

**Aus der Klinik und Poliklinik für Psychiatrie und Psychotherapie  
der Ludwig-Maximilians-Universität München**

**Vorstand: Herr Prof. Dr. med. H.- J. Möller**

**Die Bedeutung von Neuregulin 1 in der Schizophrenie**

Dissertation  
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin  
an der Medizinischen Fakultät der  
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von  
Hans-Peter Zipp

aus  
Herborn

2005

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

Berichterstatter: Priv. Doz. Dr. med. D. Rujescu

Mitberichterstatter: Priv. Doz. Dr. med. H. Steiner  
Prof. Dr. med. H.A. Kretzschmar  
Prof. Dr. med. O.K. Steinlein

Dekan: Prof. Dr. med. D. Reinhardt

Tag der mündlichen Prüfung: 14.04.2005

*>> Die Dinge sind nie so wie sie sind.*

*Sie sind immer das, was man aus ihnen macht <<*

Jean Anouilh

*meinen Eltern gewidmet*



## Inhaltsverzeichnis

<b><u>1</u></b>	<b><u>Einleitung</u></b>	<b>1</b>
<b><u>1.1</u></b>	<b><u>Die Schizophrenie</u></b>	<b>1</b>
1.1.1	<u>Definition</u>	1
1.1.2	<u>Epidemiologie</u>	1
1.1.3	<u>Symptomatik</u>	2
1.1.4	<u>Verlauf und Prognose</u>	3
1.1.5	<u>Ätiologie</u>	5
<b><u>1.2</u></b>	<b><u>Genetik in der Schizophrenie</u></b>	<b>6</b>
1.2.1	<u>Familien-, Adoptions- und Zwillingsstudien</u>	7
1.2.2	<u>Molekulargenetik</u>	8
1.2.3	<u>Kopplungsstudien</u>	10
1.2.4	<u>Assoziationsstudien</u>	11
<b><u>1.3</u></b>	<b><u>Neuregulin 1 in der Schizophrenie</u></b>	<b>13</b>
1.3.1	<u>Entdeckung und Definition von Neuregulin 1</u>	13
1.3.2	<u>Aufbau und Isoformen von Neuregulin 1</u>	13
1.3.3	<u>Funktionen von Neuregulin 1</u>	16
1.3.4	<u>Mechanismen der Signaltransduktion durch Neuregulin 1</u>	18
1.3.5	<u>Verbindungen von Neuregulin 1 zur Pathophysiologie der Schizophrenie</u>	22
1.3.6	<u>Suszeptibilitätsprüfung in Analysen von Einzel Nukleotid Polymorphismen und Haplotypen</u>	27
<b><u>1.4</u></b>	<b><u>Fragestellung</u></b>	<b>31</b>
<b><u>2</u></b>	<b><u>Material und Methoden</u></b>	<b>32</b>
<b><u>2.1</u></b>	<b><u>Vorbedingungen der Studiendurchführung</u></b>	<b>32</b>

<b><u>2.2</u></b>	<b><u>Studienteilnehmer</u></b>	32
2.2.1	<u>Kontrollen</u>	32
2.2.2	<u>Patienten</u>	33
<b><u>2.3</u></b>	<b><u>DNA-Extraktion</u></b>	35
<b><u>2.4</u></b>	<b><u>Bestimmung der DNA-Konzentration</u></b>	36
<b><u>2.5</u></b>	<b><u>Genotypisierung</u></b>	37
<b><u>2.6</u></b>	<b><u>Statistische Auswertung</u></b>	40
<b><u>3</u></b>	<b><u>Ergebnisse</u></b>	<b>41</b>
<b><u>3.1</u></b>	<b><u>Analyse des Markers rs3924999 des Neuregulin 1 Gens</u></b>	41
3.1.1	<u>Allelverteilung</u>	41
3.1.2	<u>Genotypverteilungen</u>	42
<b><u>3.2</u></b>	<b><u>Analyse des Markers rs2954041 des Neuregulin 1 Gens</u></b>	43
3.2.1	<u>Allelverteilung</u>	43
3.2.2	<u>Genotypverteilungen</u>	44
<b><u>3.3</u></b>	<b><u>Analyse des Markers SNP8NRG221533 des Neuregulin 1 Gens</u></b>	46
3.3.1	<u>Allelverteilung</u>	46
3.3.2	<u>Genotypverteilungen</u>	46
<b><u>3.4</u></b>	<b><u>Analyse des Kopplungsungleichgewichtes zwischen den untersuchten Polymorphismen des Neuregulin 1 Gens</u></b>	48
<b><u>3.5</u></b>	<b><u>Analyse der Assoziation der Haplotypen</u></b>	49
<b><u>4</u></b>	<b><u>Diskussion</u></b>	<b>50</b>
<b><u>4.1</u></b>	<b><u>Übersicht zu den experimentellen Befunden</u></b>	50

<b><u>4.2</u></b>	<b><u>Diskussion der Ergebnisse im Horizont der Literatur</u></b>	<b>50</b>
4.2.1	<u>Überblick zu Design und Resultaten von Referenzstudien</u>	51
4.2.2	<u>Vergleich der Ergebnisse der untersuchten Einzelmarker und Haplotypen mit der primären Referenzstudie</u>	61
4.2.3	<u>Abschließende Beurteilung der Ergebnisse der untersuchten Einzelmarker und Haplotypen im Kontext der Literatur</u>	64
4.3	<u>Ausblick auf zukünftige Untersuchungen</u>	69
<b><u>5</u></b>	<b><u>Zusammenfassung</u></b>	<b>72</b>
<b><u>6</u></b>	<b><u>Abkürzungen und Fachbegriffe</u></b>	<b>74</b>
<b><u>7</u></b>	<b><u>Literaturverzeichnis</u></b>	<b>77</b>
<b><u>8</u></b>	<b><u>Danksagung</u></b>	<b>94</b>
<b><u>9</u></b>	<b><u>Lebenslauf</u></b>	<b>96</b>

# **1 Einleitung**

## **1.1 Die Schizophrenie**

### **1.1.1 Definition**

Die Schizophrenie gehört in die Hauptgruppe endogener Psychosen und repräsentiert eine der schwerwiegendsten psychiatrischen Erkrankungen. Kennzeichnend ist eine Vielgestaltigkeit an Symptomatologie, Neuropathologie und Verlauf. Es wird eine multifaktorielle Entstehung der Erkrankung angenommen, wobei genetische Faktoren als wichtige Teilursache angesehen werden.

### **1.1.2 Epidemiologie**

Die Wahrscheinlichkeit im Laufe des Lebens an Schizophrenie zu erkranken, beträgt für die Durchschnittsbevölkerung etwa 1 %. Die Lebenszeitprävalenz liegt weltweit bei 0.5 bis 1 %, die jährliche Inzidenzrate bei 0.05 % (Möller et al. 2001). Es finden sich in unterschiedlichen Ländern der Welt mit variierendem soziokulturellem Hintergrund etwa gleiche Prävalenzzahlen (Tsuang et al. 1995). In einer Metaanalyse zu Geschlechterdifferenzen im globalen Risiko einer Schizophrenieentwicklung fand sich über alle einbezogenen Studien eine Inzidenzratio von 1.4 bei Überwiegen von Frauen (Aleman et al. 2003). Das Prädilektionsalter für den Ausbruch der Erkrankung liegt zwischen 18 und 30 Jahren. Das mittlere Ersterkrankungsalter von Männern bewegt sich mit 21 Jahren drei bis vier Jahre unterhalb dem von Frauen (Häfner et al. 1998). Es gibt auch charakteristische Unterschiede im Prädilektionsalter für die einzelnen Subtypen. So tritt zum Beispiel der hebefrene Subtyp vorwiegend im Jugendalter, der paranoid-halluzinatorische Subtyp überwiegend im vierten Lebensjahrzehnt auf (Möller et al. 2001).

### 1.1.3 Symptomatik

Für die Diagnostik der Schizophrenie und zur Kategorisierung der vielschichtigen Symptomatik waren historisch unterschiedliche Einteilungsmodelle bedeutsam. Bereits Emil Kraepelin fasste 1896 in seiner ersten Beschreibung die Erscheinungsbilder der Schizophrenie unter dem Begriff *Dementia praecox* zusammen und nahm die Einteilung in die Subtypen paranoid-halluzinatorisch, hebephren und kataton in Abhängigkeit von vorherrschender Symptomatik und Verlauf vor. Von Eugen Bleuler wurde mit stärkerem Bezug auf das psychopathologische Querschnittsbild die Bezeichnung *Schizophrenie* (Bewußtseinsspaltung) geprägt und die Einteilung in Grundsymptome und akzessorische Symptome entwickelt (Bleuler 1911). Nach seiner Ansicht gehörten zu den Grundsymptomen Assoziations- und Affektstörungen, Autismus und Ambivalenz, zu den akzessorischen Störungen Halluzinationen, Wahn und Katatonie. Die später etablierte Lehre Kurt Schneiders von den Symptomen ersten und zweiten Ranges orientierte sich an der unterschiedlichen diagnostischen Wertigkeit einzelner Symptome aus den abnormen Erlebniskategorien Halluzinationen, schizophrene Ich-Störungen und Wahn (Schneider 1957).

Seit den siebziger Jahren wird die Unterscheidung schizophrener Psychosen mit positiven und negativen Symptomen vorgenommen. Nach der von Kay et al. 1987 entwickelten Positiv- und Negativ-Syndrom Skala (PANSS) zählen zu den positiven Symptomen Wahn, Größen- und Verfolgungsideen, Halluzinationen, formale Denkstörungen, Erregung und Feindseligkeit. Demgegenüber umfassen die negativen Symptome Affektverflachung, Mangel an affektivem Rapport sowie an Spontanität und Flüssigkeit der Sprache, Schwierigkeiten beim abstrakten Denken, stereotype Gedanken, soziale Passivität und emotionalen Rückzug. Zu den charakteristischen Symptomen gelten nach Möller und Deister Wahn, Halluzinationen, Störungen im formalen Denken und Affekt sowie Ich- und psychomotorische Störungen (Möller und Deister 2000).

Aktuell anerkannt sind die Klassifikationssysteme *International Classification of Diseases, Tenth Edition (ICD-10)*, und *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, Fourth Edition (DSM-IV)*, (Bramer 1988, Wittchen et al. 1996). Die von der Weltgesundheitsorganisation herausgegebene Klassifikation nach der ICD-10 umfasst die sieben klinischen Syndrome einer paranoiden, hebephrenen, katatonen und undifferenzierten Schizophrenie sowie die postschizophrene Depression, das schizophrene Residuum und die Schizophrenia simplex. Das amerikanische Diagnosesystem DSM-IV, an dem sich auch die Patientenrekrutierung in dieser Arbeit orientierte, unterscheidet die fünf Haupttypen paranoid, kataton, desorganisiert, undifferenziert und residual. ICD-10 und DSM-IV legen die Diagnose der Schizophrenie durch einen Kriterienkatalog fest. Die Tabelle 1 gibt diesen Katalog in modifizierter Form wieder und zeigt die Überlappungsbereiche an (Möller et al. 2001).

Tab.1: Diagnostische Kriterien der Schizophrenie nach ICD-10 und DSM-IV gemäß der Zusammenstellung von Möller et al. 2001

ICD-10	DSM-IV
Kontrollwahn, Beeinflussungswahn, Wahnwahrnehmung	Wahn, besonders bizarrer Wahn
Halluzinationen, besonders kommentierende und dialogisierende Stimmen	stimmungsinkongruente Halluzinationen, besonders kommentierende oder dialogisierende Stimmen
Gedankenlautwerden,-eingebung,-entzug, Beeinflussungserlebnisse, Zerfahrenheit, Gedankenabreissen u.a.	Zerfahrenheit
katatone Symptome	katatone Symptome
negative Symptome wie Apathie, Sprachverarmung, verflachter Affekt	Affektarmut, Antriebsmangel, sozialer Rückzug
	Verschlechterung der sozialen Adaptation
charakteristische Symptomatik mindestens 1 Monat	kontinuierliche Anzeichen der Erkrankung mindestens 6 Monate
keine nachweisbare organische Ursache	keine nachweisbare organische Ursache

#### 1.1.4 Verlauf und Prognose

Die Schizophrenie erweist sich bezüglich ihres Verlaufes überwiegend als schwerwiegende psychiatrische Erkrankung. Das Vollbild der Schizophrenie kann akut auftreten oder sich schleichend entwickeln. Es kann eine Phase mit untypischen Prodromalerscheinungen, z.B. ein pseudoneurasthenisches oder

depressives Vorstadium, vorausgehen. Die akuten Manifestationen dauern Wochen bis Monate an. Die Krankheit kann in Schüben mit Ausbildung einer Restsymptomatik oder in Phasen mit vollständiger Remission verlaufen. Bei einem geringen Prozentsatz der Betroffenen chronifiziert eine produktiv-schizophrene Symptomatik und bleibt zeitlebens bestehen. Ein wesentlich größerer Teil bildet einen Residualzustand aus, der vorwiegend durch Negativsymptomatik mit unterschiedlich starker Beimischung produktiver Symptome geprägt ist. Es ergibt sich folgende Häufigkeitsverteilung der unterschiedlichen Verlaufstypen: eine anhaltende Symptomatik tritt in mehr als zwei Drittel der Fälle bereits nach der ersten Episode, bei etwa 20 % dagegen erst im späteren Verlauf auf. Nur knapp 7 % der Patienten bleiben langfristig ohne persistierende Symptome (Marneros et al. 1991).

Nach dem Abklingen akuter Episoden können postschizophrene Depressionen oder Erschöpfungszustände auftreten, die aber im Gegensatz zum chronischen Residuum nach einigen Wochen oder Monaten wieder abklingen. Im Rahmen der akuten Erkrankung, in der Remission und im Residualzustand kann es zu suizidalen Krisen kommen.

Auch wenn sich sowohl ungünstige als auch günstige Prognosemerkmale herausfinden ließen, ist eine verlässliche Einschätzung der Prognose im Einzelfall bei Beginn der Symptomatik unmöglich. Insgesamt scheint der hebephrene Subtyp eher mit einem ungünstigen und der katatone Subtyp mit einem günstigen Verlauf assoziiert zu sein (Möller et al. 2001). Eine grobe klinische Faustregel besagt zwar, dass die Prognose umso günstiger ist, je akuter der Erkrankungsbeginn ist und je deutlicher situative Auslöser vorliegen, eine genaue perspektivische Einschätzung lässt sich damit aber nicht vornehmen.

Durch die heutigen Behandlungsmöglichkeiten ist die Prognose wie zu erwarten günstiger als es noch Kraepelin in seiner Beschreibung der *Dementia praecox* fand. Die verfügbare Medikation vermag den Patienten nunmehr einige der Symptome zu erleichtern, allerdings gelingt damit keine Heilung der Schizophrenie. Bis heute nimmt die Krankheit noch bei mehr als 50 % der Betroffenen einen ungünstigen Verlauf mit Rezidiven und Residualsymptomatik sowie erheblichen Störungen der sozialen Integration (Möller et al. 2001).

### 1.1.5 Ätiologie

Die Ursachenforschung zur Schizophrenie hat eine über hundertjährige Tradition. Eine familiäre genetische Belastung gilt als gesicherter Risikofaktor für eine Schizophrenieentwicklung (Gottesman et al. 1987, Cardno et al. 1999). Risiken werden auch aus sozialen und demographischen Faktoren wie einem niedrigen sozioökonomischen Status, einer Geburt im städtischen Umfeld, stresserfüllten Lebensereignissen sowie dem Status von Zuwanderern oder Minderheiten abgeleitet (Eaton 1974, Harrison et al. 1997, Eaton et al. 2000, van Os et al. 2000). Die jahreszeitliche Verteilung des Geburtsdatums schizophrener Personen ergibt eine überzufällige Häufung im späten Winter und Frühjahr (Hettema et al. 1996). Auch Komplikationen in der Schwangerschaft, bei und unmittelbar nach der Geburt stellen Risikofaktoren dar (Hultman et al. 1997, Cannon et al. 2002).

Nach dem momentanen Verständnis entwickelt sich die Erkrankung auf der Basis einer multifaktoriellen Ätiopathogenese. Hierbei wird die anteilige Einbeziehung verschiedener Ursachen mit im Einzelfall differierenden Wechselwirkungen verlangt. Eine schematische Zusammenstellung bietet Abbildung 1, Seite 6, in Anlehnung an verschiedene konzeptionelle Vorgaben (Scharfetter 1995, Deister und Möller 1997, Möller et al. 2001). Aus genetischen Faktoren, die mit Umweltvariablen eine wechselseitige Beeinflussung unterhalten, können z.B. hirnstrukturelle, neurophysiologische und/oder biochemische Besonderheiten entstehen. Daraus resultiert im Sinne einer erhöhten Vulnerabilität eine Prädisposition zur Manifestation der Krankheit, wobei ungünstige psychosoziale Stressoren und Persönlichkeitsstrukturen die Manifestation erleichtern.

Aus variablen Kombinationseffekten von genetischen und exogenen Faktoren ergibt sich somit die Krankheitsmanifestation, wobei nach einer Modellvorstellung die Überschreitung einer multifaktoriellen Schwelle letztlich zur Auslösung der Erkrankung führt (Sawa und Snyder 2002).

## Einleitung

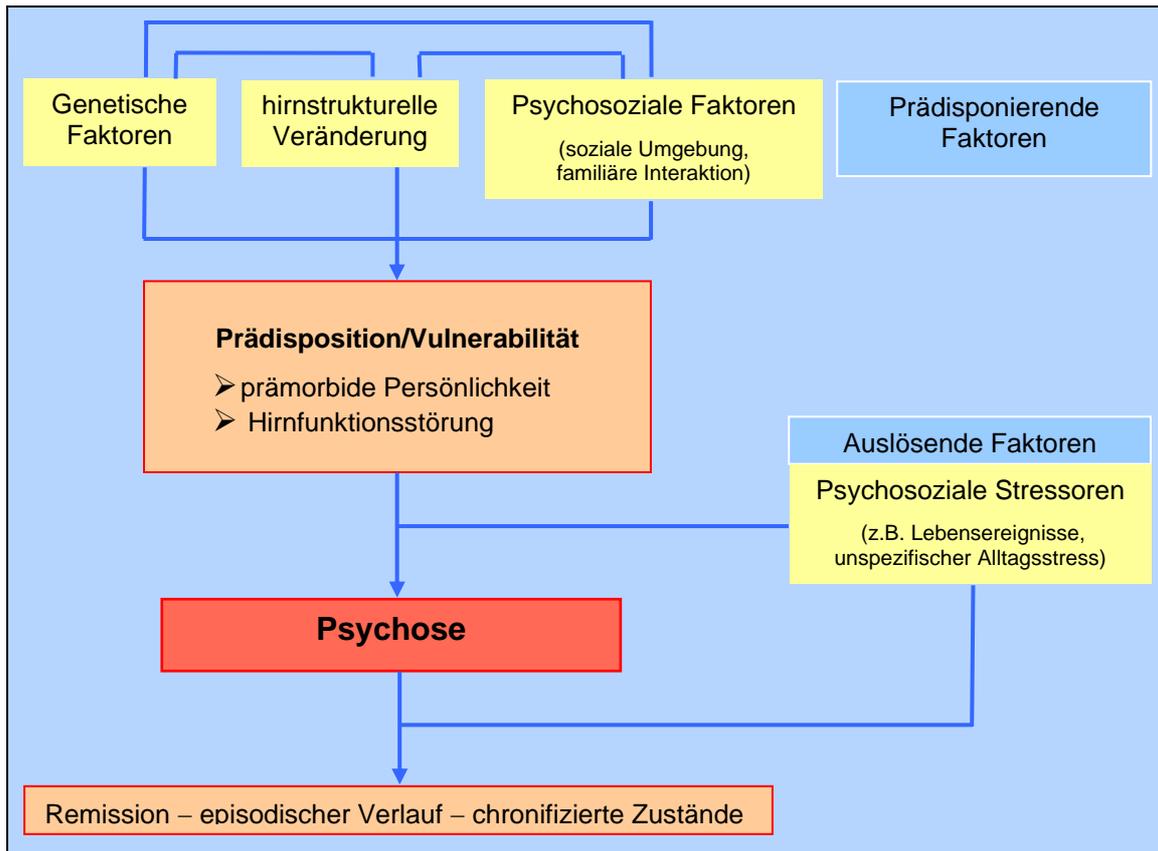


Abb.1: Schematisches Modell zur Ätiopathogenese der Schizophrenie mit Einbezug der Darstellung nach Scharfetter 1995 und des Konzeptes nach Deister und Möller 1997

## 1.2 Genetik in der Schizophrenie

Familien-, Zwillings- und Adoptionsstudien belegen die starke genetische Komponente der Schizophrenie (Cardno et al. 1999, Tsuang et al. 2001, Cloninger 2002). Die Krankheit zeigt ein komplexes Vererbungsschema und niedrige Penetranz. Intrafamiliär wird ein qualitativ heterogener, quantitativ variierender Phänotyp übertragen. Es gibt noch keinen verlässlichen biologischen Marker für die Erkrankung. Die Variationen der Manifestation der Schizophrenie lassen sich durch eine Heterogenität der kausalen Loci erklären und erschweren den Fortschritt bei der Suche nach Schizophreniegenen. Die Anwendung der verfügbar gewordenen molekulargenetischen Techniken zur Identifikation der verantwortlichen Gene stellt jedoch die derzeit erfolgversprechendste Strategie dar (Maier und Schwab 1999). Die Kenntnis verantwortlicher Gene würde auch die Aufdeckung von zusätzlichen Risikofaktoren und kausalen pathogenen Mechanismen erleichtern.

### **1.2.1 Familien-, Adoptions- und Zwillingsstudien**

Das Risiko für die Krankheitsentwicklung erhöht sich mit zunehmender genetischer Verwandtschaft (McGuffin et al. 1995). Das Risiko nimmt von 1 % in der allgemeinen Bevölkerung bei Verwandten dritten Grades auf ca. 2 %, Verwandten zweiten Grades auf ca. 6 % und schließlich bei Verwandten ersten Grades bis auf 9 % zu (Tsuang et al. 2001). Für den letztgenannten Verwandtschaftsgrad liegt die Schwankungsbreite der Risikoerhöhung zwischen 5 bis 15-fach im Vergleich zu dem allgemeinen Bevölkerungsdurchschnitt (Kendler und Gardner 1997). Da in Zwillings- und Adoptionsstudien keine Hinweise auf relevante familiäre nichtgenetische Umgebungsfaktoren zu finden sind, ist die familiäre Häufung vorwiegend auf genetische Faktoren zurückzuführen (Maier et al. 1999).

Zwillingsstudien vergleichen die Konkordanz von monozygoten Zwillingen, bei denen eine vollständige genetische Identität vorliegt, mit der von zweieiigen Zwillingen, die nur ungefähr 50 % ihrer Gene teilen. In der Literatur finden sich Angaben der Konkordanzraten von monozygoten Zwillingen um 41 bis 65 % verglichen mit 0 bis 28 % bei dizygoten Zwillingen und die Schätzungen der Heritabilität reichen bis zu 85 % (Tsuang et al. 2001). Dies kann als weiteres Indiz für die starke genetische Rolle bei der Schizophrenieentstehung gewertet werden.

Andererseits wird der Beitrag nichtgenetischer Einflüsse aus der durchschnittlich nur 50 %igen Konkordanz für Schizophrenie bei eineiigen Zwillingen ersichtlich. Monozygote Zwillinge haben bedingt durch ihre gemeinsame Plazenta die gleiche pränatale Umgebung und intrauterinen Variablen (Reiss et al. 1991). Sie teilen vergleichend zu dizygoten in stärkerem Ausmaß auch eine postnatale Umgebung, sehen sich besonders ähnlich und sind gleichgeschlechtlich. Daraus ergibt sich die Überlegung, dass sie auch aus ihrer Umgebung, z.B. durch die Eltern, in ähnlicherer Weise Reaktionen erfahren und eventuelle Persönlichkeitsunterschiede möglicherweise nivelliert werden.

Adoptionsstudien stellen die geeignetste Methode zur Trennung von genetischen und umweltbedingten Faktoren dar. Sie liefern Hinweise für die Gewichtung der Genetik bei einer familiären Häufung der Schizophrenie. Kinder ohne genetische Prädisposition, welche früh in eine Familie mit schizophrenem Elternteil adoptiert wurden, wiesen kein gesteigertes Risiko der Schizophrenieentwicklung auf. Demgegenüber behielten früh adoptierte Kinder mit an Schizophrenie erkrankten leiblichen Eltern auch in einer Familie mit gesunden Adoptiveltern ihr erhöhtes Erkrankungsrisiko bei (Kendler et al. 1994, Kety et al. 1994).

Die klinischen Subtypen zeigen kein reproduzierbar homogenes intrafamiliäres Vorkommen (Kendler und Diehl 1993). Ihnen liegen qualitativ unterschiedliche familiär-genetische Ursachen zugrunde. Allerdings variiert das Ausmaß der familiären Belastung quantitativ mäßiggradig mit der Querschnittssymptomatik (Maier et al. 1999). So wurde in Familienstudien nachgewiesen, dass insbesondere Betroffene mit ausgeprägter Negativsymptomatik familiär mit psychotischen Störungen belastet sind (Kendler et al. 1995, van Os et al. 1997). Diese Aussage gilt überwiegend für Schizophrene, die sowohl positive wie negative Symptome aufweisen. Hohe Konkordanzraten wurden vor allem bei eineiigen Zwillingen beobachtet, bei denen der Indexpatient eine ausgeprägte schizophrene Negativsymptomatik mit einer langen Episodendauer aufwies (Kendler und Diehl 1993).

### **1.2.2 Molekulargenetik**

Die Daten von Familien-, Zwillings- und Adoptionsstudien verdeutlichen die substantielle genetische Komponente der Schizophrenie. Der molekulargenetische Mechanismus der Krankheit ist weitgehend unklar, sicher ist lediglich, dass ihr Vererbungsmuster nicht den Mendelschen Regeln folgt (McGue und Gottesman 1989). Das momentan plausibelste formalgenetische Modell gründet sich auf die Annahme einer polygenen Übertragung unter Einbeziehung verschiedener Gene, die im Einzelnen jeweils vermutlich nur eine geringe Auswirkung auf das Erkrankungsrisiko haben, und deren Interaktion mit

Umweltfaktoren anzunehmen ist (Maier et al. 1999, Owen 2000). Verursachend für das Auftreten sind wahrscheinlich mehrere Mutationen an verschiedenen Genorten gleichzeitig, die im Sinne einer genetischen Heterogenität das gleiche Merkmal, also Schizophrenie, hervorrufen können. Die resultierenden, ätiologisch unterschiedlichen, möglichen Varianten lassen sich derzeit nicht mit klinischen Mitteln unterscheiden.

Etwa drei Millionen der drei Milliarden humanen Nukleotidbasen unterscheiden sich zwischen Individuen, wobei die meisten Mutationen nicht in den Exons, die schließlich in Proteine umgesetzt werden, sondern in erster Linie in Introns sowie in solchen Desoxyribonukleinsäure (DNA)-Regionen vorkommen, die nicht in messenger Ribonukleinsäure (m-RNA) transkribiert werden (Plomin et al. 1999). Handelt es sich bei den Mutationen um einen einzelnen Basenaustausch werden sie als *Single Nucleotide Polymorphism* (SNP) bezeichnet. Von den SNPs, die ca. 90 % der genetischen Heterogenitäten des Menschen bedingen, sind bis dato bereits Millionen ([http://snp.cshl.org/linkage\\_maps/](http://snp.cshl.org/linkage_maps/)) identifiziert und präzise chromosomalen Regionen zugeordnet worden. Zusammen mit einem anderen Markertyp, den Mikrosatelliten (<http://www.cidr.jhmi.edu/markerset.html>), stand damit eine aussagekräftige methodische Grundlage zur Ermittlung von Krankheitsgenen zur Verfügung.

Bei der Schizophrenie sind nach wie vor die genaue Anzahl prädisponierender Genorte, das von jedem Genlokus übertragene anteilige Risiko und der Grad der Wechselwirkung zwischen den Genorten unbekannt. Hauptgene, die einen größeren Beitrag als andere leisten, konnten bisher nicht identifiziert werden. Zu Entdeckung oder Einengung chromosomaler Regionen, in denen sich funktionell bedeutsame DNA-Varianten befinden, bieten sich zwei Ansätze an, die beide eine Abweichung vom Mendelschen Gesetz der unabhängigen Vererbung in differierender Weise messen. Eine Möglichkeit sind Kopplungsstudien, welche nicht auf bestimmten biologischen Hypothesen beruhen und im Rahmen von Familienstudien auf die Identifikation von chromosomalen Regionen mit prädisponierenden Genen abzielen. Andererseits kommen Assoziationsstudien zur Anwendung, welche genügend Sensitivität

zum Auffinden auch geringerer Geneffekte aufweisen, aber auf die Auswahl plausibler Kandidatengene angewiesen sind. Beide Methoden sind einander ergänzende Ansätze zur Identifikation von Suszeptibilitätsgenen für komplexe Erkrankungen.

