

Aus der Universitätsklinik für Psychiatrie und Psychotherapie  
der Medizinischen Fakultät  
der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

**Postmortale Analyse der Dichte GAD65/67-immunreaktiver  
Nervenfasern im Hirngewebe von Patienten mit Schizophrenie und  
Vergleichspersonen ohne neuropsychiatrische Erkrankung**

**D i s s e r t a t i o n**

Zur Erlangung des Doktorgrades

Dr. med.  
(doctor medicinae)

an der Medizinischen Fakultät  
der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

vorgelegt von ..... Vera Model  
aus ..... Basel, Schweiz  
Magdeburg ..... 2024

## **Widmung**

Für Thamiam Kirchofer

## **Dokumentationsblatt**

### **Bibliographische Beschreibung:**

Model, Vera:

Postmortale Analyse der Dichte GAD65/67-immunreaktiver Nervenfasern im Hirngewebe von Patienten mit Schizophrenie und Vergleichspersonen ohne neuropsychiatrische Erkrankung. – 2024 – 88 Blätter, 11 Abbildungen, 11 Tabellen, 224 Literaturquellen; Anhang: 1 Abbildung, 6 Tabellen

### **Kurzreferat**

Veränderungen im GABAergen System spielen nach aktuellem Forschungsstand eine wesentliche Rolle in der Pathophysiologie der Schizophrenie. Die Glutamatdecarboxylase (GAD) ist das Schlüsselenzym der GABA-Synthese. In einer Vorstudie der Arbeitsgruppe Steiner et al. war eine reduzierte GAD65/67-immunreaktive (GAD-ir) Nervenfaserdichte in der rechten CA1-Region des Hippocampus bei Schizophrenie-Patienten nachgewiesen worden (1). Ziel der Promotionsarbeit war, dies mittels einer neuen, untersucherunabhängigen, automatisierten Quantifizierungsmethode zu überprüfen, unter Berücksichtigung der Schizophrenie-relevanten Hirnregionen Gyrus temporalis superior, medio- und laterodorsaler Thalamus, CA1-Region des Hippocampus und Gyrus dentatus. Dazu wurden immunhistochemisch gefärbte koronaren Ganzhirnschnitte derselben 16 Schizophrenie-Patienten (10 paranoid, 6 residual) und 16 Vergleichspersonen ohne neuropsychiatrische Erkrankungen untersucht. Bei der statistischen Auswertung der Ergebnisse wurde der Einfluss der potenziell konfundierenden Variablen Alter, Krankheitsdauer und Antipsychotika-Dosis berücksichtigt. Im Ergebnis zeigte sich in der Schizophrenie-Gruppe eine signifikante Reduktion der GAD-ir Nervenfaserdichte in allen Hirnregionen. Besonders ausgeprägt präsentierte sich die Reduktion in der Schicht V des Gyrus temporalis superior und im mediodorsalen Thalamus. Zwischen den Patienten-Subgruppen mit paranoider und residualer Schizophrenie wurde keine signifikant unterschiedliche Verteilung der GAD-ir Nervenfaserdichte gefunden. Die Ergebnisse unterstützen die Hypothese einer Alteration des GABAergen Systems bei Schizophrenie.

Schlüsselwörter: GAD65/67 – Nervenfaser – Schizophrenie – post-mortem

# Inhaltsverzeichnis

<b>Widmung</b> .....	<b>I</b>
<b>Dokumentationsblatt</b> .....	<b>II</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	<b>V</b>
<b>Abbildungsverzeichnis</b> .....	<b>VIII</b>
<b>Tabellenverzeichnis</b> .....	<b>VIII</b>
<b>1 Einleitung</b> .....	<b>1</b>
1.1 Einführung .....	1
1.2 Einführung in die Ätiopathogenese .....	1
1.3 Das GABAerge System bei der Schizophrenie .....	3
1.3.1 GABAerge Neurotransmission und Schizophrenie .....	3
1.3.2 Das Enzym GAD .....	4
1.3.3 Post-mortem Studien zu GAD65 und GAD67 .....	5
1.4 Untersuchte Hirnregionen und untersuchte Subgruppen .....	8
1.4.1 Gyrus temporalis superior (STG) .....	8
1.4.2 Thalamus .....	8
1.4.3 Hippocampusformation .....	8
1.4.4 Untersuchte Subgruppen .....	9
1.5 Gegenstand und Zielsetzung der Dissertation .....	10
<b>2 Material und Methoden</b> .....	<b>12</b>
2.1 Charakteristika der untersuchten Gehirne .....	12
2.2 Gewebeaufbereitung .....	14
2.3 Immunhistochemische Färbung .....	16
2.4 Mikroskopischer Aufnahmeprozess .....	18
2.4.1 Abgrenzung der Zielregionen .....	18
2.4.2 Mikroskopische Aufnahme der Zielregionen .....	20
2.5 Quantifizierung der GAD-ir Nervenfaserdichte .....	22
2.5.1 Beschreibung der Methodik .....	22
2.5.2 Interrater- und Retest-Reliabilität .....	23
2.5.3 Validität der automatisierten Messung .....	25
2.6 Statistische Datenanalyse .....	25

<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b> .....	<b>27</b>
3.1	<i>Morphologische Auswertung der GAD-ir Nervenfasern</i> .....	27
3.2	<i>Quantitative Auswertung der GAD-ir Nervenfasern</i> .....	30
3.2.1	Vergleich der Diagnosegruppen .....	30
3.2.2	Vergleich der diagnostischen Subgruppen .....	32
3.2.3	Einfluss konfundierender Variablen .....	33
3.2.4	Statistisches Verhältnis von GAD-ir Nervenfasern und GAD-ir Zellen zueinander .....	35
3.2.5	Validität der automatisierten Messung.....	40
<b>4</b>	<b>Diskussion</b> .....	<b>42</b>
4.1	<i>Auswertung der Diagnosegruppen und regionale Unterschiede</i> .....	42
4.2	<i>Auswertung der diagnostischen Subgruppen und konfundierenden Variablen</i> .....	46
4.3	<i>Vergleich mit der Vorgängerstudie</i> .....	48
4.4	<i>Statistisches Verhältnis von GAD-ir Nervenfasern und GAD-ir Zellen</i> .....	49
4.5	<i>Stärken, Limitationen und weiterführende Studien</i> .....	52
4.5.1	Stärken .....	52
4.5.2	Limitationen und weiterführende Studien .....	53
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>57</b>
	<b>Literaturverzeichnis</b> .....	<b>X</b>
	<b>Danksagung</b> .....	<b>XXV</b>
	<b>Ehrenerklärung</b> .....	<b>XXVI</b>
	<b>Darstellung des Bildungsweges</b> .....	<b>XXVII</b>
	<b>Publikationen</b> .....	<b>XXVIII</b>
	<b>Anhang</b> .....	<b>XXIX</b>

## **Anmerkung**

Aus Gründen der besseren Lesbarkeit wird in dieser Arbeit das generische Maskulinum verwendet. Das generische Maskulinum bezieht sich gleichzeitig auf die männliche, weibliche und die diverse Form. Selbstverständlich ist der Text wertfrei und geschlechtsneutral zu verstehen.

## **Veröffentlichung**

\*gemeinsame Erstautorenschaft

## **Abkürzungsverzeichnis**

bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure ( <i>engl.: complementary deoxyribonucleic acid</i> )
con	In dieser Arbeit: Kontrollgruppe
dF	Freiheitsgrad ( <i>engl.: degrees of freedom</i> )
engl.	englisch
h	Stunde
k.A.	keine Angabe
kDa	Kilodalton
m	männlich
mg	Milligramm
min	Minuten
µm	Mikrometer
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure ( <i>engl.: messenger ribonucleic acid</i> )
n	Anzahl
p	Signifikanzwert ( <i>engl.: probability value</i> )
par	In dieser Arbeit: Kurzbezeichnung der Schizophrenie-Patienten des paranoiden Typus
qPCR	Quantitative Polymerase-Kettenreaktion ( <i>engl.: polymerase chain reaction</i> )
res	In dieser Arbeit: Kurzbezeichnung der Schizophrenie-Patienten des residualen Typus
$r_s$	Korrelationskoeffizient nach Spearman

sas	In dieser Arbeit: Kurzbezeichnung Patienten mit schizoaffectiver Störung
scz	In dieser Arbeit: Kurzbezeichnung aller Schizophrenie-Patienten
t	Tage
u.a.	unter anderem
vs	versus
w	weiblich
Abb.	Abbildung
ACC	Anteriorer cingulärer Kortex
AT	Anteriorer Thalamuskern
CA1	Cornu Ammonis-Region 1 des Hippocampus
CCK	Cholecystokinin
DAB	3,3'-Diaminobenzidin
DG	Gyrus dentatus ( <i>engl.: dentate gyrus</i> )
DLPFC	Dorsolateraler präfrontaler Kortex
DSM	Diagnostisches und Statistisches Manual Psychischer Störungen
EC	Entorhinaler Kortex
GABA	Gammaaminobuttersäure
GAD	Glutamatdecarboxylase
GAD-ir	GAD65/67-immunreaktiv
GAT	GABA-Transporter (GAT)
GWAS	Genom-weite Assoziationsstudie
ICC	Interklassenkorrelationskoeffizient
ICD	Internationale statistische Klassifikation der Krankheiten und verwandter Gesundheitsprobleme ( <i>engl.: International Classification of Diseases and Related Health Problems</i> )
KI	Konfidenzintervall
LD	Laterodorsaler Thalamus
LMM	Lineare Gemischte Modelle ( <i>engl.: linear mixed models</i> )
MD	Mediodorsaler Thalamus
MIA	Multiple Image Alignment
Ncl	Nucleus
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
OFC	Orbitofrontale Kortex
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung ( <i>engl.: phosphate-buffered saline</i> )

PCR	Polymerase-Kettenreaktion ( <i>engl.: polymerase chain reaction</i> )
PFC	Präfrontaler Kortex
PV	Parvalbumin
RT-PCR	Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion
SNP	Einzelnukleotid-Polymorphismus ( <i>engl.: single nucleotide polymorphism</i> )
SPSS	Statistical Product and Service Solutions
SST	Somatostatin
STG	Gyrus temporalis superior ( <i>engl.: superior temporal gyrus</i> )
Tab.	Tabelle
VSF	Volumenschrumpfungsfaktor
5-HT <sub>3a</sub>	5-Hydroxytryptamin-3a

## **Abbildungsverzeichnis**

Abbildung 1: Übersichtsaufnahme .....	17
Abbildung 2: Abgrenzung der Hirnregionen .....	19
Abbildung 3: Verfahren zur Quantifizierung der GAD-ir Nervenfasern .....	24
Abbildung 4: Illustration der selektierten GAD-ir Nervenfasern.....	27
Abbildung 5: Aufnahmen der einzelnen Hirnregionen .....	29
Abbildung 6: Selektierte GAD-ir Nervenfasern.....	30
Abbildung 7: Box-Plots – GAD-ir Nervenfaserdichte der Schizophrenie-Patienten und Kontrollen.....	31
Abbildung 8: Box-Plots – GAD-ir Nervenfaserdichte der paranoiden und der residualen Subgruppe.....	33
Abbildung 9: GAD-ir Nervenfasern-Zell-Korrelationen (Getrennte Darstellung nach Diagnosegruppen) .....	37
Abbildung 10: GAD-ir Nervenfasern-Zell-Korrelationen (Getrennte Darstellung nach diagnostischen Subgruppen) .....	39
Abbildung 11: Validität der automatisierten Messung .....	41

## **Tabellenverzeichnis**

Tabelle 1: Literaturstand GAD65 und GAD67 in post-mortem Studien .....	6
Tabelle 2: Demographische Daten – Schizophrenie-Kohorte.....	13
Tabelle 3: Demographische Daten – Schizophrenie- und Kontrollfälle.....	14
Tabelle 4: Demographische Daten - Gewebeaufbereitung .....	15
Tabelle 5: Statistik zur Verteilung der demographischen Daten .....	16
Tabelle 6: Aufnahmedetails .....	20
Tabelle 7: Vergleich GAD-ir Nervenfaserdichte zwischen den Diagnosegruppen	32
Tabelle 8: Vergleich GAD-ir Nervenfaserdichte zwischen den diagnostischen Subgruppen .....	34
Tabelle 9: Spearman-Korrelationen - Einfluss potenziell konfundierender Variablen .....	35
Tabelle 10: statistisches Verhältnis von GAD-ir Nervenfasern und GAD-ir Zellen zueinander - Diagnosegruppen .....	36
Tabelle 11: statistisches Verhältnis von GAD-ir Nervenfasern und GAD-ir Zellen zueinander – diagnostische Subgruppen .....	40

## **1 Einleitung**

### **1.1 Einführung**

Schizophrenie gehört mit einer Lebenszeitprävalenz (Risiko, im Laufe des Lebens zu erkranken) von 0,5 – 0,7% nicht zu den häufigsten psychiatrischen Erkrankungen (2, 3). Dennoch stellt die Erkrankung eine erhebliche Belastung für die Betroffenen und die Gesellschaft dar. Hierbei spielen u.a. ein oft früher Krankheitsbeginn, eine geringe Remissionsrate und eine teilweise beeinträchtigte Selbstständigkeit eine Rolle (4, 5). Der Schweizer Psychiater Eugen Bleuler führte 1911 aufgrund der für ihn im Vordergrund stehenden Symptomatik einer gespaltenen Persönlichkeit und eines veränderten Bewusstseinszustandes, den Begriff Schizophrenie ein (*griechisch: schizo – ich spalte, phren – Geist*) (6). Diese wörtliche Rückübersetzung ist für das aktuelle Krankheitsverständnis nicht mehr zutreffend. Die biologischen Ursachen sind allerdings trotz intensiver Forschung bis heute nicht vollständig verstanden.

Mit moderner pharmakologischer Therapie lassen sich die Symptome der Schizophrenie – insbesondere die schizophrene Negativsymptomatik - oft nur unzureichend behandeln und es bestehen deutliche Nebenwirkungen (7). Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, zu einem differenzierteren Verständnis der pathophysiologischen Mechanismen der Schizophrenie beizutragen, um Erkenntnisse für die Entwicklung und Etablierung neuer, effektiverer Therapiemöglichkeiten beizusteuern (8).

### **1.2 Einführung in die Ätiopathogenese**

Für eine Schizophrenie werden aktuell mehrere, sich zum Teil überlappende pathogenetische Konzepte und Krankheitsmodelle diskutiert; hierbei stehen u.a. genetische Prädispositionen und Gen-Umwelt-Interaktionen (9–11), immunologische Prozesse (12, 13), morphologische Hirnveränderungen (14–16) und Veränderungen in den Neurotransmitter- und deren Rezeptorsystemen im Fokus (17–20). Zubin und Spring formulierten 1977 zur Erklärung des Zusammenspiels verschiedener krankheitsbegünstigender Faktoren das sogenannte „Vulnerabilitäts-Stress-Modell“. Gemäß dieses Modells können endogene und exogene Stressfaktoren bei bestehender Krankheitsdisposition zur Manifestation der Erkrankung führen (21). Das Modell wurde zum sogenannten „Vulnerabilitäts-Stress-Coping-Modell“ erweitert. Demnach kommt es bei nicht

ausreichenden Copingstrategien in Stresssituationen zum Ausbruch der Erkrankung (22).

Aus biochemischer Perspektive wurden seit einigen Jahrzehnten vor allem Veränderungen der dopaminergen und glutamatergen Neurotransmittersysteme diskutiert (18, 23–25). Die vorherrschende Dopamin-Hypothese basiert in erster Linie auf der Tatsache, dass Antipsychotika als Blocker der Dopaminrezeptoren zu einer Reduktion der positiven, psychotischen Symptome führen (19, 26). Allerdings wirken diese Medikamente bei einem Teil der Patienten nicht ausreichend und kaum gegen die schizophrene Negativsymptomatik (7, 27).

Phencyclidin oder Dizocilpine als nicht-kompetitive Antagonisten des glutamatergen N-Methyl-D-Aspartat (NMDA)-Rezeptors führen zu Symptomen, die einer Schizophrenie sehr ähnlich sind (28). Die daraus abgeleitete Glutamat-Hypothese geht von einer defizitären glutamatergen Neurotransmission, vermittelt durch einen fehlfunktionierenden NMDA-Rezeptor, bei Schizophrenie aus (20, 29, 30).

Bereits 1972 wurde die Hypothese aufgestellt, dass an der Pathophysiologie der Schizophrenie auch das GABAerge (Gammaaminobuttersäure) System beteiligt sei (31). Es folgten zahlreiche Studien, die auf ein defizitäres (vorwiegend vermindertes) GABAerges System bei Schizophrenie hinweisen (32–36). Eine defizitäre GABAerge Neurotransmission führt zu einer gestörten synaptischen Plastizität (37), was die Funktionsweise neuronaler Schaltkreise beeinträchtigen kann (38, 39). Die Diskonnektivitäts-Hypothese postuliert eine veränderte neuronale Plastizität kortiko-kortikaler sowie kortiko-subkortikaler neuronaler Vernetzungen, die zu einer gestörten Kommunikation zwischen verschiedenen Hirnarealen führen könnte, und bietet so einen weiteren Erklärungsansatz für schizophrene Symptome (40–43). Resümierend ist demnach nicht von *einem* pathophysiologischen Mechanismus auszugehen, sondern vielmehr von einem Zusammenspiel mehrerer krankheitsbegünstigender Faktoren und neurobiologischer Prozesse, die letztlich zur klinischen Manifestation einer Schizophrenie führen.

### **1.3 Das GABAerge System bei der Schizophrenie**

#### **1.3.1 GABAerge Neurotransmission und Schizophrenie**

Eine Abweichung im GABAergen System bei Schizophrenie wurde in zahlreichen post-mortem Studien festgestellt (44). Es wurde mehrfach eine erhöhte Dichte von GABA<sub>A</sub>- Rezeptoren auf postsynaptischen Pyramidenzellen verzeichnet (45, 46). Eine erhöhte Rezeptordichte kann als Kompensationsmechanismus für eine verminderte GABAerge Aktivität aufgefasst werden (47). Darüber hinaus wurde eine reduzierte GAT-1 (GABA-Transporter) mRNA Expression im DLPFC gefunden (48–50). Eine reduzierte GAT-1 mRNA erhöht die synaptische Aktivität von GABA und kann demnach ebenfalls als eine kompensatorische Antwort auf eine abgeschwächte GABAerge Neurotransmission betrachtet werden (51). Explizit auf post-mortem Studien zu GAD65 (Glutamatdecarboxylase65) und GAD67 (Glutamatdecarboxylase67) wird im Kapitel 1.3.3 eingegangen.

Die genaue Bedeutung einer Abweichung des GABAergen Systems im ätiopathogenetischen Kontext der Schizophrenie ist jedoch noch ungewiss. Es wurde mehrfach Veränderungen in der Synchronität von Nervenzellen bei Schizophrenie beschrieben (52–54). Insbesondere weisen Studien auf veränderte Gamma-Oszillationen bei Schizophrenie hin (55–57). Gamma-Oszillationen sind für die korrekte Funktionsweise zahlreicher kognitiver Prozesse verantwortlich und entstehen durch die Interaktion zwischen exzitatorischen Pyramidenzellen und inhibitorischen GABAergen Interneuronen (58). Dementsprechend könnte ein abnormes GABAerges System zu dysfunktionalen Gamma-Oszillationen führen (59–62). Über lokal hemmende Schaltkreise modulieren und steuern GABAerge Interneurone exzitatorische Neurone und ermöglichen eine präzise und korrekte neuronale Funktion (39, 58, 63, 64). Auch auf Netzwerkebene ist ein fein abgestimmtes Gleichgewicht zwischen Hemmung (hauptsächlich vermittelt durch GABA) und Erregung (hauptsächlich vermittelt durch Glutamat) für die meisten höheren Hirnleistungen unerlässlich (39, 65–67). Ein GAD67-Mangel geht mit einem defizitären Wachstum von Axonen und Dendriten einher (siehe Kapitel 1.3.3). Infolgedessen kann dies zu Netzwerkstörungen führen und so die Entstehung von neurologischen bzw. psychiatrischen Erkrankungen wie Schizophrenie begünstigen (68, 69). Dementsprechend wird ein dysfunktionales GABAerges System bei weiteren psychiatrischen und neurologischen Erkrankungen diskutiert (z. B. Depression (70–72), Autismus (69, 73), bipolaren Störung (35, 74, 75) und Epilepsie (76)).

### 1.3.2 Das Enzym GAD

Der inhibitorische Neurotransmitter GABA entsteht durch Decarboxylierung des Glutamats (77). Diese Reaktion wird durch das Schlüsselenzym GAD katalysiert und ist die einzige Möglichkeit den Neurotransmitter GABA zu bilden (33). Das Schlüsselenzym GAD kommt in den beiden Isoformen GAD65 und GAD67 vor. Die Bezeichnung dieser Isoformen bezieht sich auf die jeweilige Proteingröße, die 65 bzw. 67 Kilodalton (kDA) beträgt (78). Das GAD1-Gen kodiert das Isoenzym GAD67 und liegt auf dem Chromosom 2q31, während GAD2, das die etwas kleinere Isoform GAD65 kodiert, auf Chromosom 10p11.23 lokalisiert ist (79–81). Eine Assoziation zwischen SNPs (Einzelnukleotid-Polymorphismus) im GAD1-Gen und einer bereits im Kindesalter manifestierenden Schizophrenie konnte beobachtet werden (82). Eine Genom-weite Assoziationsstudie (GWAS) fand insgesamt 108 Schizophrenie assoziierte Genloci, was die Annahme einer polygenen Erkrankung unterstreicht (83). Epigenetische Veränderungen des GAD2-Gens regulieren die Expression der GAD65 mRNA und somit könnten auch epigenetische Prozesse an der Genese der Schizophrenie beteiligt sein (84). Letztlich kann eine differenzierte pathogenetische Bedeutung genetischer und epigenetischer Veränderungen beider Gene nicht abschließend bewertet werden (77, 85).

Außerdem unterscheiden sich die beiden Isoenzyme in ihrer zellulären Verteilung. GAD65 ist hauptsächlich in Nervenendigungen und auf Vesikelmembranen zu finden (86). Im Gegensatz dazu ist GAD67 gleichmäßiger im Zytoplasma der gesamten Zelle verteilt (78, 87). Obwohl GAD65 und GAD67 in den meisten GABA-haltigen Neuronen koexprimiert werden (88), ist deren zelluläres Verhältnis in unterschiedlichen Hirnregionen verschieden ausgeprägt (87, 89). Neben einem regional unterschiedlichen Verteilungsmuster ist das Verhältnis auch entwicklungsabhängig: Während dem Isoenzym GAD67 eine zentrale Rolle in der vorgeburtlichen Entwicklung des Gehirns zugeschrieben wird (90), scheint GAD65 vor allem für die Hirnreifung nach der Geburt wichtig zu sein (91). Die GAD67-katalysierte GABA-Produktion wird während der Ausbildung inhibitorischer Schaltkreise mit dem Wachstum von Axonen und Dendriten sowie mit der regelrechten Ausbildung der Synapsen in Verbindung gebracht (68). Das Isoenzym GAD65 ist für die aktivitätsabhängige Produktion von vesikulärem GABA zuständig (80, 87, 92–94). Im Gegensatz dazu bildet das konstitutiv aktive Isoenzym GAD67 zytoplasmatisches GABA und sorgt im Ruhezustand für einen Großteil der GABA-Produktion (95). Jedoch wird auch GAD67 bei erhöhter

Nervenzellaktivität vermehrt exprimiert (96). Eine Studie an GAD65(-/-) Knockout-Mäusen zeigte, dass auch das Isoenzym GAD67 - zumindest zu einem gewissen Grad - GABA für die vesikuläre Transmitterfreisetzung synthetisieren kann (97). Dementsprechend können die unterschiedlichen Funktionen nicht strikt getrennt voneinander betrachtet werden.

### **1.3.3 Post-mortem Studien zu GAD65 und GAD67**

In den vergangenen Jahren konnten Erkenntnisse zur Beteiligung des GABAergen Systems bei der Schizophrenie anhand mehrerer post-mortem Studien zu GAD65 und GAD67 belegt werden. Die Resultate bisheriger Studien zu GAD65/67 postulieren mehrheitlich eine verminderte GABAerge Neurotransmission bei Schizophrenie. Jedoch liegen auch Studienergebnisse vor, die auf eine erhöhte GABAerge Neurotransmission bei Schizophrenie hinweisen. Der folgende Abschnitt fasst explizit den Forschungsstand zu GAD65 und GAD67 und dessen Widersprüche zusammen (Tab. 1).

Bisherige Forschungsergebnisse zeigen wiederholt eine reduzierte GAD67 mRNA Expression im DLPFC (dorsolateraler präfrontaler Kortex) bei Schizophrenie (33, 98–101) sowie auch ein entsprechend vermindertes GAD67 Protein (35, 102) (Tab.1). Nebst einer reduzierten GAD67 mRNA Studie im DLPFC ließ sich auch eine reduzierte GAD67 post-mortem Studie im primären motorischen Kortex, der primären Sehrinde, im ACC (anterioren cingulärer Kortex) (74), im OFC (orbitofrontaler Kortex), im STG (Gyrus temporalis superior) und im anterioren Thalamuskern (AT) bei Schizophrenie verzeichnen (75). Insgesamt wurde in vielen Studien die Expression der GAD67 mRNA untersucht (33). Die Berichte über GAD65 sind weniger zahlreich und die Ergebnisse weniger eindeutig (Tab.1). Eine aktuelle Studie ergab in der Schizophrenie-Kohorte eine reduzierte GAD65 mRNA in den Schichten II und III des DLPFC (103). Andere post-mortem Studien fanden keine signifikant unterschiedliche Verteilung der GAD65 mRNA Expression zwischen Schizophrenie-Patienten und Vergleichspersonen (104, 105). Dem stehen Studien gegenüber, die auf eine erhöhte Expression der GAD65 mRNA bei Schizophrenie hinweisen (106, 107). Letztere berichten analog auch von einer erhöhten GAD67 mRNA Expression. Ebenfalls auf eine erhöhte GABAerge Neurotransmission weist eine Studie hin, die eine erhöhte GAD-ir (GAD65/67-immunreaktiv) Zelldichte im Subiculum und im parahippocampalen Gyrus in der Schizophrenie-Kohorte fand (108). Zudem verzeichnete eine weitere post-mortem

Studie in der Substantia nigra ein erhöhtes GAD65/67 Protein bei mit Antipsychotika behandelten Patienten im Vergleich zur Kontrollgruppe. In der gleichen Studie wurde kein erhöhtes GAD65/67 Protein bei nicht mit Antipsychotika behandelten Patienten festgestellt (109).

Tabelle 1: Literaturstand GAD65 und GAD67 in post-mortem Studien

Arbeitsgruppe	Methode	Hirnregion	Anzahl/Diagnose	Ergebnisse	Bemerkungen
Akbarian et al. 1995 (32)	In-situ-Hybridisierung	DLPFC	10 con 10 scz	<b>GAD67 mRNA</b> ↓ Schicht I: -40% Schicht II: -48% Schicht III-VI: -30 bis -35%	Patient ohne antipsychotische Medikation hatte die niedrigste GAD65 mRNA
Curley et al. 2011 (102)	mRNA: qPCR Protein gesamt: Western Blot Protein in PV Interneuronen: Immunhistochemische Färbung	DLPFC	42 scz 42 con	<b>GAD67 mRNA</b> ↓ -14,5%, p=0,005  <b>GAD67 Protein</b> ↓ gesamt: -10%; in PV Interneuronen: -49%	Keine Korrelation mit Antipsychotika-Dosis oder Krankheitsdauer
Guidotti et al. 2000 (110)	mRNA: qRT-PCR  Protein: Western Blot	DLPFC, Kleinhirnrinde	15 con 14 scz 15 dep 15 bps	scz und bps mit Psychosen im DLPFC: <b>GAD67 mRNA</b> ↓ <b>GAD67 Protein</b> ↓ beides -30 bis -50% GAD65 mRNA/Protein =	Keine signifikante Korrelation Antipsychotika-Dosis und GAD67 Protein, Alter zum Todeszeitpunkt: scz: 44 +/- SD 12 Jahre bps: 42 +/- SD 13 Jahre
Hashimoto et al. 2003 (100)	In-situ-Hybridisierung	DLPFC	15 scz 15 con	<b>GAD67 mRNA</b> ↓ p<0,001	In PV Interneuronen
Hashimoto et al. 2005 (111)	In-situ-Hybridisierung	DLPFC	15 scz 15 con	<b>GAD67 mRNA</b> ↓ -26%	Positive Korrelation zwischen GAD67 mRNA und BDNF/Trkb mRNA
Kimoto et al. 2014 (98)	qPCR	DLPFC	62 scz 62 con	<b>GAD67 mRNA</b> ↓ -18,3%, p=0,017	
Mirnic et al. 2000 (101)	cDNA-Microarray	DLPFC	21 scz 21 con	<b>GAD67 mRNA</b> ↓	
Straub et al. 2007 (112)	mRNA: qPCR Protein: Western Blot	DLPFC	26 scz 27 con	<b>GAD67 mRNA</b> ↓ p=0,036 GAD67 Protein =	
Volk et al. 2000 (113)	In-situ-Hybridisierung	DLPFC	10 scz 10 con	<b>GAD67 mRNA</b> ↓ Schicht III: p=0,44 Schicht V: p=0,46	
Veldic et al. 2005 (99)	In-situ-Hybridisierung	DLPFC	19 scz 19 bps 26 con	<b>GAD67 mRNA</b> ↓ Schicht I und II: p=0,01	bps: GAD67 mRNA ↓ Schicht I: p=0,02, Schicht II: p=0,01
Impagnatiello et al. 1998 (114)	Western Blot	STG	18 scz 18 con	<b>GAD67 Protein</b> ↓ p=0,01 GAD65 Protein =	
Hashimoto et al. 2008 (115)	qRT-PCR, DNA-Microarray	DLPFC	14 scz 14 con	<b>GAD67 mRNA</b> ↓ -12%, p=0,049	scz (n=3) ohne antipsychotische Medikation auch reduzierte GAD67 mRNA
Woo et al. 2004 (74)	In-situ-Hybridisierung	ACC	17 con 17 scz 17 BS	<b>GAD67 mRNA</b> ↓ Schicht II: -53%, p=0,01 Schicht V: -28%, p=0,01	bps: GAD67 mRNA ↓ Schicht II: -38%; p=0,01
Thompson et al. 2009 (75)	In-situ-Hybridisierung	ACC, AT Ncl Accumben,	14 scz 15 con	<b>GAD67 mRNA</b> ↓ Signifikant in: ACC Schicht V: -23%,	Antipsychotika-Dosis: in keiner Hirnregion einen Zusammenhang

		OFC, STG, MD, Putamen		OFC Schicht II-V: -26 bis -30%, STG Schicht IV: -22%, AT: -20%	
Ray et al. 2011 (71)	In-situ-Hybridisierung	DG, EC, Subiculum, CA1-4	15 scz 15 bps 14 dep 14 con	<b>GAD67 mRNA</b> ↓ DG: -22%, p=0,022, CA4: -60%, p=0,003	dep: reduzierte GAD67 mRNA in CA4 (-44%, p=0,030)
Dowling et al. 2023 (103)	qPCR	DLPFC	41 scz 42 dep 39 bps 43 con	<b>GAD67 mRNA</b> ↓ Schicht II/III: p=0,039  <b>GAD65 mRNA</b> ↓ Schicht II/III: p=0,027	dep: GAD67 mRNA ↓ Schicht II/III: p=0,089 bps: GAD65/67 mRNA =
Kilonzo et al. 2020 (98)	Immunhistochemische Färbung	Colliculi inferiores	20 scz 20 con	<b>GAD67-ir Zellen</b> ↓ -26,8%, p=0,004	Positive Korrelation zwischen PV GAD67-ir Interneuronen, r=0,44; p=0,049
Purves-Tyson et al. 2021 (116)	Western Blot	Substantia nigra	26 scz 28 con	<b>GAD65/67 Protein</b> ↓ -34,14%, p=0,021	Positive Korrelation GAD65/67 Protein und Krankheitsdauer: r=0,490; p=0,015
Heckers et al. 2002 (104)	In-situ-Hybridisierung	Hippocampus: DG, CA4, CA2/3, CA1-4	15 scz 15 bps 15 con	GAD65 mRNA = -14%, p=0,23 GAD67 mRNA = -4%, p=0,70	bps: GAD65 mRNA ↓ - 45% p=0,001; GAD67 mRNA ↓ : -43%, p=0,02; Inverser Zusammenhang: Alter und GAD65 mRNA, keine Korrelation Antipsychotika
Glausier et al. 2015 (105)	qPCR	DLPFC	39 scz 23 sas 62 con	GAD65 mRNA = -1,8%, p = 0,79	Antipsychotika kein Effekt, sas: GAD65 mRNA ↓ -13,6%, p = 0,006
Schoonover et al. 2017 (109)	Western Blot	Substantia nigra	13 scz 12 con	<b>GAD67 Protein</b> ↑ p=0,0042	Erhöhtes GAD67 Protein bei mit Antipsychotika behandelten Patienten (n=9), p=0,0029
Hakak et al. 2001 (106)	DNA-Microarray	DLPFC	12 scz 12 con	<b>GAD67 mRNA</b> ↑ <b>GAD65 mRNA</b> ↑	Ältere Probanden: alle mind. 35 Jahre lang hospitalisiert, Alter zum Todeszeitpunkt: 72,1 +/- SD 11,7 Jahre
Dracheva et al. 2004 (107)	mRNA: qRT-PCR  Protein: Western Blot	DLPFC, Occipitallappen	15 con 27 scz	<b>GAD67 mRNA</b> ↑ DLPFC: p=0,02, Occipitallappen: p=0,03  <b>GAD65 mRNA</b> ↑ DLPFC: p=0,001; Occipitallappen: p=0,02)  GAD67/67 Protein =	Alter: 82,8 +/- SD 2,99 Jahre, mittlere Krankheitsdauer: 47 Jahre, positive Korrelation Alter und GAD65/67 mRNA, Einnahme von Antipsychotika 5 Wochen vor Tod -> signifikant höhere GAD67 mRNA im DLPFC
Schreiber et al. 2011 (108)	Immunhistochemische Färbung	Gyrus parahippocampalis, CA1-3, Subiculum	15 scz 15 con	<b>GAD65/67-ir Zellen</b> ↑ Subiculum: p=0,004 Gyrus parahippocampalis links: p=0,001	scz (w): positive Korrelationen GAD-ir Zellen und Krankheitsdauer (links: CA1-3 und Subiculum; rechts: Gyrus parahippocampalis)

*Anmerkungen:* signifikante Ergebnisse (p < 0,05) sind fett markiert: signifikant reduzierte (↓) bzw. erhöhte (↑) und nicht signifikante Ergebnisse (=).

