 als mögliches Kanidatengen der Schizophrenie herausgestellt werden (Devon et al., 2001). Außerdem wird der mGluR 5 als potentieller Angriffspunkt für neue Medikamente gesehen, da durch Aktivierung dieses Rezeptors eine Funktionsverbesserung des NMDA-Rezeptors erreicht werden kann (Conn et al., 2009).

Gruppe II beinhaltet mGluR 2 und mGluR 3. Diese Rezeptoren sind sowohl post- als auch präsynaptisch an glutamatergen, GABAergen Synapsen und Gliazellen (mGluR3) lokalisiert und wirken hemmend auf die Adenylatzyklase und auf verschiedene Typen von Kalziumkanälen (Durand et al., 2008; Kirvoy et al., 2008; Pin et al., 2003).

Bisher konnte für Polymorphismen im metabotropen Glutamatrezeptor 3-Gen (GRM3) in einigen Studien eine signifikante Assoziation mit der Schizophrenie nachgewiesen werden (Mössner et al., 2008; Fujii et al., 2003; Egan et al., 2004). Es wird dabei von einer verringerten synaptischen

## 2. Einleitung

Glutamatkonzentration bedingt durch funktionelle Varianten des GRM3 ausgegangen. Dies konnte mit Hilfe von Magnetresonanzspektroskopie-Studien belegt werden (Egan et al., 2004). Bei der Untersuchung von kognitiven Endophänotypen konnte ein schlechteres Abschneiden einer Genotypvariante des GRM3-Gens nachgewiesen werden (Mössner et al. 2008).

Die metabotropen Glutamatrezeptoren der Gruppe II sind zudem aktuell Gegenstand intensiver pharmakologischer Forschung. In ersten klinischen Studien konnte eine Verbesserung der Positiv- und Negativsymptome durch mGluR2/3-Agonisten, zum Beispiel LY404039, nachgewiesen werden. Bezuglich der Effektivität war die Behandlung mit 80mg des GRM2/3-Agonisten ebenso wirksam wie eine Therapie mit 15mg Olanzapin, einem atypischen Neuroleptikum (Patil et al., 2007). Aktuell befindet sich LY404039 in klinischen Studien Phase II und zeigt vielversprechende Ergebnisse (Mezler et al., 2010).

Die mGluR4, 6, 7 und 8 bilden die dritte Untergruppe. Die mGluR der Gruppe III sind präsynaptisch lokalisiert und wirken ebenfalls hemmend auf die Adenylatzyklase, außerdem inhibieren sie Kalziumkanäle und regulieren Kaliumkanäle. Einen Sonderfall innerhalb der Gruppe III stellt der mGluR6 dar. Dieser wird nach aktuellem Kenntnisstand ausschließlich in ON-Bipolarzellen der Retina exprimiert (Pin et al., 2003; Kirvoy et al., 2008).

Die mGluR Gruppe III ist die bis jetzt am wenigsten untersuchte Untergruppe (Krivoy et al., 2007). Bei mGluR6 ist ein Zusammenhang mit der Schizophrenie unwahrscheinlich, da dieser Rezeptor nur in der Retina exprimiert wird (Kirvoy et al., 2007). Für den GRM4 konnte bisher kein Assoziation zur Schizophrenie gezeigt werden (Ohtsuki et al., 2001; Shibata et al., 2009). Bei den Untersuchungen des GRM7 im Zusammenhang mit der Schizophrenie konnten sowohl positive (Ohtsuki et al., 2008; Shibata et al., 2009) als auch negative (Bolonna et al., 2001) Ergebnisse erzielt werden.

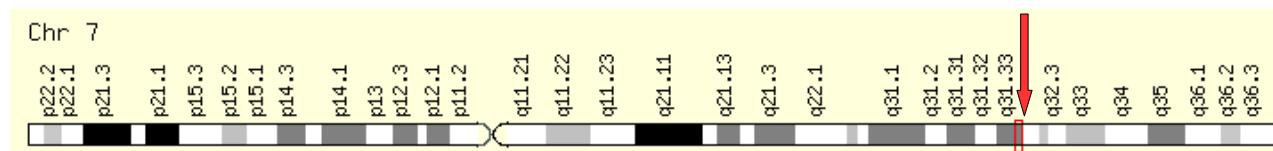
Da der GRM8 durch seine präsynaptische Lokalisation, sein gehäuftes Auftreten in Gehirnregionen, die mit der Schizophrenie in Zusammenhang stehen, und seine kontrollierende Funktion bei der Glutamatfreisetzung ein interessantes Kandidatengen der Schizophrenie darstellt (Takaki et al., 2004; Robbins et al., 2007), wurde er bisher in zwei Assoziationsstudien auf seinen Zusammenhang mit der Schizophrenie untersucht. Dabei fanden Takaki und Kollegen (2004) einen Zusammenhang mit der Schizophrenie, in der Studie von Bolonna et al. (2001) dagegen zeigte der untersuchte Marker keine signifikante Assoziation mit der Schizophrenie.

## **2.3 Metabotroper Glutamatrezeptor 8**

### **2.3.1 Genstruktur und Isoformen von GRM8**

Der metabotrope Glutamatrezeptor 8 wurde 1995 von Duvoisin und Kollegen bei der Analyse einer retinalen cDNA von Mäusen entdeckt (Duvoisin et al., 1995).

Das den metabotropen Glutamatrezeptor 8 kodierende Gen liegt auf Chromosom 7q31.3-32.1 und umfasst circa 1000 kb DNA, wobei die kodierende Region nur aus ungefähr 2,3 kb besteht (Scherer et al., 1997; vgl. Abbildung 10).

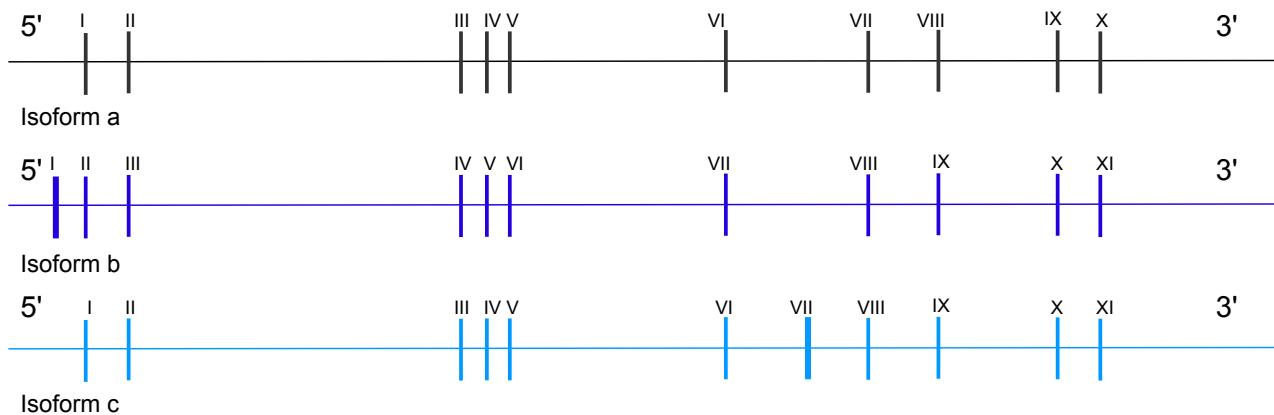


***Abbildung 10: Darstellung des Chromosom 7, Lokalisation des GRM8 mit Pfeil markiert***

Das Gen besteht aus 10 Exons und 9 Introns. Aktuell sind drei Spleißvarianten (mGluR 8a, b und c; vgl. Abbildung 11, Seite 37) bekannt. Dabei unterscheiden sich die metabotropen Glutamatrezeptoren 8a und 8b nur um 16 Aminosäuren am C-Terminus. Dies resultiert aus einer Frameshift-Insertion von 55 Basenpaaren, welche ein Exon und ein Stopcodon enthält. Die Veränderung am C-Terminus des Rezeptors mGluR8b im Vergleich zu mGluR8a scheint keine Auswirkung auf die G-Protein-Kopplung zu haben (Guo et al., 2005). Die beiden Spleißvarianten mGluR8a und b werden generell in den gleichen Hirnregionen exprimiert, allerdings in unterschiedlichem Ausmaß. Eine Ausnahme stellen die Nuclei reticularis lateralis, vestibularis spinalis und ambiguus dar, bei welchen nur der mGluR8a nachgewiesen werden konnte. Dies lässt auf eine besondere Rolle der Spleißvariante mGluR8a bei motorischen und koordinatorischen Prozessen schließen (Corti et al., 1998; Ferraguti et al., 2005).

Die dritte Spleißvariante mGluR 8c besteht nur aus der extrazellulären Rezeptorregion, da durch eine Frameshift-Insertion von 74 Basenpaaren die Translation vor den sieben Transmembrandomänen gestoppt wird. Es könnte sich dabei um eine sekretorische Isoform des Rezeptors handeln, welche eine glutamatregulatorische Funktion haben könnte. Der metabotrope Glutamatrezeptor 8c wird besonders in den Gliazellen exprimiert (Malherbe et al., 1999).

## 2. Einleitung



**Abbildung 11: schematische Darstellung des Isoformen des GRM8-Gens:** Die senkrechten, mit römischen Zahlen nummerierte Kästchen symbolisieren die Exons, die waagrechten Verbindungen die Introns.

### 2.3.2 Struktur des GRM8

Der metabotrope Glutamatrezeptor 8 ist wie alle mGluR aus einem extrazellulären N-Terminus, einer heptahelikalen Transmembrandomäne und einem intrazellulären C-Terminus aufgebaut (vgl. Abbildung 12, Seite 38).

Einen entscheidenden Unterschied zwischen den einzelnen metabotropen Glutamatrezeptoren stellt die Länge des intrazellulären C-Terminus und die verschiedenen damit interagierenden Proteine dar. Beim mGluR8a und b besteht der C-Terminus aus 65 Aminosäuren (Enz, 2006).

Calmodulin, Pias1 und PICK-1 können sowohl mit Spleißvariante GRM8a als auch mit Variante GRM8b interagieren, Filamin-A und PKA dagegen binden nur am GRM8a (Enz, 2006).

Calmodulin ist ein nahezu ubiquitär vorkommendes, intrazelluläres Rezeptorprotein für Calciumionen, welches vielfältige regulierende und modulierende Effekte hat (Berg et al., 2007). Für den metabotropen Glutamatrezeptor 7 konnte eine modulierende Funktion von Calmodulin auf die Rezeptorantwort nachgewiesen werden (O'Connor et al., 1999), auf die Rezeptorantwort des GRM8 scheint Calmodulin allerdings keinen Einfluss zu haben (Guo et al., 2005).

Pias1 ist eine Ligase, die bei der posttranslationalen Modifizierung von Proteinen eine wichtige Rolle spielt, welche Auswirkung die Bindung von Pias1 an den C-Terminus des GRM8 hat, ist zum jetzigen Zeitpunkt noch nicht geklärt (Tang et al., 2005).

PICK1 ist Substrat der Proteinkinase C und kann mit allen metabotropen Glutamatrezeptoren der Gruppe III interagieren, wobei nach aktuellem Wissensstand der metabotrope Glutamatrezeptor 7 den Hauptbindungspartner darstellt (El Far et al., 2000). Der GRM7 benötigt die Interaktion mit PICK1 für die Signaltransduktion (Perroy et al., 2002), welche Bedeutung die Bindung von PICK1

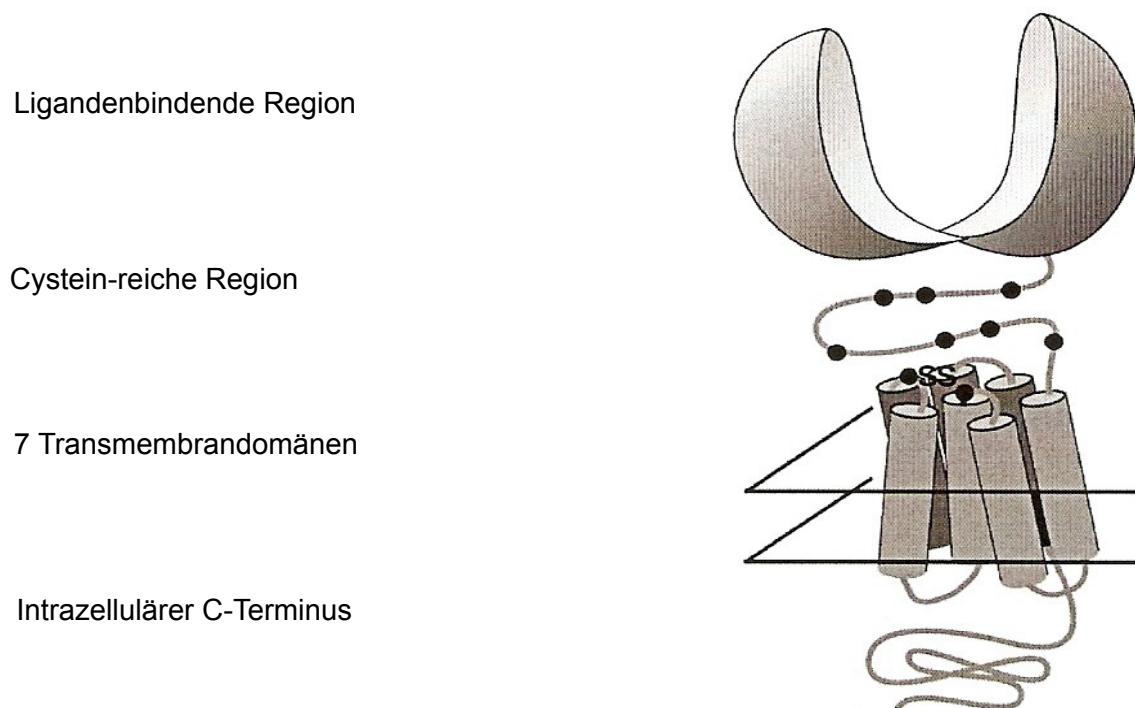
## 2. Einleitung

für den metabotropen Glutamatrezeptor 8 hat, ist derzeit noch unbekannt.

Filamin-A gehört zu den Aktin-bindenden Proteinen und interagiert mit mehr als 45 zellulären Protein mit verschiedensten Funktionen, so dass davon ausgegangen wird, dass das Protein als Organisator zellulärer Signalprozesse fungiert (Enz, 2006). Welche Rolle die Bindung an Filamin A für den GRM8 spielt, bedarf noch weiteren Untersuchungen.

Die Proteinkinase PKA kann durch Phosphorylierung am C-Terminus des metabotropen Glutamatrezeptors 8a die Rezeptorantwort inhibieren (Cai et al., 2001).

Die Rezeptorantwort des metabotropen Glutamatrezeptors 8 kann durch die Interaktion mit verschiedenen Proteinen moduliert werden. Welche Funktionen die jeweiligen Interaktionspartner allerdings genau für die Funktion des GRM8 haben, muss in weiteren Studien untersucht werden.



**Abbildung 12:** schematische Darstellung des metabotropen Glutamatrezeptors 8 (Abbildung verändert nach Pin et al., 2003)

### **2.3.3 Lokalisation und Funktion des GRM8**

#### Lokalisation des GRM8

Aktuell gibt es noch einige Unklarheiten über die genaue Funktion des metabotropen Glutamatrezeptor 8, insbesondere gestaltet sich die Analyse der exakten GRM8-Verteilung im

## 2. Einleitung

zentralen Nervensystem schwierig.

An der Synapse ist der metabotrope Glutamatrezeptor 8 präsynaptisch lokalisiert (Nicolleti et al., 2010).

Bei in-situ Hybridisierungen zeigten sich besonders hohe Expressionslevel im Bulbus olfactorius, in der grauen Substanz der Pons, Cortex piriformis, im Nucleus lateralis des Thalamus und in den Corpora mamillaria. Moderate Expressionslevel finden sich im Cortex cerebralis, im Hippocampus, im Cerebellum und in der Retina (Duvoisin et al., 1995, Saugstad et al., 1997).

Eine auffällig ausgeprägte Rezeptordichte des GRM8 konnte zum Beispiel auch an GABAergen Neuronen im Hippocampus nachgewiesen werden (Ferraguti et al., 2005).

In immunhistochemischen Untersuchungen zeigten sich hohe GRM8-Level in den Endgebieten des Tractus perforans lateralis des Gyrus dentatus (äußere molekulare Schicht) und im Stratum lacunosum-moleculare des Hippocampus (Shigemoto et al., 1997). Außerdem konnten im Bulbus olfactorius und im Cortex piriformis und entorhinalis eine hohe GRM8-Konzentration nachgewiesen werden (Kinoshita et al., 1996).

Im fetalen Gehirn wird der GRM8 in größerem Ausmaß exprimiert (Malherbe et al., 1999).

Neben dem zentralen Nervensystem wird der GRM8 auch an mehreren Stellen in der Retina exprimiert (Duvoisin et al., 1995).

### Funktion des GRM8

Die Hauptaufgabe des GRM8 scheint die Funktion als Glutamatautorezeptor zu sein. Damit trägt der GRM8 maßgeblich zur Modulation der Glutamatausschüttung bei (Cartmell et al., 2000; Schoepp, 2001; Robbins et al., 2007). Der Rezeptor kommt neben glutamatergen Neuronen auch an GABAergen Neuronen vor und bewirkt dort eine Reduktion der Transmitterausschüttung (Ferraguti et al., 2005). Die Modulation der Transmitterausschüttung erfolgt durch Inhibition von spannungsabhängigen N-Typ Kalziumkanälen (Guo et al., 2005).

Durch die Funktion als Autorezeptor an glutamatergen Neuronen ist der GRM8 also vor allem an der Regulation der Exzitabilität des zentralen Nervensystems beteiligt.

Um die Funktionen des metabotropen Glutamatrezeptors 8 genauer zu untersuchen, wurden Mäuse mit einem deaktivierten GRM8-Gen untersucht.

GRM8-Knock-out-Mäuse zeigten einen ängstlichen Phänotyp in verschiedenen Versuchen, eine verminderte Schmerzwahrnehmung, erhöhtes Körpergewicht, Beeinträchtigungen bei kognitiven Leistungen und Veränderungen der spontanen Bewegungsaktivität. Keine signifikanten Ergebnisse konnten bisher in GRM8-Mausmodellen zu psychotischen Symptomen, Lernen und Epilepsie gefunden werden (Linden et al., 2002; Gerlai et al., 2002; Duvoisin et al., 2005; Robbins et al., 2007, Fendt et al., 2010, Duvoisin et al., 2010a).

## 2. Einleitung

Die Arbeitsgruppe um Duvoisin stellt in einer neueren Studie fest, dass es bei den GRM8-Knock-out-Mäusen einen Unterschied zwischen männlichen und weiblichen Mäusen bezüglich Ängstlichkeit und kognitiven Leistungen gibt (Duvoisin et al., 2010a).

Außerdem wurden Studien mit selektiven mGluR8-Rezeptor-Agonisten durchgeführt. Einen der potentesten Liganden stellt (S)-3,4-dicarboxylphenylglycin ((S)-3,4-DCPG) dar. Bei Studien mit (S)-3,4-DCPG konnte eine dosisabhängige Erhöhung der Schwelle für epileptische Anfälle beobachtet werden (Robbins et al., 2007). Außerdem konnte eine analgetische Wirkung nachgewiesen werden, welche vermutlich auf einer Konzentrationserhöhung von Glutamat und einer verringerten Konzentration von GABA in der periaquäduktalen grauen Substanz basiert (Marabese et al., 2006 und 2007). Eine antinozizeptive und anxiolytische Wirkung des GRM8-Agonisten, (S)-3,4-DCPG, konnte auch in einem Arthritis-Schmerz-Modell nachgewiesen werden. Dabei wird die Wirkung durch eine Modulation der affektiven Schmerzbewertung und durch eine Schmerzmodulation in den Amygdala vermutet (Palazzo et al., 2008). Eine weitere Studie zu der Wirkung von (S)-3,4-DCPG nimmt eine starken anxiolytischen Effekt an (Schmid et al., 2006).

In einer neueren Studie zu den GRM8-Agonisten wurde neben (S)-3,4-DCPG auch ein neuer positiv allosterischer Modulator des GRM8-Rezeptors (AZ12216052) auf eine anxiolytische Wirkung getestet. Die Ergebnisse der Studie ließen die Autoren auf eine vielversprechenden pharmakotherapeutischen Ansatz bei Angststörungen, insbesondere für Patienten, die auf Benzodiazepine nicht adäquat ansprechen, schließen (Duvoisin et al., 2010b).

Eine antipsychotische Wirkung von (S)-3,4-DCPG konnte in Tiermodellen bisher nicht nachgewiesen werden (Robbins et al., 2007).

In einer 2009 veröffentlichten Studie zur Pharmakogenetik des Ansprechens auf Neuroleptika von Need und Kollegen wurde unter anderem eine Assoziation eines Markers (rs7778604) im GRM8-Gen mit der Verbesserung der kognitiven Leistungen unter antipsychotischer Therapie gefunden, dabei spielte es keine Rolle welches Medikament verabreicht wurde (es wurden 4 atypische und ein typisches Neuroleptika getestet) (Need et al., 2009).

In genetischen Studien zum Gen des metabotropen Glutamatrezeptors 8 wurden bisher Assoziationen zum Autismus (IMGFAC 1998; Philippe et al., 1999; Ashley-Koch et al., 1999; Liu et al., 2001; Risch et al., 1999; Barrett et al., 1999; Serajee et al., 2003; Li et al., 2008), zu Drogenabhängigkeit (Nielsen et al., 2008) und zur Schizophrenie (Takaki et al., 2004; Bolonna et al., 2001) gefunden. In den bisher durchgeföhrten genetischen Studien zur Epilepsie (Goodwin et al., 2000) bzw. zur Angststörung (Kobayashi et al., 2007) und dem metabotropen Glutamatrezeptor 8 konnte keine Assoziation gefunden werden.

### **2.3.4 Zusammenhang des metabotropen Glutamatrezeptors 8 mit der Schizophrenie**

Die Bedeutung des GRM8 für die Schizophrenie lässt sich insbesondere durch die Glutamathypothese, welche von einer hypoglutamatergen Stoffwechsellage im Gehirn schizophrener Patienten ausgeht, belegen (Coyle, et al., 2006; Sodhi et al., 2008). An der hypoglutamatergen Stoffwechsellage könnten die metabotropen Glutamatrezeptoren entscheidend beteiligt sein. Dabei könnten einerseits die postsynaptisch lokalisierten Gruppe I mGluRs, welche mitverantwortlich für die Funktion der NMDA-Rezeptoren sind, und andererseits die hauptsächlich präsynaptisch vorkommenden Gruppe II und III mGluRs, welche vor allem als Autorezeptoren die Glutamatfreisetzung kontrollieren, entscheidend in die Pathogenese involviert sein (Durand et al., 2008; Konradi et al., 2003). Durch seine Funktion als Glutamatautorezeptor und die bevorzugte Lokalisation in Hirnarealen, die mit der Schizophrenie in Zusammenhang gebracht werden, erscheint der GRM8 als relevanter Untersuchungsgegenstand in der Schizophrenieforschung (Takaki et al., 2004; Robbins et al., 2007).

Ein Erklärungsmodell zur Entstehung einer Schizophrenie stellt die Störung der neuronale Entwicklung und ZNS-Maturation dar. Die Tatsache, dass das Glutamatsystem eine entscheidende Rolle bei der Hirnentwicklung spielt, spricht für eine Beteiligung eines dysfunktionalen glutamatergen Systems an der Entstehung einer Schizophrenie (du Bois et al., 2007; Konradi et al., 2003). Da die metabotropen Glutamatrezeptoren maßgeblich an der Regulation der Glutamatfreisetzung (Gruppe II und III) und der Modulation der Glutamatwirkung (GRM Gruppe I) beteiligt sind, ist ein Einfluss auf die neuronale Entwicklung denkbar. Die Tatsache, dass der GRM8 im fetalen Hirn in größerem Ausmaß als im adulten Gehirn exprimiert wird (Malherbe et al., 1999), lässt vermuten, dass ein dysfunktionaler GRM8 zu Entwicklungsstörungen des Gehirns und damit auch zu der Entstehung der Schizophrenie beitragen kann.

