

2 Material und Methoden

2.1 Studienteilnehmer

In einer multizentrischen, prospektiven, nicht interventionellen Studie wurden in Berlin insgesamt 366 stationäre, nicht verwandte schizophrene Patienten hinsichtlich des DRD4-Genotyps untersucht. Davon waren 52,2% männlichen und 47,8% weiblichen Geschlechts. Das mittlere Alter lag bei 38,7 Jahren mit einem Minimum bei 18 und einem Maximum bei 97 Jahren. Die Standardabweichung betrug 12,6. Der Median der Altersverteilung betrug 36,5 Jahre. Die Patienten wurden aus den zwei universitären psychiatrischen Kliniken der Charité (Standort Mitte und Benjamin Franklin, Humboldt-Universität, Berlin) und aus zwei weiteren psychiatrischen Krankenhäusern (Wilhelm Griesinger Krankenhaus, Krankenhaus am Waldsee) in Berlin rekrutiert [28]. Eingeschlossen wurden nur Patienten der kaukasischen Bevölkerungsgruppe [59]. Ausgeschlossen wurden Patienten mit organisch bedingten Psychosen, die durch Magnetresonanztomographie, Computertomographie oder laborchemisch toxikologische Untersuchungen aufgedeckt werden konnten. Weiterhin wurden die Patienten ausgeschlossen, die innerhalb der Untersuchungsperiode wiederholt stationär aufgenommen wurden oder das Krankenhaus innerhalb der ersten sieben Tage wieder verließen [28,59].

Alle Patienten waren wegen des Verdachts auf eine Schizophrenie akut stationär aufgenommen worden. Die Diagnose basierte auf dem von der Deutschen Gesellschaft für Psychiatrie, Psychotherapie und Nervenheilkunde (DGPPN) und der WHO empfohlenen ICD-10-Diagnoseschlüssel [114]. Für den internationalen Vergleich wurden die Diagnosen auch nach dem Diagnoseschlüssel der DSM-IV-Kriterien der APA formuliert [6,7]. Von den eingeschlossenen Patienten hatten 219 eine schizoparanoide (DSM-IV 295.3), 65 eine schizoaffektive (DSM-IV 295.7), 29 eine residuale (DSM-IV 295.6), 15 eine katatone (DSM-IV 295.2), 3 eine desorganisierte (DSM-IV 295.1), 7 eine schizophreniforme (DSM-IV 295.4) und 4 eine undifferenzierte (DSM-IV 295.9) Schizophrenie; 24 Patienten hatten nicht näher klassifizierte Subtypen. Da es sich hinsichtlich der Diagnosen zum Teil um geringe Patientenzahlen handelte, wurden nur die vier häufigsten Schizophrenie-Subtypen statistisch analysiert.

Dokumentiert wurde weiterhin, ob es sich um eine Ersterkrankung handelte, bzw. das Erstmanifestationsalter und die Anzahl der Rezidive, die familiäre Prädisposition, die Raucheranamnese, das aktuelle Therapieschema und das aktuelle Ansprechen auf die medikamentöse Therapie anhand der positiven und negativen Symptomskala (PANSS) [28,59]. Für die Dokumentation der Nebenwirkungen unter Neuroleptikatherapie wurden drei verschiedene internationale Nebenwirkungsskalen verwendet: die Extrapyramidale Symptomskala (EPS-Skala oder Simpson-Angus-Scale) für Symptome des Pseudoparkinsonismus, die „Barnes-Akathisia-Rating-Scale“ (BARS) für die medikamentös induzierte Akathisie und die „Abnormal-Involuntary-Movement-Scale“ (AIMS) für die tardive Dyskinesie [2,59]. Die Befragungen hinsichtlich der Nebenwirkungsskalen erfolgten an drei festgelegten Untersuchungszeitpunkten nach stationärer Aufnahme - am Tag 3 (2-4), am Tag 14 (12-16) und am Tag 28 (26-30). Nicht alle Patienten konnten zu den drei festgelegten Untersuchungszeitpunkten befragt werden, da sie entweder nicht in der Lage waren, an den Befragungen teilzunehmen oder frühzeitig entlassen werden konnten [59].

