

Aus der Universitätsklinik und Poliklinik für Psychiatrie, Psychotherapie und Psychosomatik
der Medizinischen Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

(Direktor: Prof. Dr. med. Dan Rujescu)

**Assoziation von Polymorphismen des CREB1-Gens mit Veränderungen der
N1-Amplitude im EEG als Endophänotyp der Schizophrenie**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Medizin (Dr. med.)

vorgelegt

der Medizinischen Fakultät

der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Grit Büchner-Mögling

geboren am 12.09.1986 in Lutherstadt Eisleben

Betreuerin: PD Dr. rer. biol. hum. Ina Giegling (Dipl.-Psych.)

Gutachter: PD Dr. rer. biol. hum. Ina Giegling (Dipl.-Psych.)

Prof. Dr. med. Jürgen Gallinat, Hamburg

Prof. Dr. med. Ulrich Hegerl, Leipzig

26.01.2017

01.11.2017

Referat

Die Schizophrenie gehört zu den schwerwiegendsten psychiatrischen Erkrankungen, von der in der Bevölkerung etwa jeder Hundertste betroffen ist. Eine genetische Komponente ist als eine der Ursachen für die Krankheitsentstehung nachgewiesen. Eine Vielzahl von Genen wird mit dieser in Verbindung gebracht und es kommen stetig neu entdeckte Risikogene hinzu. Das CREB1-Gen ist eines der Gene, die in Studien als vielversprechend bezüglich einer möglichen Assoziation mit der Schizophrenie erachtet wurden. Eine Möglichkeit, die Identifizierung krankheitsverursachender Gene bei komplexen Erkrankungen wie der Schizophrenie zu erleichtern, zeigt das Endophänotypenkonzept auf: So werden etwa neurophysiologische Phänotypen, die mit einer Erkrankung einhergehen, einbezogen. Bei schizophrenen Patienten wurde in verschiedenen Arbeiten eine verminderte N1-Amplitude im EEG festgestellt und diese als möglicher Endophänotyp erwogen.

In dieser Arbeit wurde die N1-Amplitude im EEG (über Cz/zentrale Elektrode und Fz/frontale Elektrode) und die Aktivität definierter Hirnbereiche während dieser als Endophänotyp der Schizophrenie gewählt und auf mögliche Assoziationen mit neun Polymorphismen und Haplotypen des CREB1-Gens untersucht. Dazu wurden neun SNPs von 508 schizophrenen Patienten und 1319 Kontrollprobanden in einem dreistufigen Laborverfahren genotypisiert. Aus dieser Stichprobe sind EEG-Daten zur N1 bei 92 Patienten und 254 Kontrollen erhoben worden. Es konnten in verschiedenen Probandengruppen für sieben SNPs und drei Haplotypen Assoziationen zu den untersuchten Phänotypen ermittelt werden. Am häufigsten ließ sich ein Bezug zur Größe der N1-Amplitude feststellen. Zwei Polymorphismen sind diesbezüglich hervorzuheben: SNP rs2551640 zeigte über Cz signifikante Assoziationen in der Kontroll- und Gesamtgruppe und einen Trend zur Assoziation bei den Patienten. Über Fz wurden signifikante Assoziationen in der Patienten- und Gesamtgruppe festgestellt sowie ein Trend zur Assoziation bei den Kontrollen. Sowohl über Cz als auch über Fz war in allen Gruppen bei Genotyp A/A die größte Amplitude und bei G/G die geringste zu beobachten. Für SNP rs2254137 wurden über Cz signifikante Assoziationen in der Gesamt- und Patientengruppe und ein Trend zur Assoziation bei den Kontrollen festgestellt. Bei allen Gruppen wurde die größte Amplitude bei Genotyp A/A und die geringste bei C/C gemessen. Die ermittelten Ergebnisse sind in dieser Form neu, ähnliche Studien sind bisher nicht publiziert worden. Der Aspekt einer möglichen Assoziation von SNPs des CREB1-Gens mit den untersuchten Phänotypen sollte durch zukünftige Studien weiter untersucht werden.

Büchner-Mögling, Grit: Assoziation von Polymorphismen des CREB1-Gens mit Veränderungen der N1-Amplitude im EEG als Endophänotyp der Schizophrenie, Halle (Saale), Univ., Med. Fak., Diss., 79 Seiten, 2016

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung.....	1
1.1 Die Schizophrenie.....	1
1.1.1 Symptomatik und Verlauf.....	1
1.1.2 Epidemiologie.....	2
1.1.3 Ätiologie	2
1.1.4 Die Genetik der Schizophrenie.....	4
1.2 Das Konzept der Endophänotypen.....	7
1.3 Das ereigniskorrelierte Potential N1.....	8
1.3.1 Grundlagen.....	8
1.3.2 Beschreibung der N1.....	8
1.3.3 N1 und Schizophrenie.....	9
1.4 Das CREB1-Gen.....	11
1.4.1 Das CREB1-Gen und psychiatrische Erkrankungen.....	12
1.4.2 Das CREB1-Gen und Schizophrenie	13
1.5 Der Transkriptionsfaktor CREB1.....	14
1.5.1 Signalwege und Funktion.....	14
1.5.2 Der Einfluss von CREB1 auf Körpervorgänge und Erkrankungen	17
2 Zielstellung.....	19
3 Material und Methoden.....	20
3.1 Studiendesign	20
3.2 Studienteilnehmer.....	20
3.2.1 Kontrollprobanden.....	20
3.2.2 Patienten.....	21
3.3 EEG-Ableitung und Aufbereitung.....	22
3.3.1 Paradigma.....	22
3.3.2 EEG-Aufzeichnung.....	22
3.3.3 LORETA-Analyse.....	23
3.4 Laborverfahren.....	24
3.4.1 DNA-Extraktion.....	25
3.4.2 Konzentrationseinstellung der DNA.....	26
3.4.3 Genotypisierung.....	27

Inhaltsverzeichnis

3.4.4 Polymerase Kettenreaktion (PCR).....	28
3.4.5 Dephosphorylierung der PCR-Produkte.....	29
3.4.6 iPLEX-Reaktion (Primerextensionsreaktion).....	30
3.4.7 Messung der Extensionsprodukte (MALDI-TOF-Analyse).....	31
3.4.8 Qualitätskontrolle.....	32
3.5 Statistische Auswertung.....	32
4 Ergebnisse.....	34
4.1 Zusammensetzung der Studienteilnehmer der EEG-Stichprobe.....	34
4.2 Ergebnisse der Einzel-SNP-Analyse.....	35
4.2.1 SNP rs2253206.....	35
4.2.2 SNP rs2551640.....	36
4.2.3 SNP rs2709356.....	38
4.2.4 SNP rs2551921.....	40
4.2.5 SNP rs2254137.....	41
4.2.6 SNP rs2709392.....	43
4.2.7 SNP rs2464978.....	44
4.2.8 SNP rs2709376 und SNP rs2551922.....	45
4.3 Ergebnisse der Haplotypanalyse	46
5 Diskussion.....	48
5.1 Diskussion der Methoden.....	50
5.2 Inhaltliche Diskussion.....	51
5.2.1 Das CREB1-Gen.....	51
5.2.2 Der Transkriptionsfaktor CREB1.....	53
5.2.3 Der Transkriptionsfaktor CREB1 und seine Signalwege.....	54
5.2.4 Die Glutamathypothese.....	56
5.2.5 Die N1-Amplitude und Schizophrenie.....	58
5.2.6 Ausblick.....	60
6 Zusammenfassung.....	62
7 Literaturverzeichnis.....	64
8 Thesen.....	76
9 Tabellenanhang.....	77

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis

A ₁	Referenzallel (minores Allel)
A ₂	Allel 2 (majores Allel)
AC	Adenylcyclase
ACC	anteriöer cingulärer Cortex
AML	Akute myeloische Leukämie
ANK3	Ankyrin 3
APOE	Apolipoprotein E
ATF1	<i>Activating transcription factor</i>
B	Regressionskoeffizient
BA22	Brodmann-Areal 22
BA41	Brodmann-Areal 41
BDNF	<i>Brain-derived neurotrophic factor</i>
BESA	Dipolquellenanalyse
Ca ²⁺ -CaM	Ca ²⁺ -Calmodulin- Komplex
CACNA1C	<i>Calcium channel, voltage-dependent, L type, alpha 1C</i>
CAD	<i>Constitutive active domain</i>
CaMKIV	Ca ²⁺ -Calmodulin-abhängige Kinase IV
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
CBP	<i>CREB binding protein</i>
CEPH	<i>Centre d'Etude du Polymorphisme Humain</i>
CNV	<i>Copy number variation</i>
COMT	Catechol-O-methyltransferase
CRE	<i>cAMP responsive element</i>
CREB	<i>cAMP response element binding protein</i>
CREB1	<i>cAMP response element binding protein 1</i>
CREBBP	<i>CREB binding protein</i>
CREM	<i>cAMP response element modulator</i>
DAO	<i>D-amino-acid oxidase</i>
dB	Dezibel
ddNTP	Didesoxynukleotide
DRD1, 2, 4	<i>Dopamine receptor D1, D2, D4</i>
DSM IV	Diagnostisches und Statistisches Manual Psychischer Störungen 4. Auflage

Abkürzungsverzeichnis

DTNBP1	<i>Dystrobrevin binding protein 1</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EEG	Elektroenzephalogramm
EKP	ereigniskorreliertes Potential
ERK	<i>Extracellular-signal Regulated Kinase</i>
GABA	γ -Aminobuttersäure
GABRB2	<i>Gamma-aminobutyric acid receptor beta 2</i>
GHCl	Guanidinhydrochlorid
GIRK2	<i>G-protein-regulated inward-rectifier potassium channel 2</i>
GPR	G-Protein-gekoppelter Rezeptor
GRIA1	<i>Glutamate receptor, ionotropic, AMPA 1</i>
GRIN2A, GRIN2B	<i>Glutamate receptor, ionotropic, N-methyl D-aspartate 2A, 2B</i>
GRM3	<i>Glutamate receptor, metabotropic 3</i>
GWAS	Genomweite Assoziationsstudie
HP	Haptoglobin
HWE	Hardy-Weinberg-Equilibrium
Hz	Hertz
IL-10	Interleukin-10
IL1B	Interleukin 1, beta
ISI	Interstimulus-Intervall
ITIH3, ITIH4	<i>Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain 3, 4</i>
KID	<i>Kinase inducible domain</i>
KCNJ6	<i>Potassium channel, inwardly rectifying subfamily J member 6</i>
LD	<i>Linkage Disequilibrium</i>
LORETA	<i>Low-resolution electromagnetic tomography</i>
MALDI-TOF MS	<i>Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-Of-Flight Mass Spectrometry</i>
MAPKAP K2	Mitogen-aktivierte Proteinkinase aktivierte Proteinkinase 2
MEG	Magnetencephalographie
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
mGluR	metabotroper Glutamatrezeptor
MHC	<i>Major-Histocompatibility Complex</i>
MIR137	<i>microRNA 137</i>
MK-801	<i>Dizocilpin</i>
mM	Millimol pro Liter

Abkürzungsverzeichnis

μM	Mikromol pro Liter
MMN	<i>Mismatch negativity</i>
MMST	<i>Mini-Mental-Status-Test</i>
MSK	Mitogen- und Stressinduzierte Kinase
MTHFR	Methylenetetrahydrofolat-Reduktase
MWAS	Methylomweite Assoziationsstudie
μV	Mikrovolt
M	Mittelwert
n	Anzahl der Probanden
N1/N100	negative EKP-Komponente etwa 100ms nach Reizdarbietung
N2/N200	negative EKP-Komponente etwa 200ms nach Reizdarbietung
N400	negative EKP-Komponente etwa 400ms nach Reizdarbietung
nA/mm^2	Nanoampere pro Quadratmillimeter (Stromdichte)
NF- κB	<i>Nuclear factor-κB</i>
nM	Nanomol pro Liter
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
NMDAR	N-Methyl-D-Aspartat-Rezeptor
NRGN	Neurogranin
NRXN1	Neurexin 1
P2	positiver EKP-Gipfel etwa 200ms nach Reizdarbietung
P50	positiver EKP-Gipfel etwa 50ms nach Reizdarbietung
P3/300	positiver EKP-Gipfel etwa 300ms nach Reizdarbietung
p38 MAPK	p38-mitogen aktivierte Proteinkinase
PANSS	<i>Positive and Negative Syndrome Scale</i>
PCP	Phencyclidin
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> , Polymerase-Kettenreaktion
PKA/PKB	Proteinkinase A/Proteinkinase B
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PLXNA2	Plexin A2
PN	<i>Processing negativity</i>
Ras	<i>Rat sarcoma</i>
RNA	Ribonukleinsäure
ROI	<i>Region of interest</i>
rpm	<i>revolutions per minute</i> , Umdrehungen pro Minute
RSK	p90-ribosomale S6-Kinase

Abkürzungsverzeichnis

RTK	Rezeptor-Tyrosinkinase
SAP	Shrimp Alkalische Phosphatase
SD	Standardabweichung
SE	Standardfehler
SKID I/II	Strukturiertes klinisches Interview nach DSM-IV I/II
SLC6A4	<i>Solute carrier family 6 (neurotransmitter transporter), member 4</i>
SNP	<i>Single Nucleotide Polymorphism</i> , Einzelnukleotid-Polymorphismus
SRR	Serin-Racemase
TCF4	Transkriptionsfaktor 4
TP53	Tumor-Protein p53
TPH1	Tryptophanhydroxylase 1
TRIS	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
U	Unit
VESTAL	<i>Vector-based spatial-temporal minimum Li-norm</i> Analyse
VIPR2	<i>Vasoactive intestinal peptide receptor 2</i>
ZNF804A	Zinkfinger-Protein 804A

Einleitung

1. Einleitung

1.1 Die Schizophrenie

Die Schizophrenie gehört zu den schwerwiegendsten psychiatrischen Erkrankungen und ist als endogene Psychose mit einer vielfältigen Symptomatik verbunden.

1.1.1 Symptomatik und Verlauf

Das DSM-IV, ein weltweit etabliertes Klassifikationssystem psychischer Störungen, beschreibt charakteristische Symptome der Schizophrenie: Es können sogenannte positive und negative Symptome auftreten. Zur Positivsymptomatik zählen (vor allem akustische) Halluzinationen, Wahnphänomene (z.B. Verfolgungswahn), Ich-Störungen wie Gedankeneingebung und -entzug, desorganisierte Sprachäußerungen und grob desorganisiertes Verhalten. Typische Negativsymptome sind Affektverflachung, Alogie und Willensschwäche. Die Erkrankung ist verbunden mit erheblichen Leistungseinbußen im sozialen und beruflichen Bereich, z.B. durch sozialen Rückzug und Leistungsminderung. Keines der beschriebenen Symptome ist pathognomonisch für die Schizophrenie. Vor der Diagnose wird der Ausschluss schizoaffectiver und affektiver Störungen bzw. Substanzeinfluss verlangt. Fünf Subtypen der Schizophrenie, die sich auf das zuletzt auffällig gewordene Zustandsbild stützen, sind zu unterscheiden: paranoider, desorganisierter, katatoner, undifferenzierter und residualer Typus (Saß et al., 2003).

Das häufigste Symptom der Schizophrenie im Gesamtverlauf und auch das häufigste Initialsymptom in der Prodromalphase ist die depressive Verstimmung (Häfner et al., 2013).

Während die psychotischen Symptome herausragend sind, werden auch zunehmend kognitive Probleme als wesentlich für die Erkrankung betrachtet. Diese schließen Beeinträchtigungen der Aufmerksamkeit, des Arbeitsgedächtnisses, von Lernvorgängen, des Redeflusses, der motorischen Geschwindigkeit und der exekutiven Funktionen ein. Positiv- und Negativsymptome können fluktuieren, wobei die kognitiven Defizite relativ beständig sind (Ross et al., 2006).

Der Langzeitverlauf ist sehr individuell und kann kaum vorausgesagt werden. Mehr als die Hälfte der Patienten erholt sich nicht wieder vollständig bzw. entwickelt ein Rezidiv, sehr wenige haben nach einer einzigen Episode eine Vollremission. Mindestens die Hälfte ist arbeitslos oder lebt von Erwerbsunfähigkeitsrente (Bromet et al., 2005).

Einleitung

Die Ernsthaftigkeit der Erkrankung zeigt sich auch in einer drastisch erhöhten Suizidalität im Vergleich zur Allgemeinbevölkerung. Man schätzt, dass etwa 10% der schizophrenen Patienten Suizid begehen (Siris, 2001). Andere Studien gehen von etwa 5% aus (Hor und Taylor, 2010).

1.1.2 Epidemiologie

Ungefähr 1% der Bevölkerung weltweit ist an Schizophrenie erkrankt (Freedman, 2003). Weder geografische noch kulturelle Unterschiede zwischen den Ländern zeigen einen Einfluss auf die Erkrankungshäufigkeit (Andreasen, 2000; Saha et al., 2006).

Die Schizophrenie ist eine Erkrankung aller Lebensalter, ohne erheblichen Unterschied zwischen den Geschlechtern, wenn die Inzidenzraten über das gesamte Leben betrachtet werden. In den einzelnen Lebensphasen ergeben sich Unterschiede. Ein steiler Gipfel der Ersterkrankungen ist beim männlichen Geschlecht im Alter von 15 – 24 Jahren festzustellen. Beim weiblichen ergeben sich zwei Gipfel: im Lebensalter von 15 – 29 Jahren und von 45 – 49 Jahren. Die Ursache hierfür ist vermutlich eine protektive Wirkung des Östrogens, das nach der Menopause abnimmt (Häfner et al., 2013).

1.1.3 Ätiologie

Für die Krankheitsentstehung der Schizophrenie wird eine multifaktorielle Ätiopathogenese angenommen, bei der unter anderem genetische, neurostrukturelle, neurochemische und psychosoziale Faktoren diskutiert werden.

Eine Vielzahl an Umweltfaktoren wird hinsichtlich der Krankheitsentwicklung untersucht. In einigen Studien wurden maternale Infektionen und Nährstoffmangel während der Schwangerschaft ebenso als Risikofaktoren identifiziert, wie ein erhöhtes paternales Alter und fetale Hypoxie (Tandon et al., 2008).

Auch psychischer Stress der Mutter während der Schwangerschaft wird als risikosteigernd angenommen. Zuletzt wurde diesbezüglich der Blick auch immer mehr auf eine veränderte epigenetische Regulation gelegt, d.h. eine veränderte Genaktivität. Perinataler Stress wird beispielsweise mit einer Veränderung der DNA-Methylierung in Verbindung gebracht, die als epigenetische Signatur angesehen wird (Babenko et al., 2014).

Dysbalancen in verschiedenen Transmittersystemen des Gehirns werden als kausal diskutiert. Die bekannteste Theorie ist die Dopaminhypothese, die darauf basiert, dass die Wirkung zahlreicher antipsychotischer Medikamente auf einer Blockade der dopaminergen D2-

Einleitung

Rezeptoren beruht, sodass eine dopaminerge Überaktivität als ursächlich für die psychotische Symptomatik der Schizophrenie angenommen wird (Snyder, 2006). Diese Hyperaktivität könnte eine Reaktion auf eine primäre Hypoaktivität des Dopaminsystems und Ursache für die Negativ-Symptomatik sein (Zaudig, 2006), wobei Antipsychotika, die eine hohe Affinität zu D2-Rezeptoren besitzen, kaum auf die Negativ-Symptomatik wirken (Sachs, 2011).

Der Stellenwert der Glutamathypothese nimmt seit einigen Jahren zu. Sie geht von einer Hypoaktivität der glutamatergen NMDA-Rezeptoren (N-Methyl-D-Aspartat-Rezeptoren) aus und es wird angenommen, dass sich die Positiv- und Negativsymptomatik mit dieser besser erklären lässt, als ausschließlich mit der Dopaminhypothese (Schwartz et al., 2012; Frohlich und Van Horn, 2014). Die Beobachtung, dass NMDAR-Antagonisten, wie PCP (Phencyclidin) und Ketamin, vorübergehend Symptome einer akuten Schizophrenie auslösen, führte zu einem Paradigmenwechsel bezüglich der pharmakologischen Modelle der Schizophrenie (Frohlich und Van Horn, 2014). So wurden in Studien an Ratten, die mit MK-801 (Dizocilpin), einem NMDAR-Antagonisten, behandelt wurden, Schizophrenie-ähnliche Verhaltensweisen und kognitive Defizite beobachtet (Baier et al., 2009; Yang et al., 2014). Bei hohen Dosen MK-801 zeigten sich elektrophysiologische Veränderungen bei Mäusen, unter anderem eine verminderte N1-Amplitude im EEG (Saunders et al., 2012a,b). Balu et al. (2013) lösten in einem Tiermodell an Mäusen eine NMDAR-Hypofunktion aus und stellten unter anderem ein reduziertes hippocampales Volumen und kognitive Defizite fest.

Neben den NMDA-Rezeptoren sind auch die metabotropen Glutamatrezeptoren (mGluR), die G-Protein-gekoppelt sind, ein Thema der Schizophrenie-Forschung und hierbei besonders als potentielle Zielstrukturen der Behandlung. Es gibt acht Subtypen dieser Rezeptoren, die in drei Gruppen eingeteilt werden. Der Gruppe I, die mGluR1 und mGluR5 umfasst, gilt bezüglich der Erforschung der Schizophrenie und ihrer Behandlung großes Interesse (Wang und Zhuo, 2012). Die Aktivierung von mGluR5 z.B. zeigte im Rattenmodell einen positiven Effekt auf kognitive Defizite und die NMDAR-Funktion (Uslaner et al., 2009). Auch der mGluR1 wird bezüglich möglicher Behandlungsoptionen der Schizophrenie untersucht (Lesage und Steckler, 2010). Überdies scheint die Gruppe II der metabotropen Glutamatrezeptoren, die mGluR2 und mGluR3 beinhaltet, Potential hinsichtlich denkbarer antipsychotischer Therapien zu haben (Fell et al., 2012).

In Betracht gezogen wird des Weiteren eine reduzierte Neurotransmission von GABA (γ -Aminobuttersäure), ein inhibitorischer Neurotransmitter des Zentralen Nervensystems (Ross et al., 2006).

Weitere Neurotransmittersysteme werden auf einen Zusammenhang mit der Ursache der

Einleitung

Schizophrenie untersucht. Dopamin- und Glutamatstoffwechsel sind in der Schizophrenie aktuell am meisten erforscht.

Bei schizophrenen Patienten beschriebene strukturelle Veränderungen des Gehirns sind eine Erweiterung der Seiten- und des dritten Ventrikels und eine Volumenreduktion des medialen Temporallappens (einschließlich Hippocampus und Amygdala) und des Frontallappens. Abnormalitäten der Basalganglien, des Thalamus und der cerebellären Strukturen sind nachgewiesen worden (Ross et al., 2006).

Diese strukturellen Veränderungen, besonders des frontalen und temporalen Cortex, werden primär mittels entwicklungsbiologischer Theorien erklärt: Bei der neuroembryologischen Hypothese wird eine Entwicklungsstörung des Gehirns angenommen. In Konkurrenz dazu steht die neurodegenerative Hypothese. Diese beschreibt degenerative Hirnveränderungen, die im Laufe der Erkrankung zunehmen. Ein zweistufiges Pathogenesemodell, welches beide Komponenten beinhaltet, erscheint plausibel. Eine weitere Theorie geht von einer regionalen Dyskonnektivität innerhalb der neuronalen Netzwerkverbände aus, die ursächlich für die psychopathologischen Veränderungen ist (Falkai et al., 2001).

1.1.4 Die Genetik der Schizophrenie

Die genetische Prädisposition ist ein wesentlicher Faktor bei der Krankheitsentstehung und erfährt seit Jahren zunehmendes Interesse der Forscher.

Da eine familiäre Häufung beobachtet wurde, wird eine erbliche Komponente der Schizophrenie schon lange vermutet.

In Familienstudien wird seit vielen Jahren ein möglicher Zusammenhang untersucht: Angehörige ersten Grades eines an Schizophrenie Erkrankten haben ein zehnfach erhöhtes Erkrankungsrisiko im Vergleich zur Allgemeinbevölkerung. In den meisten Fällen haben die Betroffenen allerdings keine erkrankten Verwandten, was an der überschaubaren Fallgröße und der Tatsache der Polygenität der Schizophrenie liegen mag (Gejman et al., 2011).

Auch Zwillingsstudien geben Aufschluss über die Erblichkeit: Die Heritabilität wird auf 81% geschätzt. Es ergibt sich eine mehr als dreifach höhere Konkordanzrate der Schizophrenie von monozygoten zu dizygoten Zwillingen (Sullivan et al., 2003).

Adoptionsstudien erlauben einen weiteren Blick, da hier Umwelteinflüsse und genetische Einflüsse entkoppelt sind. So wird der genetische Einfluss bei der Schizophrenie bestätigt, denn es konnte nachgewiesen werden, dass Kinder in Adoptionsfamilien mit einem erkrankten leiblichen Elternteil ein erhöhtes Risiko besitzen, ebenfalls eine Schizophrenie zu entwickeln.

Einleitung

Ein Kind gesunder Eltern, das in eine Familie mit einem schizophrenen Elternteil adoptiert wurde, hat kein erhöhtes Erkrankungsrisiko (Gejman et al., 2011).

Seit Etablierung der Molekulargenetik gibt es weitere Ansätze, um eine mögliche Erbllichkeit der Schizophrenie zu erforschen und Risikogene zu finden:

Anfänglich wurden Kopplungsanalysen durchgeführt, um chromosomale Marker und somit Risikogene zu detektieren. Hierfür wurden in Familien mit an Schizophrenie Erkrankten Geschwisterpaare, Trios und Multiplexfamilien mithilfe eines Gen-Kartierungsverfahrens genetisch untersucht. Vor der Bestimmung der Dispositionsgene erfolgte die Lokalisation der mit Schizophrenie gekoppelten Regionen. Diese Gene mittels Kopplungsstudien zu identifizieren, ist mit einer zu erwartenden geringen Effektstärke bei der Schizophrenie selten und die Ermittlung der gekoppelten Loci erlaubt nur eine unscharfe Eingrenzung einer chromosomalen Region (Rujescu, 2007).

Assoziationsstudien wurden als Studiendesign interessanter, da die Probanden nicht verwandt sind und somit größere Kohorten betrachtet werden können. Die Kandidatengene werden hierbei nach positionellen oder funktionellen Kriterien ausgewählt (Owen et al., 2004), d.h. Gene, die entweder bereits in Kopplungsstudien aufgefallen waren oder denen eine Bedeutung in der Pathophysiologie der Erkrankung zugeschrieben wird.

In Stichproben von an Schizophrenie erkrankten und gesunden Probanden wird dabei nach Kandidatengenen gesucht, indem spezifische Gensequenzvariationen, sogenannte SNPs (*Single nucleotide polymorphisms*), zwischen beiden Gruppen verglichen werden. In einer groß angelegten Meta-Analyse konnten in 16 Genen (APOE, COMT, DAO, DRD1, DRD2, DRD4, DTNBP1, GABRB2, GRIN2B, HP, IL1B, MTHFR, PLXNA2, SLC6A4, TP53 und TPH1) 24 mit der Schizophrenie assoziierte Polymorphismen gefunden werden (Allen et al., 2008).

An die Stelle der Untersuchung in einzelnen Kandidatengenen tritt in den letzten Jahren zunehmend die Genomweite Assoziationsstudie (GWAS), da hierbei mithilfe von DNA-Chips bis zu einer Million SNPs über das gesamte Genom auf eine Assoziation zur Erkrankung überprüft werden können. Auch hier wird die Häufigkeit der SNP-Allele zwischen erkrankten und gesunden Probanden verglichen (Winchester et al., 2014).

Eine Vielzahl von GWAS wurde bislang durchgeführt, mit dem Ziel, Suszeptibilitätsgene zu ermitteln, die mit der Krankheitsentstehung der Schizophrenie in Verbindung stehen: Eine GWAS konnte bei ZNF804A auf Chromosom 2 eine Assoziation feststellen (O'Donovan et al., 2008).

Stefansson et al. (2009) fanden Assoziationen in der MHC- (*Major-Histocompatibility*

Einleitung

Complex) Region auf Chromosom 6. Außerdem wurden Marker in den Genen NRG1 und TCF4 detektiert. Die Verbindung mit der MHC-Region spricht für eine Immunkomponente des Schizophrenierisikos, wohingegen die Assoziation mit NRG1 und TCF4 auf eine Störung in der Hirnentwicklung, Gedächtnis und Kognition hindeutet.

Das *Schizophrenia Psychiatric Genome-Wide Association Study (GWAS) Consortium* konnte in einer umfangreichen Studie mit Probanden europäischer Abstammung Assoziationen zur Schizophrenie für sieben Loci ermitteln, von denen fünf neu gefunden wurden (1p21.3, 2q32.3, 8p23.2, 8q21.3 und 10q24.32-q24.33) und zwei bereits bekannt waren (6p21.32-p22.1 und 18q21.2). Es konnten Assoziationen mit MIR137, ANK3, CACNA1C und der Region ITIH3-ITIH4 festgestellt werden (Ripke et al., 2011).

Im Jahr 2013 veröffentlichten Ripke et al. 22, davon 13 neue, Risiko-Loci für die Schizophrenie. Hierbei wurden Risikogene ermittelt, die für neuronale Calciumkanäle codieren und somit auf diese Signalkaskade Einfluss nehmen. Ähnliche Mechanismen werden auch bei der Bipolaren Störung und Autismus angenommen. Die Autoren ziehen aufgrund dieser Resultate auch mögliche Behandlungsoptionen in Erwägung, die auf Calciumkanäle Einfluss nehmen (Ripke et al., 2013).

Ein Jahr darauf beschrieb das *Schizophrenia Psychiatric Genome-Wide Association Study (GWAS) Consortium* 108 Genvarianten (83 davon bislang unerwähnt), die ein erhöhtes Risiko der Erkrankung an Schizophrenie darstellen. Darunter fanden sich Kandidatengene wie DRD2, das für den dopaminergen D2-Rezeptor codiert, und GRM3, GRIN2A, SRR und GRIA1, die in der glutamatergen Neurotransmission und neuronale Plastizität involviert sind. Somit werden bekannte Hypothesen zur Ätiologie der Schizophrenie und die therapeutische Relevanz der Resultate bestätigt gesehen. Des Weiteren wurden erneut Assoziationen mit Genen der Calciumkanäle und der MHC-Region beschrieben (Ripke et al., 2014).