### 1.2.3 Kopplungsstudien

Mit Kopplungsuntersuchungen wird getestet, ob innerhalb einer Familie ein Markerallel und ein Phänotyp respektive eine Krankheit überzufällig häufig zusammen vererbt werden, d.h. co-segregieren (Böddeker und Ziegler 2000). Die theoretische Grundlage dabei ist, dass eine dem Phänotyp zugrundeliegende DNA-Sequenz und ein Marker mit umso geringerer Wahrscheinlichkeit durch eine Rekombination voneinander getrennt werden, je näher sie auf einem Chromosom liegen.

Die Durchführung der ersten Kopplungsstudien basierte auf der Annahme, dass Gene mit einer Hauptwirkung identifizierbar seien. Mutationen mit Penetranz hinsichtlich einer klaren phänotypischen Manifestation sind aber vermutlich äußerst selten oder nicht vorhanden (McGuffin und Owen 1996). Als Konsequenz wurden gemeinschaftliche Anstrengungen zur Durchführung von systematischen Kopplungsanalysen über das gesamte Genom unternommen. 2003 wurden von Lewis et al. in einer groß angelegten Meta-Analyse die Daten von 20 genomweiten Kopplungsstudien mit über 1200 Stammbäumen zur Schizophrenie ausgewertet. Dabei fand sich eine größere Übereinstimmung der Ergebnisse bisheriger Kopplungsstudien als bislang angenommen. Diese Meta-Analyse konnte auch zur Bestätigung verschiedener Hinweise auf Kopplungen herangezogen werden, die sich aus der Betrachtung homogener oder isolierter Bevölkerungsgruppen an einer geringeren Anzahl von Stammbäumen ergaben. Die Autoren geben für den Genabschnitt p12-q22.1 auf Chromosom 2 eine genomweite signifikanteste Kopplung an. Starke Assoziationen erreichen die chromosomalen Loci 1p13.3-q23.3, 2q22.1-q23.3, 3p25.3-p22.1, 5q23.2-q34, 6pter-21.1, 8p22-p21.1, 11q22.3-q24.1, 14pter-q13.1, 20p12.3-p11 und 22pter-q12.3.

Die Meta-Analyse bestätigt die Hypothese, dass mehrere Genorte zur Suszeptibilität für Schizophrenie beitragen. Die Wertigkeit positiver Kopplungsbefunde ist allerdings erst dann abschließend beurteilbar, wenn sich gesicherte Zusammenhänge zwischen prädisponierenden Genen und der Krankheitsentwicklung finden lassen.

#### **1.2.4 Assoziationsstudien**

Die Attraktivität von Assoziationsstudien beruht darauf, dass sich auch Suszeptibilitätsgene mit geringerem krankheitsinduzierendem Effekt detektieren lassen. Zielsetzung dieser empfindlichen Methode ist, einen Zusammenhang von potentiell funktionell relevanten Genvarianten oder Haplotypen mit einem erhöhten Erkrankungsrisiko zu klären. Als Haplotyp wird eine, einem einzelnen individuellen Chromosom zuordenbare und an einer oder mehreren polymorphen Stellen lokalisierte, 5'- nach 3'-Sequenz von Nukleotiden bezeichnet. Ein Haplotyp kann für ein Gen, eine chromosomale Region oder auch für jedes lange DNA-Segment definiert sein.

Eine Assoziation liegt dann vor, wenn der spezifische genetische Marker in der untersuchten Population häufiger bei erkrankten als bei gesunden Personen vorkommt (Böddeker und Ziegler 2000).

Als Gene, die in Assoziationsstudien untersucht werden, kommen funktionelle und positionelle Kandidatengene in Frage. Bei funktionellen Kandidatengenen handelt es sich um solche, die sich aus Hypothesen über die Pathophysiologie der Schizophrenie ergeben. Positionelle Kandidatengene hingegen ergeben sich aus Kopplungsstudien, d.h. es werden Gene untersucht, die in chromosomalen Regionen liegen, die in Kopplungsstudien eine signifikante Assoziation mit der Schizophrenie aufwiesen.

Das Auffinden des Gens Neuregulin 1 (NRG1) und seine Bestätigung als Kandidatengen der Schizophrenie wurden in einer Abfolge von Kopplungs- und Assoziationsmethoden erreicht. In einem genomweiten Screening konnten Ergebnisse von Kopplungsstudien zur Schizophrenie auf Chromosom 8p an

einer isländischen Bevölkerungsgruppe bestätigt werden (Stefansson et al. 2002). Der gleichen Untersucherguppe gelang dann die Entdeckung verschiedenster Marker auf dem NRG1-Gen und die Bildung eines Haplotypen, der eine signifikante Assoziation mit der Schizophrenie zeigte.

Die Tabelle 2 bietet einen Überblick über die wichtigsten Assoziationsbefunde zur Schizophrenie mit den zugehörigen chromosomalen Regionen. Die Assoziationen haben größtenteils nur einen geringen Effekt bezüglich des Erkrankungsrisikos und können etablierte Kopplungsverweise nicht komplett bestätigen.

Tab.2: Auswahl von Suszeptibilitätsgenen der Schizophrenie mit zytogenetischer Lokalisation

Gen	Zytogenetische Lokalisation	Studien
DRD3	3q13	(Williams et al. 1998)
DRD2	11q23	(Breen et al. 1999)
COMT	22q11	(Shifman et al. 2002)
5-HT-2A	13q11	(Inayama et al. 1996, Williams et al. 1997)
NRG1	8p12-p21	(Stefansson et al. 2002, 2003)
DTNBP1	6p22	(Straub et al. 2002a, Schwab et al. 2003)
RGS4	1q21-22	(Chowdari et al. 2002)
PRODH	22q11	(Gogos et al. 1999, Liu et al. 2002)
DAAO	12q24	(Mothet et al. 2000, Chumakov et al. 2002)
G72	13q22-34	(Chumakov et al. 2002)
G30	13q22-34	(Chumakov et al. 2002)
Notch 4	6p23	(Wei und Hemmings 2000)
PPP3CC	8p21	(Gerber et al. 2003)
HTR4	5q31-q33	(Claeyssen et al. 1997, Cichon et al. 1998)
GRIA4	11q22	(Makino et al. 2003)
AKT1	14q32	(Staal et al. 1988, Boyd et al. 2002)
ZDHHC8	22q11	(Mukai et al. 2004)
TRAR4	6q23	(Duan et al. 2004)

## 1.3 Neuregulin 1 in der Schizophrenie

### 1.3.1 Entdeckung und Definition von Neuregulin 1

Zur Neuregulin-Gen-Familie zählen die vier Mitglieder NRG1 bis NRG4. Über die Identifikation von Proteinen, welche von dem Gen NRG1 kodiert werden, wurde 1992 und 1993 erstmals berichtet (Holmes et al. 1992, Peles et al. 1992, Wen et al. 1992, Falls et al. 1993, Goodearl et al. 1993, Marchionni et al. 1993). Ein bedeutender Fortschritt war die Sequenzierung und Kartierung des kompletten humanen NRG1-Gens durch Stefansson et al. im Jahre 2002 (s. Abbildung 3, Seite 14), Genbank Accession No. BK000383. Dabei konnten über 1200 SNPs in der gesamten NRG1-Sequenz identifiziert werden.

Das Ergebnis der vorausgegangenen genomweiten Reihenuntersuchung an isländischen Familien mit Schizophrenie unterstützte die Auffassung einer Kopplung der Schizophrenie zum chromosomalen Lokus 8p. Durch extensives *Mapping* dieses Lokus unter Verwendung einer Kombination von Kopplungs- und Assoziationsmethoden basierend auf Mikrosatelliten-Markern und nachfolgendem Einbezug von SNPs in Haplotyp-Assoziationanalysen wurde NRG1 an Position 8p12-21 (Lokus SCZD6, MIM 603013) als Kandidatengen der Schizophrenie identifiziert (Abbildung 2, Stefansson et al. 2002).

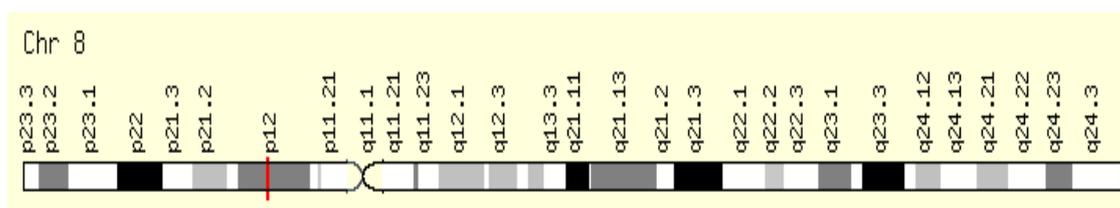


Abb.2: Darstellung von Chromosom 8 mit Position des NRG1-Gens

### 1.3.2 Aufbau und Isoformen von Neuregulin 1

Das NRG1-Gen (Abbildung 3, Seite 14) weist eine Länge von ca. 1.5 Megabasen (Mb) auf. Weniger als 0.3 % dieser Spanne finden Verwendung bei der Kodierung von Proteinen. Das Genprodukt, das NRG1-Protein, ist ein Glykoprotein mit einem Molekulargewicht von 44-Kilodalton (kD) (Wolpowitz et al. 2000).

## Einleitung

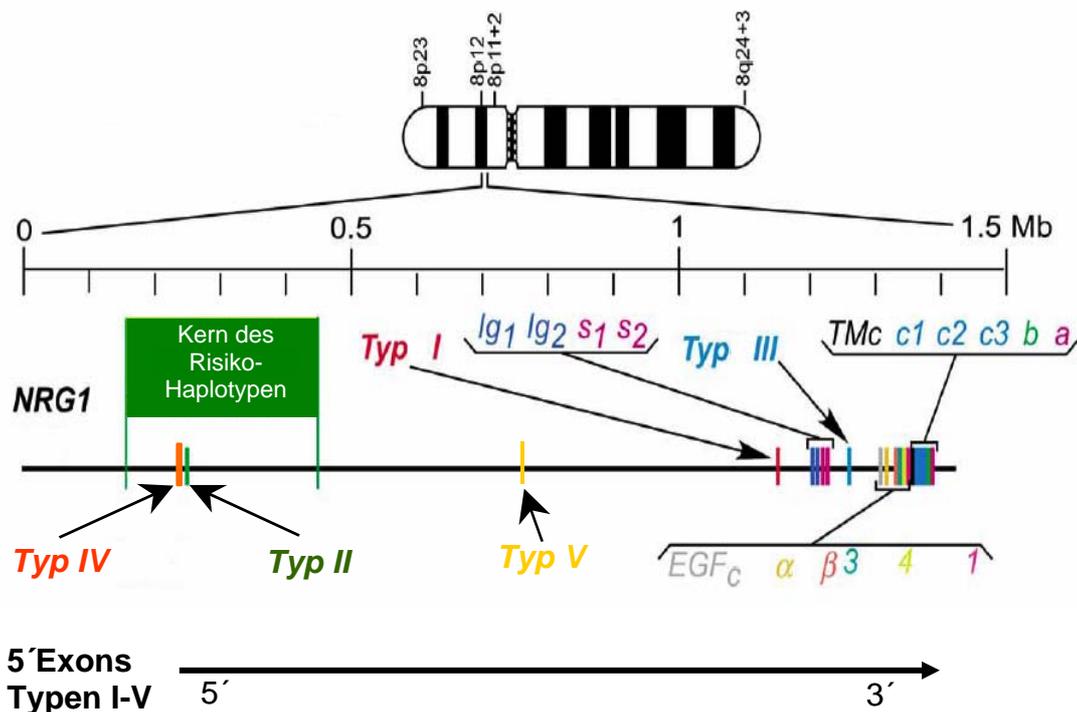


Abb.3: Illustration der NRG1-Gen-Struktur, modifiziert nach Falls 2003 und Stefansson et al. 2004

Das NRG1-Gen befindet sich auf dem kurzen Arm von Chromosom 8. Auf der detaillierten Illustration dieser Region ist die Position jedes Exons mit Bezug zu NRG1-Isoformen durch vertikale Linien angezeigt. Die absteigenden Linien entlang der grünen Box geben die Grenzen des Kerns des Risiko-Haplotypen für die Schizophrenie an. Exons sind benannt nach der strukturellen Region des von ihnen kodierten NRG1-Proteins. Verwendete Abkürzungen entsprechen den Bezeichnungen von strukturellen Regionen der NRG1-Proteine nach Abb.4. Die Typen IV und V sowie die schwarz markierten Exons stehen in aktueller Diskussion. EGF<sub>c</sub> bezieht sich auf das Exon, welches den Teil der Sequenz der EGF-ähnlichen Domäne kodiert, den auch NRGs mit einer  $\alpha$ -Typ bzw.  $\beta$ -Typ ähnlichen Domäne aufweisen. Das Exon mit der Bezeichnung TMc beinhaltet auch benachbarte extrazelluläre Sequenzen des membran- gebundenen Anteils sowie des zytoplasmatischen Endes. Das Exon mit der Zuweisung s kodiert das Zwischenstück nach Abb.4, Seite 16.

Als Konsequenz alternativen Spleißens aus nur einem primären Transkript und multipler Promotorsequenzen kommt es zur Produktion von mindestens 15 verschiedenen NRG1-Isoformen mit gewebespezifischer Expression (Fischbach und Rosen 1997).

Drei strukturelle Charakteristiken sind bekannt, die die bisher etablierten Isoformen im Hinblick auf ihre *in vivo* Funktionen und zellbiologischen Fähigkeiten unterscheiden: der Typ der *Epidermal Growth Factor* (EGF)-ähnlichen Domäne ( $\alpha$  oder  $\beta$ ), der Typ der N-terminalen Sequenz (I, II oder III) und die initiale Synthese der Isoformen als transmembrane oder nontransmembrane Proteine (s. Abbildung 4, Seite 16).

Die Typen I (mit zytoplasmatischem Teil) und II (ohne zytoplasmatischem Teil) werden auch als Immunglobulin(Ig)-ähnliche NRGs zusammengefasst und der Typ III (mit oder ohne zytoplasmatischem Teil) als *Cysteine Rich Domain*(CRD)-NRG bezeichnet (Wolpowitz et al. 2000). Die zuvor in der Literatur verwendete Namensgebung zu den NRG1-Isoformen richtet sich nach dem Gewebe und der Isoform der ersten Entdeckung: *Acetylcholin Receptor Inducing Activity* (ARA), *Glial Growth Factor* (GGF), Heregulin (HRG), *Neu Differentiation Factor* (NDF) und *Sensory and Motor Neuron Derived Factor* (SMDF) (Holmes et al. 1992, Peles et al. 1992, Wen et al. 1992, Falls et al. 1993, Goodearl et al. 1993, Marchionni et al. 1993, Ho et al. 1995). ARA, HRG und NDF wurden zum NRG Typ 1, CRD und SMDF zum NRG Typ III subsumiert.

Inzwischen werden neue 5´Exons und die NRG1-Typen IV und V diskutiert, die in Abbildung 3, Seite14, mitangeführt sind (Steinthorsdottir et al. 2004). Sie haben wie alle anderen bioaktiven NRG1-Isoformen eine EGF-ähnliche Domäne. Der Typ IV exprimiert darüberhinaus eine Ig-ähnliche Domäne. Die vielfältigen Aufgaben der NRG1-Genprodukte (Abschnitt 1.3.3) in unterschiedlichen Geweben und zu verschiedenen Zeiten in der Entwicklung erfordern eine sorgfältige Abstimmung der relativen Genexpression der Isoformen (Steinthorsdottir et al. 2004).

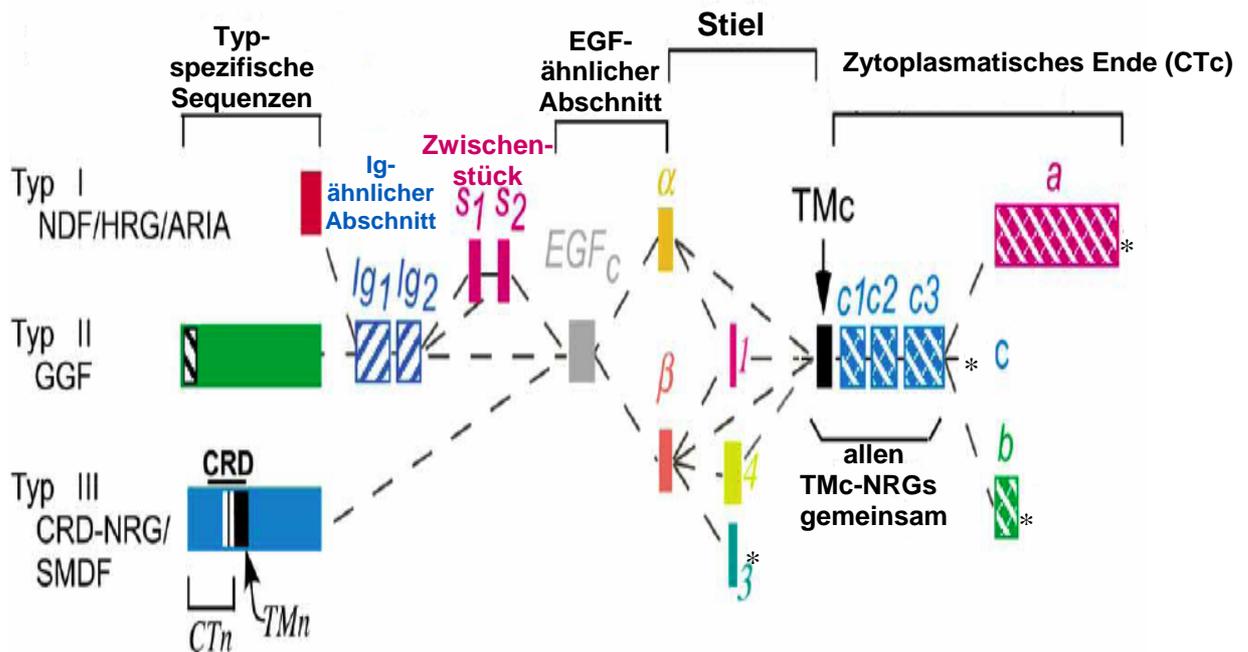


Abb.4: Illustration von NRG1-Segmenten mit kodierender Funktion, modifiziert nach Falls 2003

Die Isoformen differieren in der Zusammensetzung ihrer Segmente mit kodierender Funktion infolge der Initiierung der Transkription durch verschiedene NRG1-Gen-Promotorregionen und alternatives Spleißen. Nicht alle denkbaren Kombinationen von kodierenden Segmenten sind angeführt. CRD = Cystein-reiche Domäne; EGF = Epidermaler Wachstumsfaktor-ähnliche Domäne; Ig = Immunglobulin-ähnliche Domäne; CTc und TMc = C-terminaler Abschnitt des zyttoplasmatischen Endes und der Transmembranen Domäne der EGF-ähnlichen Domäne. CTn und TMn (nur in Typ III NRGs) = N-terminaler Abschnitt des zyttoplasmatischen Endes und der Transmembranen Domäne der EGF-ähnlichen Domäne. \* = Stopp Kodons.

### 1.3.3 Funktionen von Neuregulin 1

Die Neureguline sind Proteine mit Signalübertragungsfunktion und vermitteln Interaktionen zwischen Zellen verschiedenster Organsysteme und Strukturen, dargestellt für NRG1 in einem orientierenden Überblick in Tabelle 3, Seite 17.

Tab.3: Selektion angenommener Funktionen von NRG1 in Anlehnung an Falls 2003

Organ/Zelltyp/Struktur	Effekt	Studien
Schwanzzellen Oligodendrozyten	Überleben, Proliferation, Myelinisierung, Differenzierung, Migration (Schwanzzellen)	a)
Kortikale neuronale Vorläuferzellen	Migration von neuronalen Vorläuferzellen entlang radialer Glia	b)
Kraniale sensorische Neurone	Initiale Population kranialer sensorischer Ganglien mit von der Neuralleiste abstammenden sensorischen Neuronen	c)
Sympathische Neuronen	Migration	d)
Motorische und sensorische Neurone	Überleben	e)
Neuronen des peri- pheren und zentralen Nervensystems	Involvierung in die Regulation von Neurotransmitter-Rezeptoren (NMDA-, GABA-, neuronale nikotinerge Acetylcholin-Rezeptoren) und anderen neuronalen Ionenkanälen	f)
Neuromuskuläre Synapse	Nerven -Muskel- und Schwanzzell- Interaktion, Acetylcholin-Rezeptor Synthese	g)
Hippocampus	Inhibition der Induktion der Langzeitpotenzierung	h)
Hypothalamus Hypophyse	Pubertätsentwicklung durch Induktion der Freisetzung hypothalamischer Releasinghormone	i)
Herz	Entwicklung von Trabekeln der Ventrikelwand, des AV-Septums und der Klappen sowie des Erregungs- leitungssystems; Wachstum, Reparatur und Fortbestehen von adulten Kardiomyozyten	j)
Lunge	Entwicklung von Pulmomalepithel	k)
a) (Canoll et al. 1996, Barres und Raff 1998, Jessen und Mirsky 1998, Canoll et al. 1999, Jessen und Mirsky 1999, Vartanian et al. 1999, Fernandez et al. 2000, Flores et al. 2000, Garatt et al. 2000, Calaora et al. 2001, Lemke 2001, Park et al. 2001a, Mirsky et al. 2002)		
b) (Anton et al. 1997, Rio et al. 1997)		
c) (Meyer und Birchmeier 1995, Meyer et al. 1997, Liu et al. 1998)		
d) (Britsch et al. 1998)		
e) (Wolpowitz et al. 2000)		
f) (Ozaki et al. 1997, Yang et al. 1998, Rieff et al. 1999, Cameron et al. 2001, Liu et al. 2001)		
g) (Fischbach und Rosen 1997, Sandroock et al. 1997, Burden 1998, Buonanno und Fischbach 2001, Sanes und Lichtman 2001, Schaeffer et al. 2001, Yang et al. 2001)		
h) (Huang et al. 2000)		
i) (Ma et al. 1999, Prevot et al. 2003)		
j) (Meyer und Birchmeier 1995, Kramer et al. 1996, Erickson et al. 1997, Zhao et al. 1998, Camenisch et al. 2002, Ozcelik et al. 2002, Rentschler et al. 2002, Brutsaert 2003)		
k) (Patel et al. 2000)		

Im Vergleich zu NRG1 sind die biologischen Funktionen der übrigen Neuregulin-Proteine noch kaum bekannt. Den NRG1-Proteinen obliegt, wie aus Tabelle 3, Seite 17, hervorgeht, eine kritische Rolle hinsichtlich der Entwicklung und Funktion von zentralem und peripherem Nervensystem sowie kardialem und pulmonalem System.

Für dieses momentane Verständnis der humanbiologischen NRG1-Funktionen bildeten Experimente mit *Knock Out* (KO)-Mäusen, bei denen gezielt Mutationen im NRG1-Gen herbeigeführt wurden, eine wichtige Grundlage (Meyer und Birchmeier 1995, Kramer et al. 1996, Erickson et al. 1997, Meyer et al. 1997, Britsch et al. 1998, Liu et al. 1998, Gerlai et al. 2000, Wolpowitz et al. 2000, Yang et al. 2001, Park et al. 2001a). Varianten von NRG1-KO-Mäusen weisen demnach u.a. Störungen von kranialen sensorischen und motorischen Neuronen sowie Neuronen des sympathischen Nervensystems und eine markante Reduktion von Schwanzzellvorläuferzellen auf. Weiterhin kann eine Degeneration von kranialen und peripheren Nerven und Minderung der Anzahl spinaler Neuronen gefunden werden. Zudem können auch gravierende kardiale Defekte und funktionsunfähige neuromuskuläre Synapsen ein kardiorespiratorisches Versagen bewirken.

#### **1.3.4 Mechanismen der Signaltransduktion durch Neuregulin 1**

Die postulierte bidirektionale Signalübertragung von einer NRG-produzierenden zu einer NRG-empfangenden Zelle beinhaltet eine Reihe diffiziler Vorgänge, zu denen Abbildung 5, Seite 19, einen orientierenden Einblick gewährt. Die Abbildung entspricht einer Modifikation von aktuellen Modellentwürfen zu der Funktion von NRG1 bei der Synaptogenese und zu der Lokalisation des ErbB4-Rezeptors im Kern des Neurons (Ozaki 2002, Carpenter 2003, Stefansson et al. 2004). Die ErbB-Rezeptoren werden durch das *Erythroblastic Leukemia Viral Oncogen Homolog* (v-ErbB)-Gen kodiert. Die nachfolgenden Beschreibungen beziehen sich auf diese Modellvorstellungen.

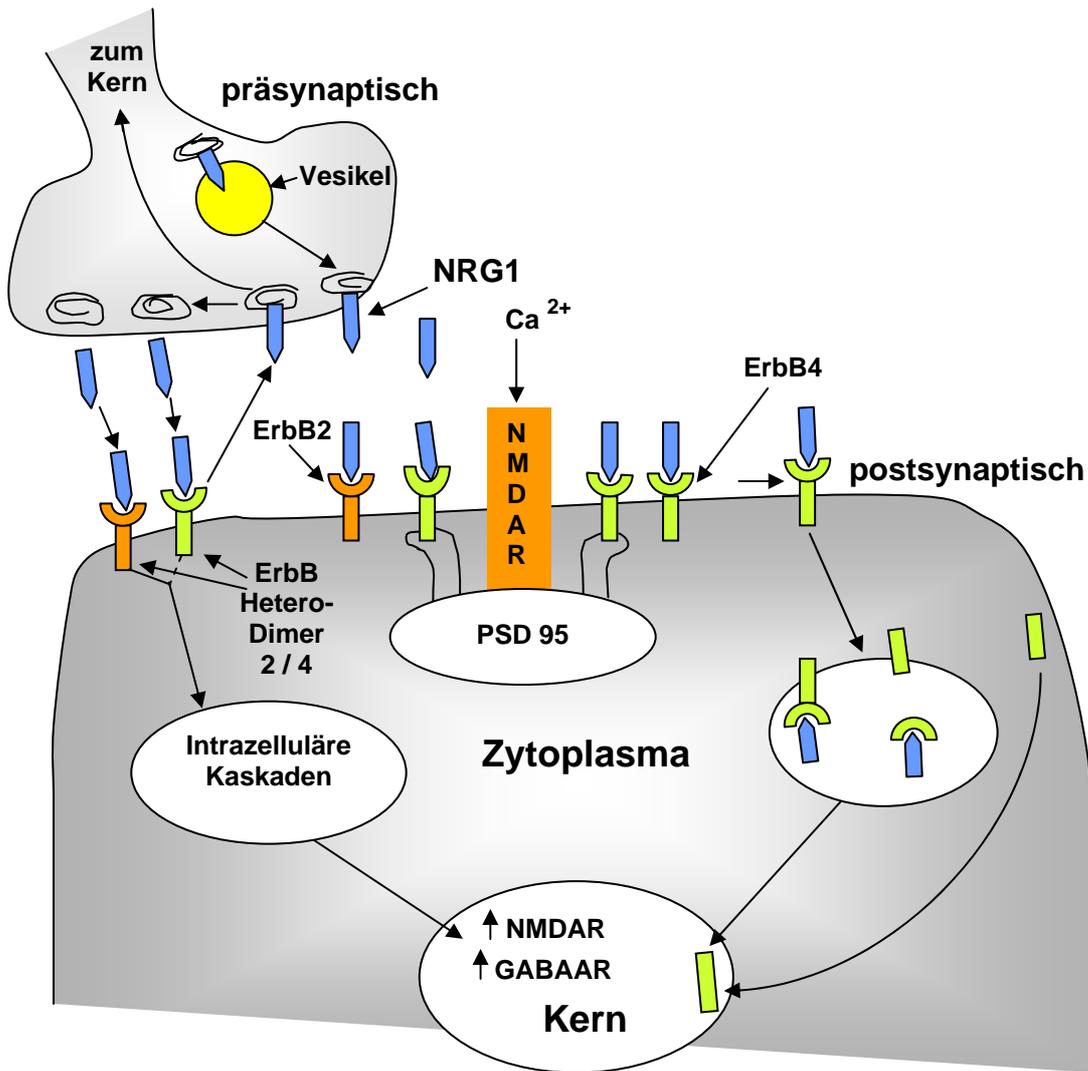


Abb.5: Schematischer Ablauf der NRG1-Signalübertragung am Beispiel der Regulation von Transkription und Modifikation von Neurotransmitter-Rezeptoren in Umgestaltung der Modelle von Ozaki 2002, Carpenter 2003 und Stefansson et al. 2004

Varianten von NRG1-Proteinen existieren entweder als transmembrane oder mobile Formen. Die transmembrane Form befindet sich in den synaptischen Vesikeln. Sie wird von dort durch Exozytose weiterbefördert und erreicht sodann die präsynaptische Membran. Nach Freisetzung der Ektodomäne mit ihrem Bestandteil der EGF-ähnlichen Domäne durch proteolytische Prozesse kann NRG1 durch den synaptischen Spalt migrieren und sodann als Ligand für ErbB-Rezeptoren Wachstum und Differenzierung von epithelialen, neuronalen, glialen und anderen Zelltypen beeinflussen. Einmal angekommen in der extrazellulären Umgebung der Zielzelle, interagiert NRG1 mit den Rezeptoren der ErbB-Familie, wobei die EGF-ähnliche Domäne für die Aktivierung der ErbB-Rezeptoren an der postsynaptischen Membran verantwortlich und alleine

ausreichend ist (Buonanno und Fischbach 2001). Im weiteren Ablauf der NRG1-Signaltransmission führt die Bindung der NRG1-Ektodomäne an eine extrazelluläre Domäne der ErbB3- oder ErbB4-Rezeptoren zu deren Formationsänderung und zur fortgesetzten Autophosphorylierung von Tyrosinresten, vermittelt durch die ErbB-Rezeptoren in ihrer Funktion als Tyrosinkinase. Es wird angenommen, dass als Folge die intrazellulären Bedingungen im postsynaptischen Neuron moduliert werden (Plowman et al. 1993). ErbB4 ist der dominante neuronale Rezeptor für NRG1 im zentralen Nervensystem und reguliert als transmembrane Rezeptortyrosinkinase die Zellproliferation und Zelldifferenzierung (Pinkas-Kramarski et al. 1997, Steiner et al. 1999).