Insgesamt wurden aus der gesamten Gruppe (366 Schizophrene) 262 Patienten anhand der AIMS-, 261 anhand der BARS- und 262 Patienten anhand der EPS-Skala befragt, und zwar 239 Patienten zum Untersuchungszeitpunkt 1 (Tag 2-4; AIMS =240, BARS =239, EPS =239), 211 Patienten zum Untersuchungszeitpunkt 2 (Tag 12-16; AIMS =211, BARS =212, EPS =210) und 167 Patienten zum Untersuchungszeitpunkt 3 (Tag 26-30; AIMS =165, BARS =169, EPS =166). Um den Bias zu untersuchen, der möglicherweise durch die Patienten hervorgerufen wurde, die nicht an allen drei Befragungen teilgenommen hatten, wurde die Allelverteilung der DRD₄-Polymorphismen in den beiden Gruppen (vollständig erfasste Patienten/ unvollständig erfasste Patienten) miteinander verglichen. Der Chi-Quadrat-Test und der Fisher's Exakt-Test zeigten keine signifikanten Unterschiede in der Allelverteilung aller hier untersuchten DRD₄-Polymorphismen. Deshalb wurden in die statistische Analyse auch die Patienten eingeschlossen, die nicht zu allen drei Untersuchungszeitpunkten befragt worden waren.

Therapeutisch eingesetzt wurden die typischen Neuroleptika, Haloperidol, Flupentixol, Clopenthixol, Perazin und Fluphenazin, das atypische Neuroleptikum Clozapin und das anticholinerg wirksame Biperiden. Dokumentiert wurde die

Tagesdosis an den drei Untersuchungszeitpunkten. Für eine einheitliche statistische Auswertung wurde für jedes Neuroleptikum die Äquivalenzdosis zu Chlorpromazin ermittelt. Dafür wurde die Tagesdosis für Haloperidol mit 50, für Flupentixol mit 30, für Clopenthixol mit 6, für Perazin mit 1,2 und Fluphenazin mit 50 multipliziert [59].

Die Stationsärzte, die die Befragungen zu den Nebenwirkungsskalen vornahmen, waren Assistenzärzte und teils bereits Fachärzte für Psychiatrie. Sie hatten keine Informationen über die Genotypen dieser Patienten. In monatlichen Treffen wurde die Verlässlichkeit der Befragungen und klinischen Untersuchungen, insbesondere diejenigen mit den Fragebögen PANSS (positive and negative symptoms scale), AIMS (acute involuntary movement scale), EPS (extrapyramidal symptoms scale, von Simpson und Angus) und BARS (Barnes akathisia scale) geprüft [59]. Die Diagnosen wurden jeweils durch die zuständigen Oberärzte und Chefärzte kontrolliert. Die Untersucher der Genotypen hatten keine klinischen Informationen zu den untersuchten Patienten. Die Patienten wurden ausführlich über die Studie aufgeklärt und gaben ihr persönliches Einverständnis. Die Studie wurde von der Ethikkommission des Universitätsklinikums der Charité (Humboldt-Universität zu Berlin) geprüft und befürwortet [28,59].

2.2 Material

2.2.1 Arbeitsgeräte

Geräte	Hersteller
Pipette 0,1 µl - 10,0 µl	Vaudaux-Eppendorf AG; Deutschland
Pipette 10,0 µl - 100,0 µl	Vaudaux-Eppendorf AG, Deutschland
Pipettenspitzen weiß	Vaudaux-Eppendorf AG, Deutschland
Pipettenspitzen gelb	Vaudaux-Eppendorf AG, Deutschland
Küvette 2000 µl	Vaudaux-Eppendorf AG, Deutschland
Becherglas 500 ml	Ilmabor, Deutschland
PCR-Gefäße	Rapidozym GmbH, Deutschland
PCR-Deckel	Rapidozym GmbH, Deutschland
Mikrozentrifuge	National Labnet CO, Japan
Tischrüttler	Janke + Kunkel, Deutschland
Zentrifuge	Beckmann, USA
Thermocycler	GeneAmp 9600 Perkin Elmer Cetus, USA
Kühlschrank	Liebherr, Deutschland
Inkubator	Biometra, Deutschland
Präzisionswaage	OWA Labor, Deutschland
Mikrowelle	Panasonic, Deutschland
Magnetrührer	IKA Labortechnik, Deutschland
Gelschlitten	Pharmacia, Schweden
Gelkämme	Pharmacia, Schweden
Gelelektrophorese-Kammer	Pharmacia, Schweden
Netzgerät	Pharmacia, Schweden
UV-Transluminator	TM Stratagene, USA
Video-System Eagle-Eye	TM Stratagene, USA
Druckpapier	Mitsubishi, Japan

Abbildung 5: Arbeitsgeräte.