Alternativ bzw. in Kombination zur neuronalen Entwicklungsstörung als Ursache der Schizophrenie wird eine neurodegenerative Ätiologie diskutiert. Der neurodegenerative Ansatz lässt sich durch eine Vielzahl von Studien, welche eine signifikante Häufung von neuronalen Struktur- und Funktionsanomalien bei schizophrenen Patienten zeigen, untermauern (Jakobi et al., 1927; Keshavan et al., 2008; Ross et al., 2006; Lawrie et al., 1998; Wright et al., 2000; Sun et al., 2009; Bernstein et al., 2009; Thompson et al., 2001). Der Verlust an grauer Substanz stellt dabei einen der bedeutendsten Befunde dar. Als Erklärungsansatz für die Volumenreduktion der grauen Substanz im Zusammenhang mit der Glutamathypothese dient der Prozess der Exzitotoxizität. Exzitotoxizität beschreibt die Apoptose von Neuronen aufgrund einer übermäßigen neuronalen Stimulation, diese kann durch eine übermäßige Glutamatfreisetzung oder durch einen verminderten inhibitorisch wirkenden GABA-Stoffwechsel entstehen (Konradi et al., 2003; Ferraguti

## 2. Einleitung

et al., 2005). Eine übermäßige Glutamatneurotransmission könnte ebenso durch einen defekten GRM8 erklärt werden, wie eine verringerte GABA-Freisetzung, da der GRM8 auch die GABA-Freisetzung moduliert (Ferraguti et al., 2005). Eine auffällig ausgeprägte Rezeptordichte des GRM8 konnte an GABAergen Neuronen im Hippocampus entdeckt werden (Ferraguti et al., 2005). Dies ist bezüglich der Tatsache besonders interessant, als dass vor allem im Hippocampus bei schizophrenen Patienten eine Volumenreduktion beobachtet werden kann (Keshavan et al., 2008). Es wäre also denkbar, dass durch einen dysfunktionalen GRM8 eine exzessive Glutamatfreisetzung durch eine Dysinhibition glutamaterger Synapsen, wegen einer reduzierten GABA-Transmission, zu einer gesteigerten Apoptose und damit zu einer Volumenreduktion vor allem im Hippocampus führt. Ein weitere Überlegung wäre, dass der metabotrope Glutamatrezeptor 8, welcher unter anderem als Autorezeptor die Glutamattransmission verringert, durch eine funktionale Veränderung zu einer gesteigerten Glutamatfreisetzung und damit zu einer neuronalen Hyperexzitabilität führt (Serajee et al., 2003), welche wiederum neuronale Schäden und damit einen Verlust der grauen Substanz bewirken könnte.

Einen weiteren interessanten Ansatz bietet die Tatsache, dass Schizophrenie und Autismus aus pathophysiologischer und genetischer Sicht ähnliche Ursachen haben (Burbach et al., 2009; Carroll et al., 2009). Die Annahme von ähnlichen pathogenetischen Ursachen und neuronalen Entwicklungsstörungen, vor allem bezüglich Synapsenbildung und -plastizität dieser beiden neuropsychiatrischen Erkrankungen wird durch ähnliche Defizite im Bereich der sozialen Wahrnehmung (Couture et al., 2010), gemeinsame genetische Suszeptibilitätsloci und durch das Auftreten von Komorbidität dieser beiden Krankheiten gestützt. Bisher wurde in einer Studie eine Assoziation des GRM8-Gen mit Autismus nachgewiesen (Serajee et al., 2003) und in einigen Kopplungsstudien zeigte der Genlocus des metabotropen Glutamatrezeptors 8 einen Zusammenhang zum Autismus (IMGFAC 1998; Philippe et al., 1999; Ashley-Koch et al., 1999; Liu et al., 2001; Risch et al., 1999; Barrett et al., 1999).

Schon bevor genetische Parallelen zwischen der Schizophrenie und dem Autismus gefunden wurden, deuteten Studienergebnisse wie ein erhöhtes Risiko für Autismus bei Kindern schizophrener Eltern auf einen Zusammenhang zwischen den beiden Erkrankungen hin (Larsson et al., 2005). Insgesamt gesehen sind einige Gemeinsamkeiten in der Pathophysiologie und der genetischen Ätiologie der beiden neuropsychiatrischen Erkrankungen wahrscheinlich und somit könnte eine Assoziation des GRM8 mit Autismus auch auf einen Zusammenhang zwischen GRM8 und Schizophrenie hinweisen.

In Zusammenschau der im Literaturüberblick gewonnenen Erkenntnisse über die Lokalisation, die Funktion des metabotropen Glutamatrezeptors 8 und über die bisherigen Entstehungsmodelle der Schizophrenie erscheint es denkbar, dass Alterationen im GRM8-Gen einen Beitrag zur

## 2. Einleitung

Ätiopathogenese der Schizophrenie leisten könnten. Bisher wurden in zwei genetischen Assoziationsstudien SNPs im GRM8-Gen auf ihren Zusammenhang mit der Schizophrenie geprüft.

### **2.3.5 Überblick zu Referenzstudien zum GRM8 als Suszeptibilitätslocus der Schizophrenie**

In Kopplungsstudien wurde kein Zusammenhang zwischen Schizophrenie und der Genomregion des GRM8 gefunden (Moises et al., 1995). Das könnte an der geringeren Sensitivität der Kopplungsstudien für Gene mit geringerem Einfluss auf eine Krankheit liegen (Tandon et al., 2008).

Bisher wurden zwei Assoziationsstudien zum metabotropen Glutamatrezeptor 8 im Zusammenhang mit Schizophrenie durchgeführt. In der ersten Studie von Bolonna und Kollegen (2001) konnte keine Assoziation nachgewiesen werden, die zweite Studie durchgeführt von Takaki und Kollegen (2004) fand eine Assoziation zwischen Polymorphismen im GRM8-Gen und der Schizophrenie.

#### Studie von Bolonna et al. (2001)

Diese Assoziationsstudie wurde mit 105 schizophrenen Patienten und 108 Kontrollprobanden durchgeführt. Die Patienten waren weiße Kaukasier mit britischer Abstammung und im Schnitt 55 (SD 18,4) Jahre alt, der Anteil der Männer betrug 70%. Die diagnostische Einordnung erfolgte mittels DSM III/IVR und basierte auf der Analyse von Krankenakten. Alle teilnehmenden Patienten waren theapieresistent gegenüber typischen Neuroleptika und wurden zum Studienzeitpunkt mit Clozapin behandelt. Für die Kontrollgruppe wurden Probanden gleicher Ethnizität, die keine psychische Erkrankung in der Vorgeschichte hatten, ausgewählt. Der Männeranteil betrug 46% und das durchschnittliche Alter wurde mit 40 (SD 10,5) Jahren angegeben.

Um den Zusammenhang des GRM8 mit der Schizophrenie zu testen wurde der Marker 2846-C/T gewählt. Der 2846-C/T-Polymorphismus befindet sich 29 Basenpaare nach dem Stopcodon.

Die Verteilung der Genotypen und Allele zeigte keinen signifikanten Unterschied zwischen den Patienten und den Kontrollen (Genotypen:  $\chi^2=0,92$ ;  $p=0,63$ ; Allele:  $\chi^2=0,13$ ;  $p=0,72$ ). In absoluten Zahlen betrachtet zeigte sich bei den Patienten eine geringere Anzahl an 2846-T Homozygoten, allerdings konnte auch die Annahme eines T-dominanten oder eines T-rezessiven Models nicht bestätigt werden. Dafür wurden 2846-C/2846-C vs. 2846-C/2846-T + 2846-T/2846-T Genotypen für ein T-dominantes Modell und 2846-T/2846-T vs. 2846-T/2846-C + 2846-C/2846-C für ein T-rezessives Modell verglichen ( $\chi^2=0,07$ ,  $df=1$ ,  $p=0,79$ ;  $\chi^2=0,66$ ,  $p=0,42$ ).

Die Autoren gaben die Power ihrer Studie zur Identifizierung einer Assoziation mit einer odds ratio von 2,5 mit 80% an. Damit konnten sie mit dem Ergebnis ihrer Analysen einen moderaten bis

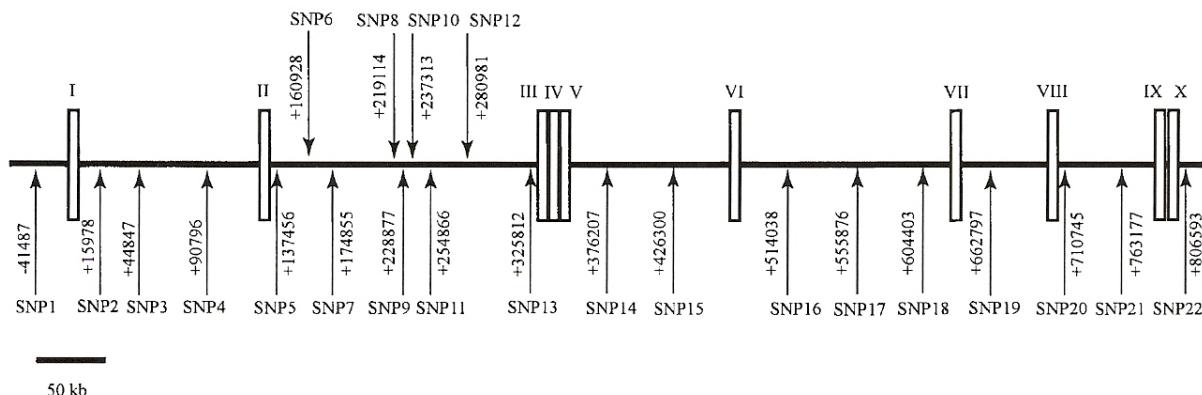
## 2. Einleitung

starken Effekt dieses Polymorphismus auf die Schizophrenieentstehung ausschließen, eine schwache Assoziation zwischen GRM8 und der Schizophrenie war mit dieser Studie allerdings nicht nachweisbar.

### Studie von Takaki et al. (2004)

In dieser Assoziationsstudie wurden 100 Kontrollprobanden mit 100 schizophrenen Patienten verglichen. Die nicht-verwandten Patienten wurde in Krankenhäusern rund um Fukuoka und Oita rekrutiert, es wurden schließlich 44 Frauen und 56 Männer mit einem Altersdurchschnitt von 49,5 Jahren in die Analysen eingeschlossen. Die Diagnose der Schizophrenie wurde mittels der DSM-IV-Kriterien gestellt. Die Kontrollgruppe bestand aus 50 Frauen und 50 Männern die im Durchschnitt 51,2 Jahre alt waren und ebenfalls in der Gegend rund um Fukuota rekrutiert wurden. Zur Ethnizität der Studienteilnehmer wurde keine genauen Angabe gemacht.

Als Marker für das GRM8-Gen wurden 22 SNPs (vgl. Abbildung 13) mit einem durchschnittlichen Abstand zwischen den einzelnen SNPs von 40,3kb gewählt, die durchschnittliche Mindestallelfrequenz der SNPs betrug 0,30. Außerdem wurden Haplotypen getestet.



**Abbildung 13:** Darstellung der Genstruktur des GRM8 und der untersuchten SNPs (Takaki et al., 2004)

Als statistische Power wurde ein Wert von 0,74 für die Entdeckung von Suszeptibilitätsgenen bei einem relativen Risiko von 1,8 angegeben.

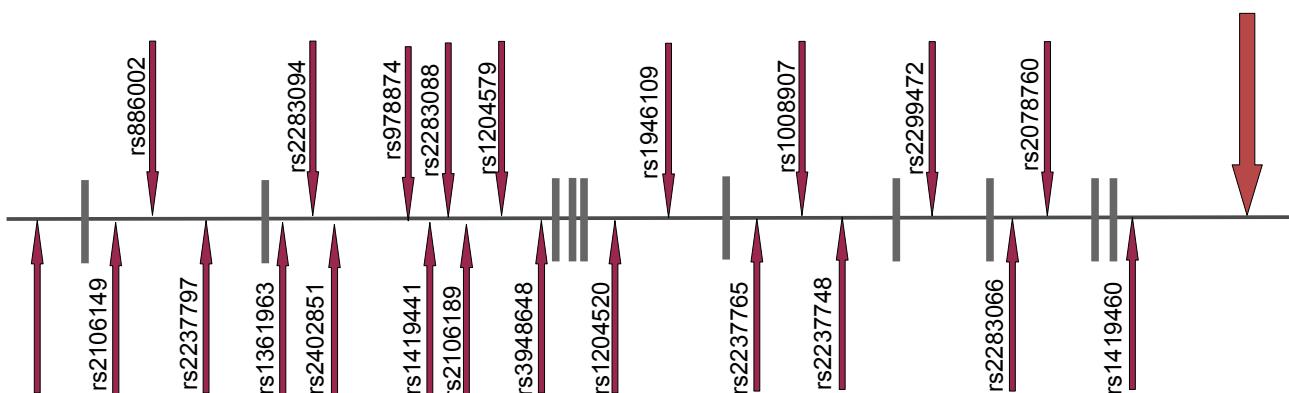
Zwei SNPs (SNP18: Allele  $p=0,0297$ , Genotypen  $p=0,0124$  und SNP19: Allele  $p=0,0302$ , Genotypen  $p=0,127$ ) zeigten eine direkte Assoziation zur Schizophrenie. Allerdings konnte für beide SNPs nach Bonferroni-Korrektur keine signifikante Assoziation mehr nachgewiesen werden. Bei der Haplotypenanalyse zeigte die Kombination von SNP11-SNP18 das signifikanteste Ergebnis ( $\chi^2=10,34$ ,  $df=3$ ,  $p=0,0002$ ), allerdings zeigte diese Kombination ein niedriges Linkage Disequilibrium mit  $D'=0,2418$ . Das zweitbeste Ergebnis erzielte die Kombination von SNP5-SNP6

## 2. Einleitung

( $\chi^2=18,12$ ,  $df=3$ ,  $p=0,0004$ , nach Bonferroni-Korrektur  $p=0,0924$ ). Aus diesem Grund wurden Haplotypen um diese beiden Marker gebildet, welche auch nach Bonferroni-Korrektur noch ein signifikantes Ergebnis aufwiesen (SNP4-SNP5-SNP6:  $\chi^2=27,50$ ,  $df=7$ ,  $p=0,0075$ , nach Bonferroni-Korrektur  $p=0,015$ ; SNP5-SNP6-SNP7:  $\chi^2=23,92$ ,  $df=3$ ,  $p=0,0011$ , nach Bonferroni-Korrektur  $p=0,0022$ ). Die Autoren der Studie schlossen auf einen Suszeptibilitätslocus für Schizophrenie im Bereich der SNPs5-7 im GRM8-Gen für die japanische Population.

### Zusammenfassung der bisherigen Ergebnisse zum GRM8-Gen und der Schizophrenie

Bisher wurden zwei genetische Assoziationsstudien zum GRM8-Gen und der Schizophrenie publiziert (Bolonna et al., 2001; Takaki et al., 2004). In der an einer kaukasischen Bevölkerung durchgeföhrten Untersuchung von Bolonna et al. (2001) zeigte der analysierte Marker 2846-C/T (vgl. Abbildung 12) keine signifikante Assoziation mit der Schizophrenie (vgl. Tabelle 5). In der japanischen Stichprobe von Takaki und Kollegen (2004) wurde ein Zusammenhang zwischen dem GRM8-Gen und der Schizophrenie postuliert (vgl. Abbildung 14 und Tabelle 5, Seite 46). Das signifikanteste Ergebnis erreichte die Arbeitsgruppe um Takaki (2004) mit der Bildung des Haplotypen um die SNPs rs1361963, rs2283094 und rs2402851 ( $p=0,0011$  nach Bonferroni-Korrektur  $p=0,0022$ ).



**Abbildung 14:** Darstellung der bisher untersuchten Marker im GRM8-Gen (schmale Pfeile = Takaki et al., 2004; dicker Pfeil = Bolonna et al., 2001)

## 2. Einleitung

Tabelle 5: Darstellung der Ergebnisse der bisherigen Studien zum GRM8-Gen und der Schizophrenie (Bolonna et al., 2001 (farbig unterlegt); Takaki et al., 2004)

| Marker    | P-Wert<br>(Genotyp) | P-Wert (Allel) | Marker           | P-Wert<br>(Genotyp) | P-Wert (Allel) |
|-----------|---------------------|----------------|------------------|---------------------|----------------|
| rs1419391 | 0,3928              | 0,2322         | rs3948648        | 0,4019              | 0,2641         |
| rs2106149 | 0,5356              | 0,3400         | rs1204520        | 0,2344              | 0,1598         |
| rs886002  | 0,9514              | 0,9069         | rs1946109        | 0,5744              | 0,6047         |
| rs2237797 | 0,9579              | 0,9087         | rs2237765        | 0,3850              | 0,2244         |
| rs1361963 | 0,5049              | 0,5612         | rs1008907        | 0,1112              | 0,0639         |
| rs2283094 | 0,3698              | >0,9999        | <b>rs2237748</b> | <b>0,0279</b>       | <b>0,0124</b>  |
| rs2402851 | 0,7820              | 0,6385         | <b>rs2299472</b> | <b>0,0302</b>       | <b>0,0127</b>  |
| rs978874  | 0,5547              | >0,9999        | rs2283066        | 0,0911              | 0,1188         |
| rs1419441 | 0,9880              | >0,9999        | rs2078760        | 0,2235              | 0,1756         |
| rs2283088 | 0,7641              | >0,9999        | rs1419460        | 0,4433              | 0,8388         |
| rs2106189 | 0,9056              | 0,9147         | 2846-C/T         | 0,63                | 0,72           |
| rs1204579 | 0,7692              | 0,8331         |                  |                     |                |

## 2.4 Fragestellung

Eine starke genetische Komponente bei der Ätiologie der Schizophrenie gilt heute als gesichert. Es wird eine Heritabilität von 80% angenommen, wobei von einem polygenen Erbgang ausgegangen wird, bei welchem entweder viele genetische Veränderungen mit einzeln relativ geringem Effekt zusammen zu einem erhöhten Erkrankungsrisiko führen oder in ca. 1% der Fälle seltene, relativ große genomische Veränderungen mit einem moderat bis stark erhöhtem Erkrankungsrisiko einhergehen.

Um Gene mit relativ geringem Einfluss auf eine komplexe Erkrankung, wie die Schizophrenie, zu detektieren, zeigten sich Assoziationsstudien als gut geeignet.

Das Gen des metabotropen Glutamatrezeptors 8 konnte im Literaturüberblick als mögliches Kandidatengen der Schizophrenie ausgewiesen werden. Da der GRM8 vor allem als Autorezeptor an glutamatergen Neuronen fungiert und dadurch die Glutamatfreisetzung reguliert. Somit könnte ein Alteration des Rezeptors zu einer hypoglutamatergen Stoffwechsellage führen, welche zur Entstehung der Schizophrenie beitragen könnte.

In den zwei bereits durchgeföhrten Assoziationsstudien zum GRM8-Gen im Zusammenhang mit der Schizophrenie, konnten Bolonna et al. (2001) keine Assoziation nachweisen, 3 Jahre später allerdings zeigten Takaki et al. (2004) einen Zusammenhang zwischen Polymorphismen im GRM8-

## 2. Einleitung

Gen und der Schizophrenie.

Ziel der vorliegenden Studie ist es, Zusammenhänge zwischen den SNPs rs6976644, rs7797614, rs17149799, rs13225837, rs7808001 des GRM8-Gens und der Schizophrenie zu erfassen. Dazu wurden Allel- und Genotypenfrequenzen von 500 schizophrenen Patienten mit denen von 605 gesunden Kontrollprobanden verglichen.

## **3. Material und Methoden**

### **3.1 Studiendesign**

Als Studiendesign wurde die Fall-Kontroll-Studie gewählt.

Dafür wurde eine Gruppe von 500 schizophrenen, nicht-verwandten Patienten kauasischer Abstammung, mit einer Kontrollgruppe von 605 gesunden, deutschstämmigen und nicht-verwandten Probanden verglichen.

Bei der Patientengruppe wurde mittels eines mehrstufigen Auswahlverfahrens die Diagnose der Schizophrenie gesichert und Ausschlusskriterien abgeklärt.

Auch die Kontrollprobanden durchliefen ein mehrstufiges Auswahlverfahren, um psychiatrische und neurologische Erkrankungen neben allgemeinen Ausschlusskriterien auszuschließen.

Neben standardisierten Interviews wurde bei allen Studienteilnehmern eine venöse Blutentnahme durchgeführt.

#### **3.1.1 Vorbedingungen der Studiendurchführung**

Die Studie wurde mit Zustimmung der lokalen Ethikkommission durchgeführt. Alle Studienteilnehmer wurden vor Beginn der Studie über Inhalt, Umfang und Ziele der Studie, die Anonymisierung der Daten und Blutproben, sowie eventuelle Risikofaktoren aufgeklärt. Stimmten die Probanden der Studienteilnahme zu, gaben sie eine schriftliche Einverständniserklärung ab.

#### **3.1.2 Kontrollprobanden**

Für die Kontrollgruppe wurden 605 Probanden deutscher Abstammung aus der Bevölkerung Münchens mit Hilfe des Einwohnermeldeamts rekrutiert. Die mittels Zufallsauswahl bestimmten Personen wurden auf dem Postweg zur Teilnahme an der Studie eingeladen. Bei positiver Rückantwort wurden in einem Telefonscreening Kriterien abgeklärt, die zum Ausschluss der Studie geführt hätten. Solche Kriterien waren psychiatrische oder neurologische Erkrankungen der Person selbst oder Familienangehörigen ersten Grades. Gab es hierfür keine klaren Hinweise wurden den potentiellen Probanden zwei Anamnesebögen zugeschickt. Im ersten Anamnesebogen wurden allgemeine Daten wie Gewicht, Größe, Alter, Geburtsort, Familienstand, Abstammung, somatische und psychiatrische Erkrankungen des Probanden und dessen

### 3. Material und Methoden

Familienangehörigen, Rauchverhalten, Alkohol- und Drogenkonsum und suizidales Verhalten erhoben. Der zweite Anamnesebogen befasste sich mit der Lebensgeschichte der Probanden und war unterteilt in die Abschnitte schulische und berufliche Laufbahn, Kinder- und Jugendzeit, Familie und soziale Situation. Lagen auch weiterhin keine Ausschlusskriterien vor, wurden die Probanden zu einem ausführlichen Interview eingeladen.

Das Gespräch wurde mittels eines strukturierten klinischen Interview zu DSM-IV (SKID I und SKID II, Wittchen et al., 1996 und 1997) geführt, welche als halbstrukturierte Interviews zur Diagnosefindung von Achse-I-Störungen (Psychopathologie, SKID I) und von Achse-II-Störungen (Persönlichkeitsstörungen, SKID II) dienen. Für die Erhebung von psychiatrischen Erkrankungen unter den Verwandten ersten Grades wurde das *Family History Assessment Module* (Rice et al., 1995) verwendet. Außerdem wurde mit allen Probanden der Hamburg-Wechsler-Intelligenz-Test für Erwachsene in revidierter Form (HAWIE-R, Tewes, 1994) durchgeführt, um die allgemeine kognitive Leistungsfähigkeit einzuschätzen zu können. Bei Studienteilnehmern, die älter als 60 Jahre alt waren, wurde zur Abklärung kognitiver Einbußen zusätzlich der Mini-Mental-State-Test (MMST, Kessler et al., 1990) erhoben.

Ein Studieneinschluss erfolgte nur bei negativer psychiatrischer Familienanamnese, dem Fehlen von Achse-I-Störungen und Achse-II-Störungen (*lifetime*) und nach Ausschluss relevanter neurologischer Erkrankungen. Ein Gesamt-IQ unter 80 (HAWIE-R) führte ebenso wie ein MMST-Wert unter 26 Punkten zum Ausschluss aus der Studie.

Schließlich wurden 605 Probanden deutscher Abstammung ohne eigene oder bei Erstgradangehörigen vorkommende psychiatrischen und neurologischen Erkrankungen in die Studie eingeschlossen (vgl. Tabelle 6, Seite 51).

Dabei waren 277 (45,8%) Probanden männlich und 328 (54,2%) weiblich, das durchschnittliche Alter betrug 45,36 Jahre (zwischen 21 und 72 Jahren). Von den Kontrollprobanden hatten 115 (19,0%) den Hauptschulabschluss, 210 (34,7%) den Realschulabschluss und 280 (46,3%) den Gymnasialabschluss.

#### 3.1.3 Patienten

Die Patientengruppe bestand aus 500 schizophrenen Personen kaukasischer Abstammung. Darunter befanden sich 325 (65,0%) Männer und 175 (35,0%) Frauen (vgl. Tabelle 6, Seite 51), die im Mittel 37,74 Jahre alt waren (zwischen 18 und 70 Jahren). Bei den Patienten hatten 217 (43,4%) den Hauptschulabschluss, 135 (27,0%) den Realschulabschluss und 148 (29,6%) den

### 3. Material und Methoden

Gymnasialabschluss.

Die Patienten wurden zu einem diagnostischen Interview eingeladen. Zunächst wurden allgemeine Daten mittels einer standardisierten Anamnese erhoben. Diese umfasste die Lebensgeschichte seit der Kindheit, eigene Erkrankungen und somatische Krankenhausaufenthalte, aktuelle Medikation, ambulante und stationäre psychiatrische Behandlungen, eventuelle Suizidversuche, Raucheranamnese, Alkohol- und Drogenkonsum, schulische und berufliche Karriere, Familienstand und die derzeitige finanzielle, berufliche und Wohnsituation. Außerdem wurde in einer ausführlichen Familienanamnese neben somatischen Erkrankungen vor allem psychiatrische Krankheiten mit eventueller stationärer und ambulanter Behandlung, sowie Suizidversuche oder Suizide in der Familie erfragt.

Im Anschluss daran diente das strukturierte klinische Interview zu DSM IV (SKID I) als Gesprächsleitfaden zur Diagnosefindung, bei welchem die Achse-I-Störungen abgefragt wurden.