Die Verbesserung der technischen Möglichkeiten zeigte, dass das menschliche Genom eine weitaus größere interindividuelle Varianz aufweist, als bis dahin angenommen. Von dieser zeugen sogenannte CNVs (*Copy number variations*), die submikroskopische Deletionen oder Duplikationen von DNA-Abschnitten bezeichnen. Für einen Teil dieser CNVs konnte gezeigt werden, dass sie krankheitsverursachend oder Risikofaktoren für komplexe Erkrankungen sind (Bartholdi, 2008).

Mithilfe von CNVs wird auch nach Risikovarianten für die Schizophrenie gesucht. Deletionen von NRXN1, 1q21.2, 15q11.2 und 15q13.3, 16p11.2 und Duplikationen von VIPR2 und 16p13.11 sind nur einige Beispiele. Die Erforschung dieser pathogenetischen CNVs kann zu

Einleitung

einer verbesserten genetischen Diagnostik und Beratung beitragen und als Anhalt für Risikoprognosen und möglicherweise als Angriffspunkt für Medikamente dienen (Grayton et al., 2012).

1.2 Das Konzept der Endophänotypen

Die hohe Heritabilität der Schizophrenie ist bekannt, die genauen genetischen Faktoren und eine exakte Ätiologie sind bei dieser komplexen Erkrankung aber schwerlich anzugeben. Somit bedarf es einer Integration genetischer und neurobiologischer Methoden, um die Pathophysiologie dieser Erkrankung zu verstehen (Gur et al., 2007). Dieser Annahme liegt das Konzept der Endophänotypen zugrunde. Der Endophänotyp, auch intermediärer Phänotyp genannt, bildet dabei einen Aspekt dieser heterogenen Pathophysiologie der Erkrankung ab (Zobel und Maier, 2004).

Folgende Kriterien sollte dieser erfüllen: Er muss mit der Erkrankung in der Population assoziiert sein und eine Erblichkeit aufweisen. Der Endophänotyp ist unabhängig von der Krankheitsaktivität und betrifft nicht von der Erkrankung betroffene Familienmitglieder mit einer höheren Wahrscheinlichkeit als die Allgemeinbevölkerung. Innerhalb von Familien wird er gemeinsam mit der Erkrankung vererbt (Gottesman und Gould, 2003).

Die Komplexität der Schizophrenie in ihrer Ätiologie erschwert die erfolgreiche Suche nach Suszeptibilitätsgenen, weshalb das Endophänotypenkonzept in den letzten Jahren immer mehr Anwendung findet.

Hierbei wird ein (durch Verhaltensmerkmale oder Krankheitsdiagnosen) definierter Phänotyp durch neurobiologische Krankheitskorrelate ersetzt. Phänotyp und Endophänotyp werden als Endprodukt von Genotypen angenommen, wobei der Endophänotyp einen direkteren Bezug zum Genotypen hat (Zobel und Maier, 2004).

Als Endophänotyp kommen neurophysiologische, biochemische, kognitive, neuroanatomische, endokrinologische und neuropsychologische Korrelate infrage (Gottesman und Gould, 2003). Ein großes Interesse haben bislang die neurokognitiven Phänotypen (Gur et al., 2007; Light et al. 2012) erfahren. Auch strukturelle Variationen (Nenadic et al., 2012) und neurophysiologische Endophänotypen werden untersucht. Zu Letzteren zählen verschiedene EEG-Komponenten wie die MMN (*Mismatch negativity*), P300, P50 und N1 (Light et al., 2012).

Einleitung

1.3 Das ereigniskorrelierte Potential N1

1.3.1 Grundlagen

Als ereigniskorrelierte Potentiale (EKP) werden die cerebralen elektrischen Potentiale bezeichnet, die vor, während oder nach einem sensorischen, motorischen oder psychischen Reiz im EEG auftreten und deren Amplituden kleiner sind als die des Spontan-EEGs. Zu diesen evozierten Potentialen zählen unter anderem folgende Wellen: P50, N1 (auch: N100), N2 (auch: N200), P3 (auch: P300) und N400, was bedeutet, dass positive (P) und negative (N) EKP-Komponenten existieren, z.B. zeigt sich die P300 nach etwa 300ms (Fallgatter und Langer, 2008).

Nicht nur die Amplituden und Latenzen der EKPs sind von Interesse, sondern auch, an welchen Orten im Gehirn diese Potentiale generiert werden.

Ein etabliertes Lokalisationsverfahren ist die LORETA (*Low-resolution electromagnetic tomography*). Diese Methode basiert auf der Hypothese, dass benachbarte Neurone gleichzeitig durch einem Reiz aktiviert werden und somit eine korrelierende elektrische Aktivität besitzen. Die LORETA löst das inverse Problem, das heißt aus Skalp-Elektroden Daten kann die Lokalisation der elektrischen Aktivität berechnet werden. Der Cortex wird dabei in Voxel (dreidimensionale Gitterpunkte) eingeteilt und aus allen mathematisch möglichen Lokalisationen wird diejenige mit der homogensten Aktivität ausgewählt. Diese Ortsbestimmung kann nicht punktuell erfolgen, sondern LORETA ermittelt etwas unscharfe Bereiche, die aber immer die maximale Aktivität beinhalten (Pascual-Marqui et al., 1994; Pascual-Marqui et al., 1999).

1.3.2 Beschreibung der N1

Bereits im Jahr 1939 wurde eine auditorisch evozierte negative Welle beschrieben, die der heute bekannten N1 entspricht (Davis, 1939).

Hillyard et al. (1973) stellten einen Zusammenhang zwischen dem auditorisch evozierten N1-Potential und selektiven Aufmerksamkeitsprozessen fest. Bei gerichteter Aufmerksamkeit auf einen akustischen Stimulus war eine Vergrößerung der Amplitude erkennbar.

Näätänen und Picton (1987) folgerten, dass sechs cerebrale Prozesse an der Entstehung des auditorisch evozierten N1-Potentials beteiligt sein können. Diese Komponenten werden an folgenden Orten generiert: im auditorischen Cortex im Planum supratemporale, im

Einleitung

auditorischen Assoziationscortex und im motorischen und prämotorischen Cortex. Weitere Komponenten sind die *Mismatch negativity*, die aus einem unwillkürlichen Vergleich zwischen augenblicklichem und vorangegangenem Stimulus resultiert, eine temporale und eine frontale Komponente der Verarbeitungsnegativität (*Processing negativity*, PN). Die ersten drei werden demnach als die echten N1-Komponenten angenommen (Näätänen und Picton, 1987). Die Verarbeitungsnegativität steht mit der selektiven Aufmerksamkeit in Verbindung und ist bei selektiv beachteten Reizen stärker ausgeprägt, was im EEG als N1-Vergrößerung oder lang gezogene negative Verschiebung zu erkennen ist (Wagner et al., 1995).

In den letzten Jahren fand eine Separation von N1 und MMN statt, da gesonderte neuronale Aktivitäten festzustellen sind und beiden verschiedene Gedächtnisfunktionen zugeordnet werden. Die N1 ist Ausdruck der Reaktion auf einen neuen Reiz, die MMN hat die Funktion der Reizdiskriminierung und wird durch einen abweichenden akustischen Reiz ausgelöst. Des Weiteren wird nunmehr auch die PN gesondert betrachtet (Näätänen et al., 2011).

Die N1-Amplitude erhöht sich bei zunehmender Aufmerksamkeit und Reizintensität und verringert sich mit Länge des Interstimulusintervalls und verschwindet bei sehr langen Reizintervallen. Wenn ein bestimmter Reiz mehrmals wiederholt wird, kommt es zur Habituation und die Amplitude wirkt kleiner (Fallgatter und Langer, 2008).

In einigen Studien hat man sich weiterhin mit den Generatoren des N1-Potentials beschäftigt und dabei auch, neben den bereits bekannten auditorischen Hirnarealen, den anterioren cingulären Cortex (ACC) als Generator der N1 identifizieren können (Mulert et al., 2001; Gallinat et al., 2002; Mulert et al., 2003). Der ACC ist ein Teil des Gyrus cinguli und somit dem limbischen System zuzuordnen. Der cinguläre Cortex ist über den sogenannten Papez-Neuronenkreis unter anderem mit der Hippocampusformation verbunden (Vogt et al., 1992).

Mulert et al. (2008) schreiben der ACC-Region eine Rolle in Bezug auf geistige Leistung und Entscheidungsfindung zu. Es wurde eine Korrelation zwischen dem Anstieg der Aktivität des ACC und einer Vergrößerung der N1-Amplitude bei höherer mentaler Anstrengung festgestellt.

1.3.3 N1 und Schizophrenie

Das N1-Potential ist schon seit vielen Jahren ein Thema in der Schizophrenie-Forschung und in einer Vielzahl von Studien wurde ein Dekrement (Verringerung) der N1-Amplitude bei an Schizophrenie erkrankten Personen im Vergleich zu gesunden Kontrollprobanden beschrieben (McCarley et al., 1991).

Wagner et al. (1995) stellten in ihrer Untersuchung fest, dass eine verminderte N1-Amplitude

Einleitung

bei schizophrenen Patienten allein unter Neuroleptikatherapie auftrat. Sie erachteten es als wenig wahrscheinlich, dass diese verminderte negative Differenz lediglich ein Artefakt der neuroleptischen Behandlung sei. Als Ursache für die Verringerung der Amplitude bei Schizophrenie-Patienten wurde eine krankheitsbedingte Störung der Informationsverarbeitung und Aufmerksamkeit vermutet.

Leicht et. al (2010) untersuchten in ihrer EEG-Studie 90 Schizophrenie-Patienten und 90 gesunde Kontrollprobanden mittels eines auditorischen Reaktions-Paradigmas. Es wurden signifikante Unterschiede in der Größe der N1-Amplitude ermittelt: Die Amplitudenwerte der erkrankten Probanden waren geringer als die der Kontrollen.

Als Folge der Erforschung des N1-Potentials bei der Schizophrenie stellte sich auch die Frage, ob dieses als Endophänotyp infrage kommt. Turetsky et al. (2008) stellten in einer Studie - bestehend aus 142 an Schizophrenie erkrankten Patienten, 373 nicht erkrankten erstgradig Verwandten und 221 Kontrollprobanden - mithilfe eines aus zwei Tönen bestehenden Klick-Paradigmas Folgendes fest: Die N1-Amplitude war bei den Erkrankten geringer als bei den Kontrollen und auch Verwandte der Patienten zeigten dieses Dekrement. Somit wurde geschlossen, dass die N1-Amplitude ein stabiles erbliches Merkmal und ein möglicher Endophänotyp ist. Dennoch schränken die Autoren die Ergebnisse ein, da nur Verwandte mit anderen psychiatrischen Komorbiditäten oder Substanzgebrauch - verglichen mit Kontrollen, die ähnliche Komorbiditäten aufwiesen - diese Minimierung der N1-Amplitude zeigten. Diese Tatsache wird durch die erhöhte genetisch bedingte Vulnerabilität dieser Verwandten erklärt.

Salisbury et al. (2010) beschäftigten sich mit der Frage der Endophänotypen in Verbindung mit dem N1-Potential. Es wurden bei 55 Patienten, die erstmals mit der Diagnose Schizophrenie stationär waren, 56 chronischen Schizophrenie-Patienten und Kontrollprobanden („*matched controls*“) auditorisch evozierte Potentiale abgeleitet. Als Resultat zeigten sich bei den schizophrenen Patienten eine verminderte N1-Amplitude im Vergleich zu den Kontrollen. Die Tatsache, dass beide Gruppen der Schizophrenie-Patienten gleichermaßen von einem Dekrement der N1-Amplitude betroffen waren, spricht für die Autoren dafür, dass das N1-Potential als ein potentieller Endophänotyp dienen kann. Die beschriebenen Defizite sollten allerdings noch bei einem Teil der nicht-erkrankten Familienmitglieder von Schizophrenie-Patienten festgestellt werden, was ein entscheidendes Merkmal für einen Endophänotypen ist.

Ethridge et al. (2014) betrachteten ereigniskorrelierte Potentiale, die mithilfe eines auditorischen Oddball-Paradigmas generiert wurden. Dabei sollten die auditorischen Verarbeitungsmechanismen mittels charakteristischer EEG-Merkmale von 284 gesunden Probanden, 229 schizophrenen Patienten und 264 erstgradig Verwandten dieser und 188

Einleitung

Patienten mit Bipolarer Störung (mit Psychose in der Krankheitsgeschichte) und 239 ihrer Angehörigen verglichen werden. Dabei wurden die N1 und P3b als evidente genetische Riskomarker für Schizophrenie, die P2 für die Bipolare Störung und die N2 für Psychose generell ermittelt.

In weiteren Studien wurde die cerebrale Aktivität des akustisch evozierten N1-Potentials betrachtet: Mulert et al. (2001) stellten eine signifikant geringere Aktivierung des anterioren cingulären Cortex (ACC) bei schizophrenen Patienten im Vergleich zu gesunden Probanden fest. Dieses Ergebnis legt eine Dysfunktion des ACC nahe. Zur Lokalisationsbestimmung wurde die LORETA angewendet.

Gallinat et al. (2002) ermittelten in einer Untersuchung mithilfe von LORETA und Dipolquellenanalyse (BESA) bei an Schizophrenie erkrankten Personen ein Defizit in der Aktivierung des ACC und von linksseitigen nicht-primären auditorischen Cortexarealen. Es wurde auf eine veränderte Funktionalität dieser N1-Generatoren geschlossen und ein ausgedehntes corticales Netzwerk für Aufmerksamkeitsdefizite bei Schizophrenie angenommen.

Mithilfe von VESTAL, einem Lokalisationsverfahren, das die MEG (Magnetencephalographie) nutzt, wurde in einer Studie die Aktivität 50ms und 100ms nach einem akustischen Reiz bestimmt und hierbei eine verminderte Aktivität im Gyrus temporalis superior festgestellt. Die verminderte auditorische Reaktion weist möglicherweise auf eine Beeinträchtigung kognitiver Prozesse höherer Ordnung hin. Auch im Gyrus frontalis inferior war die Aktivität bei Schizophrenen geringer. Im Gegensatz dazu wurde bei den schizophrenen Patienten eine erhöhte Aktivität im rechten Gyrus frontalis superior und im linken Gyrus supramarginalis festgestellt. Aus diesen Ergebnissen folgern die Autoren, dass Personen mit Schizophrenie Unregelmäßigkeiten in vielen Knotenpunkten des aktivierten auditorischen Netzwerks zeigen (Chen et al., 2013).

1.4 Das CREB1-Gen

Das Gen CREB1 (*cAMP response element binding protein 1*) wurde von Taylor et al. auf Chromosom 2 in der Region 2q32.3-q34 lokalisiert und codiert für den Transkriptionsfaktor CREB1 (Taylor et al., 1990).

In der Genomdatenbank Ensembl (Ensembl 2015) werden für das CREB1-Gen 17 Transkripte angegeben, wovon drei als funktionell relevante Isoformen in der Proteindatenbank UniProt

Einleitung

beschrieben werden (UniProt 2015). Diese sind Produkte alternativen Spleißens.

Folgende Isoformen werden als vorherrschend bezeichnet: α (auch B genannt), Δ (auch: A) und β (auch: C) (Li et al., 2013). Abbildung 1 stellt diese dar.

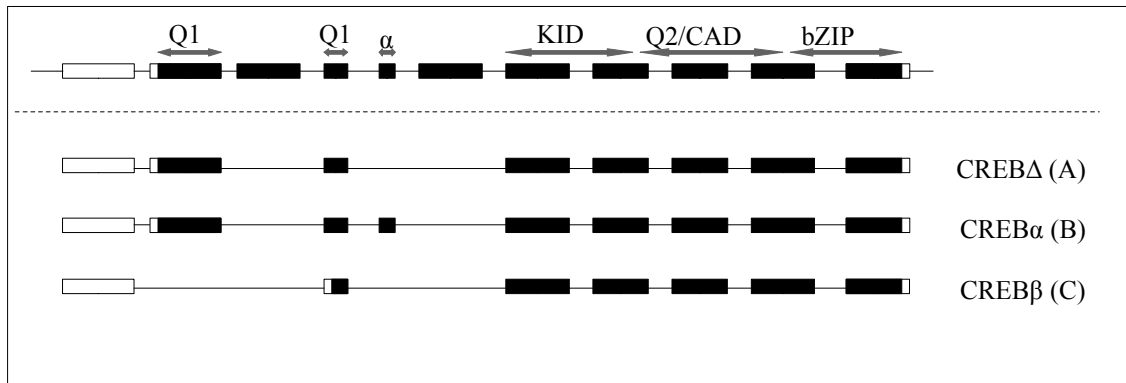


Abb. 1: Relevante CREB-Isoformen.

oberer Teil: genomische Struktur des Maus-Gens mit den funktionellen Domänen des Proteins in Bezug zu den jeweiligen Exons (gefüllte Rechtecke: codierende Exons, offene Rechtecke: nicht-codierende Exons); unterer Teil: Darstellung der drei Hauptisoformen (modifiziert nach: Shaywitz und Greenberg, 1999).

Domänen: glutaminreiche Q1 und Q2/CAD (*Constitutive active domain*), α , KID: *Kinase inducible domain*, bZIP (Leucin-Zipper).

1.4.1 Das CREB1-Gen und psychiatrische Erkrankungen

In verschiedenen Assoziationsstudien wurde das Gen CREB1 auf eine Assoziation mit Erkrankungen des psychiatrischen Formenkreises untersucht. In diesem Zusammenhang findet vor allem die depressive Störung Erwähnung:

In einer Untersuchung, bei der Patienten mit unipolarer Depression und erstgradig-verwandte Familienmitglieder eingeschlossen waren, wurde CREB1 als Suszeptibilitäts-gen für Major Depression und verwandte Störungen bei Frauen beschrieben, womit sich eine Geschlechtsspezifität diesbezüglich ergab (Zubenko et al., 2003).

Lazary et al. (2011) identifizierten eine epistatische Interaktion (Genwechselwirkung) zwischen den Genen CREB1 und KCNJ6 in Bezug auf Grübelneigung und negative Emotionalität, die beide Symptome einer Depression sein können. KCNJ6 (auch als GIRK2, *G-protein-regulated inward-rectifier potassium channel 2*, bekannt) fand auch bereits im Zusammenhang mit Schizophrenie Erwähnung: durch Ausschalten von NMDAR1 (N-Methyl-D-Aspartat-Rezeptor-1) in den Pyramidenzellen von Knockout-Mäusen zeigten diese Schizophrenie-ähnliche Symptome (kognitive und soziale Störungen), auffällige Gamma-, Beta- und Theta-

Einleitung

Oszillationen im EEG und eine verminderte GIRK-2-Expression (Tatard-Leitman et al., 2014).

In einer anderen Arbeit wurden depressive Patienten unter der Fragestellung einer Behandlungsresistenz dieser Störung untersucht. Dabei konnten Haplotypen des CREB1-Gens identifiziert werden, die mit dem Status der Behandlungsresistenz assoziiert waren (Serretti et al., 2011). Carlberg et al. (2014) betrachteten die behandlungsresistente Depression im Zusammenhang mit Suizidrisiko und -versuch und konnten hierbei keine Assoziation mit CREB1 ermitteln. Calati et al. (2013) beschäftigten sich mit dem Ansprechen und Nicht-Ansprechen auf antidepressive Behandlung und fanden keine Assoziation zu den untersuchten SNPs des Gens.

In einer Reihe von anderen Studien wurde ebenfalls kein Zusammenhang zwischen den untersuchten CREB1-SNPs und Depression bzw. verwandten Phänotypen gefunden (Hettema et al., 2009; Crisafulli et al., 2012b). Somit sei bezüglich einer Assoziation des CREB1-Gens und der depressiven Erkrankung weitere Forschung notwendig.

1.4.2 Das CREB1-Gen und Schizophrenie

Bereits 1999 konnten in einer Studie mit japanischen Probanden zwei neue Polymorphismen in der Promotorregion des CREB1-Gens identifiziert werden, die bei Patienten mit Schizophrenie häufiger auftraten (Kawanishi et al., 1999).

In einer Arbeit von 2012 wurden 38 bekannte - mit Schizophrenie assoziierte - Gene auf ihre engsten Netzwerke hin untersucht. Die gebildeten Netzwerke wurden mit einer weiteren Liste von 173 veröffentlichten Genen verglichen, wobei letztlich 115 Gene als verdächtig angesehen wurden, mit Schizophrenie assoziiert zu sein. Außerdem wurden Datensets von Biopsien olfaktorischer Mukosa und postmortem Hirngewebe von schizophrenen Patienten und Kontrollen untersucht und die Gene, deren Expression sich zwischen beiden Gruppen unterschied, mit den 115 Genen verglichen. In der Mukosastichprobe wurden 22 Gene als gemeinsam identifiziert, darunter auch CREB1, dem die Funktion als ein wichtiger Schlüsselregulator dieser Schizophrenie-assoziierten Gene in dem Netzwerk zugeschrieben wird. Mit dem Datenset des Hirngewebes gab es elf Übereinstimmungen, CREB1 eingeschlossen. Schließlich wurde das CREB1-Gen als ein essentieller Part der molekularen Mechanismen der Schizophrenie angenommen, weil es eine zentrale Rolle in den für diese Erkrankung angenommen Gen-Netzwerken innehat (Chandrasekaran und Bonchev, 2012).

Crisafulli et al. (2012a) untersuchten einige SNPs der Gene CREB1, CREBBP (*CREB binding protein*) und CREM (*cAMP response element modulator*) auf eine mögliche Assoziation mit

Einleitung

Schizophrenie und inwiefern diese das klinische Outcome von mit Antipsychotika therapierten koreanischen Patienten prognostizieren könnten. Dabei waren 221 schizophrene Patienten und 170 psychiatrisch gesunde Probanden eingeschlossen. Für die untersuchten CREB1-SNPs konnte keine Assoziation mit Schizophrenie und dem Ansprechen auf die antipsychotische Behandlung gefunden werden.

2013 wurde eine Publikation veröffentlicht, bei der Ergebnisse einer Metaanalyse von 18 Schizophrenie-GWAS und Schizophrenie-Datenbanken eingebunden und SNPs für eine familienbasierte Replikationsstudie ausgewählt wurden. Es wurden 11185 Personen mit Schizophrenie und 10768 Kontrollen aus 6 Datenbanken und 6298 Probanden (davon 3286 an Schizophrenie erkrankt) aus 1811 Kernfamilien eingeschlossen. Es konnten mögliche Suszeptibilitätsgene für Schizophrenie und pathogenetisch bedeutsame Pfade identifiziert werden. CREB1 wurde hierbei unter anderem als ein beachtenswertes Gen in den Signalwegen über chemische Synapsen genannt, denen ein möglicher Stellenwert in der Ätiologie der Schizophrenie zugeschrieben wird (Aberg et al., 2013).

Kumar et al. (2015) ergänzten GWAS-Ergebnisse (Aberg et al., 2013; Ripke et al., 2013) durch Kombination von Resultaten einer methylomweiten Assoziationsstudie (MWAS) und konnten signifikante Überschneidungen zwischen GWAS-Ergebnissen und identifizierten Methylierungssignalen im Bereich des CREB1-Gens in möglicherweise funktionell wichtigen Regionen ermitteln.

Ein seltener Haplotyp des CREB1-Gens (CCGGC) mit Prädisposition zur Schizophrenie wurde in einer anderen Arbeit veröffentlicht, deren Daten auf der Untersuchung von Han-Chinesen beruhen. Dieser Haplotyp schließt folgende Polymorphismen ein: rs2360969, rs16839849, rs2253206, rs11904814 und rs4234080 (Ma et al., 2014).

Die ermittelten Beziehungen des CREB1-Gens zur Schizophrenie beziehen sich in den meisten Arbeiten auf dessen Schlüsselrolle in diversen Schizophrenie-relevanten Gen-Netzwerken. Somit ist es als bedeutungsvoll in der Pathophysiologie dieser Erkrankung anzunehmen.

1.5 Der Transkriptionsfaktor CREB1

1.5.1 Signalwege und Funktion

CREB1 (Synonym verwendet: CREB) ist ein Protein, das als Transkriptionsfaktor wirkt und an der Regulation cAMP-abhängiger Genexpression beteiligt ist (Taylor et al., 1990).

CREB wirkt bei der Glukose-Homöostase, zellulärem Wachstum, Proliferation und Überleben

Einleitung

mit und ist bei Lernvorgängen und Gedächtnisbildung beteiligt (Mayr und Montminy, 2001; Lonze und Ginty, 2002).

Das Protein CREB gehört zur bZIP-Superfamilie der Transkriptionsfaktoren und innerhalb dieser bilden CREB, CREM und ATF1 (*Activating transcription factor 1*) eine Subkategorie, die sogenannte CREB-Familie. Wie alle bZIP-Transkriptionsfaktoren enthalten die Mitglieder dieser CREB-Familie eine C-terminale Basisdomäne, die die DNA-Bindung vermittelt und eine Leucin-Zipper-Domäne, die die Dimerisierung ermöglicht (Lonze und Ginty, 2002).

Die vorwiegend exprimierten CREB-Isoformen (CREB α und CREB Δ) umfassen folgende funktionelle Bereiche: eine Phosphorylierungsregion (KID: *Kinase inducible domain*), zwei glutaminreiche Aktivierungsdomänen, Q1 und Q2/CAD (*Constitutive active domain*) genannt, und die oben beschriebene bZIP-Domäne (Lonze und Ginty, 2002).

CREB wird durch Phosphorylierung, unter anderem durch cAMP, aktiviert. Beim cAMP (cyclisches Adenosinmonophosphat) handelt es sich um einen sogenannten *Second Messenger*, sekundären Botenstoff, der der intrazellulären Signalübertragung dient (Mayr und Montminy, 2001).

CREB vermittelt die Aktivierung von auf cAMP ansprechenden Genen durch dimerische Bindung von CRE (*cAMP responsive element*), das als Palindrom von acht Basenpaaren beschrieben wird: TGACGTCA. CRE tritt aber auch als weniger aktive halb-seitige Sequenz CGTCA auf (Mayr und Montminy, 2001).

Die Funktion von CREB als Transkriptionsfaktor wird durch Phosphorylierung des Serin-Restes 133 aktiviert. Dies begünstigt seine Interaktion mit dem Coaktivator CBP (*CREB binding protein*), der die Transkription durch Modulation des Chromatins mittels Histon-Acetylierung und durch seine Assoziation mit der RNA-Polymerase II anregt (Mayr und Montminy, 2001; Sakamoto und Frank, 2009).

Die Zielgene von CREB, mehr als 100 mit der CRE-Sequenz, sind heterogen. Die Liste dieser beinhaltet Gene, die Neurotransmission, Zellstruktur, Metabolismus, Signaltransduktion und Transkription kontrollieren (Mayr und Montminy, 2001; Lonze und Ginty, 2002). Eines dieser Gene ist das BDNF-Gen (*Brain-derived neurotrophic factor*), für dessen Protein unter anderem eine Verbindung zur Pathophysiologie der Schizophrenie angenommen wird (Lang et al., 2007; Xia et al., 2010). In Untersuchungen konnten beispielsweise bei schizophrenen Patienten veränderte periphere BDNF-Spiegel ermittelt werden (Rizos et al., 2007; Reis et al., 2008; Xiu et al., 2009; Buckley et al., 2011).

Einleitung

Abbildung 2 zeigt einen Überblick einiger wichtiger Signalpfade, die im CREB1 zusammenlaufen: Die Phosphorylierung des Serin-Restes 133 wird durch die Proteinkinase A induziert, die ihrerseits durch G-Protein-gekoppelte Rezeptoren reguliert wird. Die glutamatergen NMDA-Rezeptoren und die spannungsabhängigen Calciumkanäle führen zum Einstrom von Calcium in die Zelle, was letztlich über Ca^{2+} -Calmodulin-abhängige Kinasen zur CREB-Aktivierung führt. Wachstumsfaktoren können über verschiedene Wege CREB aktivieren. Ebenso kann Stress, z.B. durch UV-Strahlung und Hypoxie, zur Phosphorylierung beitragen (Lonze und Ginty, 2002).

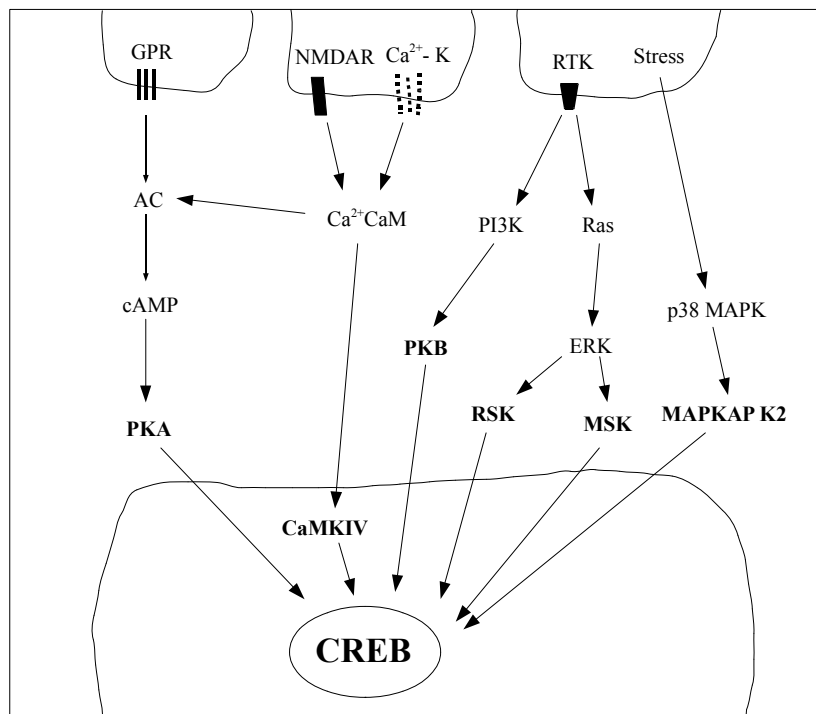


Abb. 2: Eine Auswahl wichtiger Signalpfade, die im CREB zusammenlaufen, eine Zusammenschau diverser Studien (modifiziert nach: Lonze und Ginty, 2002).

