

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

Direktor: Herr Prof. Dr. med. Peter Falkai

Das NRG3-Gen und seine Bedeutung für die Schizophrenie

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

vorgelegt von
Herbert Gruber

aus
Traunstein

2014

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Dan Rujescu

Mitberichterstatter: PD Dr. Eva M. Grasbon-Frodl

Mitbetreuerin: PD Dr. rer. biol. hum. Ina Giegling

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h.c. Maximilian Reiser, FACR, FRCR

Tag der mündlichen Prüfung: 27.11.2014

Meinen Eltern gewidmet.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	5
1 Zusammenfassung	7
2 Einleitung	9
2.1 Schizophrenie	9
2.1.1 Geschichtlicher Hintergrund.....	9
2.1.2 Symptomatik und Klassifikation	9
2.1.3 Verlauf und Prognose	11
2.1.4 Epidemiologie.....	12
2.1.5 Ätiopathogenese	13
2.1.5.1 Prä- und perinatale Faktoren	14
2.1.5.2 Psychosoziale Faktoren.....	14
2.1.5.3 Genetische Faktoren	15
2.1.5.3.1 Familien-, Zwillings- und Adoptionsstudien.....	15
2.1.5.3.2 Molekulargenetische Grundlagen und Genetikstudien	16
2.1.5.4 Neurobiologische Faktoren.....	22
2.2 Das Neuregulin3-Gen	25
2.2.1 Signalwege und Rezeptoren für Neureguline	25
2.2.1.1 Rezeptoren für Neureguline: die ErbB-Rezeptoren	25
2.2.1.2 Aktivierung und Signaltransduktion des ErbB4-Rezeptors	26
2.2.2 Die Familie der Neuregulin-Gene	28
2.2.3 Das Neuregulin 3-Gen	29
2.2.4 Neuregulin 3 und Schizophrenie	31
2.2.4.1 Studien zum Genlocus 10q22-q23 und Schizophrenie	32
2.2.4.2 Studien über das NRG3-Gen und Schizophrenie.....	34
2.2.4.3 Zusammenfassung der Studien zu NRG3	42
3 Fragestellung	44
4 Material und Methoden	45
4.1 Vorbedingungen der Studie	45
4.2 Studienteilnehmer	45
4.2.1 Kontrollgruppe	45
4.2.2 Patientengruppe	47
4.3 Laborverfahren	48
4.3.1 DNA-Extraktion	48
4.3.2 Einstellung der DNA-Konzentration	50
4.3.3 Genotypisierung	52
4.3.3.1 Multiplex-Polymerase-Kettenreaktion.....	52
4.3.3.2 Primerextensionsreaktion.....	55
4.3.3.3 Massenspektrometrische Analyse.....	56
4.4 Statistische Auswertung	57
5 Ergebnisse	58
5.1 Das NRG3-Gen in der Schizophrenie	58
5.1.1 Grundzüge der vorliegenden Studie	58
5.1.2 Lokalisation der 20 Polymorphismen im NRG3-Gen	59
5.1.3 Hardy-Weinberg-Gleichgewicht.....	60
5.1.4 Analyse der 20 Polymorphismen auf eine Assoziation mit Schizophrenie	61
5.1.4.1 Analyse der Polymorphismen in der Gesamtgruppe Schizophreniepatienten.....	61

5.1.4.2 Analyse der Polymorphismen bei Schizophreniepatienten mit an Schizophrenie erkrankten Erstgradangehörigen	64
5.1.4.3 Analyse der Polymorphismen bei Schizophreniepatienten mit an Schizophrenie erkrankten Familienangehörigen	68
5.1.4.4 Analyse der Polymorphismen bei Schizophreniepatienten mit psychiatrisch erkrankten Familienangehörigen	71
5.1.5 Haplotyp-Blockstruktur in NRG3.....	75
5.1.5.1 Analyse der Haplotypen in NRG3	75
5.1.5.2 Analyse der Haplotypen auf eine Assoziation mit Schizophrenie	76
5.2 Zusammenfassende Darstellung der Ergebnisse.....	77
6 Diskussion.....	82
6.1 Diskussion der Ergebnisse.....	82
6.2 Diskussion der Methoden	88
6.3 Fragen in der Genetik-Forschung der Schizophrenie	95
6.4 Ausblick	100
7 Abkürzungsverzeichnis	102
8 Literaturverzeichnis.....	103
9 Danksagung.....	123

1 Zusammenfassung

Die Schizophrenie wird als eine der schwersten Erkrankungen in der Psychiatrie angesehen, die das erkrankte Individuum in gravierender Weise in Verhalten und Erleben beeinflussen kann. Die multifaktorielle Ätiologie wurde bereits zahlreich untersucht, wobei sich der Einfluss der Genetik als sehr hoch herausstellte. Im Sinne einer komplex genetischen Erkrankung wird von mehreren Genen ausgegangen, die auf die Manifestation der Erkrankung Einfluss nehmen, wobei weder deren genaue Anzahl noch das anteilige Risiko des einzelnen Genlocus auf die Pathogenese geklärt ist. Zudem interagieren diese Gene mit Umweltfaktoren und epigenetischen Einflüssen.

Bisher wurden mehrere Kandidatengene für die Schizophrenie beschrieben, unter anderem das Neuregulin-3-Gen (NRG3). NRG3 ist auf Chromosom 10q22-q23 positioniert und liegt in einer Region, die in Studien als Suszeptibilitätslocus für Schizophrenie bezeichnet wurde. Über eine signifikante Assoziation zwischen Chromosom 10q22-q23 bzw. dem NRG3-Gen und dem Entstehen einer Schizophrenie wurden bereits einige Kopplungs- und Assoziationsstudien veröffentlicht, in denen verschiedene Genvarianten, vor allem Basenaustauschpolymorphismen (*single nucleotide polymorphisms*, SNPs), an verschiedenen Populationen untersucht wurden. In nachfolgenden genomweiten und Feinkartierungsstudien, sowie in Studien zur Identifizierung von Haplotyp-Blöcken, konnte der Locus als potentielle Kandidatenregion belegt werden. Zudem wurden in der Erforschung des Signalwegs von NRG3 mit seinem Rezeptor ErbB4 Hinweise entdeckt, dass dieser im Sinne eines pathogenetischen Netzwerkes das Risiko einer Schizophrenie-Entstehung erhöht. Jedoch konnten nicht alle Studien die Suszeptibilität bestätigen.

In der vorliegenden Fall-Kontroll-Assoziationsstudie wurde eine kaukasische Stichprobe auf einen Zusammenhang zwischen 20 SNPs im NRG3-Gen und der Schizophrenie geprüft, wobei insgesamt 512 an Schizophrenie erkrankte Personen sowie 1320 gesunde Kontrollprobanden für die Studie gewonnen werden konnten. Das Patientenkollektiv wurde zuerst in seiner Gesamtheit untersucht, und anschließend in drei verschiedene Untergruppen eingeteilt: Schizophreniepatienten mit erstgradig verwandten Schizophreniepatienten (97 Patienten), Schizophreniepatienten mit an Schizophrenie erkrankten Familienangehörigen über den 1. Verwandtschaftsgrad hinaus (147 Patienten) und Schizophreniepatienten mit psychiatrisch erkrankten Familienangehörigen (374 Patienten).

Die vorliegende Studie ließ für fünf SNPs (rs6584471, rs2622807, rs635481, rs2820108, rs2065537) signifikante Assoziationen in mindestens einem der vier Modelle (Allelverteilung, Genotypverteilung, Vergleich der Allelträger AA + AB vs. BB, AA vs. AB + BB) mit der Erkrankung Schizophrenie erkennen.

Der SNP rs2622807 erwies sich in der Genotypverteilung der Gesamtgruppe von Schizophreniepatienten als signifikant assoziiert mit dem selteneren T-Allel. Zudem waren sowohl in der Gesamtgruppe der Schizophreniepatienten als auch in der Gruppe der Schizophreniepatienten mit psychiatrisch erkrankten Familienangehörigen signifikant häufiger Träger des selteneren T-Allels. Auch für den benachbarten Marker rs635481 konnte in der Genotypverteilung der Gesamtgruppe von Schizophreniekranken ein signifikant häufigeres Auftreten des selteneren C-Allels nachgewiesen werden. In der Gesamtgruppe der Schizophreniepatienten und Schizophreniepatienten mit psychiatrisch erkrankten Familienangehörigen kam das seltenere C-Allel signifikant öfter vor. Für beide SNPs wurde ein Haplotyp-Block gebildet (rs2622807, rs635481), in welchem bei den Schizophreniepatienten das Allelpaar TC signifikant häufiger und das Allelpaar CT entsprechend signifikant seltener vorkam.

Die Allelverteilung bei SNP rs6584471 ergab, dass innerhalb der Patientengruppe mit erstgradig verwandten Schizophreniepatienten und derjenigen mit an Schizophrenie erkrankten Familienangehörigen das häufigere A-Allel signifikant öfter vertreten war als in der Kontrollgruppe. Zudem waren in der Gruppe der Schizophreniepatienten mit erstgradig verwandten Schizophreniepatienten signifikant öfter Träger des häufigeren A-Allels (Genotypen AA und AG) vertreten.

Bei SNP rs2820108 waren in der Gesamtgruppe der Schizophreniepatienten und in der Gruppe der Schizophreniepatienten mit psychiatrisch erkrankten Familienangehörigen signifikant häufiger Träger des selteneren A-Allels zu finden.

Für rs2065537 ergab sich bei den Patienten mit erstgradangehörigen Schizophreniepatienten ein signifikant häufigeres Vorkommen von Trägern des selteneren A-Allels.

Neben den genannten signifikanten Ergebnissen wurde für vier weitere SNPs (rs2207768, rs722982, rs2881886, rs1576986) eine Tendenz zur Signifikanz nachgewiesen.

Die Ergebnisse dieser Studie legen die Vermutung nahe, dass die assoziierten Polymorphismen und Haplotypen einen Beitrag zur Erkrankung leisten. Es sind weitere Studien mit hoher Anzahl an Probanden und genauen Einschluss- und Ausschlusskriterien notwendig, in welchen diese sowie weitere SNPs im NRG3-Gen auf einen Zusammenhang mit der Erkrankung überprüft werden.

2 Einleitung

2.1 Schizophrenie

Schizophrene Psychosen stellen schwerwiegende psychiatrische Erkrankungen dar. In ihrer Symptomatik sind sie äußerst vielfältig und auch ihr Verlauf zeigt eine hohe Variabilität (Tandon et al. 2008a, 2008c).

2.1.1 Geschichtlicher Hintergrund

Emil Kraepelin benannte als einer der ersten Forscher die Symptomatik schizophrener Psychosen in systematischer Form (Kraepelin 1896). Er prägte den Begriff der „*Dementia praecox*“ („vorzeitige Verblödung“) und betonte damit die kognitiven Beeinträchtigungen bei einem langjährigen, ungebremsten Fortschreiten der Erkrankung. Der Begriff Schizophrenie („Bewusstseinspaltung“) und eine Symptomhierarchie wurden von Eugen Bleuler eingeführt (Bleuler 1911). Kurt Schneider führte die Lehre der Symptome 1. Ranges (z. B. Stimmenhören, Wahnwahrnehmung) und 2. Ranges (z. B. andere Halluzinationen außer Stimmenhören, Wahneinfall) ein (Schneider 1957).

Eine gängige Klassifikation ist die dichotome Einteilung der Beschwerden durch Crow (1980) sowie durch Andreasen und Olsen (1982). Sie erfolgt nach Positivsymptomatik (z. B. Halluzinationen) und Negativsymptomatik (z. B. Affektverarmung). Kay et al. (1987) entwickelten daran anlehnend die *Positive and Negative Syndrome Scale* (PANSS).

2.1.2 Symptomatik und Klassifikation

Fast alle psychischen Bereiche können durch Schizophrenie beeinträchtigt sein, wobei Störungen des formalen und inhaltlichen Denkens, der Wahrnehmung, des Antriebs und des Affektes hauptsächlich betroffen sind. Dagegen sind intellektuelle Fähigkeiten weniger beeinträchtigt, mit stärker betroffenen Ausnahmen wie dem Arbeitsgedächtnis (Wilk et al. 2005, Joyce et al. 2005). In der Regel zeigen sich bezüglich des Bewusstseins und der Orientierung keine Symptome.

2 Einleitung

Mittels zweier weltweit anerkannter Klassifikationssysteme wurde die Kodierung schizophrener Psychosen vereinheitlicht und operationalisiert: ICD-10 (*International Classification of Diseases*, Weltgesundheitsorganisation WHO, 2005) und DSM-IV (*Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders IV*, American Psychiatric Association APA, 1994; Saß et al. 1996) (vgl. Tabelle 2-1).

Tabelle 2-1: Diagnostische Kriterien und Klassifikation der Subtypen schizophrener Erkrankungen nach ICD-10 und DSM-IV

ICD-10	DSM-IV
Symptomatik	
<p>Symptomgruppe 1 - 4:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Ich-Störungen (z. B. Gedankenlautwerden, -entzug, -eingebung, -ausbreitung) - Kontrollwahn, Beeinflussungswahn, Gefühl des Gemachten, Wahnwahrnehmung - Akustische Halluzinationen (kommentierende oder dialogisierende Stimmen) - Anhaltender, kulturell unangemessener und völlig unrealistischer (bizarrer) Wahn <p>Symptomgruppe 5 – 8:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Halluzinationen jeder Sinnesmodalität (außer akustische Halluzinationen) - Formale Denkstörungen (Gedankenabreißen, Einschübnungen in den Gedankenfluss, Zerfahrenheit, Danebenreden, Neologismen) - Katatone Symptome - Negativsymptome (Apathie, Sprachverarmung, verflachter oder inadäquater Affekt, Antriebsstörungen, sozialer Rückzug) 	<p>Charakteristische Symptome:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Wahn - Halluzinationen jeder Sinnesmodalität - Desorganisierte Sprechweise (Zerfahrenheit, häufiges Entgleisen) - Desorganisiertes oder katatones Verhalten - Negativsymptome (verflachter Affekt, Antriebshemmung, Alogie)
Zusätzliche Kriterien	
Die Symptomatik kann durch eine organische Ursache nicht erklärt werden	<p>Soziale/berufliche Leistungseinbußen</p> <p>Ausschluss von schizoaffektiver und affektiver Störung</p> <p>Ausschluss von Substanzeinfluss oder medizinischem Krankheitsfaktor (Vorerkrankungen, die die Symptomatik plausibel erklären)</p>
Dauer der Symptomatik	
Mindestens über vier Wochen bestehen die Symptome über die meiste Zeit.	Mindestens kontinuierliches Bestehen über sechs Monate; in dieser Zeit mindestens über einen Monat produktive Symptomatik (akute Phase). Während Prodromal- und Residualphasen können auch nur negative oder abgeschwächte positive Symptome bestehen.

2 Einleitung

Subtypen der Schizophrenie	
Paranoide Schizophrenie	Paranoider Typ
Hebephrenie	Desorganisierter Typ
Katatone Schizophrenie	Katatoner Typ
Undifferenzierte Schizophrenie	Undifferenzierter Typ
Schizophrenes Residuum	Residualer Typ
Postschizophrene Depression	
Schizophrenia simplex	

Die Klassifikation durch das DSM-IV-Manual geschieht unter stringenteren Auflagen als im ICD-10, erkennbar unter anderem an der geforderten Mindestdauer. Für die Diagnosestellung nach DSM-IV müssen mindestens zwei der fünf charakteristischen Symptomgruppen vorliegen. Falls der Wahn bizarr ist oder die Stimmen kommentierend bzw. dialogisierend sind, reicht bereits ein Merkmal aus. Nach ICD-10 kann die Diagnose gestellt werden, wenn mindestens ein Symptom aus der 1. bis 4. Symptomengruppe oder mindestens zwei Symptome aus der 5. bis 8. Symptomengruppe vorhanden sind.

2.1.3 Verlauf und Prognose

Der individuelle Verlauf der Erkrankung kann erheblich variieren. Oft lassen sich *drei Phasen* unterscheiden (Comer 2001): Die *Prodromalphase* (Vorläuferphase) kann häufig schon Jahre vorausgehen und ist von wenig charakteristischen Beschwerden geprägt, in der Negativsymptome überwiegen (Tandon et al. 2008c). Sie bleibt oftmals unerkannt (Häfner und an der Heiden 2003). Anschließend kommt es häufig zu einer *akuten Phase* mit überwiegenden Positivsymptomen, welche in der Regel über Wochen bzw. wenige Monate andauert. Nach dieser Erstmanifestation kommt es in ca. 50% der Fälle zu rezidivierenden produktiven Schüben mit zwischenzeitlicher Residualsymptomatik (Möller 2004). Die *Residualphase* beschreibt den Verbleib von Symptomen nach Abklingen der Akutsymptomatik (Residuum).

Neben oben genannter Abfolge ist ein Verlauf mit rezidivierenden akuten Schüben und zwischenzeitlicher vollständiger Remission möglich (Möller 2004).

Eine Minderheit weist bereits nach der Erstmanifestation eine lebenslang anhaltende Remission auf (Häfner und an der Heiden 2003, Marneros et al. 1991).

2 Einleitung

Langzeitstudien zum Thema Verlauf und Prognose (Bleuler 1972; Huber et al. 1979; Marneros et al. 1991) ergaben zum Teil widersprüchliche Ergebnisse aufgrund methodischer Unterschiede (Möller und von Zerssen 1986; Häfner und an der Heiden 2000). Die anfänglich aufgestellte „Drittelregel“ zur Prognosestellung (Bleuler 1972, Ciompi und Müller 1976, Huber et al. 1979), nach der ein Drittel nach Erstdiagnose im Verlauf einen deutlich gebesserten, ein Drittel einen gleich bleibenden und ein Drittel einen verschlechterten Zustand der Erkrankung erlebe, wurde wieder aufgegeben. Es zeichnete sich in späteren Studien ab, dass die Schizophrenie ihrer Natur nach am ehesten eine rezidivierende, häufig chronisch verlaufende Krankheit darstellt (Tandon et al. 2008a). Die Zahl derjenigen Patienten, die während des gesamten Krankheitsverlaufs nur eine einzige abgrenzbare Krankheitsperiode aufwies, war gering. In der Langzeitstudie von Marneros et al. (1991) waren nur 11% monoepisodische Fälle, hingegen zeigten 42% zwei oder drei, und 47% vier oder mehr Episoden. Auch eine 15-Jahres-Katamnese von Möller (2004) ergab für ca. 60% der Schizophreniepatienten eine persistierende Residualsymptomatik.

Eine individuelle Vorhersage des Verlaufs zu Beginn der Erkrankung ist nicht möglich (Berger 2008; Emsley et al. 2008). Als aussagekräftiger Prädiktor für einen ungünstigen Verlauf wurde die Dauer der unbehandelten Psychose festgestellt (Bottlender et al. 2000).

2.1.4 Epidemiologie

Die Erkrankung Schizophrenie betrifft gegenwärtig ca. ein Prozent der Weltbevölkerung, unabhängig von ethnischen, kulturellen oder geographischen Unterschieden (Eaton 1985; Tsuang et al. 1997; Saha et al. 2006). Männer weisen ein ca. 1,4fach erhöhtes Risiko im Vergleich zu Frauen auf, an Schizophrenie zu erkranken (Aleman et al. 2003; Ochoa et al. 2012).

Das Prädilektionsalter für Männer liegt zwischen dem 18. und 25. Lebensjahr, während Frauen eher zwischen dem 25. und 35. Lebensjahr erkranken (Ochoa et al. 2012). Vermutet wird als Ursache hierfür eine Schutzwirkung der Estradiole (Häfner 2003).

Von besonderer Bedeutung ist die hohe Suizidalität bei Schizophreniepatienten. Die Suizidmortalität liegt um das 20- bis 50fache über dem der Allgemeinbevölkerung (Demling 1988). Die Suizidraten unter den Betroffenen wurden auf bis zu 13% geschätzt (Schmidtke et al. 1996). Aktuellere Daten benennen eine standardisierte Mortalitätsratio (Ratio der beobachteten Tode zu den erwarteten Toden) von insgesamt 2,6 verglichen zur Allgemeinbevölkerung (McGrath et al. 2008).

2.1.5 Ätiopathogenese

Bei den schizophrenen Psychosen handelt es sich um sehr komplexe und heterogene Krankheitsbilder, bei denen einfache Ätiologiezuweisungen zu kurz greifen (Fanous und Kendler 2005; Craddock und Owen 2005; Jablensky 2006). Daher hat sich ein *multifaktorielles Modell* durchgesetzt, in dem genetische, neuroanatomische und neurophysiologische sowie psychosoziale Einflüsse vereint werden (Tandon et al. 2008b).

Es wird davon ausgegangen, dass die verschiedenen Einflüsse beim erkrankten Individuum unterschiedliche Gewichtung haben und die Faktoren wechselseitig in Beziehung stehen. Entsprechend dem *Vulnerabilitätsmodell* (vgl. Abbildung 2-1) werden prä- und perinatale Faktoren („*first hit*“) genannt, die zu hirnstrukturellen Veränderungen im Sinne einer neuronalen Entwicklungsstörung führen, welche einen Risikofaktor für eine Manifestation der Erkrankung darstellen (Murray und Lewis 1987; Lewis und Levitt 2002). Auf Grundlage dieser Mechanismen kann sich die Vulnerabilität („Verwundbarkeit“) im Laufe der weiteren Hirnreifung sowie durch spätere Aktivierung von relevanten Genen noch weiter erhöhen (Rapoport et al. 2005, Möller et al. 2008). Ebenso können psychosoziale Stressoren oder Drogenkonsum einen „*second hit*“ bedeuten und eine akute Psychose auslösen (Möller und Deister 2000, Dean et al. 2003).

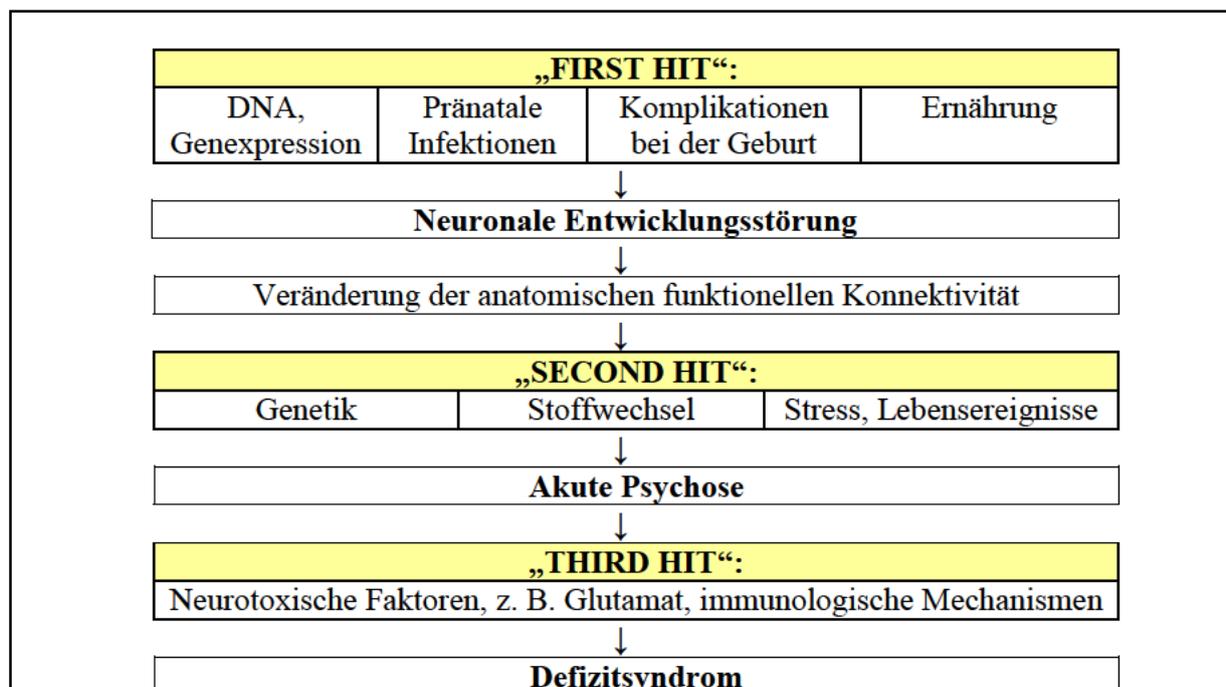


Abbildung 2-1: Multifaktorielles Modell zur Ätiopathogenese der Schizophrenie (nach Möller et al. 2008)

2 Einleitung

Nach neueren Erkenntnissen können sich nach Erstmanifestation neurodegenerative Vorgänge („*third hit*“) einleiten, ausgelöst durch neurotoxische Faktoren auf neurophysiologischer und –immunologischer Ebene (Lieberman et al. 2001a; Boteva und Lieberman 2003; Cahn et al. 2002, 2006). Durch diese Prozesse chronifiziert die Erkrankung.

Wird eine bestimmte multifaktorielle Schwelle erreicht, kann es zur Manifestation der Schizophrenie kommen (Sawa und Snyder 2002).

2.1.5.1 Prä- und perinatale Faktoren

Stress während der Schwangerschaft (Clarke et al. 2006) und Komplikationen in Schwangerschaft und Geburt (Hultman et al. 1997; Byrne et al. 2007) gelten als Risikofaktoren für die Manifestation einer Schizophrenie.

Eine häufig untersuchte Hypothese beschreibt den Einfluss von Virusinfektionen der Mutter vor allem im zweiten Trimenon der Schwangerschaft, welche einen späteren Ausbruch der Erkrankung begünstigen (Limosin et al. 2003; Meyer und Feldon 2009). Die Hypothese lautet, dass pränatale Infektionen Imbalancen in mesolimbischen und mesokortikalen Dopamin-Signalwegen induzieren, welche zu kritischen neuronalen Mechanismen beitragen (Meyer und Feldon 2009). Hingegen konnten nicht alle Studienergebnisse einen kausalen Zusammenhang nachweisen (Ebert und Kotler 2005).

2.1.5.2 Psychosoziale Faktoren

Bereits in der frühen *Life-event*-Forschung wurden Hinweise gefunden, dass kritische Lebensereignisse ein psychosozialer Auslösefaktor sein können (Brown und Birley 1970), und auch neuere Ergebnisse stützen diese Hypothese (Lysaker und Larocco 2008; Cohen et al. 2012). Auch zeigten sich Anhaltspunkte dafür, dass bei Patienten nach Erstmanifestation spätere belastende Erlebnisse das Risiko einer erneuten Exazerbation erhöhen (Bebbington und Kuipers 2003).

Ein bekannter Risikofaktor ist der Drogenkonsum, der häufig im Pubertätsalter im Zusammensein mit sogenannten *Peergroups* auftritt (DeLisi 2008; Gururajan et al. 2012). Substanzen, die zu einer schizophrenen Psychose führen können, sind Alkohol, Amphetamin („*Speed*“), Methylendioxy-N-methylamphetamin (MDMA, „*Ecstasy*“), Lysergsäurediethylamid (LSD), Kokain, Phencyclidin (PCP, „*Angel Dust*“) sowie Cannabis. Für langjährigen

2 Einleitung

Cannabis-Gebrauch konnte ein zeitlicher Zusammenhang zwischen Beginn des Abusus und Zeitpunkt der Erstmanifestation mit durchschnittlich siebenjähriger Latenz nachgewiesen werden (Galvez-Buccollini et al. 2012).

Auch die Bedeutung der Familienverhältnisse wurde wiederholt untersucht. Familien mit sogenannten *high-expressed emotions*, d. h. ein interfamiliär hohes Ausmaß gefühlsbetonter kritischer Äußerungen oder eine überprotektive Einstellung zum Patienten (Brown et al. 1972), erhöhten die Wahrscheinlichkeit eines Rezidivs (Wearden et al. 2000; Subotnik et al. 2012).

Die Tatsache, dass an Schizophrenie Erkrankte vermehrt in sozial niedrigen Schichten anzutreffen sind, wird heute mit der sogenannten *Drift-Hypothese* erklärt (Dunham 1965; Häfner 2005), wonach die Patienten aufgrund der Manifestation der Erkrankung eine niedrigere soziale Position innehaben, als es hinsichtlich ihrer primären Intelligenz und ihrer familiären Herkunft anzunehmen wäre.

2.1.5.3 Genetische Faktoren

Die Heritabilität für Schizophrenie wird auf ca. 80% geschätzt (Cardno und Gottesman 2000; Sullivan et al. 2003).

2.1.5.3.1 Familien-, Zwillings- und Adoptionsstudien

Dass die Genetik einen starken Einfluss auf die Manifestation der Schizophrenie besitzt, konnte anhand von Familien-, Zwillings- und Adoptionsstudien belegt werden (McGue und Gottesman 1991; Tsuang et al. 1991; Cardno und Gottesman 2000).

Ziel von *Familienstudien* ist es, die Häufigkeit des Auftretens von Schizophrenie abhängig vom Grad der Verwandtschaft festzustellen. Mehrheitlich konnte dabei eine erhöhte Wahrscheinlichkeit zur Erkrankung für Verwandte von Schizophreniepatienten festgestellt werden. Lichtenstein et al. (2009) wiesen anhand einer schwedischen Kohorte bei Erstgradverwandten von Schizophreniekranken (n = 35.985) nach, dass das relative Risiko, an Schizophrenie zu erkranken, 9,9 (für Kinder erkrankter Eltern) bzw. 9,0 (für Geschwister erkrankter Geschwister) beträgt. Auch Halbgeschwister weisen ein erhöhtes relatives Risiko auf. Maier et al. (1999) konnten in ihrer Metaanalyse bei Erstgradangehörigen eine

2 Einleitung

Lebenszeitprävalenz zwischen 1 bis 16 % feststellen, verglichen zu Angehörigen Gesunder mit 0 bis 2 %.

Zu berücksichtigen ist bei den Ergebnissen allerdings, dass das Umgebungsmilieu dasselbe bzw. sehr ähnlich ist, womit das Auseinanderhalten von soziokulturellen und genetischen Ursachen nicht möglich ist. Dieser Umstand wird im Studiendesign von Zwillings- und Adoptionsstudien berücksichtigt.

In *Zwillingstudien* werden ein- und zweieiige Zwillinge auf ihren Phänotyp miteinander verglichen. Bei eineiigen Zwillingen ist die komplette Desoxyribonukleinsäure (DNA) annähernd identisch, bei zweieiigen stimmt ungefähr die Hälfte der DNA überein. Obwohl durch Metaanalysen (Sullivan et al. 2003; Maier et al. 1999) die deutlich erhöhte Erkrankungsrate an Schizophrenie bei mono- und dizygoten Zwillingen nachgewiesen werden konnte, bestand keine vollständige Konkordanz. Dies beweist die Relevanz nichtgenetischer Einflüsse auf die Erkrankung (Petronis 2006, 2004; Owen et al. 2005) und bestärkt den multifaktoriellen Denkansatz.

Mit *Adoptionsstudien* gelingt die Trennung soziokultureller von genetischen Ursachen noch verlässlicher (Ingraham und Kety 2000). Hierbei wurden Kinder von an Schizophrenie erkrankten Eltern von nicht an Schizophrenie leidenden Adoptiveltern aufgezogen. Als Ergebnis zeigte sich, dass diese Kinder ihr erhöhtes Risiko, an einer Schizophrenie zu erkranken, behielten. Kinder gesunder Eltern hingegen, die bei an Schizophrenie erkrankten Eltern aufwuchsen, zeigten keine erhöhte Erkrankungswahrscheinlichkeit (Kendler et al. 1994; Petersen und Sorensen 2011).

2.1.5.3.2 Molekulargenetische Grundlagen und Genetikstudien

Schizophrenie stellt in Bezug auf die Genetik eine komplex vererbte Erkrankung dar (Schwab und Wildenauer 1998; Harrison und Weinberger 2005; Stefansson et al. 2009). Komplex genetische Erkrankungen sind durch folgende Merkmale gekennzeichnet: erstens ist das Vererbungsmuster nicht durch die Mendelschen Gesetze erklärbar, zweitens sind an der Ätiologie mehrere Gene beteiligt, die zudem sehr wahrscheinlich mit Umweltfaktoren interagieren (Ziegler 2002). Zur Erkrankung kommt es, wenn bei einer Person genetische Veränderungen in mehreren Genen vorliegen. Es resultiert eine Krankheitsdisposition, die

2 Einleitung

unter dem Einfluss von Umweltfaktoren in eine manifeste Erkrankung umschlagen kann (Ziegler 2002).

Für die Identifizierung und Lokalisierung von Suszeptibilitätsgenen stehen vor allem folgende Untersuchungen zur Verfügung: Kopplungs- und Assoziationsstudien. Diese beiden Verfahren sind in der Praxis eng miteinander verwoben. So kommt z. B. einem Kandidatengen oder einer signifikant mit einem Phänotyp assoziierten Variation, welche in einem Locus mit positiven Kopplungshinweisen positioniert ist, eine hohe Plausibilität zu (Spitzer 2006). Häufig werden genetische Polymorphismen in Form von SNPs, VNTRs (*variable number tandem repeats*) und STRs (*short tandem repeats*) untersucht.