2.2.2 Reagenzien

Chemikalien	Hersteller
Primersequenzen	s. Kapitel 2.2.3
dNTP 100 mM	Boehringer Mannheim, Deutschland (200 µM dATP, dCTP, dTTP; 100 µM dGTP; 100 µM 7-deaza-GTP)
25mM Mg-Lösung	Perkin Elmer, USA
Ampli Taq-Polymerase 5 U/µl	Perkin Elmer, USA
100 mM Tris-Puffer	Klinische Pharmakologie, Charité, Berlin, Deutschland
200 mM KCl	Klinische Pharmakologie, Charité, Berlin, Deutschland
10x Puffer	Perkin Elmer, USA (1 M Tris, 3 M NaCl, pH 7,8)
100% DMSO	Merck, Darmstadt, Deutschland
Restriktionsenzyme	s. Kapitel 2.3.3 und 2.3.4
NEBuffer2	Bio Labs, New England, USA (50 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl ₂ und 1 mM DTT, pH 7,9 bei 25°C)
NEBuffer4	Bio Labs, New England, USA (50 mM KCl, 20 mM TRIS-Acetat, 10 mM Mg-Acetat und 1 mM DTT, pH 7,9 bei 25°C)
Buffer Y+/Tango	MBI Fermentas, Litauen (33 mM TRIS-Acetat, 10 mM Mg-Acetat, 66 mM K-Acetat und 0,1 mg/ml BSA, pH 7,9)
Ethidiumbromid 100 mg/ml	Approx, Deutschland
1x TBE-Puffer	Klinische Pharmakologie, Charité, Berlin, Deutschland (5x Stammlösung, 54 g Tris, 27,5 g Borsäure, 20 ml 0,5 M EDTA (pH 8,0))
Agarose	GIBCO BRL, Schottland
Ficoll-Puffer 400	Perkin Elmer, USA
DNS-Längenstandard V	MBI Fermentas, Litauen
DNS-Längenstandard VI	MBI Fermentas, Litauen
DNS-Längenstandard 100bp	MBI Fermentas, Litauen

Abbildung 6: Tabellarische Übersicht der Reagenzien.

2.2.3 Primersequenzen

DRD4-Polymorphismen	Primersequenzen
521C>T: D4-521C-3 D4-521C-4	(Anlagerung in 5'-3'-Richtung-“Hin-Primer”) 5' - CGG GGG CTG AGC ACC AGA GGC TGC T - 3' (Anlagerung in 3'-5'-Richtung-“Rück-Primer”) 5' - G CAT CGA CGC CAG CGC CAT CCT ACC - 3'
12bpVNTR und 13bpDel/NonDel: Primer-1 [46] Primer-2 [46]	(Anlagerung in 5'-3'-Richtung-“Hin-Primer”) 5' - CGC CAT GGG GAA CCG CAG - 3' (Anlagerung in 3'-5'-Richtung-“Rück-Primer”) 5' - CGG CTC ACC TCG GAG TAG A - 3'
Val194Gly: D4Acc1.2-1 D4Acc1.2-2	(Anlagerung in 5'-3'-Richtung-“Hin-Primer”) 5' - GCC GTG CCG CTG CGC TAC AAC - 3' (Anlagerung in 3'-5'-Richtung-“Rück-Primer”) 5' - AGA TGA CCC GGT GCA AGG CGC - 3'
48bpVNTR: Primer-1 [28] Primer-2 [28]	(Anlagerung in 5'-3'-Richtung-“Hin-Primer”) 5' - GCG ACT ACG TGG TCT ACT CG - 3' (Anlagerung in 3'-5'-Richtung-“Rück-Primer”) 5' - AGG ACC CTC ATG GCC TTG - 3'

Abbildung 7: Tabellarische Übersicht der Primersequenzen.

2.3 Methode

2.3.1 DNS-Extraktion

Die Extraktion der DNS erfolgte nach dem von Sambrook et al. (1989) beschriebenen Verfahren [60]. 10 ml EDTA-Blut werden 30 ml eines 1x Erythrozytenlösepuffers zugesetzt. Dieser Ansatz wird geschüttelt, bis zur vollständigen Hämolyse ca. 30 min auf Eis gelagert und anschließend bei 2000 U/min 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wird dekantiert. Das Leukozytensediment wird erneut in 2 ml 1x Erythrozytenlysepuffer gelöst, 20 Minuten auf Eis gekühlt, 10 min bei 2000 U/min