*Abkürzungen:* ACC – anteriorer cingulärer Kortex, AT – anteriorer Thalamuskern, CA– Cornu Ammonis-Regionen des Hippocampus, con – Kontrollgruppe, cDNA – komplementäre Desoxyribonukleinsäure, DG – Gyrus dentatus, DLPFC – dorsolateraler präfrontaler Kortex, EC – entorhinaler Kortex, -ir – immunreaktiv, MD – mediodorsaler Thalamus, mRNA – messenger Ribonukleinsäure, Ncl – Nucleus, OFC – orbitofrontaler Kortex, p – Signifikanzwert (probability value), par – paranoid, PV – Parvalbumin exprimierend, qPCR – quantitative Polymerase-Kettenreaktion, qRT-PCR – quantitative Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion, res – residuale Kohorte, scz – Schizophrenie-Kohorte, SD – Standardabweichung, STG – Gyrus temporalis superior.

## **1.4 Untersuchte Hirnregionen und untersuchte Subgruppen**

### **1.4.1 Gyrus temporalis superior (STG)**

Der STG spielt eine zentrale Rolle bei der Verarbeitung akustischer Reize und bei der Sprachverarbeitung (117). Neuronale Verbindungen zwischen den Hirnregionen STG und DLPFC zeigen sich bei Schizophrenie in mehreren Studien verändert. Eine daraus resultierende aberrante frontotemporale Konnektivität wird mit dem Entstehen psychotischer Positivsymptomen in Verbindung gebracht (41, 43). Einen weiteren Hinweis auf eine Beteiligung des STG an der Pathophysiologie der Schizophrenie liefert eine funktionskernspintomografische Studie, die eine Hyperaktivität des STG während akustischer Halluzinationen aufzeigt (117). Ergänzend konnte in mehreren MRT-Studien eine Volumenreduktion des STG bei Schizophrenie festgestellt werden (118–122). Auf pathologische Veränderungen des GABAergen Systems im STG weisen mehrere post-mortem Studien hin (75, 114, 123).

### **1.4.2 Thalamus**

Der Thalamus spielt eine Schlüsselrolle bei der Informationsverarbeitung und ist somit für viele höhere kognitive und emotionale Prozesse unerlässlich (124). Unterteilt wird der Thalamus in mehrere Kerne (125, 126). Der LD (laterodorsaler Thalamus) und der MD (mediodorsaler Thalamus) stehen reziprok in Verbindung mit multiplen Regionen des Kortex und subkortikalen Strukturen (126–128). Diverse Störungen dieser funktionellen neuronalen Verbindungen dienen als Erklärung für die Entstehung einer Vielzahl schizophrener Symptome (129), was in mehreren Übersichtsarbeiten eingehend diskutiert und bekräftigt wurde (125, 130, 131). Letztere berichten ergänzend auch von strukturellen Veränderungen in diesen beiden Thalamuskernen. Dies unterstreicht die wichtige Rolle des Thalamus bei der Erkrankungsmanifestation der Schizophrenie.

### **1.4.3 Hippocampusformation**

Der hintere Teil des Hippocampus ist der anatomische Sitz funktionell wichtiger Zentren für Lern- und Gedächtnisfunktionen (132). Diese Funktionen sind bei Schizophrenie-Patienten beeinträchtigt, was eine Beteiligung des Hippocampus an der Pathophysiologie der Schizophrenie nahelegt (133). Mehrfach konnte eine Hyperaktivität des Hippocampus bei Schizophrenie festgestellt werden (134–136). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass sich anhand eines gesteigerten

Stoffwechselaktivität im Hippocampus der Krankheitsverlauf vorhersagen lässt (137). Diese Hyperaktivität wird mit einer verstärkten dopaminergen Neurotransmission in Verbindung gebracht und dient so - in der Zusammenschau mit multiplen beobachteten pathologischen Veränderungen in CA1 (Cornu Ammonis-Region 1 des Hippocampus) - als Erklärungsansatz für die Entstehung psychotischer Symptome (137–139). Gemäß der Hypothese eines Inhibition/Exzitations-Ungleichgewichtes wird als Ursache der hippocampalen Hyperaktivität auch eine Abweichung im GABAergen System des Hippocampus diskutiert (62, 134). Bisherige Studien weisen auch auf pathologische Veränderungen im DG (Gyrus dentatus) bei Schizophrenie hin (71, 140, 141) und unterstreichen die wichtige Rolle des DG bei der Entstehung schizophrener Symptome (142). Explizit auf ein beeinträchtiges GABAerges System im DG weist eine Studie hin, die eine verminderte GAD67 mRNA im DG fand (71). Im Gegensatz dazu konnte in einer anderen post-mortem Studien keine veränderte GAD65 und GAD67 mRNA Expression in der Pyramidenschicht der CA1-Region und im DG festgestellt werden (104).

#### **1.4.4 Untersuchte Subgruppen**

Die Symptome der Schizophrenie sind sehr unterschiedlich und können in Minus- bzw. Negativsymptome und Positivsymptome eingeteilt werden. Zu den Positivsymptomen zählen beispielsweise Wahnwahrnehmungen, Halluzinationen in allen Sinnesmodalitäten sowie Gedanken-lautwerden, -eingebungen und -ausbreitungen (143). Negativsymptome wie mangelnder emotionaler Ausdruck (verflachter oder inadäquater Affekt), Alogie (Sprachverarmung), Interessenverlust oder Willensschwäche, um nur einige zu nennen, treten vor allem in der Residualphase sowie zwischen akuten psychotischen Episoden ausgeprägt auf (144, 145). Anhand der im Vordergrund stehenden Symptomatik kann die Diagnose Schizophrenie nach dem Diagnostischen und Statistischen Manual Psychischer Störungen, Version IV (DSM-IV) in verschiedene diagnostische Subtypen eingeteilt werden (145).

- Paranoider Typus (295.30)
- Desorganisierter Typus (295.10)
- Katatoner Typus (295.20)
- Undifferenzierter Typus (295.90)
- Residualer Typus (295.60)

In der vorliegenden Arbeit werden die beiden diagnostischen Subtypen Schizophrenie vom paranoiden (295.30) und residualen Typus (295.60) untersucht (145). Hauptmerkmale des häufig vorkommenden paranoiden Subtypus sind akustische Halluzinationen und Wahnphänomene (145). Die Schizophrenie vom residualen Typus ist gekennzeichnet durch das Vorhandensein von Negativsymptomen bei mindestens einer vorausgegangenen psychotischen Episode. Dieser Typus kann sowohl ein Übergangsstadium in eine komplette Remission als auch ein über Jahre andauerndes chronisches Krankheitsbild darstellen. Bei Patienten mit residualer Schizophrenie kann es im Verlauf auch zu einer weiteren akuten psychotischen Episode kommen (145).

Mit deren Auftreten würde sich jedoch die Subtypenzuordnung vom residualen zum paranoiden Typus ändern, da die Einteilung anhand des zum Untersuchungszeitpunkt dominierenden Störungsbildes erfolgt (145).

### **1.5 Gegenstand und Zielsetzung der Dissertation**

Wie bereits in den vorangegangenen Kapiteln dargestellt, spielen nach aktuellem Forschungsstand Veränderungen im GABAergen System vermutlich eine wesentliche Rolle in der Pathophysiologie der Schizophrenie. Die meisten Studien gehen von einer verminderten, einige wenige jedoch auch von einer erhöhten GABAergen Neurotransmission bei Schizophrenie aus.

Die untersuchten Gehirne der vorliegenden Studie sind identisch mit den Gehirnen der Studie von Steiner et al. (2016). Steiner et al. (2016) beobachteten eine reduzierte Dichte GAD-ir Nervenfasern in der Schizophrenie-Kohorte, insbesondere in der rechten CA1-Region des Hippocampus. Zusätzlich zeigte sich eine signifikant unterschiedliche Verteilung der GAD-ir Nervenfaserdichte in der rechten STG Schicht V zwischen dem paranoiden und dem residualen Typus (1). Frühere immunhistochemische post-mortem-Studien, die auf Mikroglia bzw. die gliale S100B-Expression fokussierten, fanden zudem neurobiologische Unterschiede zwischen Fällen mit paranoider versus residualer Schizophrenie (146–148). Daher wurden diese beiden diagnostischen Subgruppen in der vorliegenden Arbeit anschließend auch getrennt analysiert.

In der Studie von Steiner et al. (2016) erfolgte die Quantifizierung der GAD-ir Nervenfaserdichte mittels einer manuellen, softwaregestützten Methode (1). Somit können in dieser Studie untersucherabhängige, subjektive Einflüsse nicht ausgeschlossen werden.

Ziel der vorliegenden Studie ist es, die Arbeit von Steiner et al. (2016) durch die zusätzliche Analyse der für die Schizophrenie bedeutsamen Hirnregion MD zu erweitern und die vorangegangenen Ergebnisse durch eine neue, automatisierte Quantifizierungsmethode zu überprüfen. Ein weiteres Ziel war, die Einflüsse potenziell konfundierender Variablen (Alter, Geschlecht, Autolysedauer, Fixationszeit, Hirngewicht, Krankheitsdauer, Antipsychotika-Dosis, Benzodiazepine und Geschlecht) zu untersuchen, um so den teilweise diskrepanten Ergebnissen vorangegangener Studien nachzugehen. Dabei sollten insbesondere folgende Fragestellungen bearbeitet werden:

- Lässt sich in den untersuchten Regionen eine verminderte GAD-ir Nervenfaserdichte bei Schizophrenie-Patienten im Vergleich zur Kontrollgruppe bestätigen?
- Wenn ja, ist diese verminderte Dichte GAD-ir Nervenfasern in der Schizophrenie-Kohorte hirnregional unterschiedlich stark ausgeprägt und in der hier erstmals analysierten Thalamusregion MD auch zu sehen?
- Lässt sich eine unterschiedliche Verteilung der GAD-ir Nervenfaserdichte zwischen den diagnostischen Subgruppen feststellen?
- Kann der Einfluß potenzieller Störvariablen ausgeschlossen werden?

Im Rahmen der bereits erfolgten Publikation (149) wurden von Antonia Förster auch GAD-ir Zellen analysiert, was eine weitere Forschungsfrage ermöglichte:

- Gibt es ein statistisches Verhältnis von GAD-ir Nervenfasern und GAD-ir Zellen zueinander und weist dieses ein hirnregional unterschiedliches Ausprägungsmuster auf?

Zudem sollte geprüft werden, ob die neue, automatisierte Quantifizierungsmethode mit der etablierten, manuellen, softwaregestützten Methode vergleichbar ist.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Charakteristika der untersuchten Gehirne

Alle in dieser Studie untersuchten Gehirne stammen aus der Magdeburger Hirnbank. Die Entnahme, Aufbereitung und Untersuchung der Gehirne wurden im Einklang mit den ethischen Richtlinien der medizinischen Forschung (Deklaration von Helsinki) durchgeführt und wurde von der Ethikkommission der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg genehmigt (Ethikvotum 08/00, (1)). Vor der Obduktion wurde die Einwilligung eines rechtlichen Vertreters eingeholt. Die insgesamt 32 untersuchten Gehirne stammen von 16 Schizophrenie-Patienten und 16 gesunden Vergleichspersonen ohne neuropsychiatrische Erkrankung (im Folgenden als „Kontrollen“ bezeichnet). Die diagnostische Klassifizierung der Schizophrenie-Patienten erfolgte im Konsens durch zwei Fachärzte für Psychiatrie (JS und BB) gemäß der Diagnosekriterien (DSM-IV) für psychische Erkrankungen (145) unter Berücksichtigung der vorhandenen klinischen Dokumentation sowie der Befragung von Lebenspartnern bzw. engen Kontaktpersonen der Verstorbenen. Von den 16 an Schizophrenie erkrankten Personen erfüllten nach DSM-IV (Diagnostisches und Statistisches Manual Psychischer Störungen, Version IV, (145)) zehn die Diagnosekriterien einer paranoiden und sechs die Diagnosekriterien einer residualen Schizophrenie.

Details zu den demographischen Daten sind in den Tabellen 2 und 3 zusammengefasst. Um Bias, welche auf die potenziell konfundierenden Variablen zurückzuführen sind zu minimieren, wurde auf eine möglichst gleichmäßige Verteilung von Geschlecht, Alter, Autolysedauer, Fixationszeit, Hirngewicht, Krankheitsdauer, Benzodiazepine und Antipsychotika-Dosis zwischen den Analysegruppen geachtet. Das Geschlechterverhältnis zwischen dem Schizophrenie-Untersuchungskollektiv und der Kontrollgruppe war mit jeweils neun männlichen und sieben weiblichen Spendern ausgeglichen. Das mediane Alter der Schizophrenie-Patienten betrug 50,5 Jahre, das der Kontrollgruppe 51,0 Jahre. Außerdem wiesen Schizophrenie-Patienten und Kontrollpersonen bezüglich der Autolysedauer ( $U = 18,500$ ,  $p = 0,175$ ), der Fixationszeit ( $U = 22,000$ ,  $p = 0,555$ ) und des Hirngewichts ( $U = 17,00$ ,  $p = 0,935$ ) keine signifikanten Gruppenunterschiede auf (Tab. 5). Die Verteilung der Antipsychotika-Dosis in den beiden diagnostischen Subgruppen unterschied sich nicht signifikant voneinander ( $U = 10,000$ ,  $p = 0,199$ ; Tab. 5). Die mittlere Tagesdosis der antipsychotischen Medikation in den letzten 90 Tagen vor dem Tod wurde aus den vorhandenen

Informationen der Patientenakten entnommen. Bei vier der Schizophrenie-Patienten war die Antipsychotika-Dosis unbekannt. Alle an Schizophrenie Erkrankten hatten typische Antipsychotika erhalten, die in Chlorpromazin-Äquivalente umgerechnet wurden (1, 150, 151). Die Dosierung der Benzodiazepine ist in den vorhandenen klinischen Akten nur unvollständig dokumentiert. Aus diesem Grund wurde in der vorliegenden Studie nur berücksichtigt, ob Benzodiazepine verabreicht wurden oder nicht (Tab. 2). Die residuale Subgruppe wies im Vergleich zur paranoiden Subgruppe eine statistisch signifikant längere Krankheitsdauer auf ( $U = 10,000$ ;  $p = 0,029$ ; Tab. 5). Alle Gehirne wurden postmortal von einem erfahrenen Neuropathologen (CM) untersucht. Dieser fand keine Anzeichen für neurodegenerative Erkrankungen (wie z.B. Morbus Alzheimer, Morbus Parkinson, Morbus Pick), Tumore, entzündliche, vaskuläre oder traumatische Prozesse oder hypoxische neuronale Schäden, indem er Schnitte mit Nissl-Myelin-Färbung und HLA-DR-, Beta-Amyloid- und Tau-Immunfärbung verwendete, um kortikale Regionen (einschließlich der präfrontalen Bereiche), die Hippocampus-Formation, die Basalganglien und den Hirnstamm zu untersuchen (1). Die genauen Todesursachen sind der Tabelle 3 zu entnehmen. Ausschlusskriterien waren ein Alter über 66 Jahre und Substanzmissbrauch oder Alkoholabhängigkeit.

Tabelle 2: Demographische Daten – Schizophrenie-Kohorte

Fallnr.	Diagnose (DSM-IV)	Benzodiazepine (ja, nein)	Krankheitsdauer [Jahre]	CPZ [mg]
1	scz, paranoid	nein	18	3500
2	scz, paranoid	ja	16	800
3	scz, paranoid	k.A.	8	k.A.
4	scz, paranoid	k.A.	28	k.A.
5	scz, paranoid	nein	21	500
6	scz, paranoid	k.A.	6	0
7	scz, paranoid	k.A.	2	0
8	scz, paranoid	k.A.	25	k.A.
9	scz, paranoid	k.A.	16	k.A.
10	scz, paranoid	ja	20	158
11	scz, residual	nein	30	540
12	scz, residual	ja	20	640
13	scz, residual	ja	18	350
14	scz, residual	nein	28	2495
15	scz, residual	ja	25	4241
16	scz, residual	ja	32	523
scz, alle Ratio/Median $\pm$ q1, q3)		6ja/4nein	20,0 (16,0; 27,3)	531,5 (206,0; 2071,3)
scz, par (Ratio/Median $\pm$ q1, q3)		2ja/2nein	17,0 (7,5; 22,0)	329,0 (0,0; 1475,0)
scz, res (Ratio/Median $\pm$ q1, q3)		4ja/2nein	26,5 (19,5; 30,5)	590,0 (479,8; 2931,5)

*Abkürzungen:* CPZ – mittlere Tagesdosis der antipsychotischen Medikation der letzten 90 Tagen vor dem Tod umgerechnet in Chlorpromazin-Äquivalente, DSM-IV – Diagnostisches und Statistisches Manual Psychischer Störungen, Version IV, Fallnr. – Fallnummer, k.A. – keine Angaben möglich, mg – Milligramm, par – paranoide Kohorte, res – residuale Kohorte, scz – Schizophrenie-Kohorte, q1 und q3 – unteres und oberes Quartil.

Tabelle 3: Demographische Daten – Schizophrenie- und Kontrollfälle

Fallnr.	Diagnose (DSM-IV)	Geschlecht (w, m)	Alter [Jahre]	Todesursache
1	scz, paranoid	m	49	Akutes Rechtsherzversagen
2	scz, paranoid	w	60	Herzversagen
3	scz, paranoid	w	38	Pneumonie
4	scz, paranoid	w	52	Suizid durch Ertrinken
5	scz, paranoid	m	49	Plötzlicher Atemstillstand
6	scz, paranoid	w	55	Suizid durch Überdosierung
7	scz, paranoid	m	34	Suizid durch Erhängen
8	scz, paranoid	m	58	Lungenembolie
9	scz, paranoid	w	62	Gastrointestinale Blutung
10	scz, paranoid	m	45	Herz-Kreislauf-Versagen
11	scz, residual	w	66	Myokardinfarkt
12	scz, residual	w	53	Myokardinfarkt
13	scz, residual	m	46	Lungenembolie
14	scz, residual	m	51	Ileus
15	scz, residual	m	50	Akzidentielle Asphyxie
16	scz, residual	m	48	Akzidentielle Asphyxie
scz, alle (Ratio/Median±q1, q3)		9m/7w	50,5 (46,5; 57,3)	
scz, paranoid (Ratio/Median±q1, q3)		5m/5w	50,5 (43,3; 58,5)	
scz, residual (Ratio/Median±q1, q3)		4m/2w	50,5 (47,5; 65,3)	
17	Kontrollen	m	50	Myokardinfarkt
18	Kontrollen	m	47	Myokardinfarkt
19	Kontrollen	w	52	Herz-Kreislauf-Versagen
20	Kontrollen	w	48	Akuter Asthmaanfall
21	Kontrollen	m	47	Respiratorische Insuffizienz
22	Kontrollen	w	64	Peritonitis
23	Kontrollen	w	33	Aortenembolie
24	Kontrollen	m	38	Myokardinfarkt
25	Kontrollen	w	50	Aneurysma dissecans der Aorta
26	Kontrollen	m	64	Aneurysma dissecans der Aorta
27	Kontrollen	m	56	Herzversagen
28	Kontrollen	w	65	Herzversagen
29	Kontrollen	m	63	Herzversagen
30	Kontrollen	w	64	Gastrointestinale Blutung
31	Kontrollen	m	54	Lungenembolie
32	Kontrollen	m	46	Lungenembolie
Kontrollen (Ratio/Median±q, q3)		9m/7w	51,0 (47,0; 63,8)	

*Abkürzungen:* DSM-IV - Diagnostisches und Statistisches Manual Psychischer Störungen, Version IV, Fallnr. – Fallnummer, m – männlich, scz – Schizophrenie-Kohorte, q1 und q3 – unteres und oberes Quartil, w – weiblich.

## 2.2 Gewebeaufbereitung

Die Gewebeaufbereitung und anschließende immunhistochemische Färbung entsprechen der Vorgängerstudie von Steiner et al. (2016) (1). Innerhalb von 4–72h nach dem Tod wurden die Gehirne entnommen (Details zur Autolysedauer siehe Tab. 4) und gewogen (Details zum Hirngewicht siehe Tab. 4). Anschließend wurden die Gehirne in einer 8%igen phosphatgepufferten Formaldehydlösung (pH = 7,0; 15-20°C) für mehrere Monate fixiert (Details zur Fixationszeit siehe Tab. 4). Nach erfolgter Fixierung wurden der Hirnstamm und das Kleinhirn abgetrennt. Die Gehirne wurden mittels zweier bihemisphärischer Koronarschnitte in drei Blöcke („Frontal-“, „Mittel-“ und „Posteriorenblock“) unterteilt. Der vordere

Koronarschnitt wurde am Rostrum des Balkens (Corpus callosum) angesetzt und der hintere okzipital am Splenium. Die in der vorliegenden Studie untersuchten Hirnschnitte stammen alle aus dem „Mittelblock“, welcher u.a. den STG, den Thalamus und den Hippocampus enthält. Während insgesamt acht Wochen wurden die Hirnblöcke in einer stufenweise in der Konzentration aufsteigenden Alkoholreihe (50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 96%, 100%, 100%) entwässert. Die entwässerten Hirnpräparate wurden anschließend für sieben Tage in das Intermedium Chloroform eingelegt. Nach abschließender vierwöchiger Paraffineinbettung wurden mit Hilfe eines Großschnittmikrotoms (Polycut- S, Reichert-Jung, Nußloch, Deutschland) von jedem Gehirn Koronarschnitte mit einer Schichtdicke von 20µm angefertigt. Diese wurden anschließend auf einen Objektträger übertragen.

Tabelle 4: Demographische Daten - Gewebeaufbereitung

Fallnr.	Diagnose (DSM-IV)	Autolysedauer [h]	Fixationszeit [t]	Hirngewicht [g]
1	scz, paranoid	24	370	1325
2	scz, paranoid	48	146	1470
3	scz, paranoid	12	161	950
4	scz, paranoid	24	140	1240
5	scz, paranoid	48	k.A.	1470
6	scz, paranoid	48	290	k.A.
7	scz, paranoid	5	330	k.A.
8	scz, paranoid	24	240	k.A.
9	scz, paranoid	24	274	1125
10	scz, paranoid	72	150	1400
11	scz, paranoid	24	308	k.A.
12	scz, paranoid	48	120	1110
13	scz, paranoid	48	210	1450
14	scz, paranoid	48	300	1450
15	scz, paranoid	48	120	1350
16	scz, paranoid	48	201	1300
scz, alle Ratio/Median±q1, q3)		48,0 (24,0; 48,0)	210,0 (146,0; 300,0)	1137,5 (1153,8; 1450,0)
scz, par (Ratio/Median±q1, q3)		24,0 (21,0; 48,0)	240,0 (148,0; 310,0)	1325,0 (1125,0; 1470,0)
scz, res (Ratio/Median±q1, q3)		48,0 (42,0; 48,0)	205,5 (120,0; 302,0)	1350,0 (1205,0; 1450,0)
17	Kontrollen	72	90	1540
18	Kontrollen	24	182	1450
19	Kontrollen	24	87	1200
20	Kontrollen	48	59	1170
21	Kontrollen	24	84	1220
22	Kontrollen	24	75	1190
23	Kontrollen	72	256	1150
24	Kontrollen	19	70	1550
25	Kontrollen	72	116	1055
26	Kontrollen	36	240	1310
27	Kontrollen	24	510	1470
28	Kontrollen	24	95	1100
29	Kontrollen	48	540	1200
30	Kontrollen	24	112	1100
31	Kontrollen	24	250	1430
32	Kontrollen	24	290	1395
Kontrollen (Ratio/Median ± q1, q3)		24,0 (24,0; 48,0)	114,0 (84,8; 254,5)	1210,0 (1155,0; 1445,0)

*Abkürzungen:* CPZ – mittlere Tagesdosis der antipsychotischen Medikation der letzten 90 Tagen vor dem Tod umgerechnet in Chlorpromazin-Äquivalente, Fallnr. – Fallnummer, g – Gramm, h – Stunden, k.A – keine Angaben möglich, m – männlich, par – paranoide Kohorte, res – residuale Kohorte, scz – Schizophrenie-Kohorte, t – Tage, q1 und q3 – unteres und oberes Quartil.

Tabelle 5: Statistik zur Verteilung der demographischen Daten

		Ge- schlecht (w, m)	Alter [Jahre]	Auto- lyse- dauer [h]	Fixa- tions- zeit [t]	Hirn- gewicht [g]	Benzo- diazepine (ja, nein)	Krankheits- dauer [Jahre]	CPZ [mg]
scz vs con	Test	Exakter Fisher- Test	U-Test	U-Test	U-Test	U-Test	-	-	-
	Testwert P-Wert	- 1,000	116,000 0,651	118,000 0,689	73,000 0,063	85,000 0,609	- -	- -	- -
par vs res	Test	Exakter Fisher- Test	U-Test	U-Test	U-Test	U-Test	Exakter Fisher- Test	U-Test	U-Test
	Testwert P-Wert	- 0,633	28,000 0,828	18,500 0,175	22,000 0,555	17,000 0,935	- 0,066	10,000 <b>0,029*</b>	10,000 0,199

*Anmerkungen:* Für die dichotom verteilten Variablen (Geschlecht und Benzodiazepine) wurde der Exakter Fisher-Test verwendet. Mit dem Shapiro-Wilk-Test wurde zur Überprüfung der Normalverteilung der demographischen Daten verwendet. Dabei wurde die Nullhypothese auf Normalverteilung für einige demographische Daten abgelehnt. Daher wurde anschließend der U-Test als nichtparametrischer Test für die Verteilung der metrisch skalierten demographischen Daten verwendet; \*p < 0,05.

*Abkürzungen:* con – Kontrollgruppe, CPZ – mittlere Tagesdosis der antipsychotischen Medikation der letzten 90 Tagen vor dem Tod umgerechnet in Chlorpromazin-Äquivalente, g – Gramm, h – Stunden, m – männlich, mg – Milligramm, par – paranoide Kohorte, res – residuale Kohorte, scz – Schizophrenie-Kohorte, t – Tage, U -Test – Mann-Whitney-U-Test, vs – versus, w – weiblich.

### 2.3 Immunhistochemische Färbung

Das Einbettmedium Paraffin wurde vor Beginn der immunhistochemischen Färbung mit Hilfe von Xylol für 10 Minuten (min) und einer absteigenden Alkoholreihe aus den Hirnschnitten entfernt. Zur Antigendemaskierung (engl. antigen retrieval) wurden die Schitte 4min in 10 mM-Zitratpuffer (pH 6,0) gekocht. Die Unterbindung der endogenen Peroxidaseaktivität erfolgte durch die Inkubation der Hirnschnitte in Methanol/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Wasserstoffperoxid). Nach wiederholtem Waschen mit phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) erfolgte die Inkubation mit dem Primärantikörper für 72 Stunden bei 4°C. Als Primärantikörper wurde ein monoklonaler Antikörper gegen GAD65 und GAD67 verwendet (Antikörper Konzentration 10µg/ml; Medical & Biological Laboratories CO., Wobrun, USA). Um nicht gebundene Antikörper zu entfernen, wurde erneut mit PBS gespült. Daraufhin erfolgte eine zweistündige Inkubation mit einem biotinylierten Brückenantikörper bei Raumtemperatur (Amersham Biosciences UK, Ltd., Little Chalfont, UK). Nach erneutem Spülen mit PBS wurde die StreptAvidin-Biotin Komplexmethode (StreptABC-Methode) angewendet. Hierfür wurde ein präformierter StreptAvidin-Peroxidase-Komplex (Amersham Biosciences) in einer Verdünnung von 1:100 appliziert und für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Das dem Komplex aufsitzende Enzym

Meerrettichperoxidase (Horse Radish Peroxidase) setzte das im nächsten Schritt applizierte Chromogen 3,3'-Diaminobenzidin (DAB) um, wodurch das Reaktionsprodukt sichtbar wurde. Zur Intensivierung der Färbung wurde 0,5%iges Ammonium-nickel(II)-sulfat Hexahydrat dazugegeben (152, 153). Ein Beispiel für einen GAD65/67-immunohistochemisch gefärbten Hirnschnitt ist in Abbildung 1 zu sehen. Die Spezifität des Primärantikörpers gegen GAD65 und GAD67 wurde untersucht, indem dieser durch eine Pufferlösung ersetzt wurde (Negativkontrolle). Dabei konnte keine immunohistochemische Färbung nachgewiesen werden.

Für die während der Fixierung und weiteren Prozessierung aufgetretene Gewebeschrumpfung wurde der Volumenschrumpfungsfaktors (VSF) gemäß folgender Formel ermittelt:

$$VSF = (A1/A2)^{3/2}$$

wobei A1 die Fläche vor und A2 die Fläche nach der Prozessierung ist.