Kopplungsuntersuchungen

Genetische Kopplungsstudien werden mittels Stammbäumen in Familien oder Trios (d. h. Betroffener und beide Elternteile) durchgeführt, bei denen eine Erkrankung überzufällig häufig auftritt. Unter Kopplung (*linkage*) wird verstanden, dass polymorphe Gensequenzen (Marker) aufgrund ihrer räumlichen Nähe auf dem gemeinsamen Chromosom miteinander vererbt werden. Die Wahrscheinlichkeit einer solchen Kopplung steigt, je näher die Genorte beieinander liegen. Diese Tatsache wird dadurch erklärt, dass ein *crossing over* in der Meiose zwischen zwei eng nebeneinander lokalisierten Genorten unwahrscheinlich ist. Solche vom *crossing over* nicht tangierten und dadurch gemeinsam vererbten Allele liegen dann im *linkage disequilibrium* (LD; Kopplungsungleichgewicht). Das bedeutet, solche Gene werden nicht mehr nach dem Zufallsprinzip verteilt, sondern erscheinen bei der nächsten Generation öfter als erwartet.

Es sollen diejenigen Marker identifiziert werden, die in der Nähe der genetischen Variation liegen (d. h. gekoppelt sind) und demnach gemeinsam vererbt werden.

Die Bewertung eines statistischen Zusammenhangs erfolgt mittels dem *logarithm of odds*- (*LOD*-) *Score*; wenn der *LOD*-Score über 3,0 liegt (d. h. die Irrtumswahrscheinlichkeit beträgt weniger als 1:10000), wird die Kopplung als signifikant erachtet. Für komplex genetische Erkrankungen wurde aufgrund bestehender Heterogenität ein zusätzlicher Parameter eingeführt, aus dem der *heterogeneity LOD*- (*HLOD*-) *Score* resultiert (Bickeböller und Fischer 2007).

2 Einleitung

Metaanalysen zu Kopplungsstudien

In verschiedenen groß angelegten Metaanalysen wurden die Ergebnisse einzelner Kopplungsstudien zur Schizophrenie zusammengefasst. Die Ergebnisse der Metaanalysen sind insgesamt inkonsistent. Badner und Gershon (2002) führten mittels MSP (*multiple scan probability*) die Auswertung von 18 Kopplungsstudien durch und fanden korrespondierende Suszeptibilitätsloci auf den Chromosomen 8p, 13q und 22q. Lewis et al. (2003) führten in Form von GSMA (*genome scan meta-analysis*) die Ergebnisse von 20 Kopplungsstudien mit 1208 berücksichtigten Stammbäumen zusammen. Folgende Loci wiesen signifikante Kopplungen zur Schizophrenie auf: 1p13.3-q23.3, 1q23.3-q31.1, 2p12-q22.1, 2q22.1-q23.3, 3p25.3-p22.1, 5q23.2-q34, 6pter-p22.3, 6p22.3-p21.1, 6q15-q23.2, 8p22-p21.1, 11q22.3-q24.1, 10pter-p14, 14pter-q13.1, 15q21.3-q26.1, 16p13-q12.2, 17q21.33-q24.3, 18q22.1-qter, 20p12.3-p11, 22pter-q12.3. Die von Ng et al. (2009) mit GSMA durchgeführte Metaanalyse von 32 Kopplungsstudien zeigte folgende Suszeptibilitätsloci: 1, 2q, 3q, 4q, 5q, 8p und 10q. Um die Ursache der Inkonsistenz bzw. fehlenden Replizierbarkeit der Studienergebnisse besser zu ergründen, führten Tang et al. (2011) eine vergleichende Metaanalyse von Kopplungsstudien mit zwei unterschiedlichen Methoden der Metaanalyse (GSMA und MSP) durch. Die beiden Methoden ergaben unterschiedliche gekoppelte Genloci, die sich größtenteils nicht überlappen. Sowohl die Ergebnisse nach GSMA und MSP konnten nach der Korrektur durch multiples Testen ihre Evidenz nicht aufrechterhalten.

Assoziationsuntersuchungen (Kandidatengenstudien)

Als Kandidatengene werden Erbanlagen bezeichnet, bei denen im Vorfeld ein Beitrag zur Krankheitsgenese angenommen wird; es wird also eine Assoziation zwischen diesem Risikofaktor und der Erkrankung vermutet. Solche Untersuchungen werden meist als Fall-Kontroll-Studien durchgeführt, d. h. eine Kohorte an Patienten und an gesunden Probanden wird untersucht. Dabei wird die Häufigkeit bestimmter Genvarianten eines Kandidatengens in beiden Kollektiven miteinander verglichen. Ergibt sich eine überzufällige Häufung einer Variante in Allel- oder Genotypverteilung, dann ist die Variante mit der Erkrankung assoziiert. Kandidatengenanalysen werden entweder zur weiteren Eingrenzung von in Kopplungsanalysen ermittelten Kandidatenregionen verwendet oder zur direkten Untersuchung von Kandidatengen (Bickeböller und Fischer 2007).

Vorteil der Assoziationsstudien ist, dass auch Assoziationen mit lediglich geringer Risikoerhöhung einer Krankheitsentstehung nachgewiesen werden können (Maier et al. 1999; Owen 2000).

2 Einleitung

Für die Bewertung der Assoziation von Kandidatengen und der Erkrankung wird die *Odds Ratio* (OR) verwendet, mit der mittels Quote ausgedrückt wird, um wie viel größer die Möglichkeit einer Erkrankung in der Gruppe mit Risikofaktor ist, im Vergleich zur Gruppe ohne Risikofaktor. Die OR stellt eine gute Näherung an das relative Risiko bei seltenen Erkrankungen dar (Bickeböller und Fischer 2007).

Es wurden einige Kandidatengene mit mutmaßlich starker Assoziation gefunden (vgl. Tabelle 2-2), z. B. RGS4 (Williams et al. 2004), DTNBP1 (Williams et al. 2005; Norton et al. 2006b), DISC1 (Millar et al. 2000) oder NRG1 (Stefansson et al. 2002, 2003; Norton et al. 2006a).

Tabelle 2-2: Übersicht über chromosomale Loci aus Kopplungsuntersuchungen zur Schizophrenie mit Angabe von Kandidatengenen (Remschmidt und Theisen 2011; aus Mehler-Wex und Renner 2008).

Beachte: aktuelle Assoziationsstudien werden nicht mehr in Form von Kandidatengenenstudien, sondern als GWAS (Genomweite Assoziationsstudien, s. unten) durchgeführt.

Chromosom	Locus	Kandidatengene
1	1q	DISC1, RGS4, CAPON
5	5q	DRD1
6	6p21-24	DTNBP1, SCA, LDL-PLA2, HLA, NOTCH4
	6q21-25	TRAR5
8	8p	NRG1, PPP3CC
10	10p	
11	11q	TPH1, DRD4
	11q	DRD2
13	13q	5HTR2A, G20, G30
15	15q13-15	CHRNA7
22	22q11	COMT, ZDHHC8, PRODH

Insgesamt fällt die Replikation der Signifikanz gefundener Kandidatengene enttäuschend aus. Sanders et al. (2008) führten eine Assoziationsanalyse mit 14 anerkannten Kandidatengenen (RGS4, DISC1, DTNBP1, STX7, TAAR6, PPP3CC, NRG1, DRD2, HTR2A, DAOA, AKT1, CHRNA7, COMT, ARVCF) an einem großen Studienkollektiv von 1870 kaukasischen Patienten mit Schizophrenie und Schizoaffektiver Störung, sowie 2002 Kontrollprobanden durch. Für die Studie wurden 789 SNPs genotypisiert. Als Ergebnis wurde keine signifikante Assoziation entdeckt, entgegen der OR-Werte der Kandidatengene aus kleineren vorhergegangenen Studien. Aktuell werden Assoziationsstudien nicht mehr als Kandidatengen-Analyse, sondern als GWAS durchgeführt.

2 Einleitung

Genomweite Assoziationsstudien (GWAS)

Seit 2006 / 2007 ermöglicht die Chip- und Arraytechnologie genomweite Assoziationsstudien (GWAS), in denen gleichzeitig millionenfach genetische Varianten (SNPs) auf mögliche Assoziationen untersucht werden. GWAS zeichnen sich durch ihren Hypothesen generierenden Ansatz aus; d. h. es können neue Varianten gefunden werden, von denen vorab keine Assoziation vermutet wird. Allerdings ist es aufgrund der Gefahr falsch positiver Ergebnisse notwendig, mehrfache Korrekturen durch multiples Testen vorzunehmen. Daher ist eine sehr hohe Anzahl an Studienprobanden notwendig (Clarke et al. 2011).

Die Ergebnisse der GWAS sind in Bezug auf Schizophrenie nicht einheitlich.

Lencz et al. (2007) führten eine Studie an 178 Patienten und 144 Kontrollen kaukasischer Herkunft durch und fanden eine Assoziation für CSF2RA und SHOX. Die erste größere GWAS kaukasischer Ethnie (O'Donovan et al. 2008) mit 479 Patienten und 2937 Kontrollprobanden erbrachte das ZNF804A-Gen als im Zusammenhang mit Schizophrenie stehend. Need et al. (2009) führten neben der Erstuntersuchung mit 871 kaukasischen Patienten und 863 Kontrollen auch eine Folgeuntersuchung (*Follow up*) mit 1460 kaukasischen Patienten und 12995 Kontrollen durch. Als Ergebnis zeigten u. a. das ADAMTSL3- und das ZNF804A-Gen eine Assoziation. Das *Schizophrenia Genetics Consortium* (SGENE) mit 2663 kaukasischen Patienten und 13498 Kontrollen in der Erstuntersuchung und 4999 kaukasischen Patienten und 15555 Kontrollen im *Follow up*, konnte für das MHC-Gen (*major histocompatibility complex*; Haupthistokompatibilitätskomplex) eine Assoziation mit Schizophrenie nachweisen, gleichso für die Gene NRG1 (Neurogranin) und TCF4 (Stefansson et al. 2009). Der Befund bezüglich der MHC-Variation ist besonders interessant, da der MHC vor allem immunologische Funktion besitzt und dadurch der Erklärungsansatz unterstützt wird, Schizophrenie als eine durch Fehlregulation des Immunsystems mitbedingte Erkrankung anzusehen. Parallel publiziert wurde eine Studie des *International Schizophrenia Consortium* (ISC), in der 3322 kaukasischen Patienten und 3587 kaukasische Kontrollen untersucht wurden. Als Ergebnis zeigten sich auch hier Assoziation mit dem ZNF804A-Gen und der MHC-Region, sowie zusätzlich mit dem MYO18B-Gen (ISC et al. 2009). *Molecular Genetics of Schizophrenia* (MGS) führten eine Erstanalyse mit 2681 kaukasischen Patienten und 2653 Kontrollprobanden und ein *Follow up* mit 1286 afrikanisch-amerikanischen Patienten und 973 Kontrollen durch, mit einem erneuten Nachweis einer Assoziation der MHC-Region, und ebenso mit CENTG2 (nur in der kaukasischen Kohorte) und ErbB4 (nur in der afrikanischen

2 Einleitung

Kohorte) (Shi et al. 2009). Die GWAS von Shi et al. (2011) an einem Han-chinesischen Kollektiv mit 3750 Patienten und 6468 Kontrollen, inklusive einem *Follow-up* an 4383 Patienten und 4539 Kontrollen erbrachte einen Zusammenhang mit SNPs innerhalb der Genloci 8p12 und 1q24.2. Das *Schizophrenia Psychiatric Genome-Wide Association Study (GWAS) Consortium* (2011) führte seine Studie zuerst an einem Kollektiv von 21856 kaukasischen Proben und im *Follow up* an 29839 Proben und fand das stärkste Signal innerhalb des Genlocus von MIR137. Yue et al. (2011) führten ihre GWAS an Han-Chinesen zuerst an 746 Schizophreniekranken und 1599 Kontrollen, im *Follow up* mit 4027 Patienten und 5603 Kontrollen durch und entdeckten Polymorphismen von ZKSCAN4, NKAPL, PGBD1 und TSPAN18 als mit der Erkrankung assoziiert.

Genkopieanzahlvarianten (*Copy number variants, CNV*)

Im zunehmenden Interesse der molekulargenetischen Forschung stehen neben den Einzelnukleotid-Polymorphismen sogenannte *copy number variants* (CNV). Dabei handelt es sich um selten vorkommende, strukturelle Genvariationen (*rare structural variations*), die relativ groß sind (Länge von 1000 bis 3 Millionen Basen) und zu abweichenden Kopieanzahlen eines bestimmten DNA-Locus führen, d. h. der Locus kann im diploiden Genom entweder nur als eine Kopie vorliegen (Deletion), oder als drei oder mehr (Duplikation), oder auch völlig fehlen (homozygote Deletion). Dadurch sind die Veränderungen der DNA durch CNVs größer als bei SNPs (Redon et al. 2006), was zu entscheidenden Auswirkungen von CNVs auf die Manifestation von psychiatrischen Krankheiten führt (Saus et al. 2010; Malhotra und Sebat 2012). Die Identifizierung von CNVs kann in der Regel im Rahmen von GWAs durchgeführt werden.

Als einer der am besten etablierten molekularen Befunde in der Schizophrenie-Forschung gilt eine Deletion in Chromosom 22q11.2. Das Mikrodeletionssyndrom 22q11 umfasst Erkrankungen wie das DiGeorge-Syndrom und das Shprintzen-Syndrom (velo-kardio-faziales-Syndrom). 20 bis 30% der Träger dieser CNV waren an Schizophrenie erkrankt (Murphy et al. 1999). Spätere GWAS (ISC 2008; Stefansson et al. 2008) fanden diese Deletion in ca. 0,5% der Schizophreniepatienten; verglichen zur Kontrollgruppe bedeutete dies ein signifikant höheres Vorkommen.

Nachfolgende GWAS fanden andere CNVs in Assoziationen zur Schizophrenie. Stefansson et al. (2008) berichteten von Deletionen in 1q21.1, 15q11.2 und 15q13.3, welche mit der Manifestation von Schizophrenie und mit Schizophrenie verwandten Psychosen signifikant assoziiert waren. Xu et al. (2008) identifizierten eine achtfach erhöhte Rate von seltenen

2 Einleitung

CNV-Mutationen bei Schizophreniepatienten bei sporadisch aufgetretener Mutation, aber nicht bei den familiären Mutationen. Walsh et al. (2008) fanden neue signifikante Assoziationen von Deletionen und Duplikationen mit einer Mindestgröße von 100 Kilobasen (kb) bei Schizophreniepatienten insbesondere mit Manifestation in der Kindheit oder im Jugendalter. Die gefundenen Mutationen spielen wichtige Rollen bei der Signaltransduktion von Glutamat oder von Neuregulinen, wie beispielsweise Variationen von ErbB4. Kirov et al. (2008) entdeckten signifikante Assoziationen zur Erkrankung und einer Deletion in Locus 2p16.3 sowie einer Duplikation in Locus 15q13.1. Bei der Deletion in 2p16.3 wird das Neurexin 1 Gen beeinflusst; die Assoziation zwischen der Deletion und Schizophrenie konnte von Rujescu et al. (2009) bestätigt werden. Eine Arbeitsgruppe um Kirov veröffentlichte ein Jahr später zwei neue Deletionen in Zusammenhang mit Schizophrenie: 22q11.2 und 17p12 (Kirov et al. 2009). Freudenberg und Freudenberg-Hua (2012) zeigten in ihrer Arbeit, dass sich die Lage der CNVs häufig mit der von Kandidatengenomen überlappt. Zudem bestätigten sie, dass es sich bei den CNVs, die bei Schizophreniepatienten häufiger zu finden sind als bei gesunden Kontrollen, vor allem um größere (> 100 kb) handelt.

Die bisher aufgeführten Varianten der DNA können das Risiko der Manifestation einer Schizophrenie erhöhen. Solche genetischen Alterationen führen u. a. auch zu Veränderungen auf neurobiologischer Ebene. Störungen der Neurobiochemie und Neurophysiologie werden aber auch als eigenständiger Erklärungsansatz betrachtet.

2.1.5.4 Neurobiologische Faktoren

Neuropathologische Veränderungen

Mehrfach konnte *post mortem* bei Schizophreniepatienten eine Erweiterung der Hirnventrikel (Seitenventrikel und dritter Ventrikel) und eine reduzierte Dicke bzw. geringere Nervenzelldichten im medialen Temporallappen (Hippocampus, Gyrus parahippocampalis, Amygdala, entorhinaler Kortex) nachgewiesen werden (Bogerts 1995).

Die Entwicklung bildgebender Verfahren in den letzten 30 Jahren machte auch die *in-vivo*-Untersuchung und morphologische Verlaufsanalyse möglich; ein Review longitudinaler Studien mit Einsatz cerebraler Bildgebung mittels Computertomographie (CT) und Magnetresonanztomographie (MRT) wies einen beschleunigten Verlust an grauer Substanz nach (Pantelis et al. 2005). Vor allem bei Kindern mit Schizophrenie (Sporn et al. 2003) und erwachsenen Patienten mit Erstmanifestation einer Schizophrenie (Lieberman et al. 2001b; Cahn et al. 2002, 2006; DeLisi et al. 2004) wurden exzessive Volumenreduktionen des

2 Einleitung

gesamten Gehirns und der grauen Substanz nachgewiesen, ebenso wie eine progressive Volumenzunahme der Liquorräume.

Während erste MRT-Studien eine jährliche Reduktion an Gehirnvolumen bei Schizophreniepatienten von ca. 1% angaben (Cahn et al. 2002), wurde in späteren Studien entdeckt, dass der Verlust von grauer Substanz und die Erweiterung der Seitenventrikel vor allem bei Patienten bis zum 45. Lebensjahr stark ausgeprägt war. Die Patienten innerhalb dieses Alterszeitraums waren in der Regel weniger als 20 Jahre erkrankt. Patienten älter als 45 Jahre zeigten keine solche Dynamik; ihr Volumenverlust entsprach in etwa dem der gleichaltrigen Kontrollprobanden (van Haren et al. 2008).

Interessant ist auch der Befund, dass Patienten mit schlechter Therapieresponse ein höheres Ausmaß an Volumenschwund zeigten als Patienten mit gutem Outcome (van Haren et al. 2008). Daraus ergibt sich ein neuer Ansatz in der Schizophrenieforschung, wonach Befunde aus der Neuroradiologie als Prognosefaktor bei Erstmanifestation verwendet werden könnten (Kerns und Lauriello 2012).

Neurobiochemische Veränderungen

Basierend auf den zwei Beobachtungen, dass klassische Neuroleptika ihre Wirkung im Dopamin-D2-Rezeptorantagonismus begründen (van Rossum 1966) und dass Substanzmissbrauch von Dopaminagonisten wie z. B. Amphetaminen zu Symptomen ähnlich einer Schizophrenie führen kann (Randrup und Munkvad 1965), wurde die *Dopaminhypothese* aufgestellt, wonach bei Schizophreniepatienten eine Hyperaktivität des dopaminergen Systems bestehen soll.

Die nach heutigem Stand der Forschung modifizierte Version der Dopaminhypothese (Davis et al. 1991) besagt, dass ein *mesolimbisch-mesokortikales Ungleichgewicht* bei Schizophreniepatienten besteht. Die kortikalen und subkortikalen (mesolimbischen) Dopamin-Transmittersysteme stehen bei Schizophreniepatienten in Imbalance. Die Desinhibition der Dopaminfreisetzung der Bahnen der Area tegmentalis ventralis zum Striatum (mesolimbisches System) führt zur Hyperaktivität dieser Projektionen und damit zur Positivsymptomatik (Abi-Dargham und Moore 2003). Aus der Inhibition der Dopaminfreisetzung der Bahnen der Area tegmentalis ventralis zum präfrontalen Kortex (mesokortikales System) resultiert eine Hypoaktivität dieser Projektionen mit Auftreten von Negativsymptomatik und kognitiven Defiziten (Andreasen 1999).

2 Einleitung

Als zweite wichtige Säule im Nachweis von pathologischen synaptischen Funktionen des ZNS (Zentralnervensystems) wird die *Glutamathypothese* angesehen, wonach eine Unterfunktion bei einem Subtyp der N-Methyl-D-Aspartat-(NMDA-)-Glutamat-Rezeptoren besteht. Dies führt zum transienten Anstieg des extrazellulären Glutamatspiegels, womit eine „desorganisierende Aktivität“ („noise“) im ZNS mit Auftreten schizophrener Symptomatik begünstigt wird (Krystal et al. 2003; Moghaddam und Krystal 2012). Die NMDA-Rezeptoren, welche für die Pathobiochemie der Schizophrenie entscheidend sind, sind auf inhibitorischen Gamma-Amino-Buttersäure-(GABA-)Neuronen lokalisiert (Benes und Berretta 2001). Diese hemmen glutamaterge Pyramidenzellen. Bei Unterfunktion der NMDA-Rezeptoren bricht die inhibierende Wirkung der GABA-Neurone ab, womit die kortikalen Pyramidenzellen exzessiv Glutamat freisetzen und verstärkt reaktive Sauerstoffintermediate gebildet werden (*glutamaterge Dysfunktion*) (Braun et al. 2007; Lisman et al. 2008). Auch diese These wurde aufgrund der Beobachtung aufgestellt, dass bestimmte psychotrope Substanzen wie PCP (Luby et al. 1959) und Ketamin, welche nicht-kompetitive Antagonisten am NMDA-Rezeptor darstellen, Symptome ähnlich einer Schizophrenie auslösen können.

Das glutamaterge System interagiert auch mit anderen Neurotransmittersystemen; z. B. bedingt eine Unterfunktion des NMDA-Rezeptors eine Überfunktion von dopaminergen Synapsen (Bowers und Hoffman 1984), wodurch sich die noch nicht geklärte Frage stellt, ob das glutamaterge System die Aberrationen im dopaminergen System verursacht (Coyle et al. 2003).

Die *Serotonin(5-HT)-Hypothese* findet ihre Grundlage in der psychotropen Wirkung von LSD, welche auf einem 5-HT_{2a}-Rezeptoragonismus beruht (Bleich et al. 1988; Kane et al. 1996). Auch die Tatsache, dass die atypischen Neuroleptika vor allem als 5-HT_{2a}- oder 5-HT_{1a}-Antagonisten wirken (Meltzer 1989; Roth und Meltzer 1995; Meltzer und Sumiyoshi 2008), bestärkt die Hypothese. Die Wirkung des serotonergen Systems erscheint dabei vielfältig. Ein verstärkter Agonismus des serotonergen Systems bewirkt akute Positivsymptome wie z. B. visuelle Halluzinationen; der therapeutische Einsatz eines Serotonin-Antagonisten wirkt antipsychotisch und bessert Negativsymptome und kognitive Defizite.

Das serotonerge System zeigt Verbindungen zu dopaminergen, glutamatergen und GABAergen Bahnen, die ebenso für die Pathogenese der Schizophrenie interessant sind (Alex und Pehek 2007; Gonzalez-Maeso et al. 2008).

2.2 Das Neuregulin3-Gen

2.2.1 Signalwege und Rezeptoren für Neureguline

2.2.1.1 Rezeptoren für Neureguline: die ErbB-Rezeptoren

Neureguline dienen vor allem als Liganden für die ErbB-(*Erythroblastic Leukemia Viral Oncogene Homolog*-)Rezeptorfamilie. Die Familie unterteilt sich in vier Mitglieder: ErbB1, welcher auch EGFR (*epidermal growth factor receptor*) oder Her1 (Heregulin 1) genannt wird, sowie ErbB2 (Neu/Her2), ErbB3 (Her3) und ErbB4 (Her4). ErbB-Rezeptoren werden von Epithel-, Mesenchym- und Nervenzellen exprimiert (Hynes et al. 2001). Sie haben dort eine bedeutende Rolle für Zellentwicklung, Proliferation und Differenzierung. Dysregulationen in der Rezeptorexpression sind u. a. assoziiert mit der Entwicklung zentralnervöser Erkrankungen wie Multipler Sklerose oder Schizophrenie (Silberberg et al. 2006; Bublil und Yarden 2007).

Struktur der ErbB-Rezeptoren

Ushiro und Cohen (1980) entdeckten, dass es sich bei EGFR um transmembran gelegene Rezeptortyrosinkinasen (RTK) handelt, welche als Oberflächenrezeptoren mit hoher Affinität für Polypeptid-Wachstumsfaktoren fungieren. RTK sind Transmembranrezeptoren mit extra-, trans- und intrazellulärem Anteil (Hubbard und Till 2000). Am extrazellulären Anteil bzw. an der Ektodomäne bindet der Ligand und löst dadurch Veränderungen an der intrazellulären Tyrosinkinase bzw. Endodomäne aus. Daraufhin werden Tyrosinreste von umgebenden Targetproteinen, vor allem aber von Tyrosinresten des Rezeptors selbst phosphoryliert und so eine Reihe von Signalwegen aktiviert (Zwick et al. 2001).

Liganden für ErbB-Rezeptoren

Die Aktivität von ErbBR wird reguliert durch die Genexpression seiner Liganden (Hynes et al. 2001). Alle Liganden von ErbBR sind Wachstumsfaktoren und besitzen eine EGF-ähnliche Domäne, mit der sie spezifisch an ErbBR binden können. Die Wachstumsfaktoren lassen sich, abhängig vom jeweiligen ErbBR an den sie binden, in drei Gruppen einteilen (vgl. Abbildung 2-2). Relevant für NRG3 ist der Rezeptor ErbB4.

2.2.1.2 Aktivierung und Signaltransduktion des ErbB4-Rezeptors

Spezifisch für ErbB4 im Vergleich zu anderen ErbB-Rezeptoren ist seine Fähigkeit, mittels seines C-terminalen Endes (Threonin-Valin-Valin) mit Proteinen der MAGUK-Gruppe (*membrane-associated guanylate kinases*) in neuronalen Synapsen eine Bindung einzugehen, welche eine sogenannte PDZ-Domäne enthalten. Die PDZ-Domäne ist eine Proteininteraktionsdomäne, die sequenzspezifisch an ein solches C-terminales Ende bindet. Diese Interaktion wurde als möglicher Faktor der neuronalen Plastizität gedeutet (Garcia et al. 2000).

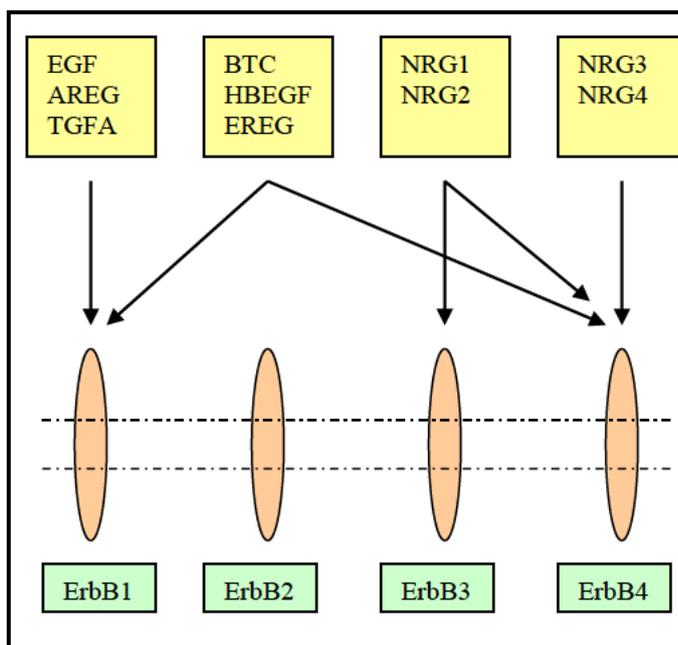


Abbildung 2-2: drei Gruppen von Liganden für die ErbB-Rezeptoren:

Die erste Gruppe an Liganden (EGF, AREG [Amphiregulin] und TGFA [*Transforming growth factor-α*]) bindet nur an ErbB1. Die zweite Gruppe (BTC [Betacellulin], HBEGF [*Heparin-binding EGF-like growth factor*] und EREG [Epiregulin]) bindet an ErbB1 und/oder ErbB4. Die Neureguline (NRG) als dritte Gruppe gehen eine Bindung mit ErbB3 und ErbB4 ein, wobei NRG1 und NRG2 sowohl für ErbB3 als auch ErbB4, und NRG3 mit NRG4 nur für ErbB4 spezifisch sind. Der Rezeptor ErbB2 besitzt keine Liganden-Bindungsstelle. Eine Interaktion von ErbB2 mit NRG ist möglich, aber nur, wenn NRG gleichzeitig an ErbB3 und ErbB 4 binden (nach Benzel et al. 2007).

Aktivierung des Rezeptors

Bindet ein Ligand wie NRG3 an den ErbB4-Rezeptor, wird dadurch die Formierung der Rezeptoren zu Homo- oder Heterodimeren induziert, d. h. zwei benachbarte Rezeptorstrukturen fügen sich zu einem gemeinsamen zusammen. Dies führt zur Aktivierung der intrinsischen Tyrosinkinase-Domäne und anschließend zur Auto- bzw. Transphosphory-

2 Einleitung

lierung an spezifischen Tyrosin-Resten im cytoplasmatischen Anteil des Rezeptors (Alroy und Yarden 1997; Buonanno und Fischbach 2001). Durch die Fähigkeit der Dimerisierung des Rezeptors kommen die Tyrosinkinasedomänen in gemeinsame Nähe, wodurch sich die beiden Einzelrezeptoren gegenseitig phosphorylieren. Neben der Autophosphorylierung fungieren die Tyrosinreste auch als Andockstellen für weitere Moleküle der Signaltransduktion. Insgesamt expandiert das Signal und eine Diversifikation setzt ein, d. h. es werden unterschiedliche intrazelluläre Signalwege aktiviert, die zu verschiedenen zellulären Antworten führen (Muthuswamy et al. 1999; Sweeney et al. 2000; Hynes et al. 2001).

Die Signaltransduktion beginnt mit der Ligandenbindung an ErbB4. Danach folgen die Rezeptordimerisierung und die Abspaltung der Ektodomäne durch eine Metalloprotease (proteolytische Prozessierung) (Vecchi und Carpenter 1997; Vidal et al. 2005). Die anschließende Spaltung der intrazellulären Domäne (S80) von ErbB4 vom membranständigen Anteil durch eine Presenilin-abhängige Gamma-Sekretase ermöglicht die Translokation von S80 zum Zellkern (Vidal et al. 2005). Dort wirkt S80 regulierend auf Transkriptionsfaktoren ein, welche Wachstums-, Überlebens- und Migrationsprozesse beeinflussen (Long et al. 2003; Omerovic et al. 2004).

Interaktionen von ErbB4 mit *Src homology 2 domain containing* (SHC), *Son of Sevenless* (SOS) und *Growth Factor Receptor-Bound Protein-2* (GRB-2) führen zur Aktivierung des MAP-Kinase-Signalwegs, welcher das Überleben der Zelle mitbestimmt. Die p85-Untereinheit von PI3K führt zu dessen Phosphorylierung und zur Aktivierung von Signalwegen, die ebenso das Überleben der Zelle regulieren, indem sie vor Apoptose geschützt wird (PI3K/Akt-Signaltransduktion; Cook et al. 2011). Auch die Aktivierung der JAK/STAT-Signaltransduktion führt zu Änderungen der Genexpression (Shaposhnikov et al. 2013).

Funktionen des ErbB4-Rezeptors im ZNS

Der Signalweg von Neuregulinen und ErbB4 ist essenziell z. B. für die Migration kortikaler Interneurone (Flames et al. 2004; Li et al. 2012), Proliferation (Weiss et al. 1997), synaptische Plastizität (Garcia et al. 2000; Huang et al. 2000), neuronaler Zelltod (Goldshmit et al. 2001), Langzeitpotenzierung (Eilam et al. 1998; Huang et al. 2000; Ma et al. 2003) und Funktionalität der Oligodendrozyten (Calaora et al. 2001; Schmucker et al. 2003; Sussman et al. 2005; Carteron et al. 2006).

2 Einleitung

Treten pathologische Veränderungen in der Signaltransduktion von Neuregulinen und ErbB4 auf, kommt es zu Alterationen in der neuronalen Migration während der Gehirnentwicklung (Corfas et al. 2004). Durch diese Änderungen in der synaptischen Plastizität können Denkprozesse und Kognition in einer für Schizophrenie typischen Form beeinträchtigt sein (Nicodemus et al. 2006; Norton et al. 2006a; Silberberg et al. 2006; Law et al. 2007; Walsh et al. 2008; Buonanno 2010; Bae et al. 2012; Hatzimanolis et al. 2013).

2.2.2 Die Familie der Neuregulin-Gene

NRGs sind Mitglieder einer Genfamilie, die für die Proteinfamilie der Neureguline kodiert. Die Proteine dienen als extrazelluläre Signalmoleküle und Liganden für Rezeptor-Tyrosinkinasen der ErbB-Rezeptorfamilie (Buonanno und Fischbach 2001, Falls 2003). Sie besitzen strukturelle Ähnlichkeit zum Epidermal-growth-factor (EGF) (Buonanno und Fischbach 2001). Insgesamt gibt es vier NRG-Gene und vier NRG-Proteine mit jeweiligen Isoformen (Guma et al. 2009).

Entdeckt wurde die Familie der NRGs erstmals in den Jahren 1992 und 1993 durch vier verschiedene Forschungsgruppen, deren Ergebnisse ein differenziertes Bild der Aufgaben von NRGs zuließen: sie dienen als Liganden für den ErbB2-Rezeptor, der als Onkogen eine bedeutende Rolle bei der Mammakarzinom-Entstehung besitzt (Holmes et al. 1992; Peles et al. 1992), sie stimulieren die Proliferation von Schwannzellen (Goodearl et al. 1993) und die Synthese von Acetylcholinrezeptoren bei Muskelzellen (Falls et al. 1993). Weitere Funktionen wurden in den darauffolgenden Jahren entdeckt: sie spielen eine bedeutende Rolle in der Entwicklung des Nervensystems, z. B. Zellmigration der kortikalen Interneurone, Proliferation, Adhäsion, Anlage neuromuskulärer Verbindungen, Wachstum von Zellen der Neuralleiste (*neural crest*) und ihren Derivaten wie Schwannzellen und Neurone des Sympathikus, sowie Wachstum der Oligodendrozyten (Yarden und Sliwkowski 2001; Falls 2003; Britsch 2007). Auch für die Entwicklung eines gesunden kardiovaskulären Systems sind sie unverzichtbar (Kramer et al. 1996), ebenso für den programmierten Zelltod von epithelialen und mesenchymalen Zellen.