Das semistrukturierte Interview (SKID I) ist in 9 Sektionen gegliedert:

Dabei erfasst Sektion A affektiven Symptome, in Sektion B werden psychotische Symptome abgefragt und der C-Teil dient zur diagnostischen Einordnung der psychotischen Symptome. So kann die Schizophrenie von der schizoaffektiven, der schizophreniformen und der kurzen psychotischen Störung unterschieden werden. Für die Diagnose der Schizophrenie müssen mindestens zwei der fünf charakteristischen Merkmale, nämlich Wahnvorstellungen, Halluzinationen, desorganisierte Sprechweise, grob desorganisiertes oder kataton Verhalten bzw. Negativsymptomatik, die durch Affektverflachung, Alogie oder Antriebshemmung gekennzeichnet ist, vorliegen. Falls es sich um bizarre Wahnvorstellungen oder dialogisierende bzw. kommentierende Stimmen handelt, kann auch bei Vorliegen nur eines Symptoms die Diagnose der Schizophrenie gestellt werden. Als zeitliches Kriterium wird das Vorliegen von Symptomen über einen Zeitraum von mindestens sechs Monaten gefordert, wovon mindestens einen Monat lang eine akute Episode vorliegen muss. Des Weiteren muss die Störung zu einem deutlichen klinischen Leiden mit zumindest zeitweisem deutlichen Absinken des Leistungsniveaus führen und darf nicht die direkte Folge von Substanzmissbrauch bzw. -abhängigkeit oder eines allgemeinen medizinischen Krankheitsfaktors sein. Außerdem wird in dieser Sektion der Subtyp der Schizophrenie (paranoid, kataton, desorganisiert oder undifferenziert), die Verlaufsform (episodisch mit oder ohne Residualsymptome, kontinuierlich, einzelne Episode) und das Alter bei Beginn der Erkrankung bestimmt.

Im folgenden D-Teil werden die im A-Teil erhobenen affektiven Symptome differenzialdiagnostisch eingeordnet.

Der E-Teil erfasst Störungen durch psychotrope Substanzen, der F-Teil Angststörungen, der G-

### 3. Material und Methoden

Teil somatoforme Störungen, der H-Teil Essstörungen und der I-Teil Anpassungsstörungen.

Zuletzt wird die globale Leistungsfähigkeit zum Interviewzeitpunkt und während der schlimmsten Phase der Erkrankung beurteilt, dafür wird der Patient unter anderem nach Problemen im sozialen, beruflichen, familiären Umfeld und nach Schwierigkeiten bei der Alltagsbewältigung gefragt.

Konnte durch den SKID I eindeutig eine Schizophrenie diagnostiziert werden und lagen keine Ausschlusskriterien vor, wurden die Probanden in die Studie aufgenommen.

Als Ausschlusskriterien galten jegliche organische Erkrankungen, die zur Entstehung der Symptome führen hätten können. So führten Epilepsie, ein Schädel-Hirn-Trauma, eine Enzephalopathie, eine Neurolues falls sie vor Beginn der Schizophrenie vorlagen zum Ausschluss. Als grundsätzliche Ausschlusskriterien galten eine HIV- oder Hepatitis C- Infektion. Grundsätzlich wurden in die Studie nur Patienten kauasischen Ursprungs aufgenommen.

Tabelle 6: Alters- und Geschlechterverteilung der untersuchten Stichprobe

| Gruppe       | Alter (Jahre)<br>Mittelwert (SD) | Geschlecht n (%)<br>männlich | weiblich   | Gesamt n |
|--------------|----------------------------------|------------------------------|------------|----------|
| Kontrollen   | 45,36 (15,24)                    | 277 (45,8)                   | 328 (54,2) | 605      |
| Patienten    | 37,74 (11,30)                    | 325 (65,0)                   | 175 (35,0) | 500      |
| Gesamt n (%) |                                  | 602 (54,5)                   | 503 (45,5) | 1105     |

## 3.2 Laborverfahren

### 3.2.1 DNA-Extraktion

Bei allen Patienten und Probanden wurde venös Blut abgenommen. Um eine Gerinnung des Blutes zu verhindern, wurden EDTA-Röhrchen verwendet.

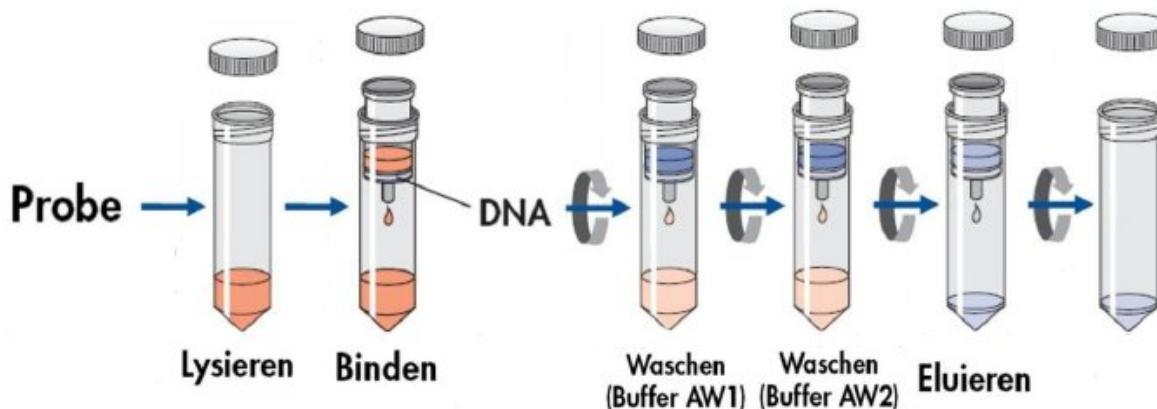
Die DNA wurde mittels dem QIAamp DNA Blood Maxi Kit Protokoll (Firma QIAGEN GmbH, 2005) gewonnen (Abbildung 15, Seite 52).

Die dafür benötigten Materialien werden in der folgenden Tabelle aufgelistet:

### 3. Material und Methoden

Tabelle 7: Materialien für die DNA-Extraktion

| Material                        | Volumen | Hersteller |
|---------------------------------|---------|------------|
| QIAamp Maxi Spin Röhrchen       |         | Qiagen     |
| Sammelröhren                    |         | Qiagen     |
| QIAGEN Protease                 | 500µl   | Qiagen     |
| Puffer AL                       | 12ml    | Qiagen     |
| Ethanol (96-100%)               | 10ml    | Rothen     |
| Puffer (Guanidin-HCL)           | 5ml     | Qiagen     |
| Waschpuffer (ethanolhaltig)     | 5ml     | Qiagen     |
| Puffer AE (Tris-Puffer; pH>9,0) | 1ml     | Qiagen     |



**Abbildung 15: Ablauf der DNA-Extraktion** (Abbildung verändert nach QIAamp Blood Midi/Maxi Handbook, 2005)

#### Schritt 1: Vorbereitung der Blutprobe und Zelllyse

Zuerst wurden zur Lyse der DNA 5-10ml Blut mit 500µl QIAGEN Protease vermischt, um durch Verdauung und Degradierung der denaturierten Proteine eine leichtere Trennung der DNA zu erreichen. Damit die DNA sich leichter auf dem Silicagel bindet, wurde der DNA ihre Hydrathülle mittels eines Guanidin-HCL-haltigen AL-Puffers (12ml) entzogen. Nach Zugabe der Reagenzien wurde das Gemisch zwei Minuten gevortext, um eine homogene Lösung zu erhalten. Im Anschluss daran wurde der Reaktionsansatz 30 Minuten im 70 Grad warmen Wasserbad unter Schütteln inkubiert.

#### Schritt 2: Adsorption der DNA an die Silikagel-Membran

Im nächsten Schritt wurden zur Fällung der DNA 10ml Ethanol zugegeben und im Anschluss daran nochmal zwei Minuten auf dem Vortexer vermischt. Als nächstes wurden 5ml des Ansatzes in ein

### 3. Material und Methoden

neues 50ml Zentrifugenröhren, in welchem eine Silikagel-Membran plaziert war, gegeben. Dann wurde der Ansatz für 3 Minuten bei 3000 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert. Durch die Salz- und pH-Bedingungen wurde eine Bindung von Proteinen und RNA an der Silikagel-Membran verhindert.

#### Schritt 3: Reinigung der DNA

Die an der Silikagel-Membran gebundene DNA wurde nun in zwei Zentrifugationsschritten unter Verwendung von zwei Waschpuffern gereinigt:

Zunächst wurde ein Guanidin-HCL-haltiger Puffer (5ml) zugegeben und anschließend wurde die Probe für eine Minute bei 5000 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert.

Zur Entfernung des Guanidinsalzes wurde unter Zugabe von 5ml eines ethanolhaltigen Waschpuffers erneut für 15 Minuten bei 5000 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert.

Durch die Waschschrifte wurden vorhandene Kontaminationen durch Proteine oder RNA entfernt ohne die Bindung der DNA an die Silikagel-Membran zu beeinflussen.

#### Schritt 4: Elution der DNA von der Silikagel-Membran

Im letzten Schritt wurde nun die DNA mit Hilfe eines AE-Puffer (Trispuffer; pH>9,0; 1 ml) von der Silicamembran gelöst. Dafür wurde die bei saurem Milieu gebundene DNA mit dem basischen Puffer für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend für 5 Minuten bei 5000 rpm zentrifugiert. Da die DNA nur bei saurem Milieu an der Membran bindet, konnte sie durch den basischen Puffer eluiert werden.

Die gewonnene DNA wurde bei -80°C gelagert bzw. für die nachfolgende Genotypisierung verwendet.

#### 3.2.2 Bestimmung der DNA-Konzentration

Die Bestimmung der DNA-Konzentration erfolgte mittels der Quant-iT-Picogreen-Methode. Picogreen ist ein ultrasensitives floreszierendes Färbemittel für doppelsträngige DNA, mit welchem auch kleinste Mengen DNA detektiert werden können. Die Floureszenzintensität hängt dabei direkt mit der in der Probe enthaltenen DNA zusammen ([www.invitrogen.com](http://www.invitrogen.com)).

In der folgenden Tabelle werden die benötigten Materialien zur DNA-Konzentrationsbestimmung aufgelistet:

### 3. Material und Methoden

Tabelle 8: Materialien für die DNA-Konzentrationsbestimmung

| Material                                     | Hersteller                     |
|--|--------------------------------|
| <b>Verbrauchsmaterialien</b>                 |                                |
| 96 well Platte ( <i>flat bottom, black</i> ) | Greiner                        |
| Selbstklebende Aluminiumfolie                | Eppendorf                      |
| 50ml konische PP-Röhrchen                    | Sarstedt                       |
| <b>Reagenzien</b>                            |                                |
| PicoGreen dsDNA quantitation reagent         | Molecular Probes (Cat# P-7581) |
| 1x TE (pH 7,4), Tris Base, EDTA              | Roth                           |
| Clontech Human Genomic DNA 100ng/ $\mu$ l    | Clontech                       |
| <b>Geräte</b>                                |                                |
| Janus Automated Workstation                  | PerkinElmer                    |
| Victor 1420 Multilabelcounter                | PerkinElmer                    |
| Optiplex GX620 Pentium 4 HT                  | Dell                           |
| Vortexer Reax                                | Heidolph                       |

#### Herstellung der Standardverdünnungsreihe

Für die Bestimmung der DNA-Konzentration wurde zunächst eine Standardverdünnungsreihe hergestellt. Dafür wurde eine humane genomische DNA mit bekannter Konzentration (100ng/ $\mu$ l, Clontech) jeweils 1:1 mit H<sub>2</sub>O (bidest.) verdünnt. So entstand eine Referenzreihe, anhand welcher die DNA-Konzentration bestimmt werden konnte, mit den folgenden Konzentrationen: 100ng/ $\mu$ l, 50ng/ $\mu$ l, 25ng/ $\mu$ l, 12,5ng/ $\mu$ l, 6,25ng/ $\mu$ l, 3,125ng/ $\mu$ l, 1,5625ng/ $\mu$ l, 0ng/ $\mu$ l.

#### Vorbereitung der Messplatte

Im Anschluss daran wurde die zu untersuchende DNA vorbereitet. Diese wurde zunächst 1:10 vorverdünnt, da die Konzentration der gelagerten DNA, die in höherer Konzentration für die Langzeitlagerung stabiler ist, ohne Vorverdünnung den Messbereich übersteigen würde. Dazu wurden mit dem Roboter (Janus Automated Workstation, Perkin Elmer) auf eine ABgene 96 well Platte jeweils 5 $\mu$ l der zu untersuchenden DNA und 45 $\mu$ l H<sub>2</sub>O (bidest.) pipettiert.

Als nächstes konnte die Messplatte mit Hilfe eines Pipettierroboters (Janus Automated Workstation, Perkin Elmer) hergestellt werden. Dafür wurden zunächst auf einer 96 well Platte (96 well flat bottom plate, black, Greiner) je well 50 $\mu$ l H<sub>2</sub>O (bidest.) vorgelegt. In Spalte 1 und 2 der 96 well Platte wurden dann in Duplikaten jeweils 5 $\mu$ l der Standardverdünnungsreihe pipettiert. Die folgenden Spalten wurden mit jeweils 5 $\mu$ l der vorverdünnten DNA versehen. Zum Schluss wurden noch pro Vertiefung 145 $\mu$ l Picogreen-Gemisch zugegeben.

### 3. Material und Methoden

#### Durchführung der Messung

Nun wurde die Messplatte mittels eines Gitters in das Fluoreszenzmessgerät transportiert, wo die Messung der DNA-Konzentration durchgeführt wurde. Dafür wurde, nachdem die Messplatte für 30 Sekunden in Doppelkreisen geschüttelt worden, der Fluoreszenzfarbstoff Picogreen mit einer Wellenlänge von 485nm angeregt, um dann die Messung bei 535nm durchzuführen. Die Messzeit betrug pro well 0,1 Sekunden. Die Messergebnisse wurden an den Computer (Optiplex GX620, Dell) weitergeleitet, welcher automatisch den Mittelwert aus den Doppelbestimmungen berechnete. Zum Schluss wurde die DNA-Konzentration automatisch auf die Arbeitskonzentration von 50ng/ $\mu$ l eingestellt.

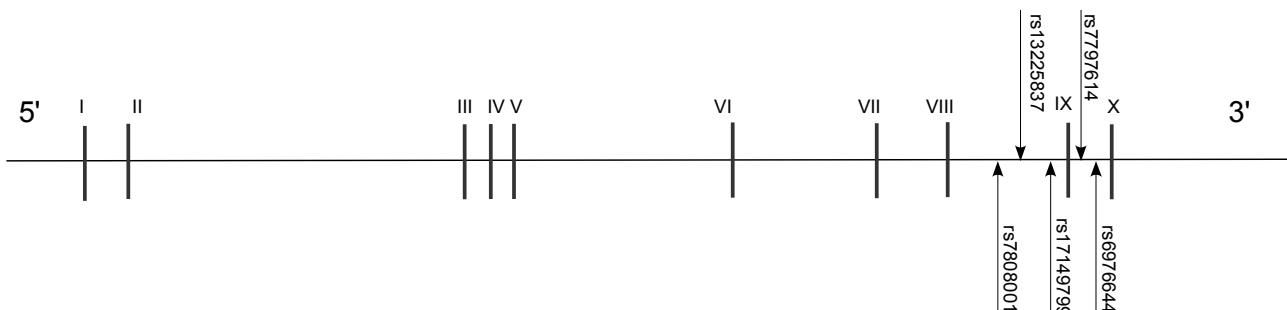
#### **3.2.3 Genotypisierung**

##### **3.2.3.1 Assaydesign**

Die Genotypisierung wurde an 5 SNPs im Gen GRM8 (metabotroper Glutamatrezeptor 8), welches auf Chromosom 7 lokalisiert ist, vorgenommen (vgl. Tabelle 9; Abbildung 16).

Tabelle 9: untersuchte Marker des GRM8-Gens

| ID/Accession No. | Contig Position | Chromosom 7 Position | Allel | Position im Gen | Funktion  |
|------------------|-----------------|----------------------|-------|-----------------|-----------|
| rs6976644        | 51264271        | 125867931            | C/T   | Intron 9        | unbekannt |
| rs7797614        | 51267662        | 125871322            | A/T   | Intron 9        | unbekannt |
| rs17149799       | 51275380        | 125879040            | C/T   | Intron 8        | unbekannt |
| rs13225837       | 51293545        | 125897205            | A/C   | Intron 8        | unbekannt |
| rs7808001        | 51299823        | 125903483            | C/T   | Intron 8        | unbekannt |



**Abbildung 16: schematische Darstellung des GRM8-Gens mit den untersuchten Polymorphismen**

### 3. Material und Methoden

Die Analysen der Polymorphismen wurden mittels des MassArray MALDI TOF MS (matrix assisted laser desorption/ionisation time of flight mass spectrometry) Systems der Firma Sequenom durchgeführt. Die MALDI-TOF basierte massenspektrometrische Messung ist auf die Hochdurchsatzanalyse von Einzelbasenaustauschen spezialisiert.

Um die für die massenspektrometrische Messung benötigten massenspezifischen Produkte jedes Allels eines SNPs zu erhalten, wurde das iPLEX-Verfahren verwendet.

Die Primer wurden für die Genotypisierung so gewählt, dass sie möglichst nahe am zu untersuchenden Polymorphismus lagen. Damit wurde sichergestellt, dass nur die gewünschten DNA-Abschnitte amplifiziert wurden (vgl. Tabelle 10).

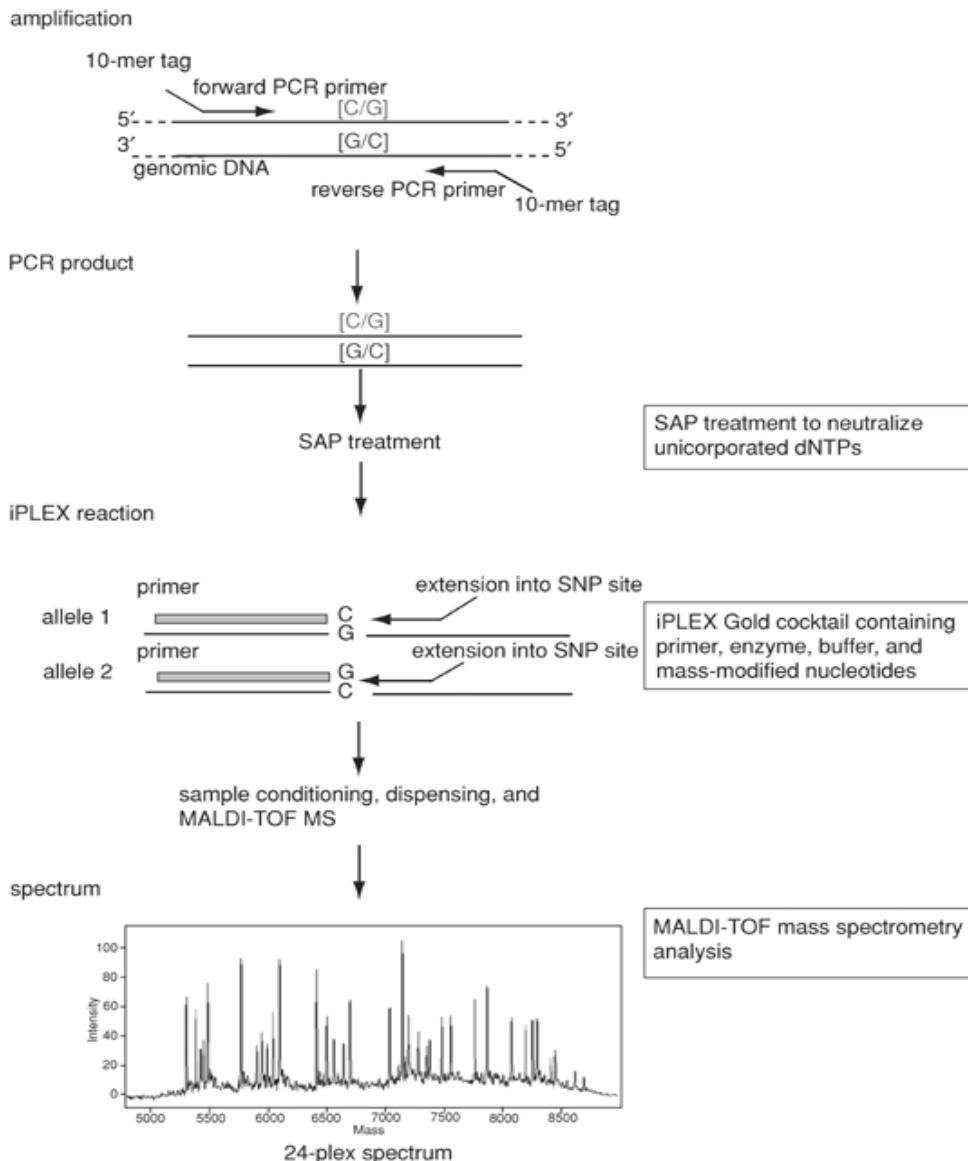
Tabelle 10: Primer

| SNP ID     | 2 <sup>nd</sup> PCR-Primer         | 1 <sup>st</sup> PCR-Primer         | Fragment-länge | Extend-Primer                       |
|------------|------------------------------------|------------------------------------|----------------|-------------------------------------|
| rs6976644  | ACGTTGGATGCCTACA<br>AGCTCCATTCAAG  | ACGTTGGATGTACAG<br>CATGTTACTGTCCTG | 183            | TATACAAATATCA<br>TTGCATTACAA        |
| rs7797614  | ACGTTGGATGCTTTT<br>TAGCAGCAATCCAG  | ACGTTGGATGAGGTG<br>AGTCTGAATGACTGG | 118            | cAACTTTATAAAA<br>TATGGTTGCCAA<br>AT |
| rs17149799 | ACGTTGGATGGGCTG<br>ATCTTGGAACATACC | ACGTTGGATGGACTT<br>GAAGGCAGTGAAGAG | 102            | ATACCAGGCATG<br>CTTC                |
| rs13225837 | ACGTTGGATGAACAG<br>GCAGAGGTTGGAAGA | ACGTTGGATGGTCTC<br>TAGGAAGCTCCAAAG | 99             | TGGAAGAGTTTG<br>GAAGT               |
| rs7808001  | ACGTTGGATGTCCTGT<br>AATCCCAGCAACTC | ACGTTGGATGATGTT<br>GCCCAGCCTAAAAC  | 120            | TGACAGCTTAAG<br>GACAGGAGT           |

#### 3.2.3.2 iPLEX-Verfahren

Das iPLEX-Verfahren beruht im Wesentlichen auf folgenden Schritten: Zunächst erfolgt eine konventionelle PCR zur Vervielfältigung des zu untersuchenden Genombereichs. Im Anschluss kommt eine spezielle PCR-Reaktion zum Einsatz, bei welcher für jedes Allel eines SNPs massenspezifische Produkte entstehen (vgl. Abbildung 17, Seite 57).

### 3. Material und Methoden



**Abbildung 17: schematische Darstellung der Reaktionen der Genotypisierung**  
([www.sequenom.com](http://www.sequenom.com))

#### Schritt 1: Die konventionelle PCR

Die konventionelle PCR zur Amplifikation des den SNP flankierenden Genombereichs wurde in 384er Mikrotitterplatten (Firma Abgene) durchgeführt. Alle Pipettierschritte wurden von einem Pipettierroboter (Mikrolab 4000, Firma Hamilton) ausgeführt, um Kontaminationen zu vermeiden (vgl. Tabelle 11, Seite 58).

### 3. Material und Methoden

Tabelle 11: Materialien für die konventionelle PCR

| Reagent                          | Volumen | Hersteller          |
|----------------------------------|---------|---------------------|
| Autoklaviertes H <sub>2</sub> O  | 1,850µl | Purelab ultra, ELGA |
| PCR Puffer mit MgCl <sub>2</sub> | 0,625µl | Qiagen              |
| MgCl <sub>2</sub> (25mM)         | 0,325µl | Qiagen              |
| dNTP Mix (25mM)                  | 0,100µl | ABgene              |
| Primer Mix (jeweils 500nM)       | 1,000µl | Qiagen              |
| Genomische DNA (50ng/µl)         | 1,000µl |                     |
| Hotstar Taq (5U/l)               | 0,100µl | Qiagen              |

Zunächst wurde jedes *well* mit 1,850µl H<sub>2</sub>O (ELGA), 0,625µl PCR Puffer (Qiagen), 0,325 µl MgCl<sub>2</sub> (25nM) (Qiagen), 0,1 µl dNTP (25nM) (Abgene), 1µl Primer Mix (je 500nM) (Qiagen), 1µl DNA (50ng/µl) und 0,1 µl Hotstar Taq (5U/µl) (Qiagen) bestückt. Nach vorsichtigem Mischen auf dem Vortexer wurden die Mikrotitterplatten zur Durchführung der PCR in einen Thermocycler (GenAmp, PCR System 9700, Firma Applied Biosystems) gegeben.

Dort erfolgte eine initiale Denaturierung durch Erwärmung auf 94°C für 15 Minuten. Dann wurden die Proben für 20 Sekunden auf 94°C gehalten, um die doppelsträngige DNA in ihre Einzelstränge zu trennen (Denaturierung). Anschließend wurde durch Abkühlung auf 55°C für 30 Sekunden das Anlagern der *forward*- und *reverse*- Primer bewirkt (Annealing). Um im nächsten Schritt durch eine Temperaturerhöhung auf 72°C für 60 Sekunden die Zweitstrangsynthese durchzuführen, dabei fügte die Taq-Polymerase die Nukleotide an die Primer an (Elongation).

Nach insgesamt 45 Zyklen standen genügend Template für den nächsten Reaktionsansatz zur Verfügung.

Abschließend wurden die Proben für die finale Extension 3 Minuten lang auf einer Temperatur von 72°C gehalten. Danach erfolgte die Abkühlung auf 4°C, um die Proben bis zur weiteren Verwendung aufbewahren zu können.