Im Rahmen der vorwärts gerichteten Signalübertragung läuft die Aktivierung von ErbB2- und ErbB4-Heterodimeren über nachgeschaltete intrazelluläre Kaskaden. Daraus könnte eine Hochregulation der Expression von GABA- und NMDA-Rezeptor Untereinheiten resultieren (Ozaki 2002). Die durch NRG1 bewirkte Autophosphorylierung ist auch auf die ErbB-Rezeptoren ausgedehnt, die mit NMDA-Rezeptoren an dem Postsynaptischen Dichte (PSD)-95-Komplex co-lokalisiert sind (Garcia et al. 2000, Huang et al. 2000). Eine posttranslationale Modifikation des NMDA-Kanals könnte durch Interaktion mit dem ErbB4-Rezeptor erfolgen. Die Signalübertragung würde vorstellungsgemäß von dem ErbB4-Rezeptor zu dem NMDA-Rezeptor durch Rekrutierung weiterer, nicht mitabgebildeter Kinasen ablaufen, welche die kinetischen Eigenschaften des NMDA-Kanals zu regulieren vermögen (Garcia et al. 2000). Der NMDA-Kanal wird als essentiell für die neuronale Entwicklung und synaptische Plastizität hervorgehoben (Stefansson et al. 2004).

Die intrazelluläre Domäne von ErbB4 kann möglicherweise auch von der Plasmamembran zum Kern transloziert werden und dort die Regulation der Zellfunktion übernehmen (Carpenter 2003). Wenn Rezeptor-Tyrosinkinasen wie ErbB4 in der Lage sind, ihre Liganden zum Kern zu transportieren, könnte u.U. auch die NRG1-Ektodomäne fähig sein, eine regulierende Funktion bei der Genexpression auszuüben (Stefansson et al. 2004).

Vermutlich entspricht nicht die zuvor dargelegte uni-, sondern eine bidirektionale NRG1-Signalübertragung den tatsächlichen Gegebenheiten (Stefansson et al. 2004). Der retrograde Signalweg könnte die NRG1-Genexpression im präsynaptischen Neuron bestimmen. Anhaltspunkte für die Vorstellung eines rückwärts gerichteten Signaltransfers ergeben sich daraus, dass ErbB-Rezeptordimere eventuell die Fähigkeit zur Bindung an die extrazelluläre Domäne eines intakten, transmembranen NRG1-Moleküls haben und konsekutiv eine Depolarisation der präsynaptischen Zelle stattfinden könnte. Nach anschließender proteolytischer Freisetzung und Translokation zum Kern könnte die intrazelluläre Domäne von NRG1 auf die Expression verschiedener Regulatoren der Apoptose einwirken. Auf diesem Weg wäre denkbar, dass NRG1 das Überleben von Neuronen mit NRG1-Expression beeinflusst (Bao et al. 2003).

Über die Rezeptoraktivierung hinausgehende physiologische NRG1-Aktivitäten werden durch strukturelle Unterschiede in den Isoformen moduliert, die auch eine Anpassung der Signalübertragungsstrategien ermöglichen. Die ErbB-Rezeptorfamilie und ihre Liganden sind im Sinne eines dreischichtigen *signaling network* interpretiert worden (Falls 2003). Dieses Netzwerk besteht demnach aus einer Eingangsebene mit Liganden, Rezeptoren und Transaktivatoren neben einer signalverarbeitenden Ebene mit Adaptern, Kaskaden und Transkriptionsfaktoren. Die Ausgangsebene bietet die Basis für die biologischen Konsequenzen der Ligand-ErbB-Interaktion mit Stimulation oder Inhibition von Proliferation, Migration, Differenzierung, Adhäsion und Apoptose (Pinkas-Kramarski et al. 1996, 1998, Olayioye et al. 2000, Yarden und Sliwkowski 2001).

Das gedankliche Konstrukt beinhaltet auch Konvergenz und Divergenz sowie horizontale Interaktionen innerhalb der Ebenen. Bezüglich der exakten Mechanismen, welche die Selektion, Arrangierung, Modifikation und Modulation der Netzwerkkomponenten in individuellen Zellen bewirken, steht das Verständnis aber erst am Anfang (Falls 2003).

### 1.3.5 Verbindungen von Neuregulin 1 zur Pathophysiologie der Schizophrenie

Krankheiten bzw. Läsionen des Zentralnervensystems (ZNS), die mit Störungen der NRG1-Signalübertragung in Zusammenhang gebracht werden, sind die Multiple Sklerose (Cannella et al. 1999, Viehover et al. 2001), der Morbus Alzheimer (Chaudhury et al. 2003), traumatische Hirnverletzungen (Tokita et al. 2001) und die Schizophrenie (Cloninger 2002, Moises et al. 2002, Stefansson et al. 2002, 2003) Die folgenden Ausführungen konzentrieren sich auf die Involvierung von NRG1 in die Pathophysiologie der Schizophrenie.

1. Im Vordergrund steht die Hypothese, dass die Schizophrenie durch eine Störung der neuronalen Entwicklung und ZNS-Maturation gekennzeichnet ist (Murray und Lewis 1987, Marengo und Weinberger 2000, Lewis und Levitt 2002, Davis et al. 2003).

Die Integration von NRG1 in die Prozesse der Hirnentwicklung wird durch Variation des Expressionsniveaus von NRG1 oder seiner Isoformen geregelt. Diese Ansicht wird gestützt durch eine Fall-Kontroll-Studie zum m-RNA-Expressionsniveau der drei Hauptisoformen von NRG1 am dorsolateralen präfrontalen Kortex in *post mortem*-Gehirnen von Schizophrenen und Gesunden (Hashimoto et al. 2004). In dieser Hirnregion wurden bei schizophrenen Patienten funktionelle und neuroanatomische Anomalien beobachtet (Weinberger et al. 2001). Es waren keine Änderungen im absoluten Niveau der Isoformen nachweisbar, dafür aber eine minimale Erhöhung des Typ I und Erniedrigung der Verhältnisse von Typ II/I und Typ II/III.

Der Kenntnisstand zu regionalen und zellulären NRG1-Expressionsprofilen wurde durch eine weitere aktuelle Studie ergänzt (Law et al. 2004). Bei der Untersuchung der m-RNA und des Proteins mit *in situ* Hybridisations- und immunhistochemischen Verfahren gelang eine eindeutige Detektion u.a. im präfrontalen Kortex, im Hippocampus, im Cerebellum, in der Substantia nigra und in verschiedenen Kernarealen des Hirnstammes.

Die persistente Genexpression bis ins Erwachsenenalter deutet auf eine kontinuierliche Einflussnahme auf die Funktionalität des ausgereiften Gehirns hin, und ihre weitgestreute Verteilung erreicht Hirnareale und Zellpopulationen, die auch bei der Schizophrenie involviert sind.

Aus einer gestörten Expression und/oder Funktion von NRG1 würde sich schließlich die Beeinträchtigung der neuronalen Entwicklung und ZNS-Maturation ergeben. Die Schizophrenie könnte das Resultat abnormer kortikaler Verschaltungen oder Dysregulationen der synaptischen Funktion mit sekundärer Beeinflussung von Neurotransmitter-Systemen sein (Weinberger 1995). NRG1-Isoformen greifen eventuell in jeder Phase dieses Prozesses durch Regulierung der neuronalen Migration und der Gliogenese während der Entwicklung des ZNS ein (Canoll et al. 1996, Syroid et al. 1996, Zanazzi et al. 2001). Für NRGs wurden in diesem Kontext Effekte auf die Regulation der Migration von neuronalen Vorläuferzellen in Zellkulturen gezeigt. Eine abnorme neuronale Migration könnte den Aufbau von Verbindungen zwischen den Hirnregionen dahingehend stören, dass externe Stimuli inadäquate kognitive Antworten erzeugen.

Weiterhin wird ein Zusammenhang zwischen Schizophrenieentwicklung und unzureichender Myelinisierung vermutet. Die dadurch hervorgerufene reduzierte oder irreguläre neuronale Transmission könnte zu der für die Schizophrenie charakteristischen Umformung der Perzeption und des emotionalen Zustandes führen. Eventuell ist das Gehirn auch in der Lage, sich an eine Verringerung der Myelinisierung anzupassen, indem die synaptische Freisetzung oder die Expression von Rezeptoren oder anderen prä- und postsynaptischen Molekülen eine Änderung erfahren. In die Myelinisierung ist NRG1 durch Regulation der Differenzierung und Proliferation von Oligodendrozyten involviert (Fernandez et al. 2000, Flores et al. 2000, Calaora et al. 2001, Park et al. 2001b).

ErbB3 als Mitglied der NRG1-Rezeptor Familie zählt zu den Genen, die in starkem Ausmaß eine Expression in Oligodendrozyten zeigen, in die Formation von Myelinscheiden einbezogen und im präfrontalen Kortex von Personen mit

chronischer Schizophrenie herunterreguliert sind (Hakak et al. 2001). Die beobachtete Reduktion des Expressionsniveaus bezog sich neben dem ErbB3-Gen auch auf oligodendrozytenspezifische Gene. Oligodendrozyten, in denen auch NRG1-Moleküle und NRG1-Rezeptoren nachweisbar sind, produzieren Wachstumsfaktoren, die trophische Signale für das Überleben und die Funktion benachbarter Neuronen und Gliazellen bereitstellen (Du und Dreyfus 2002). Damit ist eine Verbindung zu der Überlegung von Anomalien in der biologischen Funktion und im Aufbau der Glia als pathophysiologische Grundlage der Schizophrenie gegeben (Hakak et al. 2001).

Ein Mangel an glialen Wachstumsfaktoren (GGFs), wie zum Beispiel von NRG1-Isoformen, könnte die Stärke synaptischer Verbindungen abschwächen, in eine synaptische Destabilisation münden, die neuronale Entwicklung beeinträchtigen und schließlich die Symptome der Schizophrenie hervorrufen (Moises et al. 2002). Über das Einwirken auf gliale Wachstumselemente reicht NRG1 in das weite Funktionsspektrum von Gliazellen hinein. Zu diesem gehören die direktionale Kontrolle der neuronalen Migration, Regulation der neuronalen Aktivität und synaptischen Eigenschaften sowie die synaptische Transmission, Unterstützung der Hirnfunktion nach Verletzungen oder Erkrankungen und ebenfalls die Bereitstellung von Wachstumsfaktoren (Rakic 1990, Lackland und Dreyfus 1999, Haydon 2001, Ullian et al. 2001).

Die Organisation radialer Gliazellen, die als Vorläufer von Neuronen angesehen werden, sowie ihre Entwicklung zu Astrozyten werden von NRG1 reguliert (Schmid et al. 2003). Eine abnorme Entwicklung radialer Glia würde in Fehlern bei der Plazierung von Neuronen und im Aufbau der neuronalen Verbindungen münden (Anton et al. 1997, Rio et al. 1997).

Für eine verminderte Konnektivität im Gehirn Schizophreniekranker sprechen die zunehmende Eliminierung von Synapsen während der Adoleszenz und eine Verringerung der grauen Substanz bei betroffenen Individuen und ihren Verwandten ersten Grades (Friston und Frith 1995, Cannon et al. 1998). NRG1 ist in die Astrozytenbiologie und vermutlich auch in die Formation oder Stabilisierung zentraler Synapsen integriert (Pinkas-Kramarski et al. 1994, Ullian et al. 2001). Desweiteren greift NRG1 in die Formation und Funktion von

Synapsen durch Steuerung der Expression von Glutamat- und GABA-Rezeptoren sowie Acetylcholin-Rezeptoren ein (Ozaki et al. 1997, Rieff et al. 1999, Liu et al. 2001, Stefansson et al. 2002). In der Gesamtbewertung sind die Daten zu zytoarchitektonischen Anomalien noch spärlich und bieten keine umfassende ursächliche Erklärung für die Schizophrenie.

2. Eine zweite Vorstellung geht davon aus, dass die Störungen der Denkprozesse und Kognition bei der Schizophrenie die Folge von Anomalien der synaptischen Plastizität sind.

NRG1 ist in die Induktion der Langzeitpotenzierung in der hippocampalen CA1 Region involviert, ohne die basale synaptische Transmission zu tangieren. Hierbei handelt es sich um Mechanismen, die für die Formation des Gedächtnisses als wichtig betrachtet werden und die eine Form von synaptischer Plastizität bilden, welche als ein Studienmodell für die neurophysiologischen Substrate von Lernen und Erinnerung Anwendung findet (Huang et al. 2000). Die sich aus einer Destabilisierung der synaptischen Plastizität ergebenden Gedächtnisstörungen scheinen für einige Symptome der Schizophrenie verantwortlich zu sein (Kandel et al. 1995, Frith und Dolan 2000).

Die aktivitätsabhängigen Effekte von NRG1 und ErbB4 auf die Effizienz der glutamatergen Neurotransmission werden ebenfalls als ein Mechanismus synaptischer Plastizität diskutiert. Schließlich zeigen Mäuse mit einer reduzierten Zahl von NMDA-Rezeptoren auch Defizite in einem psychometrischen Korrelat für die Lenkung von sensorischen Empfindungen, der sogenannten *Prepulse Inhibition* (PPI) (Mohn et al. 1999, Stefansson et al. 2002).

3. Eine dritte Theorie schlägt vor, dass die Schizophrenieentwicklung aus einem relativen Mangel an glutamaterger im Vergleich zu dopaminergem Innervation resultiert.

Auf diesem Weg vermag auch eine Beeinträchtigung der NRG1-Signalübertragung zur Pathophysiologie der Schizophrenie beizutragen. Für zwei differierende Mutationen im NRG1-Gen oder eine Nullmutation des ErbB-Gens heterozygote Mäuse zeigen eine Hyperaktivität in Verhaltenstests ähnlich

der bei Mäusen, die mit der psychotomimetischen Droge Phencyclidin (PCP) behandelt waren oder eine Reduktion glutamaterger bzw. Zunahme dopaminerger Neurotransmission aufwiesen. Bei den in den Verhaltensstudien untersuchten Mäusen fand sich ein Stopp-Kodon eingebettet in die Sequenzen, welche die NRG1-ähnliche Domäne oder die transmembrane Domäne kodieren (Gerlai et al. 2000, Stefansson et al. 2002).

Die Hyperaktivität der Mäuse erwies sich unter Behandlung mit dem antipsychotischen Medikament Clozapin als reversibel. Parallel war ein abnehmender Bestand des NMDA-Typs des Glutamatrezeptors festzustellen. Die Reversibilität unter Clozapin könnte ein Hinweis darauf sein, dass die registrierte Hyperaktivität der Mäuse mit Mutationen im NRG1-Gen zu den Phänotypen der Schizophrenie in Beziehung steht (Stefansson et al. 2002).

Außerdem wurde beschrieben, dass Mäuse mit einer Störung der NRG1-Expression eine Reduktion funktioneller NMDA-Rezeptoren im Vergleich zu Kontrollmäusen aufweisen, eine Beobachtung in Übereinstimmung mit an Gehirnen von Schizophreniepatienten gewonnenen Befunden (Ibrahim et al. 2000, Goff und Coyle 2001). Limitationen in der Symptombehandlung durch Neuroleptika lassen aber die Vermutung zu, dass die primären Defekte nicht in den Neurotransmitter-Systemen liegen und die Dopamin-Glutamat-Hypothese die Pathophysiologie der Schizophrenie nicht voll erklären kann.

4. In einer vierten Hypothese wird angenommen, dass die Erkrankung mit Störungen der durch NRG1 beeinflussten Hormonregulation einhergeht.

Die Suszeptibilität für Schizophrenie scheint den periodischen Änderungen der endokrinologischen Homöostase zu folgen. So steigt das Erkrankungsrisiko in der späten Adoleszenz und dem frühen Erwachsenenalter bei beiden Geschlechtern, am Ende des vierten Lebensjahrzehnts bei Frauen und im sechsten Jahrzehnt wiederum bei beiden Geschlechtern an (Petronis 2004). Es gibt Hinweise, dass bei Frauen Östrogene schizophrene Psychosen modulieren können, wobei sowohl eine protektive Wirkung dieser Geschlechtshormone als auch ein krankheitsverursachender Hypoöstrogenismus diskutiert werden (Riecher-Rössler 2003). Alters- und geschlechtsspezifische Wechsel in der hormonellen Regulation sind offenbar für die Dynamik des Einflusses einer genetischen Veranlagung von Bedeutung.

NRG1 scheint eine Kontrollfunktion in der Pubertätsentwicklung durch Induktion der Freisetzung hypothalamischer Releasinghormone zu übernehmen. Für die Initiierung der Pubertät von Säugetieren ist die Aktivierung hypothalamischer Neurone notwendig, die das Neuropeptid *Luteinizing Hormone-Releasing Hormone* (LHRH) absondern. Diese durch Steuerung transsynaptischer Einflüsse auf LHRH-Neurone bewirkte Aktivierung erfordert vermutlich auch eine Signalübertragung zwischen Neuronen und Glia. Vermittelt wird die Signaltransmission durch Wachstumsfaktoren der EGF-Familie und deren astrozytäre ErbB4-Rezeptoren. Es wird angenommen, dass eine Reduktion der LHRH-Freisetzung und damit auch der Gonadotropinsekretion durch die Unfähigkeit von hypothalamischen Astrozyten hervorgerufen wird, auf NRG1 mit der Produktion von Prostaglandin E zu reagieren. Zu dessen Funktion gehört die Stimulation der Astroglia-ErbB-Rezeptor-Aktivierung und damit der neuronalen LHRH-Freisetzung.

Somit könnte eine Störung der Kommunikation zwischen Neuronen und Astrozyten, welche über die NRG1-ErbB4-Rezeptor-Signalübertragung vermittelt wird, in Anomalien der zerebralen Kontrolle der Pubertätsentwicklung bzw. allgemein in der Regulierung des Hormonhaushaltes münden (Prevot et al. 2003).

Die klinische Symptomatik der Schizophrenie beginnt in der Regel erst nach der Pubertät. Für die Überlegung, dass Störungen dieser Entwicklungsphase im Zusammenhang mit der Schizophrenie stehen könnten, fand sich aber bisher keine eindeutige Bestätigung.

### **1.3.6 Suszeptibilitätsprüfung in Analysen von Einzel Nukleotid Polymorphismen und Haplotypen**

Über die Testung von SNPs hinaus bildet die Analyse von Haplotypen die momentan vielversprechendste Vorgehensweise zur Ermittlung einer Assoziation genetischer Marker mit der Schizophrenie (s. Tabelle 4, Seite 30).

Stefansson et al. publizierten im Jahr 2002 die Identifikation von drei Risiko-Haplotypen mit jeweils exzessiver Häufigkeit bei schizophrenen Patienten aus Island und einem gemeinsamen Kern-Risiko-Haplotyp aus sieben Markern (s. Abbildung 3, Seite 14). Der Kern-Risiko-Haplotyp mit ebenso eindeutiger Assoziation zur Schizophrenie hat eine Länge von 290 kb und besteht aus fünf SNPs und zwei Mikrosatelliten-Markern. Er umspannt am 5´Ende des NRG1-Gens den Promotor und die ersten beiden Exons, wobei das postulierte neue Exon, welches den Typ IV von NRG1 kodieren könnte, bereits mit einbezogen ist.

Die Assoziation des Kern-Risiko-Haplotypen konnte im Folgejahr in großen Fall-Kontroll-Studien aus Schottland, Großbritannien und Irland bestätigt werden (Stefansson et al. 2003, Williams et al. 2003). Die Haplotypfrequenzen der isländischen und schottischen Patienten respektive der entsprechenden Kontrollpopulationen waren in den beiden Studien von Stefansson und Mitarbeitern sehr ähnlich. In der Replikationsstudie von Williams et al. fand sich eine geringere Assoziation des gleichen NRG1-Risiko-Haplotypen, insbesondere bei Betrachtung von Patienten mit familiärer Schizophreniebelastung.

Im Jahr 2004 wurden Replikationsversuche im Hinblick auf den sieben Marker Risiko-Haplotyp oder auf Mikrosatelliten-Marker, welche von Stefansson zur Genotypisierung verwendet wurden, unternommen.

Die Studien an drei chinesischen Gruppen sowie an einer japanischen und zwei irischen Populationen zeigten teilweise zusätzliche mit der Schizophrenie assoziierte Haplotypen (Corvin et al. 2004, Iwata et al. 2004, Li et al. 2004, Tang et al. 2004, Thiselton et al. 2004, Zhao et al. 2004). Von den Studien erbrachte eine an einer südchinesischen Population eine Assoziation von Haplotypen aus Mikrosatelliten-Kombinationen. Bei differierender Markerzusammenstellung bestand eine teilweise Übereinstimmung zu der des Risiko-Haplotypen der isländischen und schottischen Bevölkerung (Tang et al. 2004). In einer anderen Studie an Han-Chinesen war nur ein aus fünf Markern des Kern-Risiko-Haplotypen zusammengesetzter Haplotyp, nicht jedoch der sieben Marker Risiko-Haplotyp selbst, mit der Krankheit assoziiert (Zhao et al. 2004). In den Studien an einer japanischen und einer irischen Bevölkerungsguppe fehlte dagegen jeglicher Anhaltspunkt für eine Assoziation mit dem Risiko-

Haplotyp (Corvin et al. 2004, Iwata et al. 2004). Auch in einer kürzlich durchgeführten Studie an irischen Familien mit sehr hohem Anteil an Schizophrenie konnte in kombinierter Kopplungs- und Assoziationsmethode kein Zusammenhang von NRG1 mit der Krankheit eruiert werden, wobei auch Marker des Risiko-Haplotypen mituntersucht wurden (Thiselton et al. 2004).

Die Studie von Yang et al. aus dem Jahr 2003 diente als primäre Referenz für die vorliegende Arbeit, insbesondere, da zu ihr bisher noch keine Replikationsversuche an einem deutschen Kollektiv unternommen wurden. In der SNP- und Haplotyp-Analyse an einer Population von Han-Chinesen wurden stark positive Assoziationen gefunden.

Von den drei untersuchten SNPs (s. Abbildung 6, Seite 30, Tabelle 6, Seite 39) stammte einer aus der 5'Region, die beiden anderen lagen im mittleren Genabschnitt und wurden durch Zufallsauswahl aus den bekannten Markern des 8p21 Lokus (Datenbank: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/>) ermittelt. Der SNP des 5'Endes (SNP8NRG221533) ist der nach Stefansson signifikanteste Einzelmarker und kommt demzufolge in der Mehrzahl der hier zitierten SNP- und Haplotyp-Studien zur Anwendung. In einem zweiten SNP (rs3924999) erscheint ein G zu A Basenwechsel in Position 12 des in allen NRG1-Isoformen gleichermaßen vorkommenden zweiten Exons. Dieser SNP führt zu einem Aminosäurenaustausch von Arginin (Arg) zu Glutamin (Gln) (Arg38Gln). Zu dem dritten, im fünften Intron lokalisierten SNP (rs2954041), besteht die Überlegung, dass er möglicherweise im Kopplungsungleichgewicht mit einem kausalen Lokus für Schizophrenie stehen könnte.

Tab.4: Übersicht der bedeutendsten Studien zur Suszeptibilitätsprüfung von NRG1-Einzel Nukleotid Polymorphismen und Haplotypen

Autor	Jahr der Publikation	Population	Signifikanz
Stefansson	2002	Island	7 Marker Haplotyp, signifikantester Einzelmarker SNP8NRG221533
Stefansson	2003	Schottland	7 Marker Haplotyp, signifikantester Einzelmarker SNP8NRG221533
Yang	2003	China	SNP8NRG221533, rs2954041, rs3924999
Williams	2003	Großbritannien Irland	3 Marker Haplotyp (minimale Markerkombination für den 7 Marker Risiko-Haplotyp inklusive SNP8NRG221533)
Corvin	2004	Irland	neuer 2 Marker Haplotyp HapBire mit 1 Mikrosatelliten-Marker vom 7 Marker Risiko-Haplotyp
Tang	2004	China	2 neue Haplotypen aus Kombinationen von Mikrosatelliten-Markern, u.a. auch von 2 Markern aus dem 7 Marker Risiko-Haplotyp
Zhao	2004	China	5 Marker Haplotyp (3 SNP, inklusive SNP8NRG221533, und 2 Mikrosatelliten-Marker aus dem 7 Marker Risiko-Haplotyp)
Li	2004	China	3 neue HAP aus Mikrosatelliten-Marker-Kombinationen, HAPChina 1-3
Iwata	2004	Japan	keine inklusive des 7 Marker Risiko-Haplotyp
Thiselton	2004	Irland	keine inklusive des 7 Marker Risiko-Haplotyp

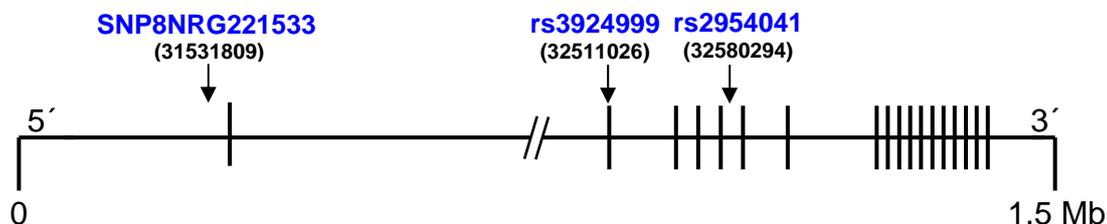


Abb.6: Position der von Yang et al. (2003) und in dieser Studie verwendeten Marker ohne Berücksichtigung der in Abb.3, Seite 14, graphisch mitdargestellten postulierten neuen Exons. Zahlen in Klammern  $\Rightarrow$  Angabe der chromosomalen Lokalisation

Die in den Studien gefundenen Assoziationen sind auf Haplotypen eingeschränkt und die für das Erkrankungsrisiko verantwortlichen funktionellen Varianten noch nicht aufgedeckt. Es mehren sich aber die Hinweise für NRG1 als tatsächlich pathogenetisch relevantes, wenn auch nicht gleichsam hauptverantwortliches Risikogen der Schizophrenie.

## 1.4 Fragestellung

Es gilt heute als gesichert, dass eine starke genetische Komponente bei der Ätiologie der Schizophrenie vorliegt. Die Entstehung schizophrener Erkrankungen ist jedoch noch nicht geklärt. Fall-Kontroll-Assoziationsstudien sind eine sensitive Methode, um auf molekulargenetischer Ebene nach Suszeptibilitätsgenen mit kleinen Effekten bei komplexen Krankheiten wie der Schizophrenie zu suchen.

NRG1 wurde im Literaturüberblick als interessantes Kandidatengen der Schizophrenie ausgewiesen. Das Gen liegt in einer Region auf Chromosom 8, für die sich in aktuellen Studien signifikante Kopplungs- respektive Assoziationshinweise finden lassen. In der primären, familienbasierten Referenzstudie an einer chinesischen Population von Yang et al. aus dem Jahr 2003 wurden für die in dieser Arbeit untersuchten Marker und Haplotypen des NRG1-Gens signifikante Assoziationen mit der Schizophrenie beschrieben.

