

## **1 Einleitung**

Die Schizophrenie ist ein sehr komplexes psychiatrisches Krankheitsbild. Aufgrund einer notwendigen lebenslänglichen Therapie und wiederholt stationärer Aufenthalte in psychiatrischen Kliniken verursacht sie neben einem erheblichen Leidensdruck für die Patienten zusätzlich auch hohe Kosten [1]. Patienten, die an Schizophrenie erkrankt sind, ist es oft über viele Jahre nicht möglich, an ihrem sozialen Alltag teilzunehmen [1]. Auch die Wiedereingliederung in ihr soziales Umfeld gestaltet sich häufig aufgrund persistierender Symptome oder auftretender Nebenwirkungen unter einer medikamentösen Langzeittherapie mit Neuroleptika als schwierig [2,3]. Die Erforschung der Schizophrenie hat in den letzten Jahrzehnten deutlich zu einem besseren Verständnis der zugrundeliegenden pathogenetischen Mechanismen beigetragen. Dadurch konnte auch eine erhebliche Verbesserung des individuell sehr unterschiedlichen Therapieerfolgs erzielt werden [1]. Die Komplexität der Erkrankung selbst und die erforderliche individuelle Dosisfindung machen eine standardisierte Therapie fast unmöglich. Daher ist gerade für die schizophrenen Patienten eine individuelle Therapieplanung von großer Bedeutung.

### **1.1 Aktueller Wissensstand zur Schizophrenie**

Die Schizophrenie (*Dementia praecox*) ist eine endogene Psychose. Die klinische Symptomatik ist durch komplexe Störungen des Denkens, der Affektivität und der Wahrnehmung (Wahnideen, Halluzinationen) gekennzeichnet [4]. Die Prävalenz der Schizophrenie in der allgemeinen Bevölkerung beträgt ca. 1% [1,4]. Transkulturell liegt eine vergleichbare Häufigkeit zwischen zehn von der WHO bisher untersuchten Ländern vor [5]. Die Diagnose wird nach dem international heute gültigen DSM-IV-Diagnoseschlüssel gestellt, der auf dem diagnostischen und statistischen Handbuch psychischer Erkrankungen (*Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, DSM*) der amerikanischen psychiatrischen Gesellschaft (*American Psychiatric Association, APA*) beruht [6,7]. Die folgenden Faktoren beeinflussen die Entstehung der Erkrankung [6,8,9]:

- ▶ Familiäre Prädisposition
- ▶ Genetische Faktoren
- ▶ Psychogene Faktoren, wie die Persönlichkeitsstruktur
- ▶ Sonstige Faktoren, wie jahreszeitliche Schwankungen und Unterschiede in den Sozialschichten

Die Schizophrenie weist ein erhöhtes Erkrankungsrisiko in belasteten Familien im Vergleich zur Allgemeinbevölkerung auf [6,10]. Die Konkordanzrate eineiiger Zwillinge liegt bei über 50%, die von dizygoten Zwillingen bei ca. 15% [11,12]. Die Häufigkeit schizophrener Psychosen bei den Kindern eines schizophren erkrankten Elternteils beträgt ca. 12,8%, bei Kindern eines schizophren erkrankten Elternpaares ca. 50% [11]. Verwandte 1. Grades haben ein um 6-10% erhöhtes Erkrankungsrisiko [4,11,12].

### 1.1.1 Der Neurotransmitter Dopamin

Der Neurotransmitter Dopamin (2-(3,4-Dihydroxyphenyl)ethylamin) ist ein biogenes Amin und beeinflusst im ZNS die neurohumoralen glutaminergen, noradrenergen, cholinergen und GABA-ergen Systeme [9]. Die Strukturformel ist in der Abbildung 1 dargestellt:

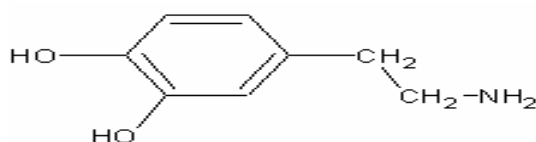


Abbildung 1: Strukturformel für Dopamin (2-(3,4-Dihydroxyphenyl)ethylamin).