Die externen Stimuli sind oben in der Abbildung dargestellt (die einzelnen Rezeptoren durch unterschiedliche Darstellung hervorgehoben). Die Pfeile kennzeichnen die intrazellulären Signalwege. Unten ist der Zellkern abgebildet, in dem die Phosphorylierung stattfindet.

Abkürzungen: AC: Adenylcyclase, Ca^{2+} -CaM: Ca^{2+} -Calmodulin-Komplex, Ca^{2+} -K: spannungsabhängige Calcium-Kanäle, CaMKIV: Ca^{2+} -Calmodulin-abhängige Kinase IV, cAMP: cyclisches Adenosinmonophosphat, ERK: *Extracellular-signal Regulated Kinase*, GPR: G-Protein-gekoppelte Rezeptoren, MAPKAP K2: Mitogen-aktivierte Proteinkinase aktivierte Proteinkinase 2, MSK: Mitogen- und Stressinduzierte Kinase, NMDAR: N-Methyl-D-Aspartat-Rezeptor, PI3K: Phosphoinositid-3-Kinase, PKA: Proteinkinase A, PKB: Proteinkinase B, p38 MAPK: p38-mitogen aktivierte Proteinkinase, Ras: Rat sarcoma (Protoonkogen), RSK: p90-ribosomale S6-Kinase, RTK: Rezeptor-Tyrosinkinase (Wachstumsfaktoren, Neurotrophinrezeptoren).

Einleitung

In einer Studie mit Knockout-Mäusen wurde festgestellt, dass der postnatale Verlust von CREB **und** CREM bei differenzierten Neuronen zur progressiven Degeneration in Hippocampus und Striatum führte (Mantamadiotis et al., 2002).

Auch in anderen Untersuchungen, bei denen Knockout-Mäuse zum Einsatz kamen, wurde der Mangel an CREB/CREM betrachtet: Dieser führte zu Abweichungen der neuronalen Migration während der Hirnentwicklung (Díaz-Ruiz et al., 2008). Außerdem wurde eine verstärkte Synaptogenese (Synapsenbildung einer Nervenzelle) und neurale Netzwerkaktivität, besonders in frühen Entwicklungsstadien, beobachtet. Im adulten Gehirn sind CREB/CREM für neuronale Synapsenbildung, Optimierung und Plastizität erforderlich (Aguado et al., 2009).

Weitere Tiermodelle zeigen einen Einfluss von CREB auf das Gedächtnis: Mäuse mit einem Mangel an den CREB-Isoformen α und Δ wiesen ein Defizit des Langzeit-, jedoch nicht des Kurzzeitgedächtnisses auf (Kogan et al., 1996). Auch in einer weiteren Untersuchung mit transgenen Mäusen, bei der die Erinnerung an aversive Reize getestet wurde, wurde dem Transkriptionsfaktor CREB eine wichtige Rolle hinsichtlich des Gedächtnisses von Säugetieren zugeschrieben (Josselyn et al., 2004).

1.5.2 Der Einfluss von CREB1 auf Körpervorgänge und Erkrankungen

Der Transkriptionsfaktor CREB hat verschiedene Aufgaben innerhalb des Immunsystems. So fördert er oftmals die anti-inflammatorische Immunantwort, beispielsweise durch die Inhibition der Aktivität des Transkriptionsfaktors NF- κ B (*Nuclear factor- κ B*), die Induktion von IL-10 (Interleukin-10) und die Generierung von Regulatorischen T-Zellen (Wen et al., 2010).

Verschiedene Arten von Krebs zeigen eine Überexpression und konstitutive Phosphorylierung von CREB, darunter AML (Akute myeloische Leukämie) und der Nicht-kleinzellige Lungenkrebs (Sakamoto und Frank, 2009).

Eine Verbindung von CREB mit (Drogen-)Abhängigkeit wird beschrieben. Der Missbrauch von Stimulantien und Opiaten führt zur CREB-Aktivierung, wobei noch wenig über die Auswirkungen dieses Effekts auf das Verhalten bekannt ist (Robison und Nestler, 2011; Nestler, 2013).

Ein hoher Stellenwert wird CREB bei der Gedächtnisbildung zugeschrieben (Lonze und Ginty, 2002; Carlezon et al., 2005; Won und Silva, 2008). Überlegungen, CREB als Ziel therapeutischer Interventionen zur Steigerung der Gedächtnisleistung einzusetzen, werden auch kritisch betrachtet, da CREB in viele wichtige zelluläre Vorgänge involviert ist und eine Kontrolle bestimmter Prozesse und die Ansprache spezifischer Gehirnregionen durch das

Einleitung

Therapeutikum, schwierig ist (Carlezon et al., 2005).

Es wurde eine abweichende CREB-vermittelte Genregulation im Hippocampus von Patienten mit Alzheimer-Demenz, einer neurodegenerativen Erkrankung, festgestellt und es gibt Hinweise darauf, dass eine generalisierte Dysregulation der CREB-Signalwege in die Pathophysiologie der frühen Phase der Erkrankung involviert ist (Satoh et al., 2009). Neben der Alzheimer-Krankheit wird ein Zusammenhang einer veränderten Signalwirkung von CREB mit weiteren Erkrankungen, die Störungen der Kognition beinhalten, angenommen: Chorea Huntington, Rubinstein-Taybi-Syndrom und Coffin-Lowry-Syndrom (Saura und Valero, 2011).

Postmortem-Hirngewebe von Patienten mit Schizophrenie, Bipolarer Störung und Kontrollprobanden wurde untersucht und die Proteinexpression von CREB, die Aktivität der CRE-DNA-Bindung und die mRNA-Expression verglichen. Dabei wurde eine verminderte Expression des Proteins CREB und der mRNA und eine reduzierte CRE-DNA-Bindungsaktivität im dorsolateralen präfrontalen Cortex und Gyrus cinguli bei den Patienten mit Bipolarer Störung ermittelt. Das gleiche Resultat war bei den Proben der an Schizophrenie Erkrankten im Gyrus cinguli festzustellen. Somit konnten Abweichungen der CREB-Funktion und Protein- und Genexpression mit der Pathophysiologie der Schizophrenie in Verbindung gebracht werden (Ren et al., 2014).

Zielstellung

2. Zielstellung

Die Ätiologie der Schizophrenie ist bislang noch nicht vollständig geklärt und eine Vielfalt an möglichen Ursachen wird diesbezüglich diskutiert. Eine relevante genetische Komponente gilt als gesichert. Da es sich hierbei um eine polygene Erkrankung handelt, kommen verschiedene Gene als potentielle Risikogene infrage. In den letzten Jahren wurden bereits viele Suszeptibilitätsgene durch GWAS identifiziert.

Das CREB1-Gen wurde in Veröffentlichungen mit der Schizophrenie und deren als ursächlich angenommenen molekularbiologischen Mechanismen in Zusammenhang gebracht (Kawanishi et al., 1999; Chandrasekaran und Bonchev, 2012; Aberg et al., 2013).

Das Konzept der Endophänotypen gewinnt in Assoziationsstudien an Bedeutung: Hierbei werden neurobiologische Phänotypen, die mit der jeweiligen Krankheit korrelieren und auf welche Gene direkter Einfluss nehmen, betrachtet. Bei Personen, die an Schizophrenie erkrankt sind, wurde in Studien eine verminderte N1-Amplitude im Vergleich zu gesunden Probanden festgestellt und schließlich als Endophänotyp in Betracht gezogen (Salisbury et al., 2010). Der Verminderung der N1-Amplitude liegt eine Störung von Aufmerksamkeitsprozessen zugrunde. Auch bei der Schizophrenie sind kognitive Defizite bekannt (Ross et al., 2006) und der Transkriptionsfaktor CREB1 wird mit Lernprozessen und Gedächtnisbildung in Zusammenhang gebracht (Mayr und Montminy, 2001; Lonze und Ginty, 2002).

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, mögliche Assoziationen von neun Polymorphismen und Haplotypen des CREB1-Gens mit der N1-Amplitudengröße und der Aktivität definierter Hirnareale (als Endophänotypen der Schizophrenie) zu untersuchen. Es sollte ermittelt werden, ob die Veränderungen der N1-Amplitude bzw. der Aktivität, wie sie bei Schizophrenie-Patienten beschrieben sind, eine genetische Basis haben. Hierfür wurde das Gen CREB1 ausgewählt, weil es bereits mehrfach mit Schizophrenie in Verbindung gebracht wurde.

3. Material und Methoden

3.1 Studiendesign

Bei der Studie handelt es sich um eine molekulargenetische Assoziationsstudie. Hierbei wurden neun SNPs und Haplotypen des Gens CREB1 und dessen Umgebung bei einer Gruppe von an Schizophrenie erkrankten Patienten und einer Gruppe von Kontrollprobanden genotypisiert und auf eine Assoziation mit der N1-Amplitude im EEG und der N1-Aktivierung definierter Hirnareale untersucht.

3.2 Studienteilnehmer

3.2.1 Kontrollprobanden

Die Rekrutierung der Teilnehmer fand in mehreren Stufen statt: Zuerst erfolgte eine zufällige Vorauswahl durch das Einwohnermeldeamt in München. Diese Personen wurden daraufhin angeschrieben, über die Ziele der Studie aufgeklärt und um Rückantwort gebeten, ob Interesse an der Teilnahme bestünde oder nicht. Danach erfolgte ein standardisiertes Telefonscreening, bei dem bestimmte Voraussetzungen zur Studienteilnahme geprüft wurden: Die Probanden sollten kaukasischer Abstammung sein. Psychiatrische, neurologische und hirnorganische Erkrankungen in Eigen- und Familienanamnese wurden ausgeschlossen. Des Weiteren wurde nach der Einnahme von Medikamenten gefragt. Wenn es keinen Grund zum Ausschluss gab, wurde den potentiellen Probanden die sogenannte Anamnese 1 zugeschickt. Mithilfe derer wurde die psychiatrische und somatische Anamnese bis zur dritten Generation ausführlich erfasst.

Im nächsten Schritt wurden sie zu einem persönlichen Termin eingeladen, wenn nach Auswertung der Anamnese 1 ebenfalls keine Ausschlusskriterien erfüllt waren. Bei diesem Termin erfolgte eine körperliche Untersuchung mit Blutentnahme. Außerdem fand das ausführliche strukturierte Interview gemäß der DSM-IV-Klassifikation, SKID I und II (Wittchen et al., 1997), statt. Beim SKID I wurden psychische Störungen erfasst, die als Achse I-Störungen definiert werden, beim SKID II Störungen der Achse II (Persönlichkeitsstörungen). Die psychosoziale Belastung (Achse IV) und das allgemeine Funktionsniveau (Achse V) wurden ebenfalls erfragt. Bei auffälligen Befunden wurden die Probanden ausgeschlossen. Mithilfe des *Family History Assessment Modules* (Rice et al., 1995) wurden psychiatrische

Material und Methoden

Diagnosen Verwandter ersten Grades erhoben. Bei Probanden, die älter als 60 Jahre alt waren, wurde der *Mini-Mental-Status-Test*, MMST (Kessler et al., 1990), durchgeführt. Außerdem wurde eine ausführliche biografische Anamnese erhoben, die Fragen zum Lebenslauf wie Geburt, schulische und berufliche Ausbildung, Familienstand, persönliche Zufriedenheit und Ähnliches enthielt.

Bei relevanten somatischen Erkrankungen, positiver psychiatrischer Eigen- bzw. Familienanamnese oder Achse I/II-Störungen wurde die Testperson ausgeschlossen.

1319 Kontrollprobanden wurden genotypisiert. Bei 254 von diesen wurden zudem EEG-Ableitungen durchgeführt.

3.2.2 Patienten

In München wurden ehemals stationäre Patienten der Universitätsklinik und der umliegenden Bezirkskrankenhäuser mit der Diagnose einer Schizophrenie telefonisch kontaktiert und bei Interesse eingeladen. Auch bei diesen Probanden erfolgte eine Blutentnahme und eine ausführliche somatische, psychiatrische und biografische Anamnese. SKID I/II (Wittchen et al., 1997) und die PANSS (Kay et al., 1987), die der Erfassung der positiven, negativen und allgemeinen Psychopathologie bei Schizophrenie dient, waren obligate Bestandteile des Untersuchungstermins. Ausgeschlossen wurden Patienten mit schizoaffektiven Störungen, anderen psychotischen Störungen und organischen Psychosen. Die Symptomatik durfte keine direkte Folge von Alkohol- oder Substanzmissbrauch sein. Patienten mit florider Hepatitis B/C oder HIV wurden ebenfalls nicht eingeschlossen.

508 schizophrene Probanden wurden genotypisiert. Bei 92 von diesen sind zusätzlich EEG-Daten erhoben worden.

In Halle erfolgte die Rekrutierung von noch stationären Patienten der Universitätsklinik im Rahmen der Katamnese-Studie, bei der unter anderem an Schizophrenie Erkrankte eingeschlossen wurden. Die Untersuchung der Patienten beinhaltete folgende Schritte: Blutentnahme, Anamneseerhebung und SKID I/II (Wittchen et al., 1997). Bei Patienten, die von psychotischen Symptomen berichteten, wurde die PANSS ausgefüllt (Kay et al., 1987).

3.3 EEG-Ableitung und Aufbereitung

3.3.1 Paradigma

Zur Generierung des ereigniskorrelierten Potentials N1 wurden den Probanden 60 Töne mit einer Dauer von 250ms und einem Schalldruckpegel von 85dB mittels Kopfhörern vorgespielt. Diese wurden mithilfe des BrainStim software package (Brain Products, München) generiert. Die Töne wurden jeweils zu 50% in Frequenzen von 800Hz und 1300Hz präsentiert. Die Folgen der Tonhöhen waren pseudorandomisiert und die Interstimulus-Intervalle (ISI) betragen zwischen 2,5s und 7,5s. Während der Versuchsreihe, die fünf Minuten dauerte, sollten die Probanden mit der rechten oder linken Hand jeweils einen Taster drücken, je nachdem ob es sich um den tiefen oder hohen Ton handelte. Voraussetzung für die Ableitung war, dass die Probanden bei 1000Hz eine Lautstärke von 30dB wahrnehmen konnten. Nach einem Testlauf wurden während der Versuchsmessung die Reaktionszeit (vom Beginn des Reizes bis zum Drücken des Knopfes) und die Fehler (binnen 1500ms den Knopf nicht bzw. innerhalb dieser Zeit den falschen Knopf zu drücken) aufgezeichnet.

3.3.2 EEG-Aufzeichnung

Die EEG- Aufzeichnung fand in einem schallgedämpften und elektromagnetisch abgeschirmten Raum statt. Die Probanden saßen in einem leicht zurückgelehnten Stuhl mit Kopfstütze und wurden angewiesen, die Augen geöffnet zu halten und auf die Wand zu schauen, die sich etwa 2m vor ihnen befand.

Das EEG wurde mit 32 Kanälen aufgezeichnet. Alle Kanäle wurden gegen eine gemeinsame Referenz Cz gemessen. Die Elektroden wurden gemäß internationalem 10/20-System (Milnik, 2009) angeordnet, wobei diese um die zusätzlichen Elektroden FC1, FC2, FC5, FC6, T1, T2, CP5, CP6, P9 und P10 erweitert wurden. FPz diente der Erdung. Die Daten wurden mit einer Abtastrate von 1000Hz und einem analogen Bandpassfilter (0,16 bis 200Hz) aufgezeichnet. Die Aufbereitung der Rohdaten wurde mit der BrainVision Analyzer (BVA) Software Version 1.05 (Brain Products, München) durchgeführt. Bei jedem Durchlauf wurde die Zeitspanne von 200ms vor dem Stimulus und 450ms nach diesem ausgewertet.

Es wurde die Mittelwertreferenz (*Common average reference*) berechnet und Artefakte mittels computergestützter Artefakterkennung eliminiert, wobei ein Amplitudenkriterium von $\pm 70\mu V$ definiert wurde. Außerdem wurde eine Baseline-Korrektur durchgeführt, die sich auf das

Material und Methoden

Intervall von 200ms - 50ms vor Stimuluspräsentation bezog.

Bei jedem Probanden wurden die ersten 30 fehlerfreien Durchläufe für weitere Analysen verwendet. Die BVA-Software erfasste automatisch die Amplituden und Latenzen. Die Ergebnisse wurden dann nochmals einer visuellen Prüfung unterzogen. Die N1-Amplituden-Peaks waren definiert als der höchste negative Potentialwert (in μV) im Zeitabschnitt von 70ms - 150ms post Stimulus.

3.3.3 LORETA-Analyse

Die Aufbereitung der EEG-Daten für die LORETA-Analyse erfolgte wie oben beschrieben.

Die verwendete LORETA Software (und somit die Einteilung der Voxel) basiert auf dem digitalisierten Talairach-Atlas (Talairach und Tournoux, 1988), einem Koordinatensystem des Gehirns, erhältlich beim Brain Imaging Centre, Montreal Neurologic Institute. LORETA löst das inverse Problem, d.h. die Schwierigkeit der Berechnung des Ursprungs der elektrischen Aktivität aus den Oberflächendaten der Skalp-Elektroden, indem grobe Bereiche mit der maximalen Aktivität bestimmt werden. Hierbei ist der Lösungsraum auf die graue Substanz und den Hippocampus beschränkt (Pascual-Marqui et al., 1999).

Mittels der EEG-Elektrodenkoordinaten nach Towle et al. (1993) erfolgte die dreidimensionale Registrierung der EEG-Elektrodenpositionen. Ein Punkt eines dreidimensionalen Gitters (Voxel) wurde dem Lösungsraum zugerechnet, wenn er folgende drei Bedingungen erfüllte: Die höhere Wahrscheinlichkeit der Zugehörigkeit zur grauen Substanz als zur weißen Substanz und zum Liquor und eine grundsätzliche Wahrscheinlichkeit von mehr als 33% zur grauen Substanz zu gehören. Auf diese Weise erfolgte die Unterteilung in 2394 Voxel mit einer Kantenlänge von 7mm (Pascual-Marqui et al., 1999).

Für die Analyse wurden folgende „*Regions of interest*“ (ROIs) festgelegt: der anguläre cinguläre Cortex (ACCkog), der primäre auditorische Cortex (BA41: Brodmann-Areal 41) und der auditorische Assoziationscortex (BA22: Brodmann-Areal 22). Diese wurden gewählt, da hinsichtlich der akustisch evozierten Potentiale sowohl der auditorische Cortex als auch der ACC als Generatoren der Aktivität in Betracht gezogen werden (Mulert et al., 2007). Die Ausdehnung der einzelnen ROIs im Talairach-Raum war nach Leicht et al. (2010) definiert. Die ROI-Analyse wurde mithilfe des „ROI-Extracters“, bereitgestellt von Marco Congedo, durchgeführt und die mittleren Stromdichte-Werte der festgelegten Voxel berechnet. Diese wurden in nA/mm^2 angegeben.

Material und Methoden

3.4 Laborverfahren

Zur Genotypisierung der neun SNPs im CREB1-Gen (Tab. 1) wurde bei allen Studienteilnehmern ca. 7,5ml venöses Blut in EDTA-Monovetten abgenommen.

Tab.1: Untersuchte Polymorphismen des CREB1-Gens

SNP-ID	Gen	Chromosom	Position	Funktion
rs2709376	5' Bereich von CREB1	2	207525664	Promotor
rs2253206	5' Bereich von CREB1	2	207527254	Promotor
rs2551640	CREB1	2	207543169	Intron
rs2709356	CREB1	2	207547368	Intron
rs2551921	CREB1	2	207570831	Intron
rs2551922	CREB1	2	207573836	Intron
rs2254137	CREB1	2	207579304	Intron
rs2709392	CREB1	2	207589915	Intron
rs2464978	CREB1	2	207593194	Intron

Die SNP-Positionen beziehen sich auf das Referenzgenom GRCh38, db SNP build 138.

Die Funktion der intronischen SNPs wurde bekannten Datenbanken (NCBI und Ensembl 2015) entnommen.

In der Literatur werden rs2709376 (Serretti et al., 2011) und rs2253206 (Lazary et al., 2011; Serretti et al., 2011) in der Promotorregion des Gens lokalisiert.

Das CREB1-Gen befindet sich auf dem langen Arm von Chromosom 2. Das abgebildete Transkript hat 9 Exons, von denen 8 codierend sind (Abb. 3).

Material und Methoden

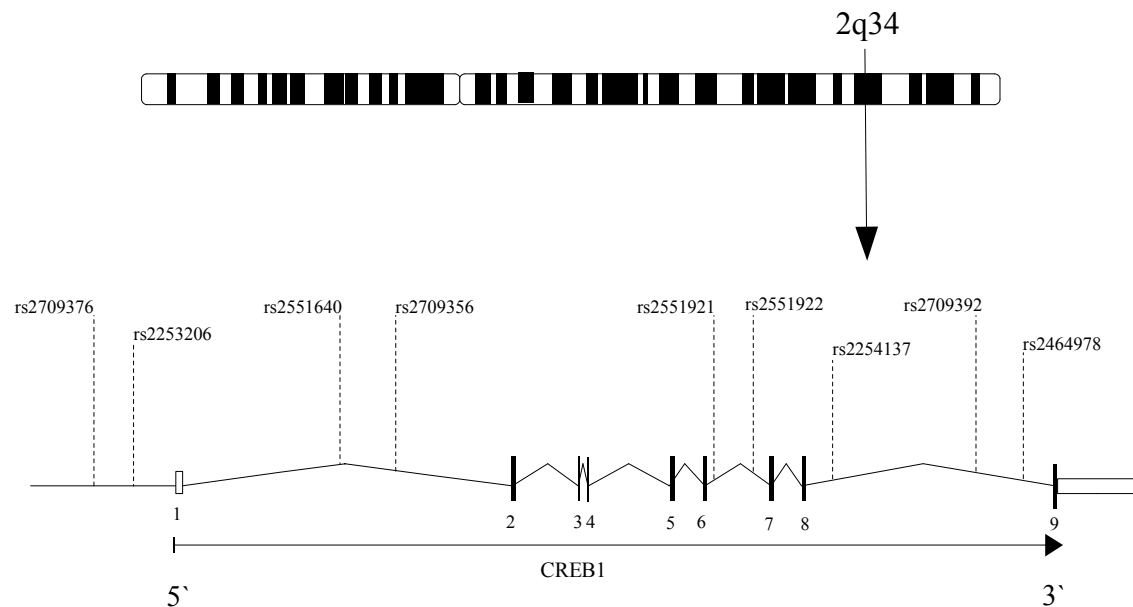


Abb. 3: Lage des Gens auf Chromosom 2; unterer Teil: Transkript CREB1-001 (ausgewählt, da längstes Transkript): Lokalisation der SNPs auf dem Gen. Die nummerierten Rechtecke stellen die Exons dar, dazwischen befinden sich die Introns. Der Pfeil gibt die Leserichtung an (modifiziert nach Ensembl release 78 und NCBI, 2015).

3.4.1 DNA-Extraktion

Tab. 2: Verwendete Materialien zur DNA-Extraktion

Verbrauchsmaterial, Reagenz, Gerät	Hersteller
EDTA-Monovette	Sarstedt, Nümbrecht
Qiagen DNA Blood Maxi Kit	Qiagen, Hilden
Ethanol	Carl Roth, Karlsruhe
50ml Zentrifugenröhre	Sarstedt, Nümbrecht
Vortex Genie	Scientific Industries, New York, USA

Die Extraktion der DNA wurde nach Protokoll des Qiagen Blood Maxi Kits (Qiagen, 2005) durchgeführt. Die verwendeten Materialien sind in Tabelle 2 aufgeführt.

Um eine Lyse der Leukozyten herbeizuführen, wurde 500µl Qiagen Protease zugegeben. Durch Zugabe von 12ml des Guanidinhydrochlorid (GHC1)-haltigen Lysepuffers wurden optimale Reaktionsbedingungen für das Enzym geschaffen.

Danach erfolgte die vollständige Durchmischung für eine Minute auf dem Vortex. Zur Maximierung des DNA-Ertrags wurde die Lösung 30 Minuten bei 70°C im Wasserbad

Material und Methoden

inkubiert. Die Zugabe von 10ml Ethanol entzog der DNA die Hydrathülle. Daran schloss sich eine Mischung auf dem Vortex für 2 Minuten an.

Es folgte bei Raumtemperatur die sukzessive Überführung der DNA-Lösung auf eine QIAamp Maxi Säule, wobei jeweils drei Minuten bei 3000 Umdrehungen pro Minute (rpm) zentrifugiert wurde. Somit wurde die DNA selektiv an die Silikagelmembran gebunden.

Durch Hinzugeben von 5ml Waschpuffer (AW1) und anschließender 2-minütiger Zentrifugation bei 4000rpm wurden Verunreinigungen durch Proteine und RNA entfernt.

Der zweite Waschschrift erfolgte mit 5ml ethanolhaltigem, salzarmen Puffer (AW2) und Zentrifugation für 15 Minuten bei 4000rpm. Dadurch wurden die GHCl-Salze ausgewaschen und die Silikagelmembran getrocknet.

Durch zweimalige Inkubation mit insgesamt 1,5ml TRIS-haltigem AE-Puffer für jeweils 5 Minuten bei Raumtemperatur und anschließender 2-minütiger Zentrifugation bei 5000rpm, ebenfalls bei Raumtemperatur, erfolgte die Elution der DNA.

3.4.2 Konzentrationseinstellung der DNA

Zur Bestimmung der DNA-Konzentration wurde die PicoGreen-Methode angewendet.

Bei der Hochdurchsatzgenotypisierung müssen alle eingesetzten DNA-Lösungen die gleiche Konzentration von 50ng/µl aufweisen und somit auf diese eingestellt werden.

Bei PicoGreen (Quant iT PicoGreen dsDNA reagent, Invitrogen GmbH, Karlsruhe) handelt es sich um ein fluoreszierenden Farbstoff, der hochselektiv an doppelsträngige DNA bindet.

Zunächst wurde eine Standardverdünnungsreihe der DNA hergestellt. Dabei wurde der DNA-Standard mit einer Konzentration von 100ng/µl (Human genomic DNA 100ng/µl, Clontech, Mountain View, USA) jeweils 1:2 verdünnt, sodass eine Standardkurve mit acht Punkten entstand: 100; 50; 25; 12,5; 6,25; 3,125; 1,5625; 0ng/µl.

Alle Pipettierschritte erfolgten mithilfe eines Pipettierroboters (Janus Automated Workstation, Perkin Elmer Inc., Massachusetts, USA).

Die DNA wurde wie folgt für die Fluoreszenzmessung vorbereitet: Die zu messenden DNA-Lösungen wurde in einer 96 well Platte (Thermo Fast 96 well Plate, ABgene, Hamburg) mit Wasser im Verhältnis 1:10 vorverdünnt. Die Standardkurve wurde nicht weiter verdünnt.

In eine schwarze 96 well Platte mit flachem Boden (96 well Flat Bottom Plate Black, Greiner Bio-one, Frickenhausen) wurden pro Vertiefung 50µl autoklaviertes, destilliertes Wasser vorgelegt. Dann folgte die Zugabe von jeweils 5µl der Standardverdünnungsreihe bzw. der vorverdünnten DNA in Duplikaten.

Material und Methoden

PicoGreen wurde 1:156 verdünnt. 145µl des verdünnten Farbstoffes wurden pro Vertiefung zu der Proben- oder Standard-DNA gegeben. Die Endverdünnung des PicoGreen betrug 1:200.

Anschließend folgte die Fluoreszenzmessung: Die Platte wurde mittels Greifarm automatisch von der Janus Workstation in den Victor 3 Multilabel Counter 1420 (Perkin Elmer Inc., Massachusetts, USA) überführt und im Messgerät 30 Sekunden in horizontaler Ebene in Doppellellipsen geschüttelt. Somit erfolgte die homogene Durchmischung der Lösungen.

Bei einer Wellenlänge von 485nm wurde das PicoGreen angeregt und die Emission bei 520nm gemessen. Die ermittelten Fluoreszenzwerte wurden an einen Computer übermittelt. Die Konzentrationen der DNA-Lösungen wurden anhand der Fluoreszenzwerte der Standardkurve berechnet und anhand dieser Konzentrationen die Menge an Wasser und DNA berechnet, die notwendig war, um eine Konzentration von 50ng/µl zu erhalten. Die Verdünnung erfolgte automatisch mittels Pipettierroboter.

3.4.3 Genotypisierung

Die Genotypisierung erfolgte im Hochdurchsatzverfahren mittels Massenspektrometrie im MassArray MALDI-TOF MS (*Matrix Assisted Laser Desorption/Ionisation time of flight Mass Spectrometry*).

Die in die Genotypisierung eingeschlossenen SNPs wurden mit der Software Assay Design 3.1 (Sequenom, San Diego) zu Multiplexen konzipiert, wobei für jeden SNP ein Primerset aus zwei PCR-Primern und einem Extensionsprimer entworfen wurde.

Die Genotypisierung erfolgte in einem dreistufigen Verfahren: konventionelle Multiplex-PCR, Primerextensionsreaktion und Messung der Extensionsprodukte im MALDI-TOF MS.

3.4.4 Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Tab. 3: Verwendete Materialien für die Multiplex-PCR

Verbrauchsmaterial, Reagenz, Gerät	Hersteller
dNTP Set, 100mM	ABgene, Hamburg
Gene Amp PCR System 9700	Applied Biosystems, Foster City, USA
HotStar Taq DNA Polymerase 5U/μl	Qiagen, Hilden
Microlab MPH 96	Hamilton, Reno, USA
PCR-Puffer 10x	Qiagen, Hilden
MgCl ₂ 25mM	Qiagen, Hilden
Thermo Fast 96 well Plate	ABgene, Hamburg
Thermo Fast 384 well Plate	ABgene, Hamburg

Um die Genombereiche zu amplifizieren, die den zu untersuchenden SNP umgeben, wurde eine Polymerase Kettenreaktion durchgeführt (verwendete Materialien vgl. Tabelle 3). Hierfür wurden PCR-Primer entworfen, die gewährleisten, dass alle Amplikons eines Plexes etwa die gleiche Länge besitzen, sodass kein Ungleichgewicht zwischen der Amplifizierung ungleich langer PCR-Produkte entstehen kann.