Struktur und Isoformen der NRG-Proteine

Den Neuregulinen gemein ist eine EGF-ähnliche Domäne. Bis zum heutigen Zeitpunkt ist NRG1 das am besten studierte Familienmitglied. Alternatives Spleißen der Ribonukleinsäure

2 Einleitung

(RNA) ist ein bedeutender Mechanismus zur Generierung der Vielfalt an Isoformen von NRG-Proteinen (Buonanno und Fischbach 2001; Nurtdinov et al. 2003), durch den erst die Wahrnehmung organspezifischer Aufgaben ermöglicht wird (Falls 2003).

Intra- und extrazelluläre Form von NRG

Bevor ein NRG-Protein als Botenstoff fungiert, wird es als transmembranäre Form in synaptischen Vesikeln gespeichert, inklusive solcher die Glutamat beinhalten (Stefansson et al. 2002). Nach erfolgter Exozytose werden dem NRG-Protein mittels Metalloproteasen regulatorische Aminosäuresequenzen abgespalten (*Ectodomain-Shedding*). Diese sogenannten Ektodomänen wandern nun durch den synaptischen Spalt, bis sie als Liganden an ErbB an der postsynaptischen Membran binden (Stefansson et al. 2002).

NRGs und Erkrankungen des ZNS

Es wurde nachgewiesen, dass NRGs die cholinerge Neurotransmission beeinflussen (Zhong et al. 2008), sowie sensorisches Gating und auf Gedächtnisinhalte bezogenes Verhalten (Chen et al. 2008). Solche pathophysiologischen Veränderungen treten unter anderem bei psychiatrischen Erkrankungen wie der Schizophrenie (Keri et al. 2001; Raedler et al. 2007) oder der Bipolaren Störung (Keri et al. 2001; Gibbons et al. 2009) auf.

NRG1 ist seit den Arbeiten von Stefansson et al. (2002, 2003) im zentralen Interesse der molekulargenetischen Forschung psychiatrischer Erkrankungen. Verschiedene Metaanalysen erbrachten weitere Unterstützung für die Hypothese, dass NRG1 ein Suszeptibilitätsgen für Schizophrenie darstellt (Li et al. 2006; Munafo et al. 2006, 2008). Variationen in der 5'-Region wurden als Suszeptibilitätsfaktor angesehen, zusammen mit der Expression von einigen ZNS-spezifischen Isoformen, welche unterschiedlich von assoziierten *Upstream*-Polymorphismen reguliert werden (Stefansson et al. 2002; Law et al. 2006). Auch bezüglich NRG3 gibt es Hinweise dafür, ein Suszeptibilitätsfaktor für Schizophrenie zu sein.

2.2.3 Das Neuregulin 3-Gen

Das Gen NRG3 wurde 1997 identifiziert von Zhang und dessen Arbeitsgruppe (Zhang et al. 1997) als ein paraloges Gen zu NRG1. Lokalisiert ist das humane NRG3-Gen auf 10q22-q23 (Gizatullin et al. 2000). Es umfasst auf genomischer Ebene 1.112 Kilobasenpaare (kb) (Genecards 2013).

2 Einleitung

Struktur und Rezeptoraffinität

NRG3 zeigt, wie auch die anderen NRGs, eine EGF-ähnliche Domäne, eine transmembrale Domäne und eine große zytoplasmatische Domäne. Zhang et al. (1997) wiesen durch von Menschen und Mäusen isoliertes NRG3 nach, dass sich die EGF-ähnliche Domäne spezifisch an die extrazelluläre Domäne von ErbB4 bindet, aber nicht an das verwandte ErbB2 oder ErbB3. Humanes NRG3 besteht in voller Länge aus 720 Aminosäuren und besitzt ein Molekulargewicht von 78 Kilodalton (kD). Die EGF-ähnliche Ektodomäne zeigt zu 31% Übereinstimmung zu der EGF-ähnlichen Domäne von NRG1. Die intrazelluläre Domäne stimmt nur 13% mit NRG1 überein. Die N-terminale Domäne ist ähnlich der des *Sensory and motor neuron-derived factor* (SMDF) (Zhang et al. 1997; Cabedo et al. 2002), daher fehlen auch die sonst für NRGs typischen Ig-ähnlichen (*Ig-like*) oder gewundenen (*kringle-like*) Domänen (Zhang et al. 1997).

Vorkommen

Zhang et al. (1997) und Longart et al. (2004) konnten NRG3 nur im sich entwickelnden und adulten Nervengewebe nachweisen, mit hoher Expressionsrate im zerebralen Kortex, Hippocampus und Thalamus. Später wurden Genexpressionen auch in nicht-neuralem Gewebe nachgewiesen, z. B. während der Entwicklung der weiblichen Brustdrüse oder eines Mammakarzinoms (Dunn et al. 2004; Howard et al. 2005).

Isoformen

Im Gegensatz zu NRG1, ist bei NRG3 wenig über den Spleißvorgang der prä-messenger-Ribonukleinsäure (mRNA), das Profil des Transkriptionsprodukts oder die Funktion im menschlichen Gehirn bekannt (Kao et al. 2010). Die quantitative Expression der NRG3-Transkripte, inklusive hFBNRG3 (Carteron et al. 2006), wird während der Gehirnentwicklung reguliert.

Es existiert mehr als eine Klassifizierung der Isoformen von NRG3. Die von Kao et al. (2010) ist die bis dato umfassendste, ebenso führten Carteron et al. (2006) und Morar et al. (2011) eine Einteilung durch.

Das von Carteron et al. (2006) entdeckte *Human foetal brain neuregulin 3* (hFBNRG3) unterscheidet sich durch einen kürzeren N-Terminus von der von Zhang et al. (1997) entdeckten Isoform, zudem ist das Protein glykolysiert und seine Lebenszeit stärker durch das Ubiquitin- und Proteasom-System reguliert. Im Vergleich zur Isoform von Zhang et al. (1997), ist bei hFBNRG3 das Exon 1 herausgespleißt, während zwei zusätzliche Exons (Exon 2 und 3)

2 Einleitung

neu eingegliedert sind (vgl. Abbildung 2-3). Die Abwesenheit von Exon 1 bedeutet, dass für hFBNRG3 ein anderer Promoter genutzt wird (Carteron et al. 2006; Chen et al. 2009; Morar et al. 2011). Kao et al. stellten fest, dass hFBNRG3 auch in adulten Gehirnen exprimiert wird. Während Carteron et al. (2006) von 11 Exons ausgingen, fanden Kao et al. (2010) insgesamt 12 Exons. In der vorliegenden Arbeit wird von 12 Exons ausgegangen (vgl. Abbildung 5-1).

Funktion im Zusammenhang mit dem ZNS

NRG3 übernimmt eine pleiotrope Rolle in der Entwicklung des ZNS: durch Ligandenbindung mit ErbB4 wirkt es auf Proliferation, Migration, Musterung (*patterning*) und Differenzierung der Neuroblasten während der Embryogenese ein (Assimacopoulos et al. 2003; Anton et al. 2004; Kao et al. 2010; Hatzimanolis et al. 2013). Die Arbeitsgruppe um Carteron (2006) konnte feststellen, dass hFBNRG3 als ein lebensverlängernder Faktor für Vorläuferzellen der Oligodendrozyten wirkt, indem es den PI3K/Akt1-Signalweg aktiviert.

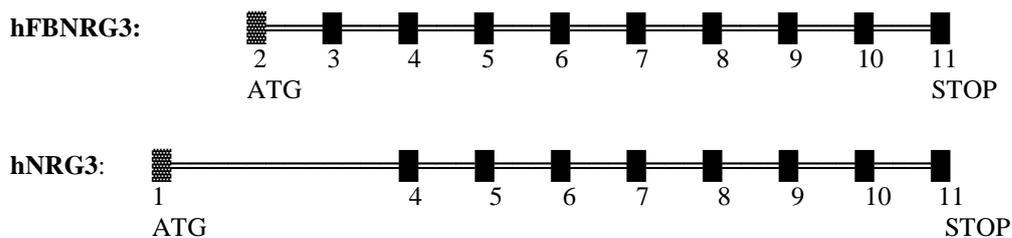


Abbildung 2-3: Graphische Darstellung zweier wichtiger Isoformen des NRG3-Gens (nach Carteron et al. 2006). hNRG3 steht für die Erstbeschreibung von Zhang et al. (1997), hFBNRG3 für die von Carteron et al. (2006) entdeckte Isoform. (ATG = Startcodon; STOP = Stopcodon; Rechtecke = Exons, Verbindungslinien = Introns)

2.2.4 Neuregulin 3 und Schizophrenie

Dass Neureguline in der Ätiopathogenese der Schizophrenie mitwirken, wurde erstmals von Stefansson et al. (2002, 2003) durch genomweite Studien und Haplotyp-Studien über NRG1 postuliert. Durch zahlreiche folgende Studien ist die Evidenz einer genetischen Assoziation zwischen NRG1 und Schizophrenie mittlerweile gut dokumentiert (Hashimoto et al. 2004; Banerjee et al. 2010). Auch in Bezug auf NRG3 und dessen Genlocus 10q22-q23 wurden in mehreren Veröffentlichungen Hinweise auf eine Assoziation zur Schizophrenie gefunden, welche im Anschluss einzeln besprochen werden.

2.2.4.1 Studien zum Genlocus 10q22-q23 und Schizophrenie

1. Genomweite Kopplungsstudie von Fallin et al. (2003)

Der Genlocus 10q22 wurde erstmals durch eine genomweite Kopplungsstudie von Fallin et al. (2003) in Verbindung mit der Entstehung einer Schizophrenie gebracht. Die Arbeitsgruppe führte ihre Analyse an einer Population von 29 Multiplex-Familien (Familien mit mehreren Betroffenen) mit Aschkenasi-Juden durch, bei denen jeweils mindestens zwei Individuen an Schizophrenie erkrankt waren. Dabei wurden zur Verminderung der genetischen Heterogenität nur Patienten in die Studie eingeschlossen, deren Eltern und Großeltern aschkenasische Juden waren. Die rekrutierten Patienten erfüllten die DSM-IV-Kriterien einer Schizophrenie.

Die Ergebnisse der Arbeitsgruppe um Fallin bekräftigten die Hypothese, dass der Genlocus auf Chromosom 10q22 Suszeptibilitätsgene für Schizophrenie beherbergt. Die aussagekräftigsten Ergebnisse wurden hierbei auf Locus 10q22.3 (DS10S1686) detektiert, für den das Ergebnis aus der nicht-parametrischen Kopplungsanalyse (*nonparametric linkage score*, NPL-Score) 3,35 betrug, mit einem genomweiten p-Wert von 0,035. Der HLOD-Score wies einen Wert von 3,14 auf. An diese Erstuntersuchung schloss sich eine *Follow-up*-Feinkartierungsanalyse von 23 zusätzlichen Markern auf Chromosom 10q zwischen D10S537 und D10S1693 an. Als Ergebnis stieg der HLOD Score auf 4,27 (p-Wert 0,00002) mit einem 95%-KI für D10S1677 bis D10S1753 (107,2 Centimorgan, cM) an. Die Tatsache, dass Gene wie HTR7 (Serotoninrezeptor 7) und NRG3 im interessierenden Locus liegen, brachte Fallin et al. zu der Vermutung, dass es sich bei diesen Genen um Suszeptibilitätsgene handelt.

2. Genomweite Kopplungsstudie von Faraone et al. (2006)

Die Arbeitsgruppe um Faraone (2006) rekrutierte 606 Familien von Han-Chinesen, bei denen insgesamt 1234 Familienmitglieder von Schizophrenie betroffen waren. Um in die Studie eingeschlossen zu werden, mussten die Familienmitglieder von Han-Chinesen abstammen und es musste ein Geschwisterpaar pro Familie an der Erkrankung leiden. Die Patienten mussten die DSM-IV-Kriterien einer Schizophrenie erfüllen. Insgesamt wurden 386 Marker untersucht, welche durchschnittlich 9 cM voneinander entfernt lagen.

Als Ergebnis wurden fünf Regionen mit einem NPL-Score von 2,0 oder größer gefunden; der größte NPL-score war mit 2,88 auf Genlocus 10q22.3 (D10S2327; 100,92 cM) nachzuweisen. Dadurch konnten Faraone et. al die Hypothese verifizieren, dass der Genort 10q22 als ein Suszeptibilitätslocus für Schizophrenie angesehen werden kann. Die Ergebnisse konnten aber

2 Einleitung

zum Zeitpunkt der Studienveröffentlichung keine genomweite Signifikanz erlangen, da eine Feinkartierungsstudie mit dem Ergebnis einer Kopplung mit Schizophrenie fehlte.

3. Fall-Kontroll- und familienbasierte Feinkartierungs-Assoziationsstudie von Chen et al. (2009)

Chen et al. (2009) unternahmen eine Feinkartierungs-Assoziationsstudie der Genposition 10q22-q23. Die Arbeitsgruppe arbeitete größtenteils auch an der Veröffentlichung von Fallin et al. (2003) mit, und ebenso wurden für die Studie Aschkenasi-Juden rekrutiert. Es nahmen 285 Trios, 173 unverwandte Patienten und 487 Kontrollprobanden teil. Untersuchungsgegenstand waren die Diagnosen Schizophrenie und schizoaffektive Störung, sowie neun quantitative Merkmale bzw. Faktoren (*traits*), welche zur charakteristischen Symptomatik der Schizophrenie gezählt wurden. Zur Diagnosestellung wurde das DSM IV verwendet, die quantitativen Merkmale wurden nach dem *Consensus diagnostic ratings*, dem *Diagnostic Interview of Genetic Studies* (DIGS; bearbeitet für DSM-IV) und dem *Premorbid Adjustment Scale* (Cannon-Spoor et al. 1982) definiert. Insgesamt wurden 1414 SNPs genotypisiert, welche entlang des 95%-KI des Kopplungs-Peaks der vorhergehenden Studie lagen.

Für die Diagnose Schizophrenie konnte keine einzige signifikante Assoziation nachgewiesen werden, welche einer Korrektur durch multiples Testen standhielt. Hingegen wurde Evidenz für die Assoziation des Merkmals Wahn (*delusion*) und drei einander benachbarter SNPs (rs10883866, rs10748842 und rs6584400) gefunden, die in einem 13 kb-Intervall in Intron 1 des NRG3-Gens lagen (p-Werte für rs10883866 und rs10748842 = $7,26 \times 10^{-7}$; p-Wert für rs6584400 = $8,40 \times 10^{-6}$). Der kleinste p-Wert konnte in der Analyse der Trios mit $7,26 \times 10^{-7}$ nachgewiesen werden. Zwei Marker (rs10883866 und rs10748842) lagen im kompletten LD ($r^2 = 1$) und wiesen denselben p-Wert auf. Bei Analyse der nicht verwandten Patienten wurde ein p-Wert von $1,55 \times 10^{-2}$ ermittelt. Der kombinierte p-Wert beider Patientengruppen lag bei $2,30 \times 10^{-7}$. Um genomweite Signifikanz zu erreichen, wurde der p-Wert nach Durchführung von 10.000 Permutationen pro Merkmal erneut gemessen ($p = 2,7 \times 10^{-3}$).

Der 162 kb große LD-Block der drei SNPs mit den signifikantesten Signalen ist in der Nähe des 5'-Endes lokalisiert und enthält den Promoter, Exon 1, und Teile des Introns 1. Dieser Block liegt proximal zu einem alternativen Promotor und Transkriptionsstartpunkt für hFBNRG3.

Einige der ursprünglich 1536 SNPs wurden aufgrund starker Abweichungen vom HWE (Hardy-Weinberg-Equilibrium) von der Studie ausgeschlossen. Chen et al. testeten diese

2 Einleitung

aussortierten SNPs, ob sie den Kriterien von CNVs entsprächen und fanden zwei adäquate Regionen innerhalb des NRG3-Gens. Beide wurden als Deletionen identifiziert, welche in Intron 1 (Deletion $\Delta 5,5$) und Intron 3 (Deletion $\Delta 32,2$) gelegen sind. Deletion $\Delta 5,5$ liegt in einer Chromosomenregion, für die ein signifikantes Signal in dieser Studie nachgewiesen werden konnte, und Deletion $\Delta 32,2$ liegt innerhalb eines alternativen, nichtkodierenden Exons in NRG3, für welches ein humaner mRNA-Klon annotiert wurde (Benson et al. 2004). Chen et al. fanden keine Evidenz dieser Deletionen weder für Schizophrenie noch für eine der neun Faktoren, allerdings wurde betont, dass bei einer Stichprobe dieser Größe die Chancen minimal seien, assoziierende Signale für Varianten dieser Größenordnung zu erhalten.

2.2.4.2 Studien über das NRG3-Gen und Schizophrenie

1. Familienbasierte Assoziationsstudie von Fallin et al. (2005)

In der Assoziationsstudie von Fallin et al. (2005) an aschkenasischen Juden wurden 337 Trios mit einem Kind mit Bipolarer Störung Typ I, 274 Trios mit einem Kind mit schizoaffektiver Störung oder Schizophrenie und 548 Kontrollprobanden analysiert. Es wurden 440 SNPs aus 64 Genen, darunter 18 SNPs des NRG3-Gens, untersucht. Von der Patientengruppe Schizophrenie und schizoaffektive Störung hatten 21% eine Schizophrenie. Zur Diagnosestellung wurde das DSM IV angewandt. Bei den Teilnehmern mussten Eltern und Großeltern ebenfalls aschkenasische Juden sein; zudem mussten von beiden Elternteilen DNA-Proben vorhanden sein.

Als Ergebnis zeigte keine der Polymorphismen von NRG3 eine Assoziation sowohl in der Gesamtgruppe Schizophrenie und schizoaffektive Störung, als auch in der Untergruppe der Schizophreniepatienten.

2. Fall-Kontroll-Assoziationsstudie von Benzel et al. (2007)

In der Assoziationsstudie von Benzel et al. (2007) an einer schottischen Stichprobe wurden acht Gene der ErbB- und NRG-Familie auf einen Zusammenhang mit Schizophrenie getestet. Es wurden 396 schottische Patienten mit Schizophrenie oder schizoaffektiver Störung und 1342 Blutspender als Kontrollprobanden rekrutiert. Die Diagnosen wurden auf Grundlage der *Operational Criteria Checklist* (OPCRIT) gestellt. Eine Abweichung vom HWE wurde ausgeschlossen.

Insgesamt wurden 365 SNPs dieser acht Gene getestet, 105 davon lagen auf NRG3. Zur Testung der Assoziation bei Allel- und Genotypen wurde der Exakte Fisher-Test durchgeführt.

2 Einleitung

Die Testung auf Interaktionen zwischen den SNPs in verschiedenen Kandidatengenomen wurde mittels logistischer Regression erarbeitet.

Als Ergebnis erwiesen sich 42 SNPs als signifikant assoziiert mit der Erkrankung (p -Wert $< 0,05$), welche in EGFR (ErbB1), ErbB4, NRG1, NRG2 und NRG3 lokalisiert waren. Von den signifikanten SNPs waren zehn in NRG3 positioniert, ein Marker davon (rs3924461) mit einer hoch-signifikanten Assoziation in der Allel-Testung (p -Wert $< 0,01$). Weitere elf Marker von NRG3 zeigten einen Trend zur Signifikanz (p -Wert $< 0,10$). Mit diesen Ergebnissen konnte erstmals eine signifikante Assoziation zwischen NRG3 und Schizophrenie dokumentiert werden.

Eine Haplotypanalyse stellten Benzel et al. nur für NRG1 dar. Für NRG3 wurde trotz aussagekräftiger Daten kein Haplotyp dargestellt, da die SNPs räumlich zu stark getrennt waren, um sie im Kopplungsungleichgewicht zu vermuten. Benzel et al. konnten aufgrund der Distanzen nicht sicher ausschließen, ob die signifikanten Daten zufällig bzw. aufgrund funktionell unterschiedlicher Varianten innerhalb desselben Gens entstanden sind.

Als weiteren Schritt suchte die Arbeitsgruppe nach signifikanten Gen-Gen-Interaktionen und konnten solche für NRG3 mit NRG1 und ErbB4 nachweisen, welche wesentlich höher als fünf Prozent lagen (Ergebnisse unterhalb von fünf Prozent wurden als zufällige Interaktionen angesehen). Die Art und Verteilung dieser paarweisen Gen-Gen-Interaktionen brachte Benzel et al. zu dem Schluss, dass zwischen NRG1 und NRG3 (sowie auch zwischen NRG1 und NRG2) eine Konkurrenz beider Liganden bei der Rezeptorbindung besteht.

Insgesamt unterstützten die signifikanten Gen-Gen-Interaktionen dieser Studie die Hypothese, dass neben dem Signalweg des bereits als Kandidatengen definierten NRG1 auch der Signalweg von NRG3 mit der Entstehung einer Schizophrenie in Verbindung steht. Hingegen muss berücksichtigt werden, dass Benzel et al. die Ergebnisse der Interaktions-Analyse der Korrektur durch multiples Testen nicht standhielten, was die Aussagekraft der Studie mindert.

3. Fall-Kontroll- und familienbasierte Assoziationsstudie von Wang et al. (2008)

Wang et al. (2008) untersuchten in einer Assoziationsstudie mit Han-Chinesen einen Zusammenhang zwischen NRG3 und Schizophrenie. Es nahmen 270 nicht verwandte Schizophreniepatienten, 235 Kontrollprobanden und 280 Trios (Betroffene und Eltern) bzw. Kernfamilien teil. Zur Diagnosestellung der Schizophrenie wurden die Kriterien nach DSM IV herangezogen. Eine Abweichung vom HWE wurde ausgeschlossen.

Es wurden neun SNPs zwischen Intron 1 und Exon 9 des NRG3-Gens analysiert, zunächst in einer Fall-Kontroll-Studie. Zwei Marker (rs1937970 und rs677221), welche im Intron 4

2 Einleitung

lokalisiert sind (NCBI 2012), zeigten signifikante Assoziationen zur Schizophrenie, sowohl bei der Genotyp- als auch Allelverteilung (p-Wert < 0,05). Bei Allel rs677221-C war das Ergebnis hochsignifikant (unkorrigierter p-Wert = 0,001; OR = 1,439; 95%-KI 1,115-1,858). Für rs1937970 wurde sowohl bei der Genotyp- als auch Allelverteilung ein signifikantes Ergebnis erzielt (p-Wert = 0,027 bzw. 0,024). Allerdings konnte die Signifikanz dieses Markers nach Korrektur durch multiples Testen nicht erhalten bleiben.

Bei der Analyse des Haploblocks, der von beiden Markern gebildet wurde, zeigte sich der Haplotyp GC signifikant häufiger bei den Schizophreniepatienten (p-Wert aus permutierten Daten = 0,0047), der Haplotyp AG häufiger bei den Kontrollen (p-Wert aus permutierten Daten = 0,0016). Beide Ergebnisse blieben auch nach Korrektur durch multiples Testen signifikant.

Diese beiden signifikanten Marker wurden anschließend an einer unabhängigen Trio-Stichprobe auf eine familienbasierte Assoziation mit Schizophrenie analysiert. Die Allele rs1937970-A und rs677221-G wurden signifikant seltener an die Nachkommen weitergegeben (unkorrigierter p-Wert für rs1937970-A = 0,003; p-Wert für rs677221-G = 0,004). Im *Transmission Disequilibrium Test* (TDT) für Haplotypen zur Testung der Allel-Kombinationen von rs1937970-rs677221 erwies sich der Haplotyp AG als signifikant seltener (unkorrigierter p-Wert = 0,006), sowie der Haplotyp GC als signifikant häufiger (unkorrigierter p-Wert = 0,004) an die von Schizophrenie betroffenen Nachkommen weitervererbt.

4. Genomweite Kopplungsstudie und familienbasierte Feinkartierungsstudie von Xu et al. (2009)

Die Arbeitsgruppe um Xu (2009) untersuchte seltene CNVs in einer Kombination aus genomweiter Kopplungsstudie und familienbasierter Feinkartierungsstudie an einer afrikanischen Population aus Südafrika. An der Assoziationsanalyse nahmen 48 Patienten mit familiären Erkrankungshintergrund inklusive beider Elternteile, 152 Patienten mit sporadisch aufgetretener Schizophrenie mit deren Eltern und 159 gesunde Kontrollprobanden inklusive deren Eltern teil. Für eine bestimmte Zahl der betroffenen Familien waren zudem noch die Daten weiterer betroffener Familienmitglieder zu gewinnen.

Für die genomweite Kopplungsanalyse wurden 479 Individuen aus 130 Familien rekrutiert. Xu et al. identifizierten 24 vererbliche CNVs in 19 Familienfällen, welche insgesamt 52 Gene betrafen. Für zwölf dieser 19 Familienfälle waren die DNA-Proben und Genotypisierung für mindestens ein weiteres betroffenen Familienmitglied erhältlich. Davon konnte bei neun

2 Einleitung

dieser zwölf Familienfälle für alle genotypisierten Familienfälle eine Ko-Segregation mit der Diagnose Schizophrenie nachgewiesen werden. Die CNVs der neun Familienfälle veränderten 12 bekannte Gene, wovon eines das NRG3-Gen war. Für NRG3 wurde eine 73.6 kb lange Duplikation in Intron 1 des NRG3-Gens entdeckt, welche Defizite in der Regulation verursachen könnte. Die CNV überlappt sich dabei mit der von Chen et al. (2009) entdeckten CNV in Intron 1. Xu et al. sprachen sich daher für die Wertigkeit einer *Follow-up*-Studie aus.

5. Fall-Kontroll-Assoziationsstudie von Morar et al. (2011)

Die Arbeitsgruppe um Morar (2011) untersuchte in einer Assoziationsstudie einer westaustralischen Kohorte die Suszeptibilität des NRG3-Gens. An der Studie nahmen 411 Schizophreniepatienten und 223 Kontrollprobanden teil. Die Patienten wurden eingeteilt in eine Untergruppe mit tiefgreifenden kognitiven Defiziten (*cognitive deficit*, CD-Cluster) und einer Untergruppe ohne kognitiven Störungen (*cognition spared*, CS-Cluster).

Morar et al. fanden eine signifikante Assoziation zwischen dem Marker rs6584400 und Schizophrenie, wonach das seltenere A-Allel bei den Patienten häufiger vorkam (p-Wert = 0,03; OR = 1,45; 95%-KI 1,03 – 2,04). Ebenso ergab sich ein Trend zur Assoziation bei rs10883866, bei dem das seltenere G-Allel bei Schizophreniepatienten häufiger anzutreffen war (p-Wert = 0,10; OR = 1,36; 95%-KI 0,95 – 1,94).

Post-hoc-Untersuchungen ergaben, dass die signifikanten Ergebnisse vor allem im CS-Cluster erzielt wurden (Marker rs6584400: p-Wert des CS-Clusters = 0,02; OR = 1,67; 95%-KI = 1,10 – 2,53; Marker rs10883866: p-Wert des CS-Cluster = 0,07; OR = 1,49; 95%-KI = 0,96 – 2,32). Die signifikanten Werte wurden bei Patienten mit ausgeprägten Erstrangsymptomen nach Schneider, dem akuten Auftreten von Wahnsymptomatik (*salience of complex delusions*) und formaler Denkstörungen (*thought disorder*) erzielt. Diese Symptome sind eng verwandt mit dem Merkmal Wahn (*delusion*) vorgehener Untersuchungen (Chen et al. 2009). Die Assoziation von rs6584400 und rs10883866 zeigte sich hauptsächlich bei Patienten, die keine bzw. kaum kognitive Einschränkungen, aber eine floride Wahnsymptomatik und Erstrangsymptome nach Schneider aufwiesen.

Desweiteren wurde bei den beiden interessierenden SNPs eine Assoziation mit kognitiven Merkmalen (*cognitive traits*) bei beiden Clustern analysiert. Bei den Merkmalen Intelligenz oder Wortgedächtnis waren keine aussagekräftigen Unterschiede zu erkennen. Bei Durchführung des *Degraded-stimulus continuous performance task* (CPT-DS) (Nuechterlein 1983), welcher einer Erhebung des kognitiven und neuropathologischen Status dient, wurde bei Patienten, welche die Risiko-Allele rs10883866-G und rs6584400-A aufwiesen, eine

2 Einleitung

überdurchschnittliche Leistung, bei den Kontrollen hingegen eine unterdurchschnittliche Leistung nachgewiesen (p-Wert für rs10883866 = 0,007; p-Wert für rs6584400 = 0,025).

Die zwei SNPs liegen in enger Nachbarschaft zu einem alternativen Exon 1 von Isoform NRG3-a, -b und -d. Für NRG3-a wiesen Morar et al. keine Gewebespezifität nach, hingegen wurden NRG3-b und -d deutlich öfter im fetalen und adulten ZNS exprimiert.

6. Fall-Kontroll- und familienbasierte Assoziationsstudie von Kao et al. (2010)

Kao et al. (2010) entdeckten in ihrer Assoziationsstudie an weißen Amerikanern mit westeuropäischen Vorfahren einen Zusammenhang zwischen Polymorphismen von NRG3, Schizophrenie und einzelnen psychiatrischen Symptomkomplexen. Der familienbasierte Teil der Studie wurde an 356 Familien mit einem von Schizophrenie betroffenen Mitglied, die Fall-Kontroll-Studie an 445 unverwandten Patienten und 488 unverwandten gesunden Kontrollprobanden durchgeführt.

Kao et al. berichteten bei der familienbasierten Analyse von einer signifikanten Assoziation von zwölf SNPs zur Schizophrenie (rs10748842, rs10399981, rs6584400, rs11192219, rs1896506, rs1336286, rs1764072, rs1764076, rs1336291, rs2992776, rs1336294, rs10786979, rs1649960, rs10509455, rs671631, rs7919853, rs17746658, rs342386). Diese SNPs sind lt. Kao et al. im Intron 1 lokalisiert (im direkten Vergleich zu Abbildung 5-1: die zwölf SNPs sind im Intron 2 lokalisiert). Diese Region beinhaltet das 13 kb-Intervall, in welchem sich die nach Chen et al. (2009) signifikant mit dem Merkmal Wahn assoziierten SNPs rs10748842, rs10883866 und rs6584400 befinden (p-Werte für rs10748842 und rs10883866 = 0,02; p-Wert für rs6584400 = 0,01; p-Wert für das zusätzliche, sich ebenso im 13 kb-Intervall befindliche tag SNP rs10399981 = 0,02).

Die stärkste Assoziation war in einem 80 kb-Intervall in Intron 1 zu finden, mit den signifikantesten SNPs rs1336286 (p-Wert < 0,001) und rs1649960 (p-Wert < 0,007). Diese Region lag unmittelbar proximal von rs1080293, ein SNP, welcher von Chen et al. (2009) als signifikant befundet wurde. Auch nahe des 3'-Endes von Intron 1 wurden signifikante SNPs gefunden: rs671631 (p-Wert = 0,04), welches auch von Benzel et al. (2007) als signifikant eingestuft wurde, rs7919853 (p-Wert = 0,035), rs17746658 (p-Wert = 0,0032) und rs342386 (p-Wert = 0,040), welches in einer CNV-Region lag (Chen et al. 2009).

Zudem konnte eine Assoziation zwischen rs10748842 (p-Wert = 0,01) und rs6584400 (p-Wert = 0,01) mit dem Schweregrads des Merkmals Wahn nachgewiesen werden, abgeleitet von der PANSS. Die Richtung der Allele ist konsistent mit eigenen Befunden der Assoziation

2 Einleitung

zur Schizophrenie, aber genau entgegengesetzt zur Allel-Richtung bei Chen et al. (2009) und Morar et al. (2011).

Auch ein Zusammenhang zwischen rs10748842 (p-Wert = 0,04) und rs6584400 (p-Wert = 0,02) mit dem Schweregrad an Positivsymptomatik wurde nachgewiesen. Interessanterweise war rs10748842 auch mit dem Schweregrad an Negativsymptomatik assoziiert (p-Wert = 0,04).

Kao et al. klassifizierten sämtliche, zum Teil neu entdeckte Isoformen des NRG3-Gens, indem sie zahlreiche Transkripte aus Hippokampus und weiteren Hirnarealen von 400 adulten und fetalen humanen *post-mortem*-Gehirnen isolierten. Die Einteilung der Isoformen erfolgte in die Klassen I bis IV, basierend auf Homologien der Exone.

Analysiert wurden die Genexpression der Isoformen Klasse I bis IV im dorsolateralen präfrontalen Kortex, einer Region, in der vorwiegend kognitive Funktionen ablaufen. Als Ergebnis fanden sich bei den Schizophreniepatienten erhöhte Expressionsraten von NRG3-Isoformen aus Klasse I sowie von NRG3-Isoformen, welche Exon 3 neben Exon 4 aufweisen (u. a. Klasse IV).