Ziel der vorliegenden Studie ist es, Zusammenhänge zwischen den untersuchten Polymorphismen und Haplotypen des NRG1-Gens mit der Schizophrenie an einer deutschen Population zu erfassen. Dazu wurden Allel-, Genotyp- und Haplotypfrequenzen im Vergleich schizophrener Patienten zu einer gesunden Kontrollpopulation bestimmt.

## **2 Material und Methoden**

### **2.1 Vorbedingungen der Studiendurchführung**

Die Studie wurde mit Zustimmung der lokalen Ethikkommission durchgeführt. Sämtliche Probanden und Betroffene wurden über die Zielsetzung der Studie sowie die anonymisierte Verwendung von erhobenen Daten und gewonnenen Blutproben aufgeklärt. Die Studienteilnahme erfolgte auf freiwilliger Basis nach Einholung unterschriebener Einverständniserklärungen.

### **2.2 Studienteilnehmer**

#### **2.2.1 Kontrollen**

Als Kontrollgruppe (s. Tabelle 5, Seite 33) diente eine Stichprobe von 366 Probanden deutscher Abstammung aus der allgemeinen Bevölkerung Münchens, die per Zufallsauswahl über das Zentralverwaltungsreferat München ausgewählt wurden. Das Alter variierte bei einem Durchschnitt von 43 Jahren von 21 bis 69. Die prozentuale Verteilung von männlichen zu weiblichen Teilnehmern betrug 57.9 % gegenüber 42.1 %. In das Probandenkollektiv wurden nicht verwandte gesunde Personen aufgenommen, deren Rekrutierung in einem mehrstufigen Vorgehen erfolgte. Nach Erhalt einer positiven Rückantwort auf ein Einladungsschreiben mit Aufklärung über das Studienziel wurde in einem Telefonscreening nach psychiatrischen beziehungsweise hirnorganischen Erkrankungen bei den angerufenen Personen und ihren Verwandten ersten Grades gefragt. Bestanden hierzu keine klaren Hinweise, wurde die Erfassung einer ausführlicheren, schriftlichen somatischen und psychiatrischen Anamnese der Kontrollteilnehmer und ihrer Verwandten ersten Grades abgeschlossen.

Hierbei wurde nach Intervention von neurologischen oder psychiatrischen Kollegen, nach entsprechenden Vorerkrankungen, insbesondere depressiven oder manischen Episoden, weiterhin nach Phasen mit großer Angst, Essstörungen, Alkohol- oder Drogenkonsum, Suizidversuch, eventueller Lebensbeendigung durch Selbsttötung bei Verwandten und schließlich nach der Abstammung gefragt. Waren die Eingangskriterien erfüllt, wurden im nächsten Schritt die potentiellen Kontrollteilnehmer zu einem umfassenden Interview eingeladen.

Zur Anwendung kam das Strukturierte Klinische Interview zur Exploration gemäß der Klassifikation des DSM-IV der *American Psychiatric Association* in seiner vierten Revision, 1994 (DSM-IV dt.: Wittchen et al. 1996, SKID: Wittchen et al. 1997). SKID I ist als halbstrukturiertes klinisches Interview ein Verfahren zur Diagnosefindung von Achse I Störungen (Psychopathologie), SKID II dient zur Erfassung von Persönlichkeitsstörungen auf der Achse II. Psychiatrische Diagnosen unter Verwandten ersten Grades wurden mittels der *Family History Assessment* Module (Rice et al. 1995) aufgeklärt. Ein Studieneinschluss erfolgte nur bei negativer psychiatrischer Familienanamnese sowie bei Abwesenheit somatischer Krankheiten oder von Störungen der Achse I/II (lifetime).

Tab.5: Beschreibung der Kontroll- und Patientengruppe nach Alter und Geschlecht

Gruppe	Alter (Jahre) Mittelwert (SD)	Geschlecht n (%)		Gesamt n
		männlich	weiblich	
Kontrollen	43 (13)	212 (57.9)	154 (42.1)	366
Patienten	43 (15)	188 (51.2)	179 (48.8)	367
Gesamt n (%)		400 (54.6)	333 (45.4)	733

### 2.2.2 Patienten

Die Patientengruppe (Tabelle 5) bestand aus 367 schizophrenen Personen deutscher Herkunft. Sie zeigten einen Altersdurchschnitt von 43 Jahren (19 bis zu 70 Jahre). 51.2 % der Patienten waren männlichen und 48.8 % weiblichen Geschlechts.

Eine einführende standardisierte Anamneseerhebung umfasste die Lebensgeschichte seit der Kindheit, eigene Erkrankungen, Medikamenteneinnahme, Alkohol- und Drogenkonsum, ambulante nervenärztliche Therapie, stationäre psychiatrische Behandlung, eventuellen Suizidversuch, schulischen und beruflichen Werdegang, familiäre- und Wohnsituation. Das anschließende differenzierte Vorgehen wiederum nach dem SKID I in der klinischen Version ermöglichte die Auswahl der Patientenpopulation für die spezifische Studie. Besondere Sorgfalt wurde auf die Verifizierung der Diagnose nach den DSM-IV-Richtlinien gelegt.

Die vorliegende Erkrankung sollte durch mindestens zwei der fünf Merkmale Wahnvorstellungen, Halluzinationen, desorganisierte Sprechweise, grob desorganisiertes oder katatonisches Verhalten bzw. Negativsymptomatik wie flacher Affekt, Alogie oder Antriebshemmung gekennzeichnet sein. Lediglich ein Merkmal wird unabdingbar gefordert, wenn es sich um bizarre Wahnvorstellungen handelt oder die Halluzinationen aus kommentierenden oder dialogisierenden Stimmen bestehen. Als zeitliche Minimalvoraussetzung für das Bestehen der Störung sind sechs Monate vorgegeben, wovon mindestens für einen Monat die Symptome der akuten Episode erfüllt sein sollten. Während der Prodromal- und Residualphasen sind nach den Vorgaben auch negative Symptome hinreichend. Ein klinisch bedeutsames Leiden mit zumindest zeitweisem deutlichem Absinken des Funktionsniveaus im sozialen- oder Arbeitsbereich wird verlangt.

Differentialdiagnostisch waren eine schizoaffektive Störung, affektive Störung mit psychotischen Merkmalen, schizophreniforme, nur kurze oder nicht näher zu bezeichnende psychotische und rein wahnhaftige Störung auszuschließen. Zudem durfte die Erkrankung keine direkte Folge von Substanzmissbrauch bzw. Abhängigkeit (Medikamente, Drogen) oder eines allgemeinen medizinischen Krankheitsfaktors (z.B. von neurologischen und endokrinen Faktoren, Instabilität des Elektrolyt- und Flüssigkeitshaushaltes, Stoffwechsel-, Autoimmun- und anderweitigen somatischen Erkrankungen) sein.

Diesen Bedingungen ist zugrundeliegend, dass durch zahlreiche psychotrope Substanzen und organische Krankheiten nahezu das komplette Spektrum der

charakteristischen Symptomatik der Schizophrenie induziert werden kann. Auch Patienten mit florider Hepatitis B und C, HIV-Positivität oder anamnestischem Anhalt für intravenösen Heroinkonsum (lifetime Abhängigkeit) wurden von der Studienteilnahme ausgeschlossen.

Nach den Beurteilungsanleitungen des SKID I und den das klinische Bild bestimmenden Symptomen wurde die Unterteilung des phänomenologischen Subtypus in paranoid, kataton, desorganisiert, undifferenziert und residual vorgenommen. Der Schweregrad wurde hinsichtlich aktuellem und jemals gegebenem, ausgeprägtesten Ausmaß beurteilt. Bei Erfassung der Chronologie wurden weiterhin der Remissionsgrad, das Alter bei Erstmanifestation und Beginn eventueller prodromaler Symptome berücksichtigt sowie ein episodisches, kontinuierliches oder unspezifisches Verlaufsmuster unterschieden. Für die Unterteilung episodischer Abläufe waren eine Remission, Residualsymptome und, wie auch bei chronischem Verlauf, eine etwaige deutliche Negativsymptomatik mit bedeutsam. Eventuelle Komorbiditäten wurden mit den diagnostischen Sektionen für Alkohol- und Drogenmissbrauch/-abhängigkeit, Posttraumatische Belastungsreaktion, Panik-, Zwangs-, Angst-, Anpassungsstörung, Somatoforme- und Essstörung abgefragt.

### **2.3 DNA-Extraktion**

Von allen Studienteilnehmern wurde Blut venös abgenommen. Die Proben wurden kodiert, um Anonymität zu gewährleisten und bei – 80 °C konserviert. Zur Extraktion der genomischen DNA wurde ein Kit der Firma Qiagen gemäß der gegebenen Anleitung verwendet (Qiagen 2001).

Nach Auftauen des tiefgefrorenen EDTA-Blutes bei Raumtemperatur wurden jeweils 10 ml Blut zur Lyse der Leukozyten und Freisetzung der Nukleinsäuren mit 500 µl Proteinase K versetzt, um durch Verdauung und Degradierung der denaturierten Proteine zu kleineren Fragmenten eine leichtere Trennung von der DNA zu erreichen. Der anschließend zugegebene Guanidin-HCl-haltige Puffer führt zum Entzug der Hydrathülle der DNA, damit sie sich später an die

Silikagel-Säule zu binden vermag. Die Lösung wurde nun für 2 min auf dem Vortexer zur Vervollständigung der Zelllyse durchmischt und unter gleichzeitigem Schütteln im Wasserbad bei 70 °C für mindestens 30 min inkubiert, um einen maximalen DNA-Ertrag zu erhalten.

Um die DNA auf das Säulenmaterial zu fällen, wurde die Probe mit 10 ml Ethanol (100 %) versehen und sodann für 2 min auf dem Vortexer vermischt, auf die Silikamembran gegeben und sukzessive für 3 min bei 3000 rpm zentrifugiert. Hierbei sorgen Salz- und pH-Bedingungen dafür, dass RNA und Nukleinsäure-bindende Proteine ungebunden bleiben. Zur Entfernung von RNA- und Protein-Verunreinigungen wurde die Säule erst mit Guanidin-HCl haltigem Puffer, sodann zur Entfernung der Guanidiniumsalze mit ethanolhaltigem Waschpuffer gewaschen.

Die Elution von der Silikamembran erfolgte unter Zugabe von 1 ml eines Tris-haltigen Puffers (pH > 9.0). Die DNA-haltige Membran wurde dazu für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert und für weitere 5 min bei 5000 rpm zentrifugiert. Die unter saurem Milieu zuvor an die Silikamembran gebundene DNA ließ sich so mittels des basischen Tris-Puffers eluieren.

## 2.4 Bestimmung der DNA-Konzentration

Die DNA-Konzentration jeder einzelnen Probe wurde mittels dsDNA-spezifischem SYBR *Green I* Fluoreszenzfarbstoff (Molecular Probes, Eugene, Oregon) in einem Genios Mikrotiterplatten-Fluoreszenz-Leser (Fa. Tecan) bestimmt. Dabei wurde für die qualitativen SNP-Typisierungen eine Genauigkeit der DNA-Konzentration von ca. +/-10 % als hinreichend angesehen.

Die Konzentrationsbestimmung wurde in schwarzen 96 *well* Platten mit flachem Boden (Fa. Greiner) durchgeführt. Auf jeder zu messenden Platte wurde eine Standardkurve mitgemessen.

Die Standardkurve aus Lamda-Kontroll-DNA (100 µg/ml) wurde aus 8 Punktmessungen (0 / 0.001 / 0.01 / 0.1 / 0.125 / 0.25 / 0.5 / 1 ng/µl) erstellt. Zur weiteren Vorbereitung der Messplatte wurden 99 µl 0.2 x Tris-EDTA-Puffer (TE) vorgelegt und je 1 µl DNA zupipettiert. Je 2 wells pro Platte enthielten Kontroll-DNA definierter Konzentration (50 ng/µl) sowie den Leerwert (100µl 0.2 x TE). Das lichtempfindliche SYBR Green I wurde unmittelbar vor der Messung mit 0.2 x TE verdünnt (3.52 µl SYBR Green I Stammlösung mit 11 ml 0.2 x TE pro Platte). Zu jeder Probe inklusive der Lamda-Standard-DNA wurden jeweils 100 µl SYBR Green I Arbeitslösung zupipettiert, gut gemischt und zentrifugiert.

Nach einer Reaktionszeit von 5 - 10 min wurde die Fluoreszenz sofort mittels Photometer gemessen, da es bereits nach etwa 15 min zu einem deutlichen Abfall der Fluoreszenz kommt. Zur Bestimmung der Fluoreszenz wurde eine Anregungswellenlänge von 485 nm verwendet und die Emission bei 535 nm gemessen. Weitere Einstellungen des verwendeten Tecan Genios Gerätes waren die Messung von 10 Lichtblitzen bei einer optimalen Steigerung und ohne Verzögerung mit einer Integrationszeit von 40 µs.

Die ermittelten Werte wurden bezüglich der Standardkurve kalibriert (8-Punkt-Kalibrierung). Eine Überprüfung der Qualität der Standardkurve sollte mindestens einen Pearsonschen Korrelationskoeffizienten von 0.98 ergeben. Der optimale Messbereich dieser Methode liegt bei Konzentrationen zwischen 20 und 200 ng/µl. Bei Über- oder Unterschreiten dieses Bereiches wird eine neue Messung in anderer Verdünnung verlangt. Alle Proben wurden sorgfältig auf dieselbe Konzentration von 50 ng/µl eingestellt, anschließend erneut vermessen und mit 0.1 x TE auf 1 ng/µl verdünnt.

## 2.5 Genotypisierung

Die Genotypisierung wurde an drei, mit denen aus der Arbeit von Yang et al. 2003 identischen, SNPs vorgenommen. Die Assays für diese SNPs im NRG1-Gen (rs3924999 und rs2954041, dbSNP; National Center for Biotechnology Information (NCBI): <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP> sowie SNP8NRG221533; s. Tabelle 6, Seite 39) wurden mit Hilfe der Spectro Designer Software (Fa.

Sequenom, San Diego, CA) konzipiert. Im Anschluss daran wurden mittels „BLAST“ (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov:80/BLAST/>) die Primer und die zu amplifizierenden Sequenzen auf ihre Spezifität überprüft (s. Tabelle 7, Seite 39).

Die Genotypisierung der DNA-Proben erfolgte im Genom Analyse Zentrum der Gesellschaft für Strahlenforschung in München. Die Analysen wurden mittels des MASS ARRAY *Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-Of-Flight* Systems (MASS ARRAY MALDI-TOF System, Prinzip s. <http://www.pharmacogenomics.co.uk/admin/articlefile/PGS030412.pdf>) durchgeführt. Dieses Verfahren erlaubt bei hoher Sensitivität und Genauigkeit eine reproduzierbare, automatisierte Genotypisierung im Hochdurchsatz. Nach Bestimmung der molekularen Massen von allelspezifischen Primerextensionsprodukten lassen sich die Genotypen der untersuchten SNPs eindeutig feststellen.

Zunächst wurden jeweils Proben a´ 5 ng genomischer DNA durch die Polymerasekettenreaktion (PCR) amplifiziert. Hierzu wurde *Hot Star Taq* DNA-Polymerase (Fa. Qiagen) mit den PCR-Primern in einer finalen Konzentration von 167 nmol in einem Volumen von 6 µl zusammengeführt. Die PCR-Primer wurden um 10 Basen verlängert, um ihre Masse zu erhöhen, bis sie außerhalb des Messfensters lag.

PCR-Bedingungen waren 95 °C für 15 min, Denaturierung bei 95 °C für 30 s, Annealing bei 56 °C für 30 s, Extension bei 72 °C für 1 min für 44 Zyklen und eine abschließende Extension bei 72 °C für 10 min.

Die PCR-Produkte wurden mit *Shrimp Alkaline Phosphatase* ((SAP); Amersham) bei 37 °C für 20 min behandelt, um überschüssige dNTPs zu entfernen. Danach wurde die SAP durch Inkubation bei 85 °C über 10 min inaktiviert.

*Thermo sequenase* (Amersham) wurde für die basalen Extensionsreaktionen verwendet. Extensionsprimer wurden bis zur endgültigen Konzentration von 0.54 millimol in 10 µl Reaktionsvolumen zugesetzt.

Die Konditionen für die grundlegenden Extensionsreaktionen waren 94 °C für 2 min, gefolgt von 94 °C für 5 s, 52 °C für 5 s und 72 °C für 5 s bei 40 Zyklen. Sämtliche Reaktionen - Reverse Transkription, PCR-Amplifikation und basale

Extension - wurden in einem *Tetrad PCR Cycler* (M.J. Research) durchgeführt. Die Produkte der basalen Extension wurden mit SpectroCLEAN Granulat (Fa. Sequenom) behandelt, um die Salze im Reaktionspuffer zu entfernen.

Alle Pipettierschritte wurden mit einer Multimek 96 Kanal Autopipette (Fa. Beckman Coulter) ausgeführt und 16 µl der Granulat-Wasser-Suspension wurden in jedes *well* zugegeben, woraus sich ein Gesamtvolumen von 26 µl ergab. Nach Zentrifugation bei 2000 rpm für 3 min in einer Eppendorf Zentrifuge 5810, wurden 10 nl der Reaktionslösung mit einem ROBO Design Pintool Nanodispenser (Fa. Sequenom) auf einem 384-Format SpectroCHIP (Fa. Sequenom, <http://www.methexis-genomics.com/0206malditof.html>) verteilt. Dieser CHIP war bereits mit einer Matrix von 3-Hydroxypicolinsäure (3-HPA) beschichtet. Ein modifiziertes Bruker Biflex oder Autoflex MALDI-TOF SpectroCHIP-Massenspektrometer (Fa. Sequenom) wurde für die Datenaquisition von dem SpectroCHIP herangezogen.

Die Genotypen wurden mit der MASS ARRAY RT Software (Fa. Sequenom) bestimmt und manuell mit der Software SpectroTYPER RT 2.0 (Fa. Sequenom) überprüft. Massenspektren von konservativen Genotypen wurden auf Konsistenz kontrolliert. Massenspektren aller nicht eindeutigen Genotypen wurden individuell geprüft und mehrdeutige Genotypen verworfen.

Tab.6: Marker

ID / Accession No.	Contig Position	Chromosom 8 Position	Allel	Position im/zum Gen	Funktion
<b>rs3924999</b>	2774132	32511026	C/T	Exon 2	Basenaustausch Arg <-> Gln
<b>rs2954041</b>	2843400	32580294	G/T	Intron 5	Intron 5
<b>SNP8NRG221533</b>	1794915	31531809	C/T	5'Region nahe Promotor	unbekannt

Tab 7: Primer

ID / Accession No.	Primer 1	Primer 2	Fragmentlänge
<b>rs3924999</b>	5'-CCGATTCCTG GCTTTTCATC-3'	5'-TTGCCTGGTG ATCAGAGTTG-3'	108 bp
<b>rs2954041</b>	5'-GTTCTTCCCC TGATGTTATAC-3'	5'-GGGAACACAC ACTCGAAAAG-3'	153 bp
<b>SNP8NRG221533</b>	5'-AGGCATCAGT TTTCAATAGC-3'	5'-ATGTCTCAAG AGACTGGAAG-3'	118 bp

## 2.6 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung zu Allel- und Genotypverteilungen der drei Marker erfolgte mit Hilfe der Software *Statistical Package for Social Sciences* (SPSS 11.0; Inc Chicago, 2001, <http://www.csub.edu/ssric-trd/SPSS/SPSfirst.htm>).

Die Verteilung der Genotypen wurde mittels des Hardy-Weinberg-Gleichgewichts getestet. Es interessierten insbesondere die Unterschiede in der Allel- und Genotypverteilung zwischen Patienten und Kontrollen. Die Prüfung der Signifikanz der Unterschiede erfolgte mit dem  $\chi^2$  Test.

Das Ausmaß des Kopplungsungleichgewichtes zwischen zwei Markern wurde mit Lewontins  $D'$  geschätzt (Lewontin 1964). Zusätzlich wurde der  $\chi^2$  Test eingesetzt, um die Unabhängigkeit der Marker untereinander zu überprüfen.

Desweiteren wurde nach Unterschieden in den Haplotypfrequenzen zwischen der Patienten- und Kontrollgruppe gesucht.

Zur Kalkulation der Haplotypfrequenzen im Fall-Kontroll-Vergleich diente das Programm R: (*gap: genetic analysis package von R*, <http://www.maths.lth.se/help/R/.R/library/gap/html/hap.score.html>). Die

Frequenzen wurden zunächst mit dem *Expectation Maximization* (EM)-Algorithmus geschätzt (Excoffier und Slatkin 1995). Anschließend wurden die resultierenden Frequenzen unter Verwendung des *Score Testes* (Schaid et al. 2002, Dokumentation enthalten in *gap*), der auf generalisierten linearen Modellen basiert und empirische p-Werte ermittelt, einer Signifikanzprüfung unterzogen.

Für alle statistischen Berechnungen wurde ein Signifikanzniveau von  $p < 0.05$  festgelegt, während  $p < 0.1$  als Trend gewertet wurde.

### 3 Ergebnisse

Die untersuchten Marker und Haplotypen des NRG1-Gens sind auf Chromosom 8 in einer Region lokalisiert, zu der in der aktuellen Literatur signifikante Kopplungs- bzw. Assoziationshinweise beschrieben sind. Nach der Publikation von Yang et al. bestehen signifikante Differenzen in den Allel- und Genotypverteilungen der drei auch in dieser Arbeit untersuchten Einzelmarker, sowie in den Häufigkeiten der aus ihnen zusammengestellten Haplotypen bei chinesischen schizophrenen Patienten (Yang et al. 2003). Um diese Ergebnisse in einem kaukasischen Kollektiv zu replizieren, wurden 366 deutsche schizophrene Patienten und 367 deutsche gesunde Kontrollen mittels MALDI-TOF MS bezüglich der Marker rs392499, rs2954041 und SNP8NRG221533 genotypisiert.

#### 3.1 Analyse des Markers rs3924999 des Neuregulin 1 Gens

##### 3.1.1 Allelverteilung

Die statistische Auswertung ergab die in Tabelle 8 veranschaulichte Allelverteilung innerhalb der Kontroll- und Patientengruppe.

Tab.8: Darstellung der Allelverteilung des Polymorphismus rs3924999

Gruppe	T-Allel n (%)	C-Allel n (%)	Gesamt n
Kontrollen	268 (36.5)	466 (63.5)	734
Patienten	266 (36.4)	464 (63.6)	730
Gesamt	534 (36.5)	930 (63.5)	1464

Es fand sich kein signifikanter Unterschied in der Allel-Verteilung zwischen der Kontroll- und Patientengruppe.

$$\chi^2 = 0.001, \text{ OR} = 0.997 \text{ (CI} = 0.806 - 1.233\text{)}, \text{ df} = 1, \text{ p} = 0.977$$

### 3.1.2 Genotypverteilungen

Die Genotypen des Basenaustauschpolymorphismus rs3924999 waren in der Patientengruppe nicht innerhalb des Hardy-Weinberg-Gleichgewichtes verteilt.

Gruppe Kontrollen $\chi^2 = 0.188, df = 1, p = 0.664$	Gruppe Patienten $\chi^2 = 9.36, df = 1, p = 0.002$
--	--

Die möglichen Genotypen wurden wie folgt zugewiesen:

Genotyp 1 = homozygot T/T

Genotyp 2 = Heterozygotie für T/C

Genotyp 3 = homozygot C/C

Die Genotypverteilungen in den beiden Gruppen sind aus Tabelle 9 ersichtlich.

Tab.9: Darstellung der Genotypverteilung des Polymorphismus rs3924999

Gruppe	Genotyp 1 T/T n (%)	Genotyp 2 T/C n (%)	Genotyp 3 C/C n (%)	Gesamt n
Kontrollen	47 (12.8)	174 (47.4)	146 (39,8)	367
Patienten	62 (17.0)	142 (38.9)	161 (44.1)	365
Gesamt	109 (14.9)	316 (43.2)	307 (41.9)	732

Die Genotypverteilungen zeigten einen Trend bei höherer Frequenz von T/T und C/C in der Patientengruppe.

$\chi^2 = 6.032, df = 2, p = 0.049$
-------------------------------------

Tabelle 10 ist eine Zusammenstellung der Träger des C-Allels (T/C und C/C) gegenüber den Homozygoten für das T-Allel.

Tab.10: Darstellung der Häufigkeit der C-Träger (Genotypen 2 und 3) im Vergleich mit den homozygoten Trägern für das T-Allel (Genotyp 1) des Polymorphismus rs3924999

Gruppe	Genotyp T/T n (%)	Genotyp T/C und C/C n (%)	Gesamt n
Kontrollen	47 (12.8)	320 (87.2)	367
Patienten	62 (17.0)	303 (83.0)	365
Gesamt	109 (14.9)	623 (85.1)	732

## Ergebnisse

Die Genotypfrequenzen wiesen zwischen den beiden Gruppen keinen signifikanten Unterschied auf.

$$\chi^2 = 2.523, \text{ OR } 0.718 \text{ (CI } 0.476 - 1.082), \text{ df} = 1, \text{ p} = 0.112$$

In der Tabelle 11 wurden die T-Allel Träger (T/C und T/T) in eine Gruppe zusammengefasst und mit den Homozygoten für das C-Allel verglichen.

Tab.11: Darstellung der Häufigkeit der T-Träger (Genotypen 1 und 2) im Vergleich mit den homozygoten Trägern für das C-Allel (Genotyp 3) des Polymorphismus rs3924999

<b>Gruppe</b>	<b>Genotyp T/C und T/T</b> n (%)	<b>Genotyp C/C</b> n (%)	<b>Gesamt</b> n
Kontrollen	221 (60.2)	146 (39.8)	367
Patienten	204 (55.9)	161 (44.1)	365
Gesamt	425 (58.1)	307 (41.9)	732

Es war auch hier keine Assoziation zwischen den jeweiligen Genotypen und der Schizophrenie zu finden.

$$\chi^2 = 1.407, \text{ OR} = 1.195 \text{ (CI} = 0.890 - 1.603), \text{ df} = 1, \text{ p} = 0.235$$

## 3.2 Analyse des Markers rs2954041 des Neuregulin 1 Gens

### 3.2.1 Allelverteilung

Aus Tabelle 12 ergibt sich die Allelverteilung innerhalb der Kontroll- und Patientengruppe.

Tab.12: Darstellung der Allelverteilung des Markers rs2954041

<b>Gruppe</b>	<b>G-Allel n (%)</b>	<b>T-Allel n (%)</b>	<b>Gesamt n</b>
Kontrollen	713 (99.0)	7 (1.0)	720
Patienten	702 (98.9)	8 (1.1)	710
Gesamt	1415 (99.0)	15 (1.0)	1430

## Ergebnisse

Es fand sich kein Unterschied in der Allel-Verteilung zwischen Kontroll- und Patientengruppe. In beiden Gruppen war das T-Allel stark unterrepräsentiert.

$$\chi^2 = 0.082, \text{ OR} = 0.997 \text{ (CI} = 0.806 - 1.233), \text{ df} = 1, \text{ p} = 0.774$$

### 3.2.2 Genotypverteilungen

In der Kontroll- und Patientengruppe waren die Genotypen des Markers rs2954041 innerhalb des Hardy-Weinberg-Gleichgewichtes verteilt.

Gruppe Kontrollen $\chi^2 = 0.04, \text{ df} = 1, \text{ p} = 0.852$	Gruppe Patienten $\chi^2 = 0.04, \text{ df} = 1, \text{ p} = 0.82$
---	---

Die möglichen Genotypen wurden wie folgt beziffert:

Genotyp 1 = homozygot G/G

Genotyp 2 = Heterozygotie für G/T

Genotyp 3 = homozygot T/T

Die Genotypverteilung in den beiden Gruppen zeigt Tabelle 13.

Tab.13: Darstellung der Genotypverteilung des Markers rs2954041

Gruppe	Genotyp 1 G/G n (%)	Genotyp 2 G/T n (%)	Genotyp 3 T/T n (%)	Gesamt n
Kontrollen	353 (98.1)	7 (1.9)	0	360
Patienten	347 (97.7)	8 (2.3)	0	355
Gesamt	700 (97.9)	15 (2.1)	0	715

Der Genotyp G/T war in beiden Gruppen deutlich unterrepräsentiert, die Allelkombination T/T überhaupt nicht vorhanden. Die Genotypen 1 und 2 ergaben keine Assoziation mit der Schizophrenie.

$$\chi^2 = 0.083, \text{ df} = 1, \text{ p} = 0.773$$

## Ergebnisse

In Tabelle 14 wurden die T-Träger (Werte resultierend aus G/T bei fehlendem T/T) den Homozygoten für das G-Allel gegenübergestellt.