zentrifugiert und der Überstand dekantiert. Das erhaltene Zellsediment wird mit 1,5 ml 1xTEN-Puffer versetzt und bei -20°C gelagert. Um die DNS aus den Leukozyten zu isolieren, werden dem Leukozyten-Zell-Sediment 2 ml Nuclei-Lysis-Puffer und pro Ansatz 1,5 mg Proteinase K in 100 μl H_2O zugesetzt. Die Ansätze werden bei 40°C unter Schütteln über Nacht inkubiert. Danach wird jeder Probe 1,5 ml eines Chloroform-Phenol-Gemisches (96:4) zugesetzt und zwei weitere Stunden mit dem Überkopfschüttler geschüttelt. Nach Zentrifugation mit 2000 U/min über 5 Minuten werden 2 Phasen getrennt. Die untere organische Phase wird verworfen. Die obere wässrige Phase enthält die extrahierte DNS, die in ein steriles 15 ml Falcon-Röhrchen überführt, mit 1,5 ml Chloroform-Isoamylalkohol (24:1) versetzt und über 5 Minuten geschüttelt wird. Die Ausfällung der DNS erfolgt durch die Zugabe von 6 ml 95%igem Ethanol und 100 ml 3 M Natriumacetat. Nach einer weiteren Zentrifugation mit 3000 U/min setzt sich die ausgefällte DNS deutlich am Boden ab. Die extrahierte DNS wird mit 70%igem Ethanol mehrmals gewaschen und zwischen den Waschvorgängen jeweils über 10 Minuten bei 3000 U/min zentrifugiert. Der Überstand wird dekantiert. Die DNS wird in 750 μl 1xTE-Puffer (10 mM Tris, 1mM EDTA) überführt und über Nacht bei 55°C im Schüttelblock gelöst. Nach Abschluss der Extraktion wird die DNS in sterile, markierte Eppendorf-Gefäße pipettiert und bei 4°C aufbewahrt.

2.3.2 Polymerase-Ketten-Reaktion

Die polymorphen Allele wurden mittels Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) mit anschließendem Restriktionsverdau (RFLP - Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismus) detektiert. Wir untersuchten in der Arbeitsgruppe von Dr. Rolf Kaiser die folgenden Genpolymorphismen des DRD_4 -Rezeptors:

- ▶ 521C>T
- ▶ 12bpVNTR
- ▶ 13bpDel/NonDel
- ▶ Val194Gly
- ▶ 48bpVNTR

Die Genotypisierung der Polymorphismen DRD_4 -Val194Gly und DRD_4 -521C>T erfolgte durch die Doktorandin der vorliegenden Arbeit, die Genotypisierung der übrigen Polymorphismen durch weitere Doktoranden der Arbeitsgruppe.

Die generelle Vorgehensweise bei der Detektion der Polymorphismen wird für den Polymorphismus DRD₄-521C>T ausführlich beschrieben, bei allen anderen werden nur noch die Angaben gemacht, die von der beschriebenen Methode abweichen.

2.3.3 Nachweis des Polymorphismus DRD₄-521C>T mittels PCR- RFLP

PCR: Die Genotypisierung erfolgte angelehnt an das von Yuki Okuyama et al. (1999) beschriebene Verfahren [42]. Alle Reagenzien wurden während des Reaktionsansatzes auf Eis gelagert. Der PCR-Reaktionsansatz (Endvolumen 25,0 µl) enthielt 1,75 µl 100 mM dNTP, 0,5 µl Primer D4-521C-3 (120,4 µM), 0,5 µl Primer D4-521C-4 (124,9 µM), 15,05 µl Aqua dest., 1,0 µl 25 mM Mg²⁺-Lösung, 0,2 µl Ampli-Taq-Polymerase (entsprechend 1 Einheit), 2,5 µl DMSO 100%, 2,5 µl 10xPuffer und 1,0 µl der genomischen DNS. Die Reaktionsansätze wurden in den geschlossenen Gefäßen gemischt und kurz zentrifugiert. Der Reaktionsansatz wurde danach in den vorgeheizten Thermocycler gestellt und entsprechend dem in der Tabelle (Abb. 8) aufgeführten Temperatur-Zeit-Programm denaturiert und amplifiziert.

Temperatur in °C	Zeit
1 Zyklus	
94°C	120 sec
35 Zyklen	
94°C	30 sec
65°C	30 sec
72°C	30 sec
1 Zyklus	
72°C	7 min
4°C	unbegrenzt

Abbildung 8: Temperatur-Zeit-Programm der PCR des DRD₄-521C>T.

Das PCR-Produkt hatte eine amplifizierte DNS-Fragmentlänge von 285 bp und wurde bei 4°C gelagert.