Vor Durchführung der Polymerase Kettenreaktion wurde ein Mastermix erstellt. Die Reagenzien wurden gemäß Tabelle 4 gemischt.

Tab. 4: Eingesetzte Konzentrationen und Volumina der Reagenzien in der PCR

Reagenz	Konzentration in einer 5μl Reaktion	Volumen für 1 Reaktion (25% Überhang incl.)	Volumen für 384 Reaktionen (25% Überhang incl.)
H ₂ O	-	1,850μl	888μl
10xPCR- Puffer	1,25x	0,625μl	300μl
MgCl ₂ 25mM	1,625mM	0,325μl	156μl
dNTP Mix 25mM	500μM	0,100μl	480μl
Primer Mix (jeweils 500nM)	100nM	1,000μl	480μl
Hotstar Taq DNA Polymerase 5U/μl	0,5U/Reaktion	0,100μl	48μl
Total	-	4,000μl	2400μl

Material und Methoden

Mithilfe des Pipettierroboters Microlab MPH 96 wurden in jedes *well* einer 384 *well* Platte 4µl Mastermix sowie 12,5ng (2,5µl) der genomischen DNA pipettiert. Die DNA wurde hierfür aus vier 96 *well* Platten transferiert.

Die erhaltenen Reaktionsplatten wurden nach Zentrifugation verschlossen und die PCR in einem Thermocycler (GeneAmp PCR System 9700) durchgeführt: Zunächst wurde die DNA durch eine 5-minütige Erwärmung auf 95°C denaturiert (initiale Denaturierung). Die Proben wurden dann für 20s auf 95°C gehalten, sodass die DNA einzelsträngig vorlag. Es folgte die Abkühlung der Proben auf 56°C für 30s. Somit konnten sich die Primer an die Einzelstränge der DNA anlagern (Annealing). Eine Temperaturerhöhung auf 72°C für eine Minute führte zur Anlagerung der Nukleotide an die Primer durch die Taq-Polymerase (Elongation). Die Schritte, die der initialen Denaturierung folgten, wurden in 45 Zyklen durchgeführt. Nach der folgenden 3-minütigen Extension bei 72°C wurden die Proben auf 12°C abgekühlt. Nach dieser Prozessierung stand für die weitere Verwendung ausreichend Material zur Verfügung.

3.4.5 Dephosphorylierung der PCR-Produkte

Um die Nukleotide, die bei der Polymerase Kettenreaktion nicht angelagert wurden, zu dephosphorylieren, wurde das Enzym Shrimp Alkalische Phosphatase (SAP) eingesetzt. Somit wurde eine Interferenz dieser mit der iPLEX-Reaktion verhindert. Die verwendeten Materialien für die SAP-Reaktion sind in Tabelle 5 aufgeführt.

Tab. 5: Verwendete Materialien für die SAP-Reaktion

Material, Reagenz, Gerät	Verwendung	Hersteller
Gene Amp PCR System 9700	Multiplex-PCR	Applied Biosystems, Foster City, USA
Multimek Pipettierroboter	Zugabe des Extend-Mastermix zum PCR- Produkt	Beckmann, Fullerton, USA
SAP-Buffer	Dephosphorylierung nicht inkorporierter dNTPs	Sequenom, San Diego, USA
Shrimp Alkaline Phosphatase (SAP) Enzyme	Dephosphorylierung nicht inkorporierter dNTPs	Sequenom, San Diego, USA

Material und Methoden

Für die SAP-Behandlung wurde ein Mastermix gemäß Tabelle 6 erstellt.

Tab. 6: Eingesetzte Volumina der Reagenzien für den SAP-Mastermix

Reagenz	Volumen für 1 Reaktion (25% Überhang incl.)	Volumen für 384 Reaktionen
H ₂ O	1,530µl	734,4µl
10x SAP-Buffer	0,170µl	81,6µl
Shrimp Alkaline Phosphatase Enzyme	0,300µl	144,0µl
Total	2,000µl	960,0µl

2µl SAP-Mastermix wurden mittels Pipettierroboter zu den PCR-Reaktionsprodukten gegeben und gemischt. Nach Zentrifugation folgte die Behandlung im Thermocycler: Der Ansatz wurde für 40 Minuten bei 37°C inkubiert. Danach erfolgte eine 10-minütige Temperaturerhöhung auf 85°C, bei der das SAP-Enzym irreversibel inaktiviert wurde. Im letzten Schritt schloss sich eine Abkühlung auf 4°C an.

3.4.6 iPLEX-Reaktion (Primerextensionsreaktion)

Bei der iPLEX-Reaktion wird, im Unterschied zur Multiplex-PCR, pro SNP nur ein Primer eingesetzt. Für diese Reaktion wurde ein Primer design, der unmittelbar 5' des SNPs an die DNA bindet.

Der Primer wurde nur um eine - die komplementäre - Base verlängert, was durch den Einsatz von Didesoxynukleotiden (ddNTPs) erreicht wurde.

Tab. 7: Verwendete Reagenzien für die iPLEX-Reaktion

Reagenz	Hersteller
iPLEX Buffer Plus	Sequenom, San Diego, USA
iPLEX Enzym	Sequenom, San Diego, USA
iPLEX Termination Mix	Sequenom, San Diego, USA

Tab. 8: Eingesetzte Konzentrationen und Volumina für die iPLEX-Reaktion

Reagenz	Konzentration/9µl	Volumen für 1 Reaktion (Überhang incl.)	Volumen für 384 Reaktionen (Überhang incl.)
H ₂ O	-	0,755µl	362,40µl
iPLEX Buffer Plus	0,222x	0,200µl	96,00µl
iPLEX Termination Mix	1x	0,200µl	96,00µl
Primer Mix (7µM - 14µM)	0,625µM - 1,25µM	0,804µl	385,92µl
iPLEX Enzyme	1x	0,041µl	19,68µl
Total	-	2,000µl	960,00µl

Es wurde ein so genannter iPLEX-Cocktail (vgl. Tabelle 7 und 8) hergestellt und in jedes *well* 2µl des Mixes pipettiert. Nachdem die Platten abzentrifugiert worden waren, fand die Extensionsreaktion im Thermocycler nach folgendem Schema statt:

(1) 94°C für 30 Sekunden, (2) 94°C für 5 Sekunden, (3) 52°C für 5 Sekunden, (4) 80°C für 5 Sekunden, (5) 72°C für 3 Minuten, (6) Abkühlung auf 4°C.

Hierbei wurden die Schritte (2) bis (5) 40mal wiederholt, wobei innerhalb dieser Zyklen eine fünfmalige Wiederholung von Schritt (3) und (4) stattfand.

Um störende Kationen zu entfernen und somit Interferenzen der Extensionsprodukte zu vermeiden, wurden diese abschließend mit einem Ionenaustauscherharz (Clean Resin; Sequenom, San Diego, USA) entsalzt.

3.4.7 Messung der Extensionsprodukte (MALDI-TOF-Analyse)

Im folgenden Schritt fand die eigentliche Genotypisierung im Autoflex MALDI-TOF Massenspektrometer (Bruker Daltonics, Bremen) statt.

Hierfür wurde das Analysegemisch auf einen Siliziumchip mit 384 bereits aufpräparierten Matrixpunkten (SpectroCHIP; Sequenom, San Diego, USA) übertragen. Die Übertragung der Proben erfolgte mit dem MassARRAY POINT Nanodispenser (Sequenom, San Diego, USA) mithilfe von Edelstahlnadeln. Zur Kalibrierung des Massenspektrometers wurde ein 3-Punkt Kalibrant (Sequenom, San Diego, USA) eingesetzt.

Der so präparierte Chip wurde in das Massenspektrometer eingeführt und im Hochvakuum wenige Nanosekunden einem gepulsten Laserstrahl ausgesetzt. Das Probenmaterial wurde somit ionisiert und daraufhin in einem elektrischen Feld beschleunigt. Die Ionen erreichten ein

Material und Methoden

Flugrohr und deren Geschwindigkeit wurde bestimmt. Anhand der Geschwindigkeiten konnte auf die molekulare Masse der Ionen und somit auf die jeweiligen Allele und Genotypen geschlossen werden. Die Spektrenauswertung erfolgte mittels der Software TyperAnalyzer 3.4.0.18 (Sequenom, San Diego, USA).

3.4.8 Qualitätskontrolle

Die SNPs, die in die statistische Auswertung eingingen, mussten bestimmte Qualitätskriterien erfüllen: Die TyperAnalyzer Software konnte für jeden SNP einen *clusterplot* erstellen, der dann als qualitativ wertvoll eingeschätzt wurde, wenn sich alle Genotypcluster sauber voneinander getrennt darstellten.

Die Blindproben durften keine und die Kontrollproben (doppelte Proben derselben DNA auf unterschiedlichen Stellen der 96 *well* Platten) mussten alle die gleichen Genotypen aufweisen.

Die Probanden-Callrate sollte mindestens 0,8 betragen: Wenigstens 80% der untersuchten SNPs mussten einen auswertbaren Genotypen für den jeweiligen Probanden ergeben. Die SNP-Callrate betrug mindestens 0,9. Das bedeutet, 90% der untersuchten Probanden mussten auswertbare Genotypen für einen SNP ergeben.

Die Genotypen der mitprozessierten CEPH-Proben wurden mit der HapMap-Datenbank (The International HapMap Consortium, 2003) abgeglichen. Diese Proben mussten die erwarteten Genotypen aufweisen, ansonsten wurden die Ergebnisse des entsprechenden SNPs verworfen.

3.5 Statistische Auswertung

Die Abweichung der Genotypverteilung vom Hardy-Weinberg-Equilibrium (HWE) wurde mit dem exakten Test nach Fisher geprüft. Signifikante Abweichungen ($p\text{-HWE} < 0,01$) in der genotypisierten Kontrollstichprobe oder eine minimale Allel-Frequenz $< 0,01$ in der genotypisierten Gesamtstichprobe führten zum Ausschluss des SNPs.

Signifikante Unterschiede in der Altersverteilung zwischen Fall- und Kontrollgruppe wurden mit dem Mann-Whitney-U-Test und signifikante Unterschiede in der Verteilung der Geschlechter zwischen beiden Gruppen wurden mit dem exakten Test nach Fischer untersucht.

Die Einteilung für die Berechnungen erfolgte in drei Gruppen: Patienten, Kontrollen und Gesamtgruppe.

Es wurde - sowohl bei der Untersuchung der Assoziation der einzelnen SNPs als auch der

Material und Methoden

Haplotypen mit dem jeweiligen Phänotypen - eine multiple lineare Regression durchgeführt, um den genetischen Einfluss auf die Phänotypen zu untersuchen. Hierbei wurden der Genotyp, das Alter, das Geschlecht und der Erkrankungsstatus (dieser nur bei der Gesamtgruppe) einbezogen. Für den Genotypeneffekt wurde ein additives Modell verwendet, welches den SNP nach Anzahl der Referenzallele mit 0, 1 und 2 codiert. Bei den Haplotypen erfolgte eine ähnliche Codierung: Der Referenzhaplotyp wurde versus alle anderen betrachtet. Hierbei wurden nur Haplotypen mit einer Frequenz von $> 1\%$ in die Analyse einbezogen, während die Probanden ausgeschlossen wurden, bei denen $> 50\%$ der Genotypen fehlten. Diese Analyse erfolgte mithilfe der Software PLINK (PLINK v1.07, Purcell et al., 2007).

Bei der Einzel-SNP-Analyse wurde zudem die Software R version 3.0.0 (R. D. C. Team, 2013) verwendet und für alle Regressionskoeffizienten (außer dem Genotypen) der jeweilige Mittelwert in die Gleichung mit den geschätzten Koeffizienten eingesetzt. Mithilfe der Gleichung wurde der adjustierte Mittelwert für jeden Genotypen berechnet.

Die grafische Darstellung der Haplotyp-Blöcke erfolgte mithilfe der Haploview Software (Haploview 4.2, Barrett et al., 2005). Nach der Methode von Gabriel (Gabriel et al., 2002) wurden die Haplotyp-Blöcke bestimmt.

Um normalverteilte Residuen zu erhalten, wurden alle ermittelten Messwerte (absolute Amplitude in μV und Stromdichte (Aktivität) in nA/mm^2) transformiert und visuell anhand von Residualplots folgende Outlier ausgeschlossen: jeweils ein Proband bei der N1-Amplitude über Cz und Fz und bei der Aktivität in BA22. Aufgrund der vorgenommenen Transformationen wird für die Messwertvariablen in der Ergebnisbetrachtung keine Einheit angegeben.

Die Werte für die Aktivität in ACCkug und BA22 wurden mit der reziproken Quadratwurzel ($1/\sqrt{x}$) transformiert. Damit entsprechen höhere Werte in der Original-Skala geringeren transformierten Werten und umgekehrt.

Bei den übrigen Messwerten wurden die folgenden Transformationen angewandt: Aktivität in BA41: $\ln(x)$, N1-Amplitude über Cz: $\ln(x+3)$ und N1-Amplitude über Fz: \sqrt{x} . Die transformierten Werte entsprechen in der Richtung denen der Original-Skala.

Ein Signifikanzniveau von $p < 0,05$ wurde für die Regressionsanalysen zugrunde gelegt, als Trend wurde $p < 0,1$ gewertet.

Ergebnisse

4. Ergebnisse

Diese Arbeit untersucht die Assoziation von neun Polymorphismen des CREB1-Gens und dessen unmittelbarer Umgebung mit der Größe der N1-Amplitude im EEG (Cz, Fz) und der ROI-Aktivierung (ACCKog, BA22, BA41) für die N1-Amplitude.

Die Genotypverteilung befand sich in der Gesamtstichprobe für alle untersuchten Polymorphismen im Hardy-Weinberg-Equilibrium ($p > 0,01$). In der EEG-Stichprobe ergaben sich bei der Gesamtkohorte für SNP rs2551921 Werte außerhalb des HWE: Bei drei Phänotyp-Untersuchungen (ACCKog, BA41, Fz) war $p < 0,01$. In der Regressionsanalyse zeigte dieser SNP keine signifikante Assoziation zu den drei Phänotypen.

Bedingt durch die Transformation der Messergebnisse entsprechen niedrige berechnete Werte der Aktivität in ACCKog und BA22 hohen Rohwerten in der LORETA-Analyse und umgekehrt. Bei den Werten für die N1-Amplitude über Cz und Fz und der Aktivität in BA41 ändert sich die Richtung nach Transformation nicht.

Eine vollständige Aufstellung aller Ergebnisse für die einzelnen Gruppen und die untersuchten neun SNPs ist im Anhang zu finden.

4.1 Zusammensetzung der Studienteilnehmer der EEG-Stichprobe

Tabelle 9 zeigt die Verteilung der Geschlechter und des Alters der Teilnehmer.

Tab. 9: Geschlechter- und Altersverteilung der EEG-Stichprobe

Gruppe	Geschlecht n (%)		Alter in Jahren M (SD)	Gesamt n
	männlich	weiblich		
Patienten	62 (67,39)	30 (32,61)	39,87 (10,26)	92
Kontrollen	125 (49,21)	129 (50,79)	46,70 (15,04)	254
Gesamt n	187 (54,05)	159 (45,95)	44,89 (14,24)	346

M = Mittelwert, SD = Standardabweichung, n = Anzahl der Probanden

In der Patientengruppe waren signifikant mehr Männer ($p = 0,003$) vertreten und sie war signifikant jünger als die Kontrollgruppe ($p = 0,00016$).

Ergebnisse

4.2 Ergebnisse der Einzel-SNP-Analyse

Die Ergebnisse der einzelnen SNPs werden im Folgenden betrachtet. Die zwei Polymorphismen ohne signifikante Assoziationen werden gemeinsam am Ende, die übrigen sieben in Reihenfolge der Leserichtung dargestellt (siehe Abb. 3).

Pro SNP werden die p-Werte für alle Phänotypen in den jeweiligen Gruppen grafisch abgebildet und signifikante Assoziationen tabellarisch ausführlich beschrieben.

4.2.1 SNP rs2253206

Es zeigte sich nur bei den Kontrollprobanden eine signifikante Assoziation ($p = 0,046$) zwischen SNP rs2253206 mit der N1-Amplitude an der Elektrode Cz (Abb. 4).

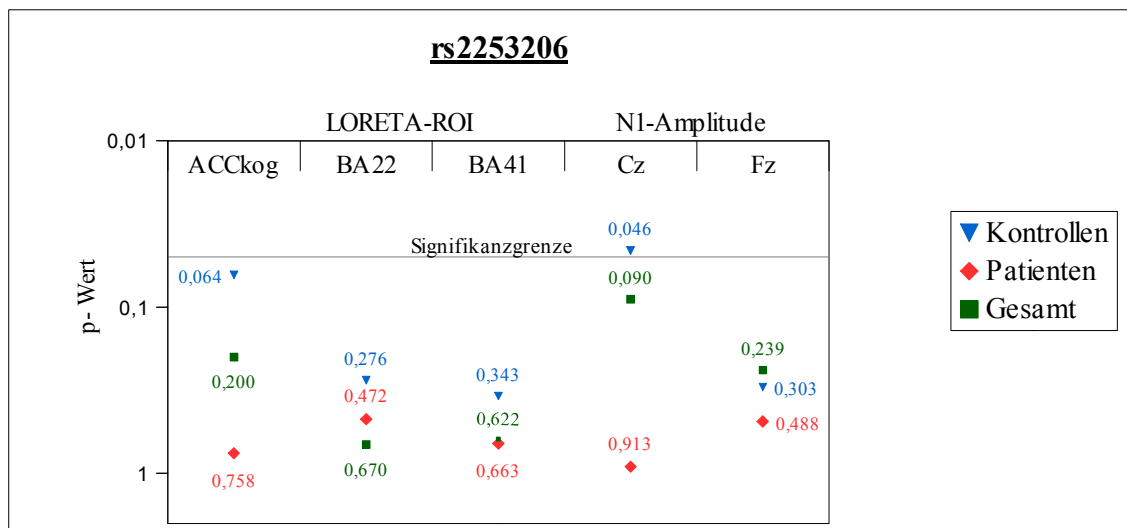


Abb. 4: Grafische Darstellung der Signifikanzen der Assoziationen zwischen SNP rs2253206 und den untersuchten Phänotypen im EEG. Die durchgezogene, waagerechte Linie markiert die Signifikanzgrenze ($p = 0,05$); LORETA-ROI: *Regions of interest* der LORETA-Analyse

Für den Genotypen A/A ergab sich in der Kontrollgruppe eine kleinere N1-Amplitude als für A/G und G/G, wobei G/G die größten Werte aufwies (Tab. 10).

Ergebnisse

Tab. 10: Mittelwerte der N1-Amplitude bei Cz für die Genotypen

Gruppe		Genotyp (A_1 : A)			B
		G/G	A/G	A/A	
Kontrollen (n = 239)					
	n (%)	73 (30,54)	121 (50,63)	45 (18,83)	
	M (SE)	2,482 (0,031)	2,427 (0,019)	2,373 (0,036)	-0,055

M = adjustierter Mittelwert, SE = Standardfehler, n = Anzahl der Probanden, A_1 = Referenzallel, B = Regressionskoeffizient

4.2.2 SNP rs2551640

Für den SNP rs2551640 konnten zu drei der untersuchten EEG-Phänotypen signifikante Assoziationen ermittelt werden: für die Aktivität in der ACCkog und der N1-Amplitude über Cz jeweils in der Kontrollgruppe und der Gesamtkohorte und für die N1-Amplitude über Fz bei den Patienten und der gesamten Gruppe (Abb. 5).

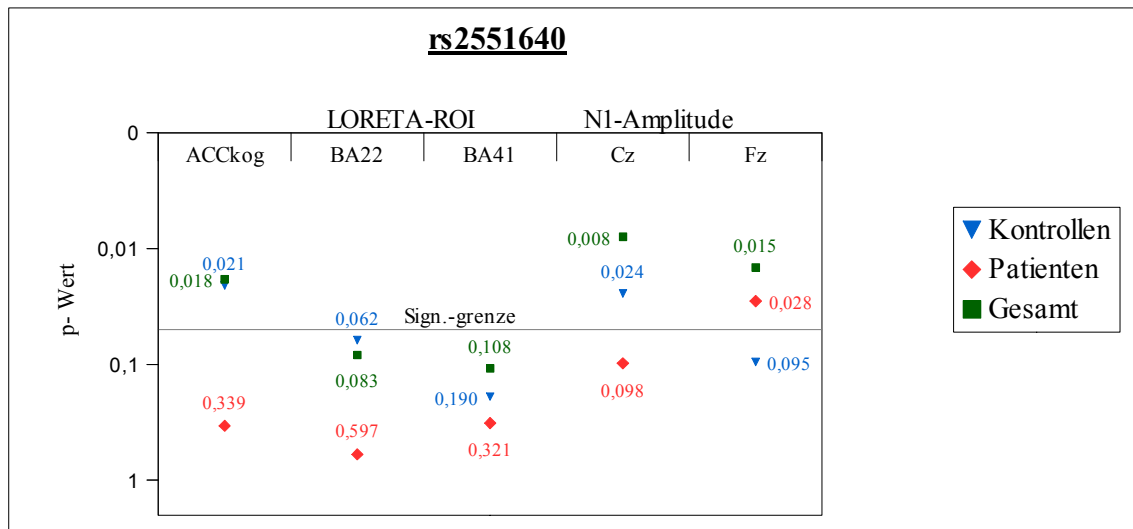


Abb. 5: Grafische Darstellung der Signifikanzen der Assoziationen zwischen SNP rs2551640 und den untersuchten Phänotypen im EEG. Die durchgezogene, waagerechte Linie markiert die Signifikanzgrenze ($p = 0,05$); LORETA-ROI: *Regions of interest* der LORETA-Analyse

In der Kontroll- und der Gesamtgruppe waren die transformierten Werte der Aktivierung für die ROI ACCkog bei Genotyp A/A geringer und für G/G am größten (Tab. 11).

Ergebnisse

Tab. 11: Mittelwerte der Stromdichte (ROI-Aktivierung des ACCkog) für die Genotypen

Gruppe		Genotyp (A ₁ : G)			B
		A/A	A/G	G/G	
Kontrollen (n = 237)					
	n (%)	121 (51,05)	85 (35,86)	31 (13,08)	
	M (SE)	18,638 (0,318)	19,427 (0,271)	20,215 (0,525)	0,788
Gesamt (n = 318)					
	n (%)	151 (47,48)	123 (38,68)	44 (13,84)	
	M (SE)	19,147 (0,296)	19,874 (0,239)	20,600 (0,463)	0,727

M= adjustierter Mittelwert, SE = Standardfehler, n = Anzahl der Probanden, A₁ = Referenzallel, B = Regressionskoeffizient

Bei der N1-Amplitude über Cz ergab sich sowohl für die Kontroll- als auch für die Gesamtgruppe bei Genotyp G/G im Durchschnitt eine geringere Amplitude als bei A/A und A/G, wobei die Probanden mit dem Genotypen A/A die größten Amplitudenwerte zeigten (Tab. 12). Dieses Ergebnis zeigte sich auch bei den Patienten als nicht signifikanter Trend (p = 0,098).

Tab. 12: Mittelwerte der N1-Amplitude über Cz für die Genotypen

Gruppe		Genotyp (A ₁ : G)			B
		A/A	A/G	G/G	
Patienten (n = 81)					
	n (%)	30 (37,04)	38 (46,91)	13 (16,05)	
	M (SE)	2,265 (0,050)	2,185 (0,034)	2,105 (0,066)	-0,080
Kontrollen (n = 236)					
	n (%)	120 (50,85)	85 (36,02)	31 (13,14)	
	M (SE)	2,457 (0,025)	2,395 (0,022)	2,334 (0,042)	-0,061
Gesamt (n = 317)					
	n (%)	150 (47,31)	123 (38,80)	44 (13,88)	
	M (SE)	2,405 (0,023)	2,342 (0,018)	2,279 (0,035)	-0,063

M = adjustierter Mittelwert, SE= Standardfehler, n = Anzahl der Probanden, A₁ = Referenzallel, B = Regressionskoeffizient

Bei der N1-Amplitude über Fz stellte sich ebenfalls eine geringere N1-Amplitude bei G/G im Vergleich zu den beiden anderen Genotypen dar (Tab. 13). Dies traf bei der Patientengruppe und dem gesamten Studienkollektiv zu. Ein Trend zur Assoziation konnte bei den Kontrollen

Ergebnisse

festgestellt werden ($p = 0,095$). Auch hier war die N1-Amplitude bei Genotyp A/A am größten.

Tab. 13: Mittelwerte der N1-Amplitude über Fz für die Genotypen

Gruppe		Genotyp (A_1 : G)			B
		A/A	A/G	G/G	
Patienten (n = 80)					
	n (%)	29 (36,25)	38 (47,50)	13 (16,25)	
	M (SE)	2,358 (0,086)	2,176 (0,058)	1,995 (0,112)	-0,182
Gesamt (n = 317)					
	n (%)	150 (47,32)	123 (38,80)	44 (13,88)	
	M (SE)	2,505 (0,039)	2,407 (0,031)	2,309 (0,060)	-0,098
Kontrollen (n = 237)					
	n (%)	121 (51,05)	85 (35,86)	31 (13,08)	
	M (SE)	2,565 (0,043)	2,488 (0,037)	2,410 (0,071)	-0,077

M = adjustierter Mittelwert, SE = Standardfehler, n = Anzahl der Probanden, A_1 = Referenzallel, B = Regressionskoeffizient

4.2.3 SNP rs2709356

Zwischen SNP rs2709356 und der Aktivität der ROI ACCkog und der N1-Amplitude über Cz fanden sich in der Kontrollgruppe signifikante Assoziationen (Abb. 6).

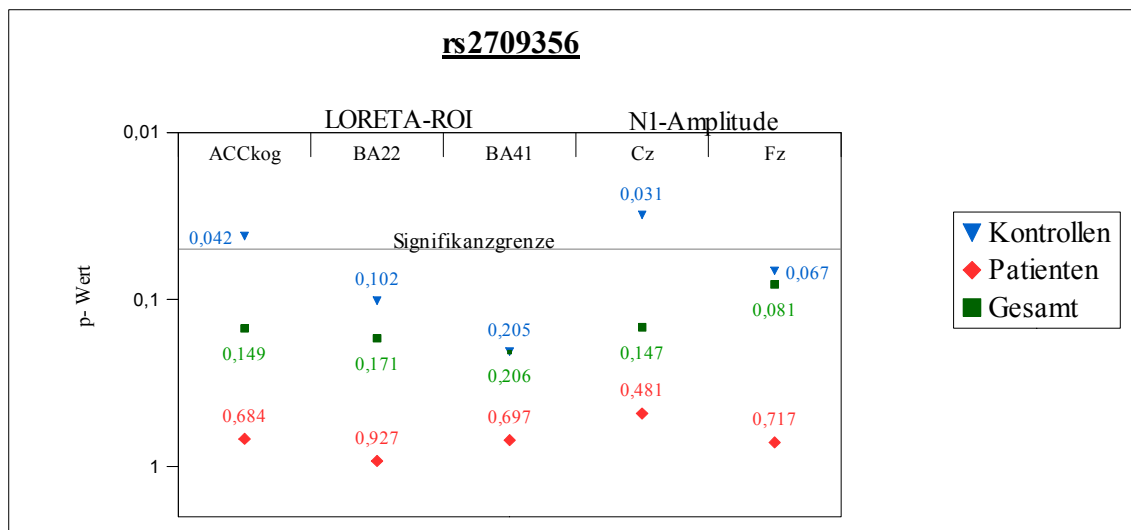


Abb. 6: Grafische Darstellung der Signifikanzen der Assoziationen zwischen SNP rs2251921 und den untersuchen Phänotypen im EEG. Die durchgezogene, waagerechte Linie markiert die Signifikanzgrenze ($p = 0,05$); LORETA-ROI: *Regions of interest* der LORETA-Analyse

Ergebnisse

Die transformierten Werte der Aktivierung der ROI ACCKog waren bei Genotyp C/C durchschnittlich am größten, bei T/T am geringsten (Tab. 14).

Tab. 14: Mittelwerte der Stromdichte (ROI-Aktivierung des ACCKog) für die Genotypen

Gruppe		Genotyp (A ₁ : T)			B
		C/C	C/T	T/T	
Kontrollen (n = 239)					
	n (%)	160 (66,95)	69 (28,87)	10 (4,18)	
	M (SE)	19,382 (0,284)	18,521 (0,354)	17,661 (0,724)	-0,860

M = adjustierter Mittelwert, SE = Standardfehler, n = Anzahl der Probanden, A₁ = Referenzallel, B = Regressionskoeffizient

Für die N1-Amplitude über Cz ergaben sich die größten Amplitudenwerte bei Genotyp T/T, bei C/C waren die Werte am niedrigsten (Tab. 15)

Tab. 15: Mittelwerte der N1-Amplitude bei Cz für die Genotypen

Gruppe		Genotyp (A ₁ : T)			B
		C/C	C/T	T/T	
Kontrollen (n = 238)					
	n (%)	160 (67,23)	69 (28,99)	9 (3,78)	
	M (SE)	2,397 (0,023)	2,472 (0,029)	2,546 (0,059)	0,074

M = adjustierter Mittelwert, SE = Standardfehler, n = Anzahl der Probanden, A₁ = Referenzallel, B = Regressionskoeffizient

Ergebnisse

4.2.4 SNP rs2551921

Für den SNP 2551921 konnte bei den Kontrollprobanden eine signifikante Assoziation zur N1-Amplitude über Cz festgestellt werden (Abb. 7).