Weiterhin zeigten Kao et al., dass der SNP rs10748842, welcher nahe eines alternativen Promotors und Transkriptionsstartpunkts für hFBNRG3 liegt (Chen et al. 2009), mit seinen unterschiedlichen Allelen Transkriptionsfaktoren verschieden stark binden kann und dadurch die Expression von NRG3-Isoformen stark beeinflusst. Bei Variationen von rs10748842 konnten unterschiedlich hohe adulte Expressionsraten von NRG3-Isoformen, vor allem von Klasse II (p-Wert = $1,445E^{-15}$) und Klasse III (p-Wert = $1,097E^{-12}$), nachgewiesen werden. Vor allem die Klasse III-Isoformen stellen vermutlich instabile und biologisch inaktive NRG-Polypeptide dar. Homozygote Träger des T-Allels hatten eine ca. um 60% höhere Expressionsrate als Träger des C-Allels. Die Ergebnisse an den fetalen Gehirnen zeigten korrespondierende Signifikanz.

Kao et al. führten dieselbe Analyse der Expressionsraten im fetalen Gehirn durch. Die Raten an exprimierten Klasse II- und Klasse III-Isoformen waren bei reifenden Gehirnen nochmals signifikant höher als bei adulten Gehirnen (p-Werte = $9,62E^{-11}$ bzw. $5,40E^{-06}$).

7. Assoziationsstudie von Pasaje et al. (2011)

Pasaje et al. (2011) untersuchten sechs SNPs des NRG3-Gens auf eine Assoziation mit Schizophrenie als auch mit Störungen von glatten Augenfolgebewegungen (*smooth pursuit eye movement*, SPEM) anhand eines koreanischen Kollektivs. Die Überlegung, SPEM-

2 Einleitung

Auffälligkeiten zusammen mit Schizophrenie zu untersuchen, wurde mit dem häufigen Auftreten von SPEM-Alterationen vor allem bei schnellen Augenfolgebewegungen bei Schizophreniepatienten begründet, welches eine Störung in neurophysiologischen Regelkreisen bedeutet (Avila et al. 2006). Hinweise auf einen Zusammenhang zwischen Genvarianten und dem Auftreten von SPEM-Alterationen wurden vor der Studie von Pasaje et al. für Locus 22q11 gefunden (Shin et al. 2010). Pasaje et al. analysierten, ob auch Deletionen von 10q22-q23 (die bereits mit kognitiven Störungen in Verbindung gebracht wurden) für Störungen in SPEM verantwortlich sein können. Zur Diagnosestellung einer Schizophrenie wurde das DSM-IV verwendet. Es nahmen 435 Schizophreniepatienten und 393 gesunde Kontrollen teil. Von den Patienten nahmen 113 an dem Traktionstest (*eye tracking test*) zur Beurteilung von Zielfolgebewegungen teil. Das Ausmaß von Abnormitäten in glatten Augenfolgebewegungen wurde mittels logarithmischen Werten der Signal/Stimme(ln S/N)-Ratio berechnet. Bei Genotypisierung der sechs SNPs aus Introns im NRG3-Gen (rs6584400, rs1080293, rs1764072, rs1937970, rs677221, rs12416489) wurden zwei Haplotypen gefunden. Differenzen in der Häufigkeitsverteilung wurden durch logistische und Regressions-Modelle ausgedrückt.

Die Studie ergab, dass die Häufigkeitsverteilung der untersuchten NRG3-Polymorphismen und Haplotypen vergleichbar ähnlich zwischen den Schizophreniepatienten und den gesunden Probanden war. Auch bei Analyse derselben SNPs und Störungen von glatten Augenfolgebewegungsstörungen zeigte sich kein signifikanter Zusammenhang.

8. Fall-Kontroll-Assoziationsstudie von Zeledon et al. (2011):

Auf dem *XIX. World Congress of Psychiatric Genetics* im Jahr 2011 stellten Zeledon et al. (2011) Ergebnisse einer Assoziationsstudie an aschkenasischen Juden vor. Ziel war es, drei bekannte Polymorphismen im 162-kb-Haploblock am 5'-Ende von NRG3 (vgl. Chen et al. 2009, Kao et al. 2010, Morar et al. 2011) auf ihre Assoziation zu Schizophrenie und dem Merkmal Wahn (*delusion*) zu untersuchen. In der Erstuntersuchung nahmen 47 Schizophreniepatienten teil, ebenso Patienten mit Bipolarer Störung Typ I und Kontrollprobanden, deren beider Anzahl im Abstract nicht genannt wurden.

Als Ergebnis fanden Zeledon et al. eine neue 1,8 kb große Mikrodeletion am 5'-Ende von NRG3, welche zwischen zwei annotierten Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren lokalisiert ist. Die Mikrodeletion wurde unter den Schizophreniepatienten zu 2,7%, unter den Bipolar Erkrankten Typ I zu 2,6% und unter den gesunden Kontrollen zu 2,8% entdeckt. Hingegen kam bei 346 schizophrenen Nicht-Aschkenasi-Juden die Deletion niemals vor.

2 Einleitung

Daher postulieren Zeledon et al. die Annahme, dass die neu entdeckte Mikrodeletion spezifisch für Aschkenasi-Juden sei. Die Mikrodeletion kam signifikant häufiger in der Untergruppe der Schizophreniepatienten mit florider Wahnsymptomatik als in der Untergruppe der Patienten mit kaum vorhandenem Wahn vor (p-Wert = 0,013).

In der *Follow-up*-Stichprobe wurden die 658 aschkenasischen Schizophreniepatienten nach Schweregrad ihrer Wahnsymptomatik (*delusion scores*) eingeteilt, mit einem hoch signifikanten Ergebnis für ein häufigeres Auftreten der Mikrodeletion bei Patienten mit floridem Wahn (p-Wert = 0,0069).

9. Fall-Kontroll-Assoziationsstudie von Meier et al. (2013)

An einer deutschen Fall-Kontroll-Stichprobe untersuchten Meier et al. (2013) die Assoziation zwischen dem Polymorphismus rs6584400 von NRG3 und dem Auftreten von psychotischen Symptomen und Aufmerksamkeitsstörungen, welche für Schizophrenie als charakteristisch gelten. Zudem sollte geklärt werden, ob eine solche Assoziation auch auf die Bipolare Störung zutrifft. In die Studie zur Überprüfung der psychotischen Symptome wurden 358 Schizophreniepatienten und 111 Patienten mit Bipolarer Störung aufgenommen. An der Untersuchung der Aufmerksamkeitsleistung nahmen davon noch 303 Schizophreniepatienten und 93 Bipolar Erkrankte teil. Kontrollprobanden nahmen keine teil.

Meier et al. wandten zur Beschreibung der psychotischen Symptome die *Operational Criteria Checklist for Psychotic Illness* (OPCRIT; McGuffin et al. 1991) und für die Prüfung der Aufmerksamkeit den *Trail Making Test* (TMT) A und B (Perianez et al. 2007) an.

Ein hoher Gesamtscore in der OPCRIT war bei den Schizophreniepatienten signifikant assoziiert mit der Trägerschaft des selteneren Allels (GA+AA) (p-Wert = 0,037). Ein solches Ergebnis konnte bei den Bipolar Erkrankten nicht wiederholt werden. Schizophreniepatienten mit dem Genotyp GA oder AA erwiesen sich im TMT als signifikant schneller als homozygote Träger des häufigeren Allels (GG) (p-Wert = 0,025 bei TMTA und p-Wert = 0,020 bei TMTB). Dasselbe Ergebnis zeigte sich bei den Bipolar Erkrankten (p-Wert = 0,009 bei TMTA und p-Wert = 0,007 bei TMTB). Beim gepoolten Kollektiv, welches alle Patienten zusammenzählte, wurden die signifikantesten Ergebnisse erzielt (p-Wert = 0,001 bzw. korrigierter p-Wert < 0,01 bei TMTA und p-Wert = 0,004 bzw. korrigierter p-Wert < 0,01 bei TMTB).

10. Fall-Kontroll-Assoziationsstudie von Zhang et al. (2013)

Zhang et al. (2013) führten eine Assoziationsstudie an Han-Chinesen mit 488 unverwandten Patienten und 506 Kontrollen durch. Es wurden 13 SNPs von NRG3 untersucht (rs10883866, rs10748842, rs10399981, rs6584400, rs17099528, rs1336286, rs1764076, rs1336291, rs2992776, rs951204, rs12416489, rs11196700, rs8421), die sich in Vorgängerstudien als assoziiert mit Schizophrenie zeigten. Die Patienten wurden nach DSM IV-Kriterien eingeschlossen. Die SNPs lagen alle im HWE.

Keiner der SNPs erwies sich als bei Genotyp- oder Allelverteilung assoziiert zur Schizophrenie. Auch die Analyse der Haplotypen im Vergleich zwischen Patienten und Kontrollen erbrachte keine signifikanten Unterschiede.

Bei den oben diskutierten Kandidatengen-Assoziationsstudien zeigten sich Assoziationen zu Genlocus 10q22-10q23 bzw. NRG3 und der Erkrankung Schizophrenie. In den bisher veröffentlichten GWAS hingegen befanden sich unter den genomweit signifikanten Assoziationen keine im NRG3-Gen lokalisiert (Lencz et al. 2007; Stefansson et al. 2008; Kirov et al. 2008; O'Donovan et al. 2008; Walsh et al. 2008; Ng et al. 2009; Need et al. 2009; Stefansson et al. 2009; ISC et al. 2009; Shi et al. 2009; Kirov et al. 2009; Shi et al. 2011; Schizophrenia Psychiatric Genome-Wide Association Study Consortium 2011; Yue et al. 2011; Tang et al. 2011).

2.2.4.3 Zusammenfassung der Studien zu NRG3

Tabelle 2-3 fasst die Ergebnisse der durchgeführten Studien zusammen, in denen eine Assoziation zwischen NRG3 und dem Auftreten einer Schizophrenie verifiziert bzw. falsifiziert werden konnte.

Tabelle 2-3: Übersicht über durchgeführte Assoziations- und Kopplungsstudien von Genlocus 10q22-23 bzw. NRG3 in Verbindung mit Schizophrenie

2 Einleitung

Autor, Jahr	Diagnose bzw. untersuchtes Merkmal	Population	Ergebnis
Genlocus 10q22-10q23			
Fallin et al. 2003	Schizophrenie	Aschkenasi-Juden	Positiv (10q22 als Suszeptibilitätslocus)
Faraone et al. 2006	Schizophrenie	Han-Chinesen	Positiv (10q22 als Suszeptibilitätslocus)
Chen et al. 2009	Schizophrenie, neun neuropsychiatrische Merkmale	Aschkenasi-Juden	Negativ für Schizophrenie; positiv für Merkmal Wahn (rs10883866, rs10748842, rs6584400 signifikant); rs10883866 und rs10748842 im kompletten LD
NRG3			
Fallin et al. 2005	Schizophrenie	Aschkenasi-Juden	Negativ
Benzel et al. 2007	Schizophrenie	Kaukasier (Schottland)	Positiv (10 SNPs signifikant, am stärksten rs3924461; 11 SNPs mit Trend zur Signifikanz)
Wang et al. 2008	Schizophrenie	Han-Chinesen	Positiv (rs1937970, rs677221 signifikant)
Xu et al. 2009	Schizophrenie	Afrikaner (Südafrika)	Positiv (1 Duplikation signifikant)
Morar et al. 2011	Schizophrenie; kognitive Merkmale	Kaukasier (West-Australier)	Positiv für Schizophrenie (rs6584400 signifikant, rs10883866 Trend zur Signifikanz); positiv für kognitive Merkmale (rs6584400 und rs10883866 signifikant)
Kao et al. 2010	Schizophrenie; Merkmal Wahn; Schweregrade Positivsymptomatik und Negativsymptomatik	Kaukasier (weiße Amerikaner)	Positiv für Schizophrenie (12 Marker signifikant, am stärksten rs1336286 und rs1649960); positiv für Wahn (rs10748842 und rs6584400 signifikant); positiv für Positivsymptomatik (rs10748842 und rs6584400 signifikant); positiv für Negativsymptomatik (rs10748842 signifikant)
Pasaje et al. 2011	Schizophrenie; Augenbewegungsstörungen	Südkoreaner	Negativ für Schizophrenie und Augenbewegungsstörungen
Zeledon et al. 2011	Schizophrenie; Merkmal Wahn	Aschkenasi-Juden	Positiv für Schizophrenie und Wahn (1 Deletion signifikant)
Meier et al. 2013	Merkmal psychotische Symptome; Merkmal Aufmerksamkeit	Kaukasier (Deutsche)	Positiv für psychotische Symptome und Aufmerksamkeit (rs6584400 signifikant)
Zhang et al. 2013	Schizophrenie	Han-Chinesen	Negativ

3 Fragestellung

Anhand zahlreich durchgeführter Familien-, Zwillings- und Adoptionsstudien wurde mehrmals die Hypothese bestätigt, dass Schizophrenie familiär gehäuft auftritt und genetische Mechanismen den größten Einfluss auf die Manifestation der Erkrankung besitzen. Gemäß dieser heute akzeptierten Theorie wird von mehreren Genen und vielfältigen Polymorphismen ausgegangen, die in unterschiedlichem Maße Einfluss auf die Erkrankung nehmen. Fall-Kontroll-Assoziationsstudien mit hoher Stichprobenzahl werden als aussagekräftige molekularbiologische Verfahren angesehen, um bei polygen vererbten Erkrankungen nach Suszeptibilitätsgenen zu suchen, deren einzelne Effekte eher gering sind.

Das NRG3-Gen ist in einer chromosomalen Region lokalisiert, für die nach heutiger Datenlage wiederholt Hinweise auf eine Assoziation mit Schizophrenie gefunden wurden, unter anderem durch familienbasierte und Fall-Kontroll-Studien.

Die hier vorliegende Fall-Kontroll-Assoziationsstudie verfolgte das Ziel, 20 Einzelbasenpolymorphismen und die daraus resultierende Haplotyp-Blockstruktur im NRG3-Gen auf eine mögliche Assoziation mit der Erkrankung Schizophrenie zu analysieren. Hierzu wurden Allel-, Genotyp- und Haplotypfrequenzen von 512 Schizophreniepatienten und 1320 gesunden Kontrollprobanden gegenübergestellt.

4 Material und Methoden

Die vorliegende Arbeit wurde als kaukasische Fall-Kontroll-Assoziationsstudie konzipiert, in die 512 Patienten und 1320 Kontrollprobanden deutscher Herkunft eingeschlossen wurden. An diesen insgesamt 1832 Proben wurden 20 SNPs des NRG3-Gens genotypisiert und auf eine Assoziation zur Schizophrenie überprüft.

4.1 Vorbedingungen der Studie

Vor Beginn der Durchführung wurde die Vorgehensweise im Rahmen der Studie genau beschrieben und die Zustimmung von der zuständigen Ethikkommission eingeholt.

Alle Studienteilnehmer erhielten vorab eine ausführliche Aufklärung bezüglich Ziel und Inhalt der Studie, zudem wurde ihnen die Anonymisierung ihrer Daten und ihrer Blutproben zugesichert. Dabei wurde die Freiwilligkeit ihrer Teilnahme betont, und dass die Einwilligung jederzeit widerrufen werden konnte. Ihre Bereitschaft zur Teilnahme bestätigten die Probanden mit ihrer Unterschrift.

Die Datenerhebung fand in der Klinik und Poliklinik für Psychiatrie und Psychotherapie der Ludwig-Maximilians-Universität München statt.

4.2 Studienteilnehmer

4.2.1 Kontrollgruppe

Auswahlverfahren

Die Probanden der Kontrollgruppe wurden nach dem Zufallsprinzip über das Einwohnermeldeamt ausgewählt und erhielten per Post eine Einladung zur Teilnahme. Bei Interesse konnten sie sich beim Studien-Initiator melden. Es folgte ein Telefonscreening, in dem u. a. psychiatrische, neurologische und psychische Vorerkrankungen bei den Teilnehmern und ihren Verwandten ersten Grades ausgeschlossen wurden.

Bestand kein Anhaltspunkt für Auffälligkeiten, wurden die Teilnehmer mit Hilfe eines Anamnesebogens nach allgemeinen und speziellen Daten, z. B. Abstammung (Eltern und

4 Material und Methoden

Großeltern mussten deutschstämmig sein), Familienstand, Schullaufbahn, somatische und psychiatrische Vorerkrankungen (vor allem Erkrankungen aus dem schizophrenen Formenkreis, Angststörungen, Essstörungen, affektive Störungen) sowohl des Probanden selbst als auch in dessen Familie, ambulante oder stationäre Krankenhausaufenthalte, aktuelle Medikamenteneinnahme, Rauchverhalten, Konsum von Alkohol oder Drogen und Suizidalität des Probanden und dessen Familie befragt.

Stellte sich die Anamneseerhebung unauffällig dar, wurden die Probanden zu einer klinischen Untersuchung und einem ausführlichen klinischem Interview in das Klinikum eingeladen.

Die *klinisch-neurologische Untersuchung* wurde eingeleitet mit der Erhebung einer neurologischen Anamnese. In der körperlichen Untersuchung wurde die Funktion der Hirnnerven, der Reflexstatus sowie die sensorischen, motorischen und koordinativen Fähigkeiten der Teilnehmer überprüft.

Zum Ausschluss psychiatrischer Diagnosen wurde das *Strukturierte Klinische Interview für DSM-IV* (SKID), Achse I und II angewandt (Wittchen et al. 1997). Das SKID I diente dabei der Erfassung und Diagnostik von Achse I-Störungen gemäß DSM-IV (Affektive Störungen, Angststörungen, Somatoforme Störungen, Psychotische Störungen, Störungen durch psychotrope Substanzen, Essstörungen, Anpassungsstörungen). SKID II operationalisierte die Diagnostik der Achse II-Störungen (Persönlichkeitsstörungen) nach DSM-IV. Die Interviews verliefen halbstrukturiert, d. h. die Fragen waren vorgegeben, aber im Wortlaut vom Untersucher modifizierbar. Auch Störungen von Achse IV (psychosoziale Beeinträchtigung) und Achse V (globale Beurteilung der Leistungsfähigkeit) wurden überprüft.

Zusätzlich kam das *Family History Assessment Module* (FHAM; Rice et al. 1995) zum Einsatz, mit dem überprüft wurde, ob in der Familie des Probanden psychiatrische Erkrankungen vorhanden waren.

Weiterhin wurde das *Leipziger Ereignis- und Belastungsinventar* (LEBI; Richter und Guthke 1996) verwendet, welches, ebenfalls in Form eines strukturierten Interviews, belastende Erlebnisse in der individuellen Biographie festhielt.

Neben den genannten Interviews wurde ein zweiter Anamnesebogen ausgefüllt, mit dem Verhaltensweisen im Kindes- und Jugendalter, schulische und berufliche Laufbahn, Partnerschaften, persönliche Finanzlage und eine Einschätzung der aktuellen Lebenssituation abgefragt wurden.

4 Material und Methoden

Ergaben sich auch nach den stattgefundenen Untersuchungen und Interviews keine Hinweise für neurologische oder psychiatrische Erkrankungen bzw. psychische Störungen sowohl beim Probanden als auch in dessen Verwandtschaft, und war die Eigenanamnese negativ bezüglich chronischer Infektionen (aktive Hepatitis B, Hepatitis C, HIV, Lues ab Stadium II), wurden die Kontrollprobanden in die Studie eingeschlossen.

4.2.2 Patientengruppe

Auswahlverfahren

Das Kollektiv der Patientengruppe wurde anhand klinikeigener Patientendaten rekrutiert. Zunächst erfolgte eine telefonische Befragung derjenigen Patienten, die die Kriterien für die Studie erfüllten, um ihr Interesse an einer Teilnahme zu ermitteln. Erklärten sich die Patienten bereit zur Teilnahme, wurden sie zu einem diagnostischen Interview in das Klinikum eingeladen. Das Interview begann analog zur Kontrollgruppe mit der Anamnese.

Ein- und Ausschlusskriterien

In die Studie der vorliegenden Arbeit wurden nur kaukasische Patienten eingeschlossen, deren Eltern und Großeltern ebenso kaukasischer Abstammung waren. Weiters galt es zum Einschluss in die Studie, die Diagnose Schizophrenie von Differenzialdiagnosen abzugrenzen. Dies waren insbesondere: primär affektive Störungen (Depressionen oder bipolare Störungen), schizoaffektive Störungen (Kombination von schizophrener und affektiver Symptomatik), schizotype Störungen (exzentrisches und bizarr wirkendes Verhalten ohne eindeutig schizophrene Symptome) und Zwangsstörungen. Zudem wurden körperlich begründbare Psychosen ausgeschlossen, d. h. psychische Störungen, die durch entzündliche, neoplastische, traumatische, toxische oder andere (hirn)-organische Prozesse begründbar waren. Letztlich wurden auch keine Patienten mit substanzinduzierten Psychosen oder chronischen Infektionen eingeschlossen.

Strukturiertes klinisches Interview nach DSM-IV-Richtlinien (SKID) I

Im Anschluss an die Anamnese folgte das SKID I (Wittchen et al. 1997) zur Verifizierung der Schizophrenie. Mittels der festgestellten Symptome nach SKID I wurde die Einteilung der Schizophrenie in einen Subtyp gemäß DMS-IV (paranoid, kataton, desorganisiert, undifferenziert, residual) unternommen. Auch das zeitliche Auftreten der Symptome (Chronologie) wurde festgehalten: das Alter zu Beginn der prodromalen Symptome sowie der

4 Material und Methoden

Erstmanifestation, die Zahl und Zeitangaben der akuten Phasen und Residualphasen, und ebenso den aktuellen Remissionsgrad. Der Patient wurde zum Schweregrad der Symptome zum aktuellen Zeitpunkt und zum Zeitpunkt der schlimmsten Ausprägung befragt. Die Untersucher differenzierten die Angaben auch hinsichtlich eines episodischen, kontinuierlichen oder unspezifischen Verlaufs.

Weitere Untersuchungen

Ergänzend zu SKID I wurde die PANSS (Kay et al. 1987) zur Erfassung der Positiv- und Negativsymptomatik angewendet. Weiterhin wurde mittels der *Global Assessment Scale* (GAS; DSM-IV Achse V) ermittelt, in welchen Dimensionen die Funktionalität des Patienten als erhalten oder eingeschränkt anzusehen war.

4.3 Laborverfahren

4.3.1 DNA-Extraktion

Um die für die Genotypisierung notwendige Gewinnung von ausschließlich genomischer DNA (gDNA) zu gewährleisten, waren folgende Arbeitsschritte und Arbeitsmaterialien (vgl. Tabelle 4-1) notwendig. Die Extraktion der gDNA erfolgte mit dem *QIAamp Blood Maxi Kit* der Firma Qiagen, entsprechend des vorgegebenen Protokolls (Quiagen 2002).

Allen Teilnehmern der Studie wurde venöses Blut mittels Ethylendiamintetraacetat-(EDTA-) Monovetten abgenommen. Diese Blutproben wurden mit anonymisierten Codes verschlüsselt. Nach der Abnahme wurden die Proben zentrifugiert, und der vom Serum getrennte Blutkuchen bei -20°C eingefroren. Nach anschließendem Wiederauftauen der Blutproben wurde PBS-Puffer (*phosphate buffered saline*, phosphatgepufferte Salzlösung) zugeführt, dabei auf ca. 10 ml aufgefüllt und die Proben durchmischt.

Dieser sich nun im Zustand einer Suspension befindliche Blutkuchen wurde mit Protease (zur Zellyse) und 12 ml Guanidiniumhydrochlorid-(GHC1-)haltigen Lysepuffer AL (zur Denaturierung der DNA und Entfernung der Hydrathülle) versetzt und mittels Vortexer durchmischt. Anschließend erfolgte eine ca. 30-minütige Inkubation im Wasserbad bei 70°C mit gleichzeitigem Schütteln der Probe.

Die DNA wurde im nächsten Schritt auf eine Silikagelmembran gefällt, indem der Probe 10 ml Ethanol zugeführt wurden und die Durchmischung mit dem Vortexer erfolgte. Es schloss

4 Material und Methoden

sich eine dreiminütige Zentrifugierung mit 3000 Umdrehungen pro Minute (*revolutions per minute*, rpm) an, wodurch sich die DNA an die QIAamp Maxi Säule band (Adsorption der DNA), während eine Bindung von RNA oder Proteinen durch das bestehende Elektrolyt- und pH-Milieu verhindert wurde.

Tabelle 4-1: Verwendete Materialien für die DNA-Extraktion

Material, Reagenz, Gerät	Verwendungszweck	Hersteller
10x PBS-Puffer	Herstellung des 1x PBS-Puffers	Reagenzien zur Eigenherstellung; Carl Roth, Hamburg
1x PBS-Puffer	Resuspendieren des Blutkuchens	Eigene Herstellung
50 ml Zentrifugenröhre	Auffangen der Eluate	Sarstedt, Nümbrecht
Sammelgefäße	Auffangen der DNA	Qiagen Hilden
EDTA Dinatriumsalz Dihydrat (Titrierkomplex III)	Herstellen des 10x PBS-Puffers	Carl Roth, Karlsruhe
EDTA Monovette	Blutentnahme	Sarstedt, Nümbrecht
Eppendorf Research Pipette (100 – 1000 µl)	Pipettieren der DNA	Eppendorf, Hamburg
Ethanol Rotipuran > 99,8% p.a.	Entfernung der Hydrathülle der DNA	Carl Roth, Karlsruhe
Kaliumchlorid, KCl	Herstellung des 10x PBS-Puffers	Carl Roth, Karlsruhe
Kaliumhydrogenphosphat, KH ₂ PO ₄	Herstellung des 10xPBS-Puffers	Carl Roth, Karlsruhe
Mikro-Schraubröhre, 2 ml	Lagerung der DNA	Sarstedt, Nümbrecht
Natriumhydrogenphosphat, Na ₂ HPO ₄	Herstellung des 10x PBS-Puffers	Carl Roth, Karlsruhe
Natriumhydroxid, NaOH	Herstellung des 10x PBS-Puffers	Carl Roth, Karlsruhe
Puffer AE	Elution der DNA	Qiagen, Hilden
Puffer AL	Zellyse	Qiagen, Hilden
Puffer AW1	Entfernung von Zellrückständen	Qiagen, Hilden
Puffer AW2	Entfernung von Zellrückständen	Qiagen, Hilden
QIAamp Maxi Spin Columns (Silikagel-Säulen)	Bindung der DNA	Qiagen, Hilden
Qiagen Protease, 500 µl	Abbau von Zellproteinen	Qiagen, Hilden
Rotixa RP Standzentrifuge	alle Zentrifugationsschritte	Hettich, Tuttlingen
Vortex Genie	Durchmischung der Blut-Puffer-Suspensionen	Scientific Industries, New York, USA
WB Wasserbad	Inkubation der Blut-Puffer-Suspension bei 70°C	Memmert, Schwabhausen

Solche Reste von RNA und Proteinen ließen sich durch die Gabe von GHCl-haltigen Puffer AW1 und anschließende zweiminütige Zentrifugation bei 4000 rpm entfernen. Um die Reste von Guanidiniumsalzen zu beseitigen, wurden 5 ml eines ethanolhaltigen Puffers AW2 verwendet, nach dessen Zugabe die Probe für 15 Minuten erneut bei 5000 rpm zentrifugiert wurde.

Abschließend wurden 1,5 ml eines basischen Trishaltigen Puffers AE direkt auf die DNA-haltige Membran zugesetzt, wodurch die Elution der DNA von der Silikagelmembran gelang. Im Anschluss wurde die Membran für fünf Minuten inkubiert und anschließend weitere zwei Minuten lang mit 5000 rpm zentrifugiert.

4 Material und Methoden

Die auf diese Weise gewonnene DNA wurde in Mikroschraubröhrchen bei -80°C gelagert, um sie für die anschließende Genotypisierung zu verwenden.

4.3.2 Einstellung der DNA-Konzentration

Von der somit extrahierten DNA musste im nächsten Schritt die Konzentration bestimmt werden. Die dafür notwendigen Materialien zeigt Tabelle 4-2.

Tabelle 4-2: Verwendete Materialien für die Einstellung der DNA-Konzentration

Material, Reagenz, Gerät	Verwendungszweck	Hersteller
20µl <i>Conductive Roborack Tips</i>	Pipettierung der DNA und Reagenzien	Perkin Elmer Inc., Massachusetts, USA
200 µL <i>Conductive Roborack Tips</i>	Pipettierung der DNA und Reagenzien	Perkin Elmer Inc., Massachusetts, USA
1000 µL <i>Conductive Roborack Tips</i>	Pipettierung der DNA und Reagenzien	Perkin Elmer Inc., Massachusetts, USA
96 Well Flat Bottom Plate Black	Vorlagenplatte für Standard- und Proben DNA	Greiner Bio-one, Frickenhausen
<i>Human genomic DNA</i> 100 ng/µl	Standardverdünnungsreihe	Firma Clontech, Mountain View, USA
<i>Janus Automated Workstation</i>	Durchführung aller Pipettierschritte	Perkin Elmer Inc., Massachusetts, USA
Mikro-Schraubröhre, 2,0ml	Lagerung der DNA	Sarstedt, Nümbrecht
Quant iT PicoGreen dsDNA reagent	Fluoreszenzmessung der DNA	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
<i>Thermo Fast 96 well Plate</i>	Vorverdünnung der Proben-DNA, Standardverdünnungsreihe	ABgene, Hamburg
Victor 3 Multilabel Counte 1420	Fluoreszenzmessung der DNA	Perkin Elmer Inc., Massachusetts, USA
Wallac 1420 Workstation	Software zur Steuerung Victor3 Multilabel Counters	Perkin Elmer Inc., Massachusetts, USA
WinPREP	Software zur Steuerung der <i>Janus Automated Workstation</i>	Perkin Elmer Inc., Massachusetts, USA

Es wurde der Farbstoff *PicoGreen* angewendet, ein fluoreszierendes Färbemittel, welches hochselektiv an doppelsträngige DNA bindet, ohne die DNA-Struktur dabei zu verändern (Interkalation) (Rengarajan et al. 2002). Die Intensität der Fluoreszenz war dabei direkt von der Menge der DNA abhängig. Nach Verdünnung der DNA-Samples mit der *PicoGreen*-Lösung und *Aqua dest* konnte nach weiteren Arbeitsschritten die durch Lichtbestrahlung angeregte Photo-Emission bestimmt werden. Die Berechnung der DNA-Konzentration wurde dann mittels einer Eichkurve vorgenommen, die bereits Werte einer bekannten Standard-DNA-Konzentration enthielt. Für die quantitative Genotypisierung der SNPs wurde eine Genauigkeit der DNA-Konzentration von bis zu +/- 10% verlangt.

4 Material und Methoden

Vorbereitung der DNA-Standards

Die DNA-Konzentrationsbestimmungen erfolgte auf 96 *well plates*; für jede zu messende Platte (*plate*) wurde eine Standardkurve ermittelt.

Zur Vorbereitung der gDNA-Standards wurde in jede Vertiefung (*well*) von Säule B1 bis H1 100 μl *Aqua dest* zugeführt. In *well* A1 wurden 200 μl des gDNA-Standards zugeführt. Anschließend wurde der Inhalt von A1 vermischt und 100 μl in die Reihe B1 pipettiert. Dieses Verfahren wurde ebenso für die Reihen C1 – G1 angewandt, wodurch man eine sukzessive Verdünnung erzielte (vgl. Tabelle 4-3). Die Reihe H1 beinhaltete keine genomische DNA. Ein Pipettierroboter (*Janus Automated Workstation*) führte die Herstellung der DNA-Standards automatisiert durch.

Tabelle 4-3: Positionen, Volumina und Konzentrationen der DNA-Verdünnungsreihe

Position	Volumen	DNA-Konzentration
A1	100 μl	100 ng/ml
B1	100 μl	50 ng/ μl
C1	100 μl	25 ng/ μl
D1	100 μl	12,5 ng/ μl
E1	100 μl	6,25 ng/ μl
F1	100 μl	3,125 ng/ μl
G1	200 μl	1,5262 ng/ μl
H1	100 μl	0

Vorbereitung der Messplatte

Zur Messung der DNA-Lösungen wurden je 5 μl gDNA im Verhältnis 1:10 mit *Aqua dest* (45 μl) verdünnt und in eine 96 *well plate* pipettiert. Der Pipettierroboter führte auch die folgenden Schritte automatisiert durch.

Zur Herstellung der Messplatte wurden zuerst 50 μl *Aqua dest* je 96 *well plate* vorgelegt. In Spalte 1 und 2 der 96 *well plates* wurden, beginnend mit A1 und A2, je 5 μl der Standardverdünnungsreihe gegeben. Ab A3 wurden nachfolgend je 5 μl der vorverdünnten DNA auf die *well plates* pipettiert. Unmittelbar vor der Messung wurden 145 μl des Gemisches aus *PicoGreen* und *Aqua dest* in jedes *well* zu der Proben- bzw. Standard-DNA zugeführt, womit sich eine Verdünnung des *PicoGreens* von 1:200 ergab. Die Messplatten wurden von einem Greifarm des Pipettierroboters in das Fluoreszenzmessgerät überführt.

Durchführung der Messung

Die Messung der DNA-Konzentration mittels Fluoreszenzmessgerät erfolgte unmittelbar an die Vorbereitung, denn bereits nach wenigen Minuten kam es zu einem deutlichen Abfall der

4 Material und Methoden

Fluoreszenz. Zunächst wurde die Messplatte für 30 Sekunden geschüttelt, dann das PicoGreen-Reagenz mittels Licht einer Wellenlänge von 485 nm angeregt und die Emission bei 520 nm gemessen, wobei die Messung pro *well* 0,1 Sekunden dauerte. Die Ergebnisse der Messung wurden unmittelbar an einen Rechner transferriert, welcher die Mittelwerte errechnete.