Restriktionsenzymverdau: Der anschließende Enzymverdau des PCR-Produktes erfolgte durch die Restriktionsendonuklease **Nsb 1** (MBI Fermentas, Litauen). Der Reaktionsansatz (Endvolumen 4,0 µl) wurde auf Eis angesetzt und enthielt 0,5 µl (entsprechend 5 Einheiten) des Restriktionsenzym *Nsb 1* und 3,5 µl des Buffer Y+/Tango. Von diesem Ansatz wurden 3,25 µl zu 25,0 µl PCR-Produkt pipettiert und

bei 37°C über 24 Stunden inkubiert. Während der Inkubation wurde das DNS-Fragment in der folgenden Sequenz durch das Restriktionsenzym *Nsb 1* geschnitten:

5' - ...TG'CG'CA...- 3'

3'- ... AC'GC'GT...- 5'

Das TT-521-Allel zeigte an der Stelle –521bp die hier beschriebene DNS-Sequenz, die sensitiv für den Schnitt durch das Restriktionsenzym *Nsb 1* war. Die DNS der CC-521-Träger wurde dagegen nicht geschnitten.

Horizontale Gelelektrophorese: Die PCR-RFLP-Produkte wurden auf ein 3%iges Agarose-Gel aufgetragen und mittels horizontaler Gelelektrophorese aufgetrennt. Zu 250ml einer 1x TBE-Lösung wurden 7,5 g Agarose (3%iges Agarose-Gel) bzw. 8,75 g Agarose (3,5%iges Agarose-Gel) hinzugegeben. Der Ansatz wurde in der Mikrowelle aufgekocht, bis die Agarose vollständig aufgelöst war, anschließend zum Abkühlen auf den Magnetrührer gestellt, nach Erreichen von ca. 50°C mit 25,0 µl Ethidiumbromid versetzt und dann auf einen Gelschlitten gegossen. Im folgenden Schritt wurden die Probenkämme fixiert. Nach ca. 10 min. war das Gel soweit verfestigt, dass es nach Entfernen der Kämme feste Geltaschen aufwies. Das Gel wurde mit Hilfe des Gelschlittens in der Gelelektrophorese-Kammer fixiert. Die Gelelektrophorese-Kammer enthielt 2,0 L des 1x TBE-Puffers, in dem 200,0 µl Ethidiumbromid gelöst waren.

Im Anschluss an den Restriktionsenzymverdau wurde zu jeder Probe 10,0 µl des Ficoll-Puffers hinzugefügt und ein Gesamtvolumen von 35,0 µl pro Reaktionsansatz in die Geltaschen pipettiert. In die äußeren Geltaschen jeder Reihe wurden 6,0 µl des entsprechenden DNS-Längenstandards Nr. V, VI oder 100bp (MBI Fermentas) pipettiert. Anschließend wurden 35,0 µl der jeweiligen Ansätze der Reihe nach in die restlichen Geltaschen pipettiert und über 60 Minuten eine Gleichspannung von 120 Volt angelegt. Dann wurde das Gel aus der Kammer entnommen und auf einen UV-Transluminator gelegt. Mit Hilfe des Eagle-Eye wurde ein digitalisiertes Bild der entsprechend ihrer Länge aufgetrennten DNS-Fragmente aufgenommen, ausgedruckt und dem Versuchsprotokoll beigelegt. Die DNS-Fragmentlängen und

die sich daraus ergebenden Genotypen zeigt die Tabelle (Abb. 9) Okuyama et al. (1999) [42]:

Genotyp	DNS-Fragmentlängen	
CC-521	1 Fragment	285 bp
TT-521	2 Fragmente	176 bp + 109 bp
CT-521	3 Fragmente	285 bp + 176 bp + 109 bp

Abbildung 9: Erwartete Fragmentlängen nach PCR-RFLP des DRD_4 -521C>T.

Nachweis des Polymorphismus DRD_4 -521C>T mittels PCR-RFLP (Abb. 10):