Es reguliert Funktionen der Fortbewegung und der Wahrnehmung [13,14]. Die dopaminerge Neurotransmission ist in verschiedenen funktionellen Einheiten des ZNS nachweisbar. Dopamin bindet als Neurotransmitter an Dopaminrezeptoren und aktiviert die Signaltransduktion in der postsynaptischen Membran der Neurone. Die molekulargenetischen und pharmakologischen Eigenschaften der verschiedenen Dopaminrezeptoren wurden intensiv in den letzten 15 Jahren untersucht [15-19].

Unterschieden werden heute die D<sub>1</sub>-artigen Dopaminrezeptoren mit den Subtypen DRD<sub>1</sub> und DRD<sub>5</sub> von den D<sub>2</sub>-artigen Dopaminrezeptoren mit den Subtypen DRD<sub>2</sub>,

DRD<sub>3</sub> und DRD<sub>4</sub> [9,13,20,21]. Beide Rezeptorfamilien gehören zu der Gruppe der G-protein gekoppelten Rezeptoren in der intrazellulären Signaltransduktion [22,23]. Die D<sub>1</sub>-artigen Dopaminrezeptoren stimulieren G<sub>a</sub>-protein gekoppelt (a = Aktivierung) die Synthese der cyclischen Adenylatcyclase (cAMP) und führen zu einem Anstieg des cAMP-Spiegels. Die D<sub>2</sub>-artigen Dopaminrezeptoren hemmen dagegen die Synthese der cAMP, G<sub>i</sub>-protein gekoppelt (i = Inhibition); es resultiert ein Abfall des cAMP-Spiegels [9,13].

### **1.1.2 Das dopaminerge System als therapeutischer Angriffspunkt der Schizophrenie**

Seeman postulierte 1975, dass der akute Schub einer Schizophrenie durch eine dopaminerge Überaktivität im ZNS bedingt sein könnte [6,24]. Denn das dopaminerge Neurotransmittersystem stellt einen wichtigen Angriffspunkt in der Therapie mit Neuroleptika dar. Die klinische Symptomatik des akuten Schubs ist durch sogenannte „positive Symptome“ (definiert als Euphorie, Wahnvorstellungen und akustische Halluzinationen) gekennzeichnet [6,25]. Es wird vermutet, dass die positiven Symptome durch eine dopaminerge Überaktivität im mesokortikalen und mesolimbischen System hervorgerufen werden [26]. Die symptomatische Besserung der dopaminbedingten positiven Symptome durch typische Neuroleptika beruht auf einer antagonistischen Wirkung vorwiegend auf den DRD<sub>2</sub>-Rezeptor [6,25]. Im Rahmen einer Langzeittherapie mit Neuroleptika treten dann sogenannte „negative Symptome“ (definiert als Antriebsarmut und Verlangsamung) in den Vordergrund, die die gesellschaftliche Wiedereingliederung der betroffenen Patienten erschweren können [6,27]. Das Auftreten der negativen Symptome wird auf die langfristige, speziell durch typische Neuroleptika hervorgerufene, Blockade der DRD<sub>2</sub>-Rezeptoren und einer daraus folgenden dopaminergen Unterfunktion im Frontalhirn zurückgeführt [27].

Atypische Neuroleptika, wie z. B. Clozapin oder Risperidon, haben eine antagonistische Wirkung vorwiegend auf den Serotonin-(5HT<sub>2A</sub>)-Rezeptor (Serotonin=5-Hydroxytryptamin) und eine zehnfach höhere Bindungsaffinität zum DRD<sub>4</sub>-Rezeptor als typische Neuroleptika, während ihre Bindungsaffinität zum DRD<sub>2</sub>-Rezeptor geringer ausgeprägt ist [22,28]. Unter dem Einsatz von atypischen Neuroleptika wird häufig eine Verbesserung der negativen Symptome beobachtet

[27]. Denn durch den Serotonin-Antagonismus resultiert an den 5HT<sub>2A</sub>-Rezeptoren der dopaminergen Neurone des Frontalhirns eine selektive Enthemmung des dopaminergen Systems, die zu der Verbesserung der negativen Symptomatik führen soll [27]. Das zeigt, dass die Pathogenese der Schizophrenie und der Therapieansatz auf komplexen Wechselwirkungen verschiedener Neurotransmittersysteme des ZNS beruht. Die Untersuchung dieser Wechselwirkungen der dopaminergen und serotoninergen Systeme mit den GABA-ergen, cholinergen und glutaminergen Neurotransmittersystemen des ZNS sind ein weiterer wichtiger Bestandteil heutiger Studien [29,30].