Tab.14: Darstellung der Häufigkeit der T-Träger (Genotypen 2 und 3) im Vergleich mit den homozygoten Trägern für das G-Allel (Genotyp 1) des Markers rs2954041

<b>Gruppe</b>	<b>Genotyp G/G</b> n (%)	<b>Genotyp G/T und T/T</b> n (%)	<b>Gesamt</b> n
Kontrollen	353 (98.1)	7 (1.9)	360
Patienten	347 (97.7)	8 (2.3)	355
Gesamt	700 (97.9)	15 (2.1)	715

Bei nicht existenter Allelkombination T/T, entsprechend dem Genotyp 3, sind die Zahlen der Genotypzusammenstellung aus G/T und T/T identisch mit denen der Heterozygoten aus Tabelle 13, Seite 44. Wiederum ergab sich kein signifikanter Unterschied in den Genotypfrequenzen zwischen den beiden Gruppen.

$\chi^2 = 0.083$ , OR = 0.860 (CI 0.309 – 2.398), df = 1, p = 0.773
---

In Tabelle 15 sind die Träger des G-Allels, bei ausschließlich aus G/T resultierenden Werten, mit den Homozygoten für das T-Allel verglichen. Die komplette Gegenüberstellung von Genotypen und die Prüfung auf signifikante Unterschiede war bei fehlender Repräsentanz von T/T nicht möglich.

Tab.15: Darstellung der Häufigkeit der G-Träger (Genotypen 1 und 2) im Vergleich mit den homozygoten Trägern für das T-Allel (Genotyp 3) des Markers rs2954041

<b>Gruppe</b>	<b>Genotyp G/T und G/G</b> n (%)	<b>Genotyp T/T</b> n (%)	<b>Gesamt</b> n
Kontrollen	360 (100)	0	360
Patienten	355 (100)	0	355
Gesamt	715 (100)	0	710

### 3.3 Analyse des Markers SNP8NRG221533 des Neuregulin 1 Gens

#### 3.3.1 Allelverteilung

Tabelle 16 veranschaulicht die Allelverteilung innerhalb der Kontroll- und Patientengruppe.

Tab.16: Darstellung der Allelverteilung des Polymorphismus SNP8NRG221533

Gruppe	T-Allel n (%)	C-Allel n (%)	Gesamt n
Kontrollen	458 (64.0)	258 (36.0)	716
Patienten	465 (64.4)	257 (35.6)	722
Gesamt	923 (64.2)	515 (35.8)	1438

Es konnte kein Unterschied in den Häufigkeiten der Allele zwischen Kontroll- und Patientengruppe gefunden werden.

$$\chi^2 = 0.030, \text{ OR} = 0.981 \text{ (CI } 0.791 - 1.217), \text{ df} = 1, \text{ p} = 0.863$$

#### 3.3.2 Genotypverteilungen

In der Analyse der Kontroll- und Patientengruppe waren die Genotypen des Basenaustauschpolymorphismus SNP8NRG221533 innerhalb des Hardy-Weinberg-Gleichgewichtes verteilt.

Gruppe Kontrollen	Gruppe Patienten
$\chi^2 = 0.01, \text{ df} = 1, \text{ p} = 0.912$	$\chi^2 = 0.004, \text{ df} = 1, \text{ p} = 0.952$

Die möglichen Genotypen wurden wie folgt beziffert:

Genotyp 1 = homozygot T/T

Genotyp 2 = Heterozygotie für T/C

Genotyp 3 = homozygot C/C

## Ergebnisse

Die Genotypverteilung in der Kontroll- und Patientengruppe zeigt Tabelle 17.

Tab.17: Darstellung der Genotypverteilung des Polymorphismus SNP8NRG221533

<b>Gruppe</b>	<b>Genotyp 1 T/T</b> n (%)	<b>Genotyp 2 T/C</b> n (%)	<b>Genotyp 3 C/C</b> n (%)	<b>Gesamt</b> n
Kontrollen	146 (40.8)	166 (46.4)	46 (12.8)	358
Patienten	150 (41.6)	165 (45.7)	46 (12.7)	361
Gesamt	296 (41.2)	331 (46.0)	92 (12.8)	719

Auch hier war kein signifikanter Unterschied in den Genotypfrequenzen zwischen den beiden Gruppen erkennbar.

$$\chi^2 = 0.045, df = 2, p = 0.978$$

In der nächsten Tabelle 18 wurden die C-Allel Träger (T/C und C/C) in eine Gruppe zusammengefasst und mit den Homozygoten für das T-Allel verglichen.

Tab.18: Darstellung der Häufigkeit der C-Träger (Genotypen 2 und 3) im Vergleich mit den homozygoten Trägern für das T-Allel (Genotyp 1) des Markers SNP8NRG221533

<b>Gruppe</b>	<b>Genotyp T/T</b> n (%)	<b>Genotyp T/C und C/C</b> n (%)	<b>Gesamt</b> n
Kontrollen	146 (40.8)	212 (59.2)	358
Patienten	150 (41.6)	211 (58.4)	361
Gesamt	296 (41.2)	423 (58.8)	719

Es konnte keine Assoziation mit der Schizophrenie festgestellt werden.

$$\chi^2 = 0.044, OR = 0.969 (CI 0.720 - 1.304), df = 1, p = 0.834$$

In Tabelle 19, Seite 48, finden sich nun die Träger des T-Alles (T/C und T/T) zusammengefügt und verglichen mit den Homozygoten für das C-Allel.

## Ergebnisse

Tab.19: Darstellung der Häufigkeit der T-Träger (Genotypen 1 und 2) im Vergleich mit den homozygoten Trägern für das C-Allel (Genotyp 3) des Markers SNP8NRG221533

Gruppe	Genotyp T/C und T/T n (%)	Genotyp C/C n (%)	Gesamt n
Kontrollen	312 (87.2)	46 (12.8)	358
Patienten	315 (87.3)	46 (12.7)	361
Gesamt	627 (87.2)	92 (12.8)	719

Wiederum ergab sich kein signifikanter Unterschied in den Genotypfrequenzen zwischen den beiden Gruppen.

$\chi^2 = 0.002$ , OR = 0.990 (CI 0.639 – 1.534), df = 1, p = 0.966
---

### 3.4 Analyse des Kopplungsungleichgewichtes zwischen den untersuchten Polymorphismen des Neuregulin 1 Gens

Das Kopplungsungleichgewicht (*Linkage Disequilibrium* (LD)) wurde in paarweiser Kombination der SNPs rs3924999 und SNP8NRG221533, die eine physikalische Distanz von 979217 bp aufweisen, in der Kontroll- und Patientengruppe untersucht. Der Marker rs2954041 wurde von der Berechnung ausgeschlossen, da in der vorliegenden Stichprobe der Genotyp T/T fehlte und das T-Allel insgesamt nur in minimaler Häufigkeit vorlag. Die resultierenden LD-Werte sind in der Tabelle 20 angeführt.

Tab.20: Resultate der paarweisen Untersuchung des Kopplungsungleichgewichtes zwischen den Markern rs3924999 und SNP8NRG221533 in der Kontrollgruppe (n = 359) und Patientengruppe (n = 363)

<b>rs3924999 ↔ SNP8NRG221533</b>			
Gruppe	D'	$\chi^2$	p
Kontrollen	0.032	0.245	0.621
Patienten	0.027	0.513	0.474

Die untersuchten Polymorphismen befanden sich weder in der Kontroll- noch in der Patientengruppe im Kopplungsungleichgewicht.

### 3.5 Analyse der Assoziation der Haplotypen

In einer Haplotypanalyse wurde auf Genotypebene im Vergleich der Marker rs3924999 und SNP8NRG221533 untersucht, ob eine Assoziation zur Schizophrenie vorliegt.

Bei u.g. Resultatezusammenstellung reflektiert die globale Score Statistik den globalen Wert über alle Haplotypen, die übrigen Scores (Tabelle 21) sind haplotypspezifisch.

Global-stat.= 0.445, df = 3, p = 0.931
--

Tabelle 21 gibt die Verteilung der Haplotypen innerhalb der Kontroll- und Patientengruppe und die Assoziationssignifikanz wieder. Der Marker rs2954041 wurde in die Analyse wiederum nicht einbezogen. Die verbleibenden vier Haplotypen ergeben sich aus den Genotypkombinationen der Marker rs3924999 und SNP8NRG221533.

Tab.21: Erwartete Haploptypfrequenzen und Assoziationssignifikanzen

Haplotypen	Kontrollen	Patienten	Score	p-Wert
T – C	0.409	0.413	0.410	0.682
T – T	0.241	0.232	-0.286	0.775
C – C	0.226	0.221	-0.354	0.724
C – T	0.125	0.133	0.191	0.848

Die Ergebnisse des globalen Score Testes und der haplotypspezifischen Scores, Tabelle 21, zeigen keine signifikanten Differenzen zwischen der Kontroll- und Patientengruppe. Der Haplotyp T – C war am häufigsten vertreten.

## **4 Diskussion**

### **4.1 Übersicht zu den experimentellen Befunden**

In dieser Arbeit wurde untersucht, ob Polymorphismen und Haplotypen des NRG1-Gens mit der Schizophrenie assoziiert sind. Dazu lassen sich aufgrund der Untersuchungsergebnisse folgende Aussagen treffen:

Es konnte keine Assoziation zwischen den untersuchten Markern und der Erkrankung festgestellt werden. Ein Marker (rs2954041) wurde von weiterführenden Statistiken und der Haplotypanalyse ausgeschlossen, da der Polymorphismus in dem untersuchten Kollektiv bei geringer Frequenz des T-Allels und Fehlen des Genotyps T/T nur sehr selten vorkam. In den Häufigkeiten der aus den beiden anderen Markern (rs3924999 und SNP8NRG221533) zusammengestellten Haplotypen zeigten sich zwischen Patienten- und Kontrollgruppe keine signifikanten Unterschiede. Diese Marker befanden sich weder in der Kontroll- noch in der Patientengruppe im Kopplungsungleichgewicht.

### **4.2 Diskussion der Ergebnisse im Horizont der Literatur**

Der folgende Abschnitt 4.2.1, Seite 51, bietet eine Übersicht zu der Referenzliteratur und beleuchtet die publizierten Ergebnisse vor allem im Hinblick auf Unterschiede im Studiendesign. Die Abschnitte 4.2.2, Seite 61, und 4.2.3, Seite 64, beinhalten dann eine kritische Beurteilung der Resultate dieser Arbeit im Vergleich zu denen der primären Referenzstudie bzw. der darüber hinaus zitierten Studien (s. Tabelle 4, Seite 30, und Tabelle 22, Seite 58). In diesem Zusammenhang werden auch Erklärungsmöglichkeiten für divergierende Befunde ausführlich diskutiert.

#### 4.2.1 Überblick zu Design und Resultaten von Referenzstudien

##### Studie von Yang et al. an Population von Han Chinesen

Die für diese Assoziationsstudie herangezogenen Marker (s. Abbildung 6, Seite 30, Tabelle 6, Seite 39) sind der Publikation von Yang et al. entnommen. In dieser Referenzstudie wurden 246 Familientrios mit Han-Chinesischer Abstammung untersucht. Von den Patienten waren bei einem mittleren Erkrankungsalter von 29 Jahren 138 (56 %) männlichen und 108 (44 %) weiblichen Geschlechts. Diagnostisch bestimmend waren die ICD-10-Kriterien (s. Tabelle 1, Seite 3), gemäß derer die Patienten als schizophren klassifiziert wurden.

Die Autoren berichten über starke Assoziationen von drei polymorphen genetischen Varianten des NRG1-Lokus. Bei allen Markern bestanden signifikante Differenzen in der Frequenz der Allel- und Haplotyp-Transmission zwischen den heterozygoten Eltern und ihren betroffenen Nachkommen.

Zwei der SNPs sind im mittleren Bereich des NRG1-Gens lokalisiert. Davon beinhaltet einer (rs3924999, G38A) einen G zu A Basenaustausch im zweiten Exon, wobei die aktuell diskutierten neuen Exons nicht mitberücksichtigt wurden, und führt zu einem Aminosäureaustausch von Arginin in Glutamin (Arg 38 Gln). Der zweite SNP (rs2954041), lokalisiert im fünften Intron, ist von Interesse, da von Yang et al. angenommen wird, dass er im Kopplungsungleichgewicht mit einem kausalen Locus für Schizophrenie stehen könnte. Eine eventuelle Kopplung zu anderen polymorphen Stellen im NRG1-Gen ist aber nicht auszuschließen. Der dritte SNP (SNP8NRG221533) nahe dem Promotor am 5´Ende des Gens ist identisch mit dem, der sich nach Stefansson et al. als am höchsten signifikant erwiesen hat und der folglich auch in den meisten der in den Tabellen 22, Seite 58, und 23, Seite 59, zusammengestellten Studien berücksichtigt wurde. Die Studie an der chinesischen Bevölkerungsgruppe belegt einen erweiterten gekoppelten Haplotyp-Block, der vom 5´Exon von NRG1 bis zum fünften Intron reicht (Yang et al. 2003).

### Studien von Stefansson et al. an isländischer und schottischer Population

Stefansson und Mitarbeiter erforschten mit Fall-Kontroll- und familienbasierten Assoziationsstudien drei Risiko-Haplotypen mit den Bezeichnungen A, B und C, bestehend aus 12 SNPs und vier Mikrosatellitenmarkern, die den NRG1-Lokus umspannen und einen einzelnen Kern-Risiko-Haplotypen mit eindeutiger Assoziation zur Schizophrenie teilen (s. Abbildung 3, Seite 14). Dieser Kern-Risiko-Haplotyp ist am 5'Ende des Gens lokalisiert und besteht aus fünf SNPs sowie zwei Mikrosatelliten-Markern. Er wird repräsentiert durch einen LD-Block mit einer minimalen Kombination von zwei Mikrosatelliten und dem SNP8NRG221533.

Einer dieser sieben SNPs liegt in dem Exon, welches die Typ II (GGF2) N-terminale Sequenz kodiert. Alle weiteren SNPs, inklusive des SNP8NRG221533, sind bis zu 22 kb von der Promotorregion in Richtung des 5'Endes verlagert. Der sieben Marker-Risiko-Haplotyp bildet die Grundlage für eine Reihe von Nachprüfungen in z.T. divergierenden Studiendesigns (s. Tabellen 4, Seite 30, 22, Seite 58 und 23, Seite 59).

An der Studie von Stefansson et al. nahmen 476 Patienten teil. Von diesen wurden 440 mit Schizophrenie, 32 mit schizoaffektiver Störung und 4 mit unspezifischer funktioneller Psychose diagnostiziert. Der sieben Marker Haplotyp wurde auf eine Frequenz von 7.5 % in der Kontrollgruppe und von 15.4 % in den isländischen Patienten geschätzt. Der Beitrag des Risiko-Haplotypen zum familiären Risiko für eine Schizophrenieentwicklung war aber gering und konnte nicht voll die zuvor an 33 isländischen Familien erhobenen Kopplungsergebnisse erklären. Die Autoren wiesen diesbezüglich darauf hin, dass noch andere Suszeptibilitätsgene in der 8p Region oder andere Risikoallele und Haplotypen für den Kopplungsnachweis in Frage kommen könnten.

Die direkte Replikation dieser Haplotypassoziation gelang an einer schottischen Population. Beim Vergleich von 609 Patienten mit nicht eindeutigem Ausschluss von schizoaffektiven Störungen und 618 nicht verwandten Kontrollen ergaben sich Frequenzen von 5.9 % respektive 10.2 % (Stefansson et al. 2002, 2003).

### Studie von Williams et al. an Population aus Irland und Großbritannien

Eine andere unabhängige Replikation bietet die Studie von Williams et al. In einer Population von 709 Patienten und 710 Kontrollen aus Irland oder Großbritannien wurde die minimale, den Kern-Risiko-Haplotypen definierende, Markerkombination aus einem SNP und zwei Mikrosatelliten analysiert. Die erhobenen Assoziationen waren aber wesentlich schwächer. Es wurden Häufigkeiten von 7.5 % in den Kontrollen gegenüber 9.5 % bei den Patienten (11.6 % im Fall einer familiären Schizophreniebelastung) gefunden, das relative Risiko lag bei 1.2 (Williams et al. 2003).

### Studie von Corvin et al. an irischer Population

Corvin et al. konnten möglicherweise aufgrund von unterschiedlich strukturierten Haplotypen keine Assoziation des Kern-Risiko-Haplotypen der isländischen und schottischen Bevölkerungsgruppe belegen. Sie untersuchten in einer unabhängigen Fall-Kontroll-Studie an einer irischen Stichprobe 243, zum Teil auch schizoaffektive Patienten und 222 Kontrollen. Sie genotypisierten drei SNPs, u.a. auch den SNP8NRG221533, und siebzehn Mikrosatelliten. Auf Einzelmarkerebene zeigten lediglich zwei der Mikrosatelliten ein signifikantes Resultat. Die Autoren identifizierten einen verfeinerten, mit der Schizophrenie assoziierten 2-Marker Haplotyp, benannt als HapB<sub>ire</sub>. Dieser bot ein signifikant häufigeres Auftreten unter den Patienten *versus* den Kontrollen bei Werten von 19.4 % gegenüber 12.3 %. Auch in der zum Vergleich herangezogenen schottischen Fallpopulation fand sich eine signifikante Häufigkeitsdifferenz des HapB<sub>ire</sub> von Patienten zu Kontrollen (17.0 % gegenüber 13.5 %) (Corvin et al. 2004).

### Studie von Tang et al. an Population aus Südchina

Die unabhängige Analyse von Tang et al. an 540 Patienten und 279 Kontrollen aus verschiedenen ethnischen Bevölkerungsgruppen Südchinas schloss dreizehn Mikrosatelliten ein, die von Stefansson zur Genotypisierung verwendet wurden, über 360 kb vom 5'Ende zum ersten Intron des NRG1-Gens weit reichen und insgesamt eine 800 kb Region von Chromosom 8 umspannen. Hinsichtlich der Marker des Kern-Risiko-Haplotyps erbrachte nur einer der in diesem inkludierten Mikrosatelliten eine Assoziation. Auch eine Haplotyp-

Kombination aus dem Mikrosatelliten und drei weiteren Markern, die in lokalisatorischem Bezug zu dem Kern-Risiko-Haplotyp standen, führte zu keinem signifikanten Ergebnis. Dagegen erreichten zwei von vier Haplotypgruppen, die anderen Mikrosatellitenregionen zugeordnet waren, eine signifikante Assoziation zur Schizophrenie. Gegenüber den Arbeiten von Stefansson et al. war somit in der Studie die Haplotyp-Zusammenstellung unterschiedlich, die geschätzte OR ergab auch einen geringeren Wert. Die statistischen Ergebnisse weisen aber erneut eine Assoziation des 5´Endes von NRG1 mit der Schizophrenie aus (Tang et al. 2004).

### Studie von Zhao et al. an Population von Han Chinesen

Zhao et al. gingen an einer Population von insgesamt 1724 Han Chinesen methodisch im kombinierten Design einer Fall-Kontroll-Studie (369 Patienten und 299 Kontrollen) und einer familienbasierten Analyse (353 Probanden mit ihren Eltern) vor. Es gelang keine erneute Replikation des sieben Marker Kern-Risiko-Haplotypen, vermutlich aufgrund der nur geringen Häufigkeit von weniger als 1 % in den chinesischen Kollektiven. Eine Haplotyp-Kombination aus fünf Markern des Kern-Risiko-Haplotypen ergab allerdings eine deutliche Assoziation im Fall-Kontroll-Vergleich und bei der Analyse der Trios. Zu den Einzelmarkern gehörten neben dem SNP8NRG221533 jeweils zwei andere SNPs und Mikrosatelliten-Marker. Zu keinem der fünf Einzelmarker fand sich im Fall-Kontroll-Vergleich und bei der Untersuchung der Familien-Trios eine Assoziation (Zhao et al. 2004).

### Studie von Li et al. an Population von Han Chinesen

Li et al. unternahmen einen Replikationsversuch an Schizophreniepatienten unter methodischer Anlehnung an Stefansson und Anwendung eines Familientrio- und Fall-Kontroll-Designs. In der Population von Han Chinesen bestanden die Kollektive aus 184 Familientrios und 138 Geschwisterpaaren mit ihren Eltern sowie für den Fall-Kontroll-Vergleich aus 298 Patienten der vorgenannten Familien und 336 nicht verwandten Kontrollen. Die Genotypisierung umfasste 25 Mikrosatelliten-Marker und 3 SNPs über eine Spannweite von 1.1 Mb des NRG1-Gens, inklusive von drei bzw. fünf Markern stellvertretend für den sieben Marker Risiko-Haplotyp. Auch in dieser chinesischen Population gelang keine

Replikation einer Assoziation zur Schizophrenie in den Haplotyp-Kombinationen der Einzelmarker des Kern-Risiko-Haplotypen.

Unter den nicht verwandten Patienten konnten sie einen neuen Haplotyp aus zwei Mikrosatelliten-Markern, HAP<sub>China 1</sub>, unmittelbar angrenzend an den Kern-Risiko-Haplotyp nach Stefansson in Richtung des 5´Endes isolieren. Dieser Haplotyp zeigte, bei einem relativen Risiko von 3.1, ein exzessives Vorkommen mit 11.9 % bei den Patienten gegenüber 4.2 % bei den Kontrollen. Bei Betrachtung von elterlichen Kontrollen war die Frequenz mit 9.2 % nicht signifikant erhöht, möglicherweise bedingt durch Populationsstratifikation. Ein zweiter neu beschriebener Haplotyp aus vier Mikrosatelliten-Markern, HAP<sub>China 2</sub>, mit Überlappung des isländischen Risiko-Haplotypen, zeigte ebenfalls deutlich signifikante Unterschiede bei Resultaten von 11.9 % für Patienten respektive 4.0 % für nicht verwandte Kontrollen und einem relativen Risiko von 2.2. Dieser Haplotyp war auch hinsichtlich elterlicher Kontrollen signifikant, das relative Risiko betrug hier 2.0. Ein weiterer Haplotyp, HAP<sub>China 3</sub>, war aus vier Mikrosatelliten-Markern zusammengesetzt, am 3´Ende des NRG1-Gens lokalisiert und überdeckte zahlreiche Exons. Bei einem relativen Risiko von 2.0 zeigte auch dieser Haplotyp signifikante Unterschiede in der Frequenz bei Werten von 23.8 % unter den Patienten und 13.7 % unter den verglichenen, nichtübertragenen elterlichen Haplotypen. Im Fall-Kontroll-Vergleich bestand dagegen keine signifikante Häufigkeitsdifferenz (Li et al. 2004).

#### Studie von Iwata et al. an japanischer Population

Iwata et al. fanden an einer japanischen Bevölkerungsgruppe von 515 Kontrollen und 607 Patienten mit bzw. ohne familiäre Schizophreniebelastung bezüglich des sieben Marker Risiko-Haplotypen keine Differenz der Häufigkeiten zwischen Patienten (4.5 %) und Kontrollen (4.3 %), die geschätzte OR betrug 1.13. Keiner der sieben Einzelmarker, inklusive des nach Stefansson in signifikantem Ausmaß bei irischen und schottischen Schizophreniepatienten nachgewiesenen C-Allels von SNP8NRG221533, war mit der Schizophrenie assoziiert. Es wurden auch ein Haplotyp aus fünf Markern des Kern-Risiko-Haplotypen und im Einklang mit dem Vorgehen von Williams und Kollegen der minimale Haplotyp aus drei Markern analysiert. Auch dabei konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen jeder der Patientengruppen und den

Kontrollen gefunden werden. Die Erstbeschreibungen zur Kopplung des NRG1-Lokus an 8p mit der Krankheit nahmen ihren Ausgang von Studien an europäischen Populationen. Im Gegensatz dazu erfüllte auch in japanischen Kopplungsstudien kein Locus auf Chromosom 8 die Kriterien für Signifikanz oder einen beträchtlichen Kopplungsnachweis (JSSLG 2003, Iwata et al. 2004).

#### Studie von Thiselton et al. an irischer Population

Thiselton et al. suchten nach geeigneten SNPs und Haplotypen für Kopplung als auch Assoziation zur Schizophrenie in einer Stichprobe aus 270 irischen Familien mit hohem Anteil an schizophrenen Personen. 1425 Individuen waren für die Genotypisierung verfügbar und wurden in drei diagnostische Kategorien eingeteilt. Zugewiesen wurden auch die Diagnosen Schizophrenia simplex, schizoaffektive und (non)affektive Störungen sowie psychotische Störungen, paranoide und schizoide Persönlichkeitsstörungen. Auch bei intensiver Analyse konnte in der von Stefansson ausgewiesenen Region auf Chromosom 8 kein vergleichbarer Hinweis auf Kopplung gefunden werden. Im Kontrast zum Kopplungsnachweis der isländischen Population konnten nur vorbestehende Befunde zu einem Kopplungssignal etwa 20 cM distal vom NRG1-Gen bestätigt werden (Kendler et al. 1996). Lediglich in einem über 250 kb in den Kern-Risiko-Haplotyp hineinreichenden Intervall konnten zwei Regionen mit geringem LD ausgemacht werden. Zu einer LD-Region gehörten drei SNPs, u.a. auch der Marker SNP8NRG255133, zu der zweiten vier Mikrosatelliten-Marker.

Im Bemühen um eine Replikation der Ergebnisse von Stefansson wurden die drei SNPs, welche die minimale, den Kern-Risiko-Haplotyp repräsentierende Kombination bilden, zwei andere SNPs des erweiterten sieben Marker Haplotypen und zusätzlich zwei Mikrosatelliten-Marker aus dem Intron 1 von NRG1 genotypisiert. Die beiden Mikrosatelliten-Marker entsprechen dem von Corvin et al. beschriebenen HapB<sub>ire</sub>. In den Analysen der acht insgesamt untersuchten Einzelmarker und von Haplotypen aus Kombinationen der drei SNPs, die den Kern-Risiko-Haplotyp kennzeichnen, war kein Assoziationsnachweis erbracht worden. In der Analyse von Haplotypen aus Markern der beiden schwachen LD-Regionen war keine erhöhte Transmission zu betroffenen Individuen feststellbar. Die Studie an der irischen Population mit

## Diskussion

hoher Dichte an Schizophrenie detektierte schlussendlich weder eine Assoziation mit dem Kern-Risiko-Haplotyp noch mit dem von Corvin et al. gefundenen HapB<sub>ire</sub> oder einer davon differierenden, bisher nicht publizierten, Haplotyp-Version (Thiselton et al. 2004).