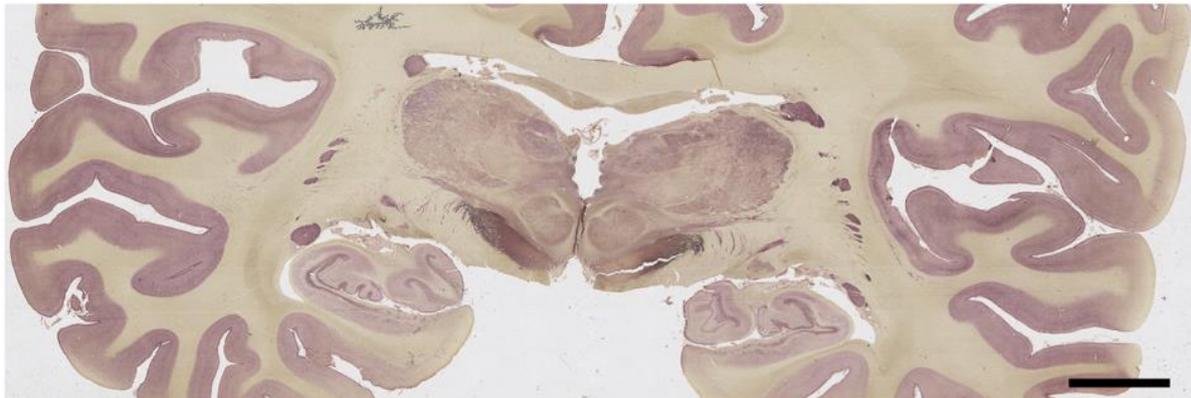


Abbildung 1: Übersichtsaufnahme

*Anmerkung:* Übersichtsaufnahme eines Anti-GAD65/67 immunohistochemisch gefärbten Hirnschnittes eines Kontrollhirns. Der Messbalken entspricht 10mm.

## **2.4 Mikroskopischer Aufnahmeprozess**

### **2.4.1 Abgrenzung der Zielregionen**

Die anatomische Identifikation der untersuchten Hirnregionen STG, MD, LD, CA1 und DG erfolgte mit Hilfe des „Atlas of the Human Brain“ von J.K. Mai (2008) (154). Die Lokalisation der Hirnregionen ist in der mikroskopischen Aufnahme in Abbildung 2A ersichtlich.

Die beiden in dieser Studie getrennt untersuchten kortikalen Schichten III und V des STG wurden mit Abgleich eines benachbarten Nissl-Schnittes identifiziert, da in den Nissl-Schnitten die typische zytoarchitektonische Struktur der Großhirnrinde besser zu erkennen ist (Abb. 2B und C) (155). Schicht III des STG enthält kleine bis mittelgroße Pyramidenzellen und Schicht V des STG ist durch das Vorhandensein von Pyramidenzellen variabler Größe gekennzeichnet (155). Die beiden Thalamuskern konnten mit Hilfe des „Atlas of the Human Brain“ von J.K. Mai (2008) eindeutig lokalisiert werden: Der MD befindet sich jeweils lateral des III. Ventrikels und der LD befindet sich lateral des MD (154). In der Hippocampusformation wurden die Pyramidenschicht der CA1-Region und die Körnerschicht des DG untersucht. Die breite Pyramidenschicht der CA1-Region des Hippocampus enthält locker gepackte, trianguläre Pyramidenzellen (156). Im Gegensatz dazu enthält die CA2-Region des Hippocampus dicht gepackte, eiförmige Pyramidenzellen und ist somit von der CA1-Region deutlich differenzierbar (156). Im DG wurde die GAD-ir Nervenfaserdichte in der Körnerschicht untersucht. Die zellreiche Körnerschicht des DG lässt sich zytomorphologisch eindeutig von der sie umgebenden zellärmeren äußeren und inneren Molekularschicht abgrenzen (siehe Abb. 2D) (156).

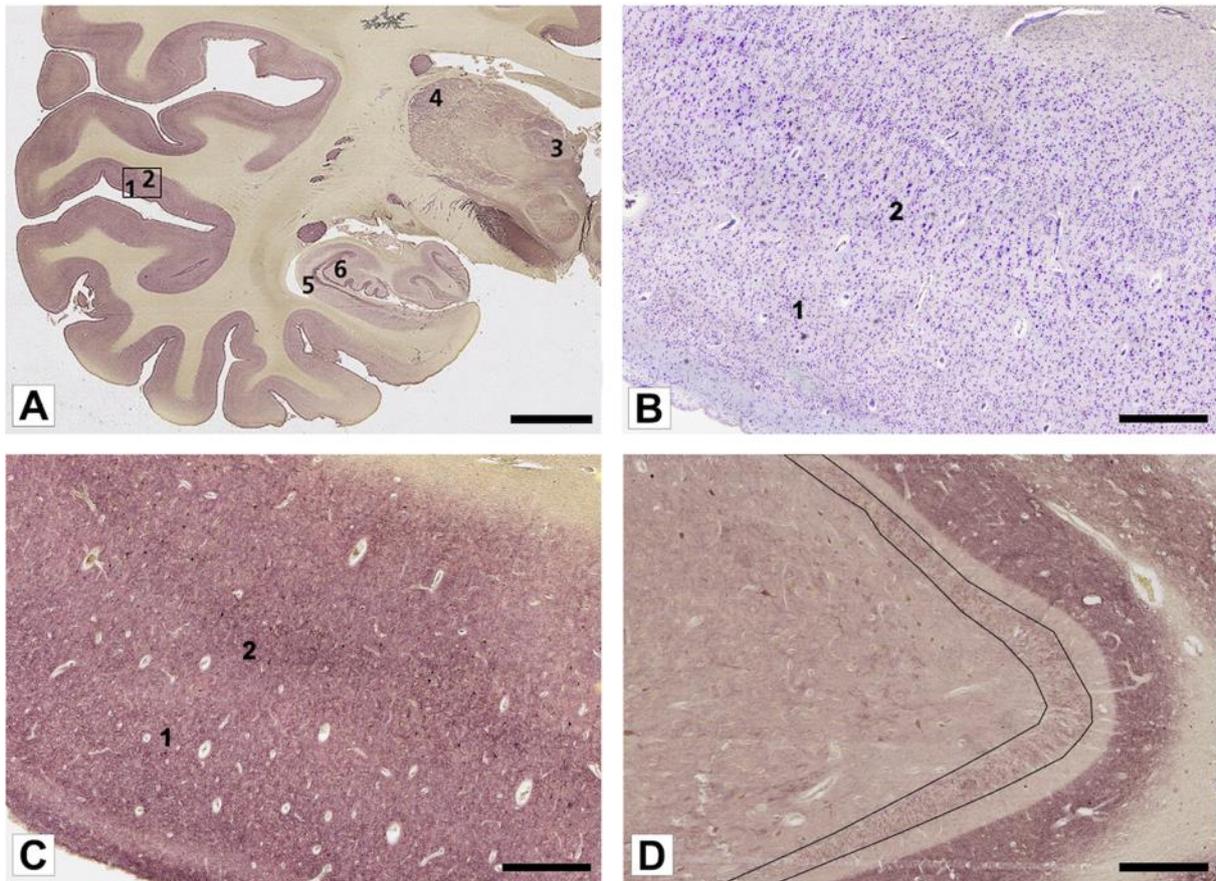


Abbildung 2: Abgrenzung der Hirnregionen

- (A) Übersichtsbild der linken Hemisphäre eines GAD-immunohistochemisch gefärbten Hirnschnitts von einem Kontrollhirn. 1 = STG Schicht III, 2 = STG Schicht V, 3 = MD, 4 = LD, 5 = CA1, 6 = DG (154). Der Messbalken entspricht 8mm.
- (B) Ausschnitt eines Nissl-gefärbten Hirnschnitts des STG von einem Kontrollhirn. 1 = STG Schicht III, 2 = STG Schicht V. Der Messbalken entspricht 500µm.
- (C) Ausschnitt eines GAD-immunohistochemisch gefärbten Hirnschnitts des STG von einem Kontrollhirn. 1 = STG Schicht III, 2 = STG Schicht V. Der Messbalken entspricht 500µm.
- (D) Selektion der Körnerschicht des DG (schwarze Umrandung) von einem Patienten mit residueller Schizophrenie. Der Messbalken entspricht 300µm.

*Anmerkungen:* Aus Förster, Model et al. (2022) (149).

*Abkürzungen:* CA1 – CA1- Region des Hippocampus, DG – Gyrus dentatus, LD – laterodorsaler Thalamus, MD – mediodorsaler Thalamus, STG III - Gyrus temporalis superior Schicht III, STG V - Gyrus temporalis superior Schicht V.

### 2.4.2 Mikroskopische Aufnahme der Zielregionen

Die Bildaufnahme erfolgte mit einer Olympus Mikroskop-Kamera DP22, die mit einem Olympus BX60 Mikroskop verbunden ist (Hersteller: Olympus K.K., Tokyo, Japan). Die hochauflösende Schrittmotor-Steuerung Märzhäuser TANGO Desktop (Hersteller: Märzhäuser Wetzlar GmbH & Co. KG, Wetzlar, Deutschland) ermöglichte die Ansteuerung in 2 Achsen. Die Kamera des Mikroskops war direkt mit der Bildaufnahmesoftware Olympus CellSens Dimension Desktop Version 1.18 verbunden. Zur Identifikation der Hirnregionen wurde zuerst ein Übersichtsbild mit einer Vergrößerung von 12,5x aufgenommen (Okularvergrößerung 10x, Objektivvergrößerung 1,25x, Bildauflösung 2,990µm/Pixel; Abb. 1). Das Übersichtsbild sowie die nachfolgenden Aufnahmen der einzelnen Hirnregionen wurden als 24-Bit Farbbild (RGB) aufgenommen (Abb. 1).

Tabelle 6: Aufnahmedetails

	vorliegende Arbeit	Vorgängerstudie (1)
Bildgröße	STG III: 20x0,35mm <sup>2</sup> ± 0,01mm <sup>2</sup> STG V: 20x0,35mm <sup>2</sup> ± 0,01mm <sup>2</sup> LD: 20x0,35mm <sup>2</sup> ± 0,01mm <sup>2</sup> MD: 20x0,35mm <sup>2</sup> ± 0,01mm <sup>2</sup> CA1: 10x0,35mm <sup>2</sup> ± 0,01mm <sup>2</sup> DG: 2x0,32mm <sup>2</sup> ± 0,13mm <sup>2</sup>	STG III und V: 6x0,34 ± 0,04mm <sup>2</sup> LD: 6x0,12 ± 0,05mm <sup>2</sup> MD: nicht evaluiert CA1: 6x0,34 ± 0,04mm <sup>2</sup> DG: 6x0,12 ± 0,05mm <sup>2</sup>
Anzahl	10 pro Hemisphäre in STG Schicht III und V, MD, LD 5 pro Hemisphäre in CA1 und 1 pro Hemisphäre in DG Insgesamt: 92 Aufnahmen pro Hirnschnitt	3 pro Hemisphäre in allen Regionen Insgesamt: 30 Aufnahmen pro Hirnschnitt
Vergrößerung	200x (Okularvergrößerung 10x, Objektivvergrößerung 20x)	200x (Okularvergrößerung 10x, Objektivvergrößerung 20x)

*Abkürzungen:* CA1 – CA1- Region des Hippocampus, DG – Gyrus dentatus, LD – laterodorsaler Thalamus, MD – mediodorsaler Thalamus, STG III – Gyrus temporalis superior Schicht III, STG V – Gyrus temporalis superior Schicht V.

Zur repräsentativen Darstellung der Hirnregionen STG Schicht III und V, MD und LD wurden jeweils 10 Zielregionen auf der linken und 10 Zielregionen auf der rechten Hemisphäre manuell positioniert. Für die Darstellung der kleineren Region CA1 wurden insgesamt 5 Zielregionen pro Hemisphäre bestimmt (siehe Aufnahmedetails und evaluierte Fläche Tab. 6). Die Körnerschicht des DG ist sehr schmal. Um dennoch eine repräsentative Fläche des DG abbilden zu können, wurde pro Hemisphäre eine große Aufnahme gemacht, aus der anschließend manuell die Körnerschicht mit ImageJ Version 2.0.0 (National Institutes of Health, Bethesda, USA) ausgeschnitten wurde (siehe Abb. 2D). Insgesamt wurde in der vorliegenden Arbeit in jeder Hirnregion kumulativ eine größere Fläche analysiert als in der

Vorgängerstudie (größere Anzahl von Einzelaufnahmen und größere Fläche der Einzelaufnahmen) (1).

Die Zielregionen wurden so ausgewählt, dass sie so wenig Artefakte und Gefäßanschnitte wie möglich enthalten. Dafür wurden die in einem Satz aufgenommenen Aufnahmen, bestehend aus 92 Einzelbildern pro Hirnschnitt, manuell kontrolliert, bei Bedarf ausgeschlossen und wenn möglich erneut aufgenommen. Artefakte können beim Fixierungs-, Einbettungs- oder Schneidprozess der Gehirne entstehen. Sie führen z.B. zu einer Quetschung oder Zerrung des Gewebes und sind als Gewebelücken/Lufteinschlüsse im Hirnschnitt erkennbar. Außerdem können Artefakte während des Färbeprozesses, z. B. durch mangelhaftes Spülen mit PBS, entstehen und sich dann als falsch-positive Präzipitate zeigen. Diese lassen sich eindeutig aufgrund ihrer für das entsprechende Gewebe atypischen Form identifizieren.

Die einzelnen Zielregionen wurden mit 200-facher Vergrößerung aufgenommen (Okularvergrößerung 10x, Objektivvergrößerung 20x; Bildauflösung 0,183 $\mu$ m/Pixel). Dabei wurde die höchste in CellSens verfügbare Kontraststufe (Stufe 2,0) verwendet. Die Belichtungszeit wurde auf automatisch eingestellt und vor jeder Aufnahme erfolgte ein manueller Weißabgleich an einer gewebefreien Stelle. Jede einzelne Aufnahme besteht aus einem großen Probereich, der nur durch mehrere Einzelaufnahmen erfasst werden konnte. Diese nebeneinander liegenden Einzelbilder wurden in einem automatischen Prozess MIA (Multiple Image Alignment) mit einer Überlappung von 5% zu einem Bild zusammengefügt. Um Helligkeitsunterschiede zwischen den Einzelaufnahmen auszugleichen, wurde eine Shading-Korrektur vorgenommen. Diese zusammengeführten Aufnahmen ergaben in den Regionen STG Schicht III und V, MD, LD und CA1 eine durchschnittliche Größe von 0,35mm<sup>2</sup>  $\pm$  0,01mm<sup>2</sup> pro Aufnahme. Nach Selektion der Körnerschicht betrug die aufgenommene Fläche im DG durchschnittlich 0,32mm<sup>2</sup>  $\pm$  0,13mm<sup>2</sup> (Tab. 6).

Die Aufnahmen und die anschließende Quantifizierung der GAD-ir Nervenfaserdichte in Kapitel 2.5 erfolgten verblindet, d.h. die Diagnosen waren der untersuchenden Person während der Datenerhebung nicht bekannt.

## 2.5 Quantifizierung der GAD-ir Nervenfaserdichte

### 2.5.1 Beschreibung der Methodik

Die Quantifizierung der GAD-ir Nervenfaserdichte wurde mit dem Bildbearbeitungsprogramm ImageJ Version 2.0.0 (National Institutes of Health, Bethesda USA) durchgeführt (157). Im ersten Schritt erfolgte die Flächenberechnung der Einzelbildaufnahme und die anschließende Konvertierung des 24-Bit RGB Farbbild in ein 8-Bit Graustufenbild (siehe Abb. 3A und B). Anschließend wurden mit dem automatischen Schwellenwertverfahren „Triangle“ (Abb. 3C, Abb. 1A) (158), relevante immunhistochemische GAD65/67-Strukturen von der Hintergrundfärbung segmentiert. Für die anschließende Selektion der GAD-ir Nervenfasern wurde ein einheitliches Filterkriterium (Größe: 0-20 $\mu\text{m}^2$ ; Rundheit: 0-1) gewählt ( $\cong$  unkorrigierte Selektion der GAD-ir Nervenfasern, Abb. 3D). In dieser Arbeit wurde die relative Dichte GAD-ir Nervenfasern untersucht. Die absoluten Werte der GAD-ir Nervenfasern sind für die Auswertung irrelevant. Diesbezüglich wurde bereits in früheren Studien ein einheitliches Filterkriterium für die Selektion des GAD-ir Nervenfasern als ausreichend sensitiv erachtet (1, 70, 159), auch wenn sich die Axondurchmesser der GABAergen Interneurone in unterschiedlichen Hirnregionen geringfügig unterscheiden (160).

Um ausschließlich GAD-ir Nervenfasern zu erfassen, wurden die im Rahmen der gemeinsamen Publikation mit AF (149) analysierten GAD-ir Zellen von der unkorrigierten Selektion der GAD-ir Nervenfasern abgezogen (Abb. 3D – Abb. 3F). Die vorangegangene Selektion der GAD-ir Zellen erfolgte ebenfalls an dem im Schritt C entstandenen segmentierten Binärbild (Abb. 3E). Aufgrund der hirnregional unterschiedlichen Zellmorphologie wurden für die Selektion der GAD-ir Zellen, die in der Arbeit von Förster, Model et. al (2022) evaluierten Filterkriterien verwendet (Tab. A1) (149). Die Anwendung der Filterkriterien zur Identifizierung der GAD-ir Zellen, kann dazu führen, dass einzelne Partikel, die eigentlich noch zum Zellkörper gehören, nicht mit erfasst werden. Daher wurden die Zellen mit der Funktion „dilate“ von ImageJ etwas vergrößert, um alle noch zum Zellkörper gehörenden Partikel zu erfassen (Abb. 3F) (149, 161, 162).

Die nach Abzug der selektierten und vergrößerten GAD-ir Zellen von der unkorrigierten Selektion der GAD-ir Nervenfasern (Abb. 3D – Abb. 3F = Abb. 3G) übrig gebliebenen Partikeln entsprechen der korrigierten Selektion der GAD-ir Nervenfasern. Die Gesamtfläche aus allen übrig gebliebenen Partikeln ( $\cong$  korrigierter Selektion der GAD-ir Nervenfasern) wurde berechnet. Die relative

Dichte von GAD-ir Nervenfasern ergibt sich aus dem Verhältnis der Gesamtfläche der selektierten GAD-ir Nervenfasern und der zu Beginn gemessenen Gesamtfläche der Aufnahme (Abb. 3H).

### **2.5.2 Interrater- und Retest-Reliabilität**

Interrater-Reliabilität bezeichnet das Ausmaß der Übereinstimmung, wenn verschiedene Personen die gleiche Methode anwenden und die Retest-Reliabilität das Ausmaß der Übereinstimmung, wenn die Methode zu einem späteren Zeitpunkt vom selben Untersuchenden nochmals angewandt wird. Der einzig in dieser Arbeit manuell evaluierte Schritt im Quantifizierungsprozess ist die Bestimmung der Filterkriterien (Größe und Rundheit) für die Selektion der GAD-ir Zellen, welche im Rahmen der gemeinsamen Publikation mit AF (149) evaluiert wurden. Unterschiedliche Filterkriterien der GAD-ir Zellen können bei dem in dieser Arbeit angewandten Quantifizierungsprozess zu leicht veränderten GAD-ir Nervenfasermessungen führen. Daher wurde zur Überprüfung der Interrater-Reliabilität das Filterkriterium für die GAD-ir Zellen in 100 Aufnahmen jeweils von meiner Forschungspartnerin AF und mir bestimmt. Die daraufhin erfolgte automatisierte Quantifizierung der GAD-ir Nervenfaserdichten gemäß Kapitel 2.5.1 ergab einem Konkordanz-Korrelationskoeffizienten nach Lin von  $r_c = 1,000$  (95%-Konfidenzintervall [1,000; 1,000]). Für die Retest-Reliabilität wurden die Filterkriterien zur Detektion des GAD-ir Zellen zu einem späteren Zeitpunkt nochmals für 100 Aufnahmen bestimmt. Mit diesen neu evaluierten Filterkriterien wurden die GAD-ir Nervenfasern erneut gemäß der oben in Kapitel 2.5.1 beschriebenen Methode bestimmt. Dabei betrug der berechnete Konkordanz-Korrelationskoeffizient nach Lin für die Retest-Reliabilität  $r_c = 0,999$  (95%-Konfidenzintervall [0,999; 1,000]). Beide Testgütekriterien weisen somit eine sehr hohe Übereinstimmung auf (163).

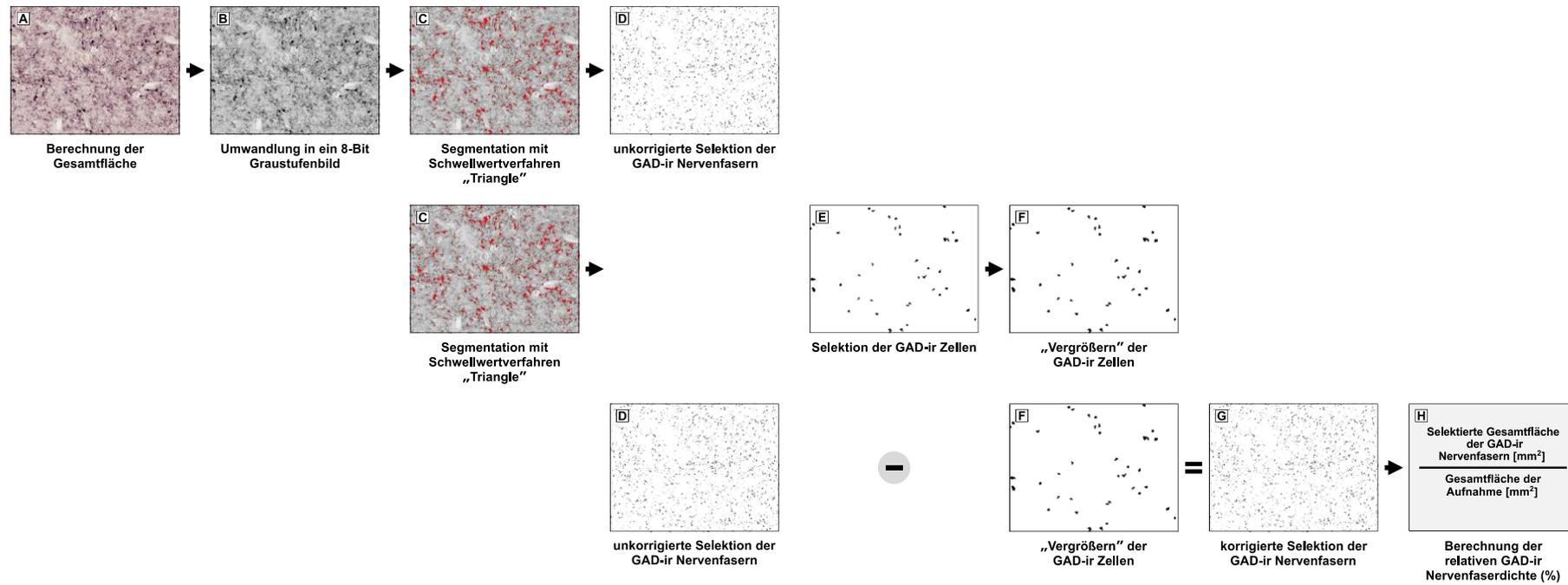


Abbildung 3: Verfahren zur Quantifizierung der GAD-ir Nervenfasern

Anmerkungen: Modifiziert nach Förster, Model et al. (2022) (149).

### 2.5.3 Validität der automatisierten Messung

Um die in dieser Arbeit angewendete neue, automatisierte Quantifizierungsmethode mit der etablierten, manuellen, softwaregestützten Referenzmethode nach Gos et al. (2009, 2012) und Steiner et al. (2016) zu vergleichen (1, 70, 159), wurde die GAD-ir Nervenfaserdichte in 100 Aufnahmen mit beiden Methoden quantifiziert. Für den entsprechenden Vergleich wurde der Konkordanz-Korrelationskoeffizient nach Lin berechnet und zur grafischen Darstellung ein Bland-Altman-Plot erstellt (Kapitel Ergebnisse 3.2.5).

**Kurzbeschreibung der manuellen, softwaregestützten Analyse:** Für die manuelle, softwaregestützte Auswertung wurde die Software Olympus CellSens Dimension Desktop Version 1.13 (1, 70, 159) verwendet. In einem ersten Schritt wurden die Aufnahmen in ein 8-Bit Graustufenbild umgewandelt. Der anschließende Segmentierungsprozess erfolgte durch eine manuelle Festlegung der unteren und oberen Schwellenwertgrenze. Diese manuelle Schwellenwertbestimmung erfolgte durch visuelle Analyse des Histogramms des Graustufenbildes. Anschließend erfolgte ein visueller Abgleich und gegebenenfalls eine Nachjustierung der Schwellenwertgrenzen. Die Zellkörper wurden einzeln manuell gelöscht. Für die anschließende Selektion der GAD-ir Nervenfasern wurde das Filterkriterium 0-20 $\mu\text{m}^2$  festgelegt (tabellarische Übersicht Methodenvergleich Tab. A2).

### 2.6 Statistische Datenanalyse

Die statistische Auswertung wurde mit der Software IBM SPSS (Statistical Product and Service Solutions) Statistics Subscription Version 26 durchgeführt. Die grafischen Darstellungen der Ergebnisse wurden in der freien Programmiersprache R (R language for statistical computing; Version 3.6.3) mit der Open-Source-Software RStudio (Version 1.3.1073) erstellt ([www.cran.r-project.org](http://www.cran.r-project.org)).

Mit dem Levene's-Test wurde die Varianzhomogenität für alle Ergebnisse der GAD-ir Nervenfaserdichtemessungen bestätigt. In einem zweiten Schritt wurde mit dem Shapiro-Wilk-Test die Normalverteilung der GAD-ir Nervenfaserdichtemessungen untersucht. In einigen Hirnregionen wurde die Nullhypothese auf Normalverteilung abgelehnt, so dass für die anschließenden Berechnungen nichtparametrische Testverfahren verwendet wurden. Um potenziell konfundierende Variablen zu identifizieren, wurden Spearman-Korrelationen zwischen den Kovariablen (Alter, Autolysedauer, Fixationszeit, Hirngewicht, Krankheitsdauer und Antipsychotika-Dosis) und den entsprechenden Medianen der

GAD-ir Nervenfaserdichtemessungen für alle Diagnose- sowie diagnostischen Subgruppen berechnet. Der potenziell konfundierende Einfluss der dichotom verteilten Daten (Benzodiazepine und Geschlecht) wurde mittels U-Test ermittelt.

Anhand der beiden finalen Linear Gemischen Modell (LMM)-Analysen wurde der Effekt der „Diagnose“ (oder der „diagnostischen Subgruppe“) auf die GAD-ir Nervenfaserdichte (abhängige Variable) untersucht. Diese beiden finalen LMM-Analysen beinhalten die unabhängigen Variablen „Hemisphäre“, „Region“, „Diagnose“/„diagnostische Subgruppe“) als Haupteffekte sowie deren Interaktionen (AxB und AxBxC). Zudem wurde zuvor in probatorischen LMM-Analysen der Einfluss potenziell konfundierender Variablen untersucht. Falls eine potenziell konfundierende Variable als Interaktion mit der „Diagnose“/ „diagnostischen Subgruppe“ einen signifikanten Einfluss auf die GAD-ir Nervenfaserdichte zeigte, wurde diese Variable sowohl als Haupteffekt wie auch als AxB Interaktion mit der „Diagnose“/„diagnostischen Subgruppe“ in der entsprechenden finalen LMM-Analyse berücksichtigt.

Ergab sich ein signifikanter Gruppenunterschied ( $p < 0,05$ ) sowie eine Interaktion zwischen „Region“ und „Diagnose“/„diagnostischen Subgruppe“ mit Trend in Richtung statistischer Signifikanz ( $p < 0,10$ ), wurde anschließend eine nach Regionen aufgeteilte Post-hoc-Analyse durchgeführt.

Zusätzlich wurden zwei supplementäre LMM-Analysen durchgeführt, um eine Diagnose- (oder diagnostische Subgruppen) abhängige Interaktion der GAD-ir Parameter (Zell- versus Nervenfaserdichte) zu untersuchen. Hierbei wurden als abhängige Variablen die Werte der GAD-ir Nervenfaserdichte und die Werte der in Förster et al. (2022) detektierten GAD-ir Zellen verwendet (149). Auch diese supplementären Analysen beinhalten die Haupteffekte „Hemisphäre“, „Region“, „Diagnose“/„diagnostische Subgruppe“ sowie deren Interaktionen (AxB und AxBxC). Zusätzlich wurde der Haupteffekt „GAD-ir Parameter“ (Zell- versus Nervenfaserdichte), sowie dessen AxB Interaktion mit „Diagnose“/„diagnostische Subgruppe“ und dessen AxBxC Interaktion mit „Region“ und „Diagnose“/„diagnostische Subgruppe“ hinzugefügt.

Um die Art und Stärke des Zusammenhangs zwischen GAD-ir Nervenfaserverdichte und GAD-ir Zelldichte zu untersuchen, wurden anschließend hirnregionenspezifische Spearman-Korrelationen berechnet

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Morphologische Auswertung der GAD-ir Nervenfasern

Zur detaillierten Veranschaulichung sind in Abbildung 4 repräsentative mikroskopischen Aufnahmen (4A/C/E) abgebildet, gefolgt von einer Illustration der entsprechend selektierten GAD-ir Nervenfasern (B/D/F).

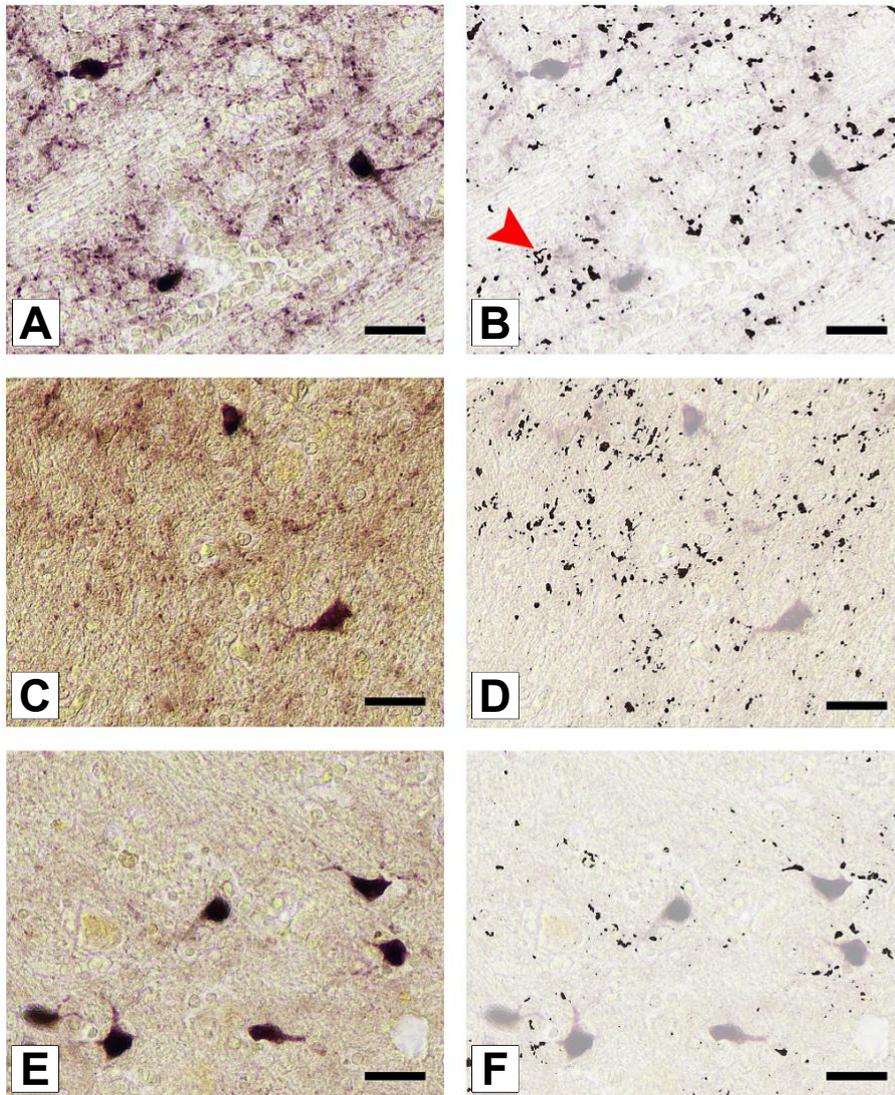


Abbildung 4: Illustration der selektierten GAD-ir Nervenfasern

(A/C/E) Ausschnitt der mikroskopischen Aufnahmen

(B/D/F) selektierte GAD-ir Nervenfasern (▶), GAD-ir Zellen wurden hier zur Darstellung grau hinterlegt

*Anmerkung:* Modifiziert nach Förster, Model et al. (2022) (149). Die repräsentativen Aufnahmen (A/B) stammen aus einem Kontrollhirn, (D/E) aus dem Gehirn eines Patienten mit paranoider Schizophrenie und (E/F) aus dem Gehirn eines Patienten mit residualer Schizophrenie. Alle Aufnahmen sind aus dem LD. Alle Messbalken entsprechen 25µm.  
*Abkürzungen:* LD – laterodorsaler Thalamus.