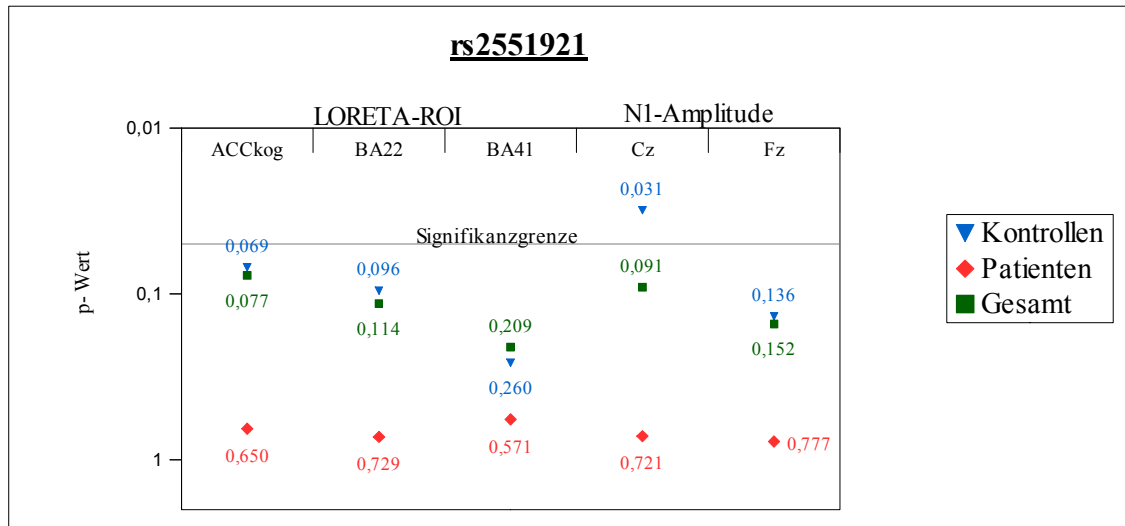


Abb. 7: Grafische Darstellung der Signifikanzen der Assoziationen zwischen SNP rs2251921 und den untersuchten Phänotypen im EEG. Die durchgezogene, waagerechte Linie markiert die Signifikanzgrenze ($p = 0,05$); LORETA-ROI: *Regions of interest* der LORETA-Analyse

Probanden mit dem Genotypen C/C zeigten durchschnittlich die größten N1-Amplitudenwerte über Cz, diejenigen mit T/T die geringsten (Tab. 16).

Tab. 16: Mittelwerte der N1-Amplitude bei Cz für die Genotypen

Gruppe	Genotyp (A_1 : C)			B
	T/T	C/T	C/C	
Kontrollen (n = 225)				
n (%)	150 (66,67)	61 (27,11)	14 (6,22)	
M (SE)	2,391 (0,024)	2,462 (0,028)	2,533 (0,056)	0,071

M = adjustierter Mittelwert, SE = Standardfehler, n = Anzahl der Probanden, A_1 = Referenzallel, B = Regressionskoeffizient

Ergebnisse

4.2.5 SNP rs2254137

Für den SNP rs2254137 wurden folgende signifikante Assoziationen ermittelt: in der Gesamtgruppe mit der Aktivität in der ROI ACCkog und bei der Patienten- und Gesamtkohorte jeweils mit der N1-Amplitude über Cz und Fz (Abb. 8).

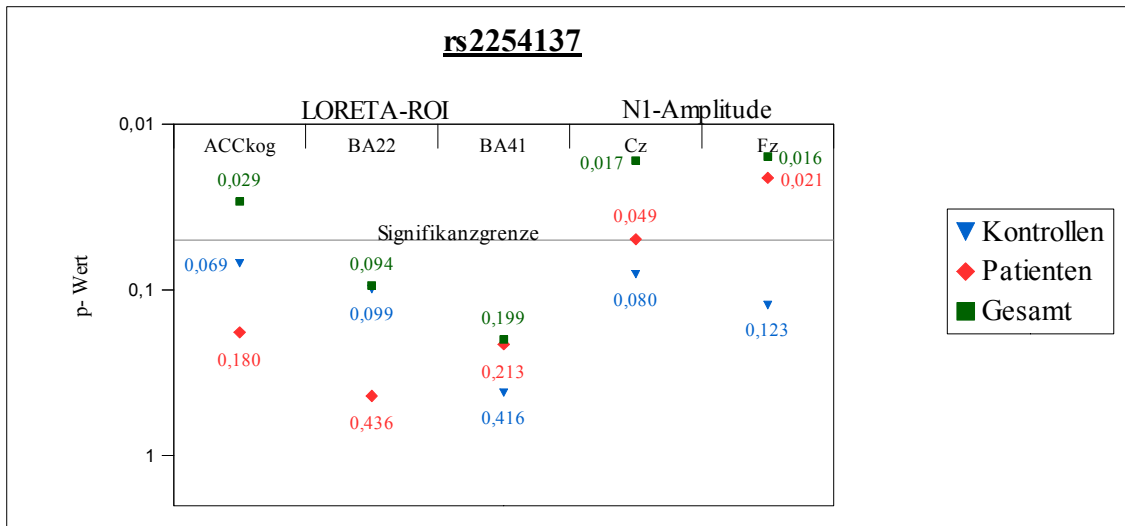


Abb. 8: Grafische Darstellung der Signifikanzen der Assoziationen zwischen SNP rs2254137 und den untersuchten Phänotypen im EEG. Die durchgezogene, waagerechte Linie markiert die Signifikanzgrenze ($p = 0,05$); LORETA-ROI: *Regions of interest* der LORETA-Analyse

Bei der Patienten- und Gesamtgruppe waren sowohl über der Cz- als auch der Fz-Elektrode die Werte der N1-Amplitude bei Genotyp A/A am größten, bei C/C am geringsten (Tab. 17).

In der Kontrollgruppe war dieses Ergebnis über Cz ebenfalls als Trend zur Signifikanz ($p = 0,080$) festzustellen.

Ergebnisse

Tab. 17: Mittelwerte der N1-Amplitude über Cz und Fz für die Genotypen

Gruppe, Phänotyp		Genotyp (A ₁ : C)			B
		A/A	A/C	C/C	
Pat. (n = 83), Cz					
	n (%)	29 (34,94)	41 (49,40)	13 (15,66)	
	M (SE)	2,268 (0,051)	2,171 (0,034)	2,074 (0,067)	-0,097
Pat. (n = 82), Fz					
	n (%)	28 (34,15)	41 (50,00)	13 (15,85)	
	M (SE)	2,340 (0,088)	2,145 (0,058)	1,950 (0,113)	-0,2
Kon. (n = 244), Cz					
	n (%)	122 (50,00)	91 (37,30)	31 (12,70)	
	M (SE)	2,456 (0,025)	2,408 (0,021)	2,360 (0,042)	-0,048
Gesamt (n = 327), Cz					
	n (%)	151 (46,18)	132 (40,37)	44 (13,46)	
	M (SE)	2,404 (0,023)	2,347 (0,018)	2,291 (0,035)	-0,057
Gesamt (n = 327), Fz					
	n (%)	151 (46,18)	132 (40,37)	44 (13,46)	
	M (SE)	2,491 (0,039)	2,394 (0,031)	2,297 (0,060)	-0,097

M = adjustierter Mittelwert, SE = Standardfehler, n = Anzahl der Probanden, A₁ = Referenzallel, Pat. = Patienten, Kon. = Kontrollen, B = Regressionskoeffizient

Für die Aktivierung der ROI ACCkog waren bei der Gesamtkohorte bei Genotyp C/C die größten transformierten Werte festzustellen, bei A/A die geringsten (Tab. 18).

Tab. 18: Mittelwerte der Stromdichte (ROI-Aktivierung des ACCkog) für die Genotypen

Gruppe		Genotyp (A ₁ : C)			B
		A/A	A/C	C/C	
Gesamt (n = 328)					
	n (%)	152 (46,34)	132 (40,24)	44 (13,41)	
	M (SE)	19,174 (0,298)	19,849 (0,237)	20,524 (0,462)	0,675

M = adjustierter Mittelwert, SE = Standardfehler, n = Anzahl der Probanden, A₁ = Referenzallel, B = Regressionskoeffizient

Ergebnisse

4.2.6 SNP rs2709392

Zwischen SNP rs2709392 zeigte sich eine signifikante Assoziation mit der Aktivität in der ROI ACCKog und der N1-Amplitude über Cz bei der Kontrollgruppe (Abb. 9).

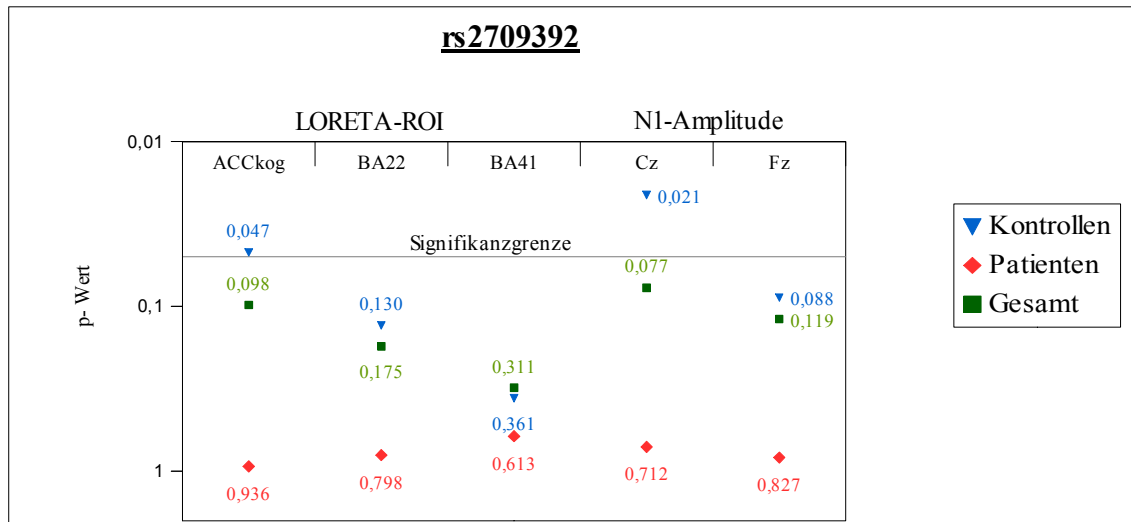


Abb. 9: Grafische Darstellung der Signifikanzen der Assoziationen zwischen SNP rs2709392 und den untersuchten Phänotypen im EEG. Die durchgezogene, waagerechte Linie markiert die Signifikanzgrenze ($p = 0,05$); LORETA-ROI: *Regions of interest* der LORETA-Analyse

Die größten transformierten Mittelwerte der Aktivierungen der ROI ACCKog fanden sich bei Genotyp G/G, die geringsten Werte zeigten Probanden mit A/A (Tab.19).

Tab. 19: Mittelwerte der Stromdichte (ROI-Aktivierung des ACCKog) für die Genotypen

Gruppe	Genotyp ($A_1: A$)			B
	G/G	A/G	A/A	
Kontrollen (n = 248)				
n (%)	155 (62,50)	80 (32,26)	13 (5,24)	
M (SE)	19,365 (0,291)	18,568 (0,328)	17,771 (0,671)	-0,797

M = adjustierter Mittelwert, SE = Standardfehler, n = Anzahl der Probanden, A_1 = Referenzallel, B = Regressionskoeffizient

Für die N1-Amplitude über Cz ergaben sich die größten Amplitudenwerte bei Genotyp A/A, bei G/G wurden die geringsten Werte gemessen (Tab. 20).

Ergebnisse

Tab. 20: Mittelwerte der N1-Amplitude über Cz für die Genotypen

Gruppe	Genotyp (A_1 : A)			B
	G/G	A/G	A/A	
Kontrollen (n = 247)				
n (%)	155 (62,75)	80 (32,39)	12 (4,86)	
M (SE)	2,395 (0,023)	2,469 (0,026)	2,544 (0,054)	0,074

M = adjustierter Mittelwert, SE = Standardfehler, n = Anzahl der Probanden, A_1 = Referenzallel, B = Regressionskoeffizient

4.2.7 SNP rs2464978

Zwischen SNP rs2464978 und der N1-Amplitude über Fz bei den Kontrollen und über Cz bei der Kontroll- und Gesamtgruppe konnten signifikante Assoziationen identifiziert werden (Abb. 10).

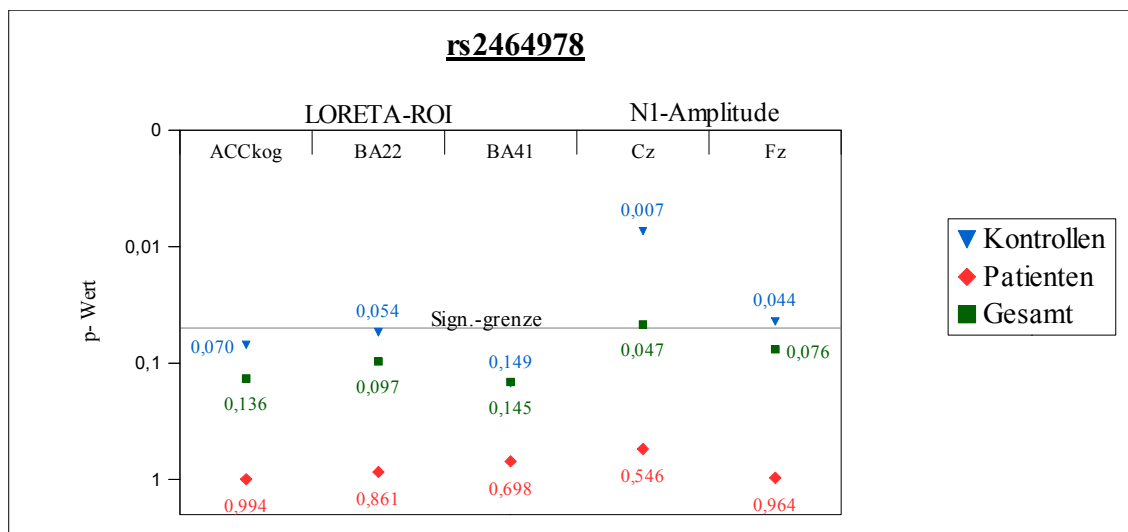


Abb. 10: Grafische Darstellung der Signifikanzen der Assoziationen zwischen SNP rs2464978 und den untersuchten Phänotypen im EEG. Die durchgezogene, waagerechte Linie markiert die Signifikanzgrenze ($p = 0,05$); LORETA-ROI: *Regions of interest* der LORETA-Analyse

Für die signifikanten Assoziationen ergab sich Folgendes: Bei den Kontrollen wurden bei Genotyp A/A die größten Amplitudenwerte über Cz und Fz gemessen, bei G/G die geringsten. Dasselbe galt für die N1-Amplitude über Cz bei der Gesamtgruppe (Tab. 21).

Ergebnisse

Tab. 21: Mittelwerte der N1-Amplitude über Cz und Fz für die Genotypen

Gruppe, Phänotyp	Genotyp (A_1 : A)			B
	G/G	A/G	A/A	
Kon. (n = 241), Cz				
n (%)	153 (63,49)	75 (31,12)	13 (5,39)	
M (SE)	2,386 (0,023)	2,472 (0,026)	2,558 (0,054)	0,086
Kon. (n = 242), Fz				
n (%)	153 (63,22)	75 (30,99)	14 (5,79)	
M (SE)	2,453 (0,040)	2,562 (0,045)	2,670 (0,091)	0,109
Gesamt (n = 330), Cz				
n (%)	215 (65,15)	99 (30,00)	16 (4,85)	
M (SE)	2,337 (0,020)	2,393 (0,024)	2,450 (0,048)	0,056

M = adjustierter Mittelwert, SE = Standardfehler, n = Anzahl der Probanden, A_1 = Referenzallel, Kon. = Kontrollen, B = Regressionskoeffizient

4.2.8 SNP rs2709376 und SNP rs2551922

Für die Polymorphismen rs2709376 und rs2551922 konnten keine signifikanten Assoziationen zu den untersuchten EEG-Phänotypen ermittelt werden (Abb. 11 und 12).

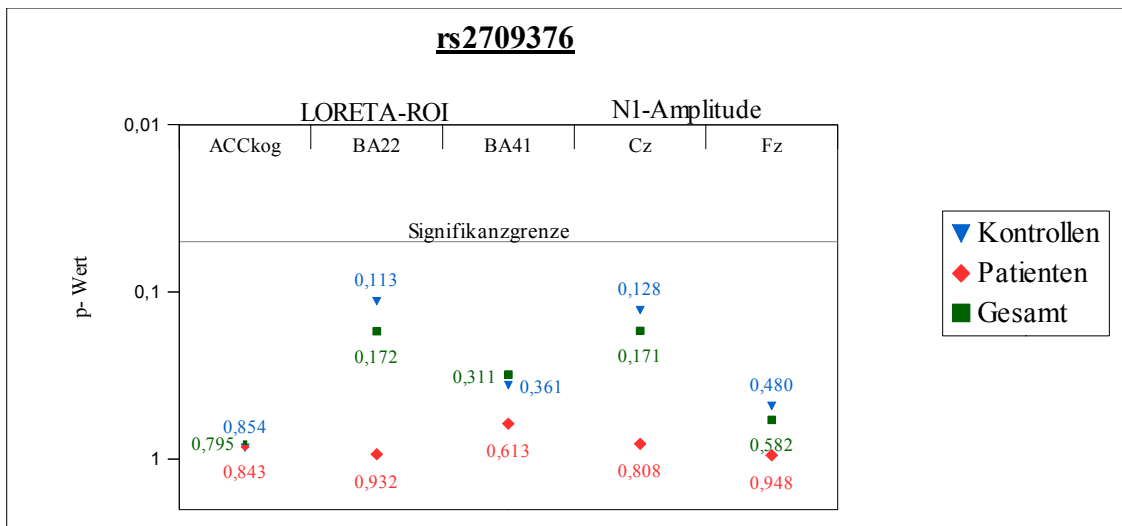


Abb. 11: Grafische Darstellung der Signifikanzen der Assoziationen zwischen den SNP rs2709376 den untersuchten Phänotypen im EEG. Die durchgezogene, waagerechte Linie markiert die Signifikanzgrenze ($p = 0,05$); LORETA-ROI: *Regions of interest* der LORETA-Analyse

Ergebnisse

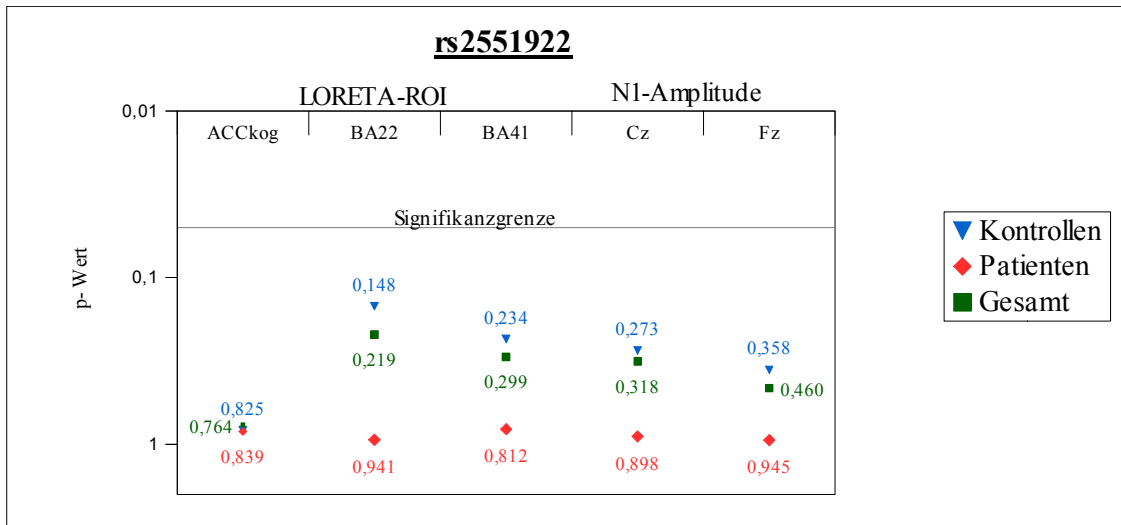


Abb. 12: Grafische Darstellung der Signifikanzen der Assoziationen zwischen den SNPs rs2551922 und den untersuchten Phänotypen im EEG. Die durchgezogene, waagerechte Linie markiert die Signifikanzgrenze ($p = 0,05$); LORETA-ROI: *Regions of interest* der LORETA-Analyse

4.3 Ergebnisse der Haplotypanalyse

Es wurde der Zusammenhang zwischen den Haplotypen des CREB1-Gens und den EEG-Phänotypen untersucht. Zumeist erfolgt die Vererbung nicht in Form einzelner SNPs, sondern von Blöcken benachbarter SNPs (Haplotyp- bzw. LD-Block). Dieser Block zeigt das Kopplungsungleichgewicht (*Linkage Disequilibrium, LD*) der untersuchten SNPs, d.h. das überzufällig häufige gemeinsame Auftreten von Allelen an mindestens zwei Genorten.

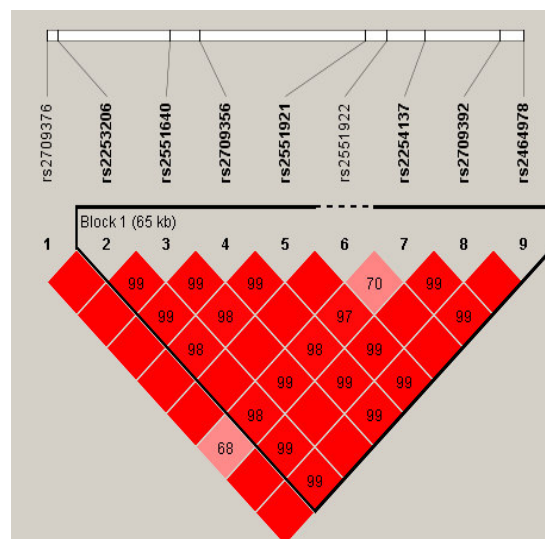


Abb. 13: LD-Blockstruktur der untersuchten neun Polymorphismen des CREB1-Gens. Die Zahl in den Rauten gibt den LD-Wert (D') zwischen den jeweiligen SNP-Paaren an.

Ergebnisse

Es wurde ein LD-Block gefunden, der die SNPs rs2253206, rs2551640, rs2709356, rs2551921, rs2254137, rs2709392 und rs2464978 beinhaltet (Abb. 13). In diesem Block wurden fünf Haplotypen identifiziert, die den festgelegten Kriterien entsprachen, wobei einer dieser Haplotypen nur in der Patientengruppe häufig genug vorhanden war (GACCAAA).

Für drei Haplotypen des betrachteten Blocks wurden signifikante Assoziationen mit den untersuchten EEG-Phänotypen ermittelt (Tab. 22).

Es zeigten sich bei Patienten mit dem Haplotypen AACTAGG, verglichen mit allen anderen Trägern, signifikant größere Amplitudenwerte (Cz und Fz). Die transformierten Werte für die Aktivität der ROI BA22 waren bei Trägern dieser Allelsequenz signifikant vermindert, in der ROI BA41 erhöht. Zu beachten ist die Transformation der BA22-Werte, durch die diese in ihrer Richtung - im Vergleich zur Originalskala - umgekehrt sind.

Der Haplotyp AGCTCGG wies folgende Assoziationen auf: In der Gesamtgruppe erhöhten sich bei dessen Vorhandensein die transformierten Aktivitätswerte in der ROI ACCkog. Die Werte für die N1-Amplitude über Cz und Fz nahmen signifikant ab. In der Patientengruppe ließ sich die Amplitudenabnahme über Fz bei der Allelsequenz AGCTCGG ebenfalls feststellen.

Kontrollprobanden, die den Haplotypen GATCAAA aufwiesen, zeigten signifikant höhere Werte der N1-Amplitude (Cz) als alle anderen.

Tab. 22: Assoziation der Haplotypen mit den EEG-Phänotypen

Haplotyp	Gruppe	Phänotyp	Frequenz	B	p
AACTAGG	Patienten	Cz	0,120	0,179	0,021
		Fz		0,257	0,047
		BA22		-1,550	0,049
		BA41		0,186	0,024
AGCTCGG	Gesamt	ACCkog	0,327	0,634	0,043
		Cz		-0,057	0,016
		Fz		-0,096	0,015
	Patienten	Fz	0,333	-0,185	0,024
GATCAAA	Kontrollen	Cz	0,203	0,067	0,036

B = Regressionskoeffizient

Diskussion

5. Diskussion

In dieser Arbeit wurde die Assoziation von neun Polymorphismen des Gens CREB1 (zwei davon im 5'-Bereich) mit der N1-Amplitude im EEG untersucht. Hierbei wurde die Größe der Amplitude und die Aktivierung bestimmter Hirnareale betrachtet.

Im DSM-IV sind in der Kategorie „Zugehörige Laborbefunde“ unter anderem die evozierten Potentiale aufgeführt. Diese weichen bei Patienten mit Schizophrenie von der Norm ab, da die sensorische Wahrnehmung und Informationsverarbeitung gestört sind (Saß et al., 2003).

In dieser Untersuchung wurden die akustisch evozierten Potentiale gewählt und die Variation der N1-Amplitude und der Stromdichte-Werte betrachtet.

Die signifikanten Assoziationen der untersuchten neun SNPs und der Haplotypen sind in Tabelle 23 zusammengefasst. Aus dieser wird ersichtlich, dass für sieben SNPs eine Verbindung mit den untersuchten EEG-Phänotypen herzustellen ist. Für vier SNPs (rs2253206, rs2709356, rs2551921, rs2709392) zeigten sich ausschließlich in der Kontrollgruppe Assoziationen. Diese stellte allerdings auch die größere Stichprobe dar, mit 254 Probanden im Vergleich zu 92 in der Patientengruppe.

Für die Polymorphismen rs2709376 und rs2551922 ergab sich keine signifikante Assoziation mit der N1-Amplitude und der Aktivität in ACCkog, BA22 und BA41.

Hervorzuheben ist der SNP rs2551640, bei dem sich in allen Gruppen (die Patienten mit einem p-Wert nahe der Signifikanz zum Gesamteffekt beitragend) für die N1-Amplitude über Cz und Genotyp A/A die größten Amplitudenwerte zeigten und für G/G die geringsten. Über Fz ergab sich dasselbe Resultat, wobei die Werte der Patienten- und Gesamtgruppe signifikant waren und die der Kontrollen als nicht signifikanter Trend gewertet wurden.

Auch für SNP rs2254137 wurde ein Allel-Dosis-Effekt auf die N1-Amplitude (Cz, Fz) bei der Kontroll- und Gesamtgruppe festgestellt. Diese war bei Probanden mit Genotyp A/A am größten, bei C/C am geringsten. Bei den Kontrollen zeigte sich dieses Ergebnis über Cz ebenfalls als Trend zur Assoziation.

Für drei Haplotypen der untersuchten SNPs wurden Assoziationen identifiziert: Bei AACTAGG nur in der Patientengruppe für die N1-Amplitude und die Aktivität in BA22 und BA41. AGCTCGG zeigte bei der Gesamtkohorte eine Assoziation mit der N1-Amplitude (Cz, Fz) und der Aktivität in ACCkog und bei den Patienten mit der N1-Amplitude über Fz. Für GATCAAA

Diskussion

wurde eine Signifikanz nur in der Kontrollgruppe festgestellt.

Abschließend ist zu bemerken, dass insgesamt häufiger signifikante Assoziationen der untersuchten SNPs mit der Größe der N1-Amplitude festzustellen waren, als mit der Aktivität der betrachteten Hirnareale. Bezüglich dieser traten meist Assoziationen mit der Aktivierung in der ROI ACCkog auf.

Tab. 23: Zusammenfassende Darstellung der Assoziationen der EEG-Phänotypen-Stichprobe

SNP (A ₁) / Haplotyp	Gruppe	Phänotyp	Messwerte bei steigender Häufigkeit von A ₁
rs2253206 (A)	Kontrollen	Cz	N1-Amplitude ↓
rs2551640 (G)	Kontrollen	Cz	N1-Amplitude ↓
		ACCkog	Aktivität ↓
	Gesamt	ACCkog	Aktivität ↓
		Cz, Fz	N1-Amplitude ↓
Patienten	Fz	N1-Amplitude ↓	
rs2709356 (T)	Kontrollen	ACCkog	Aktivität ↑
		Cz	N1-Amplitude ↑
rs2551921 (C)	Kontrollen	Cz	N1-Amplitude ↑
rs2254137 (C)	Gesamt	ACCkog	Aktivität ↓
		Cz, Fz	N1-Amplitude ↓
	Patienten	Cz, Fz	N1-Amplitude ↓
rs2709392 (A)	Kontrollen	ACCkog	Aktivität ↑
		Cz	N1-Amplitude ↑
rs2464978 (A)	Kontrollen	Cz, Fz	N1-Amplitude ↑
	Gesamt	Cz	N1-Amplitude ↑
AACTAGG	Patienten	Cz, Fz	N1-Amplitude ↑
		BA22, BA41	Aktivität ↑
AGCTCGG	Gesamt	ACCkog	Aktivität ↓
		Cz, Fz	N1-Amplitude ↓
	Patienten	Fz	N1-Amplitude ↓
GATCAAA	Kontrollen	Cz	N1-Amplitude ↑

A₁ = Referenzallel, ↑ = größere Werte, ↓ = geringere Werte

Diskussion

Die Literaturrecherche zeigte eine mangelnde Studienlage bezüglich einer Assoziation von Polymorphismen des CREB1-Gens mit den untersuchten EEG-Phänotypen, sodass keine direkten Vergleiche der in dieser Arbeit erhobenen Daten erfolgen können. Auch für andere EEG-Komponenten (z.B. P50, MMN) sind diesbezüglich keine Veröffentlichungen von Untersuchungen zu eruieren.

Die in dieser Arbeit untersuchten SNPs können Einfluss auf die Genfunktion nehmen: Von den neun SNPs sind sieben intronisch und zwei in der Promotorregion des CREB1-Gens lokalisiert. Introns sind Genabschnitte, die nicht codierend sind und nach der Transkription durch Spleißen entfernt werden. Ihnen werden vielfältige Funktionen zugeschrieben: unter anderem als Träger transkriptioneller regulatorischer Elemente, als Mitwirkende beim alternativen Spleißen und als *Enhancer* (Transkriptionsverstärker) des meiotischen *Crossing Over* innerhalb einer codierenden Sequenz und somit als ein Einflussfaktor bei der Evolution (Barrett et al., 2012).

Der Promotor eines Gens ist eine komplexe regulatorische Region, an der Transkriptionsfaktoren und RNA-Polymerasen binden. Somit kann unter anderem die Genexpression verstärkt oder abgeschwächt werden (Barrett et al., 2012).