### 1.1.3 Neuroleptika und ihre Nebenwirkungen

Historisch leiten sich die Neuroleptika von den Antihistaminika ab [26]. Neben der sedierenden Wirkung der Antihistaminika wirken Neuroleptika zusätzlich antipsychotisch [26]. Heute gibt es vier Substanzklassen:

- ▶ **Ia)** Phenothiazine
- ▶ **Ib)** Thioxanthene
- ▶ **II)** Butyrophenone
- ▶ **III)** Atypische Neuroleptika

Der antipsychotische Effekt wird in allen Substanzklassen durch die dopaminantagonistische Wirkung hervorgerufen [22]. Typische Neuroleptika bewirken durch den überwiegenden DRD<sub>2</sub>-Antagonismus, der durch die hohe Bindungsaffinität zu diesem Rezeptor hervorgerufen wird, in der Therapie des akuten Schubs einer Schizophrenie, eine Verbesserung der positiven Symptomatik [27]. Neben der unerwünschten negativen Symptomatik in der Langzeittherapie treten zusätzlich extrapyramidalmotorische Nebenwirkungen auf, die je nach Wirkstoffklasse (I-II) unterschiedlich stark ausgeprägt sind und auf eine unterschiedlich starke Bindungsaffinität speziell zum DRD<sub>2</sub>-Rezeptor zurückgeführt werden [9,13,22]. Das Auftreten extrapyramidalmotorischer Nebenwirkungen ist häufig therapielimitierend und wird auf eine hohe DRD<sub>2</sub>-Dichte im extrapyramidal-motorischen System zurückgeführt [27,31]. Die extrapyramidalmotorischen Nebenwirkungen sind in der folgenden Tabelle (Abb. 2) über der Therapiedauer dargestellt:

Symptome	Frühdyskinesie	Parkinsonoid	Akathisie	Tardive Dyskinesie
	Zungen-Schlund-Phänomen	Tremor, Akinesie, Rigor	Krankhafte Bewegungsunruhe	Unwillkürliche Kau- Schmatz- und Schluckbewegung; Choreatische und Athetotische Bewegungsmuster
Rückbildung	rasch	langsam	langsam	sehr langsam- teils irreversibel
<b>Therapie- verlauf</b>	Stunden-Tage	Wochen- Monate	Wochen- Monate	Monate-Jahre



Abbildung 2: Extrapiramidalmotorische Nebenwirkungen typischer Neuroleptika im zeitlichen Verlauf der Therapie (Pfeil).

Das Auftreten negativer Symptome steht unter der Langzeittherapie mit atypischen Neuroleptika weniger im Vordergrund [27]. Clozapin wird wegen der bereits beschriebenen Eigenschaften als atypisches Neuroleptikum bezeichnet. Nach neueren Studien spricht die verminderte Bindungsaffinität des Clozapin zum DRD<sub>2</sub>-Rezeptor auch für eine schnelle Rezeptordissoziation [32]. Atypische Neuroleptika verursachen daher auch deutlich weniger extrapyramidalmotorische Nebenwirkungen als typische Neuroleptika [22,33]. Außerdem wurde beschrieben, dass sogenannte „Non-Responder“ für eine Therapie mit typischen Neuroleptika häufig besser auf eine Therapie mit atypischen Neuroleptika ansprechen [34]. In der folgenden Tabelle (Abb. 3) ist beispielhaft der Vergleich von Bindungsaffinitäten und die Ausprägung von Nebenwirkungen verschiedener typischer und atypischer Neuroleptika an Dopamin- und Serotoninrezeptoren dargestellt [35]:

	Haloperidol	Amisulpiride	Risperidon	Clozapin
<b>Rezeptoraffinitäten</b>				
DRD <sub>2</sub> -Rezeptor	++++	++++	+++	++
5HT <sub>2A</sub> -Rezeptor	+	-	++++	++++
DRD <sub>4</sub> -Rezeptor	++++	?	?	++++
<b>Nebenwirkungen</b>				
Extrapyramidalmotorische	++++	++	++	+/-
Anstieg des Prolactin	++++	+++	-	++++
Gewichtszunahme	+	++	++	++++

Abbildung 3: Vergleich zwischen Bindungsaffinitäten und Nebenwirkungen **typischer** und **atypischer** Neuroleptika. Bei Risperidon sind die Rezeptoraffinitäten dosisabhängig- bis zu einer Dosis von 6 mg/d überwiegt die 5HT<sub>2A</sub>-Bindung; bei höheren Dosen gleichen sich die Bindungsaffinitäten an bzw. kehren sich um [27].

## 1.2 Das DRD<sub>4</sub>-Gen

Im menschlichen Genom gibt es genetische Varianten in der Nukleotidsequenz, sogenannte Genpolymorphismen. Von einem Genpolymorphismus wird gesprochen, wenn die Genotypvariante der DNS in der untersuchten Population mit einer Häufigkeit von >1% auftritt [36]. Es handelt sich um Mutationen, die die Aminosäuresequenz des jeweiligen Gen-Produktes verändern. Die Arten der Mutationen sind recht vielfältig. Von großer Bedeutung sind Punktmutationen, die als „Single Nucleotide Polymorphisms“ (SNP's) bezeichnet werden [37]. Vergleichende Untersuchungen der Genotypvarianten von Dopaminrezeptoren führten zu der Hypothese, dass die veränderten funktionellen und pharmakologischen Eigenschaften der Dopaminrezeptoren die Anfälligkeit für die Schizophrenie und das therapeutische Ansprechen auf eine antipsychotische Therapie beeinflussen [38,39]. Das DRD<sub>4</sub>-Gen befindet sich auf dem Chromosom 11q15.5 [40]. Seine bisher bekannten Varianten sind in der folgenden Abbildung (Abb. 4), angelehnt an Van Tol et al. (2000), schematisch dargestellt [41]:

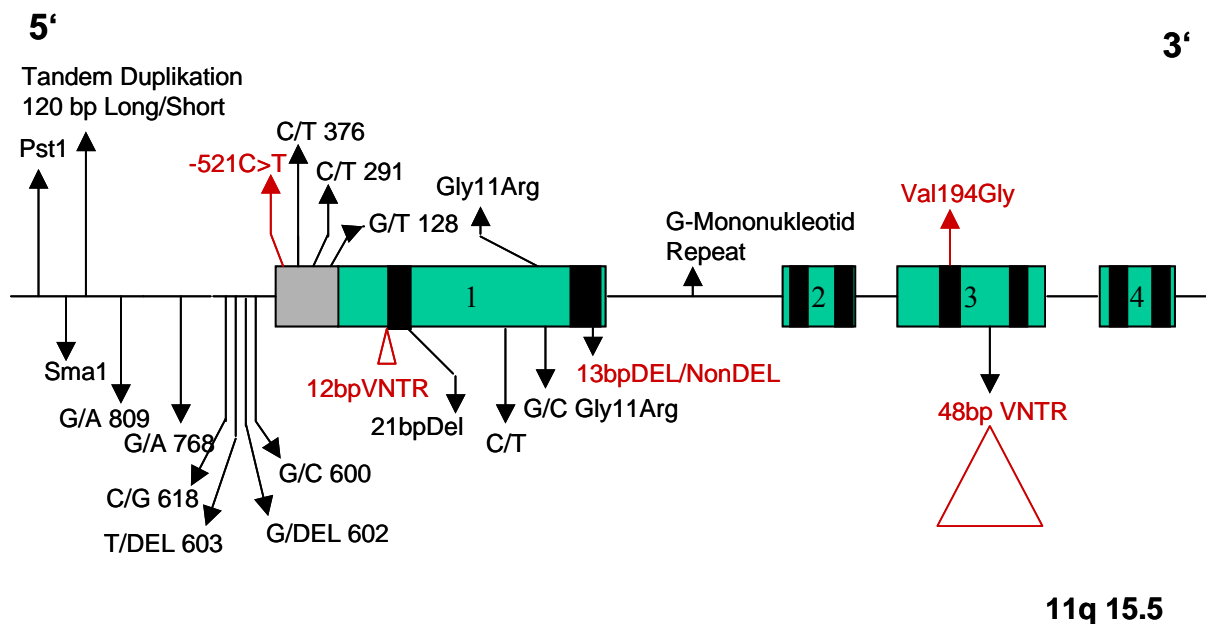


Abbildung 4: Genomische Struktur und bekannte Polymorphismen des DRD<sub>4</sub>-Gens. Die Exons (kodierende Bereiche) sind grün gekennzeichnet; schwarze Kästen beschreiben transmembranäre Domänen; der graue Kasten die Promotorregion. Die Pfeile markieren die Lokalisation der bekannten Polymorphismen. Die Untersuchung der rot unterlegten Polymorphismen ist Bestandteil dieser Arbeit.

Verschiedene molekulargenetische Studien haben einige dargestellte Varianten darauf untersucht, ob sie die DRD<sub>4</sub>-Eigenschaften und damit die Suszeptibilität für Schizophrenie beeinflussen [41]. So beschrieb Okuyama et al. (1999) erstmalig in der 5'-Promotorregion des DRD<sub>4</sub>-Gens den Polymorphismus DRD<sub>4</sub>-521C>T (C= Cytosin, T= Thymin) [42]. Bei Anwesenheit des T-Allels sank die Transkription auf 40% [42]. Da man postmortal in den Gehirnen schizophrener Patienten eine Erhöhung der DRD<sub>4</sub>-Dichte um das bis zu Sechsfache gefunden hatte, lag die Hypothese nahe, dass Träger des T-Allels weniger anfällig für Schizophrenie sein könnten [25,43,44]. Ein eindeutiger Zusammenhang konnte jedoch nicht nachgewiesen werden, obwohl das C-Allel in einer Untersuchung japanischer Schizophrener gehäuft vertreten war [42,44,45].

Catalano et al. (1993) beschrieb erstmalig im Exon 1 des DRD<sub>4</sub>-Gens den Polymorphismus DRD<sub>4</sub>-12bpVNTR (bp= Basenpaar, VNTR= „Variable Number of Tandem Repeats“) [46]. Das sogenannte „A1-Allel“ ist durch eine zweifache Nukleotidsequenz von 12 Basenpaaren charakterisiert. Das sogenannte „A2-Allel“

weist die einfache Nukleotidsequenz auf. Der DRD<sub>4</sub>-12bpVNTR kodiert wahrscheinlich 4 Aminosäuren (AlaSerAlaGly) im extrazellulären Anteil der ersten transmembranären Domäne des Rezeptors. Zenner et al. (1998) konnte zwischen den beiden Varianten des DRD<sub>4</sub>-12bpVNTR keinen veränderte Bindungsaffinität des DRD<sub>4</sub>-Proteins in Gegenwart verschiedener Liganden (Dopamin, Adrenalin und Noradrenalin) feststellen [47]. Der Polymorphismus wurde auch mit der wahnhaften Störung in Verbindung gebracht [20,41]. Eine eindeutige Beziehung mit der Schizophrenie ergab sich bisher nicht [46].

Nöthen et al. (1994) beschrieb im Exon 1 des DRD<sub>4</sub>-Gens erstmals den Polymorphismus DRD<sub>4</sub>-13bpDel/NonDel (Del= Deletion; NonDel= NonDeletion) [48]. Diese Deletion von 13 Basenpaaren führt durch Rahmenverschiebung der kodierenden Gensequenz zu einem vorzeitigen Stop am Codon 99, sodass ein nicht-funktionelles Protein kodiert wird [49,50]. Sie ist die erste am DRD<sub>4</sub>-Rezeptor beschriebene Null-Mutation. Dieser Genlocus kodiert für die Asparaginsäure in der zweiten transmembranären Domäne und ist damit für die Katecholaminbindung bedeutend. Ein Zusammenhang mit der Schizophrenie und anderen psychiatrischen Erkrankungen wurde nicht festgestellt [48,49].