Die GAD-ir Nervenfasern bestehen aus langen, dünnen Strukturen, die in den Aufnahmen quer angeschnitten sind. Daher sind GAD-ir Nervenfasern als kleine Partikel mit heterogener Morphologie erkennbar. Die GAD immunhistochemisch gefärbten Nervenfasern haben eine violett-braune Farbe und weisen ein hirntypisch unterschiedliches Verteilungsmuster auf. In den STG Schichten III und V sind die Nervenfasern relativ gleichmäßig verteilt und haben einen kleinen bis mittelgroßen Durchmesser (Abb. 5A/B). In den Thalamuskernen MD und LD haben die GAD-ir Nervenfasern einen variablen Durchmesser (siehe Abb. 5C/D). Im LD lassen sich ziemlich klar abgrenzbare Bereiche mit wenig GAD immunhistochemisch gefärbten Nervenfasern erkennen (Abb. 5D). Im Thalamuskern MD sind die Bereiche mit weniger GAD-ir Nervenfasern nicht klar abgrenzbar. Die Verteilung im MD ist dennoch heterogen und setzt sich aus Bereichen mit locker gepackten oder dichter gepackten GAD-ir Nervenfasern zusammen (Abb. 5C). Die unterschiedliche Verteilung der GAD-Nervenfasern im MD zwischen einem Gehirn eines Schizophrenie-Patienten und einem Kontrollhirn ist in der Abbildung 6 gut erkennbar (Abb. 6). In der CA1-Region des Hippocampus sind die Nervenfasern sehr fein. Durch ihre feine Morphologie und ihre zusätzlich gleichmäßig lockere Verteilung erscheint die CA1-Region insgesamt heller als die anderen hier untersuchten Regionen (Abb. 5E). Im DG sind die feinen GAD-ir Nervenfasern regelmäßig um die dicht gepackten GAD immunhistochemisch negativen Körnerzellen angeordnet. In dieser zellreichen Schicht nehmen die dicht gepackten Körnerzellen eine große Fläche in Anspruch. Dennoch sind in der Körnerschicht des DG insgesamt mehr GAD-ir Nervenfasern erkennbar als in den angrenzenden, zellärmeren Schichten des DG (Abb. 5F).

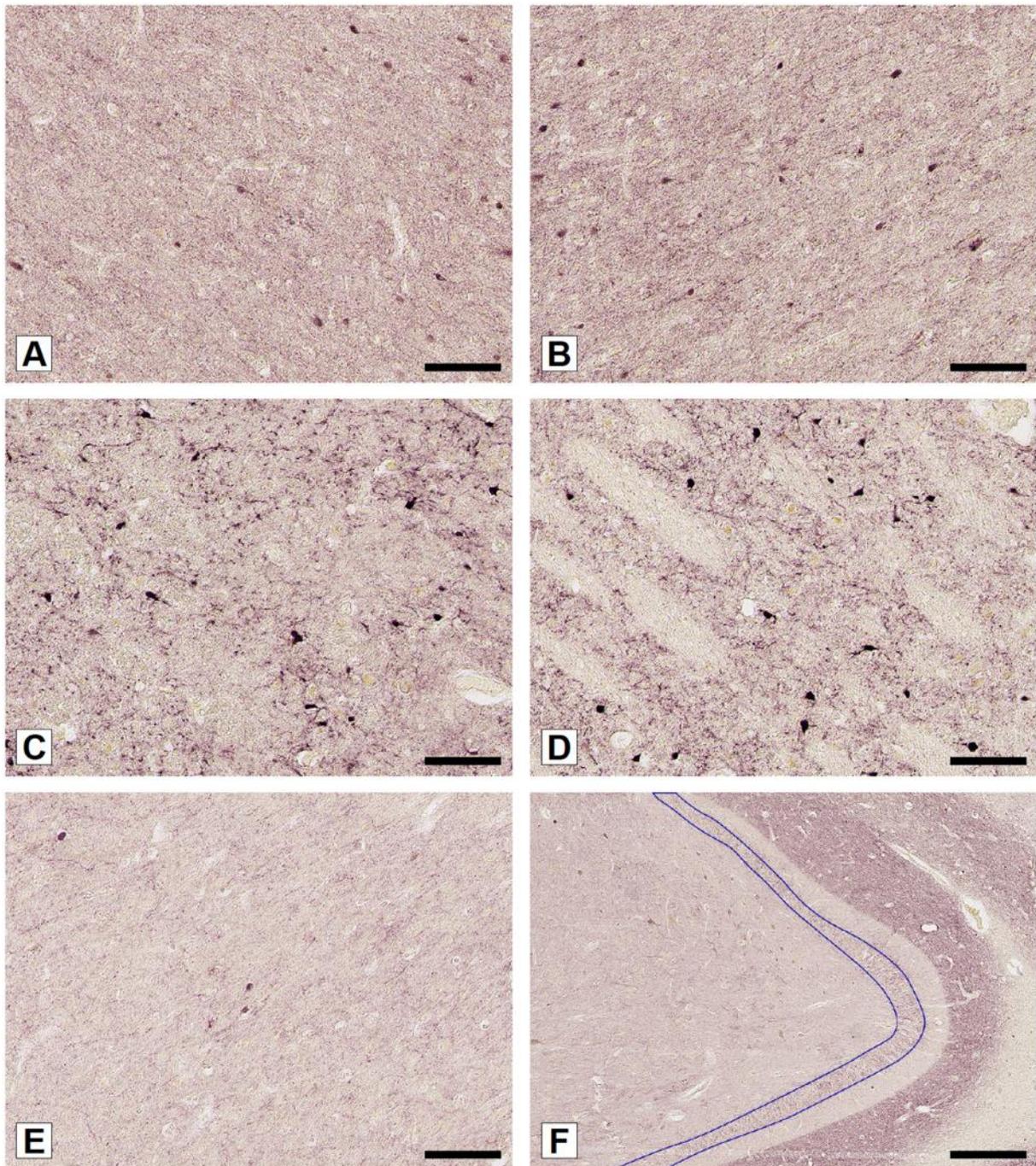


Abbildung 5: Aufnahmen der einzelnen Hirnregionen

- (A) STG Schicht III
- (B) STG Schicht V
- (C) MD
- (D) LD
- (E) CA1
- (F) DG; die untersuchte Körnerschicht des DG ist blau umrandet.

*Anmerkungen:* Alle Aufnahme aus einem Gehirn eines Patienten mit residualer Schizophrenie. Die Messbalken (A) – (E) entsprechen 100µm und der Messbalken (F) entspricht 300µm.

*Abkürzungen:* CA1 – CA1- Region des Hippocampus, DG – Gyrus dentatus, LD – laterodorsaler Thalamus, MD – mediodorsaler Thalamus, STG III – Gyrus temporalis superior Schicht III, STG V – Gyrus temporalis superior Schicht V.

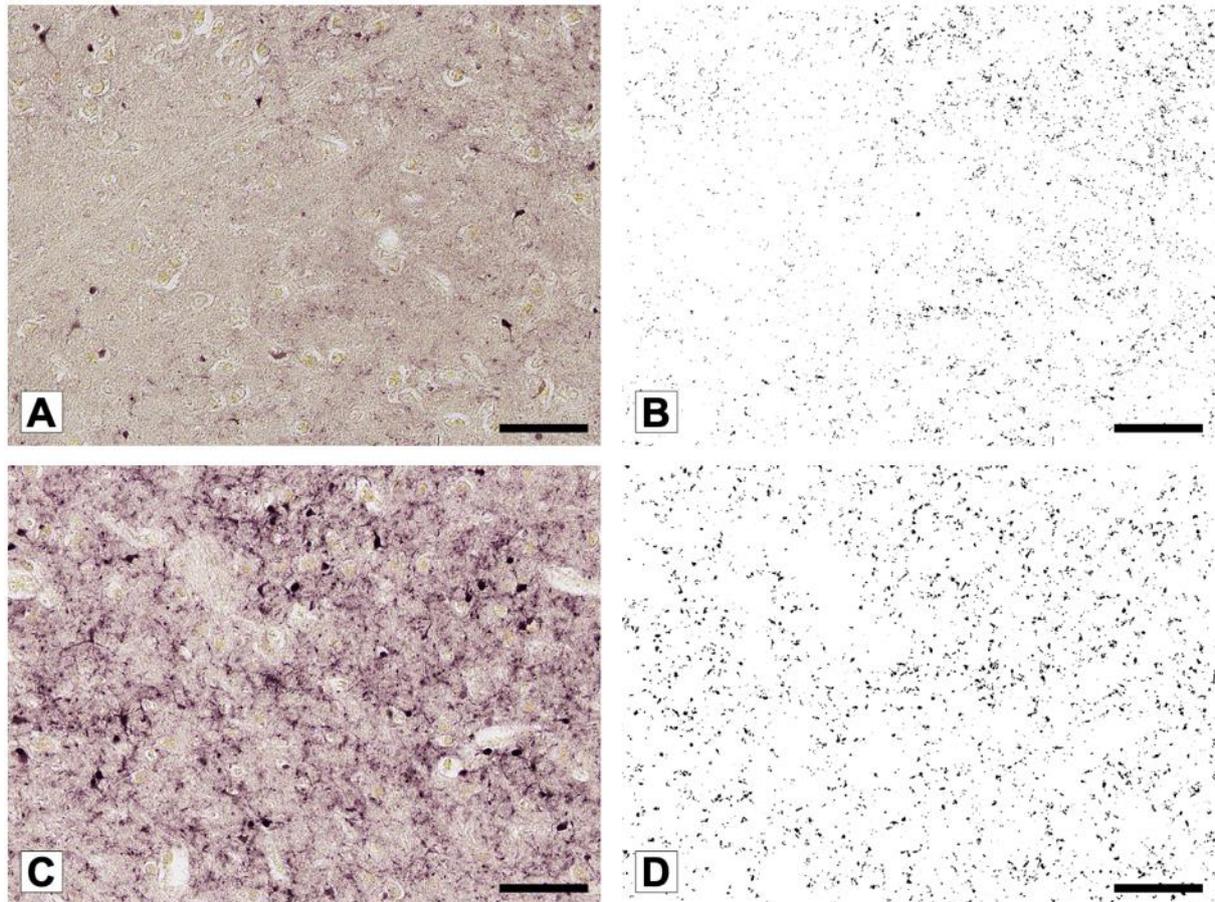


Abbildung 6: Selektierte GAD-ir Nervenfasern

(A/B) Patient mit paranoider Schizophrenie: (A) Mikroskopische Aufnahme, (B) entsprechend selektiertes GAD-ir Nervenfasern (C/D) Kontrollhirn: (C) Mikroskopische Aufnahme, (D) entsprechend selektiertes GAD-ir Nervenfasern

*Anmerkungen:* Beide Aufnahmen stammen aus der Region MD, die abgebildeten Messbalken entsprechen 100µm.

*Abkürzungen:* MD – mediodorsaler Thalamus.

## 3.2 Quantitative Auswertung der GAD-ir Nervenfasern

### 3.2.1 Vergleich der Diagnosegruppen

Die LMM-Analyse zeigte einen signifikanten Unterschied der GAD-ir Nervenfasern zwischen Schizophrenie-Patienten und Kontrollen (LMM:  $F(1,194) = 14,278$ ,  $p = 0,001$ ; Tab.7, Abb. 7). Ein signifikanter Unterschied zwischen linker und rechter Hemisphäre konnte nicht nachgewiesen werden (LMM:  $F(1,194) = 1,083$ ,  $p = 0,299$ ; Tab. 7).

Die Interaktion zwischen den Haupteffekten „Diagnose“ und „Region“ zeigte einen Trend in Richtung statistischer Signifikanz (LMM:  $F(4,111) = 2,267$ ,  $p = 0,067$ ; Tab. 7). Dies weist darauf hin, dass sich die GAD-ir Nervenfasern sowohl der Schizophrenie-Patienten als auch der Kontrollgruppe in den untersuchten Regionen unterschiedlich präsentieren. Die anschließend nach Regionen aufgeteilte Post-hoc-Analyse ergab in der Schizophrenie-Kohorte eine statistisch signifikant

verminderte GAD-ir Nervenfaserdichte in den Regionen STG Schicht V (LMM:  $F(1,58) = 6,802$ ,  $p = 0,012$ ; Tab. 7, Abb. 7) und MD (LMM:  $F(1,58) = 13,031$ ,  $p = 0,001$ ; Tab. 7, Abb. 7). Dadurch wurde ersichtlich, dass die verminderte GAD-ir Nervenfaserdichte der Schizophrenie-Kohorte in den Regionen STG Schicht V und MD am stärksten ausgeprägt ist. Auch in der Post-hoc-Analyse zeigte sich in keiner Region eine signifikant unterschiedliche Verteilung der Dichte GAD-ir Nervenfasern zwischen linker und rechter Hemisphäre (STG Schicht III LMM:  $F(1,47) = 3,868$ ,  $p = 0,055$ ; STG Schicht V LMM:  $F(1,58) = 1,762$ ,  $p = 0,190$ ; MD LMM  $F(1,58) = 0,003$ ,  $p = 0,957$ ; LD LMM:  $F(1,60) = 0,120$ ,  $p = 0,731$ , CA1 LMM:  $F(1,56) = 0,007$ ,  $p = 0,932$ ; DG LMM:  $F(1,58) = 0,1347$ ,  $p = 0,251$ ; Tab. 7).

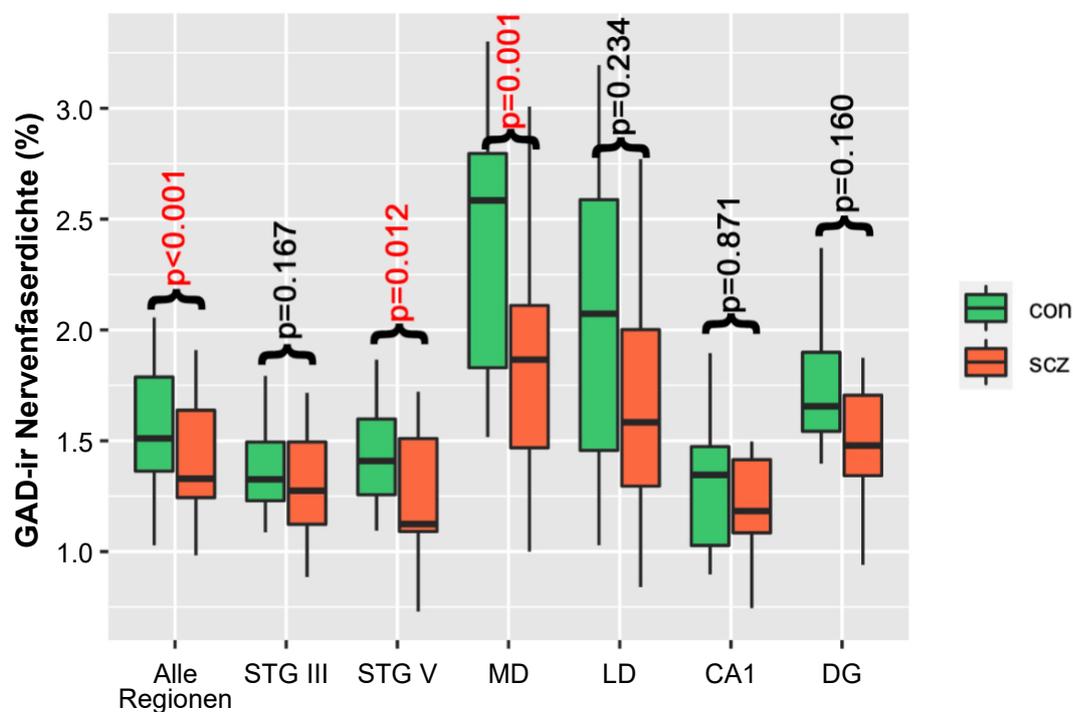


Abbildung 7: Box-Plots – GAD-ir Nervenfaserdichte der Schizophrenie-Patienten und Kontrollen

*Anmerkungen:* P-Werte wurden aus den LMM-Analysen entnommen (Tab. 7). Statistisch signifikante P-Werte ( $p < 0,05$ ) sind rot markiert. Da sich in allen untersuchten Regionen keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Hemisphären ergaben (siehe Tab. 7), wurden für die Erstellung der Box-Plots der Mittelwert zwischen linker und rechter Hemisphäre verwendet. Modifiziert nach Förster, Model et al. (2022) (149).

*Abkürzungen:* CA1 – CA1- Region des Hippocampus, DG – Gyrus dentatus, LD – laterodorsaler Thalamus, MD – mediodorsaler Thalamus, scz – Schizophrenie-Kohorte, STG III – Gyrus temporalis superior Schicht III, STG V – Gyrus temporalis superior Schicht V.

Tabelle 7: Vergleich GAD-ir Nervenfaserdichte zwischen den Diagnosegruppen

Analyse	Diagnose	GAD-Nervenfaserdichte [%]		Region	Haupteffekte und Interaktionen	p-Wert
		Median (q1; q3; n)				
Finale LMM-Analyse	scz	1,329 (1,237; 1,669; 16)		<b>Alle Regionen</b>	Region	<b>&lt;0,001*</b>
	con	1,511 (1,301; 1,838; 16)			Diagnose	<b>&lt;0,001*</b>
					Hemisphäre	0,299
					Region x Diagnose	<b>0,067</b>
					Region x Hemisphäre	0,725
					Diagnose x Hemisphäre	0,741
					Region x Hemisphäre x Diagnose	0,891
Post-hoc-LMM-Analyse <sup>a</sup>	scz	1,274 (1,120; 1,501; 16)		<b>STG III</b>	Diagnose	0,167
	con	1,326 (1,224; 1,508; 15)				
	scz	1,124 (1,085; 1,519; 16)		<b>STG V</b>	Diagnose	<b>0,012*</b>
	con	1,409 (1,238; 1,615; 15)				
	scz	1,866 (1,345; 2,138; 16)		<b>MD</b>	Diagnose	<b>0,001*</b>
	con	2,584 (1,729; 2,855; 15)				
	scz	1,583 (1,261; 2,057; 16)		<b>LD</b>	Diagnose	0,234
	con	2,073 (1,729; 2,673; 16)				
	scz	1,183 (1,055; 1,452; 16)		<b>CA1</b>	Diagnose	0,871
	con	1,346 (1,334; 1,494; 15)				
	scz	1,478 (1,330; 1,721; 16)		<b>DG</b>	Diagnose	0,160
	con	1,656 (1,504; 1,958; 16)				

*Anmerkungen:* Signifikante P-Werte sind mit einem Sternchen markiert (\*p < 0,05). P-Werte mit Trend in Richtung statistischer Signifikanz (p < 0,1) sind fett markiert.

*Abkürzungen:* CA1 – CA1- Region des Hippocampus, con – Kontrollgruppe, DG – Gyrus dentatus, LD – laterodorsaler Thalamus, MD – mediodorsaler Thalamus, n – Anzahl, scz – Schizophrenie-Kohorte, STG III – Gyrus temporalis superior Schicht III, STG V – Gyrus temporalis superior Schicht V, q1 und q3 – unteres und oberes Quartil.

<sup>a</sup> beinhaltet zusätzlich den Haupteffekt Hemisphäre und die Interaktion Diagnose x Hemisphäre, vollständige Tabelle im Anhang (Tab. A3).

### 3.2.2 Vergleich der diagnostischen Subgruppen

Über alle Hirnregionen hinweg war die prozentuale Fläche GAD-ir Nervenfasern in der residualen Subgruppe im Median mit 1,528 % (unteres und oberes Quartil: 1,207; 1,598; Tab. 8) höher als in der paranoiden Subgruppe mit 1,312 % (unteres und oberes Quartil: 1,195; 1,917; Tab. 8). In der LMM-Analyse war dieser Unterschied jedoch nicht statistisch signifikant (LMM:  $F(1,93) = 0,815$ ,  $p = 0,369$ ; Tab. 8; Abb. 8).<sup>#</sup> In dieser Analyse wurden neben den Haupteffekten „Hemisphäre“, „Region“ und „Subgruppe“, die im Kapitel 3.2.3 identifizierten konfundierenden Variablen „Krankheitsdauer“, „Alter“ und „Antipsychotika-Dosis“ berücksichtigt. Auch in der LMM-Subgruppenanalyse zeigte sich kein signifikanter hemisphärenspezifischer Effekt der GAD-ir Nervenfaserdichte (LMM:  $F(1,45) = 0,704$ ,  $p = 0,406$ ; Tab. 8).

<sup>#</sup>Da dieser Eingangstest über alle Regionen hinweg nicht signifikant war, ist eine Post-hoc-Analyse *nicht* indiziert (siehe 2.6 Statistische Datenanalyse). Eine trotzdem interessehalber durchgeführte Berechnung ergab, dass der Fokus der im Median verminderten GAD-ir Nervenfaserdichte in den Regionen MD (LMM:  $F(1,19) = 6,531$ ,  $p = 0,004$ ) und DG (LMM:  $F(1,10) = 12,299$ ,  $p = 0,009$ ) lag. Da ein Alpha-Fehler nicht ausgeschlossen werden kann, wurden diese p-Werte *nicht* in die Boxplot-Darstellung aufgenommen.

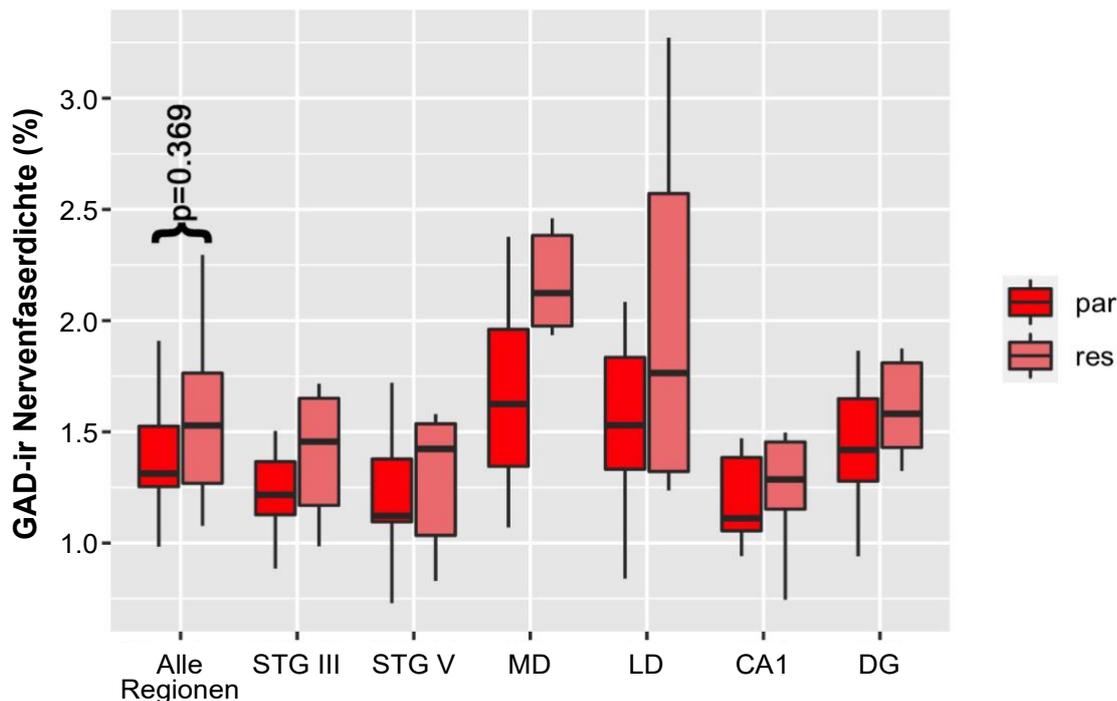


Abbildung 8: Box-Plots – GAD-ir Nervenfaserdichte der paranoiden und der residualen Subgruppe

*Anmerkungen:* P-Werte wurden aus den LMM-Analysen entnommen. Statistisch signifikante P-Werte ( $p < 0,05$ ) sind rot markiert. Da sich in der LMM-Analyse keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Hemisphären ergab (siehe Tab. 8), wurden für die Erstellung der Box-Plots der Mittelwert zwischen linker und rechter Hemisphäre gebildet. Modifiziert nach Förster, Model et al. (2022) (149).

*Abkürzungen:* CA1 – CA1- Region des Hippocampus, DG – Gyrus dentatus, LD – laterodorsaler Thalamus, MD – mediodorsaler Thalamus, scz – Schizophrenie-Kohorte, STG III – Gyrus temporalis superior Schicht III, STG V – Gyrus temporalis superior Schicht V.

### 3.2.3 Einfluss konfundierender Variablen

#### a) Spearman-Korrelationen und U-Test

Eine höhere Antipsychotika-Dosis tendiert mit steigender GAD-ir Nervenfasern zu korrelieren ( $r_s = 0,771$ ,  $p = 0,072$ ; Tab. 9). Keine Korrelation zwischen den potenziell konfundierenden Variablen (Alter, Autolysedauer, Fixationszeit, Hirngewicht, Krankheitsdauer und Antipsychotika-Dosis) und der GAD-ir Nervenfasern erreichte das Signifikanzniveau ( $p < 0,05$ ). Eine unterschiedliche Verteilung der GAD-ir Nervenfasern in der Schizophrenie-Kohorte konnte nicht mit der Einnahme von Benzodiazepinen ( $U = 7,000$ ,  $p = 0,286$ ; Tab. 9) oder dem Geschlecht ( $U = 24,000$ ,  $p = 0,427$ ; Tab. 9) in Verbindung gebracht werden.

Tabelle 8: Vergleich GAD-ir Nervenfaserdichte zwischen den diagnostischen Subgruppen

Analyse	Diagnose	GAD-ir	Nervenfaserdichte	Haupteffekte und Interaktionen	p-Wert
		[%]			
		Median (q1; q3; n)			
Probatorische LMM-Analysen <sup>a</sup>	par	1,312 (1,207; 1,598; 10)		Alter [Jahre]	0,286
	res	1,528 (1,195; 1,917; 6)		Subgruppe*Alter [Jahre]	<b>0,034*</b>
				Krankheitsdauer [Jahre]	<b>0,004*</b>
				Subgruppe x Krankheitsdauer	<b>0,002*</b>
				CPZ [mg]	<b>&lt;0,001*</b>
			Subgruppe x CPZ [mg]	<b>&lt;0,001*</b>	
Finale LMM-Analyse <sup>b</sup>	par	1,312 (1,207; 1,598; 10)		Region	<b>&lt;0,001*</b>
	res	1,528 (1,195; 1,917; 6)		Subgruppe	0,369
				Hemisphäre	0,406
				Alter [Jahre]	0,315
				CPZ [mg]	<b>&lt;0,001*</b>
				Krankheitsdauer [Jahre]	<b>&lt;0,001*</b>
				Subgruppe x Region	0,260
				Subgruppe x Hemisphäre	0,836
				Subgruppe x Alter [Jahre]	<b>0,005*</b>
				Subgruppe x CPZ [mg]	<b>&lt;0,001*</b>
			Subgruppe x Krankheitsdauer	<b>0,009*</b>	

*Anmerkungen:* Signifikante P-Werte sind mit einem Sternchen markiert (\*p < 0,05). P-Werte mit Trend in Richtung statistischer Signifikanz (p < 0,1) sind fett markiert.

*Abkürzungen:* CPZ – mittlere Tagesdosis der antipsychotischen Medikation in den letzten 90 Tagen vor dem Tod umgerechnet in Chlorpromazin-Äquivalente, mg – Milligramm, n – Anzahl, par – paranoide Kohorte, res – residuale Kohorte, q1 und q3 – unteres und oberes Quartil.

<sup>a</sup> Identifizierte konfundierende Variablen aus den probatorischen LMM-Analysen, vollständige probatorische LMM-Analysen im Anhang (Tab. A4).

<sup>b</sup> Beinhaltet zusätzlich die Interaktionen: Region x Hemisphäre, Region x Subgruppe x Hemisphäre, vollständige Tabelle im Anhang (Tab. A4).

## b) LMM-Analysen

In den probatorischen LMM zeigten sich signifikante Effekte der konfundierenden Variablen Krankheitsdauer (LMM:  $F(1,125) = 8,521$ ,  $p = 0,004$ , Tab. 8) und Antipsychotika-Dosis (LMM:  $F(1,76) = 20,485$ ,  $p = < 0,001$ , Tab. 8). Darüber hinaus konnten signifikante Interaktionen zwischen den diagnostischen Subgruppen und den konfundierenden Variablen Alter (LMM:  $F(1,118) = 4,584$ ,  $p = 0,034$ ; Tab. 8), Krankheitsdauer (LMM:  $F(1,125) = 10,535$ ,  $p = 0,002$ ; Tab. 8) und Antipsychotika-Dosis (LMM:  $F(1,76) = 20,485$ ,  $p < 0,001$ ; Tab. 8) nachgewiesen werden. Aus diesem Grund wurden diese drei Variablen in der finalen LMM-Analyse der Subgruppen berücksichtigt (Tab.8).

Tabelle 9: Spearman-Korrelationen - Einfluss potenziell konfundierender Variablen

	Geschlecht (w,m)	Alter [Jahre]	Autolyse- dauer [h]	Fixations- zeit [t]	Benzo- diazepine (ja, nein)	Hirn- gewicht [g]	Krankheits- dauer [Jahre]	CPZ [mg]
Test	U-Test	Spearman	Spearman	Spearman	U-Test	Spearman	Spearman	Spearman
scz, alle (n=16)	U=24,000 p=0,427	$r_s=0,029$ p=0,914	$r_s=0,029$ p=0,916	$r_s=-0,032$ p=0,909	U=7,000 p=0,286	$r_s=-0,091$ p=0,778	$r_s=-0,217$ p=0,420	$r_s=0,102$ p=0,753
par (n=10)	U=9,000 p=0,465	$r_s=0,116$ p=0,751	$r_s=-0,228$ p=0,526	$r_s=0,517$ p=0,154	-	$r_s=-0,162$ p=0,728	$r_s=-0,328$ p=0,354	$r_s=-0,667$ p=0,148
res (n=6)	U=4,000 p=1,000	$r_s=0,143$ p=0,787	$r_s=0,393$ p=0,441	$r_s=-0,580$ p=0,228	-	$r_s=-0,154$ p=0,805	$r_s=-0,600$ p=0,208	$r_s=0,771$ p= <b>0,072</b>
con (n=16)	U=31,000 p=0,958	$r_s=-0,366$ p=0,163	$r_s=0,160$ p=0,555	$r_s=0,262$ p=0,327	-	$r_s=-0,078$ p=0,774	-	-
alle Fälle (n=32)	U=105,000 p=0,425	$r_s=-0,140$ p=0,446	$r_s=0,085$ p=0,642	$r_s=0,071$ p=0,704	-	$r_s=-0,71$ p=0,719	-	-

Anmerkungen: P-Werte mit Trend in Richtung statistischer Signifikanz ( $p < 0,1$ ) sind fett markiert.

Abkürzungen: con – Kontrollgruppe, CPZ – mittlere Tagesdosis der antipsychotischen Medikation in den letzten 90 Tagen vor dem Tod umgerechnet in Chlorpromazin-Äquivalente, h – Stunden, mg – Milligramm, n – Anzahl, par – paranoide Kohorte, res – residuale Kohorte, U – Test – Mann-Whitney-U-Test,  $r_s$  – Korrelationskoeffizient nach Spearman, scz – Schizophrenie-Kohorte, t – Tage.