5.1 Diskussion der Methoden

Für die vorliegende Arbeit wurden an Schizophrenie erkrankte Patienten und Kontrollprobanden nach einem standardisierten Schema eingeschlossen und untersucht. Dies zeigt sich im einheitlichen und strengen Ablauf der Rekrutierung, den festgelegten Ein- und Ausschlusskriterien und der Untersuchung mittels etablierter Instrumente wie SKID I/II, PANSS und das DSM-IV. Die EEG-Ableitung fand bei allen Probanden nach dem gleichen Prinzip und akustischen Paradigma statt. Um Störfaktoren, die die Messung beeinflussen können, zu minimieren, wurde diese Untersuchung in einem schallgedämpften und elektromagnetisch abgeschirmten Raum durchgeführt.

Durch dieses einheitliche Prozedere wurden eine Objektivität und eine Vergleichbarkeit der Ergebnisse geschaffen.

Insgesamt wurde bei 1319 Kontrollprobanden und 508 Schizophrenie-Patienten eine Genotypisierung durchgeführt. EEG-Daten wurden allerdings nur von 254 Kontrollen und 92 Patienten erhoben. Somit handelt es sich um eine relativ kleine Stichprobe, die hier betrachtet wurde, was in der Interpretation der Studienresultate berücksichtigt werden muss.

Diskussion

Hervorzuheben ist auch der Unterschied bezüglich der Anzahl der Teilnehmer in Kontroll- und Patientengruppe. Eine ungleiche Verteilung der Probanden zeigte sich beim Alter (zwischen Patienten und Kontrollen) und Geschlecht (innerhalb der Patientengruppe). Dass die Patienten signifikant jünger als die gesunden Kontrollprobanden und häufiger männlichen Geschlechts waren, ist bei der Betrachtung der Ergebnisse zu berücksichtigen. Hier sollte eine möglichst einheitliche Verteilung der Probandengruppen angestrebt werden.

In beiden Gruppen waren die Teilnehmer kaukasischer Abstammung, sodass von einer ethnisch einheitlichen Stichprobe auszugehen ist. Das hat den Vorteil, eine gewisse genetische Homogenität und Vergleichbarkeit der Ergebnisse innerhalb dieser Ethnizität zu schaffen. Der Nachteil ergibt sich im Umkehrschluss durch eine Beschränktheit bzw. die fehlende globale Vergleichbarkeit dieser.

5.2 Inhaltliche Diskussion

5.2.1 Das CREB1-Gen

In einigen Studien wurde das CREB1-Gen als ein mögliches Suszeptibilitätsgen mit Schizophrenie in Verbindung gebracht (Kawanishi et al., 1999; Chandrasekaran und Bonchev, 2012; Aberg et al., 2013; Ma et al., 2014).

In einer Arbeit von Chandrasekaran und Bonchev wurden die Netzwerke von 38 mit Schizophrenie assoziierter Gene untersucht und die daraus ermittelten Gene mit denen einer weiteren Veröffentlichung verglichen. Außerdem wurden Datensets von Mukosa- und postmortem Hirngewebe von schizophrenen Patienten und Kontrollprobanden in den Vergleich einbezogen. Das Gen CREB1 wurde hierbei als ein Schlüsselregulator dieser Schizophrenie-assoziiierter Gene identifiziert, weil es innerhalb der Netzwerke, die mit der Schizophrenie in Verbindung gebracht werden, eine zentrale Rolle innehat (Chandrasekaran und Bonchev, 2012).

Auch Aberg et al. (2013), die SNPs aus 18 Schizophrenie-GWAs und 6 -Datenbanken für eine familienbasierte Replikationsstudie auswählten, räumten dem CREB1-Gen eine Relevanz innerhalb der Signalwege ein, die mit der Pathophysiologie der Schizophrenie in Verbindung gebracht werden, darunter axonale Erregungsleitung und Reizübertragung über chemische Synapsen innerhalb des Nervensystems.

Diskussion

Die Tatsache, dass das Gen CREB1 eine zentrale Rolle innerhalb der Netzwerke und Signalpfade, die mit Schizophrenie in Zusammenhang gebracht werden, innehat und in Verbindung mit Genen steht, die erwiesenermaßen mit Schizophrenie assoziiert sind, macht es zum Gegenstand aktueller Forschung. Innerhalb einer chinesischen Studienpopulation konnte ein seltener Haplotyp identifiziert werden, der zur Entwicklung einer Schizophrenie prädisponiert: Dieser umfasst fünf SNPs, wobei einer dieser Polymorphismen (rs2253206) auch in der vorliegenden Arbeit untersucht wurde (Ma et al., 2014). Dieser SNP zeigte hier nur eine Assoziation bei den Kontrollprobanden, sodass sich keine gemeinsame Ableitung zu dem Haplotypen treffen lässt. Dass sich dieses Ergebnis ausschließlich auf Han-Chinesen bezieht, muss betont werden. In einer kaukasischen Studienpopulation muss es somit nicht reproduzierbar sein. Trotz allem legt es aber den Schluss nahe, dass das CREB1-Gen bezüglich einer Assoziation mit Schizophrenie, weiter untersucht werden sollte.

Aktuell ist die Studienanzahl zum CREB1-Gen und Schizophrenie noch relativ übersichtlich, wird aber fortwährend ergänzt. So konnten Kumar et al. (2015) Ergebnisse aus GWAS mit denen von MWAS kombinieren und mögliche Schizophrenie-assozierte Genorte näher eingrenzen, darunter im Bereich des CREB1-Gens.

Bezüglich einer Verbindung des Gens mit dem Krankheitsbild der Depression ist die Studienlage etwas breiter aufgestellt. Einige, der auch in dieser Arbeit betrachteten SNPs, wurden auch schon in Zusammenhang mit der Major Depression untersucht:

Bei einer Veröffentlichung von Serretti et al. (2011) standen fünf Polymorphismen des CREB1-Gens im Mittelpunkt der Betrachtung, darunter die auch die in dieser Arbeit untersuchten SNPs rs2709376 und rs2253206. Hierbei wurden 190 Patienten im Kontext einer Behandlungsresistenz untersucht und einige Allele und Haplotypen des CREB1-Gens mit dieser in Verbindung gebracht. Für rs2709376 fand sich keine Assoziation, für rs2253206 nur als Bestandteil des Haplotyps rs2253206 - rs7569963, wobei Probanden mit den Allelen AA häufiger eine Behandlungsresistenz der Depression aufwiesen.

Die gleichen fünf SNPs wurden auch 2014 für eine weitere Untersuchung gewählt, um eine Assoziation dieser Polymorphismen mit Suizidalität und Suizidversuchen bei 250 Patienten mit Major Depression zu eruieren. Es konnte keine Assoziation festgestellt werden, was unter anderem mit der geringen Studiengröße begründet wurde (Carlberg et al., 2014).

In einer Studie von Calati et al. wurden Behandlungsresistenz, Ansprechen auf antidepressive Behandlung, Remission und andere klinische Merkmale unter anderem in Verbindung mit vier SNPs des CREB1-Gens untersucht. Zwei dieser Polymorphismen sind auch Gegenstand dieser

Diskussion

Arbeit: rs2551922 und rs2254137. Eine Assoziation konnte nicht identifiziert werden, aber es wird darauf hingewiesen, dass eine Verbindung mit Remission bestehen könnte und die Autoren regen weitere Forschung an (Calati et al., 2013).

Anhand dieser bisher stattgefundenen Studien zu möglichen Assoziationen des CREB1-Gens ist anzunehmen, dass ein Zusammenhang von Erkrankungen des psychiatrischen Formenkreises mit diesem Gen bestehen könnte. Nicht nur die Depression scheint vielversprechend hinsichtlich noch folgender Untersuchungen, auch bei der Schizophrenie könnten diesbezüglich aussichtsreiche Ergebnisse zu erwarten sein.

5.2.2 Der Transkriptionsfaktor CREB1

Funktionelle Studien mit Knockout-Mäusen zeigen, dass eine Verbindung von CREB1 mit wichtigen Funktionen des Nervensystems besteht: Mantamadiotis et al. (2002) stellten bei gleichzeitigem Fehlen von CREB und CREM eine Degeneration des Gehirns im Bereich von Hippocampus und Striatum fest. Eine neurodegenerative Mitverursachung wird bei der Schizophrenie diskutiert (Falkai et al., 2001).

Andere Autoren konnten bei einem Mangel von CREB und CREM eine Anomalie in der neuronalen Migration während der Entwicklung des Gehirns zeigen (Díaz-Ruiz et al., 2008). Eine Störung der Hirnentwicklung als eine Komponente der Ätiologie wird auch bei der Schizophrenie in Betracht gezogen (Falkai et al., 2001).

Aguado et al. (2009) stellten ein verändertes Muster neuronaler Konnektivität und Aktivität beim Mangel von CREB und CREM fest. Falkai et al. (2001) erwähnen auch bezüglich möglicher Ursachen der Schizophrenie eine Netzwerkstörung des Gehirns.

Aus anderen Untersuchungen mit Mausmodellen wurde gefolgert, dass dieser Transkriptionsfaktor eine nicht geringe Bedeutung bei der Gedächtnisbildung hat (Kogan et al., 1996; Josselyn et al., 2004).

CREB1 hat im Nervensystem einen hohen Stellenwert inne und somit auch für bedeutende Leistungen desselben wie der Gedächtnisbildung und bei Lernvorgängen (Mayr und Montminy, 2001; Lonze und Ginty, 2002). Hinsichtlich der Schizophrenie werden unter anderem funktionelle Störungen und strukturelle Anomalien des Gehirns als mögliche krankheitsfördernde Faktoren diskutiert. Eine Beeinträchtigung von Merkfähigkeit und Gedächtnis ist bei schizophrenen Patienten bekannt (Aleman et al., 1999) und ein anerkanntes Begleitsymptom.

Diskussion

Folglich ergeben sich Überschneidungen der Funktionen von CREB1 mit ätiologischen Annahmen zur Schizophrenie und psychopathologischen Auffälligkeiten, die bei dieser Erkrankung auftreten.

In einer Untersuchung von Hirngewebe schizophrener Patienten wurde eine verminderte Expression vom Protein CREB im Gyrus cinguli identifiziert (Ren et al., 2014). Demzufolge lässt sich auch hier eine mögliche Verbindung zur Schizophrenie feststellen.

In dieser Arbeit wurde der anteriore cinguläre Cortex (ACC), der ein Teil des Gyrus cinguli ist, als möglicher Ort der Entstehung der N1-Amplitude untersucht. Für den SNP rs2551640 zeigte sich ein Unterschied der Genotypen bezüglich der Aktivität in der Kontroll- und Gesamtgruppe, für rs2709356 in der Kontrollgruppe, für rs2254137 in der Gesamtgruppe, für rs2709392 in der Kontrollgruppe und für den Haplotypen AGCTCGG in der Gesamtgruppe. Da mehr Kontrollprobanden an der Untersuchung teilgenommen haben, lässt sich der Effekt bei rs2551640 hauptsächlich auf die Kontrollen zurückführen. Bei den anderen zwei SNPs und dem Haplotypen wurden signifikante Assoziationen nur in jeweils einer Gruppe festgestellt, Assoziationen bei schizophrenen Patienten gab es nicht. Die Studiengruppe war klein und in einer größeren Stichprobe könnten sich ergiebiger Daten erheben lassen. Das CREB1-Gen in Verbindung mit der Aktivität im ACC ist weiterer Untersuchung wert. Der ACC ist als Bestandteil des Gyrus cinguli über Netzwerke mit dem Hippocampus verbunden (Vogt et al., 1992). Hippocampale Veränderungen werden hinsichtlich der Ätiologie der Schizophrenie diskutiert: sowohl strukturelle Abnormitäten (Ross et al., 2006) als auch biochemische Abweichungen. Ein Beispiel hierfür ist die reduzierte CREB-Phosphorylierung im Hippocampus bei NMDAR-Antagonisierung (Yang et al., 2014).

5.2.3 Der Transkriptionsfaktor CREB1 und seine Signalwege

Die Signalpfade, die im CREB1 zusammenlaufen, sind vielfältig. Zwei sind bezüglich einer möglichen Verbindung zur Schizophrenie erwähnenswert:

GIRK2:

KCNJ6, auch GIRK2 (*G-protein-regulated inward-rectifier potassium channel 2*) genannt, codiert für das Protein GIRK2.

Tatard-Leitman et al. (2014) untersuchten Knockout-Mäuse, bei denen NMDAR1 in den pyramidalen Zellen des Gehirns ausgeschaltet war. Bei diesen wurde die soziale Interaktion

Diskussion

beobachtet und elektrophysiologische Untersuchungen mittels EEG durchgeführt. Hierbei konnten Phänotypen identifiziert werden, die der Schizophrenie ähnlich sind: gestörte Gamma-, Beta- und Theta-Oszillationen im EEG sowie soziale und kognitive Beeinträchtigungen. Diese waren assoziiert mit einer erhöhten Erregbarkeit der Pyramidalzellen. Die Mutanten-Mäuse zeigten eine verminderte Expression von GIRK2-Kanälen, was mit beschriebener verstärkter neuronaler Reizbarkeit einherging. Somit könnte die erhöhte Erregbarkeit nach NMDAR1-*knockout* auch mit Veränderungen der GIRK-Expression erklärt werden.

In einer anderen Untersuchung wurde je ein SNP der Gene CREB1 und KCNJ6 in zwei unabhängigen europäischen Stichproben genotypisiert. Derselbe CREB1-Polymorphismus wurde auch in der vorliegenden Arbeit untersucht (rs2253206). Eine epistatische Interaktion beider Gene in Bezug auf Grübelneigung (als ein Symptom der Depression) konnte ermittelt werden, wobei hinsichtlich dieser Interaktion bei rs2253206 der GG-Genotyp assoziiert war (Lazary et al., 2011). Dieses Resultat deutet demnach auf eine gewisse Beziehung beider Gene hin.

Die molekulare Ebene einer Wechselbeziehung zwischen CREB1 und GIRK2 ist bislang noch nicht vollständig geklärt. Dennoch gibt es einige molekulare Knotenpunkte, an denen beide Proteine interagieren. Eine Gemeinsamkeit ist die Form der Aktivierung: Beide können durch G-Proteine aktiviert werden. GIRK2 wird durch PKA reguliert, während auch die Phosphorylierung von CREB1 durch PKA vermittelt wird. Außerdem werden beide als entscheidende Komponenten von Langzeitpotenzierung und synaptischer Plastizität angenommen (Lazary et al., 2011).

Demzufolge ist ein Bezug von GIRK2, das sehr wahrscheinlich auch mit CREB1 interagiert, zur Schizophrenie anzunehmen. Eine weitere Gemeinsamkeit könnten die jeweils veränderten EEG-Befunde sein: Eine verminderte Expression von GIRK2 geht möglicherweise mit einer veränderten neuronalen Erregbarkeit und Oszillation im EEG einher. Die Assoziationen der in dieser Arbeit untersuchten SNPs des CREB1-Gens mit einer Variation der N1-Amplitude im EEG sind in Tabelle 23 aufgeführt.

BDNF:

Das BDNF ist eines der Zielgene, welches durch CREB1 reguliert wird (Mayr und Montminy, 2001; Lonze und Ginty, 2002) und dessen Protein die Entwicklung, Regeneration und das Überleben von Neuronen begünstigt, weshalb es unter anderem mit Schizophrenie in

Diskussion

Zusammenhang gebracht wird (Lang et al., 2007).

Die Konzentration von BDNF im Blut wurde bei schizophrenen Patienten (sowohl bei Personen mit einer ersten schizophrenen Episode, als auch bei chronischer Schizophrenie) verändert gefunden (Buckley et al., 2011). Hierbei wurden unterschiedliche Abweichungen ermittelt: In einigen Studien zeigte sich eine Abnahme des BDNF-Spiegels (Rizos et al., 2007; Xiu et al., 2009), in anderen wiederum ein Anstieg (Reis et al., 2008). Unterschiedliche Ursachen für diese inkonsistenten Befunde werden in Erwägung gezogen: die Dauer und klinische Heterogenität der Erkrankung, der genetische Hintergrund der Studienpopulation und die Behandlung mit Antipsychotika (Reis et al., 2008).

In zahlreichen klinischen Studien wurde BDNF somit eine wichtige Rolle in der Pathophysiologie der Schizophrenie zugeschrieben und auch als möglicher Biomarker diesbezüglich diskutiert.

PCP (Phencyclidin) ist ein NMDAR-Antagonist, der neuronale Apoptose während der Entwicklung und Schizophrenie-ähnliches Verhalten bei Ratten im späteren Leben auslösen soll (Xia et al., 2010). In einer Untersuchung an Rattenhirn-Schnitten wurde festgestellt, dass nach NMDAR-Antagonisierung mittels PCP während der Gehirnentwicklung die Phosphorylierung von CREB an Serin 133 vermindert war. Nach Vorbehandlung mit BDNF allerdings wurde diese auf ihr normales Niveau zurückgeführt. In dieser Studie wurde gezeigt, dass die PCP-induzierte neuronale Apoptose im sich entwickelnden Gehirn durch BDNF unterbunden wird (Xia et al., 2010).

Die Zusammenschau dieser Veröffentlichungen zum BDNF lässt erkennen, dass einerseits eine Verbindung zur Schizophrenie besteht und andererseits eine Interaktion von BDNF und CREB1 bedeutsam ist.

Des Weiteren lässt die Studie von Xia et al. (2010) auch auf eine maßgebliche Beziehung von CREB1 mit den NMDA-Rezeptoren hinsichtlich der Pathophysiologie der Schizophrenie schließen.

5.2.4 Die Glutamathypothese

Dass die glutamatergen NMDA-Rezeptoren einen bedeutenden Stellenwert innerhalb der CREB-Signalwege besitzen, ist inzwischen hinlänglich bekannt. In den letzten Jahren sind jene auch zunehmend zu einem Thema in der Schizophrenie-Forschung geworden:

Mittels eines Tiermodells an Ratten wurde gezeigt, dass diese, von kurz nach der Geburt an mit

Diskussion

dem NMDAR-Antagonisten MK-801 (Dizocilpin) behandelt, Verhaltensauffälligkeiten aufwiesen, die der Schizophrenie ähnlich sind. Hierbei präsentierte sich eine gesteigerte CREB-Phosphorylierung in den Lymphozyten während der ersten 60 Tage der Behandlung und ein progressiver Abfall derselben bei den älteren Tieren. Eine kompensatorische Upregulation der NMDA-Rezeptoren im sich entwickelnden Zentralnerven- und Immunsystem wurde als ein möglicher Mechanismus für den Anstieg vorgeschlagen (Baier et al., 2009).

Auch Yang et al. (2014) antagonisierten die NMDA-Rezeptoren mittels MK-801 in einem Ratten-Modell für kognitive Defizite der Schizophrenie. Im Hippocampus war der Grad der Phosphorylierung von Proteinen, also hochaktiver Formen dieser, erheblich reduziert - darunter auch CREB. Eine Behandlung mit 7,8-DHF (7,8-Dihydroxyflavon) erhöhte das Phosphorylierungsniveau wieder und machte die kognitiven Einbußen reversibel.

Bereits nach geringen Gaben von MK-801 konnten elektrophysiologische Veränderungen bei Mäusen festgestellt werden, unter anderem eine verzögerte Latenz des N1-Potentials, was bei Autismus häufiger vorkommt (Saunders et al., 2012a). Hohe Dosen führten zu einer Reduktion der N1-Amplitude, die z.B. bei Schizophrenie beschrieben ist (Saunders et al., 2012a,b).

In einer anderen Untersuchung wurde eine NMDAR-Hypofunktion als mögliche ätiologische Komponente der Schizophrenie betrachtet. Hierfür wurde eine Serin-Racemase-Knockout-Maus ($SR^{-/-}$) als Modell gewählt, die weniger als 10% des normalen cerebralen D-Serins, ein Co-Agonist des NMDAR, aufweist. Mäuse mit $SR^{-/-}$ hatten ein reduziertes hippocampales Volumen, kognitive Defizite und unter anderem eine verminderte Phosphorylierung des CREB an Serin 133 im Hippocampus. Des Weiteren waren auch andere Proteine (z.B. BDNF) in ihrer Expression herabgesetzt. Kontinuierliche Behandlung mit D-Serin normalisierte die elektrophysiologischen, neurochemischen und kognitiven Defizite der $SR^{-/-}$ -Mäuse. Die Autoren schlossen aus den Ergebnissen, dass eine Unterfunktion der NMDA-Rezeptoren möglicherweise die hippocampalen Defizite, die mit der Schizophrenie assoziiert sind, abbilden kann und verwies auf eine potentielle Behandlungsmöglichkeit (Balu et al., 2013).

Die metabotropen Glutamatrezeptoren sind, neben den glutamatergen NMDA-Rezeptoren, hinsichtlich der Erforschung der Schizophrenie von Interesse und hier vor allem als mögliche therapeutische Zielstrukturen:

In einer Studie an Ratten wurden diese mit CDPPB (3-cyano-N-(1,3-diphenyl-1H-pyrazol-5-yl)benzamid), einem positiven allosterischen Modulator des mGluR5 (metabotroper Glutamatrezeptor 5) behandelt. Hierbei zeigte sich, dass eine Aktivierung des mGluR5

Diskussion

(dosisabhängig) zu einer verbesserten NMDAR-Funktion führte, MK-801-induzierte Defizite behob und einen erhöhten Spiegel an phosphoryliertem CREB im Hippocampus und frontalen Cortex bewirkte (Uslaner et al., 2009).

Die hier beschriebenen Veröffentlichungen veranschaulichen den vermuteten Zusammenhang zwischen den Glutamatrezeptoren und der Symptomatik der Schizophrenie. Vor allem bei den NMDA-Rezeptoren wird überdies eine enge Beziehung zum Transkriptionsfaktor CREB ersichtlich: Bei einer Unterfunktion der NMDAR zeigten sich im Tierversuch auffällige Verhaltensweisen, die der Schizophrenie sehr ähnlich sind. Zugleich lässt sich eine veränderte CREB-Phosphorylierung feststellen.

Anhand dieser Fakten wäre ein Bezug von NMDAR und dem Transkriptionsfaktor CREB zur Ätiologie der Schizophrenie gleichermaßen herzustellen wie auch denkbar.

Eine Parallele ergibt sich auch hinsichtlich der elektrophysiologischen Befunde: Antagonisierung von NMDAR führt zu einer Verminderung der N1-Amplitude im EEG (Saunders et al., 2012a,b). In dieser Arbeit wurde ein Einfluss von Genotypen bestimmter SNPs des CREB1-Gens auf die N1-Amplitude festgestellt, von denen rs2551640 und rs2254137 besonders erwähnenswert sind.

5.2.5 Die N1-Amplitude und Schizophrenie

Die N1-Amplitude im EEG ist als ereigniskorreliertes Potential in verschiedenen Studien untersucht worden, auch im Hinblick auf Veränderungen bei an Schizophrenie erkrankten Personen. Bei diesen wurde eine verminderte N1-Amplitude im Vergleich zu gesunden Kontrollprobanden festgestellt (McCarley et al., 1991; Leicht et al., 2010).

Das Dekrement der N1-Amplitude könnte ein Indiz für die Erkrankung Schizophrenie sein.

In weiterführenden Untersuchungen wurde die N1-Amplitude daraufhin als möglicher Endophänotyp der Schizophrenie betrachtet, d.h., inwiefern dieses Merkmal auch bei nicht-erkrankten Familienmitgliedern zu beobachten ist. Turetsky et al. (2008) konnten diese Tatsache bestätigen, mussten aber ihre Studienergebnisse aufgrund vorhandener Komorbiditäten der Familienangehörigen einschränken. Mehrere Autoren bezeichneten die N1-Amplitude als vorstellbaren Endophänotypen (Turetsky et al., 2008; Salisbury et al., 2010; Ethridge et al., 2014).

Auch die Aktivität bestimmter Hirnareale (z.B. des ACC) während der N1-Amplitude zeigte sich bei schizophrenen Probanden erniedrigt (Mulert et al., 2001; Gallinat et al., 2002) und

Diskussion

könnte somit ebenfalls vergleichend herangezogen werden.

Zusammengefasst stellt die N1-Amplitude im EEG unbestritten einen möglichen Endophänotypen der Schizophrenie dar. Da die Suche nach Genorten bei solch komplexen Erkrankungen schwierig ist, erscheint das Modell der Endophänotypen als Chance, molekulargenetische Untersuchungen effektiver einzusetzen. Ebenso kann der genetische Einfluss der Erkrankung durch die Untersuchung gesunder Familienmitglieder dargelegt werden.

In dieser Arbeit wurde bezüglich dieser EEG-Endophänotypen das CREB1-Gen, bei dem eine Beziehung zur Schizophrenie sehr wahrscheinlich ist, untersucht. Eine Genotyp-abhängige Aktivitätsänderung in den Brodmann-Arealen BA22 und BA41 konnte für keinen der neun SNPs ermittelt werden. Signifikante Assoziationen in ACCkog wurden nur in der Kontroll- oder Gesamtgruppe festgestellt, bei rs2551640 in beiden. Somit scheint der Effekt der gewählten SNPs auf die Aktivität gering zu sein.

Für die Änderung der N1-Amplitude wurde ein Allel-Dosis-Effekt in einzelnen Probandengruppen identifiziert. Vor allem die Variation der N1-Amplitude bei den SNPs rs2551640 und rs2254137 ist hervorzuheben: Für den SNP rs2551640 wurden in der Kontroll- und Gesamtgruppe signifikante Assoziationen über der Elektrode Cz ermittelt, bei den Patienten ein Trend zur Assoziation. Über der Fz-Elektrode konnten signifikante Assoziationen in der Patienten- und Gesamtgruppe festgestellt werden, für die Kontrollen ein Trend zur Assoziation. Bei allen Gruppen war die N1-Amplitude sowohl über Cz als auch über Fz bei Genotyp A/A am größten, bei G/G am geringsten. Für den SNP rs2254137 wurden signifikante Assoziationen über Cz in der Gesamt- und Patientengruppe ermittelt, in der Kontrollgruppe ein Trend zur Assoziation. Bei allen Gruppen war die N1-Amplitude bei Genotyp A/A am größten, bei C/C am geringsten.

Die vorliegende Arbeit ist die erste Publikation, die den Zusammenhang von Polymorphismen des CREB1-Gens mit der N1-Amplitude im EEG untersucht hat. Somit sind aktuell (noch) keine vergleichbaren Studien eruierbar.

Ein Effekt des CREB1-Gens auf die N1-Amplitude scheint, auch aufgrund der Ergebnisse der zwei erwähnten SNPs, denkbar und sollte in zukünftigen Untersuchungen weiterverfolgt werden.

Diskussion

5.2.6 Ausblick

Die Schizophrenie ist eine heterogene Erkrankung. Die Identifizierung von Risikogenen, z.B. mithilfe Genomweiter Assoziationsstudien, sollte fortgesetzt und intensiviert werden. Hierbei könnten Endophänotypen als weniger komplexe Korrelate der Erkrankung hilfreich sein. Dafür müssten diese weiterentwickelt und vervollkommen werden, auch um eine bessere Vergleichbarkeit zu schaffen. Weitere Untersuchungen, bei denen elektrophysiologische Phänotypen wie die N1-Amplitude im EEG im Fokus stehen, wären wünschenswert. Hierbei könnten gewonnene Erkenntnisse auch für diagnostische Zwecke, unter anderem als Vulnerabilitätsmarker, Anwendung finden.

Zum hier untersuchten CREB1-Gen ist zu bemerken, dass es sich vielversprechend hinsichtlich einer möglichen Assoziation mit der Schizophrenie darstellt, die Studienlage aber alles in allem noch zu dürrig ist und ausgebaut werden sollte. Die in dieser Arbeit ermittelten Assoziationen von SNPs des CREB1-Gens zur N1-Amplitude als möglichen Endophänotypen der Schizophrenie - hervorzuheben sind hier die Polymorphismen rs2551640 und rs2254137 - sollten mit Ergebnissen ähnlicher Studien verglichen werden, um diesen mutmaßlichen Zusammenhang zu untermauern. Dazu ist eine umfangreichere Studienlage notwendig. Es müssten größere Studiengruppen und unterschiedliche ethnische Populationen untersucht werden.

Die in dieser Arbeit untersuchten Polymorphismen befinden sich in nichtcodierenden Bereichen des CREB1-Gens. Eine regulatorische Funktion bei der Transkription und ein Einfluss auf die Genexpression sind möglich. Weitere funktionelle Untersuchungen könnten eine Aussage zur Bedeutsamkeit dieser SNPs treffen.

Die Funktion und die Signalwege des Transkriptionsfaktors CREB1 sollten noch weiter erforscht werden, denn er ist ein zentraler molekularer Knotenpunkt innerhalb der Signalfade, die für die Pathophysiologie der Schizophrenie als relevant diskutiert werden. Eventuell könnte diese Forschung auch in Hinblick auf potentielle therapeutische Optionen, die derartige Moleküle als Zielstruktur haben, sinnvoll sein.

Die Netzwerke der Schizophrenie-assoziierten Gene und mögliche Interaktionen dieser sollten weiter analysiert werden. Denn die Polygenität der Erkrankung zeigt, dass nicht nur ein Gen an der Krankheitsentstehung beteiligt ist.

Diskussion

Die Detektion von SNPs und ihrer Bedeutung für einen bestimmten Phänotypen bzw. den Einfluss auf eine Erkrankung mag aussichtsreich sein: Möglicherweise können an dieser Stelle neuartige Therapeutika ansetzen oder die Diagnosefindung unterstützt und Erkrankungsrisiken abgeschätzt werden.

Außerdem sollte der Polyätiologie der Schizophrenie, in Anbetracht des hohen Stellenwertes der Genetik und der biochemischen Zusammenhänge, Rechnung getragen werden. Denn bezüglich der Ursachen dieser Erkrankung sind noch weitere Fragen genauer zu betrachten, wie etwa die Bedeutung der Umwelt- und psychosozialen Faktoren bei der Pathogenese der Schizophrenie.