Van Tol et al. (1992) beschrieb erstmalig im Exon 3 des DRD<sub>4</sub>-Gens den Polymorphismus DRD<sub>4</sub>-48bpVNTR [51]. Es handelt sich um eine Sequenz von 48 Basenpaaren, die zwischen zwei- und zehnmal wiederholt werden kann. Da diese Sequenz für 16 Aminosäuren in der dritten zytoplasmatischen Schlinge kodiert, verändert sich mit der Anzahl der Wiederholungen auch die Schlingenlänge und damit möglicherweise die Ligandenbindung und die Signaltransduktion des DRD<sub>4</sub>-Rezeptors [38,52]. So zeigte die D4.10-Variante im Vergleich zu der D4.2-Variante, eine 2-3-fach stärkere Aktivität auf die cyclische Adenylatcyclase, während die Varianten D4.4 und D4.2 im Vergleich zur D4.7-Variante eine 2-3-fach höhere DRD<sub>4</sub>-Aktivität aufwiesen [39,53]. In Bindungsanalysen zeigte sich zwischen den Varianten des DRD<sub>4</sub>-48bpVNTR kein deutlicher Unterschied in den Bindungsprofilen [54]. Auch ein Vergleich von Clozapin und typischen Neuroleptika zeigte keine Unterschiede in den Bindungsaffinitäten [38,55]. Van Tol et al. (1992) konnte nur unter In-vitro-Bedingungen eine höhere Dissoziationskonstante für Clozapin an den Varianten D4.4 und D4.2 im Vergleich zu der Variante D4.7 messen [51]. Ein direkter



Zusammenhang mit der Häufigkeitsverteilung der Varianten und der Schizophrenie ergab sich bisher nicht [41,55].

Seeman et al. (1994) beschrieb im Bereich des Exon 3 des DRD<sub>4</sub>-Gens den Aminosäureaustausch DRD<sub>4</sub>-Val194Gly (Valin durch Glycin), der die fünfte transmembranäre Domäne des DRD<sub>4</sub>-Rezeptors betrifft [41,56]. Er befindet sich in unmittelbarer Nähe zur Aminosäure Serin-193. Der Aminosäure Serin wurde in einer Studie von Cox et al. (1992) für die Bindungsaffinität für Dopamin speziell am DRD<sub>2</sub>-Rezeptor eine bedeutende Rolle zugesprochen [57]. Liu et al. (1996) führte In-vitro-Experimente mit den rekonstruierten Rezeptorvarianten durch [58]. Dabei stellte sich heraus, dass das DRD<sub>4</sub>-Protein der Glycin194-Variante bezüglich Dopamin, Clozapin und Olanzapin nur ein Tausendstel der Bindungsaffinität der Valin194-Variante aufweist [58]. Ein Einfluss der Genotypvarianten auf die Schizophrenie konnte jedoch nicht festgestellt werden [58].

### **1.3 Zielsetzung**

Es gibt Hinweise, dass die Schizophrenie pathogenetisch auf einer primären Dysregulation der dopaminergen Neurotransmittersysteme beruht. Der medikamentöse, antipsychotische Therapieerfolg wird dabei auf die dopaminantagonistische Wirkung der Neuroleptika zurückgeführt, wobei therapeutisches Ansprechen und Auftreten extrapyramidal-motorischer Nebenwirkungen individuell sehr verschieden sind. Diese Unterschiede könnten mit genetisch bedingten Variationen im Dopaminrezeptor Typ 4 zusammenhängen.

In dieser Arbeit wurden bei schizophrenen Patienten fünf DRD<sub>4</sub>-Polymorphismen mit Hilfe der PCR und des PCR-RFLP untersucht. Dabei sollte die Frage geklärt werden, ob zwischen diesen Polymorphismen und dem Auftreten von extrapyramidal-motorischen Nebenwirkungen unter Neuroleptikagabe ein Zusammenhang besteht. Als eine Nebenfragestellung sollte exploriert werden, ob zwischen diesen Genpolymorphismen und dem Auftreten von Unterformen der Schizophrenie ein Zusammenhang bestehen könnte.