### 3.2.4 Statistisches Verhältnis von GAD-ir Nervenfasern und GAD-ir Zellen zueinander

#### 3.2.4.1 Diagnosegruppen

Die supplementäre LMM-Analyse ergab eine Interaktion mit Trend in Richtung statistischer Signifikanz zwischen den beiden GAD-ir Messungen (Zell- versus Nervenfaserdichte) und der Diagnose (GAD-ir Parameter x Diagnose:  $F(1,185) = 3,691$ ,  $p = 0,056$ ; Tab. 10). Dies weist darauf hin, dass sich die Interaktion der GAD-ir Nervenfaser- und GAD-ir Zelldichte zwischen der Schizophrenie-Kohorte und der Kontrollgruppe unterscheidet. Diese diagnoseabhängige Interaktion der beiden GAD-ir Parameter, erweitert mit „Region“ zu einer Drei-Wege-Interaktion, erreichte das Signifikanzniveau (GAD-Parameter x Diagnose x Region:  $F(8,103) = 51,217$ ,  $p < 0,001$ ; Tab. 10). Dies bedeutet wiederum, dass sich die diagnoseabhängige unterschiedliche Interaktion zwischen den GAD-ir Nervenfaser- und den GAD-ir Zelldichte in den untersuchten Regionen ungleich präsentiert. Wie in Abb. 9 ersichtlich, zeigen die Spearman-Korrelationen in der Kontrollgruppe in allen Regionen einen stärkeren positiven Zusammenhang zwischen den GAD-ir Nervenfaser- und den GAD-ir Zelldichte im Vergleich zur Schizophrenie-Kohorte. (CAVE: Nach der Regressionsgeraden scheint der Zusammenhang in CA1 in der Kontrollgruppe nicht stärker zu sein. Bei Betrachtung

der Korrelationskoeffizienten (Kontrollgruppe:  $r_s = 0,593$ ,  $p = 0,020$ ; Schizophrenie-Kohorte:  $r_s = 0,324$ ,  $p = 0,222$ ; Tab. 10, Abb. 9E) wird jedoch ersichtlich, dass auch hier die Korrelation zwischen den GAD-ir Nervenfasern- und den GAD-ir Zelldichte in der Kontrollgruppe stärker ist. Dies ist auf die grafische Darstellung mittels Regressionsgerade - Summe der Abweichungsquadrate möglichst klein - zurückzuführen, die kein exaktes Korrelat zum Korrelationskoeffizienten nach Spearman darstellt.)

Ein stärkerer positiver Zusammenhang bedeutet, dass in der Kontrollgruppe mehr GAD-ir Zellen auch mit entsprechend mehr GAD-ir Nervenfasern einhergehen. Dieser Zusammenhang ist in der Schizophrenie-Kohorte weniger ausgeprägt vorhanden. Mit anderen Worten präsentiert sich das Verhältnis von GAD-ir Nervenfasern und GAD-ir Zellen in der Schizophrenie-Kohorte ungleichmäßig. Wie auch in Abb. 9B ersichtlich, zeigt die Schizophrenie-Kohorte im STG V sogar einen inversen Zusammenhang zwischen den beiden GAD-ir Parametern ( $r_s = -0,350$ ,  $p = 0,184$ , Abb.10B). Anzumerken ist, dass nur die positiven Korrelationskoeffizienten der Kontrollgruppe im MD ( $r_s = 0,807$ ,  $p < 0,001$ ; Tab. 10, Abb. 9) und in CA1 ( $r_s = 0,593$ ,  $p = 0,020$ ; Tab. 10, Abb. 9) das Signifikanzniveau erreichen.

Tabelle 10: statistisches Verhältnis von GAD-ir Nervenfasern und GAD-ir Zellen zueinander - Diagnosegruppen

Analyse	Region	Diagnose	Haupteffekte und Interaktionen (LMM-Analyse)	P-Wert
Spearman-Korrelationen $r_s$				
LMM- Analyse <sup>a</sup>	<b>Alle Regionen</b>	scz	Region	<b>&lt;0,001*</b>
		con	Diagnose	<b>0,023*</b>
			GAD-ir Parameter x Diagnose	<b>0,056</b>
			GAD-ir Parameter x Diagnose x Region	<b>&lt;0,001*</b>
Spearman- Korrelationen [ $r_s$ GAD-ir Nerven- faser-/Zelldichte]	<b>STG III</b>	scz	$r_s=0,003$	0,991
		con	$r_s=0,264$	0,341
	<b>STG V</b>	scz	$r_s=-0,350$ (I)	0,184
		con	$r_s=0,068$	0,810
	<b>MD</b>	scz	$r_s=0,465$	<b>0,070</b>
		con	$r_s=0,807$	<b>&lt;0,001*</b>
	<b>LD</b>	scz	$r_s=0,124$	0,649
		con	$r_s=0,412$	0,113
	<b>CA1</b>	scz	$r_s=0,324$	0,222
		con	$r_s=0,593$	<b>0,020*</b>
	<b>DG</b>	scz	$r_s=0,111$	0,684
		con	$r_s=0,390$	0,136

*Anmerkungen:* Signifikante P-Werte sind mit einem Sternchen markiert (\* $p < 0,05$ ). P-Werte mit Trend in Richtung statistischer Signifikanz ( $p < 0,1$ ) sind fett markiert. Inverse Korrelationen sind mit einem (I) markiert.

*Abkürzungen:* CA1 - CA1- Region des Hippocampus, con - Kontrollgruppe, DG - Gyrus dentatus, LD - laterodorsaler Thalamus, MD - mediodorsaler Thalamus, par - paranoide Kohorte, res - residuale Kohorte,  $r_s$  - Korrelationskoeffizient nach Spearman, scz - Schizophrenie-Kohorte, STG III - Gyrus temporalis superior Schicht III, STG V - Gyrus temporalis superior Schicht V.

<sup>a</sup> beinhaltet zusätzlich die Haupteffekte und Interaktionen: Region, Diagnose, Hemisphäre, GAD-ir Parameter, Region x Diagnose, Region x Hemisphäre, Diagnose x Hemisphäre, GAD-ir Parameter x Diagnose, Region x Diagnose x Hemisphäre, GAD-ir Parameter x Diagnose x Region, vollständige Tabelle im Anhang (siehe Tab. A5).

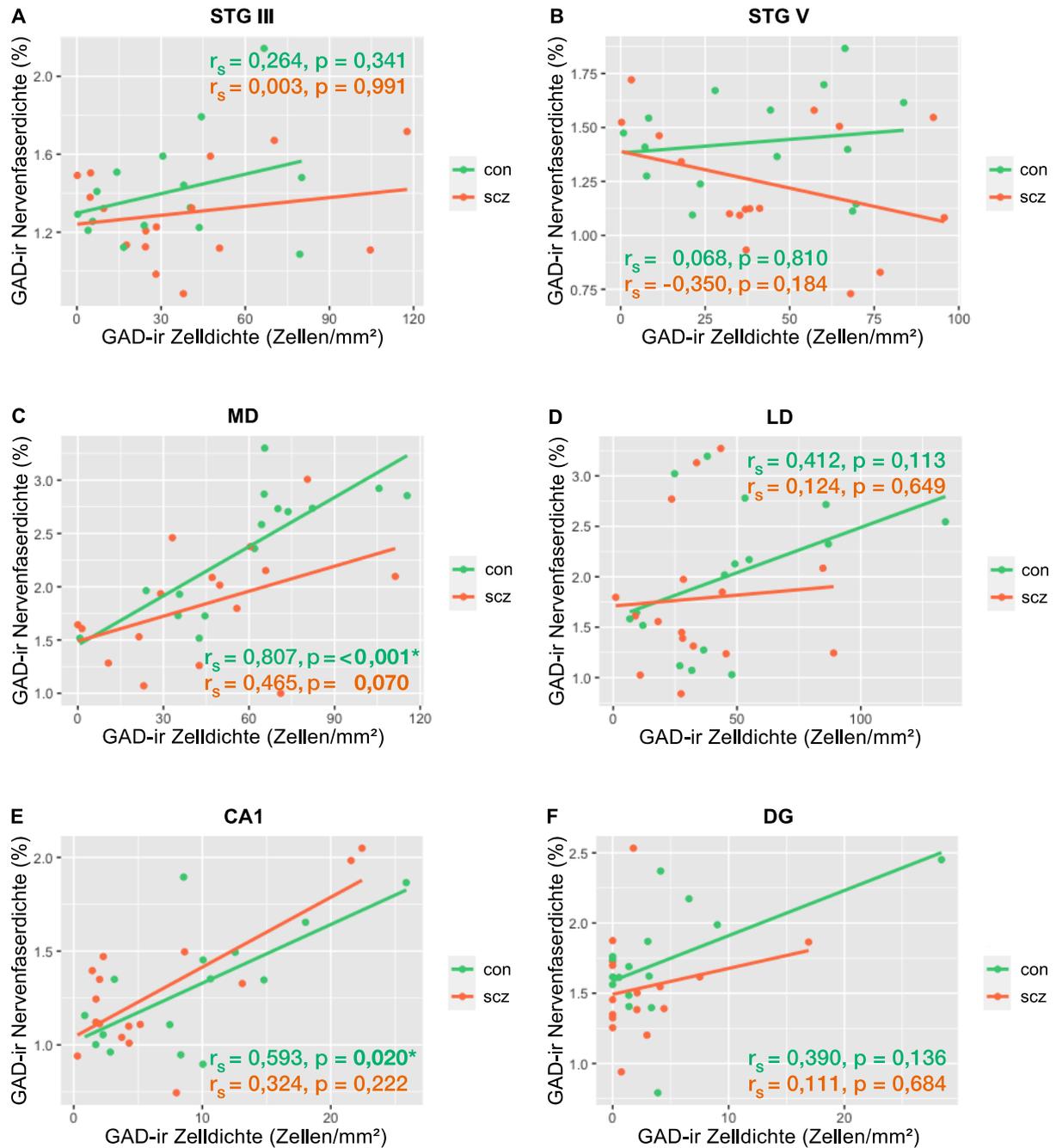


Abbildung 9: GAD-ir Nervenfaser-Zell-Korrelationen (Getrennte Darstellung nach Diagnosegruppen)

*Anmerkungen:* Signifikante P-Werte sind mit einem Sternchen markiert (\* $p < 0,05$ ). Regressionsgerade: Summe der Abweichungsquadrate möglichst klein.

*Abkürzungen:* CA1 – CA1-Region des Hippocampus, con – Kontrollgruppe, DG – Gyrus dentatus, LD – laterodorsaler Thalamus, MD – mediodorsaler Thalamus,  $r_s$  – Korrelationskoeffizient nach Spearman, scz – Schizophrenie-Kohorte, STG III – Gyrus temporalis superior Schicht III, STG V – Gyrus temporalis superior Schicht V

### 3.2.4.2 Diagnostische Subgruppen

In der supplementären LMM-Analyse zeigte sich eine statistisch signifikante Interaktion zwischen den GAD-ir Messungen (Zell- versus Nervenfaserdichte) und den diagnostischen Subgruppen (GAD-ir Parameter x Diagnose:  $F(1,75) = 6,875$ ,  $p = 0,011$ ; Tab. 11), sowie auch ein signifikanter subgruppenabhängiger Effekt (Subgruppe:  $F(1,82) = 5,402$ ,  $p = 0,023$ ; Tab. 11). Somit ergibt sich auch für die Subgruppenanalyse eine subgruppenabhängige unterschiedliche Interaktion der GAD-ir Nervenfaser- und GAD-ir Zelldichte. Diese Interaktion ergänzt mit „Region“ zu einer Drei-Wege-Interaktion erreicht ebenfalls das Signifikanzniveau (GAD-ir Parameter x Diagnose x Region:  $F(8,41) = 27,507$ ,  $p < 0,001$ ). Letztere zeigt eine hirnregionen- und subgruppenspezifisch unterschiedliche Interaktion der GAD-ir Parameter auf. Die Spearman-Korrelationen der paranoiden Kohorte ergaben in den Regionen STG Schicht III und V jeweils einen signifikanten inversen Zusammenhang (STG III:  $r_s = -0,648$ ,  $p = 0,043^*$ ; STG V:  $r_s = -0,745$ ,  $p = 0,013^*$ ; Tab. 11, Abb. 10). Das bedeutet, dass hier höhere GAD-ir Nervenfasern- mit geringeren GAD-ir Zelldichten korrelieren. Eine weitere, jedoch nicht signifikante inverse Korrelation zwischen GAD-ir Nervenfaser- und GAD-ir Zelldichte liegt in der residualen Kohorte im LD vor (LD:  $r_s = -0,029$ ,  $p = 0,957$ ; Tab. 11, Abb. 10).

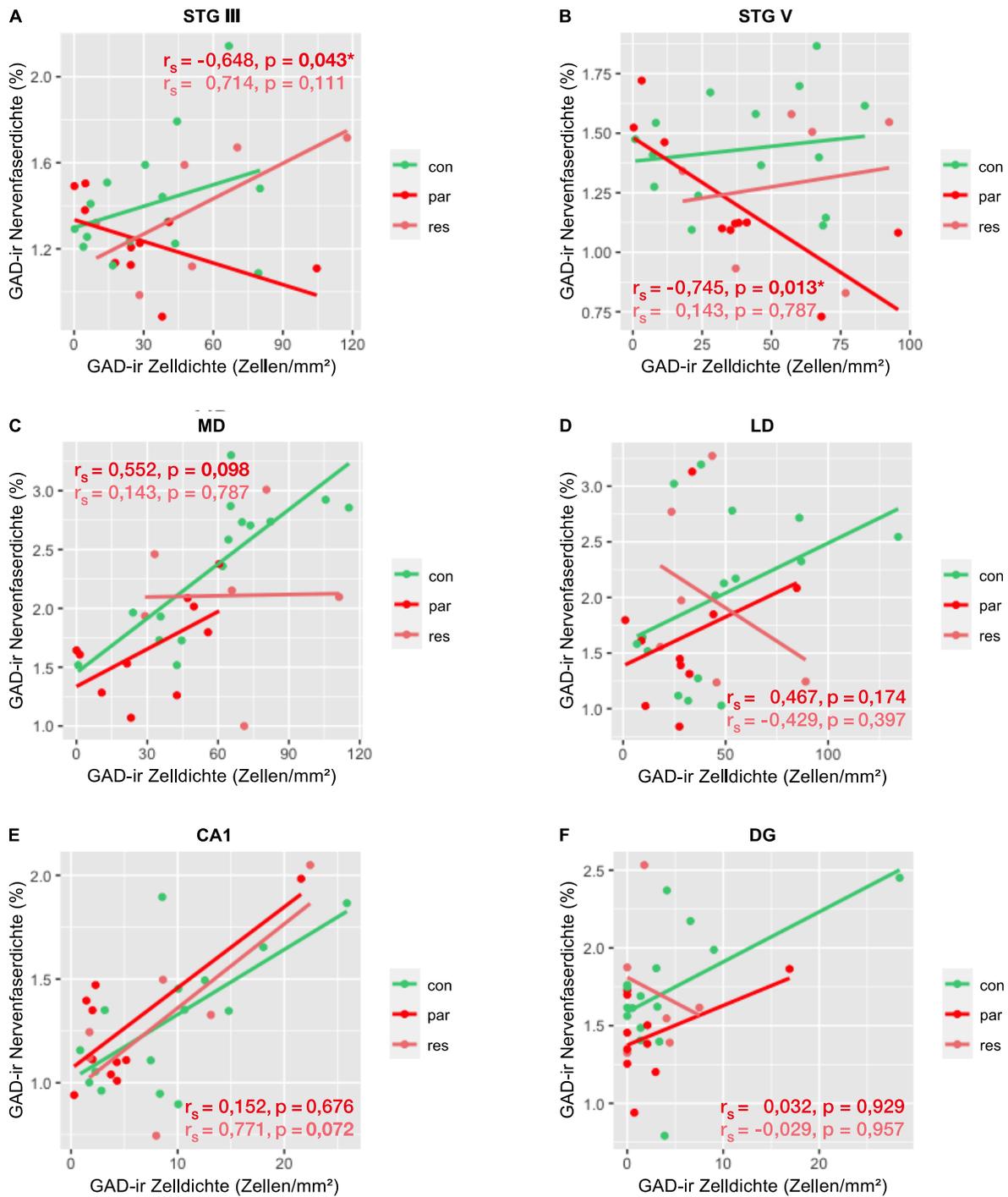


Abbildung 10: GAD-ir Nervenfaser-Zell-Korrelationen (Getrennte Darstellung nach diagnostischen Subgruppen)

Anmerkungen: Signifikante P-Werte sind mit einem Sternchen markiert (\* $p < 0,05$ ). Regressionsgerade: Summe der Abweichungsquadrate möglichst klein.

Abkürzungen: CA1 – CA1-Region des Hippocampus, con – Kontrollgruppe, DG – Gyrus dentatus, LD – laterodorsaler Thalamus, MD – mediodorsaler Thalamus, par – paranoide Kohorte, res – residuale Kohorte,  $r_s$  – Korrelationskoeffizient nach Spearman, STG III – Gyrus temporalis superior Schicht III, STG V – Gyrus temporalis superior Schicht V.

Tabelle 11: statistisches Verhältnis von GAD-ir Nervenfasern und GAD-ir Zellen zueinander – diagnostische Subgruppen

Analyse	Region	Diagnose	Interaktionen (LMM-Analyse) Spearman-Korrelationen $r_s$	P-Wert
LMM-Analyse <sup>a</sup>	<b>Alle Regionen</b>	par	Region	<b>&lt;0,001*</b>
		res	Subgruppe	<b>0,023*</b>
			GAD-ir Parameter x Subgruppe	<b>0,011*</b>
			GAD-ir Parameter x Subgruppe x Region	<b>&lt;0,001*</b>
Spearman-Korrelationen [ $r_s$ GAD-ir Nervenfasern-/Zelldichte]	<b>STG III</b>	par	$r_s = -0,648$ (I)	<b>0,043*</b>
		res	$r_s = 0,714$	0,111
	<b>STG V</b>	par	$r_s = -0,745$ (I)	<b>0,013*</b>
		res	$r_s = 0,143$	0,787
	<b>MD</b>	par	$r_s = 0,552$	<b>0,098</b>
		res	$r_s = 0,143$	0,787
	<b>LD</b>	par	$r_s = 0,467$	0,174
		res	$r_s = -0,429$ (I)	0,397
	<b>CA1</b>	par	$r_s = 0,152$	0,676
		res	$r_s = 0,771$	<b>0,072</b>
	<b>DG</b>	par	$r_s = 0,032$	0,929
		res	$r_s = -0,029$ (I)	0,957

*Anmerkungen:* Signifikante P-Werte sind mit einem Sternchen markiert (\* $p < 0,05$ ). P-Werte mit Trend in Richtung statistischer Signifikanz ( $p < 0,1$ ) sind fett markiert. Inverse Korrelationen sind mit einem (I) markiert.

*Abkürzungen:* CA1 – CA1-Region des Hippocampus, con – Kontrollgruppe, CPZ – mittlere Tagesdosis der antipsychotischen Medikation in den letzten 90 Tagen vor dem Tod umgerechnet in Chlorpromazin-Äquivalente, DG – Gyrus dentatus, LD – laterodorsaler Thalamus, MD – mediodorsaler Thalamus, par – paranoide Kohorte, res – residuale Kohorte,  $r_s$  – Korrelationskoeffizient nach Spearman, STG III – Gyrus temporalis superior Schicht III, STG V – Gyrus temporalis superior Schicht V.

<sup>a</sup> beinhaltet die Haupteffekte und Interaktionen: Region, Subgruppe, Hemisphäre, GAD-ir Parameter, Alter [Jahre], CPZ [mg], Krankheitsdauer [Jahre], Region x Subgruppe, Region x Hemisphäre, Subgruppe x Hemisphäre, Alter [Jahre] x Subgruppe, CPZ [mg] x Subgruppe, Krankheitsdauer [Jahre] x Subgruppe, GAD-ir Parameter x Subgruppe, Region x Subgruppe x Hemisphäre, GAD-ir Parameter x Subgruppe x Region, vollständige Tabelle im Anhang (Tab. A6).

### 3.2.5 Validität der automatisierten Messung

Für die 100 Aufnahmen, die zusätzlich mit der etablierten, manuellen, softwaregestützten Referenzmethode (1, 70, 159) ausgewertet wurden, beträgt der Konkordanz-Korrelationskoeffizient  $r_c = 0,984$  (95%-Konfidenzintervall: 0,976; 0,989). Dies spricht für eine sehr gute Vergleichbarkeit zwischen der neuen, automatisierten und der manuellen, softwaregestützten Methode (163). Zur grafischen Illustration des Methodenvergleichs wurden ein Streudiagramm und ein Bland-Altman-Plot erstellt (Abb. 11) (164, 165).

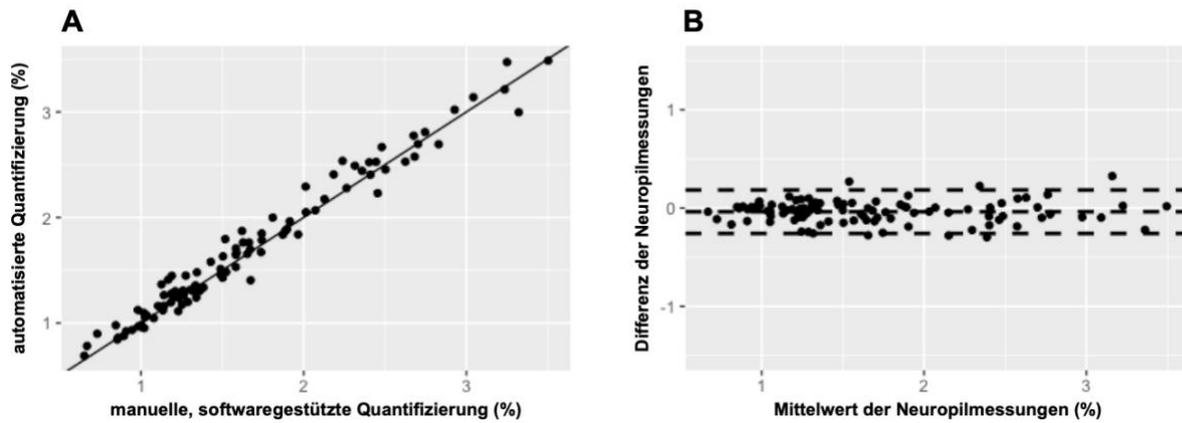


Abbildung 11: Validität der automatisierten Messung

Anmerkungen: Modifiziert nach Förster, Model et al. (2022) (149).

- (A) Streudiagramm zur grafischen Darstellung des Methodenvergleichs zwischen der neuen, automatisierten und der manuellen, softwaregestützten Quantifizierungsmethode, evaluiert für 100 Aufnahmen. Konkordanz-Korrelationskoeffizient nach Lin  $r_c = 0,984$  (95%-Konfidenzintervall: 0,976; 0,989).
- (B) Bland-Altman-Plot zur grafischen Darstellung des Methodenvergleichs zwischen der neuen, automatisierten und der manuellen, softwaregestützten Quantifizierungsmethode, evaluiert für 100 Aufnahmen (im Durchschnitt -0,038 Prozentpunkte pro Aufnahme (95%-Konfidenzintervall: -0,259; 0,184 Prozentpunkte).

## 4 Diskussion

### 4.1 Auswertung der Diagnosegruppen und regionale Unterschiede

Eine Abweichung im GABAergen System kann zu einer Dysbalance zwischen erregenden und hemmenden Signalen führen. Wie in der Einleitung erläutert, kann dies nach aktuellem Forschungsstand die Ursache für Störungen der neuronalen Synchronität sein (52–54) und damit insbesondere zu veränderten Gamma-Oszillationen beitragen (58–61). Als Folge kann die Funktionsweise neuronaler Netzwerke beeinträchtigt sein (39, 52, 65, 66) und sich die Konnektivität zwischen Hirnarealen verändern (38, 40, 166, 167). Dementsprechend kann eine Abweichung im GABAergen System eine präzise, einwandfreie Informationsübertragung und -verarbeitung beeinträchtigen und in vielfältiger Weise zur Entstehung schizophrener Symptome beitragen (62, 65, 67, 69).

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, mittels einer neuen, automatisierten, untersucherunabhängigen Quantifizierungsmethode die Dichte GAD-ir Nervenfasern in insgesamt sechs für die Schizophrenie bedeutsamen Hirnregionen zu untersuchen und damit die Ergebnisse vorangegangener Studien zu überprüfen und zu erweitern. Im Ergebnis zeigten sich eine signifikant reduzierte GAD-ir Nervenfaserdichte in allen untersuchten Hirnregionen bei Schizophrenie, wodurch die Ergebnisse der Vorgängerstudie von Steiner et al. (2016) weitgehend bestätigt werden konnten (1). Auch in der erstmals untersuchten Hirnregion MD zeigten sich eine reduzierte GAD-ir Nervenfaserdichte. Somit weisen die Ergebnisse dieser Studie auf eine generell reduzierte GABAerge Neurotransmission bei Schizophrenie hin. Die hier beobachtete verminderte GAD-ir Nervenfaserdichte kann korrespondierend zu den zahlreichen post-mortem Studien betrachtet werden, die über eine Reduktion der GAD67 mRNA Expression bei Schizophrenie berichten (33, 75, 98, 102, 103).

In der Schizophrenie-Kohorte ließ sich die am stärksten ausgeprägte Reduktion der GAD-ir Nervenfaserdichte in der Schicht V des STG und im MD feststellen. Dies deutet auf eine hirnregional unterschiedliche Bedeutung des dysfunktionalen GABAergen Systems in der Genese der Schizophrenie hin. In den folgenden Abschnitten werden diese regional unterschiedlichen Ausprägungsmuster und ihre potenzielle Bedeutung im pathogenetischen Kontext der Schizophrenie ausführlich diskutiert.

**STG:** Die in dieser Arbeit festgestellte ausgeprägte Reduktion der GAD-ir Nervenfaserdichte in der Schicht V steht im Einklang mit weiteren post-mortem Studien, die auf ein hypofunktionelles GABAerges System im STG hinweisen (75, 114). Die Schicht V des STG ist der Ursprung zahlreicher Projektionsneurone zwischen dem STG und dem präfrontalen Kortex (168). Folglich könnte die hier beobachtete reduzierte GAD-ir Nervenfaserdichte eine Ursache für veränderte neuronale Verbindungen zwischen dem STG und dem präfrontalen Kortex sein. In diversen Berichten wurde eine aberrante frontotemporale Konnektivität mit akustischen Halluzinationen in Verbindung gebracht (41, 43, 167, 168). Neben einer aberranten frontotemporalen Konnektivität wurden in früheren Berichten auch dysfunktionale Gamma-Oszillationen (57) und eine veränderte neuronale Verschaltung zwischen dem linken und rechten STG bei der Entstehung akustischer Halluzinationen diskutiert (166).

Zudem konnten wir in dieser Arbeit in der paranoiden Kohorte eine inverse GAD-ir Nervenfaserver-Zell-Korrelation im STG beobachten. Diese inverse GAD-ir Nervenfaserver-Zell-Korrelation kann zusätzlich als Korrelat einer dysfunktionalen GABAergen Neurotransmission betrachtet werden. Geht man davon aus, dass akustische Halluzinationen u.a. im STG entstehen, könnte dies die im Vordergrund stehende Symptomatik der paranoiden Subgruppe erklären. Während akustischer Halluzinationen konnte in einer bildgebenden Studie ein hyperaktiver STG beobachtet werden (117). Insgesamt unterstützen die Ergebnisse dieser Studie die Hypothese, dass die beobachtete Hyperaktivität des STG während auditorischer Halluzinationen (117) mit einem dysfunktionalen GABAergen System in Verbindung steht (169, 170). Dies wiederum stimmt mit einem Ungleichgewicht zwischen erregenden und hemmenden Signalen als neurobiologisches Modell für das Auftreten von Halluzinationen überein (171). Eine dysfunktionale Hemmung bzw. ein aberrantes GABAerges System konnte auch bei neurologischen Erkrankungen gefunden werden, die mit Halluzinationen einhergehen. Eine MRT-Studie beobachtete z.B. ein reduziertes Level des Neurotransmitters GABA in der primären Sehrinde bei Parkinson-Patienten mit visuellen Halluzinationen im Vergleich zur Kontrollgruppe und zu Parkinson-Patienten ohne visuelle Halluzinationen (172). Auch bei Patienten mit Lewy-Body-Demenz und visuellen Halluzinationen konnte eine reduzierte GABAerge Aktivität in der primären Sehrinde verzeichnet werden. Diese Beobachtungen unterstützen die Hypothese eines neurobiologischen Konzeptes, das sich zum Teil mit anderen Erkrankungen

überschneidet und das auf einen Zusammenhang zwischen einer Beeinträchtigung der GABAergen Neurotransmission und dem Auftreten von Halluzinationen hinweist (172).

Der linke STG ist mehr an der Sprachwahrnehmung und der rechte STG an der Verarbeitung von nonverbalen akustischen und sprachlichen Reizen beteiligt (117). Zwei hirmorphologische post-mortem Studien weisen auf eine prädominant rechtshemipärische Beteiligung des STG bei Schizophrenie hin (119, 122). Dem steht eine Studie gegenüber, die über eine Verkleinerung des linken vorderen STG bei Schizophrenie-Patienten berichtet (173). Wir konnten in der Auswertung keine hemisphärisch unterschiedliche Verteilung der GAD-ir Nervenfasern feststellen. Unsere Ergebnisse werden durch weitere hirmorphologische Studien gestützt, die eine bilaterale Beteiligung des STG nahelegen (120, 174). Bei einer angenommenen Heterogenität der Pathophysiologie stellen jedoch verschiedene prädominant links- oder rechtshemisphärische sowie bilaterale Ausprägungsmuster keinen Widerspruch dar. Darüber hinaus könnten unterschiedliche Ausprägungsmuster die heterogene Symptomatik der Schizophrenie erklären.

**Thalamus:** Die vorliegende Arbeit erbringt erstmals den Hinweis, dass das GABAerge System bei Schizophrenie auch im MD beeinträchtigt ist. Die besonders stark ausgeprägte Reduktion GAD-ir Nervenfasern im MD weist auf dessen wichtige Rolle in der Genese der Schizophrenie hin. Übereinstimmend wurde die herausragende Beteiligung des MD an der Pathophysiologie der Schizophrenie in mehreren Studien bekräftigt (125, 130, 131). Einige Studien verzeichneten eine Abnahme sowohl des Volumens als auch der Anzahl der Neuronen im MD bei Schizophrenie-Patienten (175–179). Die hier beobachteten Ergebnisse legen nahe, dass diese Volumen- und Neuronenreduktion mit der hier beobachteten ausgeprägten Reduktion der GAD-ir Nervenfasern einhergehen könnte. An dieser Stelle sei jedoch anzumerken, dass in den zitierten Berichten nicht ausschließlich GABAerge Neurone untersucht wurden.

Der MD steht über reziproke Verbindungen überwiegend mit präfrontalen Hirnarealen in Verbindung (e.g. DLPFC, ACC und OFC) (128), in denen ebenfalls ein dysfunktionales GABAerges System gefunden wurde (74, 75, 98, 105). Darüber hinaus, haben mehrere bildgebende Studien Veränderungen in den thalamokortikalen Schaltkreisen beschrieben (125, 130, 131, 180, 181). Demnach

wäre ein gemeinsam einhergehendes, dysfunktionales GABAerges System von kortikalen und thalamischen Hirnregionen denkbar (182).

Ein Großteil der GABAergen synaptischen Endigungen im MD stammt von den Neuronen des retikulären Thalamuskerns (183). Der retikuläre Thalamuskern kontrolliert den synchronisierten reziproken Informationsfluss zwischen dem MD und den präfrontalen limbischen Regionen (184, 185). Kommt es zu einer Störung dieser neuronalen Verbindung, kann dies die zirkadiane Rhythmik, das Schlafmuster sowie kognitive und emotionale Funktionen beeinträchtigen (186–188). Die hier beobachteten Ergebnisse eines gestörten GABAerge Systems im MD könnten zu diesen vielschichtigen Dysfunktionen beitragen und somit einen Erklärungsansatz diverser schizophrener Symptome darstellen (188).

