

## 4. Material und Methoden

### 4.1. Ethikantrag

Die Studie wurde vom Ethikkomitee des Universitätsklinikums Benjamin Franklin der Freien Universität Berlin genehmigt. Alle Teilnehmer wurden über die Untersuchung aufgeklärt und haben ihr schriftliches Einverständnis gegeben.

### 4.2. Untersuchungsablauf

Die Untersuchung wurde zusammen mit anderen Studien unter dem Arbeitstitel "Schizophrenie und dopaminerges System" an der Psychiatrischen Klinik und Poliklinik des Universitätsklinikums Benjamin Franklin der Freien Universität Berlin durchgeführt.

Die Studie besteht aus zwei Teilen. Im ersten Teil wird die Ableitung der akustisch evozierten N100 Amplitude mit Hilfe des Oddball-Paradigmas bei gesunden Probanden und schizophrenen Patienten durchgeführt. Der zweite Teil besteht aus der Ermittlung der (CA)<sub>n</sub> Dinukleotidsequenzen bei den untersuchten Personen durch das Max-Dellbrück-Zentrum Berlin.

Die Studie lief bei allen Teilnehmern in gleicher Weise ab:

1. Aufklärung der Probanden/Patienten und Unterzeichnung einer Einverständniserklärung
2. Ausfüllen eines demographischen Fragebogens
3. EEG Ableitung:
  1. Ruhe EEG 10 min
  2. Wahlreaktionsparadigma 5 min
  3. Oddball-Paradigma 12 min
  4. Kognitionstest 25 min
4. Blutabnahme

5. Probanden und Patienten wurden von einem psychiatrischen Facharzt der Klinik in einem Gespräch auf die Verwendung zur Studie überprüft.

#### 4.2.1. Patienten und Probanden

Es wurden insgesamt 347 Personen in der Studie untersucht. Darunter befanden sich 98 schizophrene Patienten und 249 gesunde Probanden.

##### Schizophrene Patienten:

Die 98 Patienten wurden nach der Diagnose F20 (ICD10) von den Stationen und der Ambulanz der Psychiatrischen Klinik und Poliklinik des Universitätsklinikums Benjamin Franklin ausgewählt. Von den schizophrenen Patienten waren zum Zeitpunkt der EEG-Aufnahme 78 stationär und 20 ambulant in Behandlung.

In der Patientengruppe befanden sich 24 Frauen und 74 Männer. Der Altersdurchschnitt der gesamten Gruppe betrug 32,4 Jahre  $\pm 10,4$  (Kapitel 5.2.). Dabei lag der Altersdurchschnitt der Frauen bei 34,5 Jahren  $\pm 10$  und der der Männer bei 31,7 Jahren  $\pm 10,5$ . Ausschlusskriterien waren weitere psychiatrische Erkrankungen, schwerwiegende somatische Erkrankungen, Rauschmittelabusus, Schädeltraumata und Hörstörungen.

##### Gesunde Probanden:

Die 249 gesunden Probanden wurden über Anzeigen in verschiedenen Berliner Zeitungen (Zweite Hand; Berliner Zeitung; Berliner Morgenpost; Zitty; Tagesspiegel) angesprochen. Es erfolgte eine Voruntersuchung mit Hilfe einer Telefoncheckliste. Durch diese Verfahrensweise konnten im voraus ungefähr 80 Prozent der Anrufer ausgeschlossen werden. Die Ausschlusskriterien dafür waren ähnlich wie bei den Patienten. Zusätzlich wurden alle

Teilnehmer mit dem M.I.N.I.-S.C.I.D. (Sheehan et al. 1998) überprüft.

Kam es zu einer Teilnahme und Untersuchung des Probanden, wurde er mit 25 Euro für seinen Aufwand entschädigt.