#### Schritt 2: Die SAP-Aufbereitung

Da bei der PCR nicht alle Nukleotide eingebaut wurden und diese bei Folgereaktionen stören würden, wurde der Ansatz mit Shrimp alkaline phosphatase (SAP) behandelt.

### 3. Material und Methoden

Tabelle 12: Materialien für die SAP-Aufbereitung

| Reagent                         | Volumen | Hersteller |
|---------------------------------|---------|------------|
| Autoklaviertes H <sub>2</sub> O | 1,530µl | Sequenom   |
| SAP Puffer 10x                  | 0,170µl | Sequenom   |
| SAP Enzym (1U/l)                | 0,300µl | Sequenom   |

Dafür wurden 0,170µl SAP 10x Puffer (Sequenom), 0,300µl Enzym (1U/µl) (Sequenom) und 1,530µl H<sub>2</sub>O (Sequenom) angesetzt und zu jedem Reaktionsansatz 2µl zugegeben (vgl. Tabelle 12). Anschließend wurde nach Vermischung auf dem Vortexer das Enzym bei 37°C für 20 Minuten inkubiert, um die Dephosphorilierung die freien Nukleotide zu erreichen und diese somit nicht mehr von der Polymerase eingebaut werden konnten. Um die SAP zu inaktivieren, wurde der Reaktionsansatz für 5 Minuten auf 85°C erhitzt.

#### Schritt 3: Die iPLEX-Reaktion

Nachdem mit Hilfe einer konventionellen PCR genügend Template des zu untersuchenden Genombereichs hergestellt wurden, folgte im nächsten Schritt die iPLEX-Reaktion.

Dabei handelte es sich um eine PCR mit modifizierten Bedingungen. Es wurden speziell entworfene Extend-Primer eingesetzt, die sich unmittelbar neben dem zu untersuchenden SNP anlagern. Außerdem wurden als Nukleotide Didesoxynukleotide verwendet, da diese Primer nur um eine Base verlängert werden konnten. Des Weiteren wurden den Nukleotide spezielle funktionelle Gruppen angehängt, die es ermöglichen sie anhand ihrer speziellen Massen zu unterscheiden.

Tabelle 13: Materialien für die iPLEX-Reaktion

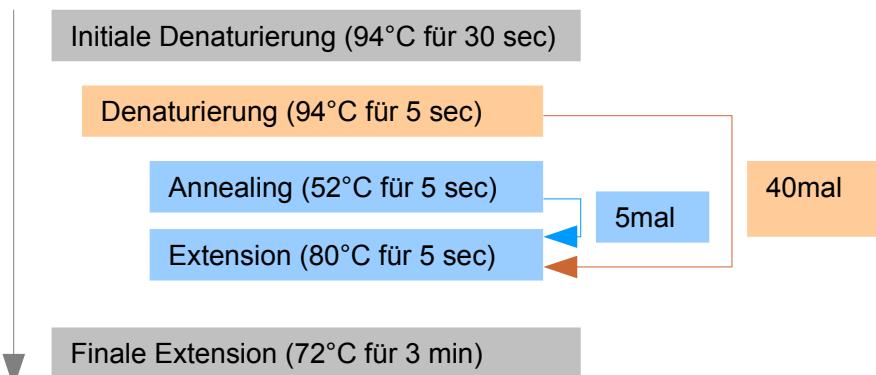
| Reagent                         | Volumen | Hersteller |
|---------------------------------|---------|------------|
| Autoklaviertes H <sub>2</sub> O | 0,755µl | Sequenom   |
| iPLEX Puffer 10x                | 0,200µl | Sequenom   |
| iPLEX Abbruch-Mix               | 0,200µl | Sequenom   |
| Primer Mix (7µM:14µM)           | 0,800µl | Sequenom   |
| iPLEX Enzyme                    | 0,041µl | Sequenom   |

Für den Reaktionsansatz wurden folgende Zusätze vermischt: 0,755µl H<sub>2</sub>O (Sequenom), 0,200µl iPLEX Puffer (Sequenom), 0,200µl iPLEX Abbruch-Mix (Sequenom), 0,800µl Primer Mix (7µM-14µM) (Sequenom), und 0,04 iPLEX Enzyme (Sequenom) (vgl. Tabelle 13). Die Reaktionen wurden in einem Thermocycler durchgeführt.

Als Erstes wurden die Proben für die initiale Denaturierung auf 94°C erhitzt und bei dieser Temperatur für 30 Sekunden gehalten.

### 3. Material und Methoden

Der weitere Reaktionsablauf lief in zwei Schleifen ab. Die äußere Schleife bestand aus Denaturierung, Annealing und Extension und wurde 40mal wiederholt. Innerhalb der äußeren Schleife bildeten Annealing und Extension die innere Schleife, welche 5mal wiederholt wurden, bevor das Thermocyclerprogramm zurück zur Denaturierung sprang. Insgesamt wurden auf diese Weise 200 Zyklen generiert. Die Denaturierung erfolgte bei 94°C, das Annealing bei 52°C und die Extension bei 80°C, die einzelnen Reaktionsschritte dauerten jeweils 5 Sekunden. Abschließend erfolgte die dreiminütige finale Extension bei 72°C (vgl. Abbildung 18).



**Abbildung 18: schematische Darstellung der iPLEX-Reaktion**

Nach der iPLEX-Reaktion mussten die Proben entsalzen werden, da zum Beispiel Natriumionen bei der späteren Messung im Massenspektrometer stören würden. Im Anschluss daran konnten die Primerextensionsprodukte auf einen Siliziumchip, der mit einer 2-Hydroxypicolinsäure-Matrix bedampft ist, übertragen werden. Dabei verhinderte die Matrix das Auskristallisieren der DNA, welches die Messung stark erschweren würde.

Nach Einbringen der Proben-DNA auf die 384er Matrix, wurde der Chip über eine Vakuumschleuse in des Massenspektrometer transportiert.

#### 3.2.3.3 MALDI-TOF Massenspektrometer Analyse

Im Massenspektrometer wurde die Matrix des Siliziumchips, auf welchen die Primerextensionsprodukte aufgetragen wurden, dann mit einem gepulsten Laser beschossen, wodurch das Probenmaterial verdampfte und zugleich ionisierte. Die dadurch entstandenen Ionen wurden im Vakuum beschleunigt und es konnte je nach benötigter Zeit zur Durchquerung des Flugkanals auf die Masse geschlossen werden.

Diese unterschiedlichen Massen konnten mit Hilfe der TYPER Analyzer 3.3.0 Software einem spezifischen Genotypen zugeordnet werden.

### **3.3 Statistische Auswertung**

Die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe der SPSS 17.0 Software (Statistical Package for Social Science, Inc Chicago, 2009). Die Verteilung der Genotypen wurde auf das Vorliegen des Hardy-Weinberg-Gleichgewichts getestet.

Ziel der Analysen war die Detektion von Unterschieden in der Allel- bzw. Genotypenverteilung zwischen Patienten- und Kontrollgruppe. Die Prüfung der Signifikanz erfolgte mittels des zweiseitigen Chi-Quadrat-Tests. Als Signifikanzniveau wurde ein Wert von  $p < 0,05$  festgelegt, ein  $p$ -Wert kleiner 0,10 wurde als Trend gewertet.

#### 4. Ergebnisse

## 4. Ergebnisse

Im Rahmen dieser Fall-Kontroll-Studie wurden die 5 SNPs rs6976644, rs7797614, rs17149799, rs13225837, rs7808001 des GRM8-Gens auf eine Assoziation mit Schizophrenie untersucht. Dafür wurden die Allel- und Genotypenfrequenzen von 500 schizophrenen Patienten mit 605 Kontrollprobanden verglichen.

Die Genotypenverteilung wurde bezüglich des Hardy-Weinberg-Gleichgewichts getestet.

### 4.1 Analyse des SNP rs6976644

#### Genotypenverteilung (rs6976644)

In der statistischen Auswertung der Genotypenverteilung, welche sich bezogen auf die Gesamtstichprobe im Hardy-Weinberg-Gleichgewicht befand ( $F=-0,002$ ,  $df=1$ ,  $p=0,953$ ), zeigte sich folgendes Ergebnis(vgl. Tabelle 14):

Tabelle 14: Genotypenverteilung des Polymorphismus rs6976644

| Gruppe     | Genotyp CC  | Genotyp CT  | Genotyp TT  | Gesamt |
|------------|-------------|-------------|-------------|--------|
| Kontrollen | 227 (37,5%) | 291 (48,1%) | 87 (14,4%)  | 605    |
| Patienten  | 187 (37,4%) | 241 (48,2%) | 72 (14,4%)  | 500    |
| Gesamt     | 414 (37,5%) | 532 (48,1%) | 159 (14,4%) | 1105   |

Die Genotypen unter Kontrollprobanden und Patienten waren gleich verteilt, es lag keine Assoziation zur Schizophrenie vor.

$$\chi^2 = 0,002; df = 2; p = 0,999$$

Im nächsten Schritt wurden C- bzw. T-Allel-Träger im Vergleich zum jeweiligen homozygoten Genotyp TT bzw. CC untersucht. Dabei ergaben sich folgende Ergebnisse (vgl. Tabellen 15/16):

Tabelle 15: Verteilung der gruppierten Genotypen (CC + CT vs. TT)

| Gruppe     | Genotyp CC + CT | Genotyp TT  | Gesamt |
|------------|-----------------|-------------|--------|
| Kontrollen | 518 (85,6%)     | 87 (14,4%)  | 605    |
| Patienten  | 428 (85,6%)     | 72 (14,4%)  | 500    |
| Gesamt     | 946 (85,6%)     | 159 (14,4%) | 1105   |

#### 4. Ergebnisse

Tabelle 16: Verteilung der gruppierten Genotypen (CC vs. CT + TT)

| Gruppe     | Genotyp CC  | Genotyp CT + TT | Gesamt |
|------------|-------------|-----------------|--------|
| Kontrollen | 227 (37,5%) | 378 (62,5%)     | 605    |
| Patienten  | 187 (37,4%) | 313 (62,6%)     | 500    |
| Gesamt     | 414 (37,5%) | 691 (62,5%)     | 1105   |

Die Analyse von gruppierten Genotypen zeigte keine signifikanten Ergebnisse in Bezug auf eine Assoziation zur Schizophrenie.

**CC + CT vs. TT:**  $\chi^2 = 0,00$ ; OR = 1,002 (CI = 0,715-1,404); df = 1; p = 0,993

**TT + CT vs. CC:**  $\chi^2 = 0,002$ ; OR = 1,005 (CI = 0,787-1,284); df = 1; p = 0,967

#### Allelverteilung (rs6976644)

Die statistische Auswertung ergab die in Tabelle 17 veranschaulichte Allelverteilung innerhalb der Kontroll- und Patientengruppen.

Tabelle 17: Allelverteilung des Polymorphismus rs6976644

| Gruppe     | C-Allel      | T-Allel     | Gesamt |
|------------|--------------|-------------|--------|
| Kontrollen | 747 (61,6 %) | 465 (38.4%) | 1210   |
| Patienten  | 615 (61,5%)  | 385 (38,5%) | 1000   |
| Gesamt     | 1360 (61,5%) | 850 (38,5%) | 2210   |

Für den SNP rs6976644 zeigte sich kein Unterschied in der Allelverteilung zwischen Kontrollen und Patienten.

$\chi^2 = 0,001$ ; OR = 1,003 (CI = 0,844-1,191); df = 1; p = 0,973

## 4.2 Analyse des SNP rs7797614

#### Genotypenverteilung (rs7797614)

Die statistische Auswertung der Genotypen, welche innerhalb des Hardy-Weinberg-Gleichgewichts verteilt waren ( $F=0,021$ ,  $df=1$ ,  $p=0,474$ ; berechnet für die Gesamtstichprobe), des Basenaustauschpolymorphismus rs7797614 ergab folgende Ergebnisse (vgl. Tabelle 18, Seite 64):

#### 4. Ergebnisse

Tabelle 18: Genotypenverteilung des Polymorphismus rs7797614

| Gruppe     | Genotyp AA | Genotyp AT  | Genotyp TT  | Gesamt |
|------------|------------|-------------|-------------|--------|
| Kontrollen | 22 (3,8%)  | 156 (26,6%) | 408 (69,6%) | 586    |
| Patienten  | 12 (2,4%)  | 141 (28,3%) | 346 (69,3%) | 499    |
| Gesamt     | 34 (3,1%)  | 297 (27,4%) | 754 (69,5%) | 1085   |

Es konnte keine Assoziation zur Schizophrenie nachgewiesen werden.

$$\chi^2 = 1,833; \text{df} = 2; p = 0,400$$

Die Analysen der gruppierten Genotypen für den Polymorphismus rs7797614 ergaben folgende Ergebnisse (vgl Tabellen 19/20).

Tabelle 19: Verteilung der gruppierten Genotypen (AA + AT vs. TT)

| Gruppe     | Genotyp AA + AT | Genotyp TT  | Gesamt |
|------------|-----------------|-------------|--------|
| Kontrollen | 178 (30,4%)     | 408 (69,6%) | 586    |
| Patienten  | 153 (30,7%)     | 346 (69,3%) | 499    |
| Gesamt     | 331 (30,5%)     | 754 (69,5%) | 1085   |

Tabelle 20: Verteilung der gruppierten Genotypen (AA vs. AT + TT)

| Gruppe     | Genotyp AA | Genotyp AT + TT | Gesamt |
|------------|------------|-----------------|--------|
| Kontrollen | 22 (3,8%)  | 564 (96,2%)     | 586    |
| Patienten  | 12 (2,4%)  | 487 (97,6%)     | 499    |
| Gesamt     | 34 (3,1%)  | 1051 (96,9%)    | 1085   |

$$\text{AA + AT vs. TT: } \chi^2 = 0,010; \text{OR} = 0,987 (\text{CI} = 0,761-1,279); \text{df} = 1; p = 0,919$$

$$\text{TT + AT vs. AA: } \chi^2 = 1,617; \text{OR} = 1,583 (\text{CI} = 0,775-3,232); \text{df} = 1; p = 0,204$$

Die Untersuchung von gruppierten Genotypen ergab keine signifikante Assoziation zur Schizophrenie für den SNP rs7797614.

#### Allelverteilung (rs7797614)

Bei Analyse der Allelverteilung für diesen Polymorphismus wurden folgende Werte berechnet (vgl. Tabelle 21, Seite 65):

#### 4. Ergebnisse

Tabelle 21: Allelverteilung des Polymorphismus rs7797614

| Gruppe     | A-Allel     | T-Allel      | Gesamt |
|------------|-------------|--------------|--------|
| Kontrollen | 200 (17,1%) | 972 (82,9%)  | 1172   |
| Patienten  | 165 (16,5%) | 833 (83,5%)  | 998    |
| Gesamt     | 365 (16,8%) | 1805 (83,2%) | 2170   |

Es konnte keine Assoziation zur Schizophrenie nachgewiesen werden.

$$\chi^2 = 0,109; \text{OR} = 1,039 (\text{CI} = 0,829-1,302); \text{df} = 1; p = 0,741$$

#### 4.3 Analyse des SNP rs17149799

##### Genotypenverteilung (rs17149799)

Die Untersuchung der Genotypen für den SNP rs17149799, die sich im Bezug auf die Gesamtstichprobe im Hardy-Weinberg-Gleichgewicht befanden ( $F=0,007$ ,  $\text{df}=1$ ,  $p=0,816$ ), erbrachte folgende Ergebnisse (vgl. Tabelle 22):

Tabelle 22: Genotypenverteilung (rs17149799)

| Gruppe     | Genotyp CC | Genotyp CT  | Genotyp TT  | Gesamt |
|------------|------------|-------------|-------------|--------|
| Kontrollen | 27 (4,6%)  | 212 (35,9%) | 351 (59,5%) | 590    |
| Patienten  | 26 (5,3%)  | 155 (31,5%) | 311 (63,2%) | 492    |
| Gesamt     | 53 (4,9%)  | 367 (33,9%) | 662 (61,2%) | 1082   |

Die Analysen ergaben keine signifikante Assoziation zur Schizophrenie.

$$\chi^2 = 2,432; \text{df} = 2; p = 0,296$$

Es wurden ebenfalls gruppierte Genotypen untersucht. Dabei wurden folgende Ergebnisse berechnet (vgl. Tabellen 23/24, Seite 66):

#### 4. Ergebnisse

Tabelle 23: gruppierte Genotypen (CC + CT vs. TT)

| Gruppe     | Genotyp CC + CT | Genotyp TT  | Gesamt |
|------------|-----------------|-------------|--------|
| Kontrollen | 239 (40,5%)     | 351 (59,5%) | 590    |
| Patienten  | 181 (36,8%)     | 311 (63,2%) | 492    |
| Gesamt     | 420 (38,8%)     | 662 (61,2%) | 1082   |

Tabelle 24: gruppierte Genotypen (CC vs. CT + TT)

| Gruppe     | Genotyp CC | Genotyp CT + TT | Gesamt |
|------------|------------|-----------------|--------|
| Kontrollen | 27 (4,6%)  | 563 (95,4%)     | 490    |
| Patienten  | 26 (5,3%)  | 466 (94,7%)     | 492    |
| Gesamt     | 53 (4,9%)  | 1029 (95,1%)    | 1082   |

**CC + CT vs. TT:**  $\chi^2 = 1,563$ ; OR = 1,170 (CI = 0,915-1,497); df = 1; p = 0,211

**TT + CT vs. CC:**  $\chi^2 = 0,289$ ; OR = 0,860 (CI = 0,495-1,493); df = 1, p = 0,591

Auch die Untersuchung der gruppierten Genotypen zeigte kein signifikantes Ergebnis.

#### Allelverteilung (rs17149799)

Bei der Analyse der Allelverteilung für den SNP rs17149799 ergaben sich folgende Ergebnisse (vgl. Tabelle 25):

Tabelle 25: Allelverteilung (rs17149799)

| Gruppe     | C-Allel     | T-Allel      | Gesamt |
|------------|-------------|--------------|--------|
| Kontrollen | 266 (22,5%) | 914 (77,5%)  | 1180   |
| Patienten  | 207 (21,0%) | 777 (79,0%)  | 984    |
| Gesamt     | 473 (21,9%) | 1691 (78,1%) | 2164   |

In der Allelverteilung zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen der Patientengruppe und der Kontrollgruppe.

$\chi^2 = 0,712$ ; OR = 1,092 (CI = 0,890-1,341); df = 1; p = 0,399

## 4. Ergebnisse

### **4.4 Analyse des SNP rs13225837**

#### Genotypenverteilung (rs13225837)

Bei der Analyse der Genotypenverteilung wurden die in Tabelle 26 dargestellten Werte berechnet. Die Verteilung der Genotypen befand sich im Hardy-Weinberg-Gleichgewicht ( $F=-0,002$ ,  $df=1$ ,  $p=0,951$ ).

Tabelle 26: Genotypenverteilung (rs13225837)

| Gruppe     | Genotyp AA | Genotyp AC  | Genotyp CC  | Gesamt |
|------------|------------|-------------|-------------|--------|
| Kontrollen | 12 (2,1%)  | 137 (23,5%) | 435 (74,5%) | 584    |
| Patienten  | 10 (2,0%)  | 128 (26,2%) | 351 (71,8%) | 489    |
| Gesamt     | 22 (2,1%)  | 265 (24,7%) | 786 (73,3%) | 1073   |

Die Analyse der Genotypenverteilung für den SNP rs13225837 zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen Fällen und Kontrollen.

$$\chi^2 = 1,062; df = 2; p = 0,588$$

Die Analyse der gruppierten Genotypen ergab folgende Ergebnisse (vgl. Tabellen 27/28):

Tabelle 27: gruppierte Genotypen (AA + AC vs. CC)

| Gruppe     | Genotyp AA + AC | Genotyp CC  | Gesamt |
|------------|-----------------|-------------|--------|
| Kontrollen | 149 (25,5%)     | 435 (74,5%) | 584    |
| Patienten  | 138 (28,2%)     | 351 (71,8%) | 489    |
| Gesamt     | 287 (26,7%)     | 786 (73,3%) | 1073   |

Tabelle 28: gruppierte Genotypen (AA vs. AC + CC)

| Gruppe     | Genotyp AA | Genotyp AC + CC | Gesamt |
|------------|------------|-----------------|--------|
| Kontrollen | 12 (2,1%)  | 572 (97,9%)     | 584    |
| Patienten  | 10 (2,0%)  | 479 (98,0%)     | 489    |
| Gesamt     | 22 (2,1%)  | 1051 (97,9%)    | 1073   |

$$\text{AA + AC vs. CC: } \chi^2 = 0,996; \text{ OR} = 0,871 \text{ (CI} = 0,664\text{-}1,142\text{)}; df = 1; p = 0,318$$

$$\text{CC + AC vs. AA: } \chi^2 = 0,000; \text{ OR} = 1,005 \text{ (CI} = 0,430\text{-}2,346\text{)}; df = 1; p = 0,991$$

#### 4. Ergebnisse

Bei den Analysen der gruppierten Genotypen des SNPs rs13225837 waren keine signifikanten Assoziationen zur Schizophrenie zu beobachten.

##### Allelverteilung (rs13225837)

Die Allelverteilung des Polymorphismus rs13225837 sah wie folgt aus (vgl. Tabelle 29):

Tabelle 29: Allelverteilung (rs13225837)

| Gruppe     | A-Allel     | C-Allel      | Gesamt |
|------------|-------------|--------------|--------|
| Kontrollen | 161 (13,8%) | 1007 (86,2%) | 1168   |
| Patienten  | 148 (15,1%) | 830 (84,9%)  | 978    |
| Gesamt     | 309 (14,4%) | 1837 (85,6%) | 2146   |

Die Allelverteilung zeigte keinen signifikanten Unterschied zwischen Patienten- und Kontrollgruppe.

$$\chi^2 = 0,786; \text{OR} = 0,897 (\text{CI} = 0,704-1,141); \text{df} = 1; p = 0,375$$

#### 4.5 Analyse des SNP rs7808001

##### Genotypenverteilung (rs7808001)

Die Genotypen, welche sich im Hardy-Weinberg-Gleichgewicht befanden ( $F=0,041$ ,  $\text{df}=1$ ,  $p=0,171$ ), verteilten sich wie folgt (vgl. Tabelle 30):

Tabelle 30: Genotypenverteilung (rs7808001)

| Gruppe     | Genotyp CC | Genotyp CT  | Genotyp TT  | Gesamt |
|------------|------------|-------------|-------------|--------|
| Kontrollen | 27 (4,5%)  | 169 (28,4%) | 399 (67,1%) | 595    |
| Patienten  | 19 (3,8%)  | 153 (30,5%) | 330 (65,7%) | 502    |
| Gesamt     | 46 (4,2%)  | 322 (29,4%) | 729 (66,5%) | 1097   |

Es konnte keine Assoziation zur Schizophrenie nachgewiesen werden.

$$\chi^2 = 0,839; \text{df} = 2; p = 0,657$$

Bei der Analyse der gruppierten Genotypen ergaben sich folgende Ergebnisse (vgl. Tabellen 31/32, Seite 69):

#### 4. Ergebnisse

Tabelle 31: gruppierte Genotypen (CC + CT vs. TT)

| Gruppe     | Genotyp CC + CT | Genotyp TT  | Gesamt |
|------------|-----------------|-------------|--------|
| Kontrollen | 196 (32,9%)     | 399 (67,1%) | 595    |
| Patienten  | 172 (34,3%)     | 330 (65,7%) | 502    |
| Gesamt     | 368 (33,5%)     | 729 (66,5%) | 1097   |

Tabelle 32: gruppierte Genotypen (CC vs. CT + TT)

| Gruppe     | Genotyp CC | Genotyp CT + TT | Gesamt |
|------------|------------|-----------------|--------|
| Kontrollen | 27 (4,5%)  | 568 (95,5%)     | 595    |
| Patienten  | 19 (3,8%)  | 483 (96,2%)     | 502    |
| Gesamt     | 46 (4,2%)  | 1051 (95,8%)    | 1097   |

**CC + CT vs. TT:**  $\chi^2 = 0,213$ ; OR = 0,942 (CI = 0,733-1,212); df = 1; p = 0,644

**TT + CT vs. CC:**  $\chi^2 = 0,384$ ; OR = 1,208 (CI = 0,664-2,200); df = 1; p = 0,535

Auch die Untersuchung von gruppierten Genotypen ergab kein signifikantes Ergebnis im Bezug auf eine Assoziation zur Schizophrenie.

#### Allelverteilung (rs7808001)

Bei der Untersuchung der Allelverteilung für den Basenaustauschpolymorphismus rs78008001 ergaben sich folgende Werte (vgl. Tabelle 33):

Tabelle 33: Allelverteilung rs7808001

| Gruppe     | C-Allel     | T-Allel      | Gesamt |
|------------|-------------|--------------|--------|
| Kontrollen | 223 (18,7%) | 967 (81,3%)  | 1190   |
| Patienten  | 191 (19,0%) | 813 (81,0%)  | 1004   |
| Gesamt     | 414 (18,9%) | 1780 (81,1%) | 2194   |

Die Allele waren zwischen den Patienten und den Kontrollen gleich verteilt.