**Hippocampusformation:** In dieser Arbeit zeigte sich in den regionenspezifischen Post-hoc-Tests keine signifikant reduzierte GAD-ir Nervenfaserdichte in CA1 und im DG in der Schizophrenie-Kohorte. Dies stimmt mit einer post-mortem Studie überein, die keine signifikant veränderte GAD65 und GAD67 mRNA Expression in der Pyramidenschicht der CA1-Region und im DG festgestellt hat (104). In den supplementären Analysen konnte jedoch in der Kontrollgruppe im Vergleich zur Schizophrenie-Kohorte in CA1 und im DG ein stärkerer Zusammenhang zwischen dem GAD-ir Nervenfaser- und den GAD-ir Zelldichte beobachtet werden. Mit anderen Worten: In der Kontrollgruppe gehen erhöhte GAD-ir Zellen mit entsprechend erhöhter Dichte der GAD-ir Nervenfasern einher. In der Schizophrenie-Kohorte ist dieser Zusammenhang weniger eindeutig, was auf ein Ungleichgewicht zwischen Zellkörper und axonalem Wachstum hinweist (eingehend diskutiert in Kapitel 4.4). Dies könnte als Korrelat einer beeinträchtigten GABAergen Neurotransmission im Hippocampus interpretiert werden. Eine abnorme GABAerge Neurotransmission im Hippocampus wird mit einer dopaminergen Hyperaktivität ebendort in Verbindung gebracht und bietet somit einen Erklärungsansatz für das Entstehen von Positivsymptomen (62, 134).

## **4.2 Auswertung der diagnostischen Subgruppen und konfundierenden Variablen**

Die GAD-ir Nervenfasern zeigten keine signifikant unterschiedliche Verteilung zwischen der residualen und der paranoiden Subgruppe. In den probatorischen LMM-Analysen konnte ein signifikanter Effekt der konfundierenden Variablen Krankheitsdauer und Antipsychotika-Dosis gefunden werden. Darüber hinaus zeigte sich eine signifikante Interaktion zwischen der konfundierenden Variable Alter und den diagnostischen Subgruppen. In den folgenden Abschnitten wird der Einfluss der konfundierenden Variablen Krankheitsdauer, Antipsychotika-Dosis und Alter diskutiert.

**Krankheitsdauer:** Das Untersuchungskollektiv der residualen Patienten weist eine signifikant längere Krankheitsdauer auf als die Patienten der paranoiden Kohorte. Der beobachtete signifikante Effekt der Krankheitsdauer, legt die Vermutung nahe, dass die - wenn auch nicht signifikante - erhöhte Dichte von GAD-ir Nervenfasern in der residualen Kohorte mit der längeren Krankheitsdauer dieser Subgruppe zusammenhängen könnte. Diese Hypothese wird durch zwei frühere Studien gestützt, die eine positive Korrelation zwischen der Krankheitsdauer und der GAD-ir Zelldichte (108) bzw. dem GAD65/67 Proteinlevel (116) bei Schizophrenie-Patienten zeigten. Zusammen mit den Beobachtungen dieser Studie unterstützt dies die Annahme eines defizitären GABAergen Systems mit zunehmender GABAergen Neurotransmission im Verlauf der Erkrankung (116). Diese Hypothese könnte die teilweise widersprüchlichen Befunde einer erhöhten GAD65/67 mRNA Expression bei Schizophrenie erklären: Zwei Studien, die konträr zur Hypothese einer verminderten GABAergen Neurotransmission bei Schizophrenie, über eine erhöhte GAD65/67 mRNA Expression berichten, wurden beide an einem sehr alten Schizophrenie-Untersuchungskollektiv mit sehr langer Krankheitsdauer durchgeführt (106, 107). Diese Beobachtungen müssten nicht mehr als widersprüchlich angesehen werden, wenn man von einer Zunahme der GABAergen Neurotransmission im Verlauf der Erkrankung ausgeht.

**Antipsychotika-Dosis:** In der vorliegenden Arbeit zeigte sich eine positive Korrelation mit Trend in Richtung statistischer Signifikanz zwischen den GAD-ir Nervenfasern und Antipsychotika-Dosis bei Patienten mit residualer Schizophrenie. Eine weitere post-mortem Studie berichtet, dass ein erhöhtes GAD67 Proteinlevel

in der Substantia nigra bei Patienten, die mit Antipsychotika behandelt wurden, zu verzeichnen war (109). Folglich postuliert diese Studie einen Zusammenhang zwischen erhöhtem GAD67 Proteinlevel und vorangegangener antipsychotischen Therapie (109). Demnach könnte die reduzierte GABAerge Neurotransmission bei Schizophrenie durch eine antipsychotische Therapie zumindest teilweise wieder rückgängig gemacht werden (189). Korrespondierend stellen weitere Studien einen Einfluss antipsychotischer Medikation auf das GABAerge System fest (138, 190–192). Im Gegensatz dazu, konnte in einigen Studien kein Effekt einer antipsychotischen Medikation auf die GAD67 mRNA Expression festgestellt werden (35, 102, 105). Dies könnte jedoch damit zusammenhängen, dass Dopamin-Rezeptoren im Gehirn nicht in allen Hirnregionen gleichmäßig exprimiert werden (193) und somit der Einfluss der antipsychotischen Medikation hirnregional unterschiedlich stark ist (113). Diese Annahme stützt eine Studie, die zeigte, dass Antipsychotika die GAD67 mRNA Expression in multiplen Hirnregionen unterschiedlich stark beeinflussen (194). Darüber hinaus ist es denkbar, dass die Einnahme von typischen und atypischen Antipsychotika möglicherweise unterschiedlich starke Auswirkungen auf das GABAerge System haben könnte (189, 192, 194). So könnte neben einer hirnregional unterschiedlichen Beeinflussung auch ein medikamentenspezifischer Einfluss die Inkonsistenz der Beobachtungen erklären. In der vorliegenden Arbeit haben alle Patienten typische Antipsychotika eingenommen, so dass eine diesbezügliche Beeinflussung in dieser Arbeit auszuschließen ist.

Wenn nun angenommen wird, dass eine längere Krankheitsdauer auch mit einer kumulativ höheren Dosis einhergeht, wäre es möglich, dass der Einfluss der Krankheitsdauer auf eine längere Einnahme von Antipsychotika zurückzuführen ist (189). Es lässt sich hiermit nicht abschließend klären, inwieweit die erhöhte GAD-ir Nervenfasern in der residualen Subgruppe als Folge einer längeren Krankheitsdauer zu interpretieren ist und inwieweit hier Medikationseffekte zusätzlich eine Rolle spielen. Methodenkritisch ist hier anzumerken, dass nur die tägliche Dosis der antipsychotischen Medikation in den letzten 90 Tagen vor dem Tod bekannt war, nicht aber die kumulativ erhaltene Dosis. Zudem war die tägliche Dosis bei 4 Schizophrenie-Patienten nicht bekannt.

**Alter:** Wir haben auf eine gleichmäßige Altersverteilung zwischen den Untersuchungsgruppen geachtet und konnten auch in den Korrelationsanalysen keinen signifikanten linearen Zusammenhang zwischen der konfundierenden Variable Alter und den GAD-ir Nervenfasermessungen nachweisen. In den probatorischen LMM-Analysen konnte jedoch eine signifikante Interaktion zwischen dem Alter und den diagnostischen Subgruppen festgestellt werden. Auch wurde bereits in anderen Studien der Einfluss des Alters auf das GAD-ir Nervenfaserdichte beschrieben (195) (1, 195). Geht man jedoch davon aus, dass ein höheres Alter mit einer längeren Krankheitsdauer einhergeht, könnte diese beobachtete Interaktion auch als Surrogatparameter für eine längere Krankheitsdauer betrachtet werden. Eine Studie wies darauf hin, dass die Sensitivität der GABAergen Interneurone mit zunehmendem Alter abnimmt, was wiederum zu einer altersabhängigen Beeinträchtigung der neuronalen Plastizität führen könnte. Dies könnte einen fließenden Übergang zwischen einem physiologischen Alterungsprozess, einer altersbedingten Abnahme kognitiver Fähigkeiten und einer altersbedingten psychiatrischen Erkrankung darstellen (196). Als ein Hinweis auf einen potenziell physiologischen Alterungsprozess wurde in der gemeinsamen Publikation mit AF (149) an den denselben mikroskopischen Aufnahmen eine negative Korrelation zwischen Alter und den GAD-ir Zellen im Untersuchungskollektiv der Kontrollpersonen festgestellt. In der Magdeburger Hirnbank gilt ein Alter über 66 Jahren als Ausschlusskriterium. Vaskuläre, inflammatorische, neoplastische und neurodegenerative Erkrankungen wurden in der vorliegenden Arbeit durch einen erfahrenen Neuropathologen (CM) nicht beobachtet. Dennoch kann eine Beeinflussung der Ergebnisse durch das Alter nicht mit absoluter Sicherheit ausgeschlossen werden.

### **4.3 Vergleich mit der Vorgängerstudie**

Die in dieser Studie zusätzlich untersuchte Region MD zeigte eine besonders ausgeprägte Reduktion der GAD-ir Nervenfasern, wodurch erstmals ein beeinträchtigtes GABAerges System in dieser Hirnregion nachgewiesen werden konnte. Die hier beobachtete Gesamtreduktion der GAD-ir Nervenfasern in allen Hirnregionen bei Schizophrenie steht im Einklang mit der Studie von Steiner et al. (2016) (1). Die Veränderungen unterscheiden sich jedoch geringfügig zwischen den einzelnen Hirnregionen und Subtypen. In beiden Studien zeigte sich stärker reduzierte GAD-ir Nervenfasern in der paranoiden Subgruppe, die in der

vorliegenden Arbeit im Gegensatz zur Vorgängerstudie nicht das Signifikanzniveau erreichte. Zudem fand sich in der Vorgängerstudie im Gegensatz zur vorliegenden Studie eine signifikant reduzierte GAD-ir Nervenfaserdichte in der rechten CA1-Region bei Schizophrenie-Patienten. Diese geringfügigen Unterschiede können u.a. durch eine unterschiedliche Quantifizierungsmethode erklärt werden: In der Vorgängerstudie erfolgte die Segmentierung des GAD-ir Nervenfasern durch manuelle Festlegung der unteren und oberen Schwellwertgrenze und anschließender visueller Kontrolle. In der vorliegenden Arbeit wurden die GAD-ir Nervenfasern mit einer neuen, untersucherunabhängigen, automatisierten Methode quantifiziert.

Außerdem tragen unterschiedliche mikroskopische Aufnahmen zu den beobachteten Unterschieden bei: In beiden Studien wurden die analysierten Areale nicht automatisch ausgesucht, so dass auch hier ein gewisser Bias auftreten kann. Um diesem Bias entgegenzuwirken, wurde eine kumulativ größere Fläche pro Hirnschnitt und Hirnregion analysiert. Nicht zuletzt kann auch ein leicht unterschiedliches statistisches Vorgehen für die geringfügigen Unterschiede verantwortlich sein: In dieser Studie zeigte sich in den LMM-Analysen kein Unterschied zwischen der linken und der rechten Hemisphäre. Dementsprechend wurden die beiden Hemisphären in den Post-hoc-Tests auch nicht getrennt untersucht. Zudem wurden hier die zuvor in probatorischen LMM-Analysen identifizierten konfundierenden Variablen Krankheitsdauer, Antipsychotika-Dosis und Alter sowie deren Interaktionseffekte mit den diagnostischen Subgruppen in der Auswertung berücksichtigt, was in der Vorgängerstudie nicht der Fall war.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die vorliegende Arbeit die Studie von Steiner et al. (2016) durch die zusätzliche Untersuchung der Hirnregion MD erweitert (1). Darüber hinaus wurde die Reliabilität durch eine neue, zuverlässige und untersucherunabhängige Quantifizierungsmethode verbessert, wobei die bisherigen Ergebnisse insgesamt bestätigt werden konnten.

#### **4.4 Statistisches Verhältnis von GAD-ir Nervenfasern und GAD-ir Zellen**

In allen Regionen gehen in der Kontrollgruppe mehr GAD-ir Zellen auch mit mehr GAD-ir Nervenfasern einher. Dieser positive Zusammenhang ist in der Schizophrenie-Kohorte in allen Regionen weniger stark ausgeprägt. Ein Ungleichgewicht zwischen GAD-ir Nervenfasern- und Zellen könnte als Korrelat einer dysfunktionalen GABAergen Neurotransmission angesehen werden. In den

Schichten III und V des STG ist sogar eine signifikant inverse GAD-ir-Nervenfaser-Zell-Korrelation in der Schizophrenie-Kohorte zu verzeichnen. Betrachtet man die Korrelation in den diagnostischen Subgruppen, wird ersichtlich, dass dieser inverse Zusammenhang auf den paranoiden Subtypus zurückzuführen ist. Interessanterweise findet sich der inverse Zusammenhang gerade im STG, dem Ort der Entstehung der für den paranoiden Subtypus charakterisierenden akustischen Halluzinationen. Dies könnte darauf hindeuten, dass dieser inverse Zusammenhang für den pathophysiologischen Mechanismus der paranoiden Subgruppe von Bedeutung ist. Der genaue pathophysiologische Mechanismus hinter diesen inversen GAD-ir Nervenfaser-Zell-Korrelationen bleibt jedoch aufgrund der hier gewonnenen Ergebnisse unklar.

Hypothetisch denkbar wäre z.B. ein vermindertes Wachstum von Axonen und Dendriten mit einhergehender reduzierter Ausbildung der Synapsen: Ein in mehreren Arbeiten replizierter Befund ist eine verminderte GAD67 mRNA Expression in mehreren für die Schizophrenie bedeutsamen Regionen. Wie in der Einleitung unter 1.3.3 erläutert, fördert insbesondere GAD67-katalysiertes GABA das Wachstum von Axonen und Dendriten der Interneurone (68). Folglich könnte ein Mangel an GAD67 mitunter zu einem verminderten Axon- und Dendritenwachstum und damit zu einer defizitären Synapsenbildung führen. Dies könnte zu den beobachteten ungleichmäßigen GAD-ir Nervenfaser-Zell-Korrelationen führen. Dies wiederum könnte die Ursache für Störungen inhibitorischer Schaltkreise und Feedbackmechanismen sein (68). Eine ähnliche Hypothese wurde bereits in einem früheren Paper bei depressiven Patienten diskutiert (197). Demnach könnten die hier beobachteten ungleichmäßigen GAD-ir Nervenfaser-Zell-Korrelationen als ein mit anderen psychiatrischen Erkrankungen überlappendes, pathophysiologisches Korrelat aufgefasst werden (71, 73, 197, 198). Ergänzend ist denkbar, dass eine defizitäre GABAerge Neurotransmission, kompensatorisch – potenziell durch Medikationseffekte mitbeeinflusst – zu einer erhöhten Dichte an GAD-ir Zellen führen könnte. Der Einfluss der Medikation könnte dabei hirnregional unterschiedlich stark sein (ausführlich diskutiert in Kapitel 4.2). Demnach würde sich initial verminderte GAD-ir- Nervenfasern und GAD-ir Zellen bei Schizophrenie-Patienten zeigen. Im Verlauf der Erkrankung könnte es als kompensatorische Antwort auf die reduzierte GABAerge Neurotransmission zu einer erhöhten GAD-ir Zelldichte kommen. Das axonale und dendritische Wachstum der Interneurone könnte dabei weiterhin

eingeschränkt sein und so zu einer ungleichmäßigen GAD-ir Nervenfasern-Zell-Korrelation beitragen.

Die beobachtete Nervenfasernreduktion könnte auch zu einer Volumenreduktion der entsprechenden Region führen. Bei gleichbleibender Zellzahl wären dadurch relativ betrachtet pro Fläche mehr Zellkörper vorhanden (199). Bekräftigt wurde diese Hypothese durch zwei weitere Studien, die einen Zusammenhang zwischen Volumenreduktion und Nervenfasernreduktion beobachteten (200, 201). Diese Annahme würde mit den Beobachtungen dieser Studie im STG übereinstimmen: Hier konnte sowohl eine ausgeprägte GAD-ir Nervenfasernreduktion als auch eine inverse Nervenfasern-Zell-Korrelation verzeichnet werden. Im MD findet sich keine inverse Nervenfasern-Zell-Korrelation, obwohl in dieser Studie auch in dieser Hirnregion ebenfalls eine ausgeprägte GAD-ir Nervenfasernreduktion beobachtet wurde. Dies spricht für hirntypische, pathophysiologische Mechanismen.

Eine weitere Erklärungshypothese für die inverse GAD-ir Nervenfasern-Zell-Korrelation könnten auch atrophische Prozesse sein: Die dopaminerge Hyperaktivität des Hippocampus könnte im Verlauf zu einer Atrophie von GAD-ir Nervenfasern und GAD-ir Zellkörper führen. Im Verlauf könnte sich diese Atrophie des Hippocampus aufgrund seiner Verbindungen auf weitere subkortikale und kortikale Regionen ausbreiten (202). Die atrophischen Prozesse könnten GAD-ir Nervenfasern und GAD-ir Zellkörper unterschiedlich stark betreffen. Atrophische Prozesse könnten auch die in anderen post-mortem Studien detektierten Volumenreduktionen in diversen Hirnregionen bei Schizophrenie-Patienten erklären (130, 175, 203–205).

In einer Studie wurde bei Schizophrenie-Patienten in einigen Hirnregionen eine erhöhte GAD-ir Zelldichte in einigen Hirnregionen festgestellt (108). Die hier beobachteten inversen GAD-ir Nervenfasern-Zell-Korrelationen im STG verdeutlichen, dass eine Erhöhung der GAD-ir Zellen nicht unbedingt mit einer Erhöhung der GAD-ir Nervenfasern korrelieren muss. Daraus kann geschlossen werden, dass eine erhöhte GAD-ir Zelldichte nicht unbedingt auf eine erhöhte GABAerge Neurotransmission hinweist. Dementsprechend muss die frühere Studie, die über eine erhöhte GAD-ir Zelldichte bei Schizophrenie berichtete (108), nicht unbedingt im Widerspruch zu einer reduzierten GABAergen Neurotransmission stehen.

Darüber hinaus ist hier anzumerken, dass in dieser Arbeit in den Analysen der diagnostischen Subgruppen keine unterschiedliche Verteilung der GAD-ir Nervenfasern gefunden werden konnten. Es ließen sich jedoch hirntypisch unterschiedliche GAD-ir Nervenfasern-Zell-Korrelationen zwischen den beiden diagnostischen Subgruppen feststellen. Dies könnte darauf hinweisen, dass eine regional unterschiedlich dysfunktionale GABAerge Neurotransmission zwischen den beiden Subgruppen denkbar ist, obwohl sich die Verteilung des GAD-ir Nervenfasern zwischen den beiden diagnostischen Subgruppen nicht signifikant unterscheidet. Zudem könnte das GAD-ir Nervenfasern/Zell Verhältnis als sensitiverer Marker für eine dysfunktionale GABAerge Neurotransmission betrachtet werden als die alleinige Analyse des GAD-ir Nervenfasern.

## **4.5 Stärken, Limitationen und weiterführende Studien**

### **4.5.1 Stärken**

**Evaluation der Methodik:** Im Vergleich zu früheren Studien lassen sich methodisch einige Unterschiede feststellen. In den Vorgängerstudien wurde die GAD-ir Nervenfasern im Segmentationsprozess durch manuelle Festlegung der oberen und unteren Schwellwertgrenze quantifiziert (1, 70, 159). Die hier angewandte Methodik erwies sich als vergleichbar mit der manuellen Methodik. Zudem bietet die hier angewandte neue Methode enorme Vorteile: Durch den automatisierten Quantifizierungsprozess ist sie weniger zeitintensiv und subjektive untersucherabhängige Einflüsse können ausgeschlossen werden. Die automatisierte Analyse von Hirnstrukturen wird es in Zukunft ermöglichen, ein größeres Patientenkollektiv schnell und zugleich präzise zu untersuchen.

**Evaluation der statistischen Auswertung:** LMM-Analysen ermöglichen die Berücksichtigung potenziell konfundierender Variablen bei der Auswertung. So konnte in der vorliegenden Arbeit der Einfluss der identifizierten konfundierenden Variablen Krankheitsdauer, Antipsychotika-Dosis und Alter berücksichtigt werden. Darüber hinaus sind LMM-Analysen robust gegenüber nicht normalverteilten Daten und ermöglichen Interaktionseffekte zu berechnen um damit komplexere Fragestellungen zu beantworten (206).

#### 4.5.2 Limitationen und weiterführende Studien

**Potenziell konfundierende Variablen:** Schizophrenie-Patienten und Kontrollpersonen dieser Studie wurden hinsichtlich Alter, Geschlecht, Autolysedauer, Fixationszeit, Hirngewicht und Antipsychotika-Dosis gematcht. Demnach ist eine relevante Beeinflussung der Ergebnisse durch diese Variablen gering. Allerdings weist die residuale Subgruppe im Vergleich zur paranoiden Subgruppe eine signifikant längere Krankheitsdauer auf. Dieser Unterschied ist durch die vorhandenen Hirnschnitte der Magdeburger Hirnbank bedingt und konnte daher nicht vermieden werden. Die unterschiedliche Krankheitsdauer zwischen den diagnostischen Subgruppen wurde jedoch in der statistischen Auswertung berücksichtigt. Auf die Bedeutung der identifizierten konfundierenden Variablen Krankheitsdauer, Antipsychotika-Dosis und Alter möchte ich an dieser Stelle auf Kapitel 4.2 verweisen.

Weitere wichtige potenziell konfundierende Variablen sind die Autolysedauer und die Fixationszeit, die den Abbau und somit die Nachweisbarkeit von GAD65/67 beeinflussen können. In den Analysen konnte jedoch kein signifikanter Einfluss der Autolysedauer und der Fixationszeit gefunden werden. Demnach ist von keiner relevanten Beeinflussung der Ergebnisse durch diese Variablen auszugehen. Hinzu kommt, dass in einer an Mäusen durchgeführten Studie ein sehr langsamer postmortaler Abbau von GAD65/67 beobachtet wurde. Dementsprechend muss der Autolysedauer als konfundierender Faktor keine große Bedeutung beigemessen werden (207). Obwohl in der Literatur teilweise geschlechtsspezifische Unterschiede beobachtet wurden (108, 122, 195), konnten wir keinen Einfluss des Geschlechts auf die Ergebnisse der GAD-ir Nervenfaserdichtemessungen feststellen. Ebenso konnten wir keine Beeinflussung der Ergebnisse durch die potenziell konfundierende Variable Hirngewicht feststellen.

Mehrere Studien weisen darauf hin, dass eine Benzodiazepin-Einnahme Auswirkungen auf das GABAerge System haben könnte. Es wurde eine chronische Modulation der GABAergen Rezeptoren (208–210) sowie eine erhöhte Anzahl von GABA-positiver Zellen (211) nach längerer Benzodiazepin-Exposition beobachtet. Es ist daher möglich, dass eine vorangegangene Benzodiazepin-Einnahme einen Einfluss auf die GAD-ir Nervenfasern haben könnte. Die Daten der klinischen Dokumentation zur Benzodiazepin-Einnahme waren teilweise unvollständig und so wurde nur berücksichtigt, ob in den letzten 90 Tagen vor dem Tod Benzodiazepine

verabreicht wurden oder nicht. Mit Benzodiazepin behandelte und unbehandelte Patienten zeigten in dieser Studie keine unterschiedliche GAD-ir Nervenfasernverteilung. Eine Beeinflussung der Ergebnisse kann jedoch aufgrund der unvollständigen klinischen Dokumentation der Benzodiazepin-Einnahme nicht ausgeschlossen werden.

**Patientenkollektiv:** Wie bei post-mortem Studien üblich, handelt es sich bei der vorliegenden Arbeit um eine Untersuchung an einem relativ kleinen Patientenkollektiv. Es wäre daher von Vorteil, wenn die vorliegenden Ergebnisse in weiteren Studien an einer größeren unabhängigen Patientenkohorte nochmals bestätigt werden könnten. Dynamische pathologische Prozesse im Krankheitsverlauf konnten naturgemäß nicht berücksichtigt werden. Inwieweit Medikationseffekte und unterschiedliche Stadien im Verlauf der Erkrankung mit den beobachteten Ergebnissen zusammenhängen, kann nicht eindeutig beantwortet werden. Um die pathophysiologischen Prozesse der Erkrankung frei von potenziellen Störfaktoren untersuchen zu können, wäre es wichtig, Schizophrenie-Patienten im Prodromalstadium zu untersuchen. Zweifelsohne ist dies in einer post-mortem Analyse nicht realisierbar. Die in dieser Arbeit gefundene positive Korrelation zwischen antipsychotischer Medikation und GAD-ir Nervenfasern spricht jedoch dafür, dass die verminderten GAD-ir Nervenfasern im Schizophrenie-Untersuchungskollektiv nicht auf die Einnahme von Antipsychotika zurückzuführen sind.

**Diagnostische Subgruppen:** Es ist zu beachten, dass sich die Einteilung in diagnostische Subgruppen im Verlauf der Erkrankung ändern kann (143) und somit die Ergebnisse nicht unbedingt subgruppenspezifisch interpretiert werden können. Aufgrund dieser zeitlichen Instabilität der Zuordnung sowie der mangelnden therapeutischen Konsequenz sind in der neuen DSM-V und in der ICD-11 (Internationale statistische Klassifikation der Krankheiten und verwandter Gesundheitsprobleme, Version 11) diese beiden Subtypen nicht mehr klassifizierbar (212). Darüber hinaus ist das Patientenkollektiv der Subgruppenanalysen nur halb so groß, was möglicherweise zu einer Verzerrung der Ergebnisse geführt haben könnte. Aus diesen Gründen sind die Ergebnisse der Subgruppenanalysen mit Vorsicht zu interpretieren und haben eine geringere Aussagekraft als die Analysen zwischen der gesamten Schizophrenie-Kohorte und der Kontrollgruppe.

**Isoenzyme:** Methodenkritisch ist anzumerken, dass der verwendete monoklonale Antikörper nicht zwischen GAD65 und GAD67 differenziert. Mehrere Studien haben gezeigt, dass das aktivitätsabhängige Isoenzym GAD65 vorwiegend in Nervenendigungen exprimiert wird. Im Gegensatz dazu ist das konstitutiv aktive Isoenzym GAD67 hauptsächlich in Axonen lokalisiert (80, 87, 92–94). Zudem werden die beiden Isoenzyme auch auf unterschiedlichen Chromosomen exprimiert (79, 81) und unterliegen unterschiedlichen epigenetischen Veränderungen (84) (ausführlich diskutiert in Kapitel 1.3.2). An dieser Stelle wären weitere Studien mit Isoenzym-spezifischen Antikörpern hilfreich, um das Verständnis der pathophysiologischen Zusammenhänge der Erkrankung zu erweitern.

**Subpopulationen GABAerger Interneurone:** In der vorliegenden Arbeit wurde die Gesamtheit aller GABAergen Interneurone betrachtet. GABAerge Interneurone können jedoch in verschiedene Subgruppen klassifiziert werden (213–216). Im Kortex exprimieren die Interneurone u.a. das  $\text{Ca}^{2+}$ -bindende Protein Parvalbumin (PV), das Neuropeptid Somatostatin (SST) sowie den ionotropen Serotoninrezeptor 5-Hydroxytryptamin-3a ( $5\text{HT}_{3a}$ ) (214). In der Pyramidenschicht des Hippocampus sind unter anderem  $\text{PV}^+$ , Cholecystinin positive ( $\text{CCK}^+$ ) und Vasoaktives intestinales Peptid positive ( $\text{VIP}^+$ ) Interneurone aufzufinden (215). Diese spezifischen Subpopulationen der GABAergen Interneurone modulieren auf unterschiedliche Art und Weise die Nervenzellaktivität der erregenden Pyramidenzellen (58, 217). Mehrere Studien weisen darauf hin, dass vor allem eine Alteration der PV exprimierenden Interneurone eine Rolle in der Pathophysiologie der Schizophrenie spielen (65, 102, 218, 219). PV exprimierende Interneurone sind u.a. an der Entstehung von Gamma-Oszillationen beteiligt (62). Demnach könnten reduzierte PV exprimierende Interneurone eine verminderte Gamma-Wellen-Aktivität bei Schizophrenie erklären und somit zur Entstehung kognitiver Defizite bei Schizophrenie beitragen (53, 58, 59). Zukünftige Studien mit differenzierter Betrachtung dieser Subpopulationen wären vielversprechend, um die Bedeutung der einzelnen Subpopulationen in der Genese der Schizophrenie genauer zu beleuchten.

**Stratum oriens:** Steiner et al. (2016) berichten von einer signifikant reduzierten GAD-ir Nervenfaserdichte in der Pyramidenschicht der rechten Hippocampusregion CA1 bei Schizophrenie-Patienten (1). Diverse Studien weisen jedoch auf eine wichtige Rolle des Stratum oriens bei Schizophrenie hin (220, 221): Eine Studie verzeichnete bei Schizophrenie-Patienten in CA1 eine verminderte GAD67 mRNA

Expression im Stratum oriens, die jedoch nicht in der Pyramidenschicht aufzufinden war (222). Zudem wurde bei Schizophrenie in den Hippocampusregionen CA2-CA4 eine erhöhte GABA<sub>A</sub>-Rezeptordichte im Stratum oriens gefunden (47, 133, 223, 224). Ergänzend konnte eine positive Korrelation zwischen Antipsychotika-Dosis und GAD-ir-Parametern im Stratum oriens in den Regionen CA2 und 3 verzeichnet werden (191). In der vorliegenden Studie haben wir jedoch die Pyramidenschicht der Region CA1 untersucht. Dies könnte eine Erklärung sein für die hier in der Post-hoc-Analyse nicht signifikanten Ergebnisse in dieser Region. An dieser Stelle sollten weitere Studien unter Einbeziehung des Stratum oriens folgen.

## 5 Zusammenfassung

Nach aktuellem Forschungsstand spielt ein beeinträchtigt GABAerges System eine wesentliche Rolle in der Pathogenese der Schizophrenie. Dementsprechend konnte in multiplen Hirnregionen eine Reduktion der GAD-ir Nervenfaserdichte nachgewiesen werden (1). In der vorliegenden Arbeit wurde die GAD65/67-immunohistochemisch gefärbte Nervenfasern in koronaren Ganzhirnschnitten von 16 Schizophrenie-Patienten (10 paranoid, 6 residual) und 16 gesunden Vergleichspersonen ohne neuropsychiatrische Erkrankung untersucht. Im Gegensatz zu vorangegangenen Studien erfolgte die Quantifizierung der GAD-ir Nervenfasern in sechs für die Schizophrenie bedeutsamen Hirnregionen mit einer neuen, automatisierten Methode. Im Ergebnis konnten in der Schizophrenie-Kohorte eine signifikant verminderte GAD-ir Nervenfaserdichte in allen untersuchten Hirnregionen festgestellt werden ( $p < 0,001^*$ ), wodurch die Hypothese einer Alteration des GABAergen Systems bei Schizophrenie bestätigt werden konnte. Diese Reduktion erwies sich besonders ausgeprägt im STG Schicht V ( $p = 0,012^*$ ) und im MD ( $p = 0,001^*$ ). Die GAD-ir Nervenfasern zeigten keine signifikant unterschiedliche Verteilung zwischen der residualen und der paranoiden Subgruppe ( $p = 0,369$ ). Als Erklärungsansatz für das heterogene Erscheinungsbild der Erkrankung konnte jedoch eine regional unterschiedliche GAD-ir Nervenfasern-Zell-Korrelation zwischen den diagnostischen Subgruppen beobachtet werden ( $p < 0,001^*$ ). Insbesondere fand sich in der paranoiden Kohorte im STG eine inverse GAD-ir Nervenfasern-Zell-Korrelation (STG III:  $r_s = -0,648$ ,  $p = 0,043^*$ ; STG V:  $r_s = -0,745$ ,  $p = 0,013^*$ ). Diese inverse Korrelation kann als Korrelat einer abnormen GABAergen Neurotransmission interpretiert werden und könnte demnach die für diese Subgruppe charakteristische Symptomatik erklären. Darüber hinaus deuten die Ergebnisse darauf hin, dass sich die GABAerge Neurotransmission im Verlauf der Erkrankung verändert und auch Medikationseffekte eine Rolle spielen könnten. Die neue, automatisierte Quantifizierungsmethode erwies sich als äquivalent zur manuellen Auswertung. Jedoch hat die neue Methode eine höhere Reproduzierbarkeit und schließt untersucherabhängige Einflüsse aus. In weiterführenden Studien sollten zusätzliche Regionen in einer unabhängigen Patientenkohorte analysiert werden (z.B. Striatum oriens). Ergänzend wäre eine differenzierte Betrachtung der beiden Isoenzyme GAD65 und GAD67 sowie der Interneuron-Subpopulationen vielversprechend, um einen genaueren Einblick in die pathophysiologischen Zusammenhänge der Schizophrenie zu erhalten.