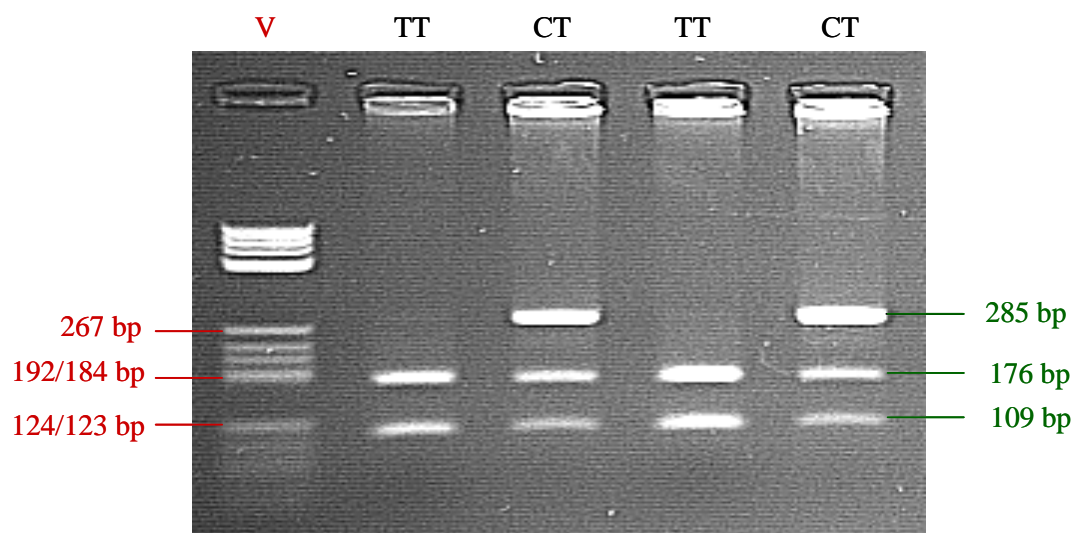


Abbildung 10: Anhand des Längenstandards V (rot) kann die DNS-Fragmentlänge des PCR-RFLP-Produktes ermittelt werden.

2.3.4 Nachweis des Polymorphismus DRD_4 -Val194Gly mittels PCR-RFLP

PCR: Die Bestimmung des Polymorphismus DRD_4 -Val194Gly erfolgte in Anlehnung an die von Seeman et al. (1994) beschriebene Methode [25]. Der Reaktionsansatz von 25,0 μ l Endvolumen enthielt 1,75 μ l 100 mM dNTP, 0,5 μ l Primer D4Acc1.2-1 (113,4 μ M), 0,5 μ l Primer D4Acc1.2-2 (104,8 μ M), 14,575 μ l Aqua dest., 1,5 μ l 25 mM Mg^{2+} -Lösung, 0,175 μ l Ampli-*Taq*-Polymerase (entsprechend 0,875 Einheiten), 2,5 μ l DMSO 100%, 2,5 μ l 10x Puffer und 1,0 μ l der genomischen DNS. Die Thermocycler-Bedingungen zeigt die folgende Tabelle (Abb. 11):

Temperatur in °C	Zeit
1 Zyklus	
94°C	120 sec
35 Zyklen	
94°C	60 sec
72°C	5 min
1 Zyklus	
72°C	7 min
4°C	unbegrenzt

Abbildung 11: Temperatur-Zeit-Programm der PCR des DRD₄-Val194Gly.

Das amplifizierte DNS-Fragment hatte eine Länge von 241 bp.

Restriktionsenzymverdau: Der anschließende Verdau des PCR-Produktes erfolgte durch die Restriktionsendonuklease *Acc1* (BioLabs, New England). Der Reaktionsansatz mit einem Endvolumen von insgesamt 4,0 µl enthielt 0,8 µl (entsprechend 8 Einheiten) *Acc1* und 3,2 µl des 1x NEBuffer 4. Von diesem Ansatz wurden 3,25 µl zu 25,0 µl PCR-Produkt pipettiert und bei 37°C über 24 Stunden inkubiert. Das DNS-Fragment wurde in der folgenden Sequenz durch das Restriktionsenzym *Acc1* geschnitten:

Valin

5' - ...GT'**AT'**AC... - 3'

3' - ...CA'**TA'**TG... - 5'

Glycin

5' - ...GT'**CG'**AC... - 3'

3' - ...CA'**GC'**TG... - 5'

Das Valin194-Allel (**rot**) zeigt an der Stelle -194bp die hier beschriebene DNS-Sequenz. Bei Vorliegen des Glycin194-Allels (**grün**) ist das Nucleotid **Thymin** durch **Guanin** ersetzt. Diese veränderte Variante wird durch das Restriktionsenzym *Acc1* nicht geschnitten [58]. Nach Trennung durch die horizontale Gelelektrophorese zeigten sich die in der folgenden Tabelle (Abb. 12) aufgeführten Fragmentlängen:

Genotyp	DNS- Fragmentlängen
Valin-194	2 Fragmente: 196 bp + 45 bp
Glycin-194	1 Fragment: 241 bp
Valin-194-Glycin	3 Fragmente: 196 bp + 45 bp + 241 bp

Abbildung 12: Erwartete Fragmentlängen nach PCR-RFLP des DRD₄-Val194Gly.