## Diskussion

Tab.22: Vergleich der Studien aus Tab.4, Seite 30, und 23, Seite 59, nach Design, klinischem Testverfahren und Signifikanz des Einzelmarkers SNP8NRG221533

<b>Autor</b>	<b>Studiendesign</b>	<b>Klinische Testverfahren</b>	<b>p-Wert (SNP8NRG221533)</b>
<b>Stefansson 2002</b>	Kombination aus Kopplungsanalyse und Fall-Kontroll- bzw. familienbasierter Assoziationsstudie	RDC, SADS-L inklusive Diagnose schizoaffektiv und unspezifische Psychose	0.0028 im Fall-Kontroll-Vergleich
<b>Stefansson 2003</b>	Fall-Kontroll-Studie	DSM-III-R, SADS-L. Schizoaffektive Patienten nicht klar ausgeschlossen	0.00064
<b>Yang</b>	familienbasierte Studie	ICD-10. Strikte Beschränkung auf schizophrene Patienten fraglich	0.00420
<b>Williams</b>	Fall-Kontroll-Studie	DSM-III, SCAN oder PSE. Kaukasische Probanden mit oder ohne familiärer Schizophreniebelastung; bei Kontrollen psychiatrische Störung möglich, aber keine Medikation	keine Angabe
<b>Corvin</b>	Fall-Kontroll-Studie	DSM-IV, SCID. Bei Kontrollen psychiatrische Störung möglich, aber keine regelmäßige Medikation	0.724
<b>Tang</b>	Fall-Kontroll-Studie	DSM-III-R. Strikte Beschränkung auf schizophrene Patienten fraglich	nicht untersucht
<b>Zhao</b>	Fall-Kontroll- und familienbasierte Studie	DSM-III-R. Sicher schizophrene Patienten	0.56 im Fall-Kontroll-Vergleich, 0.18 bei Trios
<b>Li</b>	Fall-Kontroll- und familienbasierte Studie	DSM-III und IV, SCID. Strikte Beschränkung auf schizophrene Patienten fraglich	0.22 im Fall-Kontroll-Vergleich
<b>Iwata</b>	Fall-Kontroll-Studie	DSM-IV. Strikte Beschränkung auf schizophrene Patienten fraglich	0.42
<b>Thiselton</b>	Kombination aus Kopplungs- und Assoziationsanalyse, Familien mit hohem Anteil an Schizophrenie	Keine Angabe zum Testverfahren, aber schizoaffektive und (non)affektive Störungen sowie psychotische und Persönlichkeitsstörungen einbezogen	entsprechend drei diagnostischen Kategorien variierende Werte für Einzelmarker 0.548-0.833 bzw. für Haplotypen 0.53-0.55

RDC = Research Diagnostic Criteria; SADS-L = Lifetime version of Schizophrenia and Affective Disorders Schedule; SCAN = Schedules for the clinical Assessment in Neuropsychiatry; PSE = The measurement and Classification of Psychiatric Illness

Diskussion

Tab.23: Vergleich der Marker der zitierten Studien mit Referenz zu dem Risiko-Haplotyp nach Stefansson. Autorenbezeichnung: Sf = Stefansson, Wi = Williams, Co = Corvin, Ta = Tang, Zh = Zhao, Li = Li, Iw = Iwata, Th = Thiselton, Ya = Yang (Markierungshinweise s. Seite 60)

Marker	Sf	Wi	Co	Ta	Zh	Li	Iw	Th	Ya
rs3924999	-	-	-	-	-	-	-	-	X
rs2954041	-	-	-	-	-	-	-	-	X
SNP8NRG221533	•*+	•*+	•*+	-	•*+	•*+	•*+	•*+	•*+
SNP8NRG85307DEL25	•X	-	-	-	-	-	-	-	-
SNP8NRG103492	•X	-	-	-	-	-	-	-	-
SNP8NRG221132	•*	-	-	-	-	-	-	-	-
SNP8NRG241930	•*	-	•*	-	•*	•*	•*	•*	-
SNP8NRG243177	•*	-	•*	-	•*	•*	•*	•*	-
SNP8NRG249130	-	-	-	-	-	-	-	X	-
SNP8NRG433E1006	•*	-	-	-	-	-	-	-	-
SNP8NRG444511	• X	-	-	-	-	-	-	-	-
SNP8NRG449280	• X	-	-	-	-	-	-	-	-
SNP8NRG1575566	• X	-	-	-	-	-	-	-	-
478B14-428	-	-	-	-	-	-	-	X	-
478B14-848	•*+	•*+	•*+	•*+R3	•*+	•*+	•*+	•*+	-
420M9-1395	•*+	•*+	•*+ire	•*+R3	•*+	•*+C2	•*+	•*+	-
478B14-642	X	-	X	X R2	-	X C2	-	-	-
487-2	X	-	X	X R3	-	X C2	-	-	-
420M9-1	-	-	X	-	-	X	-	-	-
420M9-116112	-	-	X	-	-	-	-	X	-
420M9-3663	-	-	-	X R3	-	-	-	-	-
450K14-72458	-	-	X	-	-	-	-	-	-
473C15-439	-	-	X	X	-	X	-	-	-
473C15-533	-	-	X	-	-	-	-	-	-
72H22-1	-	-	X	X	-	X	-	-	-
72H22-36	-	-	X	-	-	-	-	-	-
29H12-1	-	-	X	-	-	X C1	-	-	-
29H12-7320	-	-	X	X R2	-	-	-	-	-
29H12-121L21	•X	-	•X	•X R2	-	•X	-	-	-
TSC0707270	•X	-	-	-	-	-	-	-	-
TSC0707290	•X	-	-	-	-	-	-	-	-
D8S1810	•X	-	•X ire	•X R3	-	•X C2	-	•X	-
D8S1711	-	-	X	X R2	-	X C1	-	-	-
D8S1769	-	-	-	X	-	X	-	-	-
D8S1770	-	-	X	X	-	X	-	-	-
317J8-1	-	-	-	-	-	X C3	-	-	-
317J8-2	-	-	-	-	-	X C3	-	-	-
317J8-2123	-	-	-	-	-	X C3	-	-	-
317J8-4858	-	-	-	-	-	X C3	-	-	-

## Diskussion

Tabelle 23 <b>schwarze Markierungen</b>	
•	Marker der 3 Risiko-Haplotypen nach Stefansson
*	Marker zur Festlegung des 7 Marker Kern-Risiko-Haplotypen
+	Marker des minimalen Haplotypen aus 1 SNP und 2 Mikrosatelliten-Markern zur Definition des Kern-Risiko-Haplotypen
X	Marker verwendet außerhalb des 7 Marker-Risiko-Haplotypen
Tabelle 23 <b>blaue Markierungen</b>	
• * +	Marker inkludiert in Haplotyp-Kombinationen des Kern-Risiko-Haplotypen mit Signifikanznachweis
x	Marker inkludiert in Haplotypen mit Signifikanznachweis, berücksichtigt sind nur Marker außerhalb des Kern-Risiko-Haplotypen oder von Haplotypen in anderen Studien
<b>C1-3</b>	Marker der HAP China 1-3 nach Li et al.
<b>R1-3</b>	Marker der Haplotypen aus Mikrosatelliten-Regionen 1-3 nach Tang et al.
<b>ire</b>	Marker des HapBire nach Corvin et al.

#### 4.2.2 Vergleich der Ergebnisse der untersuchten Einzelmarker und Haplotypen mit der primären Referenzstudie

Für eine Gegenüberstellung der Ergebnisse zu allen drei in dieser Arbeit untersuchten Markern lässt sich nur die Studie von Yang et al. heranziehen. Die familienbasierte Assoziationsanalyse an einer chinesischen Population bezog nach ICD-10-Kriterien klassifizierte Patienten neben elterlichen Kontrollen ein. Von den Patienten waren bei einem mittleren Alter von 29 Jahren 138 (56 %) männlichen und 108 (44 %) weiblichen Geschlechts. Alle drei SNPs standen im Kopplungsungleichgewicht. Hochsignifikante Werte konnten in der Allelübertragung für jeden einzelnen Marker (Tabelle 24), im globalen Test für die Haplotyp-Transmission ( $\chi^2 = 46.068$ ,  $df = 7$ ,  $p = 0.000001$ ) sowie für die geschätzten Haplotyp-Frequenzen, mit Ausnahme der Kombinationen TAT, CGG und TGG, ermittelt werden.

Tab.24: Transmission Disequilibrium Test für jeden Marker nach der Studie von Yang et al 2003

Marker	Allele	$\chi^2$	p-Wert
rs3924999	G A	9.0905	0.002584
rs2954041	T G	22.0458	0.0003103
SNP8NRG221533	C T	8.2	0.004202

Der Marker rs2954041 zeigte in der Population dieser Arbeit nur ein äußerst seltenes Vorkommen des T-Allels und der Genotyp T/T ließ sich im Gegensatz zu der von Yang et al untersuchten Population nicht finden (s. Tabelle 13, Seite 44). Zu dem Marker rs3924999 wurden von Yang et al. die Allele G und A statt der komplementären und damit vergleichbaren C/T-Kombination untersucht. Während in dieser Studie das C-Allel häufiger vertreten war (63.5 %), überwog in der chinesischen Population von Yang et al. das T- bzw. A-Allel (67 %). Auch bei dem SNP8NRG221533 war die Allelverteilung in beiden Studien genau umgekehrt. Entsprechend fielen auch die Genotypverteilungen in den beiden Studien unterschiedlich aus. Sämtliche angesprochenen Allel- und Genotypfrequenzen sind aus den Tabellen 25 und 26, Seite 62, ersichtlich.

Diskussion

Tab.25: Genotypverteilungen und Allel-Frequenzen für jeden der SNPs nach der Studie von Yang et al 2003 (Werte in Klammern ⇒ prozentualer Anteil von n)

Marker	Genotypverteilungen			Allel-Frequenzen	
	G/G(C/C)	G/A (C/T)	A/A (T/T)	G (C)	A (T)
<b>rs3924999</b>					
Eltern	33 (6.7)	243 (49.4)	216 (43.9)	309 (31.4)	675 (68.6)
Patienten	26 (10.6)	126 (51.2)	94 (38.2)	178 (36.2)	314 (63.8)
Gesamt	59 (8.0)	369 (50.0)	310 (42.0)	487 (33.0)	989 (67.0)
<b>rs2954041</b>	<b>T/T</b>	<b>G/T</b>	<b>G/G</b>	<b>T</b>	<b>G</b>
Eltern	64 (13.0)	262 (53.3)	166 (33.7)	390 (39.6)	594 (60.4)
Patienten	51 (20.7)	131 (53.3)	64 (26.0)	233 (47.4)	259 (52.6)
Gesamt	115(15.6)	393 (53.3)	230 (31.1)	623 (42.2)	853 (57.8)
<b>SNP8NRG221533</b>	<b>C/C</b>	<b>C/T</b>	<b>T/T</b>	<b>C</b>	<b>T</b>
Eltern	205(41.7)	205 (41.7)	82 (16.6)	615 (62.5)	369 (37.5)
Patienten	113(45.9)	102 (41.5)	31 (12.6)	328 (66.6)	164 (33.4)
Gesamt	318(43.1)	307 (41.6)	113 (15.3)	943 (63.9)	533 (36.1)

Tab.26: Genotypverteilungen und Allel-Frequenzen für jeden der SNPs nach der vorliegenden Studie (Werte in Klammern ⇒ prozentualer Anteil von n)

Marker	Genotypverteilungen			Allel-Frequenzen	
	C/C	C/T	T/T	C	T
<b>rs3924999</b>					
Kontrollen	146(39,8)	174 (47.4)	47 (12.8)	466 (63.5)	268 (36.5)
Patienten	161(44.1)	142 (38.9)	62 (17.0)	464 (63.6)	266 (36.4)
Gesamt	307(41.9)	316 (43.2)	109 (14.9)	930 (63.5)	534 (36.5)
<b>rs2954041</b>	<b>T/T</b>	<b>G/T</b>	<b>G/G</b>	<b>T</b>	<b>G</b>
Kontrollen	0	7 (1.9)	353 (98.1)	7 (1.0)	713 (99)
Patienten	0	8 (2.3)	347 (97.7)	8 (1.1)	702 (98.9)
Gesamt	0	15 (2.1)	700 (97.9)	15 (1.0)	1415(99)
<b>SNP8NRG221533</b>	<b>C/C</b>	<b>C/T</b>	<b>T/T</b>	<b>C</b>	<b>T</b>
Kontrollen	46 (12.8)	166 (46.4)	146 (40.8)	258 (36.0)	458 (64.0)
Patienten	46 (12.7)	165 (45.7)	150 (41.6)	257 (35.6)	465 (64.4)
Gesamt	92 (12.8)	331 (46.0)	296 (41.2)	515 (35.8)	923 (64.2)

Eine komplette Haplotypanalyse, wie von Yang et al. vorgenommen, war in dieser Arbeit bei Einschränkung der Berechnungen auf die beiden Marker rs3924999 und SNP8NRG221533 nicht möglich. Dennoch ist bemerkenswert, dass Yang et al. im Gegensatz zu den eigenen Resultaten nicht nur für die drei Einzelmarker, sondern auch in der Haplotyptransmission überwiegend signifikante Ergebnisse erhoben haben.

Für die beschriebenen Differenzen in den Resultaten kommen vielfältige Erklärungsmöglichkeiten in Betracht. Der auffälligste Unterschied der beiden Studien ist die Zusammensetzung der Populationen. Während Yang et al. ein chinesisches Kollektiv untersuchten, wurden in dieser Studie ausschließlich kaukasische bzw. deutsche Probanden herangezogen. Da die in dieser Arbeit untersuchte Stichprobe größer ist als die von Yang et al. kommt eine zu geringe Stichprobengröße als Ursache eher nicht in Frage.

Eine weitere Ursache für die unterschiedlichen Ergebnisse könnte im Studiendesign liegen, da hier eine Fall-Kontroll-Studie verwendet wurde im Gegensatz zur familienbasierten Studie von Yang et al.. Die Varianz in der prozentualen Geschlechterverteilung bei beiden Gruppen und im mittleren Alter der Patienten (vgl. mit Tabelle 5, Seite 33) dürften ebenso wie die der klinischen Tests zur Diagnoseerhebung (ICD-10 und DSM-IV, s. Tabellen 1, Seite 3 und 22, Seite 58) demgegenüber von eher untergeordneter Bedeutung sein. Während in der vorliegenden Studie nur rein schizophrene Patienten untersucht wurden, ist allerdings nicht auszuschließen, dass Yang et al. eventuell auch schizoaffektive Patienten oder Patienten mit anderen Diagnosen aus dem schizophrenen Formenkreis mit aufgenommen haben. Die in dieser Arbeit erhobenen negativen Assoziationsresultate für Haplotypen könnten auch dadurch mitbedingt sein, dass die Marker rs3924999 und SNP8NRG221533 untereinander nicht im Kopplungsungleichgewicht stehen.

Insbesondere in Bezug auf den SNP rs3924999 wäre die erfolgreiche Replikation einer Assoziation zur Schizophrenie interessant gewesen. Dieser SNP führt wie zuvor erläutert zu einem Aminosäureaustausch. Ob damit eine eindeutig pathogenetisch relevante Auswirkung auf Proteinniveau verbunden ist, bleibt jedoch zu klären. Für die beiden anderen Marker sind dagegen keine funktionellen Auswirkungen beschrieben. Der in einem Intron lokalisierte Marker rs2954041 und der SNP8NRG221533 nahe der Promotorregion am 5'Ende des NRG1-Gens könnten stille Veränderungen sein. Theoretisch sollten diese Polymorphismen die Bioaktivität des NRG1-Proteins nicht ändern können, dafür bestünde aber die Möglichkeit eines quantitativen Einflusses auf die NRG1-Genexpression. Weiterhin könnten sie sich im Kopplungsungleichgewicht zu

einem kausalen Schizophrenielokus befinden. Der Polymorphismus SNP8NRG221533 könnte darüber hinaus eventuell bei seinem unmittelbaren lokalisatorischen Bezug zum Promotor über einen noch nicht identifizierten Weg dessen regulatorische Funktion auf z.B. die Transkription mit beeinflussen.

#### **4.2.3 Abschließende Beurteilung der Ergebnisse der untersuchten Einzelmarker und Haplotypen im Kontext der Literatur**

Der Entdeckung von NRG1 und seiner Verifizierung als Kandidatengen der Schizophrenie lagen eine Reihe von Kopplungs- und Assoziationsstudien zugrunde. Durch verschiedenste Marker auf dem NRG1-Gen und die Bildung eines Haplotypen, der eine signifikante Assoziation mit der Schizophrenie zeigte, wurde NRG1 schließlich als interessantes Kandidatengen ausgewiesen (Stefansson et al. 2002). Die von der Untersucherguppe um Levinson durchgeführte Metaanalyse über Schizophrenie Genomscans ergab eine signifikante statistische Unterstützung für Chromosom 8p als einem Suszeptibilitätsloкус der Krankheit. Auch in einer groß angelegten Metaanalyse von Lewis et al. war ein stark signifikanter Kopplungshinweis für den NRG1-Lokus 8p zu finden (Levinson et al. 2002, Lewis et al. 2003). Die von Stefansson et al. gefundene Region mit dem höchsten *Logarithm of Odds* (LOD)Score auf dem kurzen Arm von Chromosom 8 lag 10 bis 15 cM näher zum Centromer, ein Unterschied, der auf eine geringere Markerdichte bzw. Unsicherheiten beim *Mapping* in vorangegangenen Studien zurückgehen könnte (Kendler et al. 1996, Stefansson et al. 2002, Straub et al. 2002b). Chromosom 8 gilt als problematisch im Hinblick auf Sequenzanalysen und Markerzuordnung bei Deletionen oder Inversion von Polymorphismen (Giglio et al. 2001, Yu et al. 2002).

Im Überblick der in den Tabellen 22, Seite 58 und 23, Seite 59, angeführten weiteren Referenzliteratur ist von den drei Markern aus dieser Studie ausschließlich der Polymorphismus SNP8NRG221533 untersucht worden.

Die Studienlage verdeutlicht teilweise signifikante Assoziationsnachweise für den Einzelmarker und/oder für mit diesem konzipierte Haplotypen (Stefansson

et al. 2002, 2003, Williams et al. 2003, Zhao et al. 2004, s. Tabellen 4, Seite 30 und 22, Seite 58). Andererseits finden sich auch widersprüchliche und negative Befunde (Corvin et al. 2004, Iwata et al. 2004, Li et al. 2004, Thiselton et al. 2004, Tabellen 4 und 22). Mit Ausnahme der Studien von Iwata et al. und Thiselton et al. bieten alle in Tabelle 4 wiedergegebenen Arbeiten positive Assoziationen von Haplotypen überwiegend unterschiedlicher Zusammensetzung und damit Anhaltspunkte, dass das NRG1-Gen als Faktor für die Prädisposition eines Individuums zur Schizophrenie in Frage kommt. Sämtlichen zitierten Referenzstudien ist die Aussage gemeinsam, dass kein individueller Haplotyp oder Einzelmarker den gleichen Grad an Assoziation wie die übergeordneten Haplotypen in den globalen Tests erreicht.

Für die unterschiedlichen Ergebnisse der Studien, die die Assoziation des NRG1-Gens mit der Schizophrenie untersuchten, gibt es mehrere Erklärungsmöglichkeiten:

#### Ethnische Abstammung

Wie schon oben beschrieben kann die ethnische Abstammung der Studienpopulationen für differierende Resultate verantwortlich sein. Die bisher durchgeführten Studien zum NRG1-Gen fanden in verschiedensten Populationen statt, wie Tabelle 4, Seite 30, zu entnehmen ist. Für unterschiedliche ethnische Gruppen würden auch differierende assoziierte Haplotypen erwartet werden, selbst wenn die potentiellen Risikoallele dieselben wären. Der Umstand, dass keine Identifikation des Risiko-Haplotypen nach Stefansson vor allem in asiatischen Studien gelang, ist wenig überraschend, da nordeuropäische und chinesische Bevölkerungen seit Tausenden von Jahren getrennt sind und sich differierende Beziehungen zwischen Risiko-Haplotypen und zugrundeliegenden pathologischen Varianten entwickelt haben können. Das Ausmaß an Beständigkeit von Haplotypen und ihren Blockstrukturen über ethnische Gruppen hinweg ist unklar. Faktoren wie genetischer Drift, Selektion, Mutation und geplante, nicht zufallsgeleitete Paarung können profunde Effekte auf die Haplotyp-Strukturen haben (Cardon und Abecasis 2003). Eventuell existieren dieselben, bis heute nicht identifizierten, die Schizophrenie verursachenden, genetischen Varianten in europäischen und asiatischen

Populationen. Denkbar ist auch eine Heterogenität der NRG1-Loci mit mehreren, in Auftreten und Häufigkeit zwischen geographischen Populationen differierenden, Risikoallelen oder die Assoziation multipler, seltener Allele mit variierenden Haplotypen.

### Diagnoseverfahren und Einschlusskriterien

Auch divergierende klinische Testverfahren und Einschlusskriterien bei der Diagnosestellung können die Assoziationsergebnisse beeinflussen. Während ICD-10 und DSM-IV hierbei zahlreiche Gemeinsamkeiten zeigen, unterscheiden sich die anderen in den Referenzstudien angewandten diagnostischen Methoden deutlicher (s. Tabelle 22, Seite 58).

Im Gegensatz zum Vorgehen in dieser Studie wurden von manchen Untersuchern auch Probanden mit Erkrankungen des schizophrenen Spektrums einbezogen. Zu diesen zählen *per definitionem* schizoaffektive Störungen, schizotype Persönlichkeitsstörungen und andere Psychosen, inklusive psychotische affektive Störungen. Eine gemeinsame familiär-genetische Grundlage kann insbesondere für die Schizophrenie und die schizoaffektiven Erkrankungen postuliert werden (Maier et al. 1999). Psychotische Störungen sind inkludiert in breite diagnostische Kategorien, und obwohl die diagnostischen Kriterien für die Schizophrenie mit den aktuellen Klassifikationssystemen enger definiert worden sind, ist die Ansicht verbreitet, dass die Krankheit nicht eine einzige Störung sondern eine Mischung aus verschiedenen miteinander verwandten Störungen sein könnte (Stefansson et al. 2004). Die Beschränkung bei der Patientenrekrutierung auf ausschließlich an Schizophrenie leidende Personen könnte im Falle eines nicht divergierenden genetischen Spektrums dann eine unwesentliche Vorbedingung gewesen sein.

Auch die Wahl der Kontroll-Probanden stellt eine mögliche Ursache für divergierende Ergebnisse dar. So könnte es bei den Kontroll-Probanden zwischen den einzelnen Studien Unterschiede in Alters- und Geschlechtsverteilung, Familienanamnese, Verwandtschaftsgrad, ethnischer Zugehörigkeit usw. geben.

### Studiendesign

Weitere Erklärungsmöglichkeiten für die variierenden Resultate in den Studien können Populationsstratifikation oder ungenügende Stichprobengröße sein. Außerdem ist das Studiendesign nicht unerheblich. Fall-Kontroll-Studien haben im Vergleich zu familienbasierten Studien, die den *Transmission Disequilibrium Test* (TDT) heranziehen, mehr statistische Power zur Detektierung von Assoziationen, da im TDT in der Kontrollgruppe nur Eltern, die heterozygot zu den in Frage kommenden Loci sind, effektive Informationen bieten. Der TDT vermeidet dagegen falsch-positive Assoziation durch Populationsstratifikation, die sich in Fall-Kontroll-Studien auch bei sorgfältiger Auswahl der Gruppenteilnehmer als störender Faktor nicht gänzlich ausschließen lässt. Der TDT ist auch robuster bei genetischer Heterogenität und hat eine größere statistische Macht. Zusätzlich zur Assoziationsinformation der nicht transmittierten elterlichen Anteile nutzt dieser Testansatz auch die Kopplungsinformation, die in der Segregation der elterlichen Anteile enthalten ist. Eine Entdeckung von Kopplung gelingt aber nur, wenn eine Assoziation vorhanden ist. Umgekehrt kann nur bei vorliegender Assoziation ein Kopplungshinweis gefunden werden.

Auf dem Hintergrund der Problemstellung einer unübersichtlichen Populationsstruktur in Assoziationsstudien als Folge der Mischung ethnischer, in der Häufigkeit der Krankheit oder der Markerallele differierender Gruppen, wurden schließlich Analysemethoden mit Familienmitgliedern als „interne Kontrollen“ populär (Sham und McGuffin 2002). Aber bezüglich der Fragestellung einer Assoziation mit der Schizophrenie ist die genetische Ausgangssituation gesunder Kontrollen gegenüber selbst nicht betroffenen Eltern ungleich. Die Auswertungsverfahren, welche Assoziation unter Verwendung von Haplotypen untersuchen, besitzen eine größere statistische Aussagekraft bei der Feinkartierung als herkömmliche Assoziationsstudien. Da die ermittelten Assoziationen überwiegend mit nur geringen Effekten verbunden sind, lässt sich aber nicht vollständig erklären, wie überhaupt eine Detektion der betreffenden Regionen durch Kopplung gelingen konnte. Weitere Replikationsversuche erfordern demgemäß große Stichproben, die eine höhere analytische Aussagekraft gewährleisten (McGuffin et al. 2003).

### Heterogenität

Eine weitere Erklärung dafür, dass das NRG1-Gen, einzelne SNPs oder Haplotypen in manchen Studien mit der Schizophrenie assoziiert sind, während andere Studien keine Suszeptibilität von NRG1 zur Schizophrenie nahelegen, ist die Heterogenität erstens der Krankheit und zweitens der für sie verantwortlichen Gene. Unter optimalen Umständen erklärt eine einzelne Mutation oder ein einzelner SNP bzw. ein Haplotyp einen großen Anteil des Phänotypen sowie der klinischen Ausprägung einer Erkrankung. Solche Umstände existieren im Falle der Schizophrenie praktisch nicht. Wie in der Einleitung beschrieben, ist das Krankheitsbild der Schizophrenie sehr heterogen. Dies macht es problematisch, einen bestimmten Genotyp einem bestimmten Phänotyp zuzuordnen. Außerdem sind bei dieser Erkrankung Lokus- und Allel-Heterogenität üblich.

Da es sich wahrscheinlich um eine nicht nur multifaktorielle sondern auch polygenetische Krankheit handelt, können bei einigen Patienten die einen und bei einigen Patienten andere Gene Ursache für dieselbe Krankheit sein, wenn man davon ausgeht, dass viele Gene mit einem kleinen Effekt zur Entstehung beitragen. So könnte es also sein, dass in manchen der hier erwähnten Studien durchaus das NRG1-Gen ätiologisch bedeutsam war, während es in anderen Studien respektive Populationen keine so große Rolle spielte und deshalb nicht als mit der Schizophrenie assoziiert gefunden wurde.

Genauso kann es nicht nur Unterschiede zwischen einzelnen Genen geben, sondern auch innerhalb eines Gens könnten mehrere Loci krankheitsverursachend sein. Dies würde auch erklären, warum einzelne SNPs oder Haplotypen im NRG1-Gen teilweise positiv und in anderen Studien wieder negativ getestet wurden.

Aufgrund der Studienlage mit Überwiegen von positiven Assoziationen, kann aber davon ausgegangen werden, dass NRG1 oder ein Nachbar-Gen an der Pathophysiologie der Schizophrenie beteiligt sind. Ein Nachbar-Gen kommt in Frage, weil es auch möglich ist, dass die bisher gefundenen assoziierten SNPs oder Haplotypen an eine dort lokalisierte, noch nicht identifizierte, letztendlich pathogenetische bzw. funktionelle Mutation gekoppelt sind. Eine solche

pathogenetische und/oder funktionelle Variante könnte aber auch im kodierenden Abschnitt des NRG1-Gens liegen und dann zu einer Veränderung von NRG1 auf Proteinebene führen. Der Polymorphismus könnte zudem im Intron, Promotor oder sonstwo liegen und über die Regulation der Genexpression seine krankheitsbegünstigende Wirkung entfalten. Da es sich bei dem NRG1-Gen um ein sehr großes Gen mit zahlreichen Polymorphismen und verschiedenen LD-Blocks handelt, ist es nicht verwunderlich, dass bei mehreren potentiellen Varianten die pathogenetische Veränderung noch nicht gefunden wurde, denn es gibt bei so vielen SNPs natürlich auch ein Vielfaches an Haplotyp-Möglichkeiten.

### **4.3 Ausblick auf zukünftige Untersuchungen**

Die vorliegende Arbeit konnte die Ergebnisse der Assoziationsstudie von Yang et al. bezüglich des NRG1-Gens und der Schizophrenie nicht bestätigen. Ebenso sind die Ergebnisse anderer Studien, die die Assoziation von NRG1 und Schizophrenie untersucht haben, inkonsistent. Um zu klären, ob erstens das NRG1-Gen zur Suszeptibilität der Schizophrenie beiträgt und zweitens wie es pathophysiologisch wirkt, sind weitere Untersuchungen nötig.

Zunächst einmal wäre es wichtig, Replikationsstudien in noch viel größeren Stichproben durchzuführen. Möglicherweise existieren viele gemeinsame Varianten im NRG1-Gen mit moderaten aber realen Effekten auf das Krankheitsrisiko. Studien mit größeren Stichprobenumfängen könnten auch solche Varianten identifizieren. Dabei sollte außerdem auf eine exakte und sichere Diagnose der Patienten geachtet werden. Ferner sollten die Studien in verschiedenen ethnischen Populationen kontrolliert werden. Vor allem sollten ausreichend viele Polymorphismen, die sämtliche LD-Blocks des NRG1-Gens abdecken, ausgewählt werden. Problematisch hierbei wird wiederum die Heterogenität des klinischen Bildes der Schizophrenie sein.

Es findet sich bei zugrundeliegender genetischer Prädisposition keine ubiquitär nutzbare pathophysiologische Erklärung für die Vielfalt klinischer Manifestationen. Kopplungs- und Gen-Identifikation wurden stets durch die Verwertung klassischer klinischer Phänotypen erreicht. Die alleinige klinische Charakterisierung des Phänotyps durch psychopathologische Merkmale ist aber unzureichend.

Zur Differenzierung könnte die Erfassung von neuropsychologischen und neurophysiologischen Normabweichungen zur Definition von sogenannten Endophänotypen einen wesentlichen Fortschritt bieten. Die Identifikation dieser Vulnerabilitätsmarker könnte bei Personen im Risikoalter im Hinblick auf die Früherkennung und Frühintervention bei schizophrenen Störungen klinisch bedeutsam werden. Die Endophänotypen sind weiterhin möglicherweise unmittelbarer als die klinischen Phänotypen Ausdruck bestimmter Genotypen und könnten sich daher auch besonders für molekulargenetische Untersuchungen eignen.

Im Bemühen um das Verständnis, wie Gene die Schizophrenie beeinflussen können, ist die Untersuchung von Genen auf Assoziation mit der Erkrankung nur der erste Schritt. So sind sorgfältige Untersuchungen der Effekte der assoziierten SNPs und Haplotypen auf Expression und Funktion des Genproduktes erforderlich. Es muss verstärkt nach der funktionellen bzw. pathogenetischen Variante im NRG1-Gen oder einem seiner Nachbargene gesucht werden, um dann mit Hilfe molekularbiologischer Methoden die pathophysiologischen und kausalen Zusammenhänge zu identifizieren.