6. Zusammenfassung

Die Schizophrenie ist eine der gravierendsten psychiatrischen Erkrankungen. Diese ist mit einer mannigfaltigen Symptomatik verbunden und geht für die Betroffenen mit einer erheblichen Beeinträchtigung des sozialen und beruflichen Lebens einher. Ihre Ätiologie wird multifaktoriell erklärt, wobei genetische, biologische und psychosoziale Einflüsse sowie Umweltfaktoren bei der Krankheitsentstehung mitwirken. In den letzten Jahren ist der Erforschung der Genetik ein hoher Stellenwert beigemessen worden. Die Schizophrenie ist eine polygene Erkrankung, was zur Heterogenität dieser beiträgt. Es konnte bereits eine Vielzahl von Kandidatengen identifiziert werden, aber ebenso sind noch viele Fragen ungeklärt.

Das CREB1-Gen ist eines der Gene, die vielversprechend bezüglich einer möglichen Beziehung zur Schizophrenie erscheinen. In verschiedenen Studien wurde es bereits mit der Erkrankung in Verbindung gebracht (Kawanishi et al., 1999; Chandrasekaran und Bonchev, 2012; Aberg et al., 2013). Mehrere Publikationen legen einen Zusammenhang des Transkriptionsfaktors CREB1 mit Funktionen des Nervensystems und der Gedächtnisleistung nahe (Mayr und Montminy, 2001; Lonze und Ginty, 2002).

Die N1-Amplitude ist in verschiedenen Studien bei schizophrenen Patienten, im Vergleich zu gesunden Kontrollen, als geringer beschrieben worden. In einigen Veröffentlichungen wird die N1-Amplitude als potentieller Endophänotyp der Schizophrenie genannt (Salisbury et al., 2010). In dieser Arbeit wurde an neun Polymorphismen und Haplotypen des Gens CREB1 geprüft, ob diese mit einer N1-Amplitudenvariation im EEG assoziiert sind bzw. einen Einfluss auf die Aktivität definierter cerebraler Areale haben.

Diese Erkenntnisse zum CREB1-Gen und der N1-Amplitude sind Basis dieser Arbeit, bei der mögliche Assoziationen des Gens CREB1 mit diesem Schizophrenie-Endophänotypen eruiert werden sollen. Hierfür wurden 92 an Schizophrenie erkrankte Patienten und 254 Kontrollprobanden untersucht. Dabei wurde jeweils eine Genotypisierung und EEG-Ableitung durchgeführt. Es ergaben sich in einzelnen Gruppen Assoziationen von SNPs des CREB1-Gens mit einer Veränderung der N1-Amplitude und der Aktivität in bestimmten Hirnarealen.

Zwei Polymorphismen fielen hierbei besonders auf: Der SNP rs2551640 zeigte in der Kontroll- und Gesamtgruppe signifikante Assoziationen mit der N1-Amplitude über der Elektrode Cz und in der Patientengruppe einen Trend zur Assoziation. Signifikante Assoziationen bei Fz wurden in der Patienten- und Gesamtgruppe ermittelt, in der Kontrollgruppe konnte ein Trend zur

Zusammenfassung

Assoziation festgestellt werden. Für alle drei Gruppen wurde die größte N1-Amplitude über Cz und Fz bei Genotyp A/A beobachtet und bei G/G die geringste.

Für den SNP rs2254137 wurden signifikante Assoziationen über Cz sowohl in der Gesamt- als auch in der Patientengruppe festgestellt, während bei den Kontrollen ein Trend zur Assoziation vorlag. Die N1-Amplitude war in allen Gruppen bei Genotyp A/A am größten und bei C/C am geringsten. Bezüglich dieser SNPs des CREB1-Gens zeigte sich somit ein potentieller Einfluss des Genotypen auf die N1-Amplitude im EEG: für rs2551640 über Cz und Fz und für rs2254137 über Cz.

Aufgrund mangelnder vergleichbarer Studien konnte keine Gegenüberstellung der Ergebnisse durchgeführt werden. Ein Zusammenhang von SNPs des CREB1-Gens mit dem Phänotypen der N1-Amplitude ist möglich. Zukünftige Studien zum CREB1 und den untersuchten Endophänotypen wären wünschenswert.

7. Literaturverzeichnis

Aberg KA, Liu Y, Bukszár J, McClay JL, Khachane AN, Andreassen OA, Blackwood D, Corvin A, Djurovic S, Gurling H, Ophoff R, Pato CN, Pato MT, Riley B, Webb T, Kendler K, O'Donovan M, Craddock N, Kirov G, Owen M, Rujescu D, St Clair D, Werge T, Hultman CM, Delisi LE, Sullivan P, van den Oord EJ (2013) A comprehensive family-based replication study of schizophrenia genes. *JAMA Psychiatry* 70(6):573–581.

Aguado F, Díaz-Ruiz C, Parlato R, Martínez A, Carmona MA, Bleckmann S, Ureña JM, Burgaya F, Del Río JA, Schütz G, Soriano E (2009) The CREB/CREM transcription factors negatively regulate early synaptogenesis and spontaneous network activity. *J Neurosci* 29(2): 328–333.

Aleman A, Hijman R, de Haan EHF, Kahn RS (1999) Memory Impairment in Schizophrenia: A Meta-Analysis. *Am J Psychiatry* 156(9):1358–1366.

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

Andreasen NC (2000) Schizophrenia: the fundamental questions. *Brain Res Rev* 31(2-3):106–112.

Babenko O, Kovalchuk I, Metz GAS (2014) Stress-induced Perinatal and Transgenerational Epigenetic Programming of Brain Development and Mental Health. *Neurosci Biobehav Rev* 48:70–91.

Baier PC, Blume A, Koch J, Marx A, Fritzer G, Aldenhoff JB, Schiffelholz T (2009) Early postnatal depletion of NMDA receptor development affects behaviour and NMDA receptor expression until later adulthood in rats—a possible model for schizophrenia. *Behav Brain Res* 205(1):96–101.

Balu DT, Li Y, Puhl MD, Benneyworth MA, Basu AC, Takagi S, Bolshakov VY, Coyle JT (2013) Multiple risk pathways for schizophrenia converge in serine racemase knockout mice, a mouse model of NMDA receptor hypofunction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110(26):E2400-2409.

Barrett JC, Fry B, Maller J, Daly MJ (2005) Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps. *Bioinformatics* 21(2):263–265.

Barrett LW, Fletcher S, Wilton SD (2012) Regulation of eukaryotic gene expression by the untranslated gene regions and other non-coding elements. *Cell Mol Life Sci* 69(21):3613–3634.

Bartholdi D (2008) Medizinische Genetik: Copy number variants (CNV). *Schweiz Med Forum* 8(51-52):1007–1008.

Literaturverzeichnis

- Bromet EJ, Naz B, Fochtmann LJ, Carlson GA, Tanenberg-Karant M (2005) Long-term diagnostic stability and outcome in recent first-episode cohort studies of schizophrenia. *Schizophr Bull* 31(3):639–649.
- Buckley PF, Pillai A, Howell KR (2011) Brain-derived neurotrophic factor: findings in schizophrenia. *Curr Opin Psychiatry* 24(2):122–127.
- Calati R, Crisafulli C, Balestri M, Serretti A, Spina E, Calabrò M, Sidoti A, Albani D, Massat I, Höfer P, Amital D, Juven-Wetzler A, Kasper S, Zohar J, Souery D, Montgomery S, Mendlewicz J (2013) Evaluation of the role of MAPK1 and CREB1 polymorphisms on treatment resistance, response and remission in mood disorder patients. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 44:271–278.
- Carlberg L, Schosser A, Calati R, Serretti A, Massat I, Papageorgiou K, Kocabas NA, Mendlewicz J, Zohar J, Montgomery SA, Souery D, Kasper S (2014) Association study of CREB1 polymorphisms and suicidality in MDD: results from a European multicenter study on treatment resistant depression. *International J Neurosci* 00(00):1–8.
- Carlezon WA, Duman RS, Nestler EJ (2005) The many faces of CREB. *Trends Neurosci* 28(8):436–445.
- Chandrasekaran S, Bonchev DG (2012) A network view on Schizophrenia related genes. *Network Biology* 2(1):16–25.
- Chen YH, Edgar JC, Huang M, Hunter MA, Epstein E, Howell B, Lu BY, Bustillo J, Miller GA, Cañive JM (2013) Frontal and superior temporal auditory processing abnormalities in schizophrenia. *NeuroImage Clin* 2:695–702.
- Crisafulli C, Chiesa A, Han C, Lee SJ, Shim DS, Balzarro B, Andrisano C, Sidoti A, Patkar AA, Pae CU, Serretti A (2012a) Possible influence of CREB1, CREBBP and CREM variants on diagnosis and treatment outcome in patients with schizophrenia. *Neurosci Lett* 508(1):37–41.
- Crisafulli C, Shim DS, Andrisano C, Pae CU, Chiesa A, Han C, Patkar AA, Lee SJ, Serretti A, de Ronchi D (2012b) Case-control association study of 14 variants of CREB1, CREBBP and CREM on diagnosis and treatment outcome in major depressive disorder and bipolar disorder. *Psychiatry Res* 198(1):39–46.
- Davis PA (1939) Effects of Acoustic Stimuli on the waking human brain. *J Neurophysiol* 2:494–499.
- Díaz-Ruiz C, Parlato R, Aguado F, Ureña JM, Burgaya F, Martínez A, Carmona MA, Kreiner G, Bleckmann S, Del Río JA, Schütz G, Soriano E (2008) Regulation of neural migration by the CREB/CREM transcription factors and altered Dab1 levels in CREB/CREM mutants. *Mol Cell Neurosci* 39(4):519–528.

Literaturverzeichnis

Ethridge LE, Hamm JP, Pearlson GD, Tamminga CA, Sweeney JA, Keshavan MS, Clementz BA (2015) Event-Related Potential and Time-Frequency Endophenotypes for Schizophrenia and Psychotic Bipolar Disorder. *Biol Psychiatry* 77(2):127-136.

Falkai P, Vogeley K, Maier W (2001) Hirnstrukturelle Veränderungen bei Patienten mit schizophrenen Psychosen. Von der fokalen Pathologie zur Netzwerkstörung. *Nervenarzt* 72:331–341.

Fallgatter A, Langer J: Psychologie - Wahrnehmung. In: Gauggel S, Kircher T (Hrsg.): Neuropsychologie der Schizophrenie. Symptome, Kognition, Gehirn. Springer, Heidelberg, 2008, S. 146-154.

Fell MJ, McKinzie DL, Monn JA, Svensson KA (2012) Group II metabotropic glutamate receptor agonists and positive allosteric modulators as novel treatments for schizophrenia. *Neuropharmacology* 62(3):1473–1483.

Freedman R (2003) Schizophrenia. *N Engl J Med* 349(18):1738–1749.

Frohlich J, Van Horn JD (2014) Reviewing the ketamine model for schizophrenia. *J Psychopharmacol* 28(4):287–302.

Gabriel SB, Schaffner SF, Nguyen H, Moore JM, Roy J, Blumenstiel B, Higgins J, DeFelice M, Lochner A, Faggart M, Liu-Cordero SN, Rotimi C, Adeyemo A, Cooper R, Ward R, Lander ES, Daly MJ, Altshuler D (2002) The structure of haplotype blocks in the human genome. *Science* 296:2225–2229.

Gallinat J, Mulert C, Bajbouj M, Herrmann WM, Schunter J, Senkowski D, Moukhtieva R, Kronfeldt D, Winterer G (2002) Frontal and Temporal Dysfunction of Auditory Stimulus Processing in Schizophrenia. *NeuroImage* 17(1):110–127.

Gejman PV, Sanders AR, Kendler KS (2011) Genetics of schizophrenia: new findings and challenges. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 12:121–144.

Gottesman II, Gould TD (2003) The Endophenotype Concept in Psychiatry: Etymology and Strategic Intentions. *Am J Psychiatry* 160:636–645.

Grayton HM, Fernandes C, Rujescu D, Collier DA (2012) Copy number variations in neurodevelopmental disorders. *Prog Neurobiol* 99(1):81–91.

Gur RE, Calkins ME, Gur RC, Horan WP, Nuechterlein KH, Seidman LJ, Stone WS (2007) The Consortium on the Genetics of Schizophrenia: neurocognitive endophenotypes. *Schizophr Bull* 33(1):49–68.

Literaturverzeichnis

- Häfner H, Maurer K, an der Heiden W (2013) Schizophrenie - eine einheitliche Krankheit?: Ergebnisse aus 25 Jahren ABC-Studie. *Nervenarzt* 84(9):1093-1103.
- Hettema JM, An SS, van den Oord EJCG, Neale MC, Kendler KS, Chen X (2009) Association study of CREB1 with Major Depressive Disorder and related phenotypes. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 150B(8):1128–1132.
- Hillyard SA, Hink RF, Schwent VL, Picton TW (1973) Electrical signs of selective attention in the human brain. *Science* 182(4108):177–180.
- Hor K, Taylor M (2010) Suicide and schizophrenia: a systematic review of rates and risk factors. *J Psychopharmacol* 24(4 Suppl):81–90.
- Josselyn SA, Kida S, Silva AJ (2004) Inducible repression of CREB function disrupts amygdala-dependent memory. *Neurobiol Learn Mem* 82(2):159–163.
- Kawanishi Y, Harada S, Tachikawa H, Okubo T, Shiraishi H (1999) Novel variants in the promotor region of CREB gene in schizophrenic patients. *J Hum Genet* 44:428–430.
- Kay SR, Fiszbein A, Opler LA (1987) The positive and negative symptom scale (PANSS) for schizophrenia. *Schizophr Bull* 13(2):261–276.
- Kessler J, Folstein SE, Denzler P : MMST. Mini-Mental-Status-Test. Deutschsprachige Fassung. Beltz, Weinheim, 1990.
- Kogan JH, Frankland PW, Blendy JA, Coblenz J, Marowitz Z, Schütz G, Silva AJ (1996) Spaced training induces normal long-term memory in CREB mutant mice. *Curr Biol* 7(1):1–11.
- Kumar G, Clark SL, McClay JL, Shabalin AA, Adkins DE, Xie L, Chan R, Nerella S, Kim Y, Sullivan, Patrick F, Hultman CM, Magnusson PK, Aberg KA, van den Oord EJ (2015) Refinement of schizophrenia GWAS loci using methylome-wide association data. *Hum Genet* 134(1):77-87.
- Lang UE, Puls I, Müller DJ, Strutz-Seebohm N, Gallinat J (2007) Molecular Mechanisms of Schizophrenia. *Cell Physiol Biochem* 20(6):687–702.
- Lazary J, Juhasz G, Anderson IM, Jacob CP, Nguyen TT, Lesch KP, Reif A, Deakin JFW, Bagdy G (2011) Epistatic interaction of CREB1 and KCNJ6 on rumination and negative emotionality. *Eur Neuropsychopharmacol* 21(1):63–70.
- Leicht G, Kirsch V, Giegling I, Karch S, Hantschk I, Möller HJ, Pogarell O, Hegerl U, Rujescu D, Mulert C (2010) Reduced early auditory evoked gamma-band response in patients with schizophrenia. *Biol Psychiatry* 67(3):224–231.

Literaturverzeichnis

Lesage A, Steckler T (2010) Metabotropic glutamate mGlu1 receptor stimulation and blockade: therapeutic opportunities in psychiatric illness. *Eur J Pharmacol* 639:2–16.

Li L, Howell K, Sands M, Banahan M, Frohlich S, Rowan SC, Neary R, Ryan D, McLoughlin P (2013) The α and Δ isoforms of CREB1 are required to maintain normal pulmonary vascular resistance. *PLoS one* 8(12):e80637.

Light GA, Swerdlow NR, Rissling AJ, Radant A, Sugar CA, Sprock J, Pela M, Geyer MA, Braff DL (2012) Characterization of neurophysiologic and neurocognitive biomarkers for use in genomic and clinical outcome studies of schizophrenia. *PLoS one* 7(7):e39434.

Lonze BE, Ginty DD (2002) Function and Regulation of CREB Family Transcription Factors in the Nervous System. *Neuron* 35(4):605–623.

Ma L, Wu DD, Ma SL, Tan L, Chen X, Tang NLS, Yao YG (2014) Molecular evolution in the CREB1 signal pathway and a rare haplotype in CREB1 with genetic predisposition to schizophrenia. *J Psychiatr Res* 57:84–89.

Mantamadiotis T, Lemberger T, Bleckmann SC, Kern H, Kretz O, Martin Villalba A, Tronche F, Kellendonk C, Gau D, Kapfhammer J, Otto C, Schmid W, Schütz G (2002) Disruption of CREB function in brain leads to neurodegeneration. *Nat Genet* 31(1):47–54.

Mayr B, Montminy M (2001) Transcriptional regulation by the phosphorylation-dependent factor CREB. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2(8):599–609.

McCarley RW, Faux SF, Shenton ME, Nestor PG, Adams J (1991) Event-related potentials in schizophrenia: their biological and clinical correlates and a new model of schizophrenic pathophysiology. *Schizophr Res* 4:209–231.

Milnik V (2009) Anleitung zur Elektrodenplatzierung des internationalen 10–20-Systems. *Neurophysiol Lab* 31(1):1–35.

Mulert C, Gallinat J, Dorn H, Herrmann WM, Winterer G (2003) The relationship between reaction time, error rate and anterior cingulate cortex activity. *Int J Psychophysiol* 47(2):175–183.

Mulert C, Gallinat J, Pascual-Marqui R, Dorn H, Frick K, Schlattmann P, Mientus S, Herrmann WM, Winterer G (2001) Reduced event-related current density in the anterior cingulate cortex in schizophrenia. *NeuroImage* 13(4):589–600.

Mulert C, Leicht G, Pogarell O, Mergl R, Karch S, Juckel G, Möller HJ, Hegerl U (2007) Auditory cortex and anterior cingulate cortex sources of the early evoked gamma-band response: relationship to task difficulty and mental effort. *Neuropsychologia* 45(10):2294–2306.

Literaturverzeichnis

Mulert C, Seifert C, Leicht G, Kirsch V, Ertl M, Karch S, Moosmann M, Lutz J, Möller HJ, Hegerl U, Pogarell O, Jäger L (2008) Single-trial coupling of EEG and fMRI reveals the involvement of early anterior cingulate cortex activation in effortful decision making. *NeuroImage* 42(1):158–168.

Näätänen R, Kujala T, Winkler I (2011) Auditory processing that leads to conscious perception: a unique window to central auditory processing opened by the mismatch negativity and related responses. *Psychophysiology* 48(1):4–22.

Näätänen R, Picton T (1987) The N1 Wave of the Human Electric and Magnetic Response to Sound: A Review and an Analysis of the Component Structure. *Psychophysiology* 24(4): 375-425.

Nenadic I, Gaser C, Sauer H (2012) Heterogeneity of brain structural variation and the structural imaging endophenotypes in schizophrenia. *Neuropsychobiology* 66(1):44–49.

Nestler EJ (2013) Cellular basis of memory for addiction. *Dialogues Clin Neurosci* 15 (4):431–443.

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

Owen MJ, Williams NM, O'Donovan MC (2004) The molecular genetics of schizophrenia: new findings promise new insights. *Mol Psychiatry* 9(1):14–27.

Pascual-Marqui RD, Lehmann D, Koenig T, Kochi K, Merlo MC, Hell, D; Koukkou M (1999) Low resolution brain electromagnetic tomography (LORETA) functional imaging in acute, neuroleptic-naive, first-episode, productive schizophrenia. *Psychiatry Res* 90(3):169–179.

Pascual-Marqui RD, Michel CM, Lehmann D (1994) Low resolution electromagnetic tomography: a new method for localizing electrical activity in the brain. *Int J Psychophysiol* 18(1):49–65.

Purcell S, Neale B, Todd-Brown K, Thomas L, Ferreira MAR, Bender D, Maller J, Sklar P, de Bakker PIW, Daly MJ, Sham PC (2007) PLINK: a tool set for whole-genome association and population-based linkage analyses. *Am J Hum Genet* 81(3):559–575.

QIAamp DNA Blood Midi/Maxi Handbook. 2nd Edition. Qiagen, Hilden, 2005.

Literaturverzeichnis

R. D. C. Team: R Development Core Team. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Wien, 2013.

Reis HJ, Nicolato R, Barbosa IG, Teixeira do Prado PH, Romano-Silva MA, Teixeira AL (2008) Increased serum levels of brain-derived neurotrophic factor in chronic institutionalized patients with schizophrenia. *Neurosci Lett* 439(2):157–159.

Ren X, Rizavi HS, Khan MA, Bhaumik R, Dwivedi Y, Pandey GN (2014) Alteration of cyclic-AMP response element binding protein in the postmortem brain of subjects with bipolar disorder and schizophrenia. *J Affect Disord*. 152-154:326–333.

Rice JP, Reich T, Bucholz KK, Neuman RJ, Fishman R, Rochberg N, Hesselbrock VM, Nurnberger JI, Schuckit MA, Begleiter H (1995) Comparison of direct interview and family history diagnoses of alcohol dependence. *Alcohol Clin Exp Res* 19(4):1018–1023.

Ripke S, Neale BM, Corvin A, Walters JTR, Farh KH, Holmans PA, Lee P, Bulik-Sullivan B, Collier DA, Huang H, Pers TH, Agartz I, Agerbo E, Albus M, Alexander M, Amin F, Bacanu SA, Begemann M, Belliveau Jr. RA, Bene J, Bergen SE, Bevilacqua E, Bigdeli TB, Black DW, Bruggeman R, Buccola NG, Buckner RL, Byerley W, Cahn W, Cai G, Campion D, Cantor RM, Carr VJ, Carrera N, Catts SV, Chambert KD, Chan RCK, Chen RYL, Chen EYH, Cheng W, Cheung EFC, Chong SA, Cloninger CR, Cohen D, Cohen N, Cormican P, Craddock N, Crowley JJ, Curtis D, Davidson M, Davis KL, Degenhardt F, Del Favero J, Demontis D, Dikeos D, Dinan T, Djurovic S, Donohoe G, Drapeau E, Duan J, Dudbridge F, Durmishi N, Eichhammer P, Eriksson J, Escott-Price V, Essioux L, Fanous AH, Farrell MS, Frank J, Franke L, Freedman R, Freimer NB, Friedl M, Friedman JI, Fromer M, Genovese G, Georgieva L, Giegling I, Giusti-Rodriguez P, Godard S, Goldstein JI, Golimbet V, Gopal S, Gratten J, de Haan L, Hammer C, Hamshere ML, Hansen M, Hansen T, Haroutunian V, Hartmann AM, Henskens FA, Herms S, Hirschhorn JN, Hoffmann P, Hofman A, Hollegaard MV, Hougaard DM, Ikeda M, Joa I, Julià A, Kahn RS, Kalaydjieva L, Karachanak-Yankova S, Karjalainen J, Kavanagh D, Keller MC, Kennedy JL, Khrunin A, Kim Y, Klovins J, Knowles JA, Konte B, Kucinskis V, Kucinskiene ZA, Kuzelova-Ptackova H, Kähler AK, Laurent C, Keong JLC, Lee SH, Legge SE, Lerer B, Li M, Li T, Liang KY, Lieberman J, Limborska S, Loughland CM, Lubinski J, Lönnqvist J, Macek Jr M, Magnusson PKE, Maher BS, Maier W, Mallet J, Marsal S, Mattheisen M, Mattingdal M, McCarley RW, McDonald C, McIntosh AM, Meier S, Meijer CJ, Melegh B, Melle I, Meshulam-Gateley RI, Metspalu A, Michie PT, Milani L, Milanova V, Mokrab Y, Morris DW, Mors O, Murphy KC, Murray RM, Myin-Germeys I, Müller-Myhsok B, Nelis M, Nenadic I, Nertney DA, Nestadt G, Nicodemus KK, Nikitina-Zake L, Nisenbaum L, Nordin A, O'Callaghan E, O'Dushlaine C, O'Neill FA, Oh SY, Olincy A, Olsen L, Van Os J, Psychosis Endophenotypes International Consortium, Pantelis C, Papadimitriou GN, Papiol S, Parkhomenko E, Pato MT, Paunio T, Pejovic-Milovancevic M, Perkins DO, Pietiläinen O, Pimm J, Pocklington AJ, Powell J, Price A, Pulver AE, Purcell SM, Queded D, Rasmussen HB, Reichenberg A, Reimers MA, Richards AL, Roffman JL, Roussos P, Ruderfer DM, Salomaa V, Sanders AR, Schall U, Schubert CR, Schulze TG, Schwab SG, Scolnick EM, Scott RJ, Seidman LJ, Shi J, Sigurdsson E, Silagadze T, Silverman JM, Sim K, Slominsky P, Smoller JW, So HC, Spencer CCA, Stahl EA, Stefansson H, Steinberg S, Stogmann E, Straub RE, Strengman E, Strohmaier J, Stroup TS, Subramaniam M, Suvisaari J, Svrakic DM, Szatkiewicz JP, Söderman E, Thirumalai S, Toncheva D, Tosato S, Veijola J, Waddington J, Walsh D, Wang D, Wang Q, Webb BT, Weiser M, Wildenauer DB, Williams NM, Williams S, Witt SH, Wolen AR, Wong

Literaturverzeichnis

EHM, Wormley BK, Xi HS, Zai CC, Zheng X, Zimprich F, Wray NR, Stefansson K, Visscher PM, Wellcome Trust Case-Control Consortium 2, Adolfsson R, Andreassen OA, Blackwood DHR, Bramon E, Buxbaum JD, Børglum AD, Cichon S, Darvasi A, Domenici E, Ehrenreich H, Esko T, Gejman PV, Gill M, Gurling H, Hultman CM, Iwata N, Jablensky AV, Jönsson EG, Kendler KS, Kirov G, Knight J, Lencz T, Levinson DF, Li QS, Liu J, Malhotra AK, McCarroll SA, McQuillin A, Moran JL, Mortensen PB, Mowry BJ, Nöthen MM, Ophoff RA, Owen MJ, Palotie A, Pato CN, Petryshen TL, Posthuma D, Rietschel M, Riley BP, Rujescu D, Sham PC, Sklar P, St Clair D, Weinberger DR, Wendland JR, Werge T, Daly MJ, Sullivan PF, O'Donovan MC (2014) Biological insights from 108 schizophrenia-associated genetic loci. *Nature* 511(7510):421–427.

Ripke S, O'Dushlaine C, Chambert K, Moran JL, Kähler AK, Akterin S, Bergen SE, Collins AL, Crowley JJ, Fromer M, Kim Y, Lee SH, Magnusson PKE, Sanchez N, Stahl EA, Williams S, Wray NR, Xia K, Bettella F, Børglum AD, Bulik-Sullivan BK, Cormican P, Craddock N, de Leeuw C, Durmishi N, Gill M, Golimbet V, Hamshere ML, Holmans P, Hougaard DM, Kendler KS, Lin K, Morris DW, Mors O, Mortensen PB, Neale BM, O'Neill FA, Owen MJ, Milovancevic MP, Posthuma D, Powell J, Richards AL, Riley BP, Ruderfer D, Rujescu D, Sigurdsson E, Silagadze T, Smit AB, Stefansson H, Steinberg S, Suvisaari Jaana, Tosato S, Verhage M, Walters JT, Levinson DF, Gejman PV, Laurent C, Mowry BJ, O'Donovan MC, Pulver AE, Schwab SG, Wildenauer DB, Dudbridge F, Shi J, Albus M, Alexander M, Campion D, Cohen D, Dikeos D, Duan J, Eichhammer P, Godard S, Hansen M, Lerer FB, Liang KY, Maier W, Mallet J, Nertney DA, Nestadt G, Norton N, Papadimitriou GN, Ribble R, Sanders AR, Silverman JM, Walsh D, Williams NM, Wormley B, Arranz MJ, Bakker S, Bender S, Bramon E, Collier D, Crespo-Facorro B, Hall J, Iyegbe C, Jablensky A, Kahn RS, Kalaydjieva L, Lawrie S, Lewis CM, Linszen DH, Mata I, McIntosh A, Murray RM, Ophoff RA, van Os J, Walshe M, Weisbrod M, Wiersma D, Donnelly P, Barroso I, Blackwell JM, Brown MA, Casas JP, Corvin AP, Deloukas P, Duncanson A, Jankowski J, Markus HS, Mathew CG, Palmer CNA, Plomin R, Rautanen A, Sawcer SJ, Trembath RC, Viswanathan AC, Wood NW, Spencer CCA, Band G, Bellenguez C, Freeman C, Hellenthal G, Giannoulatou E, Pirinen M, Pearson RD, Strange A, Su Z, Vukcevic D, Langford C, Hunt SE, Edkins S, Gwilliam R, Blackburn H, Bumpstead SJ, Dronov S, Gillman M, Gray E, Hammond N, Jayakumar A, McCann OT, Liddle J, Potter SC, Ravindrarajah R, Ricketts M, Tashakkori-Ghanbaria A, Waller MJ, Weston P, Widaa S, Whittaker P, McCarthy MI, Stefansson K, Scolnick E, Purcell S, McCarroll SA, Sklar P, Hultman CM, Sullivan PF (2013) Genome-wide association analysis identifies 13 new risk loci for schizophrenia. *Nat Genet* 45(10):1150–1159.