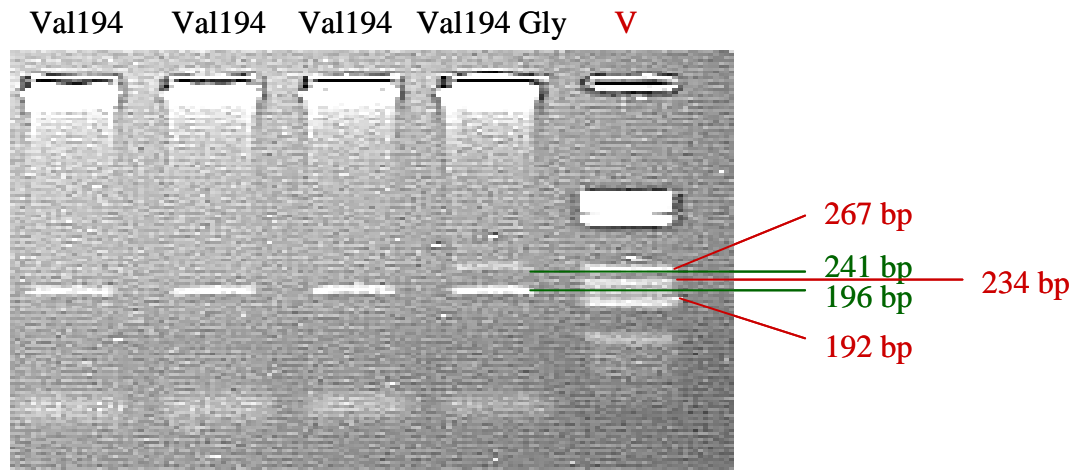


Abbildung 13: Anhand des Längenstandards V (rot) kann die DNS-Fragmentlänge des PCR-RFLP-Produktes ermittelt werden.

2.3.5 Nachweis des Polymorphismus DRD_4 -48bpVNTR

Der Polymorphismus DRD_4 -48bpVNTR wurde mittels der von Van Tol et al. (1992) beschriebenen Methode untersucht [51]. Für den Reaktionsansatz s. Kaiser et al. (2000) [28]. Die Thermocycler-Bedingungen zeigt die folgende Tabelle (Abb. 14):

Temperatur in °C	Zeit
1 Zyklus	
95°C	20 sec
38 Zyklen	
57°C	30 sec
72°C	1 min
1 Zyklus	
72°C	7 min
4°C	unbegrenzt

Abbildung 14: Temperatur-Zeit-Programm der PCR des DRD_4 -48bpVNTR [28].

Die Bestimmung der Genotypvarianten kann der Veröffentlichung von Kaiser et al. (2000) entnommen werden [28].

2.3.6 Nachweis des Polymorphismus DRD₄-12bpVNTR und DRD₄-13bpDel/NonDel

PCR: Die Genotypisierung der Polymorphismen DRD₄-12bpVNTR und DRD₄-13bpDel/NonDel erfolgte angelehnt an die von Catalano et al. (1993), bzw. Nöthen et al. (1994) publizierten Verfahren [46,48]. Der Reaktionsansatz von 25,0 µl Endvolumen enthielt 2,25 µl 100 mM dNTP, 2,0 µl Primer 4.1.1, 2,0 µl Primer 4.1.2, 1,0 µl Primer D4del Nö-1, 4,2 µl Aqua dest., 1,0 µl 25 mM Mg²⁺-Lösung, 0,3 µl Ampli-Taq-Polymerase (entsprechend 0,875 Einheiten), 2,5 µl DMSO 100%, 6,25 µl 100 mmol TRIS HCl (pH 8,0) und 1,0 µl der genomischen DNS. Die Thermocycler-Bedingungen zeigt die folgende Tabelle (Abb. 15):

Die Reaktionsansätze sind in beiden Veröffentlichungen beschrieben [46,48]. Die folgende Tabelle (Abb. 15) zeigt die Bedingungen im Thermocycler:

Temperatur in °C	Zeit
1 Zyklus	
95°C	6 min
40 Zyklen	
94°C	1 min
57°C	1 min
72°C	1 min
1 Zyklus	
4°C	unbegrenzt

Abbildung 15: Temperatur-Zeit-Programm der PCR des DRD₄-12bpVNTR- und DRD₄-13bpDel/NonDel [46].

Die Auftrennung mittels horizontaler Gelelektrophorese ergab die in der folgenden Tabelle aufgeführten DNS-Fragmentlängen (Abb. 16):

Allele des DRD₄-12bpVNTR	DNS-Fragmentlängen nach PCR
1x 12bpVNTR	1 Fragment: 285 bp
2x 12bpVNTR	1 Fragment: 297 bp
1x2x 12bpVNTR	2 Fragmente: 285 bp + 297 bp
Allele des DRD₄-13bpDel/NonDel	
13bp-Del	1 Fragment: 163 bp
13bp-NonDel	1 Fragment: 176 bp
13bp-Del/NonDel	2 Fragmente: 163 bp + 176 bp

Abbildung 16: Erwartete Fragmentlängen nach PCR des DRD₄-12bpVNTR und des DRD₄-13bpDel/NonDel.