$\chi^2 = 0,029$ ; OR = 0,982 (CI = 0,792-1,217); df = 1; p = 0,865

#### 4. Ergebnisse

##### **4.6 Zusammenfassung der Ergebnisse**

In dieser Arbeit wurde die Assoziation der Polymorphismen rs6976644, rs7797614, rs17149799, rs13225837, rs7808001 im Gen des metabotropen Glutamatrezeptors 8 mit der Schizophrenie untersucht.

Dafür wurde eine Kontrollgruppe, welche aus 605 Probanden mit deutscher Abstammung bestand, mit einem Patientenkollektiv aus 500 kaukasischen schizophrenen Patienten verglichen. Es wurden insgesamt 5 SNPs im intronischen Bereich zwischen den Exons 8 und 10 untersucht, die mittels des iPLEX-Verfahrens genotypisiert wurden.

Es wurden Allel- und Genotypenverteilung zwischen der Patienten- und der Probandengruppe verglichen. Die Prüfung der Signifikanz erfolgte mittels des zweiseitigen Chi-Quadrat-Tests, wobei als Signifikanzniveau  $p < 0,05$  festgelegt wurde,  $p$ -Werte kleiner 0,1 wurden als Trend gewertet.

Die Analysen der 5 untersuchten Marker zeigten keine signifikante Assoziation mit der Schizophrenie (vgl. Tabelle 34).

Tabelle 34: Zusammenfassung der Ergebnisse

| Marker     | Genotypen | Gruppierte Genotypen                               | Allele    |
|------------|-----------|--|-----------|
| rs6976644  | $p=0,999$ | CC+CT vs. TT: $p=0,993$<br>CT+TT vs. CC: $p=0,967$ | $p=0,973$ |
| rs7797614  | $p=0,400$ | AA+AT vs. TT: $p=0,919$<br>AT+TT vs. AA: $p=0,204$ | $p=0,741$ |
| rs17149799 | $p=0,296$ | CC+CT vs. TT: $p=0,211$<br>CT+TT vs. CC: $p=0,591$ | $p=0,399$ |
| rs13225837 | $p=0,588$ | AA+AC vs. CC: $p=0,318$<br>AC+CC vs. AA: $p=0,991$ | $p=0,375$ |
| rs7808001  | $p=0,657$ | CC+CT vs. TT: $p=0,644$<br>CT+TT vs. CC: $p=0,535$ | $p=0,865$ |

## **5. Diskussion**

Ziel der vorliegenden Studie war es Zusammenhänge von Alterationen im Gen des metabotropen Glutamatrezeptors 8 und der Schizophrenie aufzudecken. Hierfür wurden 5 Polymorphismen (rs6976644, rs7797614, rs17149799, rs13225837, rs7808001) in einer gesunden Kontrollgruppe, bestehend aus 605 nicht-verwandte Probanden deutscher Abstammung, mit einer Fallgruppe aus 500 kaukasischen schizophrener, nicht-verwandter Patienten verglichen. Eine signifikante Assoziation konnte für keinen der untersuchten Marker nachgewiesen werden.

### **5.1 Diskussion der Methoden**

#### Studiendesign

Für die vorliegende Untersuchung des GRM8 auf seinen Zusammenhang mit der Schizophrenie wurde als Studiendesign die Fall-Kontroll-Assoziationsstudie gewählt.

Zur Abschätzung relativer Erkrankungsrisiken werden bei Fall-Kontroll-Studien die Häufigkeiten bestimmter Marker in Kandidatengenen zwischen schizophrenen Patienten und gesunden Probanden verglichen (Böddeker et al., 2000).

Der entscheidende Vorteil der Assoziationsstudie ist die Möglichkeit auch Gene mit geringem Effekt auf die Entstehung einer Erkrankung nachweisen zu können (Tandon, et al., 2008). Da bei der Schizophrenie von einem polygenen Erbgang mit vielen genetischen Veränderungen mit jeweils relativ geringem Effekt ausgegangen wird, erscheint das Fall-Kontrolldesign für genetische Studien zur Schizophrenie sehr geeignet (Owen, et al., 2009).

Der fehlende Nachweis eines Zusammenhangs von Alterationen im GRM8-Gen und der Schizophrenie in Kopplungsstudien (Moises et al., 1995) könnte ein Hinweis darauf sein, dass Mutationen im Bereich des Gens des metabotropen Glutamatrezeptors 8 einen eher geringen Einfluss auf die Ätiopathogenese der Schizophrenie haben, welche möglicherweise besser mit Assoziationsstudien aufdeckt werden könnten.

Problematisch bei der Bewertung von Assoziationsanalysen ist das erhöhte Risiko für falsch-positive bzw. falsch-negative Ergebnisse, wodurch es teilweise zu divergierenden Studienergebnissen kommt. Die Hauptursache für die inkonsistente Studienlage wird dabei vor allem in heterogenen Stichproben gesehen, welche die Vergleichbarkeit verschiedener Studien erschweren (Tandon et al., 2008). Vor allem der Vergleich unterschiedlicher ethnischer Gruppen stellt ein häufiges Problem dar (Freudenberg et al., 2002; Cardon et al., 2003).

## 5. Diskussion

### Ethnizität

Genotypen- und Allelfrequenzen in verschiedenen ethnischen Gruppen weisen zum Teil eine große Variabilität auf. Daher spielt bei genetischen Assoziationsstudien ein homogenes Probandenkollektiv in Bezug auf die ethnische Abstammung eine wichtige Rolle, um Ergebnisverfälschungen zu vermeiden. Die zum Teil inkonsistente Datenlage molekulargenetischer Studien wird möglicherweise durch inhomogene, genetische Untersuchungsstichproben mitverursacht (Freudenberg et al., 2002; Cardon et al., 2003).

Um die populationsabhängige, genetische Variabilität einzelner Marker in unterschiedlichen Bevölkerungsgruppen zu vergleichen, können die Angaben zu Genotypen- und Allelverteilungen des internationalen HapMap Projektes herangezogen werden. Das HapMap Projekt ist eine Zusammenarbeit von akademischen Forschern, nicht-kommerziellen biomedizinischen Forschergruppen und Unternehmen aus den USA, Japan, China, Großbritannien, Nigeria und Kanada, deren Ziel die Identifikation und Katalogisierung genetischer Variationen in verschiedenen Bevölkerungsgruppen ist (International HapMap Consortium, 2005). In Tabelle 35 sind die Genotypen- und Allelfrequenzen für die in der vorliegenden Studie untersuchten 5 SNPs dargestellt. Dabei fallen zum Teil große Unterschiede zwischen den verschiedenen Ethnien auf, wobei die in dieser Studie erhobenen Daten nur geringfügig von den der europäischen Stichprobe des HapMap Projektes abweichen.

Tabelle 35: Genotypen- und Allelverteilung der GRM8-Marker innerhalb der vorliegenden Studie und unterschiedlicher Populationsstichproben

| rs6976644                   | C/C   | C/T   | T/T   | rs7797614                   | A/A  | A/T   | T/T   |
|-----------------------------|-------|-------|-------|-----------------------------|------|-------|-------|
| HapMap-CEU (n=116)          | 46,6% | 50,0% | 3,4%  | HapMap-CEU (n=120)          | 5,0% | 28,3% | 66,7% |
| HapMap-HCB (n=84)           | 35,7% | 47,6% | 16,7% | HapMap-HCB (n=90)           | 4,4% | 48,9% | 46,7% |
| HapMap-JPT (n=88)           | 38,6% | 50,0% | 11,4% | HapMap-JPT (n=90)           | 2,2% | 28,9% | 68,9% |
| HapMap-YRI (n=116)          | 70,7% | 29,3% | 0,0%  | HapMap-YRI (n=118)          | 5,1% | 45,8% | 49,2% |
| Vorliegende Studie (n=1105) | 37,5% | 48,1% | 14,4% | Vorliegende Studie (n=1085) | 3,1% | 27,4% | 69,5% |
| rs17149799                  | C/C   | C/T   | T/T   | rs13225837                  | A/A  | A/C   | C/C   |
| HapMap-CEU (n=226)          | 7,1%  | 37,2% | 55,8% | HapMap-CEU (n=118)          | 1,7% | 35,6% | 62,7% |
| HapMap-HBC (n=86)           | 2,3%  | 39,5% | 58,1% | HapMap-HBC (n=90)           | 0,0% | 15,6% | 84,4% |
| HapMap-JPT (n=172)          | 14,0% | 47,7% | 38,4% | HapMap-JPT (n=90)           | 2,2% | 26,7% | 71,1% |
| HapMap-YRI (n=226)          | 0,9%  | 8,0%  | 91,2% | HapMap-YRI (n=120)          | 0,0% | 8,3%  | 91,7% |
| Vorliegende Studie (n=1082) | 4,9%  | 33,9% | 61,2% | Vorliegende Studie (n=1073) | 2,1% | 24,7% | 73,3% |

## 5. Diskussion

| <b>rs7808001</b>               | <b>C/C</b> | <b>C/T</b> | <b>T/T</b> |  |
|--------------------------------|------------|------------|------------|--|
| HapMap-CEU (n=108)             | 0,0%       | 29,6%      | 70,4%      |  |
| HapMap-HBC (n=88)              | 0,0%       | 18,2%      | 81,8%      |  |
| HapMap-JPT (n=90)              | 0,0%       | 20,0%      | 80,0%      |  |
| HapMap-YRI (n=120)             | 0,0%       | 0,0%       | 100,0%     |  |
| Vorliegende Studie<br>(n=1097) | 4,2%       | 29,4%      | 66,5%      |  |

(CEU: Einwohner aus Utah mit Vorfahren aus West- und Nordeuropa; HCB: Han Chinesen aus Beijing, China; JPT: Japaner aus Tokyo; YRI: Yoruba aus Ibadan, Nigeria)

Beim Vergleich der drei bisher durchgeführten Studien zum GRM8-Gen und der Schizophrenie fällt auf, dass bei Bolonna (2001) und bei dieser Studie die Probanden kaukasischer Herkunft waren. Dabei war das Patientenkollektiv von Bolonna und Kollegen auf kaukasische Probanden mit britischer Abstammung eingegrenzt, für die vorliegende Arbeit wurden Patienten kaukasischer Herkunft rekrutiert. Bei der Kontrollgruppe waren in beiden Studien weiße Kaukasier mit britischer bzw. deutscher Abstammung gefordert. Takaki und Kollegen (2004) führten ihre Untersuchungen an einer japanischen Population durch.

Die Tatsache, dass bei den beiden Studien (Bolonna et al., 2001 und vorliegende Arbeit) an der kaukasischen Population keine signifikante Assoziation zwischen Polymorphismen im GRM8-Gen und der Schizophrenie gefunden werden konnte, könnte damit zusammenhängen, dass Polymorphismen im GRM8-Gen bei kaukasischen Patienten kaum Einfluss auf die Ätiopathogenese der Schizophrenie haben. Allerdings zeigten die Analysen von Genabschnitte, welche mit den Markern der vorliegenden Arbeit bzw. denen der Studie von Bolonna und Kollegen vergleichbar waren, in den Untersuchungen an der japanischen Stichprobe ebenfalls keine signifikanten Ergebnisse (SNP21 und 22).

In der japanischen Studie konnte im intronischen Bereich um Exon 2 eine signifikante Assoziation mit der Schizophrenie detektiert werden, so dass Takaki und Kollegen (2004) einen Zusammenhang zwischen Mutationen im GRM8-Gen und der Ätiopathogenese der Schizophrenie für die japanische Bevölkerung postulierten (vgl. Abbildung 19; Seite 79). Ob dieses Ergebnis auch auf andere Bevölkerungsgruppen übertragen werden kann, muss in weiteren Studien geklärt werden, da in den beiden Studien an kaukasischen Stichproben der erwähnte Bereich nicht untersucht wurde (Bolonna et al., 2001 und vorliegende Studie).

### Stichprobengröße

Beim Vergleich von genetischen Fall-Kontroll-Studien sollte auch auf die jeweilige

## 5. Diskussion

Stichprobengröße geachtet werden, da sie maßgeblich die statistische Aussagekraft einer Assoziationsstudie beeinflusst. Durch eine größere Stichprobenzahlen können Verzerrungen zum Beispiel durch Rekrutierungsfehler, in Form von Fehldiagnosen oder unerkannte psychiatrische Erkrankungen bei den Kontrollprobanden, kompensiert werden. Außerdem werden je kleiner der Effekt einer genetischen Mutation ist, umso größere Stichproben benötigt, um eine Assoziation nachweisen zu können (Colhoun et al., 2003).

Tabelle 36: Vergleich der Stichprobengröße

| <b>Studie</b>         | <b>Anzahl der Patienten</b> | <b>Anzahl der Probanden</b> |
|-----------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| Bolonna et al. (2001) | 105                         | 108                         |
| Takaki et al. (2004)  | 100                         | 100                         |
| Vorliegende Studie    | 500                         | 605                         |

Beim Vergleich der Studien zeigt sich, dass sich diese Studie durch ein deutlich größeres Patienten- und Kontrollprobandenkollektiv gegenüber den Referenzstudien auszeichnet (vgl. Tabelle 36). Dennoch könnte die Stichprobengröße der vorliegenden Arbeit möglicherweise noch zu klein sein, um geringe Effekte von Alterationen im GRM8-Gen auf die Ätiopathogenese der Schizophrenie nachweisen zu können.

### Geschlechterverteilung

Vergleicht man die Geschlechterverteilung der Stichprobenzusammensetzung der drei Studien fällt auf, dass in den Patientengruppen die Frauen unterrepräsentiert sind (30-44% Frauenanteil in den Patientengruppen). Wobei Frauen im Gegensatz dazu im Kontrollkollektiv in gleicher Anzahl (Takaki et al., 2004) bzw. häufiger vertreten sind (Bolonna et al., 2001 und in der vorliegenden Studie; vgl. Tabelle 37).

Tabelle 37: Vergleich des Frauenanteils

| <b>Studie</b>         | <b>Frauenanteil bei den Patienten</b> | <b>Frauenanteil bei den Probanden</b> |
|-----------------------|---------------------------------------|---------------------------------------|
| Bolonna et al. (2001) | 30%                                   | 54%                                   |
| Takaki et al. (2004)  | 44%                                   | 50%                                   |
| Vorliegende Studie    | 35%                                   | 54,2%                                 |

Der zum Teil deutlich niedrigere Frauenanteil des Patientenkollektivs könnte im Hinblick auf eine mögliche geschlechtsspezifische genetische Assoziation die Studienergebnisse verfälschen.

Dass es einen Unterschied zwischen Männern und Frauen im Bezug auf die Schizophrenie gibt,

## 5. Diskussion

kann anhand klinischer Beispiele verdeutlicht werden. Solche klinischen Unterschiede zeigen sich unter anderem in einem früheren Krankheitsbeginn bei Männern (MacDonald et al., 2009), einer höheren Inzidenzrate der Männer (McGrath et al., 2008) und einem günstigeren Krankheitsverlauf mit höheren Vollremissionsraten bei Frauen (Grossman et al., 2008). Dabei wird als wahrscheinlichster, entscheidender Faktor das Östrogen angeführt (Seeman et al., 1990; Häfner, 2003; Grossman et al., 2008). In neueren Studien konnten inzwischen auch geschlechtsspezifische genetische Assoziationen zur Schizophrenie nachgewiesen werden (Shifman et al., 2002 und 2008; Chen et al., 2006 und 2007; Tan et al., 2005). Dabei scheint die Geschlechtsspezifität der betroffenen Gene maßgebend durch den Östrogeneinfluss bedingt zu sein, denn es konnten Genabschnitte identifiziert werden, deren Expression Östrogen-abhängig reguliert wird (Chen et al., 2006; Shifman et al., 2008).

Außerdem wurde in einer neueren Studie im GRM8-Knock-Out-Mausmodell ein deutlicher Unterschied zwischen den Geschlechtern bezüglich Ängstlichkeit und kognitiven Leistungen belegt (Duvoisin et al., 2010), so dass eine geschlechtsspezifische Auswirkung von Alterationen im GRM8-Gen auch im Hinblick auf die Ätiopathogenese der Schizophrenie denkbar wäre.

Bei der Bewertung der aktuellen Studien des GRM8-Gens muss eine mögliche Verzerrung durch eine ungleiche Geschlechterverteilung innerhalb der Patienten- und Kontrollgruppen in Betracht gezogen werden. So könnte durch den jeweils niedrigeren Frauenanteil im Patientenkollektiv ein erhöhtes Erkrankungsrisiko für Frauen nicht detektiert worden sein, zum Beispiel, wenn der Effekt zu gering ist, um in der Gesamtstichprobe detektiert zu werden. So dass man im Hinblick auf eine geschlechtsspezifische Risikoerhöhung weitere Studien durchführen sollte bzw. eine geschlechtsspezifische Berechnung der vorliegenden Daten erfolgen sollte.

### Durchschnittsalter

Auch das Alter der zu vergleichenden Gruppen kann bei starken Unterschieden zu Verfälschungen der Ergebnisse führen, insbesondere wenn das Durchschnittsalter des Kontrollkollektivs unterhalb des typischen Erkrankungsalters der Schizophrenie liegt. Das Prädilektionsalter der Schizophrenie liegt zwischen dem 15. und 30. Lebensjahr (Tandon, et al., 2008), bei jüngeren Kontrollprobanden kann eine noch nicht ausgebrochene Erkrankung nicht ausgeschlossen werden.

## 5. Diskussion

Tabelle 38: Vergleich des Durchschnittsalter

| <b>Studie</b>         | <b>Altersdurchschnitt der Patienten</b> | <b>Altersdurchschnitt der Probanden</b> |
|-----------------------|---|---|
| Bolonna et al. (2001) | 55 Jahre                                | 40 Jahre                                |
| Takaki et al. (2004)  | 49,5 Jahre                              | 51,2 Jahre                              |
| Vorliegende Studie    | 37,7 Jahre                              | 45,36 Jahre                             |

In allen durchgeführten Studien lag das Durchschnittsalter des Kontrollkollektivs deutlich über dem Haupterkrankungsalter der Schizophrenie, wodurch eine erhöhte Gefahr für fälschlicherweise als gesund klassifizierten Probanden als gering anzusehen ist (vgl. Tabelle 38). Allerdings kann eine Spätmanifestation der Schizophrenie beim gesunden Kontrollkollektiv nicht ausgeschlossen werden. Die Wahrscheinlichkeit wird aber durch ein höheres Durchschnittsalter der Probanden gering gehalten.

### Diagnoseverfahren

Bei allen drei Studien wurden zur Diagnosestellung der Schizophrenie die DSM-IV-Kriterien angewendet. In der Bolonna-Studie wurde zum Teil die Diagnose auch anhand der DSM-III-Kriterien gestellt. Zur Diagnosesicherung wurden bei der Bolonna-Studie Krankenakten verwendet, bei der vorliegenden Arbeit wurden zusätzlich zu der Krankenaktenanalyse mit den Patienten Interviews mit ausführlicher Anamnese und dem SKID I (strukturiertes klinisches Interview zu DSM-IV) geführt. Woher die Daten für die Studie von Takaki und Kollegen stammen, ist aus der Publikation nicht zu entnehmen.

Grundsätzlich ist eine objektive Diagnosesicherung durch messbare Variablen bei der Schizophrenie nicht möglich, woraus letztendlich eine gewisse Unsicherheit der Diagnose aufgrund subjektiver, vom Untersucher abhängigen Einschätzungen resultiert.

Zu bemerken ist ebenfalls, dass die Schizophrenie eine sehr heterogene Erkrankung ist und die wissenschaftliche Diskussion, ob sie eine eigene Erkrankung ist oder eher eine Gruppe verschiedener Erkrankungen mit der Entität „Schizophrenie“ bildet, noch nicht abschließend geführt ist (Tandon et al., 2009).

Aus diesen Gründen ist die Fehlerquelle der Diagnoseunsicherheit als mögliche Ursache für differierende Studienergebnisse gegeben.

Um die Fehlerwahrscheinlichkeit durch Fehlklassifikationen möglichst gering zu halten, wurde in dieser Studie die Klassifikation nach DSM-IV verwendet, welche durch seine sehr präzisen und klar formulierten Kriterien eine objektive und genaue Diagnosestellung ermöglichen soll (Cheniaux et al., 2009). Mit den Patienten wurde deshalb das strukturierte klinische Interview für DSM-IV zu Achse-I-Störungen (SKID I) geführt, welches durch die systematische Erfassung mittels

## 5. Diskussion

vorformulierter Fragen die Minimierung von Fehlerquellen und Varianzen der klinischen Urteilsbildung ermöglicht und damit eine reliable und valide Diagnostik in relativ kurzer Zeit zum Ziel hat.

### Ein- und Ausschlussverfahren

Unterschiedliche Ein- und Ausschlusskriterien können ebenfalls zur Divergenz von Studienergebnissen führen.

In dieser Studie wurden die Kontrollprobanden erst nach einem mehrstufigen Screening zum Ausschluss von eigenen oder bei Erstgradangehörigen vorkommenden neuropsychiatrischen Erkrankungen in die Studie aufgenommen. Dafür wurde mit den Probanden des Kontrollkollektivs der SKID I zum Ausschluss von Achse-I-Störungen (Psychopathologie), der SKID II zum Ausschluss von Achse-II-Störungen (Persönlichkeitsstörungen) und das Family History Assessment Module zum Ausschluss von psychiatrischen Erkrankungen bei Erstgradangehörigen, durchgeführt.

Wie in den beiden anderen Studien zum GRM8-Gen und seiner Assoziation (Bolonna et al., 2001; Takaki et al., 2004) mit der Schizophrenie die Kontrollprobanden rekrutiert und gescreent wurden, ist den Publikationen nicht zu entnehmen. Deshalb sind divergierende Ergebnisse auch aufgrund von unterschiedlichen Rekrutierungsmethoden nicht auszuschließen.

Für die schizophrenen Patienten galten insbesondere mögliche Erkrankungen, die schizophrenieähnliche Symptome verursachen können, zum Beispiel eine Enzephalopathie, Zustand nach Schädel-Hirn-Trauma, oder eine Substanzabhängigkeit vor Beginn der Schizophrenie als Ausschlusskriterien. Damit wurden Substanz-induzierte-Psychosen und organisch bedingte Psychosen aus der Studie ausgeschlossen. Um diese Patienten aus der Studie herauszunehmen, wurde eine ausführliche Anamnese und der SKID I zur Diagnosesicherung der Schizophrenie durchgeführt. Die strikten Ein- und Ausschlusskriterien sollten die Fehlerquelle der vorliegenden Arbeit möglichst gering halten. Auch bei dem Vergleich der Patientenrekrutierung stellt sich das Problem, dass aus den Publikationen der Vergleichsstudien die Methodik der Rekrutierung sowie Ein- und Ausschlusskriterien nicht ersichtlich sind.

Grundsätzlich können unterschiedliche Rekrutierungsmethoden, sowie verschiedene Ein- und Ausschlusskriterien zu widersprüchlichen Studienergebnissen führen. Außerdem können auch eine inkonsequente Rekrutierung mit nachlässiger Anwendung von Ein- und Ausschlusskriterien die Studienergebnisse verfälschen.

### **5.2 Darstellung und Interpretation der Ergebnisse**

In einer Kopplungsstudie konnte kein Zusammenhang zwischen dem GRM8-Genlocus auf

## 5. Diskussion

Chromosom 7q31.3-32.1 und der Schizophrenie detektiert werden (Moises et al., 1995).

Als Ursache für das negative Ergebnis könnte ein zu geringer Effekt von Mutationen im GRM8-Gen auf die Entwicklung einer Schizophrenie postuliert werden.

Auch die erste Assoziationsstudie zum GRM8-Gen und der Schizophrenie erbrachte kein signifikantes Ergebnis. Diese Studie wurde von Bolonna und Kollegen (2001) an einem Kollektiv weißer Kaukasier mit britischer Abstammung durchgeführt. Es wurden 105 schizophrene Patienten, welche mittels DSM-III/IVR diagnostiziert wurden, und 108 gesunde Kontrollprobanden in die Studie eingeschlossen. Die 2846-C/T-Mutation, welche sich 29 Basenpaare nach dem Stopcodon befindet, wurde als Marker gewählt. Die Autoren schlossen mit den Ergebnissen ihrer Studie einen moderaten bis starken Effekt dieses Polymorphismus auf die Ätiopathogenese der Schizophrenie aus (Bolonna et al., 2001).

Im Jahr 2004 führten Takaki und Kollegen eine zweite Assoziationsstudie zum GRM8-Gen und der Schizophrenie an einer japanischen Population durch. Es wurden 100 schizophrenen Patienten, die nach den DSM-IV-Kriterien diagnostiziert wurden, mit 100 gesunden Kontrollprobanden verglichen. Als Marker wurden 22 SNPs, die einen durchschnittlichen Abstand von 40,3 kb hatten, untersucht (Abbildung 13, Seite 44), außerdem wurden Haplotypen analysiert. Anhand ihrer Ergebnisse schlossen die Autoren auf einen Suszeptibilitätslocus für Schizophrenie in der japanischen Population im Bereich der SNPs4-6, welche sich im intronischen Bereich um Exon zwei befinden.