Einstellung der DNA-Arbeitskonzentration

Der ideale Messbereich zur Genotypisierung liegt in einem Konzentrationsbereich zwischen 20 und 200 ng/μl. Daher wurde bei Samples außerhalb dieses Bereichs noch in anderer Verdünnung gemessen. Durch die ermittelten Konzentrationswerte erfolgte auch die Errechnung der notwendigen Volumina von *Aqua dest* und gDNA, um eine definierte Arbeitskonzentration von 50 ng/μl zu erzielen. Die Konzentrationseinstellung von 500 μl einer Arbeitslösung wurde automatisch durch den Pipettierroboter durchgeführt.

4.3.3 Genotypisierung

Die Feststellung der Genotypen wurde an 20 SNPs des NRG3-Gens vorgenommen (NCBI, 2012). Die Genotypisierung wurde durch die Methode der MALDI-TOF-Massenspektrometrie durchgeführt. Die matrixgestützte (*Matrix Assisted Laser Desorption/Ionisation*, MALDI) Massenspektrometrie (*mass spectrometry*) ermöglichte die Analyse von Proteinen und Nukleinsäuren im Hochdurchsatz, u. a. von DNA (Tang et al. 1995). Durch die Einführung des *PinPoint Assay*, ein Verfahren zur Einzelbasenextension, konnten auch SNPs mit MALDI-TOF genotypisiert werden (Haff und Smirnov 1997).

Die für diese Studie verwendete iPLEX-Methode beruht auf demselben Prinzip der Einzelbasenverlängerung. Das iPLEX-Verfahren setzt sich aus mehreren Schritten zusammen: zuerst eine klassische Polymerase-Kettenreaktion (PCR), danach eine abgeänderte Version der PCR (Primerextensionsreaktion), und anschließend die Messung der Extensionsprodukte, also die eigentliche Genotypisierung, durch Autoflex MALDI-TOF Massenspektrometer.

4.3.3.1 Multiplex-Polymerase-Kettenreaktion

Als erster Schritt erfolgte in einer konventionellen PCR im Hochdurchsatz (Multiplex PCR) die Amplifikation der genomischen Bereiche, welche die interessierenden SNPs flankierten.

4 Material und Methoden

Die Zusammensetzung der Reaktionslösung, in der mehrere SNPs gleichzeitig typisiert werden, ohne dass sich die Produkte gegenseitig behindern bzw. ausschalten, wird Multiplex genannt.

Im Vorfeld der PCR wurde ein sogenannter *Mastermix* hergestellt (vgl. Tabelle 4-4), welcher mittels Pipettierroboter einzeln in einer 96 *well plate* vorgelegt wurde, und anschließend davon je 3 μl *Mastermix* in eine 384 *well plate* pipettiert wurde.

Tabelle 4-4: Zusammensetzung des *Mastermix* für die konventionelle PCR

Reagenz	Volumen (für 1 Reaktion)	Hersteller
<i>Aqua bidest</i>	1,850 μl	Purelab ultra, ELGA
10 x PCR Puffer mit MgCl_2	0,625 μl	Qiagen
MgCl_2 (25mM)	0,325 μl	Qiagen
dNTP Mix (25mM)	0,100 μl	Abgen
Primer Mix (jeweils 500 nM aus Primer 1 und Primer 2)	1 μl	Qiagen
genomische DNA (5-10 ng/ μl)	1 μl	
Hotstar Taq (5 U/ μl)	0,100 μl	Qiagen

Aus den 96 *well plates*, in der die DNA-Lösungen enthalten waren, wurden je 2,5 μl DNA in die 384 *well plate* zum *Mastermix* gegeben. Die *well plates* wurden anschließend zentrifugiert und mit Versiegelungsfolie (Firma ABgene, Hamburg) verschweißt, um mit den weiteren Reaktionsschritten im *Thermocycler* zu beginnen. Im *Thermocycler* (Firma Applied Biosystems, Foster City) fanden nun die (unten beschriebenen) PCR-Zyklen statt, in dem die für die PCR geforderten Temperaturen und die Dauer der Temperaturerhöhung bzw. –senkung präzise generiert wurden.

Für die PCR wurden folgende Komponenten benötigt: die zu amplifizierende DNA; zwei Primer (Primer 1 und 2), d. h. zwei Oligonukleotide, die jeweils den Startpunkt (am 5'-Ende des zu amplifizierenden Bereichs) für die DNA-Polymerase an beiden Einzelsträngen der Doppelhelix markierten; eine thermophile DNA-Polymerase, die der Replikation der markierten DNA diente (Taq-Polymerase); Desoxynukleotidtriphosphate (dNTPs), welche als Bausteine für den von den DNA-Polymerasen synthetisierten DNA-Strang fungierten; abschließend Magnesium-Ionen und spezielle Pufferlösungen, die für die Funktionsfähigkeit der DNA unabdingbar waren.

Eine Übersicht der Primer, die für das iPLEX-Verfahren verwendet wurden, gibt Tabelle 4-5.

4 Material und Methoden

Tabelle 4-5: Primersequenzen (bp =Basenpaare)

ID	Primer 1	Primer 2	bp	Extensionsprimer
rs6584471	ACGTTGGATGACTCCTG ATGGACATGGATG	ACGTTGGATGCCCATTT GATTATGGCAAGTC	116	GTTATTGAACTTGCATG ATG
rs2207768	ACGTTGGATGTTCTAC ACATTACTGATGC	ACGTTGGATGTCAATG GAAGCTTGACTTT	97	GAAGCTTGACTTTTTCT CA
rs12569561	ACGTTGGATGGTTGGTC TATGTCAGCCTTG	ACGTTGGATGGGGCAT CTGATTTAGTGAGC	119	CCTTGTATTGACAGTTT TAGAC
rs11595793	ACGTTGGATGAGGATT GAATTGACTTGAG	ACGTTGGATGGATAAA ACTGAACTTTGCC	110	gaagTAAGGATTGAGCA GATGTTGTG
rs1336290	ACGTTGGATGCCCCAG AACATGTGAATATG	ACGTTGGATGGCAACC TTAATTCATCCAC	91	agCCACAAACTTAATTC CCTCTT
rs722982	ACGTTGGATGAGCTGT AGACCCCTGTTGAG	ACGTTGGATGTACAAG ACAATGCCCTCTTC	116	tTGCCTCTTCATCTTTC
rs2622807	ACGTTGGATGGCATTTA GCAACCAAGAACC	ACGTTGGATGTAAAGA GGTCTGGGAAGT	104	gtGAACTGCAGTCCACC
rs635481	ACGTTGGATGGGCTTTT ATCCTGCCTTTCC	ACGTTGGATGTCTGTAG GAATCACTTGCTC	99	CATCTCCTATTTAGTTA CCCA
rs2881886	ACGTTGGATGGCCTGG CTTATTTCAATTAC	ACGTTGGATGGAAGGG ATTGTGTCATT	119	tGGATTTGTGTCATTTTG ATACC
rs2820108	ACGTTGGATGAAAACA CTTGTGCATGTGTC	ACGTTGGATGACTGGA CAGATTGAGTGGAG	108	TGTGTCATTATAGTAGA TATTCTATTA
rs2065537	ACGTTGGATGGGGTTTT GAAAGGTGAAAAG	ACGTTGGATGGTCTCTT CTGCTTTACCCCT	120	GTAACCTGAGGTAATA TGATG
rs715687	ACGTTGGATGGCTATGT CTGTGTGGGAATC	ACGTTGGATGCAGGGA CTAGGAATATCAGC	98	gggagGAGAGGAGACTG GGAGAAAT
rs168199	ACGTTGGATGATTGGA GCACAGTGCAGAAG	ACGTTGGATGAGTGAC AAAGGCAAGGTAGG	100	gaagAAGGCAAGGTAGG TATCCAGAAA
rs561623	ACGTTGGATGGCCCA TATTAACAACCCTC	ACGTTGGATGCCAAAT GATTGTTGGCCGTC	100	ggTGGCCGCTTTATTTG CAATTC
rs7088441	ACGTTGGATGACATGA GAAGATCCTGGGAG	ACGTTGGATGGGTGAA TACACTAGAGTTCC	82	GTTCTGCTCTTGAGA
rs1576986	ACGTTGGATGCTGCTTC ATGATAAGCAGATG	ACGTTGGATGAAGATT CAACACGCTGGCTG	105	CTGCAGAAAATTTTTAA AAGACAA
rs1923565	ACGTTGGATGGTCATTC ATCAGGAATAGGG	ACGTTGGATGCTACTA GCACCTCAAATC	108	CATCCTCCTTCCATATT GT
rs4474379	ACGTTGGATGAGTAAA TACCAATGGAGGC	ACGTTGGATGTTTATAG CTACCCAGCCTCC	100	CAGCCTCCAAGTTCTAG
rs12763193	ACGTTGGATGCCAAGC ACCTTACTAATCG	ACGTTGGATGGTGGAC AAAAAACCAGCTC	113	cctcTTGGGCACTGTTAT GAC
rs2295933	ACGTTGGATGTTCTGAT TTGGCTGTGGGAC	ACGTTGGATGTCAGAA GACTACGAACTGGC	113	gcAACCGAGGACAGTGC AAG

Ablauf der Polymerase-Kettenreaktion

Initial wurde für 5 Minuten die DNA auf 95°C aufgewärmt. Sodann begannen die einzelnen Zyklen der PCR, wobei sich *ein Zyklus* in *drei Schritte* gliederte.

Im 1. Schritt (Denaturierung, Schmelzen) wurde die DNA durch Erhitzen auf 95°C für 20 Sekunden aufgetrennt, d. h. die Wasserstoffbrückenbindungen, welche die beiden Stränge der DNA zusammenhielten, wurden aufgebrochen. Im 2. Schritt (Primerhybridisierung, Annealing) sank die Temperatur für 30 Sekunden auf 56°C, wodurch sich nun die Primer 1 und 2 an die für sie spezifische DNA anlagern konnten. Der 3. Schritt (Elongation)

4 Material und Methoden

ermöglichte die Synthese des DNA-Stranges durch die DNA-Polymerase (Taq-Polymerase) mittels der in der Lösung enthaltenen dNTPs. Für diesen Schritt war eine Temperatur von 72°C für 60 Sekunden notwendig. Nun wurden komplementäre Einzelabschnitte der ursprünglichen DNA synthetisiert. Zur Wiederholung der genannten Schritte bzw. Beginn eines neuen Zyklus wurde die DNA anschließend wieder auf ca. 95°C erhitzt. In jedem Zyklus verdoppelte sich die Zahl der DNA-Kopien. Eine PCR-Reaktion bestand aus insgesamt 45 Zyklen. Nach dem letzten Zyklus fand abschließend eine dreiminütige Elongation bei 72°C statt.

Dephosphorylierung überschüssiger dNTPs

Nach Beenden der PCR galt es, die nun abkömmlichen dNTPs in der Lösung zu entfernen, da diese die nachfolgende iPLEX-Reaktion gestört hätten. Dies gelang, indem die dNTPs durch Beigabe von *Shrimp Alkaline Phosphatase*-(SAP-)Mastermix dephosphoryliert wurden (vgl. Tabelle 4-6). Zu jedem der 5 µl PCR-Reaktionsprodukte wurden 2 µl des *SAP-Mastermix* hinzugegeben und auf den Vortexer durchmischt. Für 40 Minuten wurde diese Probe in den *Thermocycler* erst bei 37°C inkubiert, und folgend für zehn Minuten auf 85°C erhitzt, um das SAP Enzym zu inaktivieren.

Tabelle 4-6: Zusammensetzung des *SAP-Mastermix*

Reagenz	Volumen (für 1 Reaktion)	Hersteller
<i>Aqua bidest</i>	1,530 µl	Sequenom
SAP Puffer	0,170 µl	Sequenom
SAP Enzym (1 U/µl)	0,300 µl	Sequenom

4.3.3.2 Primerextensionsreaktion

Die im Anschluss stattfindende Primerextensionsreaktion (iPLEX-Reaktion) stellt eine modifizierte Version der oben beschriebenen PCR dar. Die Verlängerung des DNA-Stranges erfolgte diesmal nur um eine Base (Einzelbasenextension, *single base extension*, SBE).

In diesem Verfahren wurden speziell die SNPs vervielfältigt, die für diese Studie von Bedeutung waren. Der für die SBE notwendige *iPLEX-Mix* (vgl. Tabelle 4-7) wurde den *wells* mit dem PCR-Produkt zugegeben. Nach anschließender Zentrifugation wurden im *Thermocycler* 40 PCR-Zyklen mit den drei Arbeitsschritten Denaturierung, Annealing und Elongation in leicht abgewandelter Form durchgeführt. An eine initiale Denaturierung bei 94°C für 30 Sekunden schlossen sich 40 Zyklen bestehend aus einer Denaturierung bei 94°C

4 Material und Methoden

für fünf Sekunden, gefolgt von jeweils fünf Zyklen aus Annealing bei 52°C für fünf Sekunden und Elongation bei 80°C für fünf Sekunden an. Die abschließende Elongation wurde bei 72°C für drei Minuten durchgeführt und das PCR Gemisch auf 4°C abgekühlt.

Tabelle 4-7: Zusammensetzung des *iPLEX-Mix*

Reagenz	Volumen (für eine Reaktion)	Hersteller
<i>Aqua bidest</i>	0,755µl	Sequenom
iPLEX Buffer plus	0,200µl	Sequenom
iPLEX Termination Mix	0,200µl	Sequenom
Primer Mix (7µM -14 µM)	0,804 µl	Sequenom
iPLEX Enzym	0,041µl	Sequenom

Die Extensionsprimer (vgl. Tabelle 4-5) wurden so generiert, dass sie genau vor dem interessierenden SNP (in 5'-Richtung) an die PCR-Produkte hybridisierten. Mit Hilfe der in der Lösung befindlichen Didesoxynukleotidtriphosphaten (ddNTPs) führten die Primer zur Verlängerung des PCR-Produkts aus der klassischen PCR, die nach einer Base abbrach. Um die neu entstandenen Produkte besser voneinander unterscheiden zu können, wurden ihnen spezielle funktionelle Gruppen angehängt.

Um die anschließende massenspektrometrische Analyse nicht durch störende Ionen zu gefährden, wurden die Proben mittels *Clean Resin* (Sequenom) unter Verwendung von *dimple plates* entsalzt.

4.3.3.3 Massenspektrometrische Analyse

Die oben beschriebene iPLEX-Reaktion wurde in Kombination mit dem MassARRAY MALDI TOF MS Systems (*Matrix Assisted Laser Desorption/Ionisation Time Of Flight Mass Spectrometry*, Sequenom) verwendet. Dieses Verfahren eignet sich für Analysen von DNA-Fragmenten von 3 - 29 bp Länge (Ragoussis et al. 2006), wie in diesem Fall die im iPLEX-Verfahrenen gewonnen komplementären Allele der SNPs.

Zuerst wurde das Analysegemisch mittels MassARRAY Nanodispenser (Sequenom) auf einen SpectroCHIP (Sequenom) aus Silizium gegeben. Ein Auskristallisieren der Proben-DNA wurde durch Verwendung von 3-Hydroxypicolinsäure verhindert, mit dem die Matrix des Siliziumchips ausgestattet war. Zuerst wurde das Analysesystem kalibriert, indem den Samples eine Mischung von Oligonukleotiden bekannter Masse zugegeben wurde. Anschließend wurden die Chips in das Massenspektrometer eingeschleust und jeder Matrixpunkt im Hochvakuum (ca. 10^{-8} – 10^{-6} mbar) für einige Nanosekunden einem

4 Material und Methoden

intensiven Laserpuls (Stickstofflaser: $\lambda = 337 \text{ nm}$) ausgeliefert. Das Probenmaterial verdampfte und wurde in einen ionisierten Zustand gebracht. Es folgte die Beschleunigung der Ionen in einem elektrostatischen Feld. Die Flugdauer der Ionen wurde im Flugkanal, d. h. zwischen Beschleunigungselektrode und Detektor genau gemessen. Durch Messung der Zeit konnte auf die molekulare Masse der Ionen (in Dalton) geschlossen werden (Ragoussis et al. 2006). Die Massen wurden mittels spezieller Software (TYPER Analyzer 3.3.0 Software, Sequenom) als Peaks dargestellt, wodurch jeder Probe ein spezifischer Genotyp zugewiesen werden konnte.

4.4 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe der SPSS 15.0 Software (*Statistical Package for Social Sciences*, SPSS Inc., Chicago).

Die Genotypverteilung wurde auf das Vorliegen des HWE getestet. Die Unterschiede zwischen Patienten- und Kontrollgruppe in Bezug auf Allel- und Genotypfrequenzen wurden mit dem χ^2 -Test dargestellt.

Als Maß für die Größe eines Kopplungsungleichgewichts zwischen zwei Polymorphismen diente der *linkage disequilibrium* Determinant D' (Lewontin 1964) und das Quadrat des Korrelationskoeffizienten r^2 (Hill und Robertson 1968). Die Zahlenwerte beider Parameter befinden sich zwischen 0 und 1 und ermöglichen eine leichte Interpretation: je näher die beiden Parameter an 1 liegen, desto höher ist das LD.

Das für alle statistische Berechnungen zugrunde gelegte Signifikanzniveau wurde bei $p < 0,05$ und ein Trend zur Signifikanz bei $p < 0,1$ festgelegt.

Aufgrund des präliminären Charakters der Studie erfolgte keine Bonferroni-Korrektur.

5 Ergebnisse

5.1 Das NRG3-Gen in der Schizophrenie

5.1.1 Grundzüge der vorliegenden Studie

In der vorliegenden Arbeit wurde ein eventueller Zusammenhang des NRG3-Gens mit dem Auftreten einer Schizophrenie überprüft. Es lagen 20 Marker in Form von SNPs vor, die innerhalb des NRG3-Gens lokalisiert sind. Diese SNPs wurden im Studiendesign einer Fall-Kontroll-Assoziationsanalyse an einem kaukasischen Kollektiv von 512 Schizophreniepatienten und 1320 Kontrollprobanden untersucht.

In dem Gesamtkollektiv der Schizophreniepatienten waren 65,2% männlich und 34,8% weiblich. Das Alter der Patienten lag zwischen 17 und 70 Jahren mit einem Medianwert von 37,7 Jahren (Standardabweichung 11,34). Zur genaueren Betrachtung des Bildungsstandes wurde der höchste erreichte Schulabschluss erfragt. Hierbei erreichten 42,8% der Patienten die Hauptschulreife, 26,0% die mittlere Reife und 31,2% das Abitur.

Zudem wurden drei Untergruppen aus der Gesamtgruppe der Schizophreniepatienten gebildet. Die erste Untergruppe bildeten Schizophreniepatienten mit an Schizophrenie erkrankten Erstgradangehörigen (97 Patienten), die zweite Untergruppe stellten Schizophreniepatienten mit an Schizophrenie erkrankten Familienangehörigen über den ersten Grad hinaus dar (147 Personen), die dritte Untergruppe bildeten Schizophreniepatienten mit psychiatrisch erkrankten Familienangehörigen ersten Grades und darüber hinaus (374 Personen).

In der Kontrollgruppe waren 46,0% männlich und 54,0% weiblich. Das Alter variierte zwischen 19 und 79 Jahren, wobei der Altersdurchschnitt bei 46,3 Jahren lag (Standardabweichung 15,69). 22,4% erlangten bei dieser Gruppe als höchsten Schulabschluss die Hauptschulreife, 33,0% die mittlere Reife und 44,6% das Abitur. Als Kontrollgruppe wurde für den Ergebnisteil stets dieselbe verwendet.

Die Allele wurden entsprechend der Häufigkeit ihres Vorkommens in der untersuchten Gesamtstichprobe als Allel 1 und Allel 2 bezeichnet. Allel 1 stellt das in der Gesamtkohorte seltener vorkommende Allel dar, Allel 2 das häufiger vorkommende Allel.

5.1.2 Lokalisation der 20 Polymorphismen im NRG3-Gen

Das NRG3-Gen ist auf Chromosom 10q22-q23 lokalisiert (Gizatullin et al. 2000). Eine Übersicht über die Lokalisation der untersuchten 20 SNPs des NRG3-Gens gibt das *National Center for Biotechnology Information (NCBI), Database of Single Nucleotide Polymorphisms (dbSNP)* (NCBI, 2012) (vgl. Abbildung 5-1).

Der Startpunkt von NRG3 (Referenz NM_001010848.3) liegt bei 83.635.070 Basenpaaren, der Endpunkt bei 84.746.935 Basenpaaren (NCBI, 2012).

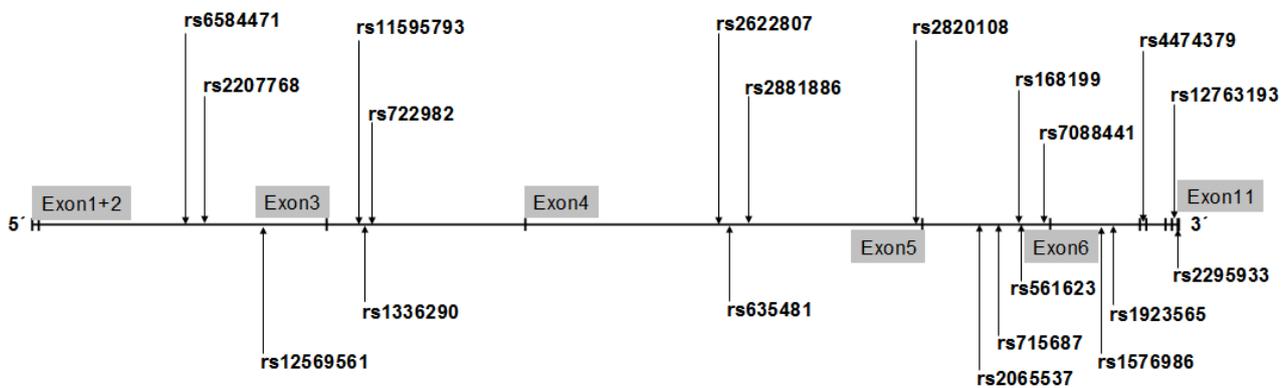


Abbildung 5-1: Lage der 20 untersuchten SNPs im NRG3-Gen. Das NRG3-Gen ist in seiner Gesamtlänge dargestellt. Die 11 Exons und 10 Introns wurden nach Vorlage von NCBI (2012) gezeichnet. Senkrechte Striche stellen Exons dar, die dazwischenliegenden Verbindungen die Introns.

5.1.3 Hardy-Weinberg-Gleichgewicht

Gemäß dem Hardy-Weinberg-Equilibrium (HWE) sind in einer unendlich großen Population, in der Effekte wie Selektion, Mutation oder Migration ausgeschlossen sind, die Allel- und Genotyphäufigkeiten von Generation zu Generation konstant. In einer solchen Population herrscht Panmixie, d. h. jedes Individuum des Kollektivs kann sich mit gleicher Wahrscheinlichkeit mit jedem gegengeschlechtlichen Individuum paaren. In einem realen Kollektiv wie dem in der vorliegenden Studie treffen die Bedingungen für Panmixie nur bedingt zu, ebenso können die oben genannten Effekte nicht sicher ausgeschlossen werden. Bei ausreichend großer Studienzahl allerdings geht man von einem Vorliegen des HWE aus. Alle in dieser Arbeit vorliegenden Genotypverteilungen wurden auf das Vorliegen des HWE geprüft. Es wurden in der beobachteten Verteilung keine signifikanten Abweichungen ermittelt, d. h. sowohl das Patienten- als auch das Kontrollprobanden-Kollektiv liegen im HWE (vgl. Tabelle 5-1).

Tabelle 5-1: Prüfung der Genotypverteilungen auf Vorliegen des HWE

SNP	Position	Allel 1/2	Patienten		Kontrollen	
			MAF	p-Wert (F)	MAF	p-Wert (F)
rs6584471	83783511	G/A	0,438	0,787 (-0,013)	0,443	0,340 (0,027)
rs2207768	83802403	G/A	0,258	0,133 (-0,069)	0,279	0,890 (0,003)
rs12569561	83865848	C/T	0,460	0,525 (-0,033)	0,448	0,285 (0,031)
rs11595793	83950971	G/C	0,429	0,851 (-0,012)	0,411	0,953 (0,002)
rs1336290	83955422	C/T	0,381	0,778 (-0,014)	0,370	0,813 (0,007)
rs722982	83962540	C/T	0,345	0,844 (-0,014)	0,321	0,445 (0,021)
rs2622807	84301584	T/C	0,354	0,695 (0,017)	0,307	0,744 (-0,011)
rs635481	84311992	C/T	0,333	0,690 (0,021)	0,293	0,422 (-0,024)
rs2881886	84334510	G/A	0,367	0,923 (0,006)	0,349	0,750 (-0,010)
rs2820108	84495179	A/C	0,486	0,858 (0,007)	0,450	0,081 (0,051)
rs2065537	84555444	A/G	0,435	0,928 (0,005)	0,424	0,649 (0,013)
rs715687	84571953	G/A	0,345	0,690 (0,018)	0,343	0,238 (0,034)
rs168199	84589026	G/T	0,477	0,787 (-0,016)	0,472	0,107 (-0,046)
rs561623	84594235	T/G	0,307	1,000 (0,000)	0,302	1,000 (0,000)
rs7088441	84616626	G/A	0,469	0,929 (-0,008)	0,455	0,434 (-0,023)
rs1576986	84669935	C/A	0,268	0,651 (-0,024)	0,271	0,141 (0,041)
rs1923565	84682591	C/G	0,349	0,280 (0,050)	0,349	0,297 (-0,030)
rs4474379	84713820	G/A	0,289	0,592 (0,022)	0,299	0,391 (-0,025)
rs12763193	84740839	T/C	0,485	0,424 (0,037)	0,474	0,824 (-0,008)
rs2295933	84745256	A/G	0,282	0,743 (0,014)	0,291	0,788 (-0,010)

Ermittlung der p-Werte nach Pearson (Freiheitsgrade $dF = 1$); MAF = *minor allele frequency*; F = Inzuchtkoeffizient

5.1.4 Analyse der 20 Polymorphismen auf eine Assoziation mit Schizophrenie

5.1.4.1 Analyse der Polymorphismen in der Gesamtgruppe Schizophreniepatienten

Im folgenden Abschnitt werden die Ergebnisse aus der Genotypisierung von der Gesamtgruppe der Schizophreniepatienten und der Kontrollprobanden dargestellt, mit dem Ziel, einen eventuellen Zusammenhang zwischen den untersuchten Markern im NRG3-Gen und der Manifestation der Erkrankung zu entdecken (vgl. Tabelle 5-2).

Tabelle 5-2: Genotypverteilung der 20 SNPs bei dem Gesamtkollektiv der Patienten und Kontrollprobanden

SNP	Allel 1/2	Patienten			Kontrollen			X ²	p-Wert
		A1A1 (%)	A1A2 (%)	A2A2 (%)	A1A1 (%)	A1A2 (%)	A2A2 (%)		
rs6584471	G/A	95(18,9)	251(49,9)	157(31,2)	265(20,3)	626(48,0)	413(31,7)	0,668	0,716
rs2207768	G/A	27(5,3)	207(40,9)	272(53,8)	102(7,9)	520(40,1)	674(52,0)	3,533	0,171
rs12569561	C/T	100(20,4)	252(51,3)	139(28,3)	269(20,8)	619(47,9)	403(31,3)	1,856	0,395
rs11595793	G/C	85(18,2)	232(49,6)	151(32,2)	212(17,0)	603(48,3)	433(34,7)	0,973	0,615
rs1336290	C/T	72(14,2)	243(47,8)	193(38,0)	181(13,9)	605(46,3)	520(39,8)	0,514	0,773
rs722982	C/T	59(11,6)	233(45,9)	216(42,5)	140(10,8)	554(42,7)	604(46,5)	2,373	0,305
rs2622807	T/C	64(12,9)	223(45,0)	209(42,1)	119(9,2)	557(43,0)	618(47,8)	7,574	0,023
rs635481	C/T	59(11,6)	222(43,5)	229(44,9)	105(8,1)	553(42,4)	646(49,5)	6,757	0,034
rs2881886	G/A	68(13,6)	231(46,2)	201(40,2)	142(12,0)	545(45,9)	500(42,1)	1,077	0,584
rs2820108	A/C	118(23,8)	246(49,6)	132(26,6)	259(21,5)	565(47,0)	379(31,5)	4,112	0,128
rs2065537	A/G	96(19,1)	246(48,9)	161(32,0)	236(18,3)	623(48,2)	433(33,5)	0,415	0,813
rs715687	G/A	60(12,3)	217(44,4)	212(43,3)	160(12,5)	555(43,6)	559(43,9)	0,099	0,952
rs168199	G/T	111(22,3)	252(50,7)	134(27,0)	274(21,1)	677(52,1)	348(26,8)	0,401	0,818
rs561623	T/G	47(9,4)	212(42,6)	239(48,0)	118(9,1)	545(42,2)	630(48,7)	0,093	0,955
rs7088441	G/A	111(21,8)	255(50,2)	142(28,0)	262(20,2)	659(50,7)	378(29,1)	0,687	0,709
rs1576986	C/A	34(6,7)	204(40,2)	270(53,1)	106(8,1)	493(37,9)	703(54,0)	1,538	0,463
rs1923565	C/G	67(13,3)	217(43,1)	219(43,6)	148(11,5)	602(46,8)	535(41,7)	2,372	0,305
rs4474379	G/A	45(8,8)	205(40,2)	260(51,0)	110(8,4)	561(43,0)	634(48,6)	1,172	0,556
rs12763193	T/C	124(24,5)	244(48,1)	139(27,4)	290(22,3)	654(50,3)	357(27,4)	1,086	0,581
rs2295933	A/G	42(8,3)	203(40,0)	263(51,7)	108(8,3)	544(41,6)	654(50,1)	0,463	0,794

Die Genotypen unterteilen sich entweder in Träger von Allel1/Allel1, Allel1/Allel2 oder Allel2/Allel2.

Wie aus Tabelle 5-2 ersichtlich, waren zwei SNPs mit der Erkrankung Schizophrenie signifikant assoziiert. Bei dem Marker rs2622807 kam der Genotyp TT bei den Schizophreniepatienten (12,9%) häufiger vor als bei den Kontrollprobanden (9,2%) (p-Wert = 0,023). Der Marker rs635481 wies den Genotyp CC häufiger bei den Schizophreniepatienten (11,6%) als bei den Kontrollen (8,1%) auf (p-Wert = 0,034).

5 Ergebnisse

Nachfolgend wurde untersucht, ob eines der beiden Allele eines SNPs überzufällig häufig bei den Patienten vorkommt. Eine solche über dem Zufall liegende Häufigkeit eines Allels würde für eine Assoziation der betreffenden Variante mit der Erkrankung sprechen. Dazu wurden die Individuen mit dem selteneren Allel 1 (Allel1/Allel1 und Allel1/Allel2) den Nicht-Trägern von Allel 1 (Allel2/Allel 2) gegenübergestellt (vgl. Tabelle 5-3).

Tabelle 5-3: Genotypverteilung nach dem dominanten Modell

SNP	Allel 1/2	Patienten		Kontrollen		χ^2	p-Wert
		A1A1 + A1A2(%)	A2A2(%)	A1A1 + A1A2(%)	A2A2(%)		
rs6584471	G/A	346(68,8)	157(31,2)	891(68,3)	413(31,7)	0,035	0,851
rs2207768	G/A	234(46,2)	272(53,8)	622(48,0)	674(52,0)	0,446	0,504
rs12569561	C/T	352(71,7)	139(28,3)	888(68,7)	403(31,3)	1,420	0,233
rs11595793	G/C	317(67,8)	151(32,2)	815(65,3)	433(34,7)	0,896	0,344
rs1336290	C/T	315(62,0)	193(38,0)	786(60,2)	520(39,8)	0,510	0,475
rs722982	C/T	292(57,5)	216(42,5)	694(53,5)	604(46,5)	2,372	0,124
rs2622807	T/C	287(57,9)	209(42,1)	676(52,2)	618(47,8)	4,559	0,033
rs635481	C/T	281(55,1)	229(44,9)	658(50,5)	646(49,5)	3,158	0,076
rs2881886	G/A	299(59,8)	201(40,2)	687(57,9)	500(42,1)	0,536	0,464
rs2820108	A/C	364(73,4)	132(26,6)	824(68,5)	379(31,5)	3,996	0,046
rs2065537	A/G	342(68,0)	161(32,0)	859(66,5)	433(33,5)	0,371	0,543
rs715687	G/A	277(56,7)	212(43,3)	715(56,1)	559(43,9)	0,039	0,843
rs168199	G/T	363(73,0)	134(27,0)	951(73,2)	348(26,8)	0,005	0,941
rs561623	T/G	259(52,0)	239(48,0)	663(51,3)	630(48,7)	0,077	0,781
rs7088441	G/A	366(72,0)	142(28,0)	921(70,9)	378(29,1)	0,234	0,628
rs1576986	C/A	238(46,9)	270(53,1)	599(46,0)	703(54,0)	0,105	0,746
rs1923565	C/G	284(56,4)	219(43,6)	750(58,3)	535(41,7)	0,538	0,463
rs4474379	G/A	250(49,0)	260(51,0)	671(51,4)	634(48,6)	0,844	0,358
rs12763193	T/C	368(72,6)	139(27,4)	944(72,6)	357(27,4)	0,000	0,992
rs2295933	A/G	245(48,3)	263(51,7)	652(49,9)	654(50,1)	0,420	0,517

Verteilung der Träger des selteneren Allels 1 (A1A1 + A1A2) versus Nicht-Träger von Allel 1 (A2A2) bei dem Gesamtkollektiv der Patienten verglichen mit gesunden Probanden.