## Literaturverzeichnis

1. Steiner J. et al.: GABAergic system impairment in the hippocampus and superior temporal gyrus of patients with paranoid schizophrenia: a post-mortem study.: *Schizophr Res* 177. 10–17 (2016)
2. McGrath J. et al.: Schizophrenia: a concise overview of incidence, prevalence, and mortality.: *Epidemiol Rev* 30. 67–76 (2008)
3. Simeone J.C. et al.: An evaluation of variation in published estimates of schizophrenia prevalence from 1990–2013: a systematic literature review.: *BMC psychiatry* 15. 193 (2015)
4. Charlson F.J. et al.: Global epidemiology and burden of schizophrenia: findings from the global burden of disease study 2016.: *Schizophr Bull* 44. 1195–1203 (2018)
5. Hosman C.M.H. et al.: Prevention of mental disorders: effective interventions and policy options: summary report. S. 47-51. Geneva. World Health Organization 2004.
6. Hahlweg K.: Schizophrenie. In: J. Margraf, S. Schneider (eds.): *Lehrbuch der Verhaltenstherapie*. S. 408. Berlin, Heidelberg. Springer Berlin Heidelberg (2009)
7. Lally J., J.H. MacCabe: Antipsychotic medication in schizophrenia: a review.: *Br Med Bull* 114. 169–179 (2015)
8. Xu M., A.H.C. Wong: GABAergic inhibitory neurons as therapeutic targets for cognitive impairment in schizophrenia.: *Acta Pharmacol Sin* 39. 733–753 (2018)
9. Kirov G. et al.: Finding schizophrenia genes.: *J Clin Invest* 115. 1440–1448 (2005)
10. Harrison P.J., D.R. Weinberger: Schizophrenia genes, gene expression, and neuropathology: on the matter of their convergence.: *Mol Psychiatry* 10. 40–68 (2005)
11. Mirnics K., D.A. Lewis: Genes and subtypes of schizophrenia.: *Trends Mol Med* 7. 281–283 (2001)
12. Schlaaff K. et al.: Increased densities of T and B lymphocytes indicate neuroinflammation in subgroups of schizophrenia and mood disorder patients.: *Brain Behav Immun* 88. 497–506 (2020)
13. Patlola S.R. et al.: The relationship between inflammatory biomarkers and cognitive dysfunction in patients with schizophrenia: a systematic review and meta-analysis.: *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 121 (2023)
14. Wegrzyn D. et al.: Structural and functional deviations of the hippocampus in schizophrenia and schizophrenia animal models.: *Int J Mol Sci* 23 (2022)
15. Bogerts B. et al.: Brain abnormalities in schizophrenia. In: S. Kasper, G. N. Papadimitriou (eds.): *Schizophrenia: Biopsychosocial Approaches and Current Challenges*. 2. Auflage. S. 87-104. New York. Informa Healthcare (2009)
16. Bogerts B. et al.: Hippocampus-amygdala volumes and psychopathology in chronic schizophrenia.: *Biol Psychiatry* 33. 236–246 (1993)
17. Ghit A. et al.: GABAA receptors: structure, function, pharmacology, and related disorders.: *J Genet Eng Biotechnol* 19. 123 (2021)
18. Lasevoli F. et al.: The glutamatergic aspects of schizophrenia molecular pathophysiology: role of the postsynaptic density, and implications for treatment.: *Curr*

Neuropharmacol 12. 219–238 (2014)

19. Howes O. et al.: Glutamate and dopamine in schizophrenia: an update for the 21st century.: *J Psychopharmacol* 29. 97–115 (2015)
20. Olney J.W.: Glutamate receptor dysfunction and schizophrenia.: *Arch Gen Psychiatry* 52. 998–1007 (1995)
21. Zubin J., B. Spring: Vulnerability: a new view of schizophrenia.: *J Abnorm Psychol* 86. 103–126 (1977)
22. Nuechterlein K.H., M.E. Dawson: A heuristic vulnerability/stress model of schizophrenic episodes.: *Schizophr Bull* 10. 300–312 (1984)
23. Hugdahl K. et al.: Glutamate as a mediating transmitter for auditory hallucinations in schizophrenia: a (1)H MRS study.: *Schizophr Res* 161. 252–260 (2015)
24. Buck S.A. et al.: Relevance of interactions between dopamine and glutamate neurotransmission in schizophrenia.: *J Mol Psychiatry* 27. 3583–3591 (2022)
25. Uno Y., J.T. Coyle: Glutamate hypothesis in schizophrenia.: *Psychiatry Clin Neurosci* 73. 204–215 (2019)
26. Campden-Main B.C., Z. Wegielski: The control of deviant behavior in chronically disturbed psychotic patients by the oral administration of reserpine.: *Ann NY Acad Sci* 61. 117–122 (1955)
27. Andrews G. et al.: Cost-effectiveness of current and optimal treatment for schizophrenia.: *Br J Psychiatry* 183. 427–435 (2003)
28. Wang X. et al.: Molecular basis of GABA hypofunction in adolescent schizophrenia-like animals.: *Neural Plast.* 1–15 (2021)
29. Morris B.J. et al.: PCP: from pharmacology to modelling schizophrenia.: *Curr Opin Pharmacol* 5. 101–106 (2005)
30. Kehrer C.: Altered excitatory-inhibitory balance in the NMDA-hypofunction model of schizophrenia.: *Front Mol Neurosci* 1 (2008)
31. Roberts E.: Prospects for research on schizophrenia. An hypotheses suggesting that there is a defect in the GABA system in schizophrenia.: *Neurosci Res Program Bull* 10. 468–482 (1972)
32. Akbarian S.: Gene expression for glutamic acid decarboxylase is reduced without loss of neurons in prefrontal cortex of schizophrenics.: *Arch Gen Psychiatry* 52. 258–266 (1995)
33. Akbarian S., H.-S. Huang: Molecular and cellular mechanisms of altered GAD1/GAD67 expression in schizophrenia and related disorders.: *Brain Res Rev* 52. 293–304 (2006)
34. Blum B.P., J.J. Mann: The GABAergic system in schizophrenia.: *Int J Neuropsychopharmacol* 5. 159–179 (2002)
35. Guidotti A. et al.: Decrease in reelin and glutamic acid decarboxylase67 (GAD67) expression in schizophrenia and bipolar disorder: A postmortem brain study.: *Arch Gen Psychiatry* 57. 1061–1069 (2000)
36. Bird E. et al.: Increased brain dopamine and reduced glutamic acid decarboxylase

- and choline acetyl transferase activity in schizophrenia and related psychoses.: *The Lancet* 310. 1157–1159 (1977)
37. Engel D. et al.: Plasticity of rat central inhibitory synapses through GABA metabolism.: *J Physiol* 535. 473–482 (2001)
38. Shaw A.D. et al.: Oscillatory, computational, and behavioral evidence for impaired GABAergic inhibition in schizophrenia.: *Schizophr Bull* 46. 345–353 (2019)
39. Roth F.C., A. Draguhn: GABA metabolism and transport: effects on synaptic efficacy.: *Neural Plast* 2012 (2012)
40. Schmitt A. et al.: Schizophrenia as a disorder of disconnectivity.: *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* 261. 150–154 (2011)
41. Crossley N.A. et al.: Superior temporal lobe dysfunction and frontotemporal dysconnectivity in subjects at risk of psychosis and in first-episode psychosis.: *Hum Brain Mapp* 30. 4129–4137 (2009)
42. Klauser P. et al.: White matter disruptions in schizophrenia are spatially widespread and topologically converge on brain network hubs.: *Schizophr Bull* 43. 425–435 (2016)
43. Yoon Y.B. et al.: Altered fronto-temporal functional connectivity in individuals at ultra-high-risk of developing psychosis.: *PLoS One* 10. e0135347 (2015)
44. de Jonge J.C. et al.: GABAergic mechanisms in schizophrenia: linking postmortem and in vivo studies.: *Front Psychiatry* 8. 118 (2017)
45. Beneyto M. et al.: Lamina-specific alterations in cortical GABA<sub>A</sub> receptor subunit expression in schizophrenia.: *Cereb Cortex* 21. 999–1011 (2011)
46. Volk D.W.: Reciprocal alterations in pre- and postsynaptic inhibitory markers at chandelier cell inputs to pyramidal neurons in schizophrenia.: *Cereb Cortex* 12. 1063–1070 (2002)
47. Benes F.M. et al.: Up-regulation of GABA<sub>A</sub> receptor binding on neurons of the prefrontal cortex in schizophrenic subjects.: *Neuroscience* 75. 1021–1031 (1996)
48. Ohnuma T. et al.: Measurement of GABAergic parameters in the prefrontal cortex in schizophrenia: focus on GABA content, GABA<sub>A</sub> receptor  $\alpha$ -1 subunit messenger RNA and human GABA transporter-1 (hGAT-1) messenger RNA expression.: *Neuroscience* 93. 441–448 (1999)
49. Hashimoto T. et al.: Alterations in GABA-related transcriptome in the dorsolateral prefrontal cortex of subjects with schizophrenia.: *Mol Psychiatry* 13. 147–161 (2008)
50. Volk D.W. et al.: GABA Transporter-1 mRNA in the prefrontal cortex in schizophrenia: decreased expression in a subset of neurons.: *Am J Psychiatry* 158. 256–265 (2001)
51. Menzies L. et al.: Effects of  $\gamma$ -aminobutyric acid-modulating drugs on working memory and brain function in patients with schizophrenia.: *Arch Gen Psychiatry* 64. 156–167 (2007)
52. Gonzalez-Burgos G., D.A. Lewis: GABA Neurons and the mechanisms of network oscillations: implications for understanding cortical dysfunction in schizophrenia.: *Schizophr Bull* 34. 944–961 (2008)
53. Uhlhaas P.J., W. Singer: Neural synchrony in brain disorders: relevance for cognitive

- dysfunctions and pathophysiology.: *Neuron* 52. 155–168 (2006)
54. Uhlhaas P.J., W. Singer: Abnormal neural oscillations and synchrony in schizophrenia.: *Nat Rev Neurosci* 11. 100–113 (2010)
55. Leicht G. et al.: Reduced auditory evoked gamma band response and cognitive processing deficits in first episode schizophrenia.: *World J Biol Psychiatry* 16. 387–397 (2015)
56. Gallinat J. et al.: Reduced oscillatory gamma-band responses in unmedicated schizophrenic patients indicate impaired frontal network processing.: *Clin Neurophysiol* 115. 1863–1874 (2004)
57. Hirano Y. et al.: Auditory cortex volume and gamma oscillation abnormalities in schizophrenia.: *Clin EEG Neurosci* 51. 244–251 (2020)
58. Lewis D.A. et al.: Cortical inhibitory neurons and schizophrenia.: *Nat Rev Neurosci* 6. 312–324 (2005)
59. Sohal V.S. et al.: Parvalbumin neurons and gamma rhythms enhance cortical circuit performance.: *Nature* 459. 698–702 (2009)
60. McNally J.M., R.W. McCarley: Gamma band oscillations: a key to understanding schizophrenia symptoms and neural circuit abnormalities.: *Curr Opin Psychiatry* 29. 202–210 (2016)
61. Bartos M. et al.: Synaptic mechanisms of synchronized gamma oscillations in inhibitory interneuron networks.: *Nat Rev Neurosci* 8. 45–56 (2007)
62. Lisman J.E. et al.: Circuit-based framework for understanding neurotransmitter and risk gene interactions in schizophrenia.: *Trends Neurosci* 31. 234–242 (2008)
63. Pouille F., M. Scanziani: Enforcement of temporal fidelity in pyramidal cells by somatic feed-forward inhibition.: *Science* 293. 1159–1163 (2001)
64. Cobb S.R. et al.: Synchronization of neuronal activity in hippocampus by individual GABAergic interneurons.: *Nature* 378. 75–78 (1995)
65. Gonzalez-Burgos G. et al.: Alterations in cortical network oscillations and parvalbumin neurons in schizophrenia.: *Biol Psychiatry* 77. 1031–1040 (2015)
66. Gonzalez-Burgos G. et al.: GABA neuron alterations, cortical circuit dysfunction and cognitive deficits in schizophrenia.: *Neural Plast.* 1–24 (2011)
67. Sears S.M., S.J. Hewett: Influence of glutamate and GABA transport on brain excitatory/inhibitory balance.: *Exp Biol Med* 246. 1069–1083 (2021)
68. Chattopadhyaya B. et al.: GAD67-mediated GABA synthesis and signaling regulate inhibitory synaptic innervation in the visual cortex.: *Neuron* 54. 889–903 (2007)
69. Gao R., P. Penzes: Common mechanisms of excitatory and inhibitory imbalance in schizophrenia and autism spectrum disorders.: *Curr Mol Med* 15. 146–167 (2015)
70. Gos T. et al.: Differences between unipolar and bipolar I depression in the quantitative analysis of glutamic acid decarboxylase-immunoreactive neuropil.: *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* 262. 647–655 (2012)
71. Ray M.T. et al.: Decreased BDNF, trkB-TK+ and GAD67 mRNA expression in the hippocampus of individuals with schizophrenia and mood disorders.: *J Psychiatry*

Neurosci 36. 195–203 (2011)

72. Gao S.-F. et al.: Reduced GAD65/67 immunoreactivity in the hypothalamic paraventricular nucleus in depression: a postmortem study.: *J Affect Disord* 149. 422–425 (2013)

73. Schür R.R. et al.: Brain GABA levels across psychiatric disorders: a systematic literature review and meta-analysis of (1) H-MRS studies.: *Hum Brain Mapp* 37. 3337–3352 (2016)

74. Woo T.-U.W. et al.: Density of glutamic acid decarboxylase 67 messenger RNA-containing neurons that express the N-methyl-D-aspartate receptor subunit NR2A in the anterior cingulate cortex in schizophrenia and bipolar disorder.: *Arch Gen Psychiatry* 61. 649 (2004)

75. Thompson M. et al.: Decreased glutamic acid decarboxylase67 mRNA expression in multiple brain areas of patients with schizophrenia and mood disorders.: *J Psychiatr Res* 43. 970–977 (2009)

76. Kaila K. et al.: GABA actions and ionic plasticity in epilepsy.: *Curr Opin Neurobiol* 26. 34–41 (2014)

77. Lee S.-E. et al.: The regulation of glutamic acid decarboxylases in GABA neurotransmission in the brain.: *Arch Pharm Res* 42. 1031–1039 (2019)

78. Kaufman D.L. et al.: Two forms of the gamma-aminobutyric acid synthetic enzyme glutamate decarboxylase have distinct intraneuronal distributions and cofactor interactions.: *J Neurochem* 56. 720–723 (1991)

79. Bu D.F. et al.: Two human glutamate decarboxylases, 65-kDa GAD and 67-kDa GAD, are each encoded by a single gene.: *Proc Natl Acad Sci USA* 89. 2115–2119 (1992)

80. Soghomonian J.-J., D.L. Martin: Two isoforms of glutamate decarboxylase: why?: *Trends Pharmacol Sci* 19. 500–505 (1998)

81. Erlander M.G. et al.: Two genes encode distinct glutamate decarboxylases.: *Neuron* 7. 91–100 (1991)

82. Addington A.M. et al.: GAD1 (2q31.1), which encodes glutamic acid decarboxylase (GAD67), is associated with childhood-onset schizophrenia and cortical gray matter volume loss.: *J Mol Psychiatry* 10. 581–588 (2005)

83. Schizophrenia Working Group of the Psychiatric Genomics Consortium: Biological insights from 108 schizophrenia-associated genetic loci.: *Nature* 511. 421–427 (2014)

84. Pan Z.Z.: Transcriptional control of Gad2.: *Transcription* 3. 68–72 (2012)

85. Tao R. et al.: GAD1 alternative transcripts and DNA methylation in human prefrontal cortex and hippocampus in brain development, schizophrenia.: *Mol Psychiatry* 23. 1496–1505 (2018)

86. Dupuy S.T., C.R. Houser: Prominent expression of two forms of glutamate decarboxylase in the embryonic and early postnatal rat hippocampal formation.: *J Neurosci* 16. 6919–6932 (1996)

87. Esclapez M. et al.: Comparative localization of two forms of glutamic acid decarboxylase and their mRNAs in rat brain supports the concept of functional differences between the forms.: *J Neurosci* 14. 1834–1855 (1994)

88. Stone D.J. et al.: Localization of cells preferentially expressing GAD67 with negligible GAD65 transcripts in the rat hippocampus. A double in situ hybridization study.: *Brain Res Mol Brain Res* 71. 201–209 (1999)
89. Trifonov S. et al.: Glutamic acid decarboxylase 1 alternative splicing isoforms: characterization, expression and quantification in the mouse brain.: *BMC Neurosci* 15. 114 (2014)
90. Asada H. et al.: Cleft palate and decreased brain  $\gamma$ -aminobutyric acid in mice lacking the 67-kDa isoform of glutamic acid decarboxylase.: *Proc Natl Acad Sci USA* 94. 6496–6499 (1997)
91. Ji F. et al.: GABA and histogenesis in fetal and neonatal mouse brain lacking both the isoforms of glutamic acid decarboxylase.: *Neurosci Res* 33. 187–194 (1999)
92. Battaglioli G. et al.: Kinetic differences between the isoforms of glutamate decarboxylase: implications for the regulation of GABA synthesis: Kinetic differences between GAD isoforms.: *J Neurochem* 86. 879–887 (2003)
93. Jin H. et al.: Demonstration of functional coupling between  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA) synthesis and vesicular GABA transport into synaptic vesicles.: *Proc Natl Acad Sci USA* 100. 4293–4298 (2003)
94. Tian N. et al.: The role of the synthetic enzyme GAD65 in the control of neuronal  $\gamma$ -aminobutyric acid release.: *Proc Natl Acad Sci USA* 96. 12911–12916 (1999)
95. Asada H. et al.: Mice Lacking the 65 kDa Isoform of Glutamic Acid Decarboxylase (GAD65) Maintain Normal Levels of GAD67 and GABA in Their Brains but Are Susceptible to Seizures.: *Biochem Biophys Res Commun* 229. 891–895 (1996)
96. Lau C.G., V.N. Murthy: Activity-dependent regulation of inhibition via GAD67.: *J Neurosci* 32. 8521–8531 (2012)
97. Wu H. et al.: Role of glutamate decarboxylase (GAD) isoform, GAD65, in GABA synthesis and transport into synaptic vesicles—evidence from GAD65-knockout mice studies.: *Brain Res* 1154. 80–83 (2007)
98. Kimoto S. et al.: Lower expression of glutamic acid decarboxylase 67 in the prefrontal cortex in schizophrenia: contribution of altered regulation by Zif268.: *Am J Psychiatry* 171. 969–978 (2014)
99. Veldic M. et al.: In psychosis, cortical interneurons overexpress DNA-methyltransferase 1.: *Proc Natl Acad Sci USA* 102. 2152–2157 (2005)
100. Hashimoto T. et al.: Gene expression deficits in a subclass of GABA neurons in the prefrontal cortex of subjects with schizophrenia.: *J Neurosci* 23. 6315–6326 (2003)
101. Mirnics K. et al.: Molecular characterization of schizophrenia viewed by microarray analysis of gene expression in prefrontal cortex.: *Neuron* 28. 53–67 (2000)
102. Curley A.A. et al.: Cortical deficits of glutamic acid decarboxylase 67 expression in schizophrenia: clinical, protein, and cell type-specific features.: *Am J Psychiatry* 168. 921–929 (2011)
103. Dowling K.F. et al.: Localization and diagnostic specificity of glutamic acid decarboxylase transcript alterations in the dorsolateral prefrontal cortex in schizophrenia.: *Biol Psychiatry* (2023)

104. Heckers S. et al.: Differential hippocampal expression of glutamic acid decarboxylase 65 and 67 messenger RNA in bipolar disorder and schizophrenia.: *Arch Gen Psychiatry* 59. 521 (2002)
105. Glausier J.R. et al.: Lower glutamic acid decarboxylase 65-kDa isoform messenger RNA and protein levels in the prefrontal cortex in schizoaffective disorder but not schizophrenia.: *Biol Psychiatry* 77. 167–176 (2015)
106. Hakak Y. et al.: Genome-wide expression analysis reveals dysregulation of myelination-related genes in chronic schizophrenia.: *Proc Natl Acad Sci USA* 98. 4746–4751 (2001)
107. Dracheva S. et al.: GAD67 and GAD65 mRNA and protein expression in cerebrocortical regions of elderly patients with schizophrenia.: *J Neurosci Res* 76. 581–592 (2004)
108. Schreiber S. et al.: Increased density of GAD65/67 immunoreactive neurons in the posterior subiculum and parahippocampal gyrus in treated patients with chronic schizophrenia.: *World J Biol Psychiatry* 12. 57–65 (2011)
109. Schoonover K.E. et al.: Protein markers of neurotransmitter synthesis and release in postmortem schizophrenia substantia nigra.: *Neuropsychopharmacology* 42. 540–550 (2017)
110. Guidotti A. et al.: New neurochemical markers for psychosis: a working hypothesis of their operation.: *Neurochem Res* 25. 1207–1218 (2000)
111. Hashimoto T.: Relationship of Brain-Derived Neurotrophic Factor and Its Receptor TrkB to Altered Inhibitory Prefrontal Circuitry in Schizophrenia.: *Journal of Neuroscience* 25. 372–383 (2005)
112. Straub R.E. et al.: Allelic variation in GAD1 (GAD67) is associated with schizophrenia and influences cortical function and gene expression.: *Mol Psychiatry* 12. 854–869 (2007)
113. Volk D.W. et al.: Decreased Glutamic Acid decarboxylase67 messenger RNA expression in a subset of prefrontal cortical g-Aminobutyric acid neurons in subjects with schizophrenia.: *Arch Gen Psychiatry* 57. 237–245 (2000)
114. Impagnatiello F. et al.: A decrease of reelin expression as a putative vulnerability factor in schizophrenia.: *Proc Natl Acad Sci USA* 95. 15718–15723 (1998)
115. Hashimoto T. et al.: Alterations in GABA-related transcriptome in the dorsolateral prefrontal cortex of subjects with schizophrenia.: *Mol Psychiatry* 13. 147–161 (2008)
116. Purves-Tyson T.D. et al.: Reductions in midbrain GABAergic and dopamine neuron markers are linked in schizophrenia.: *Mol Brain* 14. 96 (2021)
117. Nenadic I. et al.: Auditory hallucinations and brain structure in schizophrenia: voxel-based morphometric study.: *Br J Psychiatry* 196. 412–413 (2010)
118. Wright I.C. et al.: Meta-analysis of regional brain volumes in schizophrenia.: *Am J Psychiatry* 157. 16–25 (2000)
119. Matsumoto H. et al.: Superior temporal gyrus abnormalities in early-onset schizophrenia: similarities and differences with adult-onset schizophrenia.: *Am J Psychiatry* 158. 1299–1304 (2001)

120. Sanfilippo M. et al.: Volumetric measure of the frontal and temporal lobe regions in schizophrenia: relationship to negative symptoms.: *Arch Gen Psychiatry* 57. 471 (2000)
121. Allen P. et al.: The hallucinating brain: a review of structural and functional neuroimaging studies of hallucinations.: *Neurosci Biobehav Rev* 32. 175–191 (2008)
122. Bryant N.L., A. Breier: Gender differences in temporal lobe structures of patients with schizophrenia: a volumetric MRI study.: *Am J Psychiatry* 156. 609 (1999)
123. Frajman A. et al.: Gene expression meta-analysis reveals the down-regulation of three GABA receptor subunits in the superior temporal gyrus of patients with schizophrenia.: *Schizophrenia Research* 220. 29–37 (2020)
124. Andreasen N.C.: The role of the thalamus in schizophrenia.: *Can J Psychiatry* 42. 27–33 (1997)
125. Alelú-Paz R., J.M. Giménez-Amaya: The mediodorsal thalamic nucleus and schizophrenia.: *J Psychiatry Neurosci* 33. 489–498 (2008)
126. Bezdudnaya T., A. Keller: Laterodorsal nucleus of the thalamus: a processor of somatosensory inputs.: *J Comp Neurol* 507. 1979–1989 (2008)
127. Grodd W. et al.: The anterior and medial thalamic nuclei and the human limbic system: tracing the structural connectivity using diffusion-weighted imaging.: *Sci Rep* 10 (2020)
128. Taber K.H. et al.: The limbic thalamus.: *J Neuropsychiatry Clin Neurosci* 16. 127–132 (2004)
129. Andreasen N.C. et al.: Schizophrenia and cognitive dysmetria: a positron-emission tomography study of dysfunctional prefrontal-thalamic-cerebellar circuitry.: *Proc Natl Acad Sci USA* 93. 9985–9990 (1996)
130. Dorph-Petersen K.-A., D.A. Lewis: Postmortem structural studies of the thalamus in schizophrenia.: *Schizophr Res* 180. 28–35 (2017)
131. Pergola G. et al.: The role of the thalamus in schizophrenia from a neuroimaging perspective.: *Neurosci Biobehav Rev* 54. 57–75 (2015)
132. Fanselow M.S., H.-W. Dong: Are the dorsal and ventral hippocampus functionally distinct structures?: *Neuron* 65. 7–19 (2010)
133. Heckers S., C. Konradi: Hippocampal neurons in schizophrenia.: *J Neural Transm* 109. 891–905 (2002)
134. Heckers S., C. Konradi: GABAergic mechanisms of hippocampal hyperactivity in schizophrenia.: *Schizophr Res* 167. 4–11 (2015)
135. McHugo M. et al.: Hyperactivity and reduced activation of anterior hippocampus in early psychosis.: *Am J Psychiatry* 176. 1030–1038 (2019)
136. Talati P. et al.: Increased hippocampal CA1 cerebral blood volume in schizophrenia.: *Neuroimage Clin* 5. 359–364 (2014)
137. Schobel S.A. et al.: Imaging patients with psychosis and a mouse model establishes a spreading pattern of hippocampal dysfunction and implicates glutamate as a driver.: *Neuron* 78. 81–93 (2013)
138. Zierhut K.C. et al.: Hippocampal CA1 deformity is related to symptom severity and

- antipsychotic dosage in schizophrenia.: *Brain* 136. 804–814 (2013)
139. Narr K.L. et al.: Regional specificity of hippocampal volume reductions in first-episode schizophrenia.: *Neuroimage* 21. 1563–1575 (2004)
140. Allen K.M. et al.: Cell proliferation is reduced in the hippocampus in schizophrenia.: *Aust N Z J Psychiatry* 50. 473–480 (2016)
141. Falkai P. et al.: Decreased oligodendrocyte and neuron number in anterior hippocampal areas and the entire hippocampus in schizophrenia: a stereological postmortem study.: *Schizophr Bull* 42. 4–12 (2016)
142. Tamminga C.A. et al.: The hippocampal formation in schizophrenia.: *Am J Psychiatry* 167. 1178–1193 (2010)
143. Deutsche Gesellschaft für Psychiatrie und Psychotherapie, Psychosomatik und Nervenheilkunde e. V. (DGPPN): S3-Leitlinie Schizophrenie. Langfassung. (2019)
144. Wójciak P., J. Rybakowski: Clinical picture, pathogenesis and psychometric assessment of negative symptoms of schizophrenia.: *Psychiatr Pol* 52. 185–197 (2018)
145. Saß, H., I. Houben: Diagnostisches und Statistisches Manual Psychischer Störungen : DSM-IV. S. 349-363. Göttingen. Hogrefe Verlag (1998)
146. Busse S. et al.: Different distribution patterns of lymphocytes and microglia in the hippocampus of patients with residual versus paranoid schizophrenia: further evidence for disease course-related immune alterations?: *Brain Behav Immun* 26. 1273–1279 (2012)
147. Steiner J. et al.: S100B-immunopositive glia is elevated in paranoid as compared to residual schizophrenia: a morphometric study.: *J Psychiatr Res* 42. 868–876 (2008)
148. Gos T. et al.: Reduced microglial immunoreactivity for endogenous NMDA receptor agonist quinolinic acid in the hippocampus of schizophrenia patients.: *Brain Behav Immun* 41. 59–64 (2014)
149. Förster A. et al.: Reduced GABAergic neuropil and interneuron profiles in schizophrenia: complementary analysis of disease course-related differences.: *J Psychiatr Res* 145. 50–59 (2022)
150. Atkins M. et al.: Chlorpromazine equivalents: a consensus of opinion for both clinical and research applications.: *Psychiatric Bull* 21. 224–226 (1997)
151. Rey M.-J. et al.: Guideline for the dosage of neuroleptics. I: chlorpromazine equivalents of orally administered neuroleptics.: *Int Clin Psychopharmacol* 4. 95–104 (1989)
152. Hsu S.M., E. Soban: Color modification of diaminobenzidine (DAB) precipitation by metallic ions and its application for double immunohistochemistry.: *J Histochem Cytochem* 30. 1079–1082 (1982)
153. Bernstein H.-G. et al.: Regional and cellular distribution of neural visinin-like protein immunoreactivities (VILIP-1 and VILIP-3) in human brain.: *J Neurocytol* 28. 655–662 (1999)
154. Mai J.K. et al.: Atlas of the human brain. 3. Auflage. S. 153-181. Amsterdam. Elsevier Academic Press (2008)

155. Lüllmann-Rauch R., E. Asan: Taschenlehrbuch Histologie. 6. Auflage. S. 245. Stuttgart. Georg Thieme Verlag (2019)
156. Duvernoy H.M. et al.: The human hippocampus. S. 16. Berlin, Heidelberg. Springer Berlin Heidelberg (2013)
157. Schindelin J. et al.: Fiji: an open-source platform for biological-image analysis.: Nat Methods 9. 676–682 (2012)
158. Zack G.W. et al.: Automatic measurement of sister chromatid exchange frequency.: J Histochem Cytochem 25. 741–753 (1977)
159. Gos T. et al.: Suicide and depression in the quantitative analysis of glutamic acid decarboxylase-immunoreactive neuropil.: J Affect Disord 113. 45–55 (2009)
160. Pannese E.: Neurocytology: fine structure of neurons, nerve processes, and neuroglial cells. 2. Auflage. S. 13-24. Cham. Springer International Publishing (2015)
161. Serra J.: Introduction to mathematical morphology.: Computer Vision, Graphics, and Image Processing 35. 283–305 (1986)
162. Haralick R.M. et al.: Image analysis using mathematical morphology.: IEEE Trans Pattern Anal Mach Intell 9. 532–550 (1987)
163. Akoglu H.: User's guide to correlation coefficients.: Turk J Emerg Med 18. 91–93 (2018)
164. Bland J.M., D.G. Altman: Statistical methods for assessing agreement between two methods of clinical measurement.: The Lancet 1. 307–310 (1986)
165. Giavarina D.: Understanding bland altman analysis.: Biochem Med 25. 141–151 (2015)
166. Steinmann S. et al.: The interhemispheric miscommunication theory of auditory verbal hallucinations in schizophrenia.: Int J Psychophysiol 145. 83–90 (2019)
167. Weber S. et al.: Glutamate- and GABA-modulated connectivity in auditory hallucinations—a combined resting state fMRI and MR spectroscopy study.: Front Psychiatry 12 (2021)
168. Medalla M., H. Barbas: Specialized prefrontal “auditory fields”: organization of primate prefrontal-temporal pathways.: Front Neurosci 8. 77 (2014)
169. Gawne T.J. et al.: A multimodal magnetoencephalography 7 T fMRI and 7 T proton MR spectroscopy study in first episode psychosis.: NPJ Schizophr 6. 23 (2020)
170. Hjelmervik H. et al.: Intra-regional glu-GABA vs inter-regional glu-glu imbalance: a 1H-MRS study of the neurochemistry of auditory verbal hallucinations in schizophrenia.: Schizophr Bull 46. 633–642 (2020)
171. Jardri R. et al.: Are hallucinations due to an imbalance between excitatory and inhibitory influences on the brain?: Schizophr Bull 42. 1124–1134 (2016)
172. Firbank M.J. et al.: Reduced occipital GABA in parkinson disease with visual hallucinations.: Neurology 91. 675–685 (2018)
173. Levitan C. et al.: Superior temporal gyral volumes and laterality correlates of auditory hallucinations in schizophrenia.: Biol Psychiatry 46. 955–962 (1999)