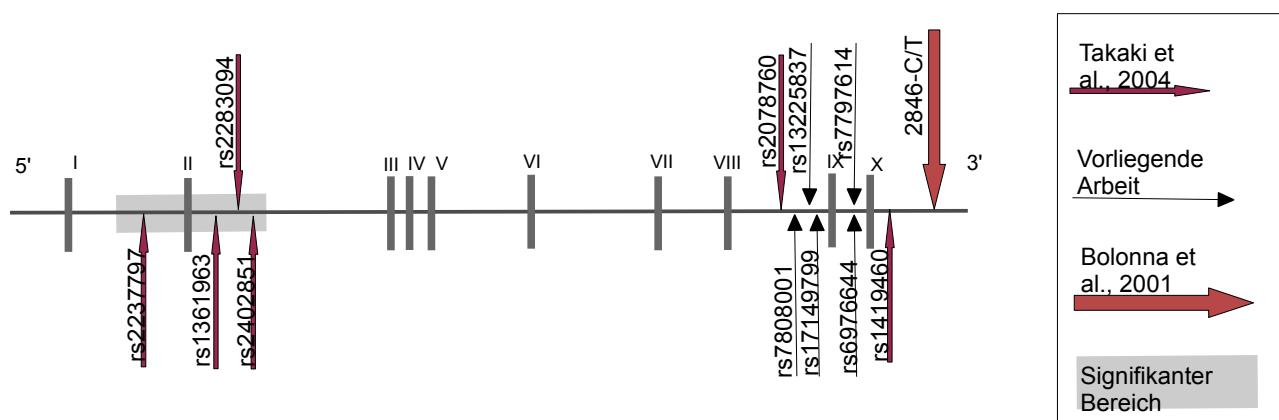
In der hier vorgestellten Arbeit konnten keine signifikanten Ergebnisse erzielt werden. In die Studie wurden 500 schizophrene Patienten kaukasischer Ethnität, wobei die DSM-IV-Kriterien zur Diagnosefindung angewendet wurden, und 605 gesunde deutschstämmige Probanden eingeschlossen. Es wurden 5 Marker im intronischen Bereich zwischen den Exons 8 und 10 gewählt, die auf ihre Assoziation zur Schizophrenie getestet wurden (vgl. Abbildung 16, Seite 55). Bei der Analyse der 5 SNPs konnte kein signifikanter Unterschied der Allel- bzw. Genotypenverteilung zwischen Patienten- und Kontrollgruppe festgestellt werden.

Beim Vergleich der drei Studien zeigte sich, dass die Ergebnisse gut miteinander vereinbar sind, da die Untersuchungen von Markern, die in vergleichbaren Genregionen lagen, zu übereinstimmenden Resultaten kamen.

Die von Bolonna und Kollegen analysierte 2846-C/T-Mutation zeigte ebenso wie der SNP22 (rs1419460; 2471 Basenpaare vor 2846-C/T) in der von Takaki und Kollegen, der in einer vergleichbaren Genregion lokalisiert ist, keine signifikante Assoziation mit der Schizophrenie (Bolonna et al., 2001; Takaki et al., 2004). Die in der vorliegenden Studie analysierten Marker lagen zwischen den SNPs rs2078760 und rs1419460 der Takaki-Studie. Die bisherigen Studienergebnisse zum GRM8-Gen und der Schizophrenie erbrachten somit konsistente

## 5. Diskussion

Ergebnisse, da die SNPs rs2078760 und rs1419460 der Takaki-Studie und der in der Bolonna-Studie untersuchte Restriktionslängenpolymorphismus genauso wie die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Polymorphismen keine signifikante Assoziation zur Schizophrenie zeigten (vgl. Abbildung 19).



**Abbildung 19: Vergleich der Ergebnisse aller Studien zum GRM8-Gen und der Schizophrenie:** signifikanter Bereich der Takaki-Studie (Haplotypen um rs2237797-rs2402851) und der in einer vergleichbaren Genregion liegenden Marker der vorliegenden Arbeit, der Takaki- und der Bolonna-Studie (Takaki et al., 2004; Bolonna et al., 2001)

Dies könnte daran liegen, dass in dem untersuchten Genbereich dieser Studie Polymorphismen nicht zu einem erhöhten Risiko der Schizophrenie beitragen.

Allerdings ist vor allem der Vergleich der Takaki-Studie mit unserer Untersuchung nur eingeschränkt möglich, da die beiden Studien an unterschiedlichen ethnischen Populationen durchgeführt wurden und es fragwürdig ist, in wie weit sich die genetischen Varianten, die zur Entstehung einer Schizophrenie beitragen, in der europäischen Bevölkerung mit denen in einer asiatischen Population vergleichen lassen. Dennoch ist das Vorhandensein eines Suszeptibilitätslocus innerhalb des GRM8-Gens wie er von der japanischen Forschergruppe identifiziert werden konnte (rs2237797-rs2402851; vgl. Abbildung 19) auch für die europäische Bevölkerung denkbar.

Es wäre wünschenswert in zukünftigen Studien den in der Takaki-Studie als signifikant identifizierten Bereich genauer zu untersuchen. Insbesondere sollten die signifikanten SNPs auch in anderen ethnischen Gruppen auf einen möglichen Zusammenhang mit der Schizophrenie getestet werden, da der metabotrope Glutamatrezeptor 8 aufgrund seiner Lokalisation und seiner Funktion weiterhin als interessantes Kandidatengen der Schizophrenie angesehen wird.

## 5. Diskussion

Eine Kandidatengenstudie zur Pharmakogenetik des Ansprechens auf Neuroleptika im Jahr 2009 erbrachte bezüglich des metabotropen Glutamatrezeptors 8 ein interessantes Ergebnis, darin konnte nämlich der SNP rs7778604 mit einer Verbesserung der kognitiven Leistungen schizophrener Patienten unter neuroleptischer Therapie assoziiert werden. Der Marker liegt im Intron 2 des metabotropen Glutamatrezeptor 8-Gens und damit in der Nähe des Genbereiches um Exon 2, welcher in der japanischen Studie eine Assoziation mit der Schizophrenie aufwies (Need et al., 2009). Der Mechanismus, der zur Verbesserung der kognitiven Leistungsfähigkeit führt, ist dabei jedoch bisher nicht bekannt, insbesondere welche Rolle der metabotrope Glutamatrezeptor 8 dabei spielen könnte ist unklar.

Unter Einbeziehung dieses Aspektes wären zum Beispiel Untersuchungen an Subgruppen denkbar, da die Schizophrenie ein sehr komplexes Krankheitsbild darstellt, bei welchem die jeweiligen verschiedenen Symptome jeweils nicht alle zwingend vorliegen müssen bzw. in unterschiedlicher Ausprägung vorkommen. Daraus resultiert ein phänotypisch sehr heterogenes Patientenkollektiv, worin verschiedene Subtypen und Erscheinungsformen zusammengefasst werden. Aus diesem Grund wären Studiendesigns, welche dieser Heterogenität des Phänotyps der Schizophrenie Rechnung tragen, interessant. Dabei könnten Assoziationen bestimmter Marker mit einzelnen Symptomkomplexen oder Subgruppen untersucht werden.

Im Fall des metabotropen Glutamatrezeptors 8 scheint sich unter Einbeziehung der Ergebnisse der Studie von Need und Kollegen (2009), welche auf eine Assoziation zu kognitiven Defiziten bei schizophrenen Patienten hinweisen, eine Untersuchungen einer Subgruppe mit ausgeprägten kognitiven Defiziten anzubieten. Vor allem weil sich auch in Studien mit GRM8-Knock-out-Mäusen gezeigt hat, dass ein dysfunktionaler GRM8 mit Beeinträchtigungen der kognitiven Funktionen einhergehen kann. So zeigten GRM8-Knock-out-Mäuse in einer Studie von Fendt und Kollegen (2010) unter anderem milde Einbußen im deklarativen Gedächtnis. In einer weiteren Studie konnten geschlechtsspezifische Defizite bezüglich der kognitiven Leistungen nachgewiesen werden, dabei waren die Einbußen bei weiblichen Mäusen ausgeprägter als bei den männlichen Artgenossen (Duvoisin et al., 2010a).

Zusammenfassend kann durch die Ergebnisse der Pharmakogenetischen Studie von Need und Kollegen (2009) in Kombination mit den Ergebnissen aus dem Mausmodell die Hypothese des Einflusses von Alterationen im Gen des metabotropen Glutamatrezeptors 8 auf die Entstehung der Schizophrenie gestützt werden. Es wird dabei insbesondere nochmals unterstrichen, dass der Bereich um Exon 2, welcher in der japanischen Stichprobe eine signifikante Assoziation zur Schizophrenie aufweist und in welchen Nähe sich auch der signifikante Marker im GRM-8-Gen aus der CATIE-Studie (Need et al., 2009) befindet, weiter untersucht werden sollte. Insbesondere auch bezüglich bestimmter Symptomkomplexe und einer geschlechtsspezifischen Assoziation.

### **5.3 Ausblick**

In der vorliegenden Studie konnte keine signifikante Assoziation der 5 untersuchten Polymorphismen (rs6976644, rs7797614, rs17149799, rs13225837, rs7808001) des GRM8-Gens mit der Schizophrenie gefunden werden. Trotzdem sollte der metabotrope Glutamatrezeptor 8 nicht als Kandidatengen der Schizophrenie verworfen werden, denn die Hauptfunktion des Rezeptors als Modulator der Glutamatfreisetzung, lassen ihn in Anbetracht der Hypothese einer hypoglutamatergen Hirnstoffwechsellsage bei schizophrenen Patienten weiterhin als interessantes Suszeptibilitätsgen erscheinen.

Außerdem konnte eine der drei bereits durchgeführten Studien eine Genregion innerhalb des GRM8-Gens als signifikant mit der Schizophrenie assoziiert ausweisen. Dabei ist vor allem die Tatsache interessant, dass die signifikanten Polymorphismen bis jetzt von keiner anderen Arbeitsgruppe untersucht wurden. Daher sollte in zukünftigen Studien versucht werden die signifikanten Ergebnisse von Takaki und Kollegen zu replizieren. Von besonderem Interesse wäre dabei, ob sich die signifikanten Ergebnisse der Takaki-Studie, welche für eine japanische Population gefunden wurden, auch in anderen ethnischen Bevölkerungen nachweisen lassen. Des weiteren wäre die Untersuchung von bestimmten Untergruppen, zum Beispiel nach Geschlecht oder Cannabisabusus, interessant, da bereits in Studien zu anderen Kandidatengenen der Schizophrenie geschlechtsspezifische Assoziationen (Shifman et al., 2002 und 2008; Chen et al., 2006 und 2007; Tan et al., 2005) oder signifikante Ergebnisse nur in Kombination mit Cannabiskonsum (Caspi et al., 2005; Henquet et al., 2009) gefunden wurden. Im Fall des GRM8 weisen Studien mit Knock-out-Mäusen auf geschlechtsspezifische Unterschiede hin (Duvoisin et al., 2010), so dass Analysen auf eine geschlechtsspezifische Assoziation von Polymorphismen im GRM8-Gen mit der Schizophrenie anzustreben sind.

Problematisch bei der molekulargenetischen Forschung der Ätiologie der Schizophrenie ist die phänotypische Heterogenität der Erkrankung. Eine Homogenisierung durch klinisch-psychopathologische Kriterien gestaltet sich schwierig. Inzwischen wurde in einigen Studien versucht durch eine Unterteilung in verschiedene Symptomenkomplexe, zum Beispiel positive, negative/desorganisierte und affektive Symptome, wie in der genomweiten Assoziationsstudie von Fanous und Kollegen (2012), der phänotypischen Heterogenität der Erkrankung Rechnung zu tragen.

Einen alternativer Ansatz für die Suche nach Risikogenen für die Schizophrenie stellt deshalb die Untersuchung von Endophänotypen dar. Endophänotypen repräsentieren messbare neurobiologische Krankheitskorrelate und zeichnen sich durch eine potentiell einfachere

## 5. Diskussion

genetische Determination aus. Dadurch erscheinen sie den klassischen Phänotypen, welche anhand von klinischen Diagnosen eingeteilt werden, überlegen. Durch die Untersuchung von Endophänotypen kann die Sensitivität und Spezifität von Assoziationsstudien, die komplexe Erkrankungen, wie die Schizophrenie, untersuchen, erhöht werden (Ross et al., 2006). Daher wäre auch diese Suchstrategie für die Detektion von signifikanten Polymorphismen im GRM8-Gen in zukünftigen Studien interessant.

Insgesamt stellt die Molekulargenetik ein wichtiges Instrument in der Ursachenforschung der Schizophrenie dar, um krankheitsrelevante Gene zu identifizieren. Die Molekulargenetik dient damit als Basis, um im nächsten Schritt krankheitsverursachende molekulare Mechanismen aufdecken zu können, da diese bis heute nahezu unbekannt sind. Das Ziel stellt schließlich die Entwicklung neuer Therapeutika dar, die durch kausale Angriffspunkte eine effizientere Therapie ermöglichen. Auch Präventivmaßnahmen und eine frühere und zuverlässige Diagnosestellung werden sich durch ein besseres Verständnis der Schizophrenie erwartet.

## **6. Abkürzungsverzeichnis**

| <b>Abkürzung</b> | <b>Erklärung</b>   |
|------------------|--|
| (S)-3,4-DCPG     | (S)-3,4-dicarboxylphenylglycin, mGluR8-Agonist   |
| 5-HT-2A          | 5-Hydroxytryptamin, Serotoninrezeptor  |
| A                | Adenin   |
| AL-Puffer        | Aluminium-Puffer   |
| AMPA             | $\alpha$ -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazol-Propionsäure   |
| Bidest.          | Doppelt destilliert  |
| Bp               | Basenpaare   |
| C                | Cytosin  |
| cAMP             | Zyklisches Adenosinmonophosphat  |
| CCDC60           | coiled-coil domain containing 60   |
| cDNA             | complementary DNA  |
| CI               | Konfidenzintervall   |
| CNV              | Copy Number Variations   |
| COMT             | Catechol-O-;ethyltransferase   |
| CSF2RA           | Colony stimulating factor 2 Rezeptor alpha   |
| D1               | Dopaminrezeptor 1  |
| D2               | Dopaminrezeptor 2  |
| df               | Freiheitsgrade   |
| DISC1            | Disrupted-In-Schizophrenia 1   |
| dNTP             | Desoxyribonukleosidtriphosphate  |
| DRD2             | Dopaminrezeptor D2   |
| DSM-IV           | Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders 4 <sup>th</sup> edition der American Psychiatric Association |
| EDTA             | Ethyldiamintetraessigsäure   |
| FHAM             | Family History Assessment Module   |
| G                | Guanin   |
| G-Protein        | Guaninnukleotid Bindungsprotein  |
| GABA             | Gamma-Aminobuttersäure   |
| GDP              | Guanosindiphosphat   |
| GPCR             | G-Protein gekoppelter Rezeptor   |
| GRIN2B           | NMDA-Rezeptor-Untereinheit 2B  |
| GRM, mGluR       | Metabotroper Glutamatrezeptor  |
| GTP              | Guanisontriphosphat  |

6. Abkürzungsverzeichnis

| <b>Abkürzung</b> | <b>Erklärung</b>  |
|------------------|---|
| GWAS             | Genomweite Assoziationsstudie   |
| HCl              | Salzsäure   |
| ICD-10           | Internationale Klassifikation psychischer Störungen der Weltgesundheitsorganisation |
| IL3RA            | Interleukin 3 Rezeptor alpha  |
| kb               | Kilobasen   |
| LD, D'           | Linkage Disequilibrium,   |
| LY404039         | mGluR2/3-Agonist  |
| MALDI TOF MS     | Matrix assisted laser desorption/ionisation time of flight mass spectrometry        |
| ml               | Milliliter  |
| ng               | Nanogramm   |
| nM               | Nanomol   |
| nm               | Nanometer   |
| NMDA             | N-Methyl-D-Aspartat   |
| NRG1             | Neuregulin 1  |
| p                | p-Wert, Signifikanz   |
| p (Chromosom)    | Kurzer Arm eines Chromosoms   |
| PCP              | Phencyclidin, NMDA-Rezeptorantagonist   |
| PCR              | Polymerasekettenreaktion  |
| pH               | Negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionen                              |
| PLXNA2           | Plexin A2   |
| PPI              | Prepuls Inhibition  |
| Q (Chromosom)    | Langer Arm eines Chromosoms   |
| RBP1             | Retinol bindendes Protein 1   |
| RELN             | Reelin  |
| RGS4             | Regulator of G-Protein signaling 4  |
| RNA              | Ribonukleinsäure  |
| rpm              | Umdrehungen pro Minute  |
| SAP              | Shrimp alkaline Phosphatase   |
| SD               | Standardabweichung  |
| SKID I           | Strukturiertes klinisches Interview für DSM-IV Achse I                              |
| SKID II          | Strukturiertes klinisches Interview für DSM-IV Achse II                             |
| SNP              | Einzel-Nukleotid-Polymorphismus   |
| T                | Thymin  |
| TE               | Tris-Ethylenediamintetraacetat Puffer   |
| TPH1             | Tryptophanhydroxylase 1   |

## 6. Abkürzungsverzeichnis

| Abkürzung     | Erklärung                                   |
|---------------|---|
| Trispuffer    | Tris(hydroxymethyl)-aminomethan, Trometamol |
| WHO           | Weltgesundheitsorganisation                 |
| ZNF804A       | Zinkfinger Protein 804A                     |
| ZNS           | Zentrales Nervensystem                      |
| $\mu\text{l}$ | Mikroliter                                  |
| $\chi^2$      | Chi-Quadrat-Test                            |

## 7. Literaturverzeichnis

**Allen** N. C., Bagade S., McQueen M. B. , Ioannidis J. P. A., Kavvoura F. K., Khouri M. J., Tanzi R. E., Bertram L. (2008). *Systematic meta-analyses and field synopsis of genetic association studies in schizophrenia: the SzGene database*. Nature Genetics Vol. 40(7): 827-834.

**Ashdown** H., Dumont Y., Ng M., Poole S., Boksa P., Luheshi G. N. (2006). *The role of cytokines in mediating effects of prenatal infection in the fetus: implications for schizophrenia*. Molecular Psychiatry 11: 47-55.

**Ashley-Koch** A., Wolpert C. M., Menold M. M., Zaeem L., Basu S., Donnelly S. L., Ravan S. A., Powell C. M., Qumsiyeh M. B., Aylsworth A. S., Vance J. M., Gilbert J. R., Wright H. H., Abramson R. K., DeLong G. R.; Cuccaro M. L.; Pericak-Vance M. A. (1999). *Genetic studies of autistic disorder and chromosome 7*. Genomics 1999;61: 227-36.

**Badner** J. A., Gershon E. S. (2002). *Meta-analysis of whole-genome linkage scans of bipolar disorder and schizophrenia*. Molecular Psychiatry 7: 405-411.

**Barnes** T. R. E., Leeson V. C., Mutsatsa S. H., Watt H. C., Hutton S. B., Joyce E. M. (2008). *Duration of untreated psychosis and social function: 1-Year follow-up study of first-episode schizophrenia*. The British Journal of Psychiatry 193(3): 203-209.

**Barrett** S., Beck J. C., Bernier R., Bisson E.; Braun T. A.; Casavant T. L., Childress D., Folstein S. E., Garcia M., Gardiner M. B., Gilman S., Haines J. L., Hopkins K., Landa R., Meyer N. H., Mullane J. A., Nishimura D. Y., Palmer P., Piven J., Purdy J., Santangelo S. L., Searby C., Sheffield V., Singleton J., Slager S. (1999). *An autosomal genomic screen for autism. Collaborative linkage study of autism*. American Journal of medical genetics 88: 609-15.

**Berg** J. M., Tymoczko, J. L., Stryer, L. (2007). *Stryer Biochemie*. 6. Aufl. 2007, Spektrum Akademischer Verlag.

**Bergen** S. E., Petryshen T. L. (2012). *Genome-wide association studies of schizophrenia: does bigger lead to better results?* Current opinion in Psychiatry 25(2):76-82.

## 7. Literaturverzeichnis

**Bernstein** H.-G., Steiner J. and Bogerts B. (2009). *Glial cells in schizophrenia: pathophysiological significance and possible consequences for therapy.* Expert Review of Neurotherapeutics 9(7): 1059-1071.

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

**Böddeker** I., Ziegler A. (2000). *Assoziations- und Kopplungsstudien zur Analyse von Kandidatengenen.* Deutsche Medizinische Wochenschrift 125: 810-815.

**Bolonna** A. A., Kerwin R. W., Munro J., Arranz M. J., Makoff A. J. (2001). *Polymorphisms in the genes for mGluR types 7 and 8: association studies with schizophrenia.* Schizophrenia Research 47: 99-103.

**Braff** D. L., Freedman R., Schork N. J., Gottesman I. I. (2007). *Deconstructing Schizophrenia: An Overview of the Use of Endophenotypes in Order to Understand a Complex Disorder.* Schizophrenia Bulletin 33(1): 21-32.

**Braff** D. L., Greenwood T. A., Swerdlow N. R., Light G. A., Schork N. J. And the investigators of the consortium on the genetics of schizophrenia (2008). *Advances in endophenotyping schizophrenia.* World Psychiatry 7:11-18.

**Breier** A., Malhotra A. K., Pinals D. A., Weisenfeld N. I., Pickar D. (1997). *Association of ketamine-induced psychosis with focal activation of the prefrontal cortex in healthy volunteers.* The american journal of psychiatry 154(6): 805-811.

**Bromet** E. J., Kotov R., Fochtmann L. J., Carlson G. A., Tanenberg-Karant M., Ruggero C., Chang S. W. (2011). *Diagnostic shifts during the decade following first admission for psychosis.* The american journal of psychiatry 168:1186-94.

**Burbach** J. P. H., van der Zwaag B. (2009). *Contact in the genetics of autism and schizophrenia.* Trends in Neurosciences 32(2): 69-72.

**Byrne** M., Agerbo E., Bennedsen B., Eaton W. W., Mortensen P. B. (2007). *Obstetric conditions and risk of first admission with schizophrenia: a Danish national register based study.* Schizophrenia research 97: 51-59.

## 7. Literaturverzeichnis

- Cai** Z., Saugstad J. A.; Sorensen S. D.; Ciombor K. J., Zhang C., Schaffhauser H., Hubalek F., Pohl J., Duvoisin R. M., Conn P. J. (2001). *Cyclic AMP-dependent protein kinase phosphorylates group III metabotropic glutamate receptors and inhibits their function as presynaptic receptors.* Journal of Neurochemistry 78(4):756-66.
- Cardno** A. G. , Gottesman I. I. (2000). *Twin studies of schizophrenia: From bow-and-arrow concordances to star wars Mx and functional genomics.* American Journal of Medical Genetics 97: 12-17.
- Cardon** L. R., Palmer L. J. (2003). *Population stratification and spurious allelic association.* The Lancet 361: 598-604.
- Carroll** L. S., Owen M. J. (2009). *Genetic overlap between autism, schizophrenia and bipolar disorder.* Genome Medicine 1(10):102.
- Cartmell** J., Schoepp D. D. (2000). *Regulation of Neurotransmitter Release by Metabotropic Glutamate Receptors.* Journal of Neurochemistry 75(3): 889-907.
- Caspi** A., Moffitt T. E., Cannon M., Mc Clay J., Murray R., Harrington H., Taylor A., Arseneault L., Williams B., Braithwaite A., Poulton R., Craig I. W. (2005). *Moderations of the effect of adolescent-onset cannabis use on adult psychosis by a functional polymorphism in the catechol-o-methyltransferase gene: longitudinal evidence of a gene x environment interaction.* Biological Psychiatry 57: 1117-1127.
- Chan** R. C. and Gottesman I. I. (2008). *Neurological soft signs as candidate endophenotypes for schizophrenia.* Neuroscience and Biobehavioral Reviews 32(5):957-71.
- Charych** E. I., Liu F., Moss S. J., Brandon N. J. (2009). *GABAA receptors and their associated proteins: Implications in the etiology and treatment of schizophrenia and related disorders.* Neuropharmacology 57: 481-495.
- Chen** X., Wng X., Hassain S., O'Neill F. A., Walsh D., Pless L., Chowdari K. V., Nimgaonkar V. L., Schwab S. G., Wildenauer D. B., Sullivan P. F., van den Oord E., Kendler K. S. (2006). *Haplotypes spanning SPEC2, PDZ-GEF2 and ACSL genes are associated with schizophrenia.* Human Molecular Genetics 15(22): 3329-3342.

## 7. Literaturverzeichnis

- Chen** X., Wang X., Hossain S., O'Neill F. A., Walsh D., van den Oord E., Fanous A., Kendler K. S. (2007). *Interleukin 3 and schizophrenia: the impact of sex and family history*. Molecular Psychiatry 12(3): 273-282.
- Cheniaux** E., Landeira-Fernandez J., Versiani M. (2009). *The Diagnoses of Schizophrenia, Schizoaffective Disorder, Bipolar Disorder and Unipolar Depression: Interrater Reliability and Congruence between DSM-IV and ICD-10*. Psychopathology 42: 293-298.
- Colhoun** H. M., McKneigue P. M., Smith G. D. (2003). *Problems of reporting genetic associations with complex outcomes*. The Lancet 361: 865-72.
- Conn** P. J., Lindsley C. W., Jones C. K. (2009). *Activation of metabotropic glutamate receptors as a novel approach for the treatment of schizophrenia*. Trends in Pharmacological Sciences 30(1): 25-31.
- Corti** C., Restituito S., Rimland J. M., Brabet I., Corsi M., Pin J. P., Ferraguti F. (1998). *Cloning and characterization of alternative mRNA forms for the rat glutamate receptor mGluR7 and mGluR8*. European Journal of Neuroscience 10: 3629-3641.
- Coutinho** V., Knöpfel T. (2002). *Metabotropic Glutamate Receptors: Electrical and Chemical Signaling Properties*. Neuroscientist 8(6): 551-561.
- Couture** S. M., Penn D. L., Losh M., Adolphs R., Hurley R. und Piven J. (2010). *Comparison of social cognitive functioning in schizophrenia and high functioning autism: more convergence than divergence*. Psychological Medicine 40(4):569-79.
- Coyle** J. T. (2006). *Glutamate and Schizophrenia: Beyond the Dopamine Hypothesis*. Cellular and Molecular Neurobiology 26: 365-384.
- Crow** T. J. (2007). *How and Why Genetic Linkage Has Not Solved the Problem of Psychosis: Review and Hypothesis*. American Journal of Psychiatry 164: 13-21.
- Dawe** G. S., Hwang E. H. J., Tan C. H. (2009). *Pathophysiology and Animal Models of Schizophrenia*. Annals of the Academy of Medicine, Singapore 38: 425-430.