Die Bestimmung der Genotypvarianten kann den Veröffentlichungen von Catalano et al. (1993) und Nöthen et al. (1994) entnommen werden [46,48].

2.4 Statistische Methode

Die statistische Analyse erfolgte anhand von SPSS, Version 12.0. Die Analysen zum Vergleich der DRD₄-Genotypen auf Gleichheit zwischen allen Schizophrenen und den vier in unserer Untersuchungsgruppe häufigsten Schizophreniesubtypgruppen, dem Geschlecht und Vorliegen eines Rezidivs, erfolgte mittels Pearson's χ^2 -Unabhängigkeitstest. Bei erwarteten Zellhäufigkeiten <5 wurde ergänzend der exakte Test nach Fisher durchgeführt. Die Signifikanzgrenze wurde für $p < 0,05$ festgelegt.

Für die Hypothese auf Gleichheit zwischen den DRD₄-Varianten und Erstmanifestationsalter sowie Rezidivhäufigkeit wurde die Varianzanalyse nach Kruskal-Wallis (für mehrere unabhängige Untergruppen) und der Mann-Whitney-U-Test (für zwei unabhängige Untergruppen) durchgeführt. Untergruppen, die im Kruskal-Wallis-Test signifikante Verteilungsunterschiede ergaben, wurden einzeln anhand des Mann-Whitney-U-Test gegeneinander getestet.

Für die Unterscheidung der DRD₄-Varianten zwischen der Ausprägung von Nebenwirkungen, dem Geschlecht, der Durchführung einer Clozapintherapie, dem Rauchverhalten (Raucher-Nichtraucher; abstinenter Raucher) und dem Bestehen einer Erstmanifestation, wurde ebenfalls für mehrere unabhängige Untergruppen der Kruskal-Wallis-Test und für zwei unabhängige Untergruppen der Mann-Whitney-U-Test durchgeführt.

Um das Problem des multiplen Testens durch die angewandten Einzeltestverfahren zu den drei Untersuchungszeitpunkten einzuschränken und kofaktorielle Parameter

zu berücksichtigen, wären multivariate Analysen, wie die univariate Varianzanalyse mit und ohne Messwiederholung, bzw. die Kovarianzanalyse, die geeigneten Verfahren. Die Varianzanalyse ist ein robustes Verfahren, was moderate Abweichungen betrifft. Die Anwendung ist aber an Voraussetzungen gebunden, die in unserer Untersuchungsgruppe nicht erfüllt werden. Die Verteilung der Zielgröße (Nebenwirkungsintensitäten) weicht in unserer Gruppe (s.S. 38-39) stark von einer Normalverteilung ab. Zusätzlich liegen extreme Unterschiede in den Gruppengrößen zu den Faktorstufen vor. Auch die Voraussetzung der Varianzhomogenität der Zielvariablenverteilung wird über die Faktorstufen stark verletzt. Damit werden drei Voraussetzungen für diese multivariaten Analyseverfahren nicht erfüllt. Den ermittelten Signifikanzen wäre nicht zu trauen. Aus diesen Gründen sind nur die oben genannten Analyseverfahren in dieser Untersuchungsgruppe durchführbar.

Um jedoch Fehler erster und zweiter Art durch das multiple Testen der Einzeltestverfahren zu reduzieren, erfolgte für statistisch signifikante Ergebnisse ergänzend eine Adjustierung auf multiples Testen nach Bonferroni.

Für die Beziehungen klinischer Einflussfaktoren (Neuroleptika-Tagesdosis, Biperiden-Tagesdosis, Rezidivrate, Erstmanifestationsalter, aktuelles Alter und Raucherjahre) mit der Ausprägung von Nebenwirkungen und der Zusammenhang der Nebenwirkungen zueinander wurde die Spearman-Rang-Korrelationsanalyse (r-Wert = Spearman-Rangkorrelationskoeffizient) durchgeführt.

r-Wert:	$r = +/-0,2$	betragsmäßig $<0,2$, sehr geringe Korrelation
	$r = +/-0,5$	betragsmäßig $<0,5$, geringe Korrelation
	$r = +/-0,7$	betragsmäßig $<0,7$, mittlere Korrelation
	$r = +/-0,9$	betragsmäßig $<0,9$, starke Korrelation
	$r = +/-1,0$	betragsmäßig $<1,0$, sehr starke Korrelation