Ripke S, Sanders AR, Kendler KS, Levinson DF, Sklar P, Holmans PA, Lin DY, Duan J, Ophoff RA, Andreassen OA, Scolnick E, Cichon S, St. Clair D, Corvin A, Gurling H, Werge T, Rujescu D, Blackwood DHR, Pato CN, Malhotra AK, Purcell S, Dudbridge F, Neale BM, Rossin L, Visscher PM, Posthuma D, Ruderfer DM, Fanous A, Stefansson H, Steinberg S, Mowry BJ, Golimbet V, De Hert M, Jönsson EG, Bitter I, Pietiläinen OPH, Collier DA, Tosato S, Agartz I, Albus M, Alexander M, Amdur RL, Amin F, Bass N, Bergen SE, Black DW, Børglum AD, Brown MA, Bruggeman R, Buccola NG, Byerley WF, Cahn W, Cantor RM, Carr VJ, Catts SV, Choudhury K, Cloninger CR, Cormican P, Craddock N, Danoy PA, Datta S, de Haan L, Demontis D, Dikeos D, Djurovic S, Donnelly P, Donohoe G, Duong L, Dwyer S, Fink-Jensen A, Freedman R, Freimer NB, Friedl M, Georgieva L, Giegling I, Gill M, Glenthøj B, Godard S, Hamshere M, Hansen M, Hansen T, Hartmann AM, Henskens FA, Hougaard DM, Hultman CM, Ingason A, Jablensky AV, Jakobsen KD, Jay M, Jürgens G, Kahn RS, Keller MC, Kenis G, Kenny E, Kim Y, Kirov GK, Konnerth H, Konte B, Krabbendam L, Krasucki R, Lasseter VK,

Literaturverzeichnis

- Laurent C, Lawrence J, Lencz T, Lerer FB, Liang KY, Lichtenstein P, Lieberman JA, Linszen DH, Lönnqvist J, Loughland CM, Maclean AW, Maher BS, Maier W, Mellet J, Malloy P, Mattheisen M, Mattingsdal M, McGhee KA, McGrath JJ, McIntosh A, McLean DE, McQuillin A, Melle I, Michie PT, Milanova V, Morris DW, Mors O, Mortensen PB, Moskvina V, Muglia P, Myin-Germeys I, Nertney DA, Nestadt G, Nielsen J, Nikolov I, Nordentoft M, Norton N, Nöthen MM, O'Dushlaine CT, Olincy A, Olsen L, O'Neill FA, Ørntoft TF, Owen MJ, Pantelius C, Papadimitriou G, Pato MT, Peltonen L, Petursson H, Pickard B, Pimm J, Pulver AE, Puri V, Quedsted D, Quinn EM, Rasmussen HB, Réthelyi JM, Ribble R, Rietschel M, Riley BP, Ruggeri M, Schall U, Schulze TG, Schwab SG, Scott RJ, Shi J, Sigurdsson E, Silverman JM, Spencer CCA, Stefansson K, Strange A, Strengman E, Stroup TS, Suvisaari J, Terenius L, Thirumalai S, Thygesen JH, Timm S, Toncheva D, van den Oord E, van Os J, van Winkel R, Veldink J, Walsh D, Wang AG, Wiersma D, Wildenauer DB, Williams HJ, Williams NM, Wormley B, Zammit S, Sullivan PF, O'Donovan MC, Daly MJ, Gejman PV (2011) Genome-wide association study identifies five new schizophrenia loci. *Nat Genet* 43(10):969–976.
- Rizos EN, Rontos I, Laskos E, Arsenis G, Michalopoulou PG, Vasilopoulos D, Gournellis R, Lykouras L (2008) Investigation of serum BDNF levels in drug-naive patients with schizophrenia. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 32(5):1308–1311.
- Robison AJ, Nestler EJ (2011) Transcriptional and epigenetic mechanisms of addiction. *Nat Rev Neurosci* 12(11):623–637.
- Ross CA, Margolis RL, Reading SAJ, Pletnikov M, Coyle JT (2006) Neurobiology of schizophrenia. *Neuron* 52(1):139–153.
- Rujescu D (2007) Genetik der Schizophrenie. *Biospektrum* 13:727–729.
- Sachs G (2011) Schizophrenie. *Psychopraxis* 14(4):8-12.
- Saha S, Welham J, Chant D, McGrath J (2006) Incidence of schizophrenia does not vary with economic status of the country: evidence from a systematic review. *Soc Psychiatry Psychiatr Epidemiol* 41(5):338–340.
- Sakamoto KM, Frank DA (2009) CREB in the pathophysiology of cancer: implications for targeting transcription factors for cancer therapy. *Clin Cancer Res* 15(8):2583–2587.
- Salisbury DF, Collins KC, McCarley RW (2010) Reductions in the N1 and P2 auditory event-related potentials in first-hospitalized and chronic schizophrenia. *Schizophr Bull* 36(5):991–1000.
- Saß H, Wittchen HU, Zaudig M, Houben I: Diagnostisches und Statistisches Manual Psychischer Störungen, DSM-IV-TR. 4. Aufl. Textrevision. Hogrefe, Göttingen-Bern-Toronto-Seattle, 2003, S. 343-359.

Literaturverzeichnis

Satoh J, Tabunoki H, Arima K (2009) Molecular network analysis suggests aberrant CREB-mediated gene regulation in the Alzheimer disease hippocampus. *Dis Markers* 27(5):239–252.

Saunders JA, Gandal MJ, Roberts TP, Siegel SJ (2012a) NMDA antagonist MK801 recreates auditory electrophysiology disruption present in autism and other neurodevelopmental disorders. *Behav Brain Res* 234(2):233–237.

Saunders JA, Gandal MJ, Siegel SJ (2012b) NMDA antagonists recreate signal-to-noise ratio and timing perturbations present in schizophrenia. *Neurobiol Dis* 46(1):93–100.

Saura CA, Valero J (2011) The role of CREB signaling in Alzheimer's disease and other cognitive disorders. *Rev Neurosci* 22(2):153–169.

Schwartz TL, Sachdeva S, Stahl SM (2012) Glutamate neurocircuitry: theoretical underpinnings in schizophrenia. *Front Pharmacol* 3:195.

Serretti A, Chiesa A, Calati R, Massat I, Linotte, Kasper S, Lecrubier Y, Antonijevic I, Forray C, Snyder L, Bollen J, Zohar J, de Ronchi D, Souery D, Mendlewicz J (2011) A preliminary investigation of the influence of CREB1 gene on treatment resistance in major depression. In: *J Affect Disord* 128(1-2):56–63.

Shaywitz AJ, Greenberg ME (1999) CREB: A Stimulus-Induced Transcription Factor Activated by A Diverse Array of Extracellular Signals. *Annu Rev Biochem* 68:821–861.

Siris SG (2001) Suicide and schizophrenia. *J Psychopharmacol* 15(2):127–135.

Snyder SH (2006) Dopamine Receptor Excess and Mouse Madness. *Neuron* 49(4):484–485.

Stefansson H, Ophoff RA, Steinberg S, Andreassen OA, Cichon S, Rujescu D, Werge T, Pietiläinen OPH, Mors O, Mortensen PB, Sigurdsson E, Gustafsson O, Nyegaard M, Tuulio-Henriksson A, Ingason A, Hansen T, Suvisaari J, Lonnqvist J, Paunio T, Børglum AD, Hartmann AM, Fink-Jensen A, Nordentoft M, Hougaard D, Norgaard-Pedersen B, Böttcher Y, Olesen J, Breuer R, Möller HJ, Giegling I, Rasmussen HB, Timm S, Mattheisen M, Bitter I, Réthelyi JM, Magnusdottir BB, Sigmundsson T, Olausson P, Masson G, Gulcher JR, Haraldsson M, Fossdal R, Thorgeirsson TE, Thorsteinsdottir U, Ruggeri M, Tosato S, Franke B, Strengman E, Kiemenev LA, Melle I, Djurovic S, Abramova L, Kaleda V, Sanjuan J, de Frutos R, Bramon E, Vassos E, Fraser G, Ettinger U, Picchioni M, Walker N, Touloupoulou T, Need AC, Ge D, Yoon JL, Shianna KV, Freimer NB, Cantor RM, Murray R, Kong A, Golimbet V, Carracedo A, Arango C, Costas J, Jönsson EG, Terenius L, Agartz I, Petursson H, Nöthen MM, Rietschel M, Matthews PM, Muglia P, Peltonen L, St Clair D, Goldstein DB, Stefansson K, Collier DA (2009) Common variants conferring risk of schizophrenia. *Nature* 460(7256):744–747.

Sullivan PF, Kendler KS, Neale MC (2003) Schizophrenia as a Complex Trait. Evidence From a Meta-analysis of Twin Studies. *Arch Gen Psychiatry* 60:1187–1192.

Literaturverzeichnis

Talairach J, Tournoux P: Co-planar stereotaxic atlas of the human brain. 3-dimensional proportional system: an approach to cerebral imaging. Stuttgart: Thieme, Stuttgart, 1988.

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

Tatard-Leitman VM, Jutzeler CR, Suh J, Saunders JA, Billingslea EN, Morita S, White R, Featherstone RE, Ray R, Ortinski PI, Banerjee A, Gandal MJ, Lin R, Alexandrescu A, Liang Y, Gur RE, Borgmann-Winter KE, Carlson GC, Hahn CG, Siegel SJ (2014) Pyramidal Cell Selective Ablation of N-Methyl-D-Aspartate Receptor 1 Causes Increase in Cellular and Network Excitability. *Biol Psychiatry* 77(6):556-568.

Taylor AK, Klisak I, Mohandas T, Sparkes RS, Li C, Gaynor R, Lusk AJ (1990) Assignment of the human gene for CREB1 to chromosome 2q32.3–q34. *Genomics* 7(3):416–421.

The International HapMap Consortium (2003) The International HapMap Project. *Nature* 426:789–796.

Towle VL, Bolaños J, Suarez D, Tan K, Grzeszczuk R, Levin DN, Cakmur R, Frank SA, Spire JP (1993) The spatial location of EEG electrodes: locating the best-fitting sphere relative to cortical anatomy. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* 86(1):1–6.

Turetsky BI, Greenwood TA, Olincy A, Radant AD, Braff DL, Cadenhead KS, Dobie DJ, Freedman R, Green MF, Gur RE, Gur RC, Light GA, Mintz J, Nuechterlein KH, Schork NJ, Seidman LJ, Siever LJ, Silverman JM, Stone WS, Swerdlow NR, Tsuang DW, Tsuang MT, Calkins ME (2008) Abnormal auditory N100 amplitude: a heritable endophenotype in first-degree relatives of schizophrenia probands. *Biol Psychiatry* 64(12):1051–1059.

Uslaner JM, Parmentier-Batteur S, Flick, RB, Surlles NO, Lam JSH, McNaughton CH, Jacobson MA, Hutson PH (2009) Dose-dependent effect of CDPPB, the mGluR5 positive allosteric modulator, on recognition memory is associated with GluR1 and CREB phosphorylation in the prefrontal cortex and hippocampus. *Neuropharmacology* 57:531–538.

Vogt BA, Finch DM, Olson CR (1992) Functional heterogeneity in cingulate cortex: the anterior executive and posterior evaluative regions. *Cereb Cortex* 2(6):435–443.

Wagner M, Rendtorff N, Kathmann N, Engel RR (1995) Elektrophysiologische Korrelate der selektiven Aufmerksamkeit bei Schizophrenen. *Klin Neurophysiol* 26(2):72–82.

Wang H, Zhuo M (2012) Group I metabotropic glutamate receptor-mediated gene transcription and implications for synaptic plasticity and diseases. *Front Pharmacol* 3:189.

Wen AY, Sakamoto KM, Miller LS (2010) The role of the transcription factor CREB in immune function. *J Immunol* 185(11):6413–6419.

Literaturverzeichnis

Winchester CL, Pratt JA, Morris BJ (2014) Risk genes for schizophrenia: translational opportunities for drug discovery. *Pharmacol Ther* 143:34–50.

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

Won J, Silva AJ (2008) Molecular and cellular mechanisms of memory allocation in neuronetworks. *Neurobiol Learn Mem* 89(3):285–292.

Xia Y, Wang CZ, Liu J, Anastasio NC, Johnson KM (2010) Brain-derived neurotrophic factor prevents phencyclidine-induced apoptosis in developing brain by parallel activation of both the ERK and PI-3K/Akt pathways. *Neuropharmacology* 58(2):330–336.

Xiu MH, Hui L, Dang YF, Hou TD, Zhang CX, Zheng YL, Chen da C, Kosten TR, Zhang XY (2009) Decreased serum BDNF levels in chronic institutionalized schizophrenia on long-term treatment with typical and atypical antipsychotics. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 33:1508–1512.

Yang YJ, Li YK, Wang W, Wan JG, Yu B, Wang MZ, Hu B (2014) Small-molecule TrkB agonist 7,8-dihydroxyflavone reverses cognitive and synaptic plasticity deficits in a rat model of schizophrenia. *Pharmacol Biochem Behav* 122:30–36.

Zaudig M: Schizophrenie. In: Zaudig M, Trautmann RD (Hrsg.): *Therapielexikon Psychiatrie, Psychosomatik & Psychotherapie*. Springer, Berlin-Heidelberg-New York, 2006, S. 667.

Zobel A, Maier W (2004) Endophänotypen - ein neues Konzept zur biologischen Charakterisierung psychischer Störungen. *Nervenarzt* 75(3):205–214.

Zubenko GS, Hughes HB, Stiffler JS, Brechbiel A, Zubenko WN, Maher BS, Marazita ML (2003) Sequence variations in CREB1 cosegregate with depressive disorders in women. *Mol Psychiatry* 8(6):611–618.

Thesen

8. Thesen

1. Das CREB1-Gen ist mit hoher Wahrscheinlichkeit mit Schizophrenie assoziiert, was diverse Studien vermuten lassen.
2. Das auch neurophysiologische Phänotypen umfassende Konzept der Endophänotypen gewinnt in der Forschung an Bedeutung. Eine Verminderung der N1-Amplitude im EEG (Elektroenzephalogramm) und der Aktivität definierter Hirnbereiche - z.B. anteriorer cingulärer Cortex (ACC) - sind bei schizophrenen Patienten, laut Studienlage, nachweisbar.
3. In dieser Arbeit wurden neun SNPs (*Single Nucleotide Polymorphisms*) und Haplotypen des CREB1-Gens auf eine Assoziation mit einer N1-Amplitudenvariation (EEG-Ableitung über zentraler (Cz) und frontaler (Fz) Elektrode) und einer Änderung der Aktivität im anterioren cingulären Cortex (ACCkog) und in den Brodmann-Arealen BA22 und BA41 untersucht und für sieben SNPs und drei Haplotypen in verschiedenen Gruppen signifikante Assoziationen mit einzelnen Phänotypen ermittelt.
4. Es konnten mehr Assoziationen der Genotypen mit der N1-Amplitude als mit der Aktivität der definierten Gehirnbereiche identifiziert werden.
5. Es ergab sich keine signifikante Assoziation der Einzel-SNPs mit der Aktivität in den Regionen BA22 und BA41, sondern ausschließlich in ACCkog.
6. Zwei SNPs sind hinsichtlich der N1-Amplitude hervorzuheben: SNP rs2551640 zeigte über Cz signifikante Assoziationen (Kontroll- und Gesamtgruppe) und einen Trend zur Assoziation (Patienten) sowie signifikante Assoziationen (Patienten- und Gesamtgruppe) und einen Trend (Kontrollen) über Fz. In allen Gruppen war über Cz und Fz bei Genotyp A/A die größte und bei G/G die geringste Amplitude zu ermitteln. SNP rs2254137 wies signifikante Assoziationen über Cz auf (Patienten- und Gesamtgruppe) und einen Trend zur Assoziation (Kontrollen). Die größte Amplitude wurde in allen Gruppen bei Genotyp A/A festgestellt, bei C/C die minimalste.
7. Diese Arbeit liefert Anhaltspunkte, dass Polymorphismen des CREB1-Gens mit einem Teil der untersuchten EEG-Phänotypen, insbesondere der N1-Amplitude, assoziiert sind.

9. Tabellenanhang

Tab. 24: Ergebnisse der EEG-Phänotyp-Studie der untersuchten Polymorphismen

PT	M (SE) für Genotypen: A ₁ /A ₁ ; A ₁ /A ₂ ; A ₂ /A ₂		
	Gesamtgruppe	Kontrollgruppe	Patientengruppe
rs2253206 (A₁ = A; A₂ = G)			
1	20,124 (0,404); 19,719 (0,219); 19,314 (0,363)	19,660 (0,452); 19,022 (0,241); 18,385 (0,384)	21,493 (0,852); 21,717 (0,489); 21,941 (0,893)
2	19,757 (0,291); 19,660 (0,158); 19,563 (0,262)	19,371 (0,338); 19,091 (0,180); 18,811 (0,687)	20,961 (0,567); 21,308 (0,327); 21,655 (0,594)
3	-5,915 (0,033); -5,902 (0,018); -5,890 (0,029)	-5,861 (0,039); -5,833 (0,021); -5,805 (0,033)	-6,077 (0,060); -6,099 (0,034); -6,121 (0,063)
4	2,321 (0,030); 2,361 (0,016); 2,402 (0,027)	2,373 (0,036); 2,427 (0,019); 2,482 (0,031)	2,170 (0,057); 2,176 (0,033); 2,181 (0,060)
5	2,376 (0,051); 2,423 (0,028); 2,471 (0,046)	2,463 (0,061); 2,511 (0,033); 2,559 (0,052)	2,125 (0,094); 2,181 (0,054); 2,238 (0,101)
rs2551640 (A₁ = G; A₂ = A)			
1	20,600 (0,463); 19,874 (0,239); 19,147 (0,296)	20,215 (0,525); 19,427 (0,271); 18,838 (0,318)	21,916 (0,979); 21,239 (0,506); 20,562 (0,737)
2	20,185 (0,342); 19,790 (0,177); 19,395 (0,219)	19,837 (0,397); 19,355 (0,205); 18,874 (0,241)	21,390 (0,684); 21,129 (0,354); 20,867 (0,515)
3	-5,954 (0,039); -5,913 (0,020); -5,871 (0,025)	-5,896 (0,046); -5,866 (0,024); -5,817 (0,028)	-6,127 (0,071); -6,076 (0,037); -6,025 (0,053)
4	2,279 (0,035); 2,342 (0,018); 2,405 (0,023)	2,334 (0,042); 2,395 (0,022); 2,457 (0,025)	2,105 (0,066); 2,185 (0,034); 2,265 (0,050)
5	2,309 (0,060); 2,407 (0,031); 2,505 (0,039)	2,410 (0,071); 2,488 (0,037); 2,565 (0,043)	1,995 (0,112); 2,176 (0,058); 2,358 (0,086)
rs2709356 (A₁ = T; A₂ = C)			
1	18,810 (0,665); 19,364 (0,326); 19,918 (0,215)	17,661 (0,724); 18,521 (0,354); 19,382 (0,284)	22,143 (1,546); 21,788 (0,761); 21,432 (0,525)
2	19,046 (0,499); 19,441 (0,245); 19,835 (0,189)	18,248 (0,551); 18,774 (0,270); 19,300 (0,216)	21,224 (1,122); 21,282 (0,552); 21,340 (0,381)
3	-5,834 (0,056); -5,875 (0,028); -5,916 (0,021)	-5,755 (0,064); -5,803 (0,032); -5,850 (0,025)	-6,048 (0,115); -6,073 (0,057); -6,098 (0,039)
4	2,432 (0,052); 2,389 (0,026); 2,345 (0,020)	2,546 (0,059); 2,472 (0,029); 2,397 (0,023)	2,109 (0,110); 2,153 (0,054); 2,196 (0,037)
5	2,578 (0,086); 2,492 (0,042); 2,405 (0,033)	2,686 (0,098); 2,581 (0,048); 2,477 (0,038)	2,278 (0,183); 2,240 (0,090); 2,203 (0,062)

M (SE) für Genotypen: A ₁ /A ₁ ; A ₁ /A ₂ ; A ₂ /A ₂					
PT	Gesamtgruppe	Kontrollgruppe	Patientengruppe		
rs2551921 (A₁ = C; A₂ = T)					
1	18,693 (0,666); 19,376 (0,331); 20,058 (0,268)	17,963 (0,713); 18,725 (0,356); 19,486 (0,305)	20,729 (1,648); 21,150 (0,813); 21,570 (0,552)		
2	19,008 (0,474); 19,442 (0,236); 19,876 (0,191)	18,352 (0,510); 18,851 (0,255); 19,350 (0,218)	20,835 (1,149); 21,059 (0,567); 21,283 (0,388)		
3	-5,846 (0,054); -5,886 (0,027); -5,925 (0,022)	-5,778 (0,060); -5,817 (0,030); -5,857 (0,026)	-6,027 (0,120); -6,065 (0,059); -6,103 (0,040)		
4	2,434 (0,051); 2,385 (0,025); 2,335 (0,020)	2,533 (0,056); 2,462 (0,028); 2,391 (0,024)	2,142 (0,114); 2,165 (0,056); 2,188 (0,038)		
5	2,532 (0,084); 2,463 (0,042); 2,393 (0,034)	2,632 (0,093); 2,550 (0,047); 2,469 (0,040)	2,250 (0,193); 2,220 (0,095); 2,189 (0,064)		
rs2254137 (A₁ = C; A₂ = A)					
1	20,524 (0,462); 19,849 (0,237); 19,174 (0,298)	19,969 (0,530); 19,342 (0,272); 18,715 (0,322)	22,283 (0,952); 21,344 (0,488); 20,405 (0,731)		
2	20,179 (0,341); 19,797 (0,175); 19,416 (0,219)	19,742 (0,390); 19,322 (0,200); 18,903 (0,237)	21,642 (0,697); 21,244 (0,357); 20,846 (0,535)		
3	-5,946 (0,038); -5,913 (0,020); -5,880 (0,025)	-5,877 (0,046); -5,853 (0,023); -5,828 (0,028)	-6,151 (0,070); -6,087 (0,036); -6,023 (0,0540)		
4	2,291 (0,035); 2,347 (0,018); 2,404 (0,023)	2,360 (0,042); 2,408 (0,021); 2,456 (0,025)	2,074 (0,067); 2,171 (0,034); 2,268 (0,051)		
5	2,297 (0,060); 2,394 (0,031); 2,491 (0,039)	2,410 (0,071); 2,481 (0,036); 2,551 (0,043)	1,950 (0,113); 2,145 (0,058); 2,340 (0,088)		
rs2709392 (A₁ = A; A₂ = G)					
1	18,724 (0,634); 19,343 (0,310); 19,961 (0,262)	17,771 (0,671); 18,568 (0,328); 19,365 (0,291)	21,467 (1,586); 21,540 (0,775); 21,613 (0,567)		
2	19,107 (0,459); 19,474 (0,225); 19,842 (0,190)	18,414 (0,501); 18,867 (0,245); 19,319 (0,217)	20,997 (1,073); 21,155 (0,524); 21,312 (0,386)		
3	-5,857 (0,052); -5,888 (0,025); -5,919 (0,021)	-5,787 (0,058); -5,819 (0,029); -5,851 (0,025)	-6,040 (0,112); -6,072 (0,055); -6,105 (0,040)		
4	2,440 (0,048); 2,390 (0,024); 2,340 (0,020)	2,544 (0,054); 2,469 (0,026); 2,395 (0,023)	2,142 (0,106); 2,164 (0,052); 2,186 (0,038)		
5	2,546 (0,080); 2,472 (0,039); 2,398 (0,033)	2,657 (0,090); 2,565 (0,044); 2,473 (0,039)	2,231 (0,178); 2,209 (0,087); 2,186 (0,063)		

Fortsetzung Tab. 24

M (SE) für Genotypen: A ₁ /A ₁ ; A ₁ /A ₂ ; A ₂ /A ₂				
PT	Gesamtgruppe	Kontrollgruppe	Patientengruppe	
rs2464978 (A₁ = A; A₂ = G)				
1	18,860 (0,642); 19,423 (0,315); 19,987 (0,267)	17,932 (0,689); 18,678 (0,340); 19,422 (0,301)	21,531 (1,567); 21, 538 (0,765); 21, 545 (0,568)	
2	19,012 (0,453); 19,456 (0,223); 19,810 (0,189)	18,293 (0,491); 18,857 (0,242); 19,420 (0,214)	21,027 (1,078); 21,135 (0,526); 21,244 (0,394)	
3	-5,842 (0,051); -5,886 (0,025); -5,930 (0,021)	-5,769 (0,057); -5,819 (0,028); -5,868 (0,025)	-6,047 (0,112); -6,072 (0,055); -6,097 (0,041)	
4	2,450 (0,048); 2,393 (0,024); 2,337 (0,020)	2,558 (0,054); 2,472 (0,026); 2,386 (0,023)	2,129 (0,104); 2,166 (0,051); 2,202 (0,038)	
5	2,555 (0,080); 2,471 (0,040); 2,388 (0,033)	2,670 (0,091); 2,562 (0,045); 2,453 (0,040)	2,214 (0,175); 2,210 (0,086); 2,205 (0,063)	
rs2709376 (A₁ = T; A₂ = C)				
1	20,165 (1,491); 19,965 (0,739); 19,765 (0,222)	19,387 (1,568); 19,238 (0,777); 19,089 (0,244)	22,394 (3,856); 22,000 (1,909); 21,607 (0,499)	
2	18,252 (1,079); 19,014 (0,534); 19,775 (0,161)	17,291 (1,169); 18,251 (0,579); 19,210 (0,182)	21,105 (2,607); 21,220 (1,291); 21,336 (0,339)	
3	-5,741 (0,122); -5,827 (0,060); -5,913 (0,018)	-5,630 (0,136); -5,737 (0,067); -5,844 (0,021)	-6,033 (0,273); -6,067 (0,135); -6,101 (0,035)	
4	2,444 (0,111); 2,398 (0,055); 2,353 (0,017)	2,528 (0,123); 2,472 (0,061); 2,417 (0,019)	2,211 (0,256); 2,196 (0,127); 2,180 (0,033)	
5	2,521 (0,187); 2,468 (0,093); 2,415 (0,028)	2,649 (0,208); 2,573 (0,103); 2,497 (0,032)	2,160 (0,428); 2,175 (0,212); 2,189 (0,056)	
rs2551922 (A₁ = A; A₂ = G)				
1	20,177 (1,414); 19,957 (0,610); 19,737 (0,224)	19,412 (1,480); 19,241 (0,732); 19,071 (0,248)	22,382 (3,837); 21,981 (1,900); 21,579 (0,494)	
2	18,471 (1,013); 19,116 (0,501); 19,762 (0,161)	17,590 (1,081); 18,404 (0,535); 19,218 (0,182)	21,093 (2,609); 21,192 (1,292); 21,290 (0,337)	
3	-5,790 (0,115); -5,851 (0,057); -5,913 (0,018)	-5,691 (0,126); -5,769 (0,062); -5,847 (0,021)	-6,032 (0,272); -6,065 (0,135); -6,098 (0,035)	
4	2,462 (0,105); 2,407 (0,052); 2,353 (0,017)	2,548 (0,116); 2,482 (0,057); 2,416 (0,019)	2,212 (0,256); 2,195 (0,127); 2,178 (0,033)	
5	2,554 (0,178); 2,486 (0,088); 2,418 (0,028)	2,686 (0,196); 2,593 (0,097); 2,499 (0,033)	2,162 (0,426); 2,177 (0,211); 2,192 (0,055)	

PT = Phänotyp, A₁ = Referenzallel, A₂ = Allel 2; 1 = ACCkcg, 2 = BA22; 3 = BA41; 4 = Cz, 5 = Fz, M = Mittelwert (adjustiert, transformiert), SE = Standardfehler

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name Grit Büchner-Mögling
Geburtsdatum 12. September 1986
Geburtsort Lutherstadt Eisleben
Adresse Zanderweg 14
83209 Prien a. Chiemsee
grit.buechner-moegling@web.de

Schulbildung

1994-1997 Grundschule Torgartenstraße
Lutherstadt Eisleben
1997-1999 Sekundarschule Katharinenschule
Lutherstadt Eisleben
1999-2006 Martin-Luther-Gymnasium
Lutherstadt Eisleben
Schulabschluss Allgemeine Hochschulreife

Humanmedizinstudium

Oktober 2006 - Oktober 2013
Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
Praktisches Jahr Innere Medizin, Unfallchirurgie, Humangenetik
Nebentätigkeit während des Studiums 10/2010 - 09/2011
Wissenschaftliche Hilfskraft in der Klinik für
Innere Medizin I am Universitätsklinikum Halle
Studienabschluss Staatsexamen
Approbation als Ärztin November 2013

Promotionsstudium

Februar 2014 - Mai 2016
Universitätsklinik für Psychiatrie,
Psychotherapie und Psychosomatik in Halle

Masterstudium

April 2015 - Mai 2016
Medizin-Ethik-Recht
Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
Studienabschluss Master of Medicine, Ethics and Law (M.mel.)

Wissenschaftliche Tätigkeit

Juni 2015 - Januar 2016
Wissenschaftliche Hilfskraft
Institut für Geschichte und Ethik der Medizin
Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

Teilnahme an der Lehre

WS 2015/16
Kurs der Medizinischen Terminologie

Klinische Tätigkeit

seit Juni 2016
Assistenzärztin, Psychosomatische Medizin
Schön Klinik Roseneck
Prien a. Chiemsee

Prien a. Chiemsee, 14.09.2016

Selbstständigkeitserklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet. Die Regeln zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis wurden beachtet (Amtsblatt der MLU Nr. 5, 02.07.09).

Ich versichere, dass ich für die inhaltliche Erstellung der vorliegenden Arbeit nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- und Beratungsdiensten (Promotionsberater oder andere Personen) in Anspruch genommen habe. Niemand hat von mir unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen.

Prien a. Chiemsee, den 14.09.2016

Grit Büchner-Mögling

Erklärung über frühere Promotionsversuche

Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Prien a. Chiemsee, den 14.09.2016

Grit Büchner-Mögling

Danksagung

Zuallererst möchte ich Herrn Prof. Dr. Dan Rujescu danken, der es mir ermöglichte, diese Arbeit an der von ihm geleiteten Universitätsklinik und Poliklinik für Psychiatrie, Psychotherapie und Psychosomatik der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg durchzuführen.

Mein Dank gilt außerdem besonders Frau PD Dr. Ina Giegling für die umfassende und freundschaftliche Betreuung.

Für die Unterstützung bei molekularbiologischen Fragestellungen und dem Laborteil möchte ich mich bei Frau Dr. Annette Hartmann und Frau Dr. Marion Friedl bedanken, die immer ansprechbar und mit konstruktiven Ratschlägen von großer Hilfe waren. Frau Bettina Konte danke ich ganz herzlich für das Korrekturlesen und die Geduld bei der Beantwortung meiner zahlreichen Fragen.

Ein großer Dank gilt des Weiteren den Mitarbeitern, die maßgeblich am EEG-Teil dieser Arbeit beteiligt waren, insbesondere Herrn Prof. Dr. Oliver Pogarell, Herrn Prof. Dr. Christoph Mulert, Herrn Dr. Gregor Leicht, Frau PD Dr. Susanne Karch und Herrn Prof. Dr. Ulrich Hegerl. Außerdem möchte ich auch Frau Jessica Fehse und meinen Mitdoktoranden danken, die dazu beigetragen haben, dass der praktische Teil der Arbeit so kurzweilig und erfreulich war.

Mein abschließender Dank gilt meinem Mann, der mich zu jeder Zeit bei der Umsetzung dieser Promotionsarbeit unterstützt hat.