Als Ergebnis ließ sich ein signifikanter Zusammenhang zwischen Schizophrenie und dem Einzelbasenpolymorphismus rs2622807 feststellen: die Träger der Genotypen mit dem selteneren T-Allel waren bei den Schizophreniepatienten (57,9%) signifikant häufiger vertreten im Vergleich zu den gesunden Kontrollen (52,2%) (p-Wert 0,033). Auch bei Marker rs2820108 zeigten sich Träger des selteneren A-Allels signifikant häufiger unter den Schizophreniepatienten (73,4%) im Vergleich zu den Kontrollprobanden (68,5%) (p-Wert 0,046). Bei dem Marker rs635481 ließen sich Träger des selteneren C-Allels mit einem Trend zur Signifikanz gehäuft bei den Schizophreniepatienten nachweisen (p-Wert 0,076).

5 Ergebnisse

Dieselbe Berechnung wurde auch mit den Trägern des häufigeren Allels (Allel 2) durchgeführt. Analog zur vorherigen Berechnung wurden die Träger des häufigeren Allels 2 (Allel2/Allel2 und Allel1/Allel2) den Personen ohne Allel 2 (Allel 1/Allel1) gegenübergestellt (vgl. Tabelle 5-4).

Tabelle 5-4: Genotypverteilung nach dem rezessiven Modell

SNP	Allel 1/2	Patienten		Kontrollen		χ^2	p-Wert
		A2A2 + A1A2(%)	A1A1(%)	A2A2 + A1A2(%)	A1A1(%)		
rs6584471	G/A	408(81,1)	95(18,9)	1039(79,7)	265(20,3)	0,469	0,494
rs2207768	G/A	479(94,7)	27(5,3)	1194(92,1)	102(7,9)	3,517	0,061
rs12569561	C/T	391(79,6)	100(20,4)	1022(79,2)	269(20,8)	0,048	0,827
rs11595793	G/C	383(81,8)	85(18,2)	1036(83,0)	212(17,0)	0,329	0,567
rs1336290	C/T	436(85,8)	72(14,2)	1125(86,1)	181(13,9)	0,030	0,862
rs722982	C/T	449(88,4)	59(11,6)	1158(89,2)	140(10,8)	0,256	0,613
rs2622807	T/C	432(87,1)	64(12,9)	1175(90,8)	119(9,2)	5,368	0,021
rs635481	C/T	451(88,4)	59(11,6)	1199(91,9)	105(8,1)	5,513	0,019
rs2881886	G/A	432(86,4)	68(13,6)	1045(88,0)	142(12,0)	0,865	0,352
rs2820108	A/C	378(76,2)	118(23,8)	944(78,5)	259(21,5)	1,040	0,308
rs2065537	A/G	407(80,9)	96(19,1)	1056(81,7)	236(18,3)	0,161	0,688
rs715687	G/A	429(87,7)	60(12,3)	1114(87,5)	160(12,5)	0,027	0,870
rs168199	G/T	386(77,7)	111(22,3)	1025(78,9)	274(21,1)	0,329	0,567
rs561623	T/G	451(90,6)	47(9,4)	1175(90,9)	118(9,1)	0,042	0,838
rs7088441	G/A	397(78,2)	111(21,8)	1037(79,8)	262(20,2)	0,630	0,427
rs1576986	C/A	474(93,3)	34(6,7)	1196(91,9)	106(8,1)	1,074	0,300
rs1923565	C/G	436(86,7)	67(13,3)	1137(88,5)	148(11,5)	1,110	0,292
rs4474379	G/A	465(91,2)	45(8,8)	1195(91,6)	110(8,4)	0,073	0,787
rs12763193	T/C	383(75,5)	124(24,5)	1011(77,7)	290(22,3)	0,970	0,325
rs2295933	A/G	466(91,7)	42(8,3)	1198(91,7)	108(8,3)	0,000	0,999

Verteilung der Träger des häufigeren Allels 2 (A2A2 + A1A2) versus Nicht-Träger von Allel 2 (A1A1) im Gesamtkollektiv der Patienten, verglichen zur Gruppe der Kontrollprobanden

Der SNP rs2622807 ging als signifikant mit Schizophrenie assoziiert hervor; die Träger der Genotypen mit dem häufigeren Allel C kamen bei Schizophreniepatienten (87,1%) seltener vor als bei Gesunden (90,8%) (p-Wert 0,021). Auch bei Marker rs635481 waren Träger des häufigeren T-Allels unter den Schizophreniepatienten (88,4%) seltener als bei den Gesunden (91,9%) (p-Wert 0,019) zu finden. Zusätzlich zeigte sich ein Trend zur Signifikanz bei SNP rs2207768, wonach Träger des häufigeren A-Allels öfter unter den Erkrankten zu finden waren (p-Wert 0,061).

Die Verteilung der Allele innerhalb der beiden Kohorten Schizophreniepatienten und gesunde Probanden wurde als nächstes untersucht. Die Anzahl der Allele entspricht dem diploiden Chromosomensatz (vgl. Tabelle 5-5).

Tabelle 5-5: Allelverteilung in der Gesamtgruppe der Schizophreniepatienten im Vergleich zu Kontrollprobanden

SNP	Allel 1/2	Patienten		Kontrollen		χ^2	p-Wert
		Allel 1 (%)	Allel 2 (%)	Allel 1 (%)	Allel 2 (%)		
rs6584471	G/A	441(43,8)	565(56,2)	1156(44,4)	1452(55,6)	0,070	0,791
rs2207768	G/A	261(25,8)	751(74,2)	724(27,9)	1868(72,1)	1,681	0,195
rs12569561	C/T	452(46,0)	530(54,0)	1157(44,8)	1425(55,2)	0,426	0,514
rs11595793	G/C	402(42,9)	534(57,1)	1027(41,1)	1469(58,9)	0,911	0,340
rs1336290	C/T	387(38,1)	629(61,9)	967(37,0)	1645(63,0)	0,357	0,550
rs722982	C/T	351(34,5)	665(65,5)	834(32,1)	1762(67,9)	1,941	0,164
rs2622807	T/C	351(35,4)	641(64,6)	795(30,7)	1793(69,3)	7,169	0,007
rs635481	C/T	340(33,3)	680(66,7)	763(29,3)	1845(70,7)	5,761	0,016
rs2881886	G/A	367(36,7)	633(63,3)	829(34,9)	1545(65,1)	0,974	0,324
rs2820108	A/C	482(48,6)	510(51,4)	1083(45,0)	1323(55,0)	3,616	0,057
rs2065537	A/G	438(43,5)	568(56,5)	1095(42,4)	1489(57,6)	0,400	0,527
rs715687	G/A	337(34,5)	641(65,5)	875(34,3)	1673(65,7)	0,004	0,948
rs168199	G/T	474(47,7)	520(52,3)	1225(43,3)	1373(56,7)	0,082	0,774
rs561623	T/G	306(30,7)	690(69,3)	781(30,2)	1805(69,8)	0,093	0,761
rs7088441	G/A	477(46,9)	539(53,1)	1183(45,5)	1415(54,5)	0,588	0,443
rs1576986	C/A	272(26,8)	744(73,2)	705(27,1)	1899(72,9)	0,034	0,854
rs1923565	C/G	351(34,9)	655(65,1)	898(34,9)	1672(65,1)	0,001	0,977
rs4474379	G/A	295(28,9)	725(71,1)	781(29,9)	1829(70,1)	0,353	0,553
rs12763193	T/C	492(48,5)	522(51,5)	1234(47,4)	1368(52,6)	0,351	0,554
rs2295933	A/G	287(28,2)	729(71,8)	760(29,1)	1852(70,9)	0,257	0,613

Bei Betrachtung der vorliegenden Allelverteilung fiel erneut eine Signifikanz bei den beiden Markern rs2622807 (p-Wert 0,007) und rs635481 (p-Wert 0,016) auf. Bei SNP rs2622807 war das seltenere T-Allel bei den Schizophreniepatienten (35,4%) häufiger als bei den Kontrollen (30,7%) anzutreffen. Der SNP rs635481 wies das seltenere C-Allel bei den Schizophreniepatienten (33,3%) häufiger als bei den gesunden Probanden (29,3%) auf.

Das SNP rs2820108 zeigte eine Tendenz zu einem signifikanten Ergebnis, wonach das seltenere Allel A häufiger unter den Schizophreniepatienten zu finden ist (p-Wert 0,057).

5.1.4.2 Analyse der Polymorphismen bei Schizophreniepatienten mit an Schizophrenie erkrankten Erstgradangehörigen

Schizophreniepatienten, welche Erstgradangehörige aufwiesen, die ebenfalls an Schizophrenie litten, wurden im folgenden Untersuchungsgang als Subgruppe des oben besprochenen Patientenkollektivs gebildet. Die Anzahl der Patienten dieser Untergruppe betrug 97, von denen 59,8% männlich und 40,2% weiblich waren. Die Patienten dieser

5 Ergebnisse

Subgruppe hatten ein Alter zwischen 18 bis 67 Jahren, der Altersdurchschnitt lag bei 40,7 Jahren (Standardabweichung 11,45). Bei Betrachtung des Bildungsstandes ergab sich folgende Einteilung: 48,5% erreichten den Hauptschulabschluss, 17,5% die mittlere Reife und 34,0% das Abitur als höchsten Schulabschluss.

Zuerst wurde die Genotypverteilung der Patientensubpopulation auf eine signifikante Assoziation mit der Erkrankung untersucht (vgl. Tabelle 5-6).

Tabelle 5-6: Genotypverteilung der 20 SNPs bei den Schizophreniepatienten mit an Schizophrenie erkrankten Erstgradangehörigen und gesunden Kontrollen.

SNP	Allel 1/2	Patienten			Kontrollen			χ^2	P
		A1A1 (%)	A1A2 (%)	A2A2 (%)	A1A1 (%)	A1A2 (%)	A2A2 (%)		
rs6584471	G/A	10(10,4)	50(52,1)	36(37,5)	265(20,3)	626(48,0)	413(31,7)	5,721	0,057
rs2207768	G/A	7(7,3)	36(37,5)	53(55,2)	102(7,9)	520(40,1)	674(52,0)	0,368	0,832
rs12569561	C/T	14(15,1)	47(50,5)	32(34,4)	269(20,8)	619(47,9)	403(31,3)	1,821	0,402
rs11595793	G/C	18(20,2)	39(43,8)	32(36,0)	212(17,0)	603(48,3)	433(34,7)	0,894	0,640
rs1336290	C/T	14(14,6)	44(45,8)	38(39,6)	181(13,9)	605(46,3)	520(39,8)	0,040	0,980
rs722982	C/T	9(9,4)	50(52,1)	37(38,5)	140(10,8)	554(42,7)	604(46,5)	3,232	0,199
rs2622807	T/C	12(12,9)	44(47,3)	37(39,8)	119(9,2)	557(43,0)	618(47,8)	2,795	0,247
rs635481	C/T	12(12,4)	44(45,4)	41(42,2)	105(8,1)	553(42,4)	646(49,5)	3,175	0,204
rs2881886	G/A	14(14,6)	42(43,7)	40(41,7)	142(12,0)	545(45,9)	500(42,1)	0,597	0,742
rs2820108	A/C	25(25,8)	47(48,4)	25(25,8)	259(21,5)	565(47,0)	379(31,5)	1,731	0,421
rs2065537	A/G	15(15,5)	59(60,8)	23(23,7)	236(18,3)	623(48,2)	433(33,5)	5,953	0,051
rs715687	G/A	9(9,7)	44(47,3)	40(43,0)	160(12,5)	555(43,6)	559(43,9)	0,875	0,646
rs168199	G/T	16(17,2)	49(52,7)	28(30,1)	274(21,1)	677(52,1)	348(26,8)	0,989	0,610
rs561623	T/G	5(5,4)	43(46,2)	45(48,4)	118(9,1)	545(42,2)	630(48,7)	1,718	0,424
rs7088441	G/A	18(18,7)	48(50,0)	30(31,3)	262(20,2)	659(50,7)	378(29,1)	0,241	0,887
rs1576986	C/A	3(3,1)	47(48,4)	47(48,5)	106(8,1)	493(37,9)	703(54,0)	n.a.	n.a.
rs1923565	C/G	15(15,8)	43(45,3)	37(38,9)	148(11,5)	602(46,8)	535(41,7)	1,568	0,457
rs4474379	G/A	11(11,3)	36(37,1)	50(51,6)	110(8,4)	561(43,0)	634(48,6)	1,781	0,410
rs12763193	T/C	23(24,2)	43(45,3)	29(30,5)	290(22,3)	654(50,3)	357(27,4)	0,895	0,639
rs2295933	A/G	10(10,4)	36(37,5)	50(52,1)	108(8,3)	544(41,6)	654(50,1)	0,935	0,627

Die Genotypen unterteilen sich entweder in Träger von Allel1/Allel1, Allel1/Allel2 oder Allel2/Allel2 (n.a. = nicht auswertbar)

Es zeigte sich eine Tendenz zur Signifikanz bei Marker rs6584471, wonach der Genotyp AA bei den Schizophreniepatienten mit an Schizophrenie erkrankten Erstgradangehörigen häufiger vorkam als bei den gesunden Kontrollen (p-Wert 0,057). Ebenso ließ sich ein signifikanter Trend bei SNP rs2065537 nachweisen, bei dem der Genotyp AG häufiger in der Untergruppe der Schizophreniepatienten vorkam (p-Wert 0,051).

Nachfolgend wurden in der Subgruppe diejenigen Patienten mit dem selteneren Allel 1 (Allel1/Allel1 und Allel1/Allel2) den Patienten ohne Allel 1 (Allel2/Allel 2) gegenübergestellt (vgl. Tabelle 5-7).

Tabelle 5-7: Genotypverteilung nach dem dominanten Modell

SNP	Allel 1/2	Patienten		Kontrollen		χ^2	p-Wert
		A1A1 + A1A2(%)	A2A2(%)	A1A1 + A1A2(%)	A2A2(%)		
rs6584471	G/A	60(62,5)	36(37,5)	891(68,3)	413(31,7)	1,394	0,238
rs2207768	G/A	43(44,8)	53(55,2)	622(48,0)	674(52,0)	0,367	0,545
rs12569561	C/T	61(65,6)	32(34,4)	888(68,7)	403(31,3)	0,410	0,522
rs11595793	G/C	57(64,0)	32(36,0)	815(65,3)	433(34,7)	0,058	0,810
rs1336290	C/T	58(60,4)	38(39,6)	786(60,2)	520(39,8)	0,002	0,964
rs722982	C/T	59(61,5)	37(38,5)	694(53,5)	604(46,5)	2,298	0,130
rs2622807	T/C	56(60,2)	37(39,8)	676(52,2)	618(47,8)	2,214	0,137
rs635481	C/T	56(57,8)	41(42,2)	658(50,5)	646(49,5)	1,910	0,167
rs2881886	G/A	56(58,3)	40(41,7)	687(57,9)	500(42,1)	0,008	0,931
rs2820108	A/C	72(74,2)	25(25,8)	824(68,5)	379(31,5)	1,377	0,241
rs2065537	A/G	74(76,3)	23(23,7)	859(66,5)	433(33,5)	3,932	0,047
rs715687	G/A	53(57,0)	40(43,0)	715(56,1)	559(43,9)	0,026	0,871
rs168199	G/T	65(69,9)	28(30,1)	951(73,2)	348(26,8)	0,485	0,486
rs561623	T/G	48(51,6)	45(48,4)	663(51,3)	630(48,7)	0,004	0,950
rs7088441	G/A	66(68,7)	30(31,3)	921(70,9)	378(29,1)	0,200	0,655
rs1576986	C/A	50(51,5)	47(48,5)	599(46,0)	703(54,0)	n.a.	n.a.
rs1923565	C/G	58(61,2)	37(38,8)	750(58,3)	535(41,7)	0,263	0,608
rs4474379	G/A	47(48,4)	50(51,6)	671(51,4)	634(48,6)	0,318	0,573
rs12763193	T/C	66(69,5)	29(30,5)	944(72,6)	357(27,4)	0,421	0,516
rs2295933	A/G	46(47,9)	50(52,1)	652(49,9)	654(50,1)	0,144	0,704

Verteilung der Träger des selteneren Allels 1 (A1A1 + A1A2) versus Nicht-Träger von Allel 1 (A2A2) bei den Schizophreniepatienten mit an Schizophrenie erkrankten Erstgradangehörigen im Vergleich mit gesunden Kontrollen (n.a. = nicht auswertbar)

Es zeigte sich eine Signifikanz bei Marker rs2065537, wonach sich Träger des selteneren A-Allels häufiger in der Gruppe der Schizophreniepatienten mit erstgradig verwandten Schizophreniepatienten (76,3%) befanden als bei den Kontrollprobanden (66,5%) (p-Wert 0,047).

Dasselbe wurde bezüglich dem häufigeren Allel 2 durchgeführt: den Trägern von Allel 2 (Allel2/Allel2 und Allel1/Allel2) wurden diejenigen Patienten ohne Allel 2 (Allel1/Allel1) gegenübergestellt (vgl. Tabelle 5-8). Bei Marker rs6584471 zeigte sich das häufigere A-Allel bei den Schizophreniepatienten mit erstgradig verwandten Schizophreniepatienten (89,6%) signifikant häufiger als bei der Kontrollgruppe (79,7%) (p-Wert 0,018).

Nachfolgend wurde die Verteilung der Allele innerhalb der beiden Kohorten Schizophreniepatienten mit erstgradig verwandten Schizophreniepatienten und gesunde Probanden verglichen. Die Zahlen der Allele entsprechen dem diploiden Chromosomensatz (Tabelle 5-9).

5 Ergebnisse

Tabelle 5-8: Genotypverteilung nach dem rezessiven Modell

SNP	Allel 1/2	Patienten		Kontrollen		χ^2	p-Wert
		A2A2 + A1A2(%)	A1A1(%)	A2A2 + A1A2(%)	A1A1(%)		
rs6584471	G/A	86(89,6)	10(10,4)	1039(79,7)	265(20,3)	5,558	0,018
rs2207768	G/A	89(92,7)	7(7,3)	1194(92,1)	102(7,9)	0,041	0,839
rs12569561	C/T	79(84,9)	14(15,1)	1022(79,2)	269(20,8)	1,783	0,182
rs11595793	G/C	71(79,8)	18(20,2)	1036(83,0)	212(17,0)	0,611	0,434
rs1336290	C/T	82(85,4)	14(14,6)	1125(86,1)	181(13,9)	0,039	0,843
rs722982	C/T	87(90,6)	9(9,4)	1158(89,2)	140(10,8)	0,186	0,666
rs2622807	T/C	81(87,1)	12(12,9)	1175(90,8)	119(9,2)	1,394	0,238
rs635481	C/T	85(87,6)	12(12,4)	1199(91,9)	105(8,1)	2,200	0,138
rs2881886	G/A	82(85,4)	14(14,6)	1045(88,0)	142(12,0)	0,571	0,450
rs2820108	A/C	72(74,2)	25(25,8)	944(78,5)	259(21,5)	0,947	0,331
rs2065537	A/G	82(84,5)	15(15,5)	1056(81,7)	236(18,3)	0,479	0,489
rs715687	G/A	84(90,3)	9(9,7)	1114(87,5)	160(12,5)	0,664	0,415
rs168199	G/T	77(82,8)	16(17,2)	1025(78,9)	274(21,1)	0,796	0,372
rs561623	T/G	88(94,6)	5(5,4)	1175(90,9)	118(9,1)	1,508	0,219
rs7088441	G/A	78(81,3)	18(18,7)	1037(79,8)	262(20,2)	0,112	0,738
rs1576986	C/A	94(96,9)	3(3,1)	1196(91,9)	106(8,1)	n.a.	n.a.
rs1923565	C/G	80(84,2)	15(15,8)	1137(88,5)	148(11,5)	1,550	0,213
rs4474379	G/A	86(88,7)	11(11,3)	1195(91,6)	110(8,4)	0,970	0,325
rs12763193	T/C	72(75,8)	23(24,2)	1011(77,7)	290(22,3)	0,188	0,665
rs2295933	A/G	86(89,6)	10(10,4)	1198(91,7)	108(8,3)	0,535	0,465

Verteilung der Träger des häufigeren Allels 2 (A2A2 + A1A2) versus Nicht-Träger von Allel 2 (A1A1) bei den Schizophreniepatienten mit an Schizophrenie erkrankten Erstgradangehörigen im Vergleich mit gesunden Kontrollen (n.a. = nicht auswertbar)

Tabelle 5-9: Allelverteilung bei Schizophreniepatienten mit an Schizophrenie erkrankten Erstgradangehörigen im Vergleich zu Kontrollen

SNP	Allel 1/2	Patienten		Kontrollen		χ^2	p-Wert
		Allel 1 (%)	Allel 2 (%)	Allel 1 (%)	Allel 2 (%)		
rs6584471	G/A	70(36,5)	122(63,5)	1156(44,4)	1452(55,6)	4,496	0,034
rs2207768	G/A	50(26,0)	142(74,0)	724(27,9)	1868(72,1)	0,318	0,573
rs12569561	C/T	75(40,3)	111(59,7)	1157(44,8)	1425(55,2)	1,415	0,234
rs11595793	G/C	75(42,1)	103(57,9)	1027(41,1)	1469(58,9)	0,067	0,796
rs1336290	C/T	72(37,5)	120(62,5)	967(37,0)	1645(63,0)	0,018	0,895
rs722982	C/T	68(35,4)	124(64,6)	834(32,1)	1762(67,9)	0,884	0,347
rs2622807	T/C	68(36,6)	118(63,4)	795(30,7)	1793(69,3)	2,762	0,097
rs635481	C/T	68(35,1)	126(64,9)	763(29,3)	1845(70,7)	2,907	0,088
rs2881886	G/A	70(36,5)	122(63,5)	829(34,9)	1545(65,1)	0,185	0,667
rs2820108	A/C	97(50,0)	97(50,0)	1083(45,0)	1323(55,0)	1,802	0,180
rs2065537	A/G	89(45,9)	105(54,1)	1095(42,4)	1489(57,6)	0,904	0,342
rs715687	G/A	62(33,3)	124(66,7)	875(34,3)	1673(65,7)	0,078	0,780
rs168199	G/T	81(43,5)	105(56,5)	1225(43,3)	1373(56,7)	0,905	0,342
rs561623	T/G	53(28,5)	133(71,5)	781(30,2)	1805(69,8)	0,240	0,624
rs7088441	G/A	84(43,7)	108(56,3)	1183(45,5)	1415(54,5)	0,230	0,632
rs1576986	C/A	53(27,3)	141(72,7)	705(27,1)	1899(72,9)	0,006	0,941
rs1923565	C/G	73(38,4)	117(61,6)	898(34,9)	1672(65,1)	0,939	0,333
rs4474379	G/A	58(29,9)	136(70,1)	781(29,9)	1829(70,1)	0,000	0,994
rs12763193	T/C	89(46,8)	101(53,2)	1234(47,4)	1368(52,6)	0,024	0,877
rs2295933	A/G	56(29,2)	136(70,8)	760(29,1)	1852(70,9)	0,000	0,984

5 Ergebnisse

Bei Betrachtung des Gesamttallels zeigte sich für Locus rs6584471 das häufigere A-Allel signifikant öfter in der erkrankten Untergruppe (63,5%) als bei den Kontrollen (55,7%) (p-Wert 0,034). Einen Trend zur Signifikanz erwies der Marker rs2622807 auf, wonach das seltenere T-Allel häufiger bei den Erkrankten vorkam (p-Wert 0,097), sowie der Marker rs635481, bei dem eine Häufung des selteneren C-Allels in der Untergruppe der Schizophreniepatienten nachgewiesen wurde (p-Wert 0,088).

5.1.4.3 Analyse der Polymorphismen bei Schizophreniepatienten mit an Schizophrenie erkrankten Familienangehörigen

Die Anzahl der Patienten der nächsten Untergruppe betrug 147, wobei 61,2% männlich und 38,8% weiblich waren. Das Alter der Patienten variierte von 18 bis 67 Jahren mit einem Medianwert von 38,5 Jahren (Standardabweichung 11,42). 44,9% dieser Untergruppe erreichten den Hauptschulabschluss, 21,8% die mittlere Reife und 33,3% das Abitur als höchsten Schulabschluss.

Zuerst wurde wieder die Genotypisierung vorgenommen (vgl. Tabelle 5-10).

Tabelle 5-10: Genotypverteilung der 20 SNPs bei den Schizophreniepatienten mit an Schizophrenie erkrankten Familienangehörigen im Vergleich zu gesunden Kontrollen

SNP	Allel 1/2	Patienten			Kontrollen			χ^2	P
		A1A1 (%)	A1A2 (%)	A2A2 (%)	A1A1 (%)	A1A2 (%)	A2A2 (%)		
rs6584471	G/A	21(14,4)	69(47,3)	56(38,3)	265(20,3)	626(48,0)	413(31,7)	4,177	0,124
rs2207768	G/A	8(5,5)	56(38,4)	82(56,1)	102(7,9)	520(40,1)	674(52,0)	1,519	0,468
rs12569561	C/T	25(17,6)	72(50,7)	45(31,7)	269(20,8)	619(47,9)	403(31,3)	0,862	0,650
rs11595793	G/C	26(19,1)	64(47,1)	46(33,8)	212(17,0)	603(48,3)	433(34,7)	0,391	0,823
rs1336290	C/T	23(15,8)	69(47,3)	54(36,9)	181(13,9)	605(46,3)	520(39,8)	0,626	0,731
rs722982	C/T	18(12,3)	72(49,3)	56(38,4)	140(10,8)	554(42,7)	604(46,5)	3,538	0,171
rs2622807	T/C	18(12,6)	61(42,7)	64(44,7)	119(9,2)	557(43,0)	618(47,8)	1,803	0,406
rs635481	C/T	18(12,2)	58(39,5)	71(48,3)	105(8,1)	553(42,4)	646(49,5)	3,054	0,217
rs2881886	G/A	25(17,1)	60(41,1)	61(41,8)	142(12,0)	545(45,9)	500(42,1)	3,432	0,180
rs2820108	A/C	28(19,0)	78(53,1)	41(27,9)	259(21,5)	565(47,0)	379(31,5)	1,951	0,377
rs2065537	A/G	24(16,3)	79(53,7)	44(30,0)	236(18,3)	623(48,2)	433(33,5)	1,611	0,447
rs715687	G/A	14(9,9)	65(45,8)	63(44,3)	160(12,5)	555(43,6)	559(43,9)	0,907	0,635
rs168199	G/T	27(18,9)	74(51,7)	42(29,4)	274(21,1)	677(52,1)	348(26,8)	0,623	0,733
rs561623	T/G	11(7,7)	62(43,7)	69(48,6)	118(9,1)	545(42,2)	630(48,7)	0,341	0,844
rs7088441	G/A	28(19,2)	75(51,4)	43(29,4)	262(20,2)	659(50,7)	378(29,1)	0,080	0,961
rs1576986	C/A	6(4,1)	62(42,2)	79(53,7)	106(8,1)	493(37,9)	703(54,0)	3,459	0,177
rs1923565	C/G	20(13,8)	64(44,1)	61(42,1)	148(11,5)	602(46,8)	535(41,7)	0,768	0,675
rs4474379	G/A	13(8,8)	56(38,1)	78(53,1)	110(8,4)	561(43,0)	634(48,6)	1,312	0,519
rs12763193	T/C	36(24,8)	72(49,7)	37(25,5)	290(22,3)	654(50,3)	357(27,4)	0,559	0,756
rs2295933	A/G	12(8,2)	54(37,0)	80(54,8)	108(8,3)	544(41,6)	654(50,1)	1,273	0,529

Die Genotypen unterteilen sich entweder in Träger von Allel1/Allel1, Allel1/Allel2 oder Allel2/Allel2

5 Ergebnisse

Bei Betrachtung der Genotypverteilung von den Schizophreniepatienten, welche in der Familie ebenso Schizophreniepatienten hatten, zeigten sich im Vergleich zu den gesunden Kontrollen keine signifikanten Assoziationen.

Als nächstes wurde geprüft, ob bei den einzelnen SNPs Träger des selteneren Allels 1 (Allel1/Allel1 und Allel1/Allel2) häufiger oder seltener im Vergleich zu Nicht-Trägern von Allel 1 (Allel2/Allel2) vorkamen (vgl. Tabelle 5-11).

Tabelle 5-11: Genotypverteilung nach dem dominanten Modell

SNP	Allel 1/2	Patienten		Kontrollen		χ^2	p-Wert
		A1A1 + A1A2(%)	A2A2(%)	A1A1 + A1A2(%)	A2A2(%)		
rs6584471	G/A	90(61,7)	56(38,3)	891(68,3)	413(31,7)	2,681	0,102
rs2207768	G/A	64(43,9)	82(56,1)	622(48,0)	674(52,0)	0,910	0,340
rs12569561	C/T	97(68,3)	45(31,7)	888(68,7)	403(31,3)	0,013	0,908
rs11595793	G/C	90(66,2)	46(33,8)	815(65,3)	433(34,7)	0,041	0,839
rs1336290	C/T	92(63,1)	54(36,9)	786(60,2)	520(39,8)	0,440	0,507
rs722982	C/T	90(61,6)	56(38,4)	694(53,5)	604(46,5)	3,536	0,060
rs2622807	T/C	79(55,3)	64(44,7)	676(52,2)	618(47,8)	0,466	0,495
rs635481	C/T	76(51,7)	71(48,3)	658(50,5)	646(49,5)	0,081	0,776
rs2881886	G/A	85(58,2)	61(41,8)	687(57,9)	500(42,1)	0,006	0,937
rs2820108	A/C	106(72,1)	41(27,9)	824(68,5)	379(31,5)	0,798	0,372
rs2065537	A/G	103(70,0)	44(30,0)	859(66,5)	433(33,5)	0,764	0,382
rs715687	G/A	79(55,7)	63(44,3)	715(56,1)	559(43,9)	0,012	0,911
rs168199	G/T	101(70,6)	42(29,4)	951(73,2)	348(26,8)	0,435	0,510
rs561623	T/G	73(51,4)	69(48,6)	663(51,3)	630(48,7)	0,001	0,976
rs7088441	G/A	103(70,6)	43(29,4)	921(70,9)	378(29,1)	0,008	0,929
rs1576986	C/A	68(46,3)	79(53,7)	599(46,0)	703(54,0)	0,003	0,954
rs1923565	C/G	84(57,9)	61(42,1)	750(58,3)	535(41,7)	0,010	0,920
rs4474379	G/A	69(46,9)	78(53,1)	671(51,4)	634(48,6)	1,061	0,303
rs12763193	T/C	108(74,5)	37(25,5)	944(72,6)	357(27,4)	0,243	0,622
rs2295933	A/G	66(45,2)	80(54,8)	652(49,9)	654(50,1)	1,169	0,280

Verteilung der Träger des selteneren Allels 1 (A1A1 + A1A2) versus Nicht-Träger von Allel 1 (A2A2) bei Schizophreniepatienten mit an Schizophrenie erkrankten Familienangehörigen im Vergleich zu gesunden Kontrollen

Hierbei zeigte sich bei Marker rs722982 ein Trend zur Signifikanz, wonach Träger des selteneren C-Allels häufiger in der Untergruppe Schizophreniepatienten zu finden waren (p-Wert 0,060).

Nachfolgend wurden die Träger des häufigeren Allels 2 (Allel2/Allel2 und Allel1/Allel2) mit den Nicht-Trägern von Allel 2 (Allel1/Allel1) verglichen (vgl. Tabelle 5-12).