In der Probandengruppe befanden sich 120 Frauen und 129 Männer. Der Altersdurchschnitt in der gesamten Gruppe der gesunden Probanden betrug 41 Jahre  $\pm 15,3$  (Kapitel 5.2.). Dabei lag der Altersdurchschnitt der Frauen bei 41,3 Jahren  $\pm 16,7$  und der der Männer bei 40,7 Jahren  $\pm 13,9$ .

#### 4.2.2. Ableitung und Auswertung der akustisch evozierten N100 Amplitude

Die EEG Ableitung fand in einem schalldichten und elektromagnetisch abgeschirmten Raum statt. Die Probanden/Patienten wurden angewiesen, ihre Augen zu schließen, sich zu entspannen aber nicht einzuschlafen. Die Ableitung erfolgte mit Hilfe von 32 Elektroden nach dem erweiterten 10-20 System (Kapitel 9.2.). Die Elektroden A1 und A2 wurden auf dem linken sowie rechten Mastoid befestigt. Die Cz Elektrode diente als Referenzelektrode und eine Elektrode 2 cm rostral von der Fz Elektrode angebracht als Erde. Eine 1 cm lateral des linken Auges positionierte Elektrode diente zum Ausschluss von störenden Augenbewegungen. Sämtliche Elektroden wurden so angepasst, dass ihre Impedanz unterhalb von 10 k $\Omega$  lag.

Für die Ableitung wurde der Verstärker "SynAmps Modell 5083" mit einer Abtastrate von 500 Hz verwendet.

Als Aufnahmeprogramm diente der "Brain Vision Datamanager" (Version 0.91).

Die EEG Aufnahme begann mit dem Ruhe EEG. Durch das Ruhe EEG sollten ein fehlerhafter Sitz der Elektroden und grobe pathologische Veränderungen des EEGs ausgeschlossen werden. An zweiter und vierter Stelle standen EEG Aufnahmen, die nicht für

die vorliegende Arbeit, sondern für andere Untersuchungen verwendet wurden. Deshalb soll hier nicht näher darauf eingegangen werden.

Die für uns relevante Ableitung fand an dritter Stelle in Form eines üblichen auditorischen Oddball-Paradigmas für 12 min statt. Dabei wurden in pseudorandomisierter Form häufige Nontargets (175 Doppelklicktöne mit einem Interstimulusintervall von 500 ms) und seltene Targets (55 Sinustöne bei 1000 Hz, 83 dB und 40 ms Dauer einschließlich 10 ms An- und Abfallzeit) über Kopfhörer vorgespielt, wobei auf letztere mit einem Knopfdruck reagiert werden musste. Das Interstimulusintervall zwischen Targets und Nontargets betrug 1,5 bis 4,6 s.

Die EEG Rohdaten wurden mit Hilfe des "Vision Analyser" (Version 1.03.0002) ausgewertet. Hierbei erfolgte eine digitale Filterung im Frequenzbereich von 0,16 bis 30 Hz. Es wurden die mit Hilfe der im linken Augenwinkel platzierten Elektrode ermittelten Augenartefakte in den EEG Aufnahmen detektiert und ausgesondert. Außerdem wurden nur beantwortete Targets mit einbezogen. Weiterhin wurde mit Hilfe eines Notch-Filters die Frequenz von 50 Hz herausgefiltert, die durch die Netzfrequenz entsteht. Aus dem bis dahin kontinuierlichen EEG wurden nun 1150 ms lange Segmente herausgeschnitten, welche von 350 ms vor bis 800 ms nach dem auslösenden Reiz reichten. Mit Hilfe einer Baselinekorrektur, bei der der Mittelwert aller Potentiale im Zeitintervall berechnet wurde, konnte eine Nulllinie bestimmt werden. Alle Segmente, bei denen Amplituden von  $\pm 100 \mu\text{V}$  vorkamen, wurden ebenfalls aus der Wertung genommen. Schließlich mussten mindestens 30 Zielsegmente verbleiben, um in die Untersuchung mit einzugehen.

Die so ermittelten Zielsegmente wurden für alle Elektroden mit Hilfe des Rechners gemittelt.