Erst wenn dies gelingen sollte, wäre bestätigt, dass das NRG1-Gen mit der Schizophrenie assoziiert ist. Dann stünden auch Möglichkeiten offen, neue Medikamente zu entwickeln, die kausal die Schizophrenie therapieren könnten. Im Bereich der Pharmakogenetik würde dies auch bedeuten, dass Art und Dosierung der Medikation in Abhängigkeit vom Genotyp der Patienten individuell angepasst werden könnten.

Mit dem besseren Verständnis der Pathogenese ist zudem die Hoffnung verbunden, Präventivmaßnahmen gegen den Ausbruch der Schizophrenie ergreifen zu können oder eine zuverlässigere Diagnose zu stellen. Dazu müsste aber auch geklärt werden, wie groß der Anteil des NRG1-Gens an der Suszeptibilität der Schizophrenie ist. Dies kann nur gelingen, indem die Suche nach weiteren Suszeptibilitätsgenen konsequent fortgesetzt wird, ferner Interaktionen zwischen dem NRG1-Gen und der Umwelt sowie anderen Genen erforscht werden.

## 5 Zusammenfassung

Die Schizophrenie ist eine schwerwiegende chronische, psychiatrische Störung mit noch weitgehend ungeklärter multifaktorieller Ätiologie bei einer ausgeprägten Heritabilität und einem Lebenszeiterkrankungsrisiko von annähernd 1 %. Bei der Suche nach kausalen chromosomalen Loci und Genen wurden multiple Gene mit jeweils nur geringen Beiträgen zur Entstehung und Ausprägung der Erkrankung gefunden. Bisher gelang aber noch kein Nachweis von klar pathogenetischen Mutationen. Eine definitive Bestätigung von spezifischen Genen als wahre Suszeptibilitätsgene für die Schizophrenie könnte das pathogenetische Verständnis verbessern und den Fortschritt in der gezielten Entwicklung neuer Medikamente unterstützen.

NRG1 ist ein Kandidatengen auf Chromosom 8p, das sowohl in Kopplungs- als auch Assoziationsstudien als Risikogen für die Schizophrenie identifiziert wurde. Das Neuregulinsystem partizipiert an der Regulation von Proliferation, Migration und Differenzierung von Neuronen und Glia. Damit verbunden ist eine zentrale Rolle in der neuronalen Entwicklung und der Regulation synaptischer Plastizität sowie in der Antwort oder Adaptation des Gehirns auf Umwelteinflüsse. Die Umwelt beeinflusst das Gehirn durch individuelle Erfahrungen, auf die eine Antwort des zentralen Nervensystems durch synaptische Remodellierung erfolgt, die wiederum durch NRG1 reguliert wird. Darüber hinaus beeinflusst NRG1 multiple Neurotransmitter-Systeme. So greift NRG1 in die Regulation von Neurotransmitter-Rezeptoren (NMDA-, GABA-, neuronalen nikotinergen Acetylcholin-Rezeptoren) und anderen neuronalen Ionenkanälen ein. Defizite in der NRG1-Expression und/oder -Funktion können außerdem über Alterationen der hormonellen Regulation die Krankheitsentwicklung möglicherweise begünstigen. Es ist noch nicht vollständig geklärt, wie NRG1 zur Suszeptibilität der Schizophrenie beiträgt.

In der vorliegenden Arbeit wurde eine Fall-Kontroll-Assoziationsstudie zur Untersuchung der Beziehung zwischen drei Markern des NRG1-Gens und der Schizophrenie an 367 deutschen schizophrenen Patienten und 366 deutschen gesunden Kontrollprobanden durchgeführt.

Die drei SNPs (rs3924999, rs2954041, SNP8NRG221533) wurden von Yang et al. in einer familienbasierten Assoziationsstudie als mit der Schizophrenie signifikant assoziiert beschrieben. Da es sich um ein chinesisches Kollektiv handelte, sollte in dieser Arbeit untersucht werden, ob sich die Ergebnisse in einem deutschen Kollektiv replizieren lassen.

Weder bei der Untersuchung von Allel- und Genotypfrequenzen noch bei der Analyse der Häufigkeiten von Haplotypen konnte in der deutschen Population eine Assoziation mit der Schizophrenie ermittelt werden.

Die naheliegendste Erklärung für die Unterschiede zwischen den Ergebnissen dieser Arbeit und denen von Yang et al. ist die, dass es in der chinesischen Population andere Risikoallele gibt als in der deutschen. Eine weitere Ursache könnte das unterschiedliche Testverfahren sein, da hier eine Studie mit nicht verwandten Kontrollprobanden gegenüber der Studie von Yang et al. mit elterlichen Kontrollen durchgeführt wurde. Trotz einer sehr sorgfältigen Auswahl sowohl des Patienten- als auch des Kontrollkollektivs mit klar definierten Ein- und Ausschlusskriterien in dieser Studie könnten auch diagnostische Unterschiede verantwortlich sein. Sowohl die Heterogenität der Krankheit als auch die Heterogenität der sie möglicherweise verursachenden Gene sind weitere Gründe für differierende Resultate.

Die vorliegende Arbeit konnte eine positive Assoziation von NRG1 und der Schizophrenie nicht bestätigen. Ob NRG1 zur Suszeptibilität der Schizophrenie beiträgt, muss in weiteren unabhängigen Studien untersucht werden, wobei auf strenge diagnostische Kriterien, große Stichproben in verschiedenen ethnischen Populationen und eine das Gen abdeckende Anzahl an Polymorphismen geachtet werden sollte. Ferner bedarf es auch der Erweiterung des Spektrums an molekularbiologischen Techniken, um den Nachweis einer pathogenen Mutation führen bzw. den pathophysiologischen Zusammenhang zwischen NRG1 und der Schizophrenie entschlüsseln zu können.

## 6 Abkürzungen und Fachbegriffe

Abkürzung	Erklärung
A	Adenin/Adenosin
Abb.	Abbildung
AKT1	v-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1
ARA	Acetylcholin Receptor Inducing Activity
Arg	Arginin
bp	Basenpaare
C	Cytosin
CI	Confidence Interval
CRD	Cysteine Rich Domain des NRG1-Proteins
COMT	Catechol-O-Methyltransferase
cM	Centimorgan
C-Terminus	Carboxy-Ende
D'	Maß für das Disequilibrium (Kopplungsungleichgewicht), Wert für die Assoziation der am häufigsten vorkommenden Allele eines Genorts
DAAO	D-Aminosäure Oxidase
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DRD2	Dopamin 2-Rezeptor
DRD3	Dopamin 3-Rezeptor
DSM-IV	Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders (Fourth Edition) der American Psychiatric Association
DTNBP1	Dysbindin
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	Epidermal Growth Factor
EM	Expectation Maximization Algorithm
ErbB	Virales Onkogen Homolog (v-Erb-B) als Form eines im Vogel (avian) Erythroblastose Virus gefundenen Gens
Fa.	Firma
G	Guanin/Guanosin
GABA	Gamma Aminobuttersäure
gap	genetic analysis package
GGF	Glial Growth Factor
Gln	Glutamin
GRIA4	$\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid (AMPA)-Receptor subunit GluR4
HCl	Salzsäure
3-HPA	3-Hydroxypicolinsäure
HRG	Heregulin
5-HT	5-Hydroxy-Tryptamin (Serotonin)
HTR4	Human Serotonin 4 Receptor

## Abkürzungen und Fachbegriffe

ICD-10	International Classification of Diseases, Klassifikationssystem für Krankheiten der Weltgesundheitsorganisation
ID	Identifikation bei Single Nukleotid Polymorphismen
Ig like	Immunglobulin ähnlich
kb	Kilobasenpaare
kD	Kilo-Dalton, Maß für Molekulargewicht
KO-Mäuse	Knock Out Mäuse mit gezielten Mutationen bzgl. bestimmter Gen- und Proteinfunktionen
LD	Linkage Disequilibrium, Kopplungsungleichgewicht
LHRH	Luteinizing Hormone-Releasing Hormone
LOD Score	Logarithm of Odds Score
MASS ARRAY MALDI-TOFSystem	Mass Array Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-Of-Flight System
Mb	Megabasen
ml	Milliliter
mmol	Millimol
min	Minute
m-RNA	Messenger(Boten-)Ribonukleinsäure
n	Probandenzahl
NCBI	National Center for Biotechnology Information
ng	Nanogramm
nl	Nanoliter
ns	Nanosekunde
NDF	Neu Differentiation Factor
Notch 4	Notch Homolog 4 (Drosophila)
NRG	Neuregulin
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
nmol	Nanomol
N-Terminus	Amino-Ende
OR	Odds Ratio
p(Chromosom)	petit, kurzer Arm eines Chromosoms
p	Signifikanz, p-Wert, probability
PANSS	Positiv- und Negativ-Syndrom Skala
PCP	Phencyclidin
PCR	Polymerasekettenreaktion
pH	Wasserstoff-Ionenkonzentration
PPI	Prepulse Inhibition
PPP3CC	Protein Phosphatase 3-Gen, welches die Calcineurin $\gamma$ katalytische Untereinheit kodiert
Primer	DNA-Oligonukleotid
PRODH	Prolin Dehydrogenase
PSD	Postsynaptische Dichte

## Abkürzungen und Fachbegriffe

PSE	The measurement and Classification of Psychiatric Illness
q(Chromosom)	queue, langer Arm eines Chromosoms
RDC	Resarch Diagnostic Criteria
RGS4	Regulator of Guanin-Nukleotid Bindungsprotein (G-Protein)-Signaling-4
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	rounds per minute, Umdrehungen pro Minute
s	Sekunde
SADS-L	Lifetime version of Schizophrenia and Affective Disorders Schedule
SAP	Shrimp Alkaline Phosphatase
SCAN	Schedules for the clinical Assessment in Neuropsychiatry
SMDF	Sensory and Motor Neuron Derived Factor
SKID I	Strukturiertes Klinisches Interview für DSM-IV Achse I
SKID II	Strukturiertes Klinisches Interview für DSM-IV Achse II
SNP	Einzel (Single) Nukleotid-Polymorphismus
T	Thymidin
Tab.	Tabelle
Taq	Thermus aquaticus, Bakterium, aus dem die Isolation der Taq-Polymerase für das PCR-Verfahren erfolgt
TDT	Transmission Disequilibrium Test
TM	Transmembran
TRAR4	Trace Amine Receptor 4
TE	Tris-Ethylendiamintetraacetat Puffer
ZDHHC8	Zinc finger, DHHC domain containing 8
ZNS	Zentrales Nervensystem
°C	Grad Celcius
µl	Mikroliter
µs	Mikrosekunde

## 7 Literaturverzeichnis

1. Aleman, A., Kahn, R.S. und Selten, J.P. (2003) Sex differences in the risk of schizophrenia: evidence from meta-analysis. *Archives of General Psychiatry*, **60**, 565-571.
2. Anton, E.S., Marchionni, M.A., Lee, K.F. und Rakic, P. (1997) Neuregulin signaling in interactions between migrating neurons and radial glia in the developing cerebral cortex. *Development*, **124**, 3501-3510.
3. Bao, J., Wolpowitz, D., Role, L.W. und Talmage, D.A. (2003) Back signaling by the Nrg-1 intracellular domain. *Journal of Cell Biology*, **161**, 1133-1141.
4. Barres, B.A. und Raff, M.C. (1998) Axonal control of oligodendrocyte development. *Journal of Cell Biology*, **147**, 1123-1128.
5. Bleuler, E. (1911) Dementia praecox oder Gruppe der Schizophrenien. In Aschaffenburg, G. (ed.), *Handbuch der Psychiatrie*, Verlag Deuticke, Leipzig.
6. Böddeker, I. und Ziegler, A. (2000) Assoziations- und Kopplungsstudien zur Analyse von Kandidatengenomen. *Deutsche medizinische Wochenschrift, Georg-Thieme Verlag, Stuttgart*, **125**, 810-815.
7. Boyd, Y., Haynes, A. und Bumstead, N. (2002) Orthologs of seven genes (AKT1, CDC42BPB, DIO3, EIF5, JAG2, KLC, NDUFB1) from human chromosome 14q32 map to distal chicken chromosome 5. *Mammalian Genome*, **13**, 120-122.
8. Bramer, G.R. (1988) International statistical classification of diseases and related health problems. Tenth revision. *World Health Statistics Quarterly. Rapport Trimestriel de Statistiques Sanitaires Mondiales*, **41**, 32-36.
9. Breen, G., Brown, J., Maude, S., Fox, H., Collier, D. et al. (1999) 141 C del/ins polymorphism of the dopamine receptor 2 gene is associated with schizophrenia in a British population. *American Journal of Medical Genetics*, **88**, 407-410.
10. Britsch, S., Li, L., Kirchhoff, S., Theuring, F., Brinkmann, V. et al. (1998) The ErbB2 and ErbB3 receptors and their ligand, neuregulin-1, are essential for development of the sympathetic nervous system. *Genes and Development*, **12**, 1825-1836.

11. Brutsaert, D.L. (2003) Cardiac endothelial-myocardial signaling: its role in cardiac growth, contractile performance and rhythmicity. *Physiological Reviews*, **83**, 59-115.
12. Buonanno, A. und Fischbach, G.D. (2001) Neuregulin and ErbB receptor signaling pathways in the nervous system. *Current Opinion in Neurobiology*, **11**, 287-296.
13. Burden, S. (1998) The formation of neuromuscular synapses. *Genes and Development*, **12**, 133-148.
14. Calaora, V., Rogister, B., Bismuth, K., Murray, K., Brandt, H. et al. (2001) Neuregulin signaling regulates neural precursor growth and the generation of oligodendrocytes in vitro. *The Journal of Neuroscience*, **21**, 4740-4751.
15. Camenisch, T.D., Schroeder, J.A., Bradley, J., Klewer, S.E. und McDonald, J.A. (2002) Heart-valve mesenchyme formation is dependent on hyaluronan-augmented activation of ErbB2-ErbB3 receptors. *Nature Medicine*, **8**, 850-855.
16. Cameron, J.S., Dryer, L. und Dryer, S.E. (2001) beta-neuregulin-1 is required for the in vivo development of functional Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels in parasympathetic neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **98**, 2832-2836.
17. Cannella, B., Pitt, D., Marchionni, M. und Raine, C.S. (1999) Neuregulin and ErbB receptor expression in normal and diseased human white matter. *Journal of Neuroimmunology*, **100**, 233-242.
18. Cannon, M., Jones, P.B. und Murray, R.M. (2002) Obstetric complications and schizophrenia: historical and meta-analytic review. *American Journal of Psychiatry*, **159**, 1080-1092.
19. Cannon, T.D., van Erp, T.G., Huttunen, M., Lonnqvist, J., Salonen, O. et al. (1998) Regional gray matter, white matter and cerebrospinal fluid distributions in schizophrenic patients, their siblings and controls. *Archives of General Psychiatry*, **55**, 1084-1091.
20. Canoll, P.D., Kraemer, R., Teng, K.K., Marchionni, M.A. und Salzer, J.L. (1999) GGF/neuregulin induces a phenotypic reversion of oligodendrocytes. *Molecular and Cellular Neurosciences*, **13**, 79-94.
21. Canoll, P.D., Musacchio, J.M., Hardy, R., Reynolds, R., Marchionni, M.A. et al. (1996) GGF/neuregulin is a neuronal signal that promotes the proliferation and survival and inhibits the differentiation of oligodendrocyte progenitors. *Neuron*, **17**, 229-243.

22. Cardno, A.G., Marshall, E.J., Coid, B., Macdonald, A.M., Ribchester, T.R. et al. (1999) Heritability estimates for psychotic disorders: the Maudsley twin psychosis series. *Archives of General Psychiatry*, **56**, 162-168.
23. Cardon, L.R. und Abecasis, G.R. (2003) Using haplotype blocks to map human complex trait loci. *Trends in Genetics*, **19**, 135-140.
24. Carpenter, G. (2003) Nuclear localization and possible functions of receptor tyrosine kinases. *Current Opinion in Cell Biology*, **15**, 143-148.
25. Chaudhury, A.R., Gerecke, K.M., Wyss, J.M., Morgan, D.G., Gordon, M.N. et al. (2003) Neuregulin-1 and ErbB4 immunoreactivity is associated with neuritic plaques in Alzheimer disease brain and in a transgenic model of Alzheimer disease. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, **62**, 42-54.
26. Chowdari, K.V., Mirnics, K., Semwal, P., Wood, J., Lawrence, E. et al. (2002) Association and linkage analysis of RGS4 polymorphisms in schizophrenia. *Human Molecular Genetics*, **11**, 1373-1380.
27. Chumakov, I., Blumenfeld, M., Guerassimenko, O., Cavarec, L., Palicio, M. et al. (2002) Genetic and physiological data implicating the new human gene G72 and the gene for D-amino acid oxidase in schizophrenia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **99**, 13675-13680.
28. Cichon, S., Kesper, K., Propping, P. und Nothen, M.M. (1998) Assignment of the human serotonin 4 receptor gene (HTR4) to the long arm of chromosome 5 (5q31-q33). *Molecular Membrane Biology*, **15**, 75-78.
29. Claeysen, S., Faye, P., Sebben, M., Lemaire, S., Bockaert, J. et al. (1997) Assignment of 5-hydroxytryptamine receptor (HTR4) to human chromosome 5 bands q31-->q33 by in situ hybridization. *Cytogenetics and Cell Genetics*, **78**, 133-134.
30. Cloninger, C.R. (2002) The discovery or susceptibility genes for mental disorders. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **99**, 13365-13367.
31. Corvin, A.P., Morris, D.W., McGhee, K., Schwaiger, S., Scully, P. et al. (2004) Confirmation and refinement of an 'at-risk' haplotype for schizophrenia suggests the EST cluster, Hs.97362, as a potential susceptibility gene at the Neuregulin-1 locus. *Molecular Psychiatry*, **9**, 208-13.

32. Davis, K.L., Stewart, D.G., Friedman, J.I., Buchsbaum, M., Harvey, P.D. et al. (2003) White matter changes in schizophrenia: evidence for myelin-related dysfunction. *Archives of General Psychiatry*, **60**, 443-456.
33. Deister, A. und Möller, H.J. (1997) *Schizophrenie und verwandte Psychosen*. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart.
34. Du, Y. und Dreyfus, C.F. (2002) Oligodendrocytes as providers of growth factors. *Journal of Neuroscience Research*, **68**, 647-654.
35. Duan, J., Martinez, M., Sanders, A.R., Hou, C., Saitou, N. et al. (2004) Polymorphisms in the Trace Amine Receptor 4 (TRAR4) gene on chromosome 6q23.2 are associated with susceptibility to schizophrenia. *American Journal of Human Genetics*, **75**, 624-638.
36. Eaton, W.W. (1974) Residence, social class and schizophrenia. *Journal of Health and Social Behavior*, **15**, 289-299.
37. Eaton, W.W., Mortensen, P.B. und Frydenberg, M. (2000) Obstetric factors, urbanization and psychosis. *Schizophrenia Research*, **43**, 117-123.
38. Erickson, S., Shea, K., Ghaboosi, N., Loverro, L., Frantz, G. et al. (1997) ErbB is required for normal cerebellar and cardiac development: a comparison with ErbB2- and heregulin-deficient mice. *Development*, **124**, 4999-5011.
39. Excoffier, L. und Slatkin, M. (1995) Maximum-likelihood estimation of molecular haplotype frequencies in a diploid population. *Molecular Biology and Evolution*, **12**, 921-927.
40. Falls, D.L. (2003) Neuregulins: functions, forms and signaling strategies. *Experimental Cell Research*, **284**, 14-30.
41. Falls, D.L., Rosen, K.M., Corfas, G., Lane, W.S. und Fischbach, G.D. (1993) ARIA, a protein that stimulates acetylcholine receptor synthesis, is a member of the neu ligand family. *Cell*, 801-815.
42. Fernandez, P.A., Tang, D.G., Cheng, L., Prochiantz, A., Mudge, A.W. et al. (2000) Evidence that axon-derived neuregulin promotes oligodendrocyte survival in the developing rat optic nerve. *Neuron*, **28**, 81-90.
43. Fischbach, G.D. und Rosen, K.M. (1997) ARIA -a neuromuscular junction neuregulin. *Annual Review of Neuroscience*, **20**, 429-458.

44. Flores, A.I., Mallon, B.S., Matsul, T., Ogawa, W., Rosenzweig, A. et al. (2000) Akt-mediated survival of oligodendrocytes induced by neuregulins. *The Journal of Neuroscience*, **20**, 7622-7630.
45. Friston, K.J. und Frith, C.D. (1995) Schizophrenia: a disconnection syndrome? *Clinical Neuroscience*, **3**, 89-97.
46. Frith, C. und Dolan, R.J. (2000) The role of memory in the delusions associated with schizophrenia. In Schacter, D.L. und Scarry, E. (eds.), *Memory, Brain and Belief*. Cambridge, M.A., Harvard University Press, pp. 115-135.
47. Garatt, A.N., Britsch, S. und Birchmeier, C. (2000) Neuregulin, a factor with many functions in the life of a schwann cell. *Bioessays*, **22**, 987-996.
48. Garcia, R.A., Vasudevan, K. und Buonanno, A. (2000) The neuregulin receptor ErbB-4 interacts with PDZ-containing proteins at neuronal synapses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **97**, 3596-3601.
49. Gerber, D.J., Hall, D., Miyakawa, T., Demars, S., Gogos, J.A. et al. (2003) Evidence for association of schizophrenia with genetic variation in the 8p21.3 gene, PPP3CC, encoding the calcineurin gamma subunit. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **100**, 8993-8998.
50. Gerlai, R., Pisacane, P. und Erickson, S. (2000) Heregulin but not ErbB2 or ErbB3 heterozygous mutant mice exhibit hyperactivity in multiple behavioral tasks. *Behavior Brain Research*, **109**, 219-227.
51. Giglio, S., Broman, K.W., Matsumoto, N., Calvari, V., Gimelli, G. et al. (2001) Olfactory receptor-gene clusters, genomic-inversion polymorphisms and common chromosome rearrangements. *American Journal of Human Genetics*, **68**, 874-83.
52. Goff, D.C. und Coyle, J.T. (2001) The emerging role of glutamate in the pathophysiology and treatment of schizophrenia. *American Journal of Psychiatry*, **158**, 1367-1377.
53. Gogos, J.A., Santha, M., Takacs, Z., Beck, K.D., Luine, V. et al. (1999) The gene encoding proline dehydrogenase modulates sensorimotor gating in mice. *Nature Genetics*, **21**, 434-439.
54. Goodearl, A.D.J., Davis, J.B., K., M., Minghetti, L., Otsu, M. et al. (1993) Purification of multiple forms of glial growth factor. *Journal of Biological Chemistry*, **268**, 18095-18102.

55. Gottesman, I.I., McGuffin, P. und Farmer, A.E. (1987) Clinical genetics as clues to the "real" genetics of schizophrenia (a decade of modest gains while playing for time). *Schizophrenia Bulletin*, **13**, 23-47.
56. Häfner, H., Maurer, K., Löffler, W., an der Heiden, W., Munk-Jorgensen, P. et al. (1998) The ABC Schizophrenia Study: a preliminary overview of the results. *Social Psychiatry and Psychiatric Epidemiology*, **33**, 380-386.
57. Hakak, Y., Walker, J.R., Li, C., Wong, W.H., Davis, K.L. et al. (2001) Genome-wide expression analysis reveals dysregulation of myelination-related genes in chronic schizophrenia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **98**, 4746-4751.
58. Harrison, G., Glazebrook, C., Brewin, J., Cantwell, R., Dalkin, T. et al. (1997) Increased incidence of psychotic disorders in migrants from the Caribbean to the United Kingdom. *Psychological Medicine*, **27**, 799-806.
59. Hashimoto, R., Straub, R.E., Weickert, C.S., Hyde, T.M., Kleinman, J.E. et al. (2004) Expression analysis of neuregulin-1 in the dorsolateral prefrontal cortex in schizophrenia. *Molecular Psychiatry*, **9**, 299-307.
60. Haydon, P.G. (2001) GLIA: listening and talking to the synapse. *Nature Reviews Neuroscience*, **2**, 185-193.
61. Hetta, J.M., Walsh, D. und Kendler, K.S. (1996) Testing the effect of season of birth on familial risk for schizophrenia and related disorders. *The British Journal of Psychiatry*, **168**, 205-209.
62. Ho, W.H., Armanini, M.P., Nuijens, A., Phillips, H.S. und Osheroff, P.L. (1995) Sensory and motor neuron-derived factor: a novel heregulin variant highly expressed in sensory and motor neurons. *Journal of Biological Chemistry*, **270**, 14523-14532.
63. Holmes, W.E., Sliwkowski, M.X., Akita, R.W., Henzel, W.J., Lee, J. et al. (1992) Identification of heregulin, a specific activator of p185erbB2. *Science*, **256**, 1205-1210.
64. Holmes, W.E., Sliwkowski, M.X., Akita, R.W., Henzel, W.J., Lee, J. et al. (1992) Identification of heregulin, a specific activator of p185ErbB2. *Science*, **256**.
65. Huang, Y.Z., Won, S., Ali, D.W., Wang, Q., Tanowitz, M. et al. (2000) Regulation of neuregulin signaling by PSD-95 interacting with ErbB4 at CNS synapses. *Neuron*, **26**, 443-455.
66. Hultman, C.M., Ohman, A., Cnattingius, S., Wieselgren, I.M. und Lindstrom, L.H. (1997) Prenatal and neonatal risk factors for schizophrenia. *British Journal of Psychiatry*, **170**, 128-133.

67. Ibrahim, H.M., Hogg, A.J., Jr., Healy, D.J., Haroutunian, V., Davis, K.L. et al. (2000) Ionotropic glutamate receptor binding and subunit mRNA expression in thalamic nuclei in schizophrenia. *American Journal of Psychiatry*, **157**, 1811-1823.
68. Inayama, Y., Yoneda, H., Sakai, T., Ishida, T., Nonomura, Y. et al. (1996) Positive Association between a DNA sequence variant in the serotonin 2A receptor gene and schizophrenia. *American Journal of Medical Genetics*, **67**, 103-105.
69. Iwata, N., Suzuki, T., Ikeda, M., Kitajima, T., Yamanouchi, Y. et al. (2004) No association with the neuregulin 1 haplotype to Japanese schizophrenia. *Molecular Psychiatry*, **9**, 126-127.
70. Jessen, K.R. und Mirsky, R. (1998) Origin and early development of schwann cells. *Microscopy Research and Technique*, **41**, 393-402.
71. Jessen, K.R. und Mirsky, R. (1999) Schwann cells and their precursors emerge as major regulators of nerve development. *Trends in Neurosciences*, **22**, 402-410.
72. JSSLG (2003) Initial genome-wide scan for linkage with schizophrenia in the Japanese Schizophrenia Sib-Pair Linkage Group (JSSLG) families. *American Journal of Medical Genetics*, **120B**, 22-28.
73. Kandel, E.R., Schwartz, J.H. und Jesell, T.M. (1995) Essentials of neural science and behavior. In. London: Prentice Hall.
74. Kay, S.R., Fiszbein, A. und Opler, L.A. (1987) The positive and negative syndrome scale (PANSS) for schizophrenia. *Schizophrenia Bulletin*, **13**, 261-276.
75. Kendler, K.S. und Diehl, S.R. (1993) The genetics of schizophrenia: a current genetic-epidemiologic perspective. *Schizophrenia Bulletin*, **19**, 261-285.
76. Kendler, K.S. und Gardner, C.O. (1997) The risk for psychiatric disorders in relatives of schizophrenic and control probands: a comparison of three independent studies. *Psychological Medicine*, **27**, 411-419.
77. Kendler, K.S., Gruenberg, A.M. und Kinney, D.K. (1994) Independent diagnosis of adoptees and relatives as defined by DSM-III in the provincial and national samples of the Danish Adoption Study of Schizophrenia. *Archives of General Psychiatry*, **51**, 456-468.