Tabelle 5-12: Genotypverteilung nach dem rezessiven Modell

SNP	Allel 1/2	Patienten		Kontrollen		χ^2	p-Wert
		A2A2 + A1A2(%)	A1A1(%)	A2A2 + A1A2(%)	A1A1(%)		
rs6584471	G/A	125(85,6)	21(14,4)	1039(79,7)	265(20,3)	2,924	0,087
rs2207768	G/A	138(94,5)	8(5,5)	1194(92,1)	102(7,9)	1,065	0,302
rs12569561	C/T	117(82,4)	25(17,6)	1022(79,2)	269(20,8)	0,819	0,366
rs11595793	G/C	110(80,9)	26(19,1)	1036(83,0)	212(17,0)	0,391	0,532
rs1336290	C/T	123(84,2)	23(15,8)	1125(86,1)	181(13,9)	0,390	0,532
rs722982	C/T	128(87,7)	18(12,3)	1158(89,2)	140(10,8)	0,321	0,571
rs2622807	T/C	125(87,4)	18(12,6)	1175(90,8)	119(9,2)	1,717	0,190
rs635481	C/T	129(87,8)	18(12,2)	1199(91,9)	105(8,1)	2,993	0,084
rs2881886	G/A	121(82,9)	25(17,1)	1045(88,0)	142(12,0)	3,159	0,076
rs2820108	A/C	119(81,0)	28(19,0)	944(78,5)	259(21,5)	0,482	0,488
rs2065537	A/G	123(83,7)	24(16,3)	1056(81,7)	236(18,3)	0,336	0,563
rs715687	G/A	128(90,1)	14(9,9)	1114(87,5)	160(12,5)	0,864	0,353
rs168199	G/T	116(81,1)	27(18,9)	1025(78,9)	274(21,1)	0,382	0,537
rs561623	T/G	131(92,3)	11(7,7)	1175(90,9)	118(9,1)	0,298	0,585
rs7088441	G/A	118(80,8)	28(19,2)	1037(79,8)	262(20,2)	0,080	0,777
rs1576986	C/A	141(95,9)	6(4,1)	1196(91,9)	106(8,1)	3,052	0,081
rs1923565	C/G	125(86,2)	20(13,8)	1137(88,5)	148(11,5)	0,651	0,420
rs4474379	G/A	134(91,2)	13(8,8)	1195(91,6)	110(8,4)	0,029	0,864
rs12763193	T/C	109(75,2)	36(24,8)	1011(77,7)	290(22,3)	0,481	0,488
rs2295933	A/G	134(91,8)	12(8,2)	1198(91,7)	108(8,3)	0,000	0,983

Verteilung der Träger des häufigeren Allels 2 (A2A2 + A1A2) versus Nicht-Träger von Allel 2 (A1A1) bei Schizophreniepatienten mit an Schizophrenie erkrankten Familienangehörigen im Vergleich zu gesunden Kontrollen

Es zeigte sich bei folgenden SNPs ein Trend zur Signifikanz: bei Marker rs6584471 kam das häufigere A-Allel öfter in der Subgruppe Erkrankter vor (p-Wert 0,087); bei Marker rs635481 fand sich das häufigere T-Allel seltener in der erkrankten Subgruppe (p-Wert 0,084); bei Marker rs2881886 ließ sich das häufigere A-Allel ebenso seltener in der Untergruppe finden (p-Wert 0,076); bei Marker rs1576986 kam das häufigere A-Allel öfter in der Subgruppe Erkrankter vor (p-Wert 0,081).

Die Verteilung der Allele der beiden Kohorten Schizophreniepatienten mit an Schizophrenie Erkrankten in der Familie und gesunde Probanden wurde als nächstes untersucht. Die Zahlen der Allele entsprechen dem diploiden Chromosomensatz (vgl. Tabelle 5-13).

Der Marker rs6584471 stellte sich mit einem als signifikant assoziiert mit der Erkrankung heraus; die Subgruppe der Schizophreniepatienten wies das häufigere A-Allel öfter auf (62,0%) als die Kontrollgruppe (55,7%) (p-Wert 0,039).

Der Marker rs722982 zeigte einen Trend zur Signifikanz, wobei in der Untergruppe der Erkrankten das seltenere C-Allel häufiger vorkam (p-Wert 0,093).

Tabelle 5-13: Allelverteilung bei Schizophreniepatienten mit an Schizophrenie erkrankten Familienangehörigen, im Vergleich zu Kontrollprobanden

SNP	Allel 1/2	Patienten		Kontrollen		χ^2	p- Wert
		Allel 1 (%)	Allel 2 (%)	Allel 1 (%)	Allel 2 (%)		
rs6584471	G/A	111(38,0)	181(62,0)	1156(44,4)	1452(55,6)	4,252	0,039
rs2207768	G/A	72(24,7)	220(75,3)	724(27,9)	1868(72,1)	1,408	0,235
rs12569561	C/T	122(43,0)	162(57,0)	1157(44,8)	1425(55,2)	0,355	0,551
rs11595793	G/C	116(42,6)	156(57,4)	1027(41,1)	1469(58,9)	0,228	0,633
rs1336290	C/T	115(39,4)	177(60,6)	967(37,0)	1645(63,0)	0,627	0,429
rs722982	C/T	108(37,0)	184(63,0)	834(32,1)	1762(67,9)	2,821	0,093
rs2622807	T/C	97(33,9)	189(66,1)	795(30,7)	1793(69,3)	1,230	0,267
rs635481	C/T	94(32,0)	200(68,0)	763(29,3)	1845(70,7)	0,937	0,333
rs2881886	G/A	110(37,7)	182(62,3)	829(34,9)	1545(65,1)	0,863	0,353
rs2820108	A/C	134(45,6)	160(54,4)	1083(45,0)	1323(55,0)	0,034	0,854
rs2065537	A/G	127(43,2)	167(56,8)	1095(42,4)	1489(57,6)	0,073	0,787
rs715687	G/A	93(32,7)	191(67,3)	875(34,3)	1673(65,7)	0,289	0,591
rs168199	G/T	128(44,8)	158(55,2)	1225(43,3)	1373(56,7)	0,594	0,441
rs561623	T/G	84(29,6)	200(70,4)	781(30,2)	1805(69,8)	0,047	0,828
rs7088441	G/A	131(44,9)	161(55,1)	1183(45,5)	1415(54,5)	0,048	0,827
rs1576986	C/A	74(25,2)	220(74,8)	705(27,1)	1899(72,9)	0,487	0,485
rs1923565	C/G	104(35,9)	186(64,1)	898(34,9)	1672(65,1)	0,097	0,756
rs4474379	G/A	82(27,9)	212(72,1)	781(29,9)	1829(70,1)	0,523	0,470
rs12763193	T/C	144(49,7)	146(50,3)	1234(47,4)	1368(52,6)	0,520	0,471
rs2295933	A/G	78(26,7)	214(73,3)	760(29,1)	1852(70,9)	0,727	0,394

5.1.4.4 Analyse der Polymorphismen bei Schizophreniepatienten mit psychiatrisch erkrankten Familienangehörigen

Die Anzahl der Patienten der folgenden Untergruppe betrug 374, wovon 64,2% männlich und 35,8% weiblich waren. Das Alter der Patienten lag zwischen 17 und 70 Jahren mit einem Median bei 37,9 Jahren (Standardabweichung 11,15). 42,5% der Patienten erreichten als höchsten Schulabschluss die Hauptschulreife, 23,5% die Realschulreife und 34,0% das Abitur.

Nachfolgend wurde die Genotypverteilung von Schizophreniepatienten mit Familienangehörigen, die an einer psychiatrischen Erkrankung litten, und von gesunden Kontrollen miteinander verglichen (vgl. Tabelle 5-14).

Es zeigte sich ein Trend zur Signifikanz bei folgenden Markern: bei SNP rs2622807 fand sich der Genotyp TT häufiger in der Untergruppe Erkrankter (p-Wert 0,067); bei Marker rs635481 war der Genotyp CC häufiger in der erkrankten Subgruppe anzutreffen (p-Wert 0,079); bei

5 Ergebnisse

Marker rs2820108 wurde der Genotyp AA häufiger in der Untergruppe der Erkrankten nachgewiesen (p-Wert 0,095).

Tabelle 5-14: Genotypverteilung bei den Schizophreniepatienten mit psychiatrisch erkrankten Familienangehörigen im Vergleich zu gesunden Kontrollen

SNP	Allel 1/2	Patienten			Kontrollen			χ^2	p
		A1A1 (%)	A1A2 (%)	A2A2 (%)	A1A1 (%)	A1A2 (%)	A2A2 (%)		
rs6584471	G/A	64(17,4)	187(50,8)	117(31,8)	265(20,3)	626(48,0)	413(31,7)	1,720	0,423
rs2207768	G/A	19(5,1)	153(41,5)	197(53,4)	102(7,9)	520(40,1)	674(52,0)	3,159	0,206
rs12569561	C/T	77(21,3)	178(49,3)	106(29,4)	269(20,8)	619(47,9)	403(31,3)	0,455	0,796
rs11595793	G/C	65(19,0)	167(48,7)	111(32,3)	212(17,0)	603(48,3)	433(34,7)	1,032	0,597
rs1336290	C/T	56(15,0)	174(46,8)	142(38,2)	181(13,9)	605(46,3)	520(39,8)	0,504	0,777
rs722982	C/T	47(12,7)	167(45,0)	157(42,3)	140(10,8)	554(42,7)	604(46,5)	2,400	0,301
rs2622807	T/C	48(13,3)	154(42,5)	160(44,2)	119(9,2)	557(43,0)	618(47,8)	5,411	0,067
rs635481	C/T	44(11,8)	154(41,3)	175(46,9)	105(8,1)	553(42,4)	646(49,5)	5,070	0,079
rs2881886	G/A	50(13,7)	163(44,8)	151(41,5)	142(12,0)	545(45,9)	500(42,1)	0,813	0,666
rs2820108	A/C	86(23,6)	185(50,8)	93(25,6)	259(21,5)	565(47,0)	379(31,5)	4,717	0,095
rs2065537	A/G	71(19,3)	179(48,6)	118(32,1)	236(18,3)	623(48,2)	433(33,5)	0,355	0,837
rs715687	G/A	45(12,4)	158(43,8)	158(43,8)	160(12,5)	555(43,6)	559(43,9)	0,005	0,997
rs168199	G/T	83(22,7)	192(52,6)	90(24,7)	274(21,1)	677(52,1)	348(26,8)	0,865	0,649
rs561623	T/G	35(9,6)	164(45,1)	165(45,3)	118(9,1)	545(42,2)	630(48,7)	1,316	0,518
rs7088441	G/A	83(22,3)	196(52,7)	93(25,0)	262(20,2)	659(50,7)	378(29,1)	2,583	0,275
rs1576986	C/A	24(6,5)	147(39,6)	200(53,9)	106(8,1)	493(37,9)	703(54,0)	1,273	0,529
rs1923565	C/G	54(14,7)	154(41,8)	160(43,5)	148(11,5)	602(46,8)	535(41,7)	4,128	0,127
rs4474379	G/A	35(9,4)	143(38,3)	195(52,3)	110(8,4)	561(43,0)	634(48,6)	2,603	0,272
rs12763193	T/C	87(23,5)	186(50,1)	98(26,4)	290(22,3)	654(50,3)	357(27,4)	0,285	0,867
rs2295933	A/G	33(8,9)	143(38,4)	196(52,7)	108(8,3)	544(41,6)	654(50,1)	1,245	0,537

Die Genotypen unterteilen sich entweder in Träger von Allel1/Allel1, Allel1/Allel2 oder Allel2/Allel2

Nachfolgend wurden die Träger des selteneren Allels 1 (Allel1/Allel1 und Allel1/Allel2) den Nicht-Trägern von Allel 1 (Allel2/Allel2) gegenübergestellt (vgl. Tabelle 5-15).

Der Marker rs2820108 zeigte eine signifikante Assoziation zur Schizophrenie, wonach Schizophreniepatienten mit Familienmitgliedern, welche an psychiatrischen Erkrankungen litten, häufiger das seltenere Allel A (74,4%) trugen als gesunde Probanden (68,5%) (p-Wert 0,030).

Dieselbe Berechnung wurde für das häufigere Allel 2 vorgenommen: Träger des Allels 2 (Allel2/Allel2 und Allel1/Allel2) wurden Nicht-Träger von Allel 2 (Allel1/Allel1) gegenübergestellt (vgl. Tabelle 5-16).

Zwei Marker deuteten signifikant auf eine Assoziation mit der Erkrankung Schizophrenie hin. Bei SNP rs2622807 war bei Schizophreniekranken mit positiver Familienanamnese bezüglich psychiatrisch Erkrankter das häufigere C-Allel seltener anzutreffen (86,7%) als bei gesunden Probanden (90,8%) (p-Wert 0,023).

5 Ergebnisse

Tabelle 5-15: Genotypverteilung nach dem dominanten Modell

SNP	Allel 1/2	Patienten		Kontrollen		χ^2	p-Wert
		A1A1 + A1A2(%)	A2A2(%)	A1A1 + A1A2(%)	A2A2(%)		
rs6584471	G/A	251(68,2)	117(31,8)	891(68,3)	413(31,7)	0,002	0,965
rs2207768	G/A	172(46,6)	197(53,4)	622(48,0)	674(52,0)	0,220	0,639
rs12569561	C/T	255(70,6)	106(29,4)	888(68,7)	403(31,3)	0,455	0,500
rs11595793	G/C	232(67,7)	111(32,3)	815(65,3)	433(34,7)	0,651	0,420
rs1336290	C/T	230(61,8)	142(38,2)	786(60,2)	520(39,8)	0,328	0,567
rs722982	C/T	214(57,7)	157(42,3)	694(53,5)	604(46,5)	2,067	0,151
rs2622807	T/C	202(55,8)	160(44,2)	676(52,2)	618(47,8)	1,439	0,230
rs635481	C/T	198(53,1)	175(46,9)	658(50,5)	646(49,5)	0,799	0,372
rs2881886	G/A	213(58,5)	151(41,5)	687(57,9)	500(42,1)	0,047	0,829
rs2820108	A/C	271(74,4)	93(25,6)	824(68,5)	379(31,5)	4,708	0,030
rs2065537	A/G	250(67,9)	118(32,1)	859(66,5)	433(33,5)	0,271	0,603
rs715687	G/A	203(56,2)	158(43,8)	715(56,1)	559(43,9)	0,001	0,970
rs168199	G/T	275(75,3)	90(24,7)	951(73,2)	348(26,8)	0,668	0,414
rs561623	T/G	199(54,7)	165(45,3)	663(51,3)	630(48,7)	1,311	0,252
rs7088441	G/A	279(75,0)	93(25,0)	921(70,9)	378(29,1)	2,401	0,121
rs1576986	C/A	171(46,1)	200(53,9)	599(46,0)	703(54,0)	0,001	0,977
rs1923565	C/G	208(56,5)	160(43,5)	750(58,3)	535(41,7)	0,399	0,528
rs4474379	G/A	178(47,7)	195(52,3)	671(51,4)	634(48,6)	1,586	0,208
rs12763193	T/C	273(73,6)	98(26,4)	944(72,6)	357(27,4)	0,153	0,696
rs2295933	A/G	176(47,3)	196(52,7)	652(49,9)	654(50,1)	0,790	0,374

Verteilung der Träger des selteneren Allels 1 (A1A1 + A1A2) versus Nicht-Träger von Allel 1 (A2A2) bei den Schizophreniepatienten mit psychiatrischen erkrankten Familienangehörigen im Vergleich zu gesunden Kontrollen

Tabelle 5-16: Genotypverteilung nach dem rezessiven Modell

SNP	Allel 1/2	Patienten		Kontrollen		χ^2	p-Wert
		A2A2 + A1A2(%)	A1A1(%)	A2A2 + A1A2(%)	A1A1(%)		
rs6584471	G/A	304(82,6)	64(17,4)	1039(79,7)	265(20,3)	1,560	0,212
rs2207768	G/A	350(94,9)	19(5,1)	1194(92,1)	102(7,9)	3,156	0,076
rs12569561	C/T	284(78,7)	77(21,3)	1022(79,2)	269(20,8)	0,041	0,839
rs11595793	G/C	278(81,0)	65(19,0)	1036(83,0)	212(17,0)	0,721	0,396
rs1336290	C/T	316(85,0)	56(15,0)	1125(86,1)	181(13,9)	0,341	0,559
rs722982	C/T	324(87,3)	47(12,7)	1158(89,2)	140(10,8)	1,028	0,311
rs2622807	T/C	314(86,7)	48(13,3)	1175(90,8)	119(9,2)	5,151	0,023
rs635481	C/T	329(88,2)	44(11,8)	1199(91,9)	105(8,1)	5,022	0,025
rs2881886	G/A	314(86,3)	50(13,7)	1045(88,0)	142(12,0)	0,808	0,369
rs2820108	A/C	278(76,4)	86(23,6)	944(78,5)	259(21,5)	0,716	0,398
rs2065537	A/G	297(80,7)	71(19,3)	1056(81,7)	236(18,3)	0,201	0,654
rs715687	G/A	316(87,6)	45(12,4)	1114(87,5)	160(12,5)	0,002	0,962
rs168199	G/T	282(77,3)	83(22,7)	1025(78,9)	274(21,1)	0,458	0,498
rs561623	T/G	329(90,4)	35(9,6)	1175(90,9)	118(9,1)	0,081	0,776
rs7088441	G/A	289(77,7)	83(22,3)	1037(79,8)	262(20,2)	0,810	0,368
rs1576986	C/A	347(93,5)	24(6,5)	1196(91,9)	106(8,1)	1,127	0,289
rs1923565	C/G	314(85,3)	54(14,7)	1137(88,5)	148(11,5)	2,657	0,103
rs4474379	G/A	338(90,6)	35(9,4)	1195(91,6)	110(8,4)	0,335	0,563
rs12763193	T/C	284(76,5)	87(23,5)	1011(77,7)	290(22,3)	0,222	0,637
rs2295933	A/G	339(91,1)	33(8,9)	1198(91,7)	108(8,3)	0,136	0,721

Verteilung der Träger des häufigeren Allels 2 (A2A2 + A1A2) versus Nicht-Träger von Allel 2 (A1A1) bei Schizophreniepatienten mit an Schizophrenie erkrankten Familienangehörigen im Vergleich zu gesunden Kontrollen

5 Ergebnisse

Auch bei SNP rs635481 zeigte sich in der Subgruppe das häufigere T-Allel seltener (88,2%) als bei der Kontrollgruppe (91,9%) (p-Wert 0,025). Der Marker 2207768 zeigte sich ein Trend zur Signifikanz, indem das häufigere A-Allel häufiger in der erkrankten Untergruppe anzutreffen war (p-Wert 0,076).

Anschließend wurde das Gesamttel betrachtet und mit der gesunden Probandengruppe verglichen (vgl. Tabelle 5-17). Die Zahlen der Allele entsprechen dem diploiden Chromosomensatz.

Tabelle 5-17: Allelverteilung bei Schizophreniepatienten mit psychiatrisch erkrankten Familienangehörigen im Vergleich zu Kontrollprobanden

SNP	Allel 1/2	Patienten		Kontrollen		χ^2	p-Wert
		Allel 1 (%)	Allel 2 (%)	Allel 1 (%)	Allel 2 (%)		
rs6584471	G/A	315(42,8)	421(57,2)	1156(44,4)	1452(55,6)	0,543	0,461
rs2207768	G/A	191(25,9)	547(74,1)	724(27,9)	1868(72,1)	1,213	0,271
rs12569561	C/T	332(46,0)	390(54,0)	1157(44,8)	1425(55,2)	0,314	0,575
rs11595793	G/C	297(43,3)	389(56,7)	1027(41,1)	1469(58,9)	1,022	0,312
rs1336290	C/T	286(38,4)	458(61,6)	967(37,0)	1645(63,0)	0,499	0,480
rs722982	C/T	261(35,2)	481(64,8)	834(32,1)	1762(67,8)	2,433	0,119
rs2622807	T/C	250(34,5)	474(65,5)	795(30,7)	1793(69,3)	3,806	0,051
rs635481	C/T	242(32,4)	504(67,6)	763(29,3)	1845(70,7)	2,801	0,094
rs2881886	G/A	263(36,1)	465(63,9)	829(34,9)	1545(65,1)	0,356	0,551
rs2820108	A/C	357(49,0)	371(51,0)	1083(45,0)	1323(55,0)	3,648	0,056
rs2065537	A/G	321(43,1)	415(56,9)	1095(42,4)	1489(57,6)	0,359	0,549
rs715687	G/A	248(34,3)	474(65,7)	875(34,3)	1673(65,7)	0,000	0,997
rs168199	G/T	358(49,0)	372(51,0)	1225(43,3)	1373(56,7)	0,816	0,366
rs561623	T/G	234(32,1)	494(67,9)	781(30,2)	1805(69,8)	1,008	0,315
rs7088441	G/A	362(48,6)	382(51,4)	1183(45,5)	1415(54,5)	2,266	0,132
rs1576986	C/A	195(26,3)	547(73,7)	705(27,1)	1899(72,9)	0,185	0,667
rs1923565	C/G	262(35,6)	474(64,4)	898(34,9)	1672(65,1)	0,108	0,742
rs4474379	G/A	213(28,6)	533(71,4)	781(29,9)	1829(70,1)	0,523	0,470
rs12763193	T/C	360(48,5)	382(51,5)	1234(47,4)	1368(52,6)	0,276	0,599
rs2295933	A/G	209(28,1)	535(71,9)	760(29,1)	1852(70,9)	0,285	0,594

Es zeigten sich Tendenzen zur Signifikanz bei folgenden Markern: SNP rs2622807 wies das seltenere T-Allel häufiger in der erkrankten Untergruppe auf (p-Wert 0,051), auch SNP rs635481 zeigte das seltenere C-Allel häufiger in der Untergruppe (p-Wert 0,094), und dasselbe war bei Marker rs2820108 in Bezug auf das seltenere A-Allel zu vermerken (p-Wert 0,056).

5.1.5 Haplotyp-Blockstruktur in NRG3

5.1.5.1 Analyse der Haplotypen in NRG3

Liegen bestimmte Allele eines Gens dicht beieinander, können sie in einem LD stehen, welches sich in Form eines Haploblocks darstellen lässt. Die Anzahl an Polymorphismen, die in einem solchen Haploblock auftreten, ist gering. Dies ermöglicht das sichere Auseinanderhalten der verschiedenen Blöcke.

Die in dieser Arbeit analysierten 20 Marker wurden paarweise auf Vorhandensein eines LD in der Gesamtstichprobe (Gesamtgruppe der Patienten *versus* Gesamtgruppe der Kontrollen) geprüft. Dabei wurden vier Haploblöcke identifiziert (vgl. Abbildung 5-2).

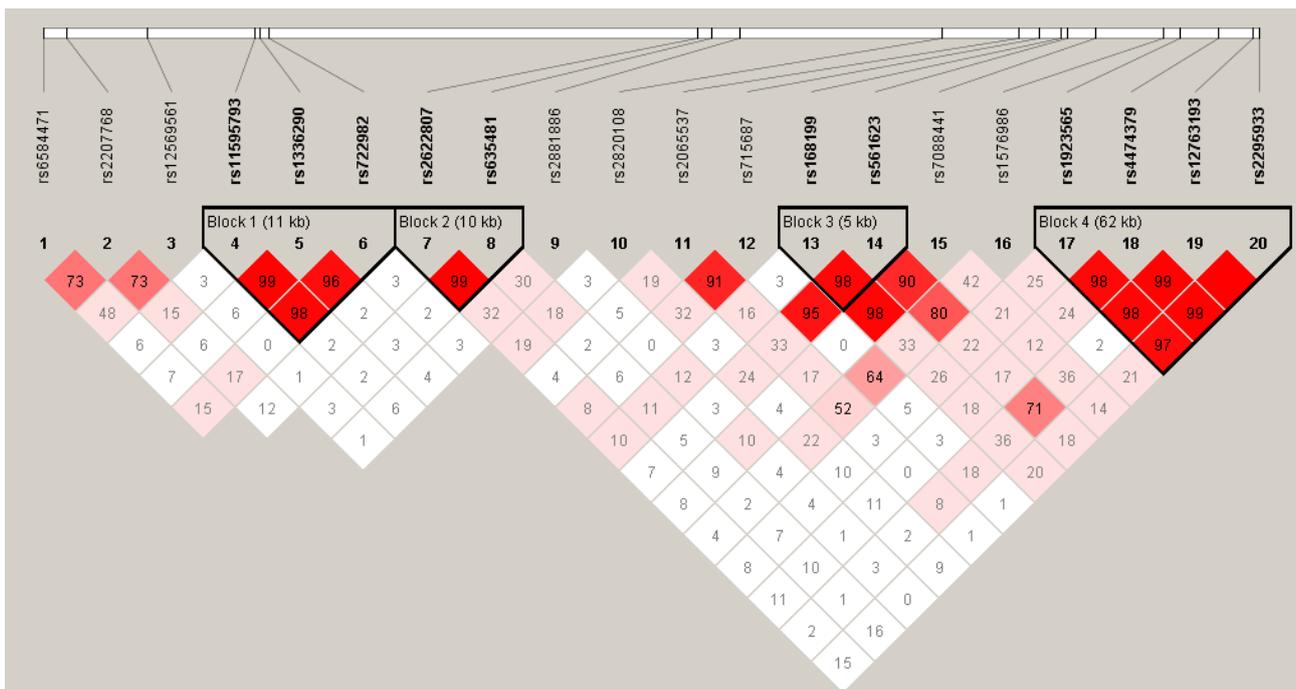


Abbildung 5-2: Darstellung der Haplotyp-Blöcke der untersuchten Marker. Die SNPs in den Blöcken 1 bis 4 stehen im Kopplungsungleichgewicht.

Der Haploblock 1 umfasst 11 kb und liegt im Intron 3 des NRG3-Gens. Haploblock 2 ist 10 kb groß und liegt im großen Intron 4. Intron 5 beinhaltet den 5 kb großen Haploblock 3. Block 4 ist mit 62 kb der größte der in dieser Arbeit untersuchten Blöcke im NRG3-Gen. Er beginnt im Intron 6, reicht über die Exons und Introns 7, 8, 9 und 10 und endet im Exon 11.

5 Ergebnisse

Block 4 enthält mit rs2295933 den einzigen hier untersuchten kodierenden SNP. Der Marker rs2295933 führt zu einem Basenaustausch, aber keinem Aminosäureaustausch (Serin → Serin). Gemäß dem degenerierten Code besitzt nicht jeder Allelwechsel eine funktionelle Konsequenz.

5.1.5.2 Analyse der Haplotypen auf eine Assoziation mit Schizophrenie

Nachfolgend wurden die Haplotyp-Blöcke auf die Fragestellung hin untersucht, ob bestimmte Haplotypen vermehrt bei Schizophreniepatienten vorkamen. Ein solches überzufälliges Vorkommen würde für die gemeinsame Vererbung mit der Erkrankung Schizophrenie sprechen (vgl. Tabelle 5-18).

Tabelle 5-18: Geschätzte Haplotypfrequenzen bei Schizophreniepatienten und Kontrollen.

SNP	Haplotyp	Frequenz	Score	sim. p-Wert
Block 1: rs11595793, rs1336290, rs722982	CTT	0,580	-0,794	0,438
	GCC	0,317	1,052	0,301
	GCT	0,050	-1,299	0,223
	GTT	0,045	0,866	0,447
Block 2: rs2622807, rs635481	CT	0,678	-2,600	0,008
	TC	0,305	2,337	0,015
	TT	0,017	1,184	0,206
Block 3: rs168199, rs561623	TG	0,526	-0,775	0,440
	GT	0,303	1,182	0,239
	GG	0,169	-0,453	0,617
Block 4: rs1923565, rs4474379, rs12763193, rs2295933	GATG	0,476	0,061	0,937
	CGCA	0,284	0,130	0,912
	GACG	0,164	-0,577	0,566
	CACG	0,058	0,581	0,549

(sim. p-Wert = simulierter p-Wert)

Bei Haplotyp-Block 2 (Marker rs2622807 und rs635481) zeigte sich eine signifikante Assoziation bei den Allelkombinationen CT (p-Wert 0,008) und TC (p-Wert 0,015) mit der Erkrankung Schizophrenie. Das Allelpaar CT kam bei Schizophreniepatienten signifikant seltener vor und Allelpaar TC entsprechend signifikant häufiger. Bei den anderen Haploblöcken zeigte sich kein signifikanter Zusammenhang.

5.2 Zusammenfassende Darstellung der Ergebnisse

In der vorliegenden Fall-Kontroll-Assoziationsstudie wurden signifikante Assoziationen zwischen einzelnen Markern des NRG3-Gens und der Schizophrenie nachgewiesen. Dabei variierten die signifikanten SNPs je nachdem, ob die Gesamtgruppe der Schizophreniepatienten oder einzelne Untergruppen mit der Kontrollgruppe verglichen wurden. Die Ergebnisse werden nochmals in Reihenfolge ihrer Genlokalisierung aufgelistet. Tabelle 5-19 fasst die Resultate abschließend zusammen, Abbildung 5-2 zeigt graphisch die Genotypverteilung in den 4 Patientengruppen.

Ergebnisse der Gesamtgruppe der Schizophreniepatienten:

- Bei Marker rs2207768 im Intron 2 zeigten sich Träger des häufigeren A-Allels unter den Schizophreniekranken tendenziell öfter (p-Wert 0,061).
- SNP rs2622807, dem am weitesten in 5'-Richtung des Introns 4 gelegenen SNP, der hier untersucht wurde, zeigte eine signifikante Assoziation des selteneren T-Allels zur Erkrankung. Sowohl der Genotyp TT (p-Wert 0,023) als auch Träger des T-Allels (p-Wert 0,033) fanden sich häufiger unter den Schizophreniepatienten. Signifikant seltener kamen Träger des häufigeren C-Allels vor (p-Wert 0,021). Bei Betrachtung der Allelverteilung war das T-Allel ebenso bei den Schizophreniepatienten erhöht (p-Wert 0,007).
- Bei Marker rs635481, ebenfalls in Intron 4 gelegen, erwies sich ein gehäuftes Auftreten des selteneren C-Allels bei den Patienten. Der Genotyp CC war unter den Schizophreniepatienten signifikant häufiger (p-Wert 0,034), ebenso war bei der Allelverteilung das C-Allel signifikant häufiger vertreten (p-Wert 0,016). Träger des häufigeren T-Allels fanden sich bei Schizophreniepatienten signifikant seltener (p-Wert 0,019), Träger des selteneren C-Allels waren bei Schizophreniepatienten tendenziell häufiger (p-Wert 0,076) anzutreffen.
- Bei SNP rs2820108 in Intron 4 erwies sich bei Betrachtung des selteneren A-Allels die Trägerschaft bei Schizophreniepatienten signifikant erhöht (p-Wert 0,046), und in der Allelverteilung zeigte sich ein Trend zur Signifikanz, wonach das A-Allel seltener unter den Schizophreniekranken zu finden war (p-Wert 0,057).

5 Ergebnisse

Ergebnisse der Untergruppe Schizophreniepatienten mit erstgradig verwandten Schizophreniepatienten:

- Bei dem im Intron 2 befindlichen Marker rs6584471 zeigten die Träger des häufigeren A-Allels signifikant öfter unter den Schizophreniekranken (p-Wert 0,018), ebenso war in der Allelverteilung das A-Allel häufiger unter den Erkrankten vertreten (p-Wert 0,034), und auch in der Genotypverteilung zeigte sich ein Tendenz zur Signifikanz (p-Wert 0,057) für ein häufigeres Auftreten des A-Allels bei den Erkrankten.
- In der Allelverteilung des SNPs rs2622807, der sich in Intron 4 befindet und bereits in der Gesamtstichprobe eine signifikante Assoziation zeigte, war das seltenere T-Allel tendenziell häufiger bei den Patienten anzutreffen (p-Wert 0,097).
- Bei Marker rs635481, der sich ebenfalls in Intron 4 befindet und in der Gesamtstichprobe eine signifikante Assoziation aufwies, zeigte sich in der Allelverteilung das seltenere C-Allel häufiger bei den Schizophreniepatienten (p-Wert 0,088).
- Schizophreniepatienten waren bei SNP rs2065537 signifikant häufiger Träger des selteneren A-Allels (p-Wert 0,047). In der Genotypverteilung war zwar das Allelpaar AA seltener unter den Schizophreniepatienten, aber das Allelpaar AG tendenziell häufiger vertreten (p-Wert 0,051).

Ergebnisse der Untergruppe Schizophreniepatienten mit an Schizophrenie erkrankten Familienangehörigen:

- Bei Marker rs6584471 aus Intron 2 zeigte sich, ebenso wie in der Subgruppe der Schizophreniepatienten mit an Schizophrenie erkrankten Erstgradangehörigen, das häufigere A-Allel in der Gesamallel-Verteilung signifikant häufiger unter den Schizophreniepatienten (p-Wert 0,039), ebenso kamen Träger des A-Allels tendenziell signifikant häufiger unter den Erkrankten vor (p-Wert 0,087).
- Bezüglich SNP rs722982 aus Intron 3 waren Träger des selteneren C-Allels bei den Schizophreniepatienten tendenziell häufiger anzutreffen (p-Wert 0,060), ebenfalls war das C-Allel bei der Allelverteilung tendenziell häufiger in der Patientengruppe (p-Wert 0,093).
- Wie bereits in der Gesamtgruppe der Schizophreniepatienten und in der Gruppe der Schizophreniepatienten mit an Schizophrenie erkrankten Erstgradangehörigen, waren bei Marker rs635481 aus Intron 4 Träger des häufigeren T-Allels seltener unter den Schizophreniepatienten anzutreffen (p-Wert 0,084).
- Erstmals wies der ebenso in Intron 4 gelegene Marker rs2881886 tendenziell weniger Träger des häufigeren A-Allels in der Schizophreniegruppe auf (p-Wert 0,076).

5 Ergebnisse

- Auch bei dem in Intron 6 lokalisierten Marker rs1576986 zeigte sich erstmalig eine Tendenz zur Signifikanz, wonach unter den Schizophreniekranken Träger des häufigeren A-Allels öfter vorkamen (p-Wert 0,081).

Ergebnisse der Untergruppe Schizophreniepatienten mit psychiatrisch erkrankten Familienangehörigen:

- Träger des häufigeren A-Allels bei dem aus Intron 2 stammenden Marker rs2207768 zeigten sich, wie bereits in der Gesamtgruppe der Schizophreniepatienten, tendenziell öfter unter den Schizophreniepatienten (p-Wert 0,076).
- Der Marker rs2622807 aus Intron 4 zeigte, wie auch in der Gesamtgruppe und in der Gruppe Schizophreniekranker mit Erstgradangehörigen Schizophreniekranken, signifikante Assoziationen. Unter den Schizophreniepatienten kamen signifikant seltener Träger des häufigeren C-Allels vor (p-Wert 0,023). Tendenz zur Signifikanz zeigte der Genotyp TT, der häufiger unter den Erkrankten vorkam (p-Wert 0,067). In der Allelverteilung war das seltenere T-Allel häufiger bei Patienten zu finden (p-Wert 0,051).
- Bei dem in jeder Patientengruppe (tendenziell) signifikante Marker rs635481 zeigte in der Trägerschaft des häufigeren T-Allels eine signifikante Reduktion unter den Schizophreniekranken (p-Wert 0,025). Zudem wurde der Genotyp CC tendenziell häufiger nachgewiesen (p-Wert 0,079). In der Allelverteilung zeigte sich das seltenere C-Allel als häufiger vertreten (p-Wert 0,094).
- Bei Marker rs2820108 aus Intron 4, der ebenso in der Gesamtgruppe Assoziationen aufwies, zeigte sich erneut ein signifikant höheres Vorkommen von A-Allelträgern unter den Patienten (p-Wert 0,030). Der Genotyp AA kam häufiger in der Patientengruppe vor (p-Wert 0,095), und auch in der Allelverteilung zeigte sich das seltenere A-Allel öfter (p-Wert 0,056).