Die N100 Amplitude wurde für die Ableitungen Fz und Cz, welche für die vorliegende Untersuchung relevant sind, unter visueller Kontrolle in einem Zeitfenster von 80 bis 180 ms nach Einspielen

der Targets bestimmt und hinsichtlich Latenz und Amplitude vermessen.

#### 4.2.3. Blutabnahme

Es wurden im Anschluss an die elektrophysiologischen Untersuchungen fünf Röhrchen (BD Vacutainer™ K2E 5,4 mg, BD Vacutainer Systems) mit dem Venenpunktionsbesteck (Butterfly<sup>R</sup> - 19, Venisystem™) entnommen und sofort danach bis zur weiteren Verarbeitung tiefgefroren.

#### 4.2.4. Genotypisierung

Die genomische DNS unserer entnommenen Blutproben wurde mit Standardmethoden extrahiert (Miller et al. 1988). Der (CA)<sub>n</sub> Dinukleotid-Polymorphismus im Intron 2 des DRD2 Rezeptorgens wurde gemäß Protokoll von Hauge et al. (1991) ermittelt. Die verwendeten Primer für die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) waren 5'-FAM-GGAGGGCGGTGCGGTCAT-3' und 5'-CAGGAGCACGTTTCTCATA-3'. Von jeder Probe wurden 4 ng der aufgearbeiteten genomischen DNS entnommen und auf einer 384 Loch fassenden Mikrotiterplatte getrocknet. Die Vervielfachung der Zielsequenz wurde in einem Gene Amp PCR Thermocycler durchgeführt. Der Reaktionsansatz umfasste ein Volumen von 6 µl, welches 10 mmol Tris-HCl (pH 8.3), 50 mmol KCl, 1.5 mmol MgCl<sub>2</sub>, 0.001% Gelatine, 100 mmol jedes dNTPs, 0,12 Einheiten Taq Polymerase (Invitrogen) und 75 nmol von jedem Primer umfasste. Die initiale Denaturierung erfolgte bei 95°C für 5 Minuten. Dann folgten 35 Zyklen mit Temperaturen von 94°C für 30 Sekunden (Denaturierung), 55°C für 45 Sekunden (Annealing) und 72°C für 60 Sekunden (Extension). Am Ende wurde die Temperatur über 20 Minuten bei 72°C gehalten, um eine komplette Synthese der PCR-Amplifikate zu erzielen. Die

vervielfältigten Fragmente wurden mit dem automatischen ABI 3700 Sequenzer getrennt und die Fragmentlängen mit Hilfe von Längenstandards ermittelt. Die Fragmentlängen der PCR-Amplikate wurden mit Hilfe des Programms "GENESCAN" (Version 2.2) dargestellt. Die Allel-Bestimmung erfolgte mit der GENOTYPER Software (Version 2.0). Die Genotypisierung wurde von zwei unabhängigen Untersuchern durchgeführt, welche keine Kenntnis von den elektrophysiologischen Daten hatten.

#### 4.3. Statistische Berechnungen

Die statistischen Berechnungen erfolgten mit SPSS für Windows (Release 11.0). Gruppenvergleiche zwischen Probanden und Patienten wurden mit dem  $\chi^2$  Test und einem T-Test für unabhängige Stichproben erhoben. Gruppenvergleiche innerhalb der verschiedenen Genotypen wurden mit einfaktoriellen ANOVAs durchgeführt. Die Allelverteilung in der Gruppe der Gesunden und Kranken wurde mit dem Homogenitätstest nach Rao überprüft. Der Zusammenhang zwischen den Faktoren (CA)n-Dinukleotid-Genpolymorphismus des DRD2-Rezeptorgens, Diagnose und Geschlecht sowie der Kovariate Alter gegenüber der abhängigen Variablen akustisch evozierte N100 Amplitude an Elektrode Fz und Cz wurde mit Hilfe einer MANOVA untersucht. Alle Tests wurden mit einer zweiseitigen Signifikanzgrenze von  $p < 0.05$  ausgeführt.