## 7. Literaturverzeichnis

**Desbonnet** L., Waddington J. L., O'Tuathaigh C. M. P. (2009). *Mutant models for genes associated with schizophrenia*. Biochemical Society Transactions 37(1): 308-312.

**Devon** R. S., Anderson S., Teague P. W., Muir W. J., Murray V., Pelosi A. J., Blackwood D. H., Portous D. J. (2001). *The genomic organisation of the metabotropic glutamate receptor 5 gene, and its association with schizophrenia*. Molecular Psychiatry 6: 311-314.

**du Bois** T., Huang X.-F. (2007). *Early brain development disruption from NMDA receptor hypofunction: Relevance to schizophrenia*. Brain Research Reviews 53: 260-270.

**Durand** D., Pampillo M., Caruso C., Lasaga M. (2008). *Role of metabotropic glutamate receptors in the control of neuroendocrine function*. Neuropharmacology 55: 577-583.

**Duvoisin** R. M., Zhang C., Ramonell K. (1995). *A Novel Metabotropic Glutamate Receptor Expressed in the Retina and Olfactory Bulb*. The Journal of Neuroscience 15(4): 3075-3083.

**Duvoisin** R. M., Zhang C., Pfankuch T. F., O'Connor H., Gayet-Primo J., Quraishi S., Raber J. (2005). *Increased measures of anxiety and weight gain in mice lacking the group III metabotropic glutamate receptor mGluR8*. European Journal of Neuroscience 22: 425-436.

**Duvoisin** R. M., Villasana L., Pfankuch T., Raber J. (2010a). *Sex-dependent cognitive phenotype of mice lacking mGluR8*. Behavioural Brain Research 209: 21-26.

**Duvoisin** R. M., Pfankuch T., Wilson J. M., Grabell J., Chhajlani V., Brown D. G., Johnson E., Raber J. (2010b). *Acute pharmacological modulation of mGluR8 reduces measures of anxiety*. Behavioural Brain Research 212: 168-173.

**Egan** M. F., Straub R. E., Goldberg T. E., Yakub I., Callicott J. H., Hariri A. R., Mattay V. S., Bertolin A., Hyde T. M., Shannon-Weickert C., Akil M., Crook J., Vakkalanka R. M., Balkissoon R., Gibbs R. A., Kleinman J. E., Weinberger D. R. (2004). *Variations in GRM3 affects cognition, prefrontal glutamate and risk for schizophrenia*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 101(34): 12604-12609.

**El Far** O., Airas J., Wischmeyer E., Nehring R. B., Karschin A., Betz H. (2000). *Interaction of the C-terminal tail region of the metabotropic glutamate receptor 7 with the protein kinase C substrate PICK1*. European Journal of Neuroscience 12(12): 4215-21.

## 7. Literaturverzeichnis

**Enz** R. (2006). *The trick of the tail: protein-protein interactions of metabotropic glutamate receptors.* BioEssays 29: 60-73.

**Fanous** A. H., Zhou B., Aggen S. H., Bergen S. E., Amdur R. L., Duan J., Sanders A. R., Shi J., Mowry B. J., Olincy A., Amin F., Cloninger C. R., Silverman J. M., Buccola N. G., Byerley W. F., Black D. W., Freedman R., Dudbridge F., Holmans P. A., Ripke S., Gejman P. V., Kendler K. S., LevinsonD. F., Schizophrenia Psychiatric Genome-Wide Association Study (GWAS) Consortium (2012). *Genome-wide association study of clinical dimensions of schizophrenia: polygenic effect on disorganized symptoms.* The American Journal of Psychiatry 2012 Dec 1;169(12):1309-17.

**Farooq** S., Large M., Nielssen O., Waheed W. (2009). *The relationship between the duration of untreated psychosis and outcome in low-and-middle income countries: a systematic review and meta analysis.* Schizophrenia Research 109: 15-23.

**Fendt** M., Bürki H., Imobersteg S., van der Putten H., McAllister K., Leslie J. C., Shaw D., Hölscher C. (2010). *The effect of mGlu8 deficiency in animal models o psychiatric diseases.* Genes, Brain and Behavior 9: 33-44.

**Ferraguti** F., Klausenberger T., Cobden P., Baude A., Roberts J. D. B., Szucs P., Kinoshita A., Shigemoto R., Somogyi P., Dalezios Y. (2005). *Metabotropic Glutamate Receptor 8-Expressing Nerve Terminals Target Subsets of GABAergic Neurons in the Hippocampus.* The Journal of Neuroscience 25(45): 10520-10536.

**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.* The Journal of clinical Psychiatry 67: 916-924.

**Freudenberg** J., Cichon S., Nöthen M. M., Propping P. (2002). *Blockstruktur des menschlichen Genoms.* Deutsches Ärzteblatt 99 (47): 3190-3195.

**Fujii** Y., Shibata H., Kikuta R., Makino C., Tani A., Hirata N., Shibata A., Ninomiya H., Tashiro N., Fukumaki Y. (2003). *Positive associations of polymorphisms in the metabotropic glutamate receptor type 3 gene (GRM3) with schizophrenia.* Psychiatric genetics 13(2): 71-76.

**Fujii** T., Iijima Y., Kondo H., Shizuno T., Hori H., Nakabayashi T., Arima K., Saitoh O., Kunugi H.

## 7. Literaturverzeichnis

(2007). *Failure to confirm an association between the PLXNA2 gene and schizophrenia in a japanese population.* Progress in neuro-psychopharmacology and biological psychiatry. 31(4): 873-7.

**Gaspar** P. A., Bustamante M. L., Silva H., Aboitiz F. (2009). *Molecular mechanisms underlying glutamatergic dysfunction in schizophrenia: therapeutic implications.* Journal of Neurochemistry 111: 891-900.

**Gerlai** R., Adams B., Fitch T., Chaney S., Baez M. (2002). *Performance deficits of mGluR8 knockout mice in learning tasks: the effects of null mutation and the background genotype.* Neuropharmacology 43: 235-249.

**Glantz** L. A., Gilmore J. H., Lieberman J. A., Jarskog L. F. (2006). *Apoptotic mechanisms and the synaptic pathology of schizophrenia.* Schizophrenia Research 81: 47-63.

**Goodwin** H., Curran N., Chioza B., Blower J., Nashef L., Asherson P., Makoff A. J. (2000). *No association found between polymorphisms in genes encoding in mGluR7 and mGluR8 and idiopathic generalised epilepsy in a case control study.* Epilepsy research 39: 27-31.

**Grossman** L. S., Harrow M., Rosen C., Faull R., Strauss G. P. (2008). *Sex differences in schizophrenia and other psychotic disorders: A 20-year longitudinal study of psychosis and recovery.* Comprehensive Psychiatry 49(6): 523-529.

**Guo** J., Ideka S. R. (2005). *Coupling of Metabotropic Glutamate Receptor 8 to N-Type Ca<sup>2+</sup> Channels in Rat Sympathetic Neurons.* Molecular Pharmacology 67: 1840-1851.

**Häfner** H. (2003). *Gender differences in schizophrenia.* Psychoneuroendocrinology 28(2): 17-54.

**Harrison** G., Hopper K., Craig T., Laska E., Siegel C., Wanderling J., Dube K. C., Ganev K., Giel R., an der Heiden W., Holmberg S. K., Janca A., Lee P. W. H., León C. A., Malhotra S., Marsella A., J., Nekane Y., Sartorius N., Shen Y., Skoda C., Thara R., Tsirkin S. J., Varma V. K., Marsh D., Wiersma D. (2001). *Recovery from psychotic illness: a 15- and 25-Year international follow-up study.* British Journal of Psychiatry 178: 506-517.

**Havlickova** M., Blahos J., Brabet I., Liu J., Hruskova B., Prézeau L., Pin J.-P. (2003). *The Second Intracellular Loop of Metabotropic Glutamate Receptors Recognizes C Termini of G-protein α-*

## 7. Literaturverzeichnis

*Subunits.* The Journal of Biological Chemistry 278 (37): 35063-35070.

**Henquet** C., Rosa A., Delespaul P., Papiol S., Fananás L., van Os J., Myin-Germeys I. (2009). *COMT ValMet moderation of cannabis-induced psychosis: a momentary assessment study of switching on hallucinations in the flow of daily life.* Acta psychiatrica Scandinavica 119:156-160.

**Hor** K., Taylor M. (2010). *Suicide and Schizophrenia: a systematic review of rates and risk factors.* Journal of Psychopharmacology 2010 November; 24(4\_supplement): 81–90.

**Horn** F., Lindenmeier G., Moc I., Grillhösl C., Berghold S., Schneider N., Münster B. (2003). *Biochemie des Menschen.* 2., korrigierte Auflage. Stuttgart:Georg Thieme Verlag.

**Howes** O. D. and Kapur S. (2009). *The Dopamine Hypothesis of Schizophrenia: Version III-The Final Common Pathway.* Schizophrenia Bulletin Vol. 35 no. 3: 549-562.

**IMGSAC.** (1998). *A full genome screen for autism with evidence for linkage to a region on chromosom 7q.* Human molecular genetics 1998, 7: 571-8

**International HapMap Consortium** (2005). *A haplotype map of the human genome.* Nature 437(7063): 1299-1319.

**Jakobi** W., Winkler H. (1927). *Encephalographische Studien an chronische Schizophrenen.* Archiv für Psychiatrie und Nervenkrankheiten 81: 299-332.

**Javitt** D. C., Zukin S. R. (1991). *Recent advances in the phencyclidine model of schizophrenia.* The american journal of psychiatry 148(10):1301-1308.

**Jingami** H., Nakanishi S., Morikawa K. (2003). *Structure of the metabotropic glutamate receptor.* Current Opinion in Neurobiology 13: 271-278.

**Kallman** F. J. (1946). *The genetic theory of schizophrenia: an analysis of 691 schizophrenic twin index families.* The American Journal of Psychiatry 103: 309-322.

**Keshavan** M. S., Tandon R., Boutros N. N., Nasrallah H. A. (2008). *Schizophrenia „just the facts“: What we know in 2008 Part 3: Neurobiology.* Schizophrenia Research (2008), doi: 10.1016/j.schres2008.07.020.

## 7. Literaturverzeichnis

**Kessler** J., Folstein S. E., Denzler P. (1990). *MMST. Mini-Mental-Status-Test. Deutschsprachige Fassung.* Weinheim: Beltz.

**Kety** S. S., Wender P. H., Jacobsen B., Ingraham L. J., Jansson L., Faber B., Kinney D. K. (1994). *Mental illness in the biological and adoptive relatives of schizophrenic adoptees. Replication of the Copenhagen Study in the rest of Denmark.* Archives of general psychiatry 51(6): 442-55.

**Kinoshita** A., Ohishi H., Neki A., Nomura S., Shigemoto R., Takada M., Nakanishi S., Mizuno N. (1996). *Presynaptic localisation of a metabotropic glutamate receptor, mGluR8, in the rhinencephalic areas: a light and electron microscopy study in the rat.* Neuroscience Letters 207: 61-64.

**Kirov** G., Zaharieva I., Georgieva L., Moskvina V., Nikolov I., Cichon S., Hillmer A., Toncheva D., Owen M.J., O'Donovan M.C. (2008). *A genome-wide association study in 574 schizophrenia trios using DNA pooling.* Molecular Psychiatry 14(8):796-803 .

**Kobayashi** Y., Akiyoshi J., Kaneshisa M., Ichioka S., Tanaka Y., Tsuru J., Hanada H., Kodama K., IsogawaK., Tsutsumi T. (2007). *Lack of polymorphism in genes encoding mGluR7, mGluR8, GABA(A) receptor alfa-6 subunit and nociceptin/orphanin FQ receptor and panic disorder.* Psychiatric Genetics 17(1):9.

**Kobilka** B. K. (2007). *G protein coupled receptor structure and activation.* Biochimica and biophysica acta 1766(4): 794-807.

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

**Kraepelin** E. (1899). *Zur Diagnose und Prognose der Dementia praecox.* Allgemeine Zeitschrift für Psychiatrie Nr. 56: 254–263.

**Krivoy** A., Fischel T., Weizman A. (2008). *The possible involvement of metabotropic glutamate receptors in schizophrenia.* European Neuropsychopharmacology 18: 395-405.

**Krystal** J. H., Karper L. P., Seibyl J. P., Freeman G. K., Delaney R., Bremner J. D., Heninger G. R., Bowers M. B. Jr., Charney D. S. (1994). *Subanesthetic effects of the noncompetitive NMDA*

## 7. Literaturverzeichnis

*antagonist, ketamine, in humans.* Archives of general psychiatry 51(3): 199-214.

**Lang** U. E., Puls I., Müller J., Strutz-Seebohm N., Gallinat J. (2007). *Molecular Mechanisms of Schizophrenia.* Cellular Physiology and Biochemistry 20: 687-702.

**Larsson** H. J., Eaton W. W., Madsen K. M., Vestergaard M., Olesen A. V., Agerbo E., Schendel D., Thorsen P., Mortensen P. B. (2005). *Risk factors for autism: Perinatal factors, parental psychiatric history, and socioeconomic status.* American Journal of Epidemiology 161(10): 916-925.

**Lathi** A. C., Weiler M. A., Tamara Michaelidis B. A., Parwani A., Tamminga C. A. (2001). *Effects of ketamine in normal and schizophrenic Volunteers.* Neuropharmacology 25: 455-467.

**Lawrie** S. M., Abukmeil S. S. (1998). *Brain abnormality in schizophrenia. A systematic and quantitative review of volumetric magnetic resonance imaging studies.* British Journal of Psychiatry 172: 110-120.

**Lencz** T., Morgan T.V., Athanasiou M., Dain B., Reed C.R., Kane J.M., Kucherlapati R., Malhotra A.K. (2007). *Converging evidence for a pseudoautosomal cytokine receptor gene locus in schizophrenia.* Molecular Psychiatry 12(6):572-80.

**Lewis** C. M., Levinson D. F., Wise L. H., DeLisi L. E., Straub R. E., Hovatta I., Williams N. M., Schwab S. G., Pulver A. E., Faraone S. V., Brzustowicz L. M., Kaufmann C. A., Garver D., L., Gurling H. M. D., Lindholm E., Coon H., Moises H. W., Byerley W., Shaw S. H., Mesen A., Sherrington R., O'Neil F. A., Walsh D., Kendler K. S., Ekelund J., Paunio T., Lönnqvist J., Peltonen L., O'Donovan M. C., Owen M. J., Wildenauer D. B., Maier W., Nestadt G., Blouin J.-L., Antonarakis S. E., Mowry B. J., Silverman J. M., Crowe R. R., Cloninger C. R., Tsuang M. T., Malaspina D., Harkavy-Friedman J. M., Svarkic D. M., Bassett A. S., 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.* American Journal of Human Genetics 73: 34-48.

**Li** H., Li Y., Shao J., Li R., Qin Y., Xie C., Zhao Z. (2008). *The association analysis of RELN and GRM8 genes with autistic spectrum disorder in Chinese Han population.* American Journal of medical genetics. Part B, Neuropsychiatric genetics 147B(2): 194-200.

## 7. Literaturverzeichnis

- Linden** A.-M., Johnson B. G., Peters S. C., Shannon H. E., Tian M., Wang Y., Yu J. L., Köster A., Baez M., Schoepp D. D. (2002). *Increased anxiety-related behavior in mice deficient for metabotropic glutamate 8 (mGlu8) receptor*. Neuropharmacology 43: 251-259.
- Liu** J., Nyholt D. R., Magnussen P., Parano E., Pavone P., Geschwind D., Lord C., Iversen P., Hoh J., Ott J., Gilliam T. C. (2001). *A genomewide screen for autism susceptibility loci*. American Journal of Human genetics 2001, 69: 327-40.
- MacDonald** A. W., Schulz S. C. (2009). *What We Know: Findings That Every Theory of Schizophrenia Should Explain*. Schizophrenia Bulletin 35(3): 493-508.
- Mah** S., Nelson M. R., DeLisi L. E., Reneland R. H., Markward N., James M. R., Nyholt D. R., Hayward N., Handoko H., Mowry B., Kammerer S., Braun A. (2006). *Identification of the semaphorin receptor PLXNA2 as a candidate for susceptibility to schizophrenia*. Molecular Psychiatry 11: 471-478.
- Malherbe** P., Kratzeisen C., Lundstrom K., Richards J. G., Faull R. L. M., Mutel V. (1999). *Cloning and functional expression of alternative spliced variants of the human metabotropic glutamate receptor 8*. Molecular Brain Research 67: 201-210.
- Marabese** I., de Novellis V., Palazzo E., Scarfuro M. A., Vita D., Rossi F., Maione S. (2006). *Effects of (S)-3,4-DCPG, an mGlu8 receptor agonist, on inflammatory and neuropathic pain in mice*. Neuropharmacology 52: 253-262.
- Marabese** I., Rossi F., Palazzo E., de Novellis V., Starowicz K., Cristino L., Vita D., Gatta L., Guida F., Di Marzo V., Rossi F., Maione S. (2007). *Periaqueductal Gray Metabotropic Glutamate Receptor Subtype 7 and 8 Mediate Opposite Effects on Amino Acid Release, Rostral Ventromedial Medulla Cell Activities, and Thermal Nociception*. Journal of Neurophysiology 98: 43-53.
- McGrath** J., Saha S., Welhalm J., Saadi O. E., 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 medicine (2004): doi: 10.1186/1741-7015-2-13.
- McGrath** J. J. (2006). *Variations in the Incidence of Schizophrenia: Data Versus Dogma*. Schizophrenia Bulletin 32(1): 195-197.

## 7. Literaturverzeichnis

**McGrath** J. J., Saha S., Chant D., Welham J. (2008). *Schizophrenia: A Concise Overview of Incidence, Prevalence and Mortality*. Epidemiologic Reviews 30: 67-76.

**Meador-Woodruff** J. H., Healy D. J. (2000). *Glutamate receptor expression in schizophrenic brain*. Brain Research 31: 288-294.

**Meador-Woodruff** J. H., Clinton S. M., Beneyto M., McCullumsmith R. E. (2003). *Molecular abnormalities of the glutamate synapse in the thalamus in schizophrenia*. Annals of the New York Academy of Sciences 1003: 75-93.

**Meyer** U., Yee B. K., Feldon J. (2007). *The neurodevelopmental impact of prenatal infections at different times in pregnancy: the earlier the worse*. Neuroscientist 13: 241-266.

**Mezler** M., Geneste H., Gault L., Marek G. J. (2010). *LY-2140023, a prodrug of the group II metabotropic glutamate receptor agonist LY-404039 for the potential treatment of schizophrenia*. Current opinion in investigational drugs 2010 11(7): 833-45.

**Mezzich** J. E. 2002. *International surveys on the use of ICD-10 and related diagnostic systems*. Psychopathology 35: 72-75.

**Moises** H. W., Yang L., Kristbjarnarson H., Wiese C., W. Beyerley W., Macciardi F., Arolt V., Blackwood D., Liu X., Sjögren B., Aschauer H. N., Hwu H.-G., Jang K., Livesley W. J., Kennedy J. L., Zoega T., Ivarsson O., Bui M.-T., Yu M.-H., Havsteen B., Commenges D., Weissenbach J., Schwinger E., Gottesman I. I., Pakstis A. J., Wetterberg L., Kidd K. K., Helgason T. (1995). *An international two-stage genome-wide search for susceptibility genes*. Nature genetics 11: 321-324.

**Möller** H.-J., Laux G., Deister A. (2009). *Duale Reihe. Psychiatrie und Psychotherapie*. 4., überarbeitete Auflage. Stuttgart: Georg Thieme Verlag KG.

**Moreno-De-Luca** D., SGENE Consortium, Mulle J. G., Simons Simplex Collection Genetics Consortium, Kaminsky E. B., Sanders S. J., GeneSTAR, Myers S. M., Adam M. P., Pakula A. T., Eisenhauer N. J., Uhas K., Weik L., Guy L., Care M. E., Morel C. F., Boni C., Salbert B. A., Chandraseddy A., Demmer L. A., Chow E. W., Surti U., Aradhya S., Pickering D. L., Golden D. M., Sanger W. G., Aston E., Brothman A. R., Gliem T. J., Thorland E. C., Ackley T., Iyer R., Huang S., Barber J. C., Crolla J. C., Warren S. T., Martin C. L., Ledbetter D. H. (2010). *Deletion 17q12 is a recurrent copy number variant that confers high risk of autism and schizophrenia*. American journal

## 7. Literaturverzeichnis

of human genetics 87(5): 618-30.

**Morgen** C., Fisher H. (2007). *Environmental factors in schizophrenia: childhood trauma-a critical review*. Schizophrenia Bulletin 33: 3-10.

**Mössner** R., Schuhmacher A., Schulze-Rauschenbach S., Kühn K. U., Rujescu D., Rietschel M., Zobel A., Franke P., Wölwer W., Gaebel W., Häfner H., Wagner M., Maier W. (2008). *Further evidence for a functional role of the glutamate receptor gene GRM3 in schizophrenia*. European Neuropharmacology 18(10): 768-772.

**Muto** T., Tsuchiya D., Morikae K., Jingami H. (2007). *Structures of the extracellular regions of the group II/III metabotropic glutamate receptors*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 104(10): 3759-3764.

**Need** A. C., Keefe R. S. E., Ge D., Grossmann I., Dickson S., McEvoy J. P., Goldstein D. B. (2009). *Pharmacogenetics of antipsychotic response in the CATIE trial: a candidate gene analysis*. European Journal of Human Genetics (2009) 17, 946-957.

**Nicoletti** F., Bockaert J., Collingridge G. L., Conn J. P., Ferraguti F., Schoepp D. D., Wroblewski J. T., Pin J., P. (2010). *Metabotropic glutamate receptors: From the workbench to the bedside*. Neuropharmacology 4 Nov. 2010: 1-25.

**Nielsen** D. A., Ji F., Yufero V., Ho A., Chen A., Levran O., Ott J., Kreek M. J. (2008). *Genotype patterns that contribute to increasea risk for or protection from developing heroin addiction*. Molecular psychiatry 13(4): 417-428.

**Ng** M.Y.M., Levinson D. F., Faraone S. V., Suarez B. K., DeLisi L. E., Arinami T., Riley B., Paunio T., Pulver A. E., Irmansah, Holmans P.A., Escamilla M., Wildenauer D. B., Williams N. M., Laurent C., Mowry B. J., Brzustowicz L. M., Maziade M., Sklar P., Garver D. L.; Abecasis G. R., Lerer B., Fallin M. D., Gurling H. M. D., Gejam P. V., Lindholm E., Moises H. W., Byerley W., Wijsman E. M., Forabosco P., Tsuang M. T., Hwu H.-G., Okazaki Y., Kendler K. S., Wormley B., Fanous A., Walsh D., O'Neil F. A., Peltonen L., Nestadt G., Lasseter V. K., Liang K. Y., Papadimitriou G. M., Dikeos D. G., Schwab S. G., Owen M. J., O'Donovan M.C., Norton N., Hare E., Raventos H., Nicolini H., Albus M., Maier W., Nimgaonkar V. L., Terenius L., Mallet J., Jay M., Godard S., Nertney D., Alexander M., Crowe R. R., Silverman J. M., Bassett A. S., Roy M.-A., Mérette C., Pato C. N., Pato M. T., Louw Roos J., Kohn Y., Amann-Zalcenstein D., Kalsi G., McQuillin A., Curtis D., Brynjolfson

## 7. Literaturverzeichnis

J., Sigmundsson T., Petursson H., Sanders A. R., Duan J., Jazin E., Myles-Worsley M., Karayiorgou M., Lewis C. M. (2009). *Meta-analysis of 32 genom-wide linkage studies of schizophrenia*. Molecular Psychiatry 14: 774-785.

O'Connor V., El Far O., Bofill-Cardona E., Nanoff C., Freissmuth M., Karschin A., Airas J.M., Betz H., Boehm S. (1999). *Calmodulin dependence of presynaptic metabotropic glutamate receptor signaling*. Science (Wash DC) 286: 1180–1184.