174. Marshall M., J. Rathbone: Early intervention for psychosis.: *Schizophr Bull* 37. 1111–1114 (2011)
175. Buchmann A. et al.: Reduced mediodorsal thalamic volume and prefrontal cortical spindle activity in schizophrenia.: *Neuroimage* 102. 540–547 (2014)
176. Pakkenberg B.: Pronounced reduction of total neuron number in mediodorsal thalamic nucleus and nucleus accumbens in schizophrenics.: *Arch Gen Psychiatry* 47. 1023–1028 (1990)
177. Perez-Rando M. et al.: Alterations in the volume of thalamic nuclei in patients with schizophrenia and persistent auditory hallucinations.: *Neuroimage Clin* 35 (2022)
178. Popken G.J. et al.: Subnucleus-specific loss of neurons in medial thalamus of schizophrenics.: *Proc Natl Acad Sci USA* 97. 9276–9280 (2000)
179. Shimizu M. et al.: Structural abnormalities of the adhesio interthalamica and mediodorsal nuclei of the thalamus in schizophrenia.: *Schizophr Res* 101. 331–338 (2008)
180. Andreasen N.C. et al.: Hypofrontality in schizophrenia: distributed dysfunctional circuits in neuroleptic-naive patients.: *The Lancet* 349. 1730–1734 (1997)
181. Siegel B. et al.: Cortical-striatal-thalamic circuits and brain glucose metabolic activity in 70 unmedicated male schizophrenic patients.: *Am J Psychiatry* 150. 1325–1336 (1993)
182. Danos P.: Pathology of the thalamus and schizophrenia - an overview.: *Fortschr Neurol Psychiatr* 72. 621–634 (2004)
183. Houser C.R. et al.: GABA neurons are the major cell type of the nucleus reticularis thalami.: *Brain Re* 200. 341–354 (1980)
184. Ferrarelli F., G. Tononi: The thalamic reticular nucleus and schizophrenia.: *Schizophr Bull* 37. 306–315 (2011)
185. Jones E.G.: Thalamic circuitry and thalamocortical synchrony.: *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 357. 1659–1673 (2002)
186. Ferrarelli F. et al.: Thalamic dysfunction in schizophrenia suggested by whole-night deficits in slow and fast spindles.: *Am J Psychiatry* 167. 1339–1348 (2010)
187. Ferrarelli F., G. Tononi: Reduced sleep spindle activity point to a TRN-MD thalamus-PFC circuit dysfunction in schizophrenia.: *Schizophr Res* 180. 36–43 (2017)
188. Young A., R.D. Wimmer: Implications for the thalamic reticular nucleus in impaired attention and sleep in schizophrenia.: *Schizophr Res* 180. 44–47 (2017)
189. Van Hooijdonk C.F.M. et al.: The substantia nigra in the pathology of schizophrenia: a review on post-mortem and molecular imaging findings.: *Eur Neuropsychopharmacol* 68. 57–77 (2023)
190. Huhtaniska S. et al.: Long-term antipsychotic use and brain changes in schizophrenia - a systematic review and meta-analysis.: *Hum Psychopharmacol* 32. 2574 (2017)
191. Todtenkopf M.S., F.M. Benes: Distribution of glutamate decarboxylase65 immunoreactive puncta on pyramidal and nonpyramidal neurons in hippocampus of

- schizophrenic brain.: *Synapse* 29. 323–332 (1998)
192. Zink M. et al.: Differential effects of long-term treatment with clozapine or haloperidol on GABAA receptor binding and GAD67 expression.: *Schizophr Res* 66. 151–157 (2004)
193. Camps M. et al.: Dopamine receptors in human brain: autoradiographic distribution of D2 sites.: *Neuroscience* 28. 275–290 (1989)
194. Sakai K. et al.: Traditional and new antipsychotic drugs differentially alter neurotransmission markers in basal ganglia-thalamocortical neural pathways.: *Synapse* 39. 152–160 (2001)
195. Pandya M. et al.: Sex- and age-related changes in GABA signaling components in the human cortex.: *Biol Sex Differ* 10. 5 (2019)
196. Rozycka A., M. Liguz-Leczna: The space where aging acts: focus on the GABAergic synapse.: *Aging Cell* 16. 634–643 (2017)
197. Bielau H. et al.: Dysregulation of GABAergic neurotransmission in mood disorders: a postmortem study.: *Ann N Y Acad Sci* 1096. 157–169 (2007)
198. Fatemi S.H. et al.: Expression of GABAA  $\alpha 2$ -,  $\beta 1$ - and  $\epsilon$ -receptors are altered significantly in the lateral cerebellum of subjects with schizophrenia, major depression and bipolar disorder.: *Transl Psychiatry* 3. 303 (2013)
199. Selemon L.D., P.S. Goldman-Rakic: The reduced neuropil hypothesis: a circuit based model of schizophrenia.: *Biol Psychiatry* 45. 17–25 (1999)
200. Selemon L.D.: Abnormally high neuronal density in the schizophrenic cortex: a morphometric analysis of prefrontal area 9 and occipital area 17.: *Arch Gen Psychiatry* 52. 805 (1995)
201. Selemon L.D. et al.: Elevated neuronal density in prefrontal area 46 in brains from schizophrenic patients: application of a three-dimensional, stereologic counting method.: *J Comp Neurol* 392. 402–412 (1998)
202. Lieberman J.A. et al.: Hippocampal dysfunction in the pathophysiology of schizophrenia: a selective review and hypothesis for early detection and intervention.: *Mol Psychiatry* 23. 1764–1772 (2018)
203. Andreasen N.C. et al.: Progressive brain change in schizophrenia: a prospective longitudinal study of first-episode schizophrenia.: *Biol Psychiatry* 70. 672–679 (2011)
204. Bernstein H.-G. et al.: Bilaterally reduced claustral volumes in schizophrenia and major depressive disorder: a morphometric postmortem study.: *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* 266. 25–33 (2016)
205. Kreczmanski P. et al.: Volume, neuron density and total neuron number in five subcortical regions in schizophrenia.: *Brain* 130. 678–692 (2007)
206. Schielzeth H. et al.: Robustness of linear mixed-effects models to violations of distributional assumptions.: *Methods Ecol Evol* 11. 1152 (2020)
207. Martin S.B. et al.: Post-mortem degradation of brain glutamate decarboxylase.: *Neurochem Int* 42. 549–554 (2003)
208. Gravielle M.C.: Regulation of GABAA receptors by prolonged exposure to

- endogenous and exogenous ligands.: *Neurochem Int* 118. 96–104 (2018)
209. Malcolm R.J.: GABA systems, benzodiazepines, and substance dependence.: *J Clin Psychiatry* 64. 36–40 (2003)
210. Raol Y.H. et al.: Long-term effects of diazepam and phenobarbital treatment during development on GABA receptors, transporters and glutamic acid decarboxylase.: *Neuroscience* 132. 399–407 (2005)
211. Vadachkoria Z. et al.: Influence of halothane narcosis on a change of the number of GABA-positive cells in the hippocampus of adult rats with the midazolam premedication.: *Georgian Med News*. 46–50 (2011)
212. Zielasek J., W. Gaebel: Schizophrenia and other primary psychotic disorders in ICD-11.: *Fortschr Neurol Psychiatr* 86. 178–183 (2018)
213. Freund T., G. Buzaski: Interneurons of the hippocampus. In: *Hippocampus*. 6nd ed. S. 347-470. *Hippocampus* (1996)
214. Rudy B. et al.: Three groups of interneurons account for nearly 100% of neocortical GABAergic neurons.: *Dev Neurobiol* 71. 45–61 (2011)
215. Somogyi P., T. Klausberger: Defined types of cortical interneurone structure space and spike timing in the hippocampus: Interneurones structure space and spike timing in the hippocampus.: *J Physiol* 562. 9–26 (2005)
216. Vitalis T., J. Rossier: New insights into cortical interneurons development and classification: Contribution of developmental studies.: *Dev Neurobiol* 71. 34–44 (2011)
217. Benes F.: GABAergic interneurons implications for understanding schizophrenia and bipolar disorder.: *Neuropsychopharmacology* 25. 1–27 (2001)
218. Fish K.N. et al.: Altered parvalbumin basket cell terminals in the cortical visuospatial working memory network in schizophrenia.: *Biol Psychiatry* 90. 47–57 (2021)
219. Ruden J.B. et al.: Parvalbumin interneuron vulnerability and brain disorders.: *Neuropsychopharmacol.* 46. 279–287 (2021)
220. Maccaferri G.: Stratum oriens horizontal interneurone diversity and hippocampal network dynamics: Horizontal interneurons of the hippocampus.: *J Physiol* 562. 73–80 (2005)
221. Yanovsky Y. et al.: Activation of interneurons at the stratum oriens/alveus border suppresses excitatory transmission to apical dendrites in the CA1 area of the mouse hippocampus.: *Neuroscience* 77. 87–96 (1997)
222. Benes F.M. et al.: Regulation of the GABA cell phenotype in hippocampus of schizophrenics and bipolars.: *Proc Natl Acad Sci USA* 104. 10164–10169 (2007)
223. Benes F.M.: Amygdalocortical circuitry in schizophrenia: from circuits to molecules.: *Neuropsychopharmacology* 35. 239–257 (2010)
224. Benes F.M. et al.: Uncoupling of GABAA and benzodiazepine receptor binding activity in the hippocampal formation of schizophrenic brain.: *Brain Res* 755. 121–129 (1997)

## **Danksagung**

Zu besonders großem Dank bin ich meinem Betreuer verpflichtet: Herr Prof. Dr. Johann Steiner, leitender Oberarzt an der Universitätsklinik für Psychiatrie und Psychotherapie, supervidierte und förderte mich von Anfang an. Selbst im Urlaub an der Ostsee, nahm er sich die Zeit für ein Zoom-Meeting. Diese intensive, konstruktive und motivierende Betreuung insbesondere während des Publikationsprozesses, habe ich nie als selbstverständlich angesehen und sie hat maßgeblich dazu beigetragen, dass ich diese Arbeit fertigstellen konnte.

Ein weiteres großes Dankeschön geht an meine Forschungspartnerin Antonia Förster, ohne sie hätte die Arbeit nicht halb so viel Freude bereitet. Gegenseitig konnten wir uns beruhigen, wenn uns zu später Stunde mal das „Herz in die Hose gerutscht ist“, weil wir dachten, wir hätten bei den Berechnungen etwas übersehen. Antonia Förster war stets mit viel Elan und einem erfrischend klaren Kopf bei der Arbeit. Unsere nächtlichen Sprachnachrichten und unser rege Mailverkehr gestalteten den Arbeitsprozess gewinnbringend interaktiv.

Herzlich bedanken möchte ich mich auch bei Konstantin Schlaaf für seine große Unterstützung bei der Bildanalyse sowie bei der Veröffentlichung der Publikation. Herrn Dipl.-Ing. Henrik Dobrowolny danke ich für die zahlreichen Hilfestellungen bei der statistischen Datenanalyse.

Überdies gilt mein Dank allen Mitwirkenden im Publikationsprozess: Prof. i.R. Hans-Gert Bernstein, Prof i.R. Bernhard Bogerts, Prof. Dr. Thomas Frodl, Prof. Dr. Tomasz Gos, Dr. Paul C. Guest, Prof. Dr. Kolja Schlitz, Prof. Dr. Christian Mawrin und Gabriela Meyer-Lotz.

Eine herausragende Stellung in vielseitiger Hinsicht nehmen meine Familie und meine Freund:innen ein: Claude, Katja, Jan, Lars, Letizia, Julia, Cosima, Katharina, Victoria und Leni – vielen herzlichen Dank für eure fürsorgliche Unterstützung in allen Phasen der Entstehung dieser Arbeit!

## **Ehrenerklärung**

Ich erkläre, dass ich die der Medizinischen Fakultät der Otto-von-Guericke-Universität zur Promotion eingereichte Dissertation mit dem Titel

„Postmortale Analyse der Dichte GAD65/67-immunreaktiver Nervenfasern im Hirngewebe von Patienten mit Schizophrenie und Vergleichspersonen ohne neuropsychiatrische Erkrankung“

in der Universitätsklinik für Psychiatrie und Psychotherapie der Medizinischen Fakultät der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg mit Unterstützung durch Herrn Prof. Steiner sowie den Mitarbeiter:innen der experimentellen Psychiatrie ohne sonstige Hilfe durchgeführt und bei der Abfassung der Dissertation keine anderen als die dort aufgeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Bei der Abfassung der Dissertation sind Rechte Dritter nicht verletzt.

Ich habe diese Dissertation bisher an keiner in- oder ausländischen Hochschule zur Promotion eingereicht. Ich übertrage der Medizinischen Fakultät das Recht, weitere Kopien meiner Dissertation herzustellen und zu vertreiben.

Magdeburg, den 30.05.2024

---

Vera Model

## **Darstellung des Bildungsweges**

In dieser Version aus Datenschutzgründen nicht enthalten.

## **Publikationen**

Antonia Förster, Vera Model, Tomasz Gos, Thomas Frodl, Kolja Schlitz, Henrik Dobrowolny, Gabriela Meyer-Lotz, Paul C Guest, Christian Mawrin, Hans-Gert-bernstein, Bernhard Bogerts, Konstantin Schlaaff, Johann Steiner: Reduced GABAergic neuropil and interneuron profiles in schizophrenia: Complementary analysis of disease course-related differences: *Journal of Psychiatric Research*, Volume 145, Seite 50-59 (2022), ISSN 0022-3956

## Anhang

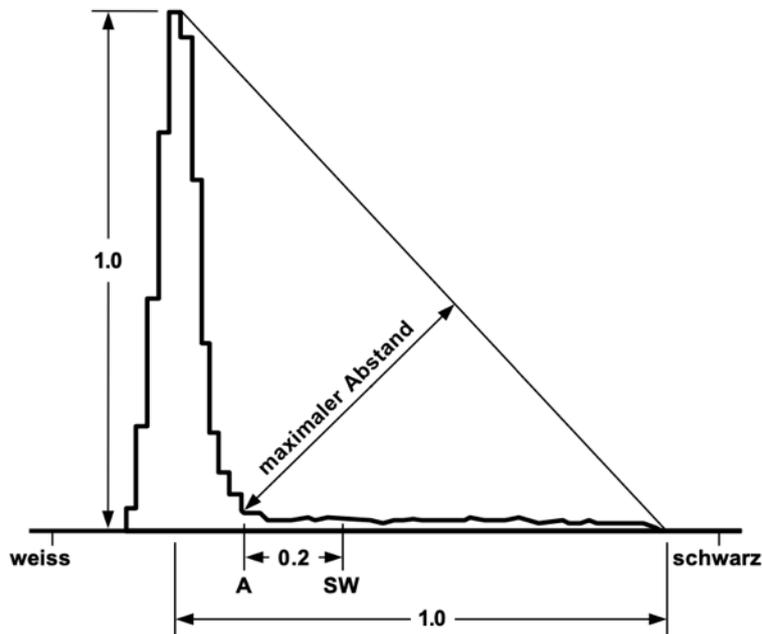


Abbildung A1: Intensitätshistogramm – Segmentationsverfahren („Triangle“)

*Anmerkungen:* Bestimmung des Schwellenwertes für jede Aufnahme einzeln. Größtmöglicher Abstand zwischen der Hypotenuse und der Kurve des Intensitätshistogramms. Bestimmung des Punktes A auf der Ordinate wie dargestellt und jeweils Addition des konstanten Faktors 0.2 entspricht dem Schwellenwert. Modifiziert nach Zack et al. (1977) (158).  
*Abkürzungen:* SW – Schwellenwert.

Tabelle A1: Filterkriterien – GAD-ir Zellen

Region	Größe	Rundheit
STG Schicht III	28 - $\infty$	0,22-1,00
STG Schicht V	30 - $\infty$	0,22-1,00
MD	44 - $\infty$	0,30-1,00
LD	65 - $\infty$	0,20-1,00
CA1	30 - $\infty$	0,27-1,00
DG	40 - $\infty$	0,30-1,00

*Anmerkungen:* Aus Förster, Model et al. 2022 (149).

*Abkürzungen:* CA1 – CA1- Region des Hippocampus, DG – Gyrus dentatus, LD – laterodorsaler Thalamus, MD – mediodorsaler Thalamus, STG III – Gyrus temporalis superior Schicht III, STG V – Gyrus temporalis superior Schicht V.

Tabelle A2: Übersicht Methodenvergleich

Methode	Manuell, softwaregestützte, quantitative Analyse	Automatisierte, quantitative Analyse
Angewendet in	Gos et al (2009; 2012) <sup>1)</sup> und Steiner et al (2016) <sup>2)</sup>	Vorliegende Arbeit
Evaluierte Fläche pro Region und Hirnschnitt	In Steiner et al (2016): <sup>2)</sup> SGT III und V: $6 \times 0,34 \pm 0,04 \text{mm}^2$ LD: $6 \times 0,12 \pm 0,05 \text{mm}^2$ MD: nicht evaluiert CA1: $6 \times 0,34 \pm 0,04 \text{mm}^2$ DG: $6 \times 0,12 \pm 0,05 \text{mm}^2$	STG III und V: $20 \times 0,35 \text{mm}^2 \pm 0,01 \text{mm}^2$ LD: $20 \times 0,35 \text{mm}^2 \pm 0,01 \text{mm}^2$ MD: $20 \times 0,35 \text{mm}^2 \pm 0,01 \text{mm}^2$ CA1: $10 \times 0,35 \text{mm}^2 \pm 0,01 \text{mm}^2$ DG: $2 \times 0,32 \text{mm}^2 \pm 0,13 \text{mm}^2$
Filterkriterien	GAD-ir Nervenfasern: Größe 0-20 $\mu\text{m}^2$  GAD-ir Zellen: manuelles Löschen der Zellkörper	GAD-Nervenfasern: Größe 0-20 $\mu\text{m}^2$  GAD-ir Zellen: Regionenspezifische Filterkriterien gemäß Förster, Model et al. (2022) (149), anschließend von unkorrigierter Selektion der GAD-ir Nervenfasern subtrahiert
Schwellwertbestimmung	Manuelle Schwellwertbestimmung für jede Aufnahme durch visuellen Abgleich	Automatische Schwellwertbestimmung mit dem Segmentationsverfahren „Triangle“
Retest-Reliabilität	ICC zwischen 0,9 und 1,0 in 5 Gehirnen	$r_c = 0,999$ und 95%-KI [0,999; 1,000] für 100 Aufnahmen
Interrater-Reliabilität	ICC zwischen 0,9 und 1,0 in 5 Gehirnen	$r_c = 1,000$ und 95%-KI [1,000; 1,000] für 100 Aufnahmen
Konstruktvalidität zwischen den Methoden	-	$r_c = 0,984$ und 95%-KI [0,976; 0,989] für 100 Aufnahmen (siehe Abb. 11)

Anmerkungen: <sup>1)</sup> (70, 159), <sup>2)</sup> (1)

Abkürzungen: CA1 – CA1- Region des Hippocampus, DG – Gyrus dentatus, ICC – Interklassen-Korrelationskoeffizient, KI – Konfidenzintervall, LD – laterodorsaler Thalamus, MD – mediodorsaler Thalamus,  $r_c$  – Konkordanz-Korrelationskoeffizient nach Lin, STG III – Gyrus temporalis superior Schicht III, STG V – Gyrus temporalis superior Schicht V.

Tabelle A3: Vergleich GAD-ir Nervenfasern zwischen den Diagnosegruppen

Analyse	Diagnose	GAD-Nervenfaserdichte [%] Median (q1; q3; n)	Region	Haupteffekte und Interaktionen	Test Wert F (dF Zähler, dF Nenner)	P-Wert
Gesamt LMM-Analyse	scz	1,329 (1,237; 1,669; 16)	<b>Alle Regionen</b>	Region	34,916 (4,111)	<b>&lt;0,001*</b>
	con	1,511 (1,301; 1,838; 16)		Diagnose	14,278 (1,194)	<b>&lt;0,001*</b>
				Hemisphäre	1,083 (1,194)	0,299
				Region x Diagnose	2,267 (4,111)	<b>0,067</b>
				Region x Hemisphäre	0,514 (4,111)	0,725
				Diagnose x Hemisphäre	0,109 (4,194)	0,741
				Region x Hemisphäre x Diagnose	0,279 (4,111)	0,891
post-hoc LMM-Analyse	scz	1,274 (1,120; 1,501; 16)	<b>STG III</b>	Diagnose	1,970 (1,47)	0,167
	con	1,326 (1,224; 1,508; 15)		Hemisphäre	3,868 (1,47)	<b>0,055</b>
				Diagnose x Hemisphäre	2,362 (1,47)	0,131
	scz	1,124 (1,085; 1,519; 16)	<b>STG V</b>	Diagnose	6,802 (1,58)	<b>0,012*</b>
	con	1,409 (1,238; 1,615; 15)		Hemisphäre	1,762 (1,58)	0,190
				Diagnose x Hemisphäre	0,236 (1,58)	0,629
	scz	1,866 (1,345; 2,138; 16)	<b>MD</b>	Diagnose	13,031 (1,58)	<b>0,001*</b>
	con	2,584 (1,729; 2,855; 15)		Hemisphäre	0,003 (1,58)	0,957
				Diagnose x Hemisphäre	0,001 (1,58)	0,979
	scz	1,583 (1,261; 2,057; 16)	<b>LD</b>	Diagnose	1,447 (1,60)	0,234
	con	2,073 (1,729; 2,673; 16)		Hemisphäre	0,120 (1,60)	0,957
				Diagnose x Hemisphäre	0,163 (1,60)	0,979
	scz	1,183 (1,055; 1,452; 16)	<b>CA1</b>	Diagnose	0,027 (1,56)	0,871
	con	1,346 (1,334; 1,494; 15)		Hemisphäre	0,007 (1,58)	0,923
		Diagnose x Hemisphäre		0,113 (1,58)	0,738	
scz	1,478 (1,330; 1,721; 16)	<b>DG</b>	Diagnose	2,025 (1,58)	0,160	
con	1,656 (1,504; 1,958; 16)		Hemisphäre	1,347 (1,58)	0,251	
			Diagnose x Hemisphäre	0,181 (1,58)	0,672	

Anmerkungen: Signifikante P-Werte sind mit einem Sternchen markiert (\*p < 0,05). P-Werte mit Trend in Richtung statistischer Signifikanz (p < 0,1) sind fett markiert. Entspricht Tab. 7.

Abkürzungen: CA1 – CA1- Region des Hippocampus, con – Kontrollgruppe, dF – Freiheitsgrad, DG – Gyrus dentatus, LD – laterodorsaler Thalamus, MD – mediodorsaler Thalamus, scz – Schizophrenie-Kohorte, STG III – Gyrus temporalis superior Schicht III, STG V – Gyrus temporalis superior Schicht V, q1 und q3 – unteres und oberes Quartil.

Tabelle A4: Vergleich GAD-ir Nervenfasern zwischen den diagnostischen Subgruppen

Analyse	Diagnose	GAD-ir Nervenfaserdichte	Haupteffekte und Interaktionen	Test Wert F	P-Wert
		[%] Median (q1; q3; n)		(dF Zähler, dF Nenner)	
Probatorische LMM-Analysen Alter	par res	1,312 (1,207; 1,598; 10)	Region	12,735 (4,53)	<b>&lt;0,001*</b>
		1,528 (1,195; 1,917; 6)	Subgruppe	7,418 (1,124)	<b>&lt;0,001*</b>
			Hemisphäre	0,265 (1,86)	0,608
			Alter [Jahre]	1,151 (1,118)	0,286
			Region x Subgruppe	0,913 (4,53)	0,463
			Region x Hemisphäre	0,117 (4,53)	0,976
			Subgruppe x Hemisphäre	0,000 (1,86)	0,988
			Region x Hemisphäre x Subgruppe	0,082 (4,53)	0,988
			Subgruppe x Alter [Jahre]	84,584 (1,118)	<b>0,034*</b>
	Probatorische LMM-Analyse Krankheitsdauer	par res	1,312 (1,207; 1,598; 10)	Region	13,820 (4,54)
1,528 (1,195; 1,917; 6)			Subgruppe	18,418 (1,142)	<b>&lt;0,001*</b>
			Hemisphäre	0,280 (1,85)	0,598
			Krankheitsdauer [Jahre]	8,521 (1,125)	<b>0,004*</b>
			Region x Subgruppe	0,991 (4,54)	0,421
			Region x Hemisphäre	0,124 (4,54)	0,973
			Subgruppe x Hemisphäre	0,000 (1,85)	0,983
			Region x Hemisphäre x Subgruppe	0,085 (4,54)	0,987
			Subgruppe x Krankheitsdauer [Jahre]	10,535 (1,125)	<b>0,002*</b>
Probatorische LMM-Analyse Anti-psychotika	par res	1,312 (1,207; 1,598; 10)	Region	11,279 (4,38)	<b>&lt;0,001*</b>
		1,528 (1,195; 1,917; 6)	Subgruppe	0,815 (1,93)	0,369
			Hemisphäre	0,704 (1,45)	0,406
			CPZ [mg]	14,659 (1,76)	<b>&lt;0,001*</b>
			Region x Subgruppe	0,902 (4,38)	0,472
			Region x Hemisphäre	0,234 (4,38)	0,918
			Subgruppe x Hemisphäre	0,051 (1,53)	0,822
			Subgruppe x CPZ [mg]	20,485 (1,76)	<b>&lt;0,001*</b>
			Region x Hemisphäre x Subgruppe	0,242 (4,38)	0,913
Gesamte LMM-Analyse <sup>a</sup>	par res	1,312 (1,207; 1,598; 10)	Region	15,628 (4,33)	<b>&lt;0,001*</b>
		1,528 (1,195; 1,917; 6)	Subgruppe	0,815 (1,93)	0,369
			Hemisphäre	0,704 (1,45)	0,406
			Alter [Jahre]	1,021 (1,88)	0,315
			CPZ [mg]	35,164 (1,88)	<b>&lt;0,001*</b>
			Krankheitsdauer [Jahre]	24,092 (1,88)	<b>&lt;0,001*</b>
			Subgruppe x Region	1,387 (4,33)	0,260
			Subgruppe x Hemisphäre	0,071 (1,45)	0,836
			Subgruppe x Alter [Jahre]	8,182 (1,88)	<b>0,005*</b>
			Subgruppe x CPZ [mg]	35,164 (1,88)	<b>&lt;0,001*</b>
			Subgruppe x Krankheitsdauer	7,148 (1,88)	<b>0,009*</b>
			Region x Hemisphäre	0,350 (4,33)	0,842
			Region x Subgruppe x Hemisphäre	0,354 (4,31)	0,839

Anmerkungen: Signifikante P-Werte sind mit einem Sternchen markiert (\*p < 0.05). P-Werte mit Trend in Richtung statistischer Signifikanz (p < 0,01) sind fett markiert. Entspricht Tab. 8.

Abkürzungen: CPZ – mittlere Tagesdosis der antipsychotischen Medikation in den letzten 90 Tagen vor dem Tod umgerechnet in Chlorpromazin-Äquivalente, dF – Freiheitsgrad, par – paranoide Kohorte, res – residuale Kohorte, q1 und q3 – unteres und oberes Quartil.

<sup>a</sup> Gesamte LMM-Analyse zwischen den beiden diagnostischen Subgruppen mit den identifizierten konfundierenden Variablen für alle Regionen.

Tabelle A5: statistisches Verhältnis von GAD-ir Nervenfasern und GAD-ir Zellen zueinander - Diagnosegruppen

Analyse	Diagnose	Region	Haupteffekte und Interaktionen	Test Wert F	P-Wert
				(dF Zähler, dF Nenner)	
LMM-Analyse	scz con	<b>Alle Regionen</b>	Region	101,153 (4,103)	<b>&lt;0,001*</b>
			Diagnose	5,286 (1,198)	<b>0,023*</b>
			Hemisphäre	1,133 (1,192)	0,288
			GAD-ir Parameter	476,725 (1,185)	<b>&lt;0,001*</b>
			Alter [Jahre]	0,883 (1,236)	0,348
			Region x Diagnose	1,946 (4,103)	0,108
			Region x Hemisphäre	0,520 (4,110)	0,721
			Diagnose x Hemisphäre	0,113 (1,192)	0,737
			Alter [Jahre] x Diagnose	1,646 (1,236)	0,201
			Region*Hemisphäre x Diagnose	0,281 (4,110)	0,890
			GAD-ir Parameter x Diagnose	3,691 (1,185)	<b>0,056</b>
			GAD-ir Parameter x Diagnose x Region	51,250 (8,103)	<b>&lt;0,001*</b>

Anmerkungen: Signifikante P-Werte sind mit einem Sternchen markiert (\*p < 0,05). P-Werte mit Trend in Richtung statistischer Signifikanz (p < 0,01) sind fett markiert. Entspricht Tab. 10.

Abkürzungen: con – Kontrollgruppe, dF – Freiheitsgrad, scz – Schizophrenie-Kohorte.

Tabelle A6: statistisches Verhältnis von GAD-ir Nervenfasern und GAD-ir Zellen zueinander - diagnostische Subgruppen

Analyse	Diagnose	Region	Haupteffekte und Interaktionen	Test Wert F	P-Wert
				(dF Zähler, dF Nenner)	
LMM-Analyse	par res	<b>Alle Regionen</b>	Region	53,257 (4,41)	<b>&lt;0,001*</b>
			Subgruppe	5,402 (1,82)	<b>0,023*</b>
			Hemisphäre	0,729 (1,45)	0,389
			GAD-ir Parameter	269,256 (1,75)	<b>&lt;0,001*</b>
			Alter [Jahre]	1,079 (1,88)	0,302
			CPZ [mg]	37,086 (1,88)	<b>&lt;0,001*</b>
			Krankheitsdauer [Jahre]	25,012 (1,88)	<b>&lt;0,001*</b>
			Region x Subgruppe	2,089 (4,41)	0,100
			Region x Hemisphäre	0,355 (4,33)	0,839
			Subgruppe x Hemisphäre	0,072 (1,45)	0,789
			GAD-Parameter x Subgruppe	6,875 (1,75)	<b>0,011*</b>
			Alter [Jahre] x Subgruppe	9,115 (1,88)	<b>0,003*</b>
			CPZ [mg] x Subgruppe	18,977 (1,88)	<b>&lt;0,001*</b>
			Krankheitsdauer [Jahre] x Subgruppe	6,466 (1,88)	<b>0,013*</b>
			Region x Hemisphäre x Subgruppe	0,363 (4,33)	0,833
			Region x Subgruppe x GAD-ir Parameter	27,507 (1,41)	<b>&lt;0,001*</b>

Anmerkungen: Signifikante P-Werte sind mit einem Sternchen markiert (\*p < 0,05). P-Werte mit Trend in Richtung statistischer Signifikanz (p < 0,01) sind fett markiert. Entspricht Tab. 11.

Abkürzungen: CPZ – mittlere Tagesdosis der antipsychotischen Medikation in den letzten 90 Tagen vor dem Tod umgerechnet in Chlorpromazin-Äquivalente, dF – Freiheitsgrad, par – paranoide Kohorte, res – residuale Kohorte.