78. Kendler, K.S., MacLean, C.J., O'Neill, F.A., Burke, J., Murphy, B. et al. (1996) Evidence for a schizophrenia vulnerability locus on chromosome 8p in the Irish Study of High-Density Schizophrenia Families. *American Journal of Psychiatry*, **153**, 1534-1540.
79. Kendler, K.S., McGuire, M., Gruenberg, A.M. und Walsh, D. (1995) Schizotypal symptoms and signs in the Roscommon Family Study. Their factor structure and familial relationship with psychotic and affective disorders. *Archives of General Psychiatry*, **52**, 296-303.
80. Kety, S.S., Wender, P.H., Jakobsen, B., Ingraham, L.J., Jansson, L. et al. (1994) Mental illness in the biological and adoptive relatives of schizophrenic adoptees. Replikation of the Copenhagen Study in the rest of Denmark. *Archives of General Psychiatry*, **51**, 6442-6455.
81. Kraepelin, E. (1896) Dementia Praecox. In *Psychiatrie, Ein Lehrbuch für Studierende und Ärzte*. 5. ed. Barth, Leipzig.
82. Kramer, R., Bucay, N., Kane, D.J., Martin, L.E., Tarpley, J.E. et al. (1996) Neuregulins with an Ig-like domain are essential for mouse myocardial and neuronal development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **93**, 4833-4838.
83. Lackland, J. und Dreyfus, C.F. (1999) Trophins as mediators of astrocyte effects in the aging and regenerating brain. In *Neuroglia in the aging brain*. Totowa: Humana press Inc., pp. 199-216.
84. Law, A.J., Shannon Weickert, C., Hyde, T.M., Kleinman, J.E. und Harrison, P.J. (2004) Neuregulin-1 (NRG-1) mRNA and protein in the adult human brain. *Neuroscience*, **127**, 125-136.
85. Lemke, G. (2001) Glial control of neuronal development. *Annual Review of Neuroscience*, **24**, 87-105.
86. Levinson, D.F., Lewis, C.M. und Wise, L.H. (2002) Meta-analysis of genome scans for schizophrenia. *American Journal of Medical Genetics*, **114**, 700-701.
87. Lewis, C.M., Levinson, D.F., Wise, L.H., DeLisi, L.E., Straub, R.E. et al. (2003) Genome scan meta-analyses of schizophrenia and bipolar disorder. Part II: Schizophrenia. *American Journal of Human Genetics*, **73**, 34-48.
88. Lewis, D.A. und Levitt, P. (2002) Schizophrenia as a disorder of neurodevelopment. *Annual Review of Neuroscience*, **25**, 409-432.
89. Lewontin, R.C. (1964) The interaction of selection and linkage. II. optimum models. *Genetics*, **50**, 757-782.

90. Li, T., Stefansson, H., Gudfinnsson, E., Cai, G., Liu, X. et al. (2004) Identification of a novel neuregulin 1 at-risk haplotype in Han schizophrenia Chinese patients, but no association with the Icelandic/Scottish risk haplotype. *Molecular Psychiatry*, **9**, 698-704.
91. Liu, H., Heath, S.C., Sobin, C., Roos, J.L., Galke, B.L. et al. (2002) Genetic variation at the 22q11 PRODH2/DGCR6 locus presents an unusual pattern and increases susceptibility to schizophrenia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **99**, 3717-3722.
92. Liu, X., Hwang, H., Cao, L., Buckland, M., Cunningham, A. et al. (1998) Domain-specific gene disruption reveals critical regulation of neuregulin signaling by its cytoplasmic tail. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **95**, 13024-13029.
93. Liu, Y., Ford, B., Mann, M.A. und Fischbach, G.D. (2001) Neuregulins increase alpha7 nicotinic acetylcholine receptors and enhance excitatory synaptic transmission in GABAergic interneurons of the hippocampus. *The Journal of Neuroscience*, **21**, 5660-5669.
94. Ma, Y.J., Hill, D.F., Creswick, K.E., Costa, M.E., Cornea, A. et al. (1999) Neuregulins signaling via a glial ErbB2-ErbB4 receptor complex contribute to the neuroendocrine control of mammalian sexual development. *Journal of Neuroscience*, **19**, 9913-9927.
95. Maier, W., Lichtermann, D., Rietschel, M., Held, T., Falkai, P. et al. (1999) Genetik schizophrener Störungen. Neuere Konzepte und Befunde. *Nervenarzt*, **70**, 955-969.
96. Maier, W. und Schwab, S. (1999) Genetische Determination häufiger psychischer Störungen. In Ganten, D. und Ruckpaul, K. (eds.), *Handbuch der molekularen Medizin*. Springer Verlag, Berlin Heidelberg.
97. Makino, C., Fujii, Y., Kikuta, R., Hirata, N., Tani, A. et al. (2003) Positive association of the AMPA receptor subunit GluR4 gene (GRIA4) haplotype with schizophrenia: linkage disequilibrium mapping using SNPs evenly distributed across the gene region. *American Journal of Medical Genetics*, **116B**, 17-22.
98. Marchionni, M.A., Goodearl, A.D.J., Chen, M.S., Bermingham-McDonogh, O., Kirk, C. et al. (1993) Glial growth factors are alternatively spliced ErbB2 ligands expressed in the nervous system. *Nature*, **362**, 312-318.
99. Marenco, S. und Weinberger, D.R. (2000) The neurodevelopmental hypothesis of schizophrenia: following a trail of evidence from cradle to grave. *Development and Psychopathology*, **12**, 501-527.

100. Marneros, A., Deister, A. und Rohde, A. (1991) *Affektive, schizoaffektive und schizophrene Psychosen. Eine vergleichende Langzeitstudie.* Springer Verlag, Berlin Heidelberg New York Tokio.
101. McGue, M. und Gottesman, I. (1989) Genetic linkage in schizophrenia. Perspectives from genetic epidemiology. *Schizophrenia Bulletin*, **15**, 453-464.
102. McGuffin, P. und Owen, M.J. (1996) Molecular genetic studies of schizophrenia. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, **61**, 815-822.
103. McGuffin, P., Owen, M.J. und Farmer, A.E. (1995) Genetic basis of schizophrenia. *Lancet*, **346**, 678-682.
104. McGuffin, P., Tandon, K. und Corsico, A. (2003) Linkage and association studies of schizophrenia. *Current Psychiatry Reports*, **5**, 121-127.
105. Meyer, D. und Birchmeier, C. (1995) Multiple essential functions of neuregulin in development. *Nature*, **378**, 386-390.
106. Meyer, D., Yamaai, T., Garratt, A., Riethmacher-Sonnenberg, E., Kane, D. et al. (1997) Isoform-specific expression and function of neuregulin. *Development*, **124**, 3575-3586.
107. Mirsky, R., Jessen, K.R., Brennan, A., Parkinson, D., Dong, Z. et al. (2002) Schwann cells as regulators of nerve development. *Journal of Physiology, Paris*, **96**, 17-24.
108. Mohn, A.R., Gainetdinov, R.R., Caron, M.G. und Koller, B.H. (1999) Mice with reduced NMDA receptor expression display behaviors related to schizophrenia. *Cell*, **98**, 427-436.
109. Moises, H.W., Zoega, T. und Gottesman, II (2002) The glial growth factors deficiency and synaptic destabilization hypothesis of schizophrenia. *BMC Psychiatry*, **2**, 8.
110. Möller, H.-J. und Deister, A. (2000) Schizophrenie. In Möller, H.-J., Laux, G. und Kapfhammer, H.P. (eds.), *Psychiatrie und Psychotherapie.* Springer Verlag, Berlin-Heidelberg.
111. Möller, H.-J., Laux, G. und Deister, A. (2001) Schizophrenie. In Bob, A. und Bob, K. (eds.), *Psychiatrie und Psychotherapie, Duale Reihe.* 2nd ed. Georg-Thieme Verlag, Stuttgart.

112. Mothet, J.P., Parent, A.T., Wolosker, H., Brady, R.O., Jr., Linden, D.J. et al. (2000) D-serine is an endogenous ligand for the glycine site of the N-methyl-D-aspartate receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **97**, 4926-31.
113. Mukai, J., Liu, H., Burt, R.A., Swor, D.E., Lai, W.S. et al. (2004) Evidence that the gene encoding ZDHHC8 contributes to the risk of schizophrenia. *Nature Genetics*, **36**, 725-731.
114. Murray, R.M. und Lewis, S.W. (1987) Is schizophrenia a neurodevelopmental disorder? *British Medical Journal (Clinical Research Ed.)*, **295**, 681-682.
115. Olayioye, M.A., Neve, R.M., Lane, H.A. und Hynes, N.E. (2000) The ErbB signaling network: receptor heterodimerization in development and cancer. *EMBO Journal*, **19**, 3159-3167.
116. Owen, M.J. (2000) Molecular genetic studies of schizophrenia. *Brain Research, Rev.* **31**, 179-186.
117. Ozaki, M. (2002) Analysis of patterned neuronal impulses and function of neuregulin. *Neurosignals*, **11**, 191-196.
118. Ozaki, M., Sasner, M., Yano, R., Lu, H.S. und Buonanno, A. (1997) Neuregulin-beta induces expression of an NMDA-receptor subunit. *Nature*, **390**, 691-694.
119. Ozcelik, C., Erdmann, B., Pilz, B., Wettschureck, N., Britsch, S. et al. (2002) Conditional mutation of the ErbB2 (HER2) receptor in cardiomyocytes leads to dilated cardiomyopathy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **99**, 8880-8885.
120. Park, S.K., Miller, R., Krane, I. und Vartanian, T. (2001a) The ErbB2 gene is required for the development of terminally differentiated spinal cord oligodendrocytes. *Journal of Cell Biology*, **154**, 1245-1258.
121. Park, S.K., Solomon, D. und Vartanian, T. (2001b) Growth factor control of CNS myelination. *Developmental Neuroscience*, **23**, 327-337.
122. Patel, N.V., Acarregui, M.J., Snyder, J.M., Klein, J.M., Sliwkowski, M.X. et al. (2000) Neuregulin-1 and human epidermal growth factor receptors 2 and 3 play a role in human lung development in vitro. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, **22**, 432-440.
123. Peles, E., Bacus, S.S., Koski, R.A., Lu, H.S., Wen, D. et al. (1992) Isolation of the neu/Her-2 stimulatory ligand: a 44kd glycoprotein that induces differentiation of mammary tumor cells. *Cell*, **69**, 205-216.

124. Petronis, A. (2004) The origin of schizophrenia: genetic thesis, epigenetic antithesis and resolving synthesis. *Biological Psychiatry*, **55**, 965-970.
125. Pinkas-Kramarski, R., Eilam, R., Alroy, I., Levkowitz, G., Lonai, P. et al. (1997) Differential expression of NDF/neuregulin receptors ErbB3 and ErbB4 and involvement in inhibition of neuronal differentiation. *Oncogene*, **15**, 2803-2815.
126. Pinkas-Kramarski, R., Eilam, R., Spiegel, O., Lavi, S., Liu, N. et al. (1994) Brain neurons and glial cells express neu differentiation factor/heregin: a survival factor for astrocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **91**, 9387-9391.
127. Pinkas-Kramarski, R., Shelly, M., Guarino, B.C., Wang, L.M., Lyass, L. et al. (1998) ErbB tyrosine kinases and the two neuregulin families constitute a ligand-receptor network. *Molecular and Cellular Biology*, **18**, 6090-6101.
128. Pinkas-Kramarski, R., Soussan, L., Waterman, H., Levkowitz, G., Alroy, I. et al. (1996) Diversifikation of neu differentiation factor and epidermal growth factor signaling by combinatorial receptor interactions. *EMBO Journal*, **15**, 2452-2467.
129. Plomin, R., DeFries, J.C., McClearn, G.E. und Rutter, M. (1999) *Gene, Umwelt und Verhalten*. 1st ed. Verlag Hans Huber, Bern, Göttingen, Toronto, Seattle.
130. Plowman, G.D., Green, J.M., Culouscou, J.M., Carlton, G.W., Rothwell, V.M. et al. (1993) Heregulin induces tyrosine phosphorylation of HER4/p180erbB4. *Nature*, **366**, 473-475.
131. Prevot, V., Rio, C., Cho, G.J., Lomniczi, A., Heger, S. et al. (2003) Normal female sexual development requires neuregulin-ErbB receptor signaling in hypothalamic astrocytes. *Journal of Neuroscience*, **23**, 230-239.
132. Qiagen (ed.) (2001) *DNA Blood Midi Kit and DNA Blood Maxi Kit Handbook*.
133. Rakic, P. (1990) Principles of neural cell migration. *Experientia*, **46**, 882-891.
134. Reiss, D., Plomin, R. und Hetherington, E.M. (1991) Genetics and psychiatry: an unheralded window on the environment. *American Journal of Psychiatry*, **148**, 283-291.

135. Rentschler, S., Zander, J., Meyers, K., France, D., Levine, R. et al. (2002) Neuregulin-1 promotes formation of the murine cardiac conduction system. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **99**, 10464-10469.
136. Rice, J.P., Reich, T., Bucholz, K.K., Neuman, R.J., Fishman, R. et al. (1995) Comparison of direct interview and family history diagnoses of alcohol dependence. *Alcoholism, Clinical and Experimental Research*, **19**, 1018-1023.
137. Riecher-Rössler, A. (2003) Implikationen für die Therapie von Frauen mit Schizophrenien. *Nervenarzt*, **74**, 398-405.
138. Rieff, H.I., Raetzmann, L.T., Sapp, D.W., Yeh, H.H., Siegel, R.E. et al. (1999) Neuregulin induces GABA(A) receptor subunit expression and neurite outgrowth in cerebellar granule cells. *The Journal of Neuroscience*, **19**, 10757-10766.
139. Rio, C., Rieff, H.I., Qi, P. und Corfas, G. (1997) Neuregulin and ErbB receptors play a critical role in neuronal migration. *Neuron*, **19**, 39-50.
140. Sandrock, A.W., Dryer, S.E., Rosen, K.M., Gozani, S.N., Kramer, R. et al. (1997) Maintenance of acetylcholine receptor number by neuregulins at the neuromuscular junction in vivo. *Science*, **276**, 599-603.
141. Sanes, J.R. und Lichtman, J.W. (2001) Induction, assembly, maturation and maintenance of a postsynaptic apparatus. *Nature Reviews Neuroscience*, **2**, 791-805.
142. Sawa, A. und Snyder, S.H. (2002) Schizophrenia: diverse approaches to a complex disease. *Science*, **296**, 692-695.
143. Schaeffer, L., de Kerchove d`Exaerde, A. und Changeux, J.P. (2001) Targeting transcription to the neuromuscular synapse. *Neuron*, **31**, 15-22.
144. Schaid, D.J., Rowland, C.M., Tines, D.E., Jacobson, R.M. und Poland, G.A. (2002) Score tests for association between traits and haplotypes when linkage phase is ambiguous. *American Journal of Human Genetics*, **70**, 425-434.
145. Scharfetter, C. (1995) *Schizophrene Menschen*. 4 ed. Psychologie Verlags Union, Weinheim.

146. Schmid, R.S., McGrath, B., Berechid, B.E., Boyles, B., Marchionni, M. et al. (2003) Neuregulin 1-ErbB2 signaling is required for the establishment of radial glia and their transformation into astrocytes in cerebral cortex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **100**, 4251-4256.
147. Schneider, K. (1957) Primäre und sekundäre Symptome bei Schizophrenie. *Fortschritt für Neurologie und Psychiatrie*, **25**, 487-490.
148. Schwab, S.G., Knapp, M., Mondabon, S., Hallmayer, J., Borrmann-Hassenbach, M. et al. (2003) Support for association of schizophrenia with genetic variation in the 6p22.3 gene, dysbindin, in sib-pair families with linkage and in an additional sample of triad families. *American Journal of Human Genetics*, **72**, 185-190.
149. Sham, P. und McGuffin, P. (2002) Linkage and association. In McGuffin, P., Owen, M.J. und Gottesman, I.I. (eds.), *Psychiatric Genetics and Genomics*. Oxford University Press, Oxford, pp. 55-73.
150. Shifman, S., Bronstein, M., Sternfeld, M., Pisante-Shalom, A., Lev-Lehman, E. et al. (2002) A highly significant association between a COMT haplotype and schizophrenia. *American Journal of Human Genetics*, **71**, 1296-1302.
151. Staal, S.P., Huebner, K., Croce, C.M., Parsa, N.Z. und Testa, J.R. (1988) The AKT1 proto-oncogene maps to human chromosome 14, band q32. *Genomics*, **2**, 96-98.
152. Stefansson, H., Sarginsson, J., Kong, A., Phil, Y., Steinthorsdottir, V. et al. (2003) Association of neuregulin 1 with schizophrenia confirmed in a Scottish population. *American Journal of Human Genetics*, **72**, 83-87.
153. Stefansson, H., Sigurdsson, E., Steinthorsdottir, V., Bjornsdottir, S., Sigmundsson, T. et al. (2002) Neuregulin 1 and susceptibility to schizophrenia. *American Journal of Human Genetics*, **71**, 877-892.
154. Stefansson, H., Steinthorsdottir, V., Thorgeirsson, T.E., Gulcher, J.R. und Stefansson, K. (2004) Neuregulin 1 and schizophrenia. *Annals of Medicine*, **36**, 62-71.
155. Steiner, H., Blum, M., Kitai, S.T. und Fedi, P. (1999) Differential expression of ErbB3 and ErbB4 neuregulin receptors in dopamine neurons and forebrain areas of the adult rat. *Experimental Neurology*, **159**, 494-503.
156. Steinthorsdottir, V., Stefansson, H., Ghosh, S., Birgisdottir, B., Bjornsdottir, S. et al. (2004) Multiple novel transcription initiation sites for NRG1. *Gene*, **342**, 97-105.

157. Straub, R.E., Jiang, Y., MacLean, C.J., Ma, Y., Webb, B.T. et al. (2002a) Genetic variation in the 6p22.3 gene DTNBP1, the human ortholog of the mouse dysbindin gene, is associated with schizophrenia. *American Journal of Human Genetics*, **71**, 337-348.
158. Straub, R.E., MacLean, C.J., Ma, Y., Webb, B.T., Myakishev, M.V. et al. (2002b) Genome-wide scans of three independent sets of Irish multiplex schizophrenia families and follow-up of selected regions in all families provides evidence for multiple susceptibility genes. *Molecular Psychiatry*, **7**, 542-559.
159. Syroid, D.E., Maycox, P.R., Burrola, P.G., Liu, N., Wen, D. et al. (1996) Cell death in the schwann cell lineage and its regulation by neuregulin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **93**, 9229-92234.
160. Tang, J.X., Chen, W.Y., He, G., Zhou, J., Gu, N.F. et al. (2004) Polymorphisms within 5' end of the Neuregulin 1 gene are genetically associated with schizophrenia in the Chinese population. *Molecular Psychiatry*, **9**, 11-2.
161. Thiselton, D.L., Webb, B.T., Neale, B.M., Ribble, R.C., O'Neill, F.A. et al. (2004) No evidence for linkage or association of neuregulin-1 (NRG1) with disease in the Irish study of high-density schizophrenia families (ISHDSF). *Molecular Psychiatry*, **9**, 777-783; image 729.
162. Tokita, Y., Keino, H., Matsui, F., Aono, S., Ishiguro, H. et al. (2001) Regulation of neuregulin expression in the injured rat brain and cultured astrocytes. *Journal of Neuroscience*, **21**, 1257-1264.
163. Tsuang, M.T., Stone, W.S. und Faraone, S.V. (2001) Genes, environment and schizophrenia. *British Journal of Psychiatry. Supplement*, **40**, 18-24.
164. Tsuang, M.T., Tohen, M. und Zahner, G. (1995) *Textbook in Psychiatry epidemiology*. Wiley-Liss New York.
165. Ullian, E.M., Sapperstein, S.K., Christopherson, K.S. und Barres, B.A. (2001) Control of synapse number by glia. *Science*, **291**, 657-661.
166. van Os, J., Driessen, G., Gunther, N. und Delespaul, P. (2000) Neighbourhood variation in incidence of schizophrenia. Evidence for person-environment interaction. *British Journal of Psychiatry*, **176**, 243-248.
167. van Os, J., Marcelis, M., Sham, P., Gilvarry, K. und Murray, R. (1997) Psychopathological syndromes and familial morbid risk of psychosis. *The British Journal of Psychiatry*, **170**, 241-246.

168. Vartanian, T., Fischbach, G. und Miller, R. (1999) Failure of spinal cord oligodendrocyte development in mice lacking neuregulin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **96**, 731-735.
169. Viehovec, A., Miller, R.H., Park, S.K., Fischbach, G. und Vartanian, T. (2001) Neuregulin: an oligodendrocyte growth factor absent in active multiple sclerosis lesions. *Developmental Neuroscience*, **23**, 377-386.
170. Wei, J. und Hemmings, G.P. (2000) The NOTCH4 locus is associated with susceptibility to schizophrenia. *Nature Genetics*, **25**, 376-377.
171. Weinberger, D.R. (1995) From neuropathology to neurodevelopment. *Lancet*, **346**, 552-557.
172. Weinberger, D.R., Egan, M.F., Bertolino, A., Callicott, J.H., Mattay, V.S. et al. (2001) Prefrontal neurons and the genetics of schizophrenia. *Biological Psychiatry*, **50**, 825-844.
173. Wen, D., Peles, E., Cupples, R., Suggs, S.V., Bacus, S.S. et al. (1992) Neu differentiation factor: a transmembrane glycoprotein containing an EGF domain and an immunoglobulin homology unit. *Cell*, **69**, 559-572.
174. Williams, J., McGuffin, P., Nothen, M. und Owen, M.J. (1997) Meta-analysis of association between the 5-HT2a receptor T102C polymorphism and schizophrenia. EMAS Collaborative Group. European Multicentre Association Study of Schizophrenia. *Lancet*, **349**, 1221.
175. Williams, J., Spurlock, G., Holmans, P., Mant, R., Murphy, K. et al. (1998) A meta-analysis and transmission disequilibrium study of association between the dopamine D3 receptor gene and schizophrenia. *Molecular Psychiatry*, **3**, 141-149.
176. Williams, N.M., Preece, A., Spurlock, G., Norton, N., Williams, H.J. et al. (2003) Support for genetic variation in neuregulin 1 and susceptibility to schizophrenia. *Molecular Psychiatry*, **8**, 485-487.
177. Wittchen, H.-U., Saß, H. und Zaudig, M. (1996) *Diagnostisches und Statistisches Manual Psychischer Störungen DSM-IV*. Hogrefe Verlag für Psychiatrie, Göttingen, Bern, Toronto, Seattle.
178. Wittchen, H.-U., Zaudig, M. und Fydrich, T. (1997) *SKID Strukturiertes Klinisches Interview für DSM-IV Achse I und II*. Hogrefe Verlag für Psychiatrie, Göttingen, Bern, Toronto, Seattle.

179. Wolpowitz, D., Mason, T.B.A., Dietrich, P., Mendelsohn, M., Talmage, D.A. et al. (2000) Cysteine-rich domain isoforms of the neuregulin1 gene are required for maintenance of peripheral synapses. *Neuron*, **25**, 79-91.
180. Yang, J.Z., Si, T.M., Ruan, Y., Ling, Y.S., Han, Y.H. et al. (2003) Association study of neuregulin 1 gene with schizophrenia. *Molecular Psychiatry*, **8**, 706-709.
181. Yang, X., Arber, S., William, C., Li, L., Tanabe, Y. et al. (2001) Patterning of muscle acetylcholine receptor gene expression in the absence of motor innervation. *Neuron*, **30**, 399-410.
182. Yang, X., Kuo, Y., Devay, P., Yu, C. und Role, L. (1998) A cysteine-rich isoform of neuregulin controls the level of expression of neuronal nicotinic receptor channels during synaptogenesis. *Neuron*, **20**, 255-270.
183. Yarden, Y. und Sliwkowski, M.X. (2001) Untangling the ErbB signaling network. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, **2**, 127-137.
184. Yu, C.E., Dawson, G., Munson, J., D´Souza, I., Osterling, J. et al. (2002) Presence of large deletions in kindreds with autism. *American Journal of Human Genetics*, **71**, 100-115.
185. Zanazzi, G., Einheber, S., Westreich, R., Hannocks, M.J., Bedell-Hogan, D. et al. (2001) Glial growth factor/neuregulin inhibits schwann cell myelination and induces demyelination. *Journal of Cell Biology*, **152**, 1289-1299.
186. Zhao, X., Shi, Y., Tang, J., Tang, R., Yu, L. et al. (2004) A case control and family based association study of the neuregulin 1 gene and schizophrenia. *Journal of Medical Genetics*, **41**, 31-34.
187. Zhao, Y.Y., Sawyer, D.R., Baliga, R.R., Opel, D.J., Han, X. et al. (1998) Neuregulins promote survival and growth of cardiac myocytes. Persistence of ErbB2 and ErbB4 expression in neonatal and adult ventricular myocytes. *Journal of Biological Chemistry*, **273**, 10261-10269.

## 8 Danksagung

Herrn Prof. Dr. med. Möller danke ich für das Entgegenkommen, dass ich diese Arbeit in der von Ihm geleiteten Psychiatrischen Universitätsklinik absolvieren durfte.

Mein besonderer Dank gilt weiterhin Herrn Priv. Doz. Dr. med. Dan Rujescu für die Möglichkeit zur Durchführung der vorliegenden Arbeit in seiner Forschungsgruppe und die kompetente Betreuung mit umsichtiger Auswahl des Themas. Ausdrücklich möchte ich mich bei Frau Diplompsychologin Ina Giegling bedanken, deren Vorschläge und Hilfsbereitschaft bei der statistischen Auswertung der Studienergebnisse und beim Korrekturlesen unerlässlich waren.

Nachdrücklich verpflichtet fühle ich mich auch den übrigen Teamkollegen in der Arbeitsgemeinschaft molekulare und klinische Neurobiologie, die mir ihre Aufmerksamkeit geschenkt und ihre Einsichten mit mir geteilt haben. Ihre freundliche Kritik hat mich meinem Ziel, nicht nur so klar, sondern auch so genau wie möglich zu schreiben, ein großes Stück näher gebracht.

Außerordentlich hervorheben möchte ich hier Herrn Dr. med. Lars Mühlenhoff, dessen konsequente und freundschaftliche Unterstützung bei der Überarbeitung des Manuskriptes in verschiedenen Fassungen unverzichtbar und überaus wertvoll war. Durch konstruktive Gespräche und Rat in Zweifelsfällen, u.a. bei statistischen Fragestellungen, hat auch dankenswerterweise Frau Diplompsychologin Katrin Thierfelder ganz wesentlich zur Erleichterung der Arbeit beigetragen. Sehr hilfreiche Anregungen im Rahmen der Korrektur bzw. zu der Ausfertigung der graphischen Darstellungen verdanke ich zudem Frau Dr. humanbiol. Annette Hartmann und Herrn Dr. med. Just Genius. Den angesprochenen Kollegen bin ich für ihre kooperative Mitarbeit sehr verbunden.

Mein Dank richtet sich auch an alle Probanden, die sich für diese Studie als Teilnehmer zur Verfügung gestellt haben.

## Danksagung

Der herzlichste Dank gilt meinen Eltern und meiner Frau Irmi, die mich durch ihre immerwährende Förderung und beständigen Ermutigungen über das Studium hinaus bis zur Fertigstellung der Arbeit verlässlich begleitet haben.

## 9 Lebenslauf

### Personalien:

Name: Zipp, Hans-Peter  
 Geburtsdatum: 06.01.1957  
 Geburtsort: Herborn, Lahn-Dillkreis  
 Wohnort: Geißhornstraße 13  
 87452 Krugzell  
 E.Mail: [hpzipp@gmx.de](mailto:hpzipp@gmx.de)

### Schulbildung:

1964 -1967	Dillenburg	Grundschule
1967 -1976		Gymnasium
05/76		Abitur

### Wehrdienst:

1976 -1978	Rennerod	Sanitätsbataillon
	Diez/Lahn	Sanitätsbereich
	Amberg	Bundeswehrkrankenhaus
	München	Sanitätsakademie

### Krankenpflegepraktikum:

1978 -1979	Dillenburg	Krankenpflegehelfer im Kreiskrankenhaus
1980	Marburg	Krankenpflegehelfer an der Medizinischen Univ. Klinik

### Studium:

1979	Marburg	Biologie
1979 -1980		Humanbiologie
1981	Saarbrücken	Medizin
1981 -1982	Marburg	
1983 -1984	Wien	
1985	Marburg	
1985 -1986	Augsburg	Praktisches Jahr am Zentralklinikum
12/86	München	III. Staatsexamen

**Berufsausbildung:**

1988	Landshut	Kinderkrankenhaus St. Marien Kinderchirurgie, Chefarzt Dr. Jahn
1988 -1989	Regen Bayr. Wald	Kinderlandklinik, Chefarzt Dr. Dr. Braumandl
1989 -1991	Kempton	Kinderabteilung, Chefarzt Dr. Kehr
1991 -1993	Regensburg	Kinderklinik St. Hedwig, Intensivstation, Chefarzt Dr. Schütz
05/93	München	Facharztanerkennung
1993 - 2002	Kempton	Kinderabteilung, Ausrichtung Neuropädiatrie, Oberarzt unter Chefarzt Dr. Müller
2002 - 2003	Diverse Fort- und Weiterbildungen, Zertifikat Epileptologie	
seit 07/2003	Dissertation an der Ludwig-Maximilians-Universität München, Arbeitsgruppe molekulare und klinische Neurobiologie, Leiter: Priv. Doz. Dr. Dan Rujescu	

Krugzell im Januar 2005