O'Donovan M. C., Craddock N., Norton N., Williams H., Peirce T., Moskvina V., Nikolov I., Hamshere M., Carroll L., Georgieva L., Dwyer S., Holmans P., Marchini J. L., Spencer C. C., Howie B., Leung H. T., Hartmann A. M., Möller H.-J., Morris D. W., Shi Y., Feng G., Hoffmann P., Propping P., Vasilescu C., Maier W., Rietschel M., Zammit S., Schumacher J., Quinn E. M., Schulze T. G., Williams N. M., Giegling I., Iwarta N., Ideka M., Darvasi A., Shifman S., He L., Duan J., Sanders A. R., Levinson D. F., Gejman P. V., Cichon S., Nothen M. M., Gill M., Corvin A., Rujescu D., Kirov G., Owen M. J., Buccola N. G., Mowry B. J., Freedman R., Amin F., Black D. W., Silverman J. M., Byerley W. F., Cloninger C. R.. Molecular Genetics of Schizophrenia Collaboration. (2008). *Identification of loci associated with schizophrenia by genome-wide association and follow-up*. Nature genetics 40: 1053-1055.

Ohtsuki T., Toru M., Arinami T. (2001). *Mutation screening of the metabotropic glutamate receptor mGluR4 (GRM4) gene in patients with schizophrenia*. Psychiatric genetics 11: 79-83.

Ohtsuki T., Koga M., Ishiguro H., Horiuchi Y., Arai M., Niizato K., Itokawa M., Inada T., Iwata N., Iritani S., Ozaki N., Kunugi H., Kjike H., Watanabe Y., Someya T., Arinami T. (2008). *A polymorphism of the metabotropic glutamate receptor mGluR7 (GRM7) gene is associated with schizophrenia*. Schizophrenia research 101: 9-16.

Owen M. J., Williams H. J., O'Donovan M. C. (2009). *Schizophrenia genetics: advancing on two fronts*. Current Opinion in Genetics and Development 19: 266-270.

Palazzo E., Fu Y., Ji G., Maione S., Neugebauer V. (2008). *Group III mGluR7 and mGluR8 in the amygdala differentially modulate nocifensive and affective pain behaviors*. Neuropharmacology 55: 537-545.

Patil S. T., Zhang L., Martenyi F., Lowe S. L., Jackson K. A., Andreev B. V., Avedisova A. S., Bardenstein L. M.; Gurovich I. Y., Morozova M. A., Mosolov S. N. Neznanoy N. G., Reznik A. M.,

## 7. Literaturverzeichnis

Smulevich A. B., Tochilov V. A., Johnson B. G., Monn J. A., Schoepp D. D. (2007). *Activation of mGlu2/3 receptors as a new approach to treat schizophrenia: a randomized Phase 2 clinical trial.* Nature medicine 13(9): 1102-1107.

**Penner** J. D., Brown A. S. (2007). *Prenatal infectious and nutritional factors and risk of schizophrenia.* Expert Review of Neurotherapeutics 7: 797-805.

**Perkins** D. O., Gu H., Boteva K., Lieberman J. A. (2005). *Relationship Between Duration of Untreated Psychosis and Outcome in First-Episode Schizophrenia: A Critical Review and Meta-Analysis.* The American Journal of Psychiatry 162: 1785-1804.

**Perroy** J., El Far O., Bertaso F., Pin J. P., Betz H., Bockaert J., Fagni L. (2002). *PICK1 is required for the control of synaptic transmission by the metabotropic glutamate receptor 7.* The EMBO Journal 21(12): 2990-9.

**Philippe** A., Martiney M., Guilloud-Bataille M., Gillberg C., Rastam M., Sponheim E., Coleman M., Zappella M., Aschauer H., Van Maldergem L., Penet C., Feingold J., Brice A., Leboyer M., van Malgerderme L. (1999). *Genome-wide scan for autism susceptibility genes. Paris Autism Research International Sibpair Study.* Human molecular genetics 1999, 8: 805-12.

**Pin** J.-P., Galvez T., Prézeau L. (2003). *Evolution, structure, and activation mechanism of family 3/C G-protein-coupled receptors.* Pharmacology and Therapeutics 98: 325-354.

**Pin** J.-P., Comps-Agrar L., Maurel D., Monnier C., Rives M. L., Trinquet E., Kniazeff J., Rondard P., Prezeau L. (2009). *GPCR oligomers: two or more for what? Lessons from mGlu and GABAB receptors.* The journal of physiology 587: 5337-5344.

**Preininger** A. M., Hamm H. E. (2004). *G-protein signaling: insights from new structures.* Science's STKE 218:re3.

**Psychiatric GWAS Consortium Coordinating Committee**, Cichon S., Craddock N., Daly M., Faraone S. V., Gejman P. V., Kelsoe J., Lehner T., Levinson D. F., Moran A., Sklar P., Sullivan P. F. (2009). *Genomwide Association Studies: History, Rationale, and Prospects for Psychiatric Disorders.* The American Journal of Psychiatry 166(5):540-556.

**Psychiatric GWAS Consortium Steering Committee** (2009). *A framework for interpreting*

## 7. Literaturverzeichnis

*genome-wide association studies of psychiatric disorders.* Molecular Psychiatry 14:10-17.

**Purcell** S. M., Wray N. R., Stone J. L., Visscher P. M., O'Donovan M. C., Sullivan P. F., Sklar P. (International Schizophrenia Consortium) (2009). *Common polygenetic variations contributes to risk of schizophrenia and bipolar disorder.* Nature 460(7256):748-52.

**QIAGEN GmbH**, 2005. *QIAamp DNA Blood Midi/Maxi Handbook.* Hilden.

**Redon** R., Ishikawa S., Fitch K. R., Fenn L., Perry G. H., Andrews T. D., Fiegler H., Shapero M. H., Carson A. R., Chen W., Cho E. K., Dallaire S., Freeman J. L., González J. R., Gratacòs M., Huang J., Kalaizoupolis D., Komura D., MacDonald J. R., Marshall C. R., Mei R., Montgomery L., Nishimura K., Okamura K., Shen F., Somerville M. J., TchindaJ., Valsesia A., Woodwark C., Yang F., Zhang J., Zerjal T., Zhang J., Armengol L., Conrad D. F., Estivill X., Tyler-Smith C., Carter N. P., Aburatani H., Lee C., Jones K. W., Scherer S. W., Hurles M. E. (2006). *Global variation in copy number in the human genome.* Nature 444: 444-454.

**Rice** J. P., Reich T., Buchholz K. K., Neuman R. J., Fishman R., Rochberg N., Hesselbrock V. M., Nurnberger J. I., Schuckit M. A., Begleiter H. (1995). *Comparison of direct interview and family history diagnoses of alcohol dependence.* Alcoholism: Clinical and Experimental Research 19: 1018-1023.

**Ripke** S., Sanders A. R., Kendler K. S., Levinson D. F., Sklar P., Holmans P. S., Lin D. Y., Duan J., Ophoff R. A., Andreassen O. A., Scolnick E., Cichon S., St Clair D., Corvin A., Gurling H., Werge T., Rujescu D., Blackwood D. H., Pato C. N., Malhotra A. K., Purcell S., Dudbridge F., Neale B. M., Rossin L., Visscher P. M., Posthuma D., Ruderfer D. M., Fanous A.; Stefansson H., Steinberg S., Mowry B. J., Golimbet V., De Hert M., Jönsson E; G., Bitter I., Pietiläinen O. P., Collier D. A., Tosato S., Agartz I., Alnus M., Alexander M., Amdur R. L., Amin F., Bass N., Bergen S. E., Black D. W., Børglum A. D., Brown M. A., Bruggeman R., Buccola N. G., Byerley W. F., Cahn W., Cantor R. M., Carr V. J., Catts S. V., Choudhury K., Cloninger C. R., Cormican P., Craddock N., Danoy P. A., Datta S., de Haan L., Demontis D., Dikeos D., Djurovic S., Donnelly P., Donohoe G., Duong L., Dwyer S., Fink-Jensen A., Freedman R., Freimer N. B., Friedl M., Georgieva L., Giegling I., Gill M., Glenthøj B., Godard S., Hamshere M., Hansen M., Hansen T., Hartmann A. M., Henskens F. A., Hougaard D. M., Hultman C. M., Ingason A., Jakobson K. D., Jay M., Jürgens G., Kahn R. S., Keller M. C., Kenis G., Kenny E., Kim Y., Kirov G. K., Konnerth H., Konte B., Krabbendam L., Krasucki R., Lasseter V. K., Laurent C., Lawrence J., Lencz T., Lerer F. B., Liang K. Y., Lichtenstein P., Lieberman J. A., Linszen D. H., Lönnqvist J., Loughland C. M.,

## 7. Literaturverzeichnis

Maclean A. W., Maher B. S., Maier W., Mallet J., Malloy P., Mattheisen M., Mattingsdal M., McGhee K. A., McGrath J. J., McIntosh A., McLean D. E., McQuillin A., Melle I., Michie P. T., Milanova V., Morris D. W., Mors O., Mortensen P. B., Moskvina V., Muglia P., Myin-Germeys I., Nertney D. A., Nestadt G., Nielsen J., Nikolov I., Nordentoft M., Norton N., Nöthen M. M., O'Dushlaine C. T., Olincy A., Olsen L., O'Neill F. A., Orntoft T. F., Owen M. J., Pantelis C., Papadimitriou G., Pato M. T., Peltonen L., Petursson H., Pickard B., Pimm J., Pulver A. E., Puri V., Quested D., Quinn E. M., Rasmussen H. B., Réthelyi J. M., Ribble R., Rietschel M., Riley B. P., Ruggeri M., Schall U., Schulze T. G., Schwab S. G., Scott R. J., Shi J., Sigurdsson E., Silverman J. M., Spencer C. C., Stefansson K., Strange A., Strengman E., Stroup T. S., Suvisaari J., Terenius L., Thirumalai S., Thygesen J. H., Timm S., Toncheva D., van den Oord E., van Os J., van Winkel R., Veldink J., Walsh D., Wang A. G., Wiersma D., Wildenauer D. B., Williams H. J., Williams N. M., Wormley B., Zammit S., Sullivan P. F., O'Donovan M. C., Daly M. J., Gejman P. V.; Schizophrenia Psychiatric Genome-Wide Association Study (GWAS) Consortium (2011). *Genome-wide association study identifies five new schizophrenia loci*. Nature Genetics 43(10):969-76.

**Risch** N., Spiker D., Lotspeich L., Nouri N., Hinds D., Hallmayer J., Kalaydjieva L., McCague P., Dimiceli S., Pitts T., Nguyen L., Yang J., Harper C., Thorpe D., Vermeer S., Young H., Herbert J., Lin A., Ferguson J., Chiotti C., Wiese-Slater S., Rogers T., Salmon B., Nicholas P., Myers R. M.. (1999). *A genomic screen of autism: evidence for a multilocus etiology*. American Journal of human genetics 1999, 65:493-507.

**Robbins** M. J., Starr K. R., Honey A., Soffin E. M., Rourke C., Jones G. A., Kelly F. M., Strum J., Melarange R. A., Harris A. J., Rocheville M., Rupniak T., Murdock P. R., Jones D. N. C., Kew J. N. C., Maycox P. R. (2007). *Evaluation of the mGlu8 receptor as a putative therapeutic target in schizophrenia*. Brain Research 1152: 215-227.

**Roth** L. T., Lubin F. D., Sodhi M., Kleinman J. E. (2009). *Epigenetic mechanisms in schizophrenia*. Biochimica et Biophysica Acta 1790: 869-877.

**Ross** C. A., Margolis R. L., Reading S. A. J., Plernikov M., Coyle J. T. (2006). *Neurobiology of schizophrenia*. Neuron 52: 139-153.

**Saha** S., Chant D., Welham J. McGrath J. J. (2005). *A Systematic Review of the Prevalence of Schizophrenia*. PloS Medicine 2(5): 413-141.

## 7. Literaturverzeichnis

**Saha** S., Chant D., McGrath J. J. (2008). *Meta-analyses of the incidence and prevalence of schizophrenia: conceptual and methodological issues.* International Journal of Methods in Psychiatric Research 17(1): 55-61.

**Saugstad** J. A., Kinzie J. M., Shinohara M. M., Segerson T. P., Westbrook G. L. (1997). *Cloning and expression of rat metabotropic glutamate receptor 8 reveals a distinct pharmacological profile.* Molecular Pharmacology 51: 119-125.

**Scherer** S. W., Soder S., Duvoisin R. M., Huizenga J. J., Tsui L.-C. (1997). *The Human Metabotropic Glutamate Receptor 8 (GRM8) Gene: A Disproportionately Large Gene Located at 7q31.3-7q32.1.* Genomics 44: 232-236.

**Schizophreniaforum** (2011). <http://www.schizophreniaforum.org/res/sczgene/default.asp>

**Schmid** S., Fendt M. (2006). *Effects of the mGluR8 agonist (S)-3,4-DCPG in the lateral amygdala on acquisition/expression of fear-potentiated startle, synaptic transmission, and plasticity.* Neuropharmacology 50: 154-164.

**Schneider** K. (1957). *Primäre und Sekundäre Symptome bei der Schizophrenie.* Fortschritte der Neurologie und Psychiatrie 25: 487-491.

**Schoepp** D. D. (2001). *Unveiling the Functions of Presynaptic Metabotropic Glutamate Receptors in the Central Nervous System.* The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics 299: 12-20.

**Schosser** A., Kindler J., Mossaheb N., Aschauer H. N. (2006). *Genetische Aspekte affektiver Erkrankungen und der Schizophrenie.* Journal für Neurologie, Neurochirurgie und Psychiatrie 7: 19-24.

**Schwartz** T. L., Sachdeva S., Stahl S. M. (2012). *Glutamate neurocircuitry: theoretical underpinnings in schizophrenia.* Frontiers in Pharmacology 2012;3:195. doi: 10.3389/fphar.2012.00195. Epub 2012 Nov 26.

**Seeman** M. V., Lang M. (1990). *The role of estrogens in schizophrenia gender differences.* Schizophrenia Bulletin 16(2): 185-194.

## 7. Literaturverzeichnis

**Serajee** F. J., Zhong H., Nabi R., Huq A. H. (2003). *The metabotropic glutamate receptor 8 gene at 7q31: partial duplication and possible association with autism.* Journal of medical Genetics 40(4): e42.

**Sherrington** R., Brynjolfsson J., Petursson H., Potter M., Dudley K., Barraclough B., Wasmuth J., Dobbs M., Gurling H. (1998). *Localization of a susceptibility locus for schizophrenia on chromosome 5.* Nature 336(6195): 164-7.

**Shi** J., Gershon E. S., Liu C. (2008). *Genetic associations with schizophrenia: Meta-analyses of 12 candidate genes.* Schizophrenia Research 104(1-3): 96-107.

**Shi** J., Levinson D. F., Duan J., Sanders A. R., Zheng Y., Pe'er I., Dudbridge F., Holmans P. A., Whittemore A. S., Mowry B. J., Olincy A., Amin F., Cloninger C. R., Silverman J. M., Buccola N. G., Byerley W. F., Black D. W., Crowe R. R., Oksenberg J. R., Mirel D. B., Kendler K. S., Freedman R., Gejman P. V. (2009). *Common variants on chromosome 6p22.1 are associated with schizophrenia.* Nature 460(7256):753-7.

**Shibata** H., Tani A., Chikuhara T., Kikuta R., Sakai M., Ninomiya H., Tashiro N., Iwata N., Ozaki N., Fukumaki Y. (2009). *Association study of polymorphisms in the group III metabotropic glutamate receptor genes GRM4 and GRM7, with schizophrenia.* Psychiatry Research 167(1-2): 88-96.

**Shifman** S., Bronstein M., Sternfeld M., Pisanté-Shalom A., Lev-Lehman E., Weizman A., Reznik I., Spivak B., Grisarn N., Karp L., Schiffer R., Kotler M., Stous R., Swartz-Vanetik M., Knobler H. Y., Shinar E., Beckmann J. S., Yakir B., Risch N., Zak N. B., Darvasi A. (2002). *A highly significant association between a COMT haplotype and schizophrenia.* The American Journal of Human Genetics 71(6): 1296-1302.

**Shifman** S., Johannesson M., Bronstein M., Chen S. X., Collier D. A., Craddock N. J., Kendler K. S., Li T., O'Donovan M., O'Neill F. A., Owen M. J., Walsh D., Weinberger D. R., 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 genetics 4(2): e28.

**Shigemoto** R., Kinoshita A., Wada E., Nomura S., Ohishi H., Takada M., Flor P. J., Neki A., Abe T., Nakanishi S., Mizuno N. (1997). *Differential presynaptic localization of metabotropic glutamate receptor subtypes in the rat hippocampus.* Journal of Neuroscience 17: 7503-7522.

## 7. Literaturverzeichnis

**Sideli L., Mule A., La Barbera D., Murray R. M.** (2012). *Do child abuse and maltreatment increase risk of schizophrenia?* Psychiatry Investigation 2012 Jun;9(2):87-99. doi: 10.4306/pi.2012.9.2.87. Epub 2012 Apr 30.

**Sodhi M., Wood K. H., Meador-Woodruff J.** (2008). *Role of glutamate in schizophrenia: integrating excitatory avenues of research.* Expert Review of Neurotherapeutics 8(9): 1389-1406.

**Stefansson H., Ophoff R. A. , Steinberg S., Andreassen O. A., Cichon S., Rujescu D., Werge T., Pietiläinen O. P., Mors O., Mortensen P. B., Sigurdsson E., Gustafsson O., Nyegaard M., Tuulio-Henriksson A., Ingason A., Hansen T., Suvisaari J., Lonnqvist J., Paunio T., Børglum A. D., Hartmann A., Fink-Jensen A., Nordentoft M., Hougaard D., Norgaard-Pedersen B., Böttcher Y., Olesen J., Breuer R., Möller H. J., Giegling I., Rasmussen H. B., Timm S., Mattheisen M., Bitter I., Réthelyi J. M., Magnusdottir B. B., Sigmundsson T., Olason P., Masson G., Gulcher J. R., Haraldsson M., Fosdal R., Thorgeirsson T. E., Thorsteinsdottir U., Ruggeri M., Tosato S., Franke B., Strengman E., Kiemeney L. A., Genetic Risk and Outcome in Psychosis (GROUP), Melle I., Djurovic S., Abramova L., Kaleda V., Sanjuan J., de Frutos R., Bramon E., Vassos E., Fraser G., Ettinger U., Picchioni M., Walker N., Touloumi T., Need A. C., Ge D., Yoon J. L., Shianna K. V., Freimer N. B., Cantor R. M., Murray R., Kong A., Golimbet V., Carracedo A., Arango C., Costas J., Jönsson E. G., Terenius L., Agartz I., Petursson H., Nöthen M. M., Rietschel M., Matthews P. M., Muglia P., Peltonen L., St Clair D., Goldstein D. B., Stefansson K., Collier D. A.** (2009). *Common variants conferring risk of schizophrenia.* Nature 460(7256):744-7.

**Stompe T.** (2008). *Geschlecht, Alter und schizophrene Wahnthematik.* Journal für Neurologie, Neurochirurgie und Psychiatrie 9: 35-37.

**Sullivan P. F., Kendler K. S., Neale M. C.** (2003). *Schizophrenia as a complex trait. Evidence of meta-analysis of twin studies.* Archives of general psychiatry 60(12): 1187-1192.

**Sullivan P. F., Lin D., Tzeng J.-Y., van den Oord E., Perkins D., Stroup T. S., Wagner M., Lee S., Wright F. A., Zou F., Liu W., Downing A. M., Lieberman J., Close S. L.** (2008). *Genomwide association for schizophrenia in the CATIE study: results of stage 1.* Molecular Psychiatry 13: 570-584.

**Sun J., Maller J. J., Gao L. and Fitzgerald P. B.** (2009). *Superior temporal gyrus volume change in schizophrenia: A review on Region of Interest volumetric studies.* Brain Research Reviews 61: 14-

## 7. Literaturverzeichnis

32.

**Takeshita** M., Yamada K., Hattori E., Iwayama Y., Toyota T., Iwata Y., Tsuchiya K. J., Sugihara G., Hashimoto K., Watanabe H., Iyo M., Kikuchi M., Okazaki Y., Yoshikawa T. (2008). *Genetic examination of the PLXNA2 gene in Japanese and Chinese people with schizophrenia*. Schizophrenia Research 99(1-3): 359-64.

**Tan** E. C.; Chon S. A., Wang H., Chew-Ping L. E., Teo Y. Y. (2005). *Gender-specific association of insertion/deletion polymorphisms in the nogo gene and chronic schizophrenia*. Brain research. Molecular brain research 139(2): 212-214.

**Tandon** R., Keshavan M. S., Nasrallah H. A. (2008). *Schizophrenia, „Just the Facts“: What we know in 2008 Part 1: Overview*. Schizophrenia Research 100: 4-19.

**Tandon** R., Keshavan M. S., Nasrallah H. A. (2008). *Schizophrenia, „Just the Facts“ What we know in 2008. 2. Epidemiology and etiology*. Schizophrenia Research 102: 1-18.

**Tandon** R., Nasrallah H. A., Keshavan M. S. (2009). *Schizophrenia, „just the facts“ 4. Clinical features and conceptualization*. Schizophrenia Research 110: 1-23.

**Tang** Z., El Far O., Betz H., Scheschonka A. (2005). *Pias1 interaction and sumoylation of metabotropic glutamate receptor 8*. The Journal of biological Chemistry Nov 18;280(46).

**Takaki** H., Kikuta R., Shibata H., Ninomiya H., Tashiro N., Fukumaki Y. (2004). *Positive Association of Polymorphisms in the Metabotropic Glutamate Receptor Type 8 Gene (GRM8) with Schizophrenia*. American Journal of Medical Genetics Part B (Neuropsychiatric Genetics) 128B: 6-14.

**Tewes** U. (1994). *HAWIE-R: Hamburg-Wechsler-Intelligenztest für Erwachsene, Revision 1991*. Bern, Göttingen, Toronto, Seattle: Huber.

**Thompson** P. M., Vidal C., Giedd J. N., Gochman P, Blumenthal J., Nicolson R., Toga A. W., Rapoport J. L. (2001). *Mapping adolescent brain change reveals dynamic wave of accelerated gray matter loss in very early-onset schizophrenia*. Proceedings of the National Academy of Sciences U S A 98, 11650-11655.

## 7. Literaturverzeichnis

**Tiwari** A. K., Zai C. C., Müller D. J., Kennedy J. L. (2010). *Genetics in schizophrenia: where are we and what next?* Dialogues in clinical neuroscience 12(3):289-303.

**van Os** J., Kapur S. (2009). *Schizophrenia*. The Lancet 374: 635-645.

**Watis** L., Chen S. H., Chua H. C., Chong S. A., Sim K. (2008). *Glutamatergic abnormalities of the thalamus in schizophrenia: a systematic review*. Journal of neural transmission 115: 493-511.

**Wittchen** H.-U., Saß H., Zaudig M. (1996). *Diagnostisches und Statistisches Manual Psychiatrischer Störungen DSM-IV*. Göttingen, Bern, Zoronto, Seattle: Hogrefe Verlag für Psychiatrie.

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

**Wright** I. C., Rabe-Hesketh S., Woodruff P. W., David A. S., Murray R. M., Bullmore E. T. (2000). *Meta-analysis of regional brain volumes in schizophrenia*. The American Journal of Psychiatry 157: 16-25.

**Yanagawa** M., Yamashita T., Shichida Y. (2009). *Activation Switch in the Transmembrane Domain of Metabotropic Glutamate Receptor*. Molecular Pharmacology 76: 201-207.

## **8. Danksagung**

Zunächst möchte ich Herrn Prof. Dr. med. H.-J. Möller und Herrn Prof. Dr. med. P. Falkai danken für die Möglichkeit der Durchführung dieser Dissertation an der von ihnen geleiteten Klinik und Poliklinik für Psychiatrie und Psychotherapie.

Bedanken möchte ich mich ebenso bei Prof. Dr. med. D. Rujescu, der mir diese Promotionsarbeit in seiner Arbeitsgruppe für Molekulare und Klinische Neurobiologie ermöglichte.

Frau PD Dr. rer. biol. hum Ina Giegling danke ich für die gute Betreuung, die Hilfe bei der statistischen Auswertung und Unterstützung bei allgemeinen Fragen.

Besonderer Dank gilt Frau Dr. rer. biol. hum. Annette Hartmann für die sehr hilfreichen Korrekturen, die Hilfe bei labortechnischen und genetischen Fragen.

Frau Dr. rer. biol. hum. Heike Konnerth möchte ich herzlich danken für die umfassende Einarbeitung in die, in dieser Arbeit verwendeten Diagnoseinstrumente und kompetente Betreuung im praktischen Teil meiner Arbeit. Besonders dankbar bin Ich Ihr dafür, dass sie mir bei jeglichen Fragen beim Verfassen der Arbeit immer mit Rat und Tat zur Seite stand.

Ebenso möchte ich mich bei den Mitarbeitern und Doktoranden der Arbeitsgruppe Molekulare und Klinische Neurobiologie bedanken.

Auch den Teilnehmern der Studie, die diese Promotionsarbeit erst ermöglichten, gilt mein Dank.

Zuletzt gilt der Dank meine Eltern, die mich immer unterstützt haben.

## **9. Eidesstattliche Versicherung**

Ich, Ilona Hartlmüller, erkläre hiermit an Eides statt,  
dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

*„Das Gen des metabotropen Glutamatrezeptors 8 und sein Einfluss auf die Schizophrenie.“*

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

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

---

Ort, Datum

---

Doktorandin