Ergebnisse der Haploblöcke:

- Der im Intron 4 gelegene Haploblock 2 (Marker rs2622807 + rs635481) war mit den Allelsequenzen CT (p-Wert 0,008) in der Gesamtgruppe der Schizophreniekranken seltener anzutreffen. Das Allelpaar TC zeigte sich in der Kontrollgruppe seltener (p-Wert 0,015).

Tabelle 5-19: Zusammenfassende Darstellung der (tendenziell) signifikanten Polymorphismen:

I n t r o n	SNP/ Haplotyp	Mit Schizophrenie assoziierte Allele oder Genotypen			
		Gesamtgruppe der Schizophrenie- patienten	Erstgradig verwandte Schizophrenie- patienten	An Schizophrenie erkrankte Familien- angehörige	Psychiatrisch erkrankte Familien- angehörige
2	rs6584471	n.s.	Genotyp AA ↑ A-Allelträger ↑↑ A-Allel ↑↑	A-Allelträger ↑ A-Allel ↑↑	n.s.
2	rs2207768	A-Allelträger ↑	n.s.	n.s.	A-Allelträger ↑
3	rs722982	n.s.	n.s.	C-Allelträger ↑ C-Allel ↑	n.s.
4	rs2622807	Genotyp TT ↑↑ T-Allelträger ↑↑ C-Allelträger ↓↓ T-Allel ↑↑	T-Allel ↑	n.s.	Genotyp TT ↑ C-Allelträger ↓↓ T-Allel ↑
4	rs635481	Genotyp CC ↑↑ C-Allelträger ↑ T-Allelträger ↓↓ C-Allel ↑↑	C-Allel ↑	T-Allelträger ↓	Genotyp CC ↑ T-Allelträger ↓↓ C-Allel ↑
4	rs2881886	n.s.	n.s.	A-Allelträger ↓	n.s.
4	rs2820108	A-Allelträger ↑↑ A-Allel ↑	n.s.	n.s.	Genotyp AA ↑ A-Allelträger ↑↑ A-Allel ↑
5	rs2065537	n.s.	Genotyp AG ↑ A-Allelträger ↑↑	n.s.	n.s.
6	rs1576986	n.s.	n.s.	A-Allelträger ↑	n.s.
4	<u>Haploblock</u> rs2622807 + rs635481	CT ↓↓ TC ↑↑	n.b.	n.b.	n.b.

↑ Allel/Genotyp tendenziell häufiger; ↓ Allel/Genotyp tendenziell seltener bei Schizophreniekranken

↑↑ Allel/Genotyp signifikant häufiger; ↓↓ Allel/Genotyp signifikant seltener bei Schizophreniekranken

n.s. = nicht signifikant; n.b. = nicht berechnet

5 Ergebnisse

Im direkten Vergleich der vier Patientengruppen zeigen sich deutliche Unterschiede in den Kategorien Genotypverteilung, Trägerschaft des häufigeren bzw. selteneren Allels sowie in der Allelverteilung. Abbildung 5-3 zeigt graphisch die Genotypverteilung in den vier Patientengruppen; in den drei anderen Kategorien sind die graphischen Unterschiede zwischen den Gruppen ähnlich ausgeprägt.

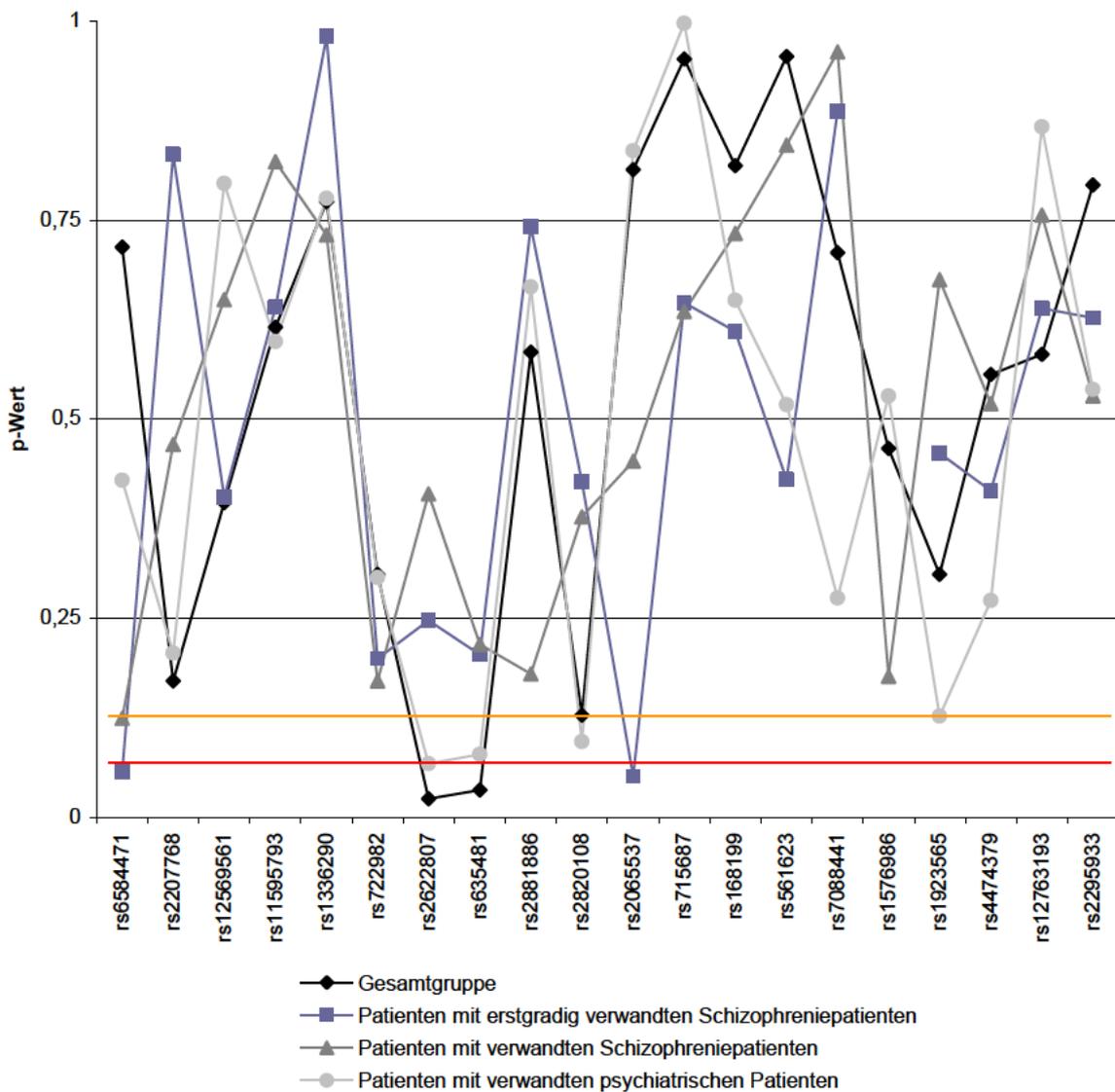


Abbildung 5-3: Genotypverteilung der 20 Polymorphismen im Vergleich der einzelnen Patientengruppen. Das Signifikanzniveau liegt bei $\leq 0,05$ (rote Linie), der Trend zur Signifikanz bei $\leq 1,0$ (orange Linie).

6 Diskussion

Die vorliegende Arbeit geht der Fragestellung nach, ob 20 ausgewählte Marker sowie Haplotypen des NRG3-Gens mit der Erkrankung Schizophrenie in einem signifikanten Zusammenhang stehen.

Das NRG3-Gen kodiert die Isoformen des Proteins Neuregulin 3, welche als Liganden für die Rezeptortyrosinkinase ErbB4 fungieren (Zhang et al. 1997; Kao et al. 2010). Dieser Signalweg beeinflusst wesentlich das reife und adulte ZNS (Assimacopoulos et al. 2003; Anton et al. 2004; Carteron et al. 2006). In diesem Zusammenhang wurde in mehreren Assoziationsstudien eine Suszeptibilität für Schizophrenie entdeckt (Benzel et al. 2007; Wang et al. 2008; Xu et al. 2009; Kao et al. 2010; Morar et al. 2011; Zeledon et al. 2011; Meier et al. 2013). Es gibt aber es auch Negativberichte bezüglich einer Assoziation zur Schizophrenie (Fallin et al. 2005; Pasaşje et al. 2011; Zhang et al. 2013).

Bei den GWAS, die bisher veröffentlicht wurden, fanden sich bezüglich Varianten im NRG3-Gen keine genomweit signifikanten Assoziationen (Lencz et al. 2007; Stefansson et al. 2008; Kirov et al. 2008; O'Donovan et al. 2008; Walsh et al. 2008; Ng et al. 2009; Need et al. 2009; Stefansson et al. 2009; ISC et al. 2009; Shi et al. 2009; Kirov et al. 2009; Shi et al. 2011; Schizophrenia Psychiatric Genome-Wide Association Study Consortium 2011; Yue et al. 2011; Tang et al. 2011). Dies ist auch bei anderen funktionellen Kandidatengen nicht der Fall, wie beispielweise bei Dopamin-Rezeptor D2 (DRD2).

Als Resultat der vorliegenden Fall-Kontroll-Assoziationsstudie fanden sich signifikante Assoziationen zwischen einzelnen Polymorphismen von NRG3 und Schizophrenie. Auffällig ist an den Befunden vor allem, dass die Ergebnisse der einzelnen Marker je nach untersuchtem Patientenkollektiv variieren.

6.1 Diskussion der Ergebnisse

Von den 20 untersuchten Polymorphismen liegen 19 in intronischen Regionen und einer liegt in Exon 11 (rs2295933) (NCBI 2012). Dieser Polymorphismus führt zu einem Allelwechsel, aber keinem Aminosäureaustausch („stille Mutation“). Möglicherweise liegt rs2295933 in einer regulatorischen Sequenz, z. B. in einer Spleißfaktorbindungsstelle, Enhancer- oder

6 Diskussion

Silencerbindungsstelle. Dadurch ist es denkbar, dass rs2295933 Einfluss auf die Genexpression nimmt.

Auch Introns, obwohl in nicht-kodierenden Regionen gelegen, können durch Regulation des alternativen Spleißens eine Rolle in der Ausformung des Isoenzym nehmen (Sammeth et al. 2008; Breitbart et al. 1987). Intronsequenzen können Spleißfaktoren als Bindungsstelle dienen (Kabat et al. 2006). Auf diesem Wege wirken Introns in der Entscheidung mit, ob eine DNA-Sequenz als Intron oder Exon behandelt wird.

rs2622807 und rs635481

In der Gesamtgruppe der Schizophreniekranken zeigten sich die stärksten signifikanten Ergebnisse bei den Polymorphismen rs2622807 und rs635481, welche sich im Intron 4 des NRG3-Gens befinden, d. h. in einer nicht kodierenden Region. Bei beiden SNPs zeigte sich das seltenere Allel signifikant häufiger unter den Schizophreniepatienten. In der Genotypverteilung kam bei rs2622807 der Genotyp TT und bei rs635481 der Genotyp CC gehäuft bei den Schizophreniepatienten vor, ebenso zeigte die Allelverteilung bei rs2622807 ein häufigeres Vorkommen des selteneren T-Allels und bei rs635481 des selteneren C-Allels. Entsprechend (tendenziell) signifikante Ergebnisse wurden für eine häufigere Trägerschaft des selteneren Allels, und seltenerer Trägerschaft des häufigeren Allels in der Schizophreniegruppe erzielt.

Beide Marker liegen zudem im LD und bilden den Haploblock 2, wovon die Haplotypen CT und TC eine signifikante Assoziation zur Erkrankung aufwiesen.

Jedoch ließen sich diese Befunde für rs2622807 und rs635481 bei Betrachtung der Subgruppen nicht mehr in dieser statistischen Stärke reproduzieren. Am ehesten zeigte die Untergruppe Schizophreniepatienten mit psychiatrisch erkrankten Familienangehörigen ein abgeschwächtes, (tendenziell) signifikantes Signal in Genotyp- und Allelverteilung, sowie in der selteneren Trägerschaft des häufigeren Allels. Die (tendenziell) signifikanten Ergebnisse von Gesamtgruppe und den drei Untergruppen zeigten in dieselbe Richtung.

Eine Hypothese zur Erklärung der Abweichungen in den einzelnen Gruppen ist die Komplexität des Erbgangs der Schizophrenie. Es könnte sein, dass die Risikoallele rs2622807-T und rs635481-C öfter bei spontaner Schizophrenie-Manifestation (d. h. Erkrankung an Schizophrenie ohne familiäre Belastung) als bei Schizophrenie mit familiärer Belastung auftreten und dort eine Erkrankung begünstigen. Allerdings spricht dagegen, dass auch Schizophreniepatienten mit psychiatrisch erkrankten Familienangehörigen beide Allele deutlich gehäuft aufweisen. Die beiden Risikoallele könnten hingegen auch unterschiedliche

6 Diskussion

Auswirkung bei den Betroffenen besitzen: während bei einem Individuum die Manifestation einer Schizophrenie gefördert wird, so treten bei dessen Verwandten häufiger andere psychiatrische Erkrankungen auf.

Eine andere Ursache der Inkonsistenz könnte in Schwächen der angewendeten statistischen Verfahren liegen. Diese lassen sich in einem bestimmten Umfang mit Tests zur Reliabilität prüfen. Jedoch ist dazu eine bestimmte Mindestgröße der Stichprobe erforderlich. Da die gebildeten Subgruppen kleiner als die Gesamtgruppe der Schizophreniepatienten sind, könnte es sein, dass der Effekt in den Subgruppen nicht mehr signifikant nachweisbar ist.

rs2820108

Bei Polymorphismus rs2820108, ebenso gelegen in Intron 4, zeigten sich signifikante Ergebnisse bei Betrachtung der Gesamtgruppe Schizophreniepatienten und bei der Untergruppe Schizophreniepatienten mit psychiatrisch erkrankten Familienangehörigen, wonach das seltenere A-Allel häufiger unter den Schizophreniepatienten vorkam. In beiden Gruppen waren Schizophreniepatienten häufiger Träger des A-Allels und in der Allelverteilung zeigte sich das A-Allel häufiger unter den Erkrankten. Bei der Untergruppe Schizophreniepatienten mit psychiatrisch erkrankten Familienangehörigen fand sich zudem in der Genotypverteilung tendenziell häufiger die Konstellation AA unter den Erkrankten. Bei den Unterguppen Schizophreniepatienten mit erstgradig verwandten Schizophreniepatienten und Schizophrenieerkrankte mit an Schizophrenie leidenden Familienangehörigen waren keine signifikanten Ergebnisse nachzuweisen.

Auch hier richtet sich die Vermutung, analog zu rs2622807 und rs635481, auf verschiedene Vererbungsmodi zwischen spontaner und familiärbedingter Erkrankung, wonach sich das Risikoallel rs2820108-A am stärksten bei den spontan Erkrankten und bei der Gruppe von Erkrankten, deren Familienmitglieder einen anderen Phänotyp von psychiatrischer Erkrankung aufwiesen. Als zweiter Erklärungsansatz könnten, ebenso wie bei rs2622807 und rs635481 vermutet, statistische Phänomene vorliegen.

rs6584471

Der Marker rs6584471, welcher im Intron 2 liegt, ergab in der Gesamtgruppe der Schizophreniepatienten und in der Untergruppe Schizophreniepatienten mit psychiatrisch erkrankten Familienangehörigen keine signifikanten Assoziationen. Hingegen traten in den Untergruppen Schizophreniepatienten mit erstgradig verwandten Schizophreniepatienten (tendenziell) signifikante Unterschiede auf, und auch in der Subgruppe

6 Diskussion

Schizophreniepatienten mit an Schizophrenie erkrankten Familienangehörigen zeigten sich (tendenziell) signifikante Werte. Es zeigte sich ein öfteres Vorkommen des häufigeren A-Allels, wonach mehr A-Allelträger in den Gruppen der Schizophreniepatienten zu finden waren, der Genotyp AA häufiger bei den Schizophreniepatienten vorkam und in der Allelverteilung das A-Allel häufiger auszuzählen war. Die (tendenziell) signifikanten Werte waren im Vergleich beider Gruppen in ihrer Richtung der Ausprägung gleich.

Die Frage, wie es zu dieser unterschiedlichen Ausprägung in den Gruppen kommt, ist derzeit nicht klar zu beantworten. Es kann vermutet werden, dass sich das häufigere A-Allel vor allem in Schizophreniefällen mit familiärer Belastung auswirkt und weniger bei Spontanerkrankungen. Hingegen bleibt dann fraglich, warum sich bei der Untergruppe Schizophreniepatienten mit psychiatrisch erkrankten Familienangehörigen das Risikoallel nicht in gleicher Weise ausprägt, wenn es vor allem bei Neuerkrankungen eine Rolle spielen soll. Alternativer Erklärungsansatz wären methodische oder statistische Mängel.

rs2065537

Der Marker rs2065537 (Intron 5) zeigte (tendenzielle) Signifikanz nur in der Untergruppe Schizophreniepatienten mit erstgradig verwandten Schizophreniepatienten. Hier ließ sich ein häufigeres Vorkommen des selteneren A-Allels feststellen, wonach Träger des A-Allels häufiger unter den Erkrankten zu zählen waren, ebenso der Genotyp AG.

Das Risikoallel rs2065537-A scheint seinen dominanten Effekt nur im 1. Grad der Verwandtschaft auszuprägen, während entfernter Verwandte und spontan Erkrankte von dessen Auswirkungen weniger berührt werden. Eine andere Erklärung wären methodische Mängel.

rs2207768

Bei Polymorphismus rs2207768 (Intron 2) zeigten sich im Trend signifikante Ergebnisse bei Betrachtung der Gesamtgruppe Schizophreniepatienten und bei der Untergruppe Schizophreniepatienten mit psychiatrisch erkrankten Familienangehörigen, und auch die Richtung der tendenziell signifikanten Ergebnisse war in beiden Gruppen gleich. Das häufigere A-Allel zeigte sich öfter unter den Erkrankten. Bei den anderen beiden Untergruppen ließen sich keine statistisch verwertbaren Assoziationen nachweisen.

Ob die differierenden Ergebnisse der komplexen Genetik oder fehlender Reliabilität der Test- und Statistikverfahren anzulasten ist, kann an dieser Stelle nicht geklärt werden.

6 Diskussion

rs722982, rs2881886, rs1576986

Die drei SNPs rs722982 (Intron 3), rs2881886 (Intron 4) und rs1576986 (Intron 6) zeigten eine Tendenz zur Signifikanz nur in der Untergruppe Schizophreniepatienten mit Schizophreniekranken in der Familie. Bei rs722982 zeigte sich ein häufigeres Vorkommen des selteneren C-Allels, denn sowohl C-Allelträger und das C-Allel in der Allelverteilung waren häufiger unter den Erkrankten. Bei rs2881886 war das häufigere A-Allel seltener in der erkrankten Gruppe anzutreffen, dadurch lässt sich indirekt ein pathogenetischer Einfluss des selteneren G-Allels vermuten. Bei rs1576986 befand sich das häufigere A-Allel öfter unter den Erkrankten. Erneut lassen sich die polygene Genetik oder statistische Phänomene als Gründe vermuten, warum die drei Marker nur in einer Subgruppe auffällig waren.

Die weiteren elf Marker zeigten keine signifikanten Ergebnisse. Dies gilt auch für Marker rs2295933, obwohl als einziger in einer kodierenden Region liegend. Wang et al. (2008) testeten diesen Marker an Han-Chinesen und fanden ebenso keine Assoziation und auch kein LD, in dem rs2295933 integriert wäre.

Die vorliegenden Ergebnisse lassen sich abgesehen von rs2295933 mit den im Einleitungsteil besprochenen Studien nicht direkt vergleichen, da keiner der Marker in einer der Vorgängerstudien näher auf eine Assoziation untersucht wurde.

Bezüglich der in Intron 4 gelegenen Marker rs2622807 und rs635481, welche in der vorliegenden Studie die deutlichste Assoziation zur Schizophrenie aufwiesen, ist eine räumliche Nähe zu den von Wang et al. (2008) als signifikant zur Schizophrenie befundenen und ebenfalls im Intron 4 lokalisierten SNPs rs677221 und rs1937970 zu verzeichnen. Der SNP rs677221 liegt ca. 12 kb in 5'-Richtung entfernt von rs2622807. Beispielfhaft wurde das LD für SNP rs1937970 berechnet; er liegt im schwachen LD mit den SNPs rs677221 ($D' = 0,717$; $r^2 = 0,415$; $LOD = 12,98$), rs2622807 ($D' = 0,724$; $r^2 = 0,445$; $LOD = 13,96$) und rs635481 ($D' = 0,663$; $r^2 = 0,383$; $LOD = 11,58$). Die Daten stammen aus dem *International HapMap Consortium*, Data Phase III (IHC 2014).

Die drei im Intron 2 lokalisierten Marker rs6584400, rs10883866 und rs10748842, welche in mehreren Veröffentlichungen (Kao et al. 2010; Morar et al. 2011; Meier et al. 2013) als signifikant zur Schizophrenie assoziiert publiziert wurden, liegen chromosomal benachbart zu den in der vorliegenden Studie untersuchten SNPs rs6584471 und rs2207768. Der SNP rs6584400 liegt ca. 130 kb in 5'-Richtung distanziert von Marker rs6584471. Der Marker rs10883886, für den hier beispielsweise das LD berechnet wurde, liegt sehr schwach im LD

6 Diskussion

mit rs2207768 ($D' = 0,529$; $r^2 = 0,012$; $LOD = 0,28$) (IHC 2014). Für rs6584471 berechnete das IHC kein LD mit rs10883886, doch anhand seiner chromosomalen Position zwischen den Markern rs7094054 und rs7068239 ist ebenfalls von einem schwachen LD auszugehen.

Die vorliegende Studie weist Ergebnisse auf, die *NRG3* als Suszeptibilitätsgen bekräftigen und neue Polymorphismen und einen neuen Haploblock als interessante Loci für weitere Untersuchungen aufdecken.

NRG3 als Suszeptibilitätsgen

Seit seiner Entdeckung (Zhang et al. 1997) wird *NRG3* bezüglich seines Einflusses auf Entwicklung und Funktionalität des Gehirns untersucht. Es ist an Vorgängen der Proliferation, Differenzierung, Migration und Zellüberleben bzw. Apoptose beteiligt (Carteron et al. 2006). Der Genlocus 10q wurde in einer großen Metaanalyse von 32 genomweiten Kopplungsstudien der Schizophrenie (Ng et al. 2009) als Genregion mit potentiellen Kandidatenloci genannt. Die Annahme, dass es sich bei der Genposition 10q22-23 um einen Suszeptibilitätslocus für Schizophrenie handeln könnte, wurde erstmals durch Kopplungsstudien an Aschkenasi-Juden (Fallin et al. 2003) und Han-Chinesen (Faraone et al. 2006) geäußert.

Weitere Unterstützung der Hypothese, dass *NRG3* in der Pathogenese der Schizophrenie eine Rolle spielt, lieferten die Ergebnisse aus Kandidatengenstudien mit Markern des *NRG3*-Gens an schottischen (Benzel et al. 2007) und Han-chinesischen Probanden (Wang et al. 2008). In einer Assoziations-Feinkartierungsstudie der Region 10q22-23 an Aschkenasi-Juden (Chen et al. 2009) wurde zwar kein signifikanter Zusammenhang zwischen Schizophrenie und 152 Genvarianten aus *NRG3* gefunden, die die Korrektur für multiples Testen überstanden, jedoch konnte eine signifikante Assoziation zwischen dem Merkmal „Wahn“ und zwei SNPs im Intron 1 des *NRG3*-Gens (rs10883866 und rs6584400) entdeckt werden. Diese SNPs sind in einem LD-Block lokalisiert. Eine andere Studie, die sich auf CNVs innerhalb von Familien mit Schizophreniekranken aus einer afrikanischen Population konzentrierte, berichtete von einer 73,6 kb langen Duplikation im Intron 1 des *NRG3*-Gens, welches Defizite in der Genregulation verursachen könnte (Xu et al. 2009).

Zwei unabhängige Studien bestätigten eine Assoziation zwischen drei SNPs (rs10883866, rs6584400, rs10748842) und sowohl dem Ausmaß an psychotischen Symptomen und der Diagnose Schizophrenie (Kao et al. 2010; Morar et al. 2011). Verglichen zu gesunden Kontrollprobanden, zeigte sich bei Schizophreniepatienten eine pathologische Abweichung im Gleichgewicht der *NRG3*-Isoformen hin zu instabilen *NRG3*-Varianten (Kao et al. 2011).

6 Diskussion

Auch Effekte auf die Kognition von NRG3 wurden erforscht. Die Marker rs10883866 und rs6584400 stehen offensichtlich in Zusammenhang mit Aufmerksamkeitsleistungen (Morar et al. 2011; Meier et al. 2013).

Der wiederholte Nachweis von Assoziation mit Schizophrenie u. a. auch in dieser Arbeit geben genügend Hinweise dafür, NRG3 trotz des Vorliegens negativer Befunde (Fallin et al. 2005; Pasaje et al. 2011; Zhang et al. 2013) als Kandidatengen zu betrachten.

6.2 Diskussion der Methoden

Die Studie der vorliegenden Arbeit wurde als Fall-Kontroll-Assoziationsstudie durchgeführt. Mit Assoziationsstudien lassen sich genetische Marker wie die hier untersuchten SNPs auf eine Auswirkung auf die Schizophrenie-Entstehung untersuchen, selbst wenn der einzelne Einfluss des Markers gering ausfällt. Allerdings fordert dieses Studiendesign die Berücksichtigung unter anderem von folgenden Punkten.

Größe des Patientenkollektivs

Das Gesamtkollektiv repräsentiert mit 512 Schizophreniepatienten und 1320 gesunden Kontrollprobanden für eine einzelne Stichprobe einen großen Umfang. Die Größe der Patientenstichprobe ist ein wesentlicher Faktor gerade für die Entdeckung von Polymorphismen, deren einzelner Beitrag zur Krankheitsentstehung als klein angenommen wird. Dennoch könnten mit einem noch größeren Patientenkollektiv noch sicherer seltene Genvariationen aufgespürt werden. Durch an diese Studie anschließende Assoziations- oder Metaanalysen kann dies gelingen.

Ethnische Abstammung

Schizophrenie ist innerhalb der verschiedenen Ethnien in relativ ähnlicher Prävalenz anzutreffen (Tsuang et al. 1997; Saha et al. 2006). Aber angesichts der Tatsache, dass zwischen den verschiedenen ethnischen Gruppen mitunter deutliche Unterschiede in Bezug auf Allel- und Genotypverteilung der genetischen Marker herrschen, welche zu falsch-positiven bzw. falsch-negativen Befunden führen können (Owen 2000), ist eine einheitliche Ethnie innerhalb eines untersuchten Kollektivs von Bedeutung. Denn voneinander abweichende genetische Marker könnten in unterschiedlichen Ethnien eventuell einen

6 Diskussion

ähnlichen Phänotyp bedingen. Daher empfiehlt sich die Berücksichtigung ethnies-
 überschreitender Abstammung der einzelnen Probanden, um eine Populationsstratifikation
 weitgehend auszuschließen (Lander und Schork 1994). In die vorliegende Studie wurden nur
 kaukasische Patienten zugelassen, deren Eltern und Großeltern ebenso kaukasischer
 Abstammung waren. Bei dem Kontrollkollektiv handelt es sich ausschließlich um deutsche
 Probanden mit deutschstämmigen Eltern und Großeltern.

Die Kategorisierung von Geno- und Haplotypen des menschlichen Genoms erarbeiteten
 internationale Forschungsgruppen im *International HapMap Consortium* (IHC 2012). Diese
 untersuchten genetische Variationen an folgenden Völkern: Kaukasier (Nordamerikaner mit

Tabelle 6-1: Genotyp- und Allelfrequenzen der 20 Marker im NRG3-Gen bei Patienten- und Kontrollkollektiv
 und bei Populationsstichproben des IHC.

	Genotyp (%)					
	rs6584471			rs2207768		
	G/G	A/G	A/A	G/G	A/G	A/A
P	18,9	49,9	31,2	5,3	40,9	53,8
K	20,3	48,0	31,7	7,9	40,1	52,0
E	25,0	43,3	31,7	11,7	40,0	48,3
C	17,8	66,7	15,6	0	35,6	64,4
J	26,7	40,0	33,3	6,7	26,7	66,7
Y	55,0	38,3	6,7	50,8	39,0	10,2
	rs12569561			rs11595793		
	C/C	C/T	T/T	G/G	C/G	C/C
P	20,4	51,3	28,3	18,2	49,6	32,2
K	20,8	47,9	31,3	17,0	48,3	34,7
E	27,7	44,7	27,7	15,0	48,3	36,7
C	54,5	38,6	6,8	53,3	40,0	6,7
J	59,1	36,4	4,5	44,4	42,2	13,3
Y	61,8	29,1	9,1	65,0	31,7	3,3
	rs1336290			rs722982		
	C/C	C/T	T/T	C/C	C/T	T/T
P	14,2	47,8	38,0	11,6	45,9	42,5
K	13,9	46,3	39,8	10,8	42,7	46,5
E	11,3	45,3	43,4	6,7	46,7	46,7
C	56,8	36,4	6,8	53,3	40,0	6,7
J	52,5	30,0	17,5	44,4	42,2	13,3
Y	75,0	23,1	1,9	73,3	23,3	3,3
	rs2622807			rs635481		
	T/T	T/C	C/C	C/C	C/T	T/T
P	12,9	45,0	42,1	11,6	43,5	44,9
K	9,2	43,0	47,8	8,1	42,4	49,5
E	10,0	43,3	46,7	8,3	46,7	45,0
C	17,8	53,3	28,9	17,8	53,3	28,9
J	33,3	51,1	15,6	43,2	40,9	15,9
Y	0	0	0	65,0	30,0	5,0

6 Diskussion

rs2881886				rs2820108		
	G/G	G/A	A/A	A/A	A/C	C/C
P	13,6	46,2	40,2	23,8	49,6	26,6
K	12,0	45,9	42,1	21,5	47,0	31,5
E	10,0	51,7	38,3	16,1	53,6	30,4
C	35,6	51,1	13,3	9,5	50,0	40,5
J	33,3	55,6	11,1	29,3	34,1	36,6
Y	55,0	41,7	3,3	19,6	58,9	21,4

rs2065537			rs715687			
	A/A	A/G	G/G	G/G	G/A	A/A
P	19,1	48,9	32,0	12,3	44,4	43,3
K	18,3	48,2	33,5	12,5	43,6	43,9
E	19,0	56,9	24,1	13,3	48,3	38,3
C	14,3	35,7	50,0	11,1	35,6	53,3
J	11,1	55,6	33,3	11,4	56,8	31,8
Y	66,1	30,5	3,4	30,0	56,7	13,3

rs168199			rs561623			
	G/G	G/T	T/T	T/T	T/G	G/G
P	22,3	50,7	27,0	9,4	42,6	48,0
K	21,1	52,1	26,8	9,1	42,2	48,7
E	30,0	56,7	13,3	10,0	61,7	28,3
C	15,6	44,4	40,0	13,3	46,7	40,0
J	6,8	45,5	47,7	6,8	40,9	52,3
Y	21,7	55,0	23,3	6,7	51,7	41,7

rs7088441			rs1576986			
	G/G	G/A	A/A	C/C	C/A	A/A
P	21,8	50,2	28,0	6,7	40,2	53,1
K	20,2	50,7	29,1	8,1	37,9	54,0
E	28,3	58,3	13,3	10,0	46,7	43,3
C	2,3	25,0	72,7	28,9	42,2	28,9
J	0	15,6	84,4	34,1	54,5	11,4
Y	18,3	53,3	28,3	8,5	28,8	62,7

rs1923565			rs4474379			
	C/C	C/G	G/G	G/G	G/A	A/A
P	13,3	43,1	43,6	8,8	40,2	51,0
K	11,5	46,8	41,7	8,4	43,0	48,6
E	30,0	38,3	31,7	25,0	38,3	36,7
C	53,3	40,0	6,7	46,7	42,2	11,1
J	55,6	37,8	6,7	48,9	42,2	8,9
Y	55,0	35,0	10,0	0	0	0

rs12763193			rs2295933			
	T/T	T/C	C/C	A/A	A/G	G/G
P	24,5	48,1	27,4	8,3	40,0	51,7
K	22,3	50,3	27,4	8,3	41,6	50,1
E	16,9	33,9	49,2	23,3	36,7	40,0
C	0	25,0	75,0	46,7	42,2	11,1
J	6,7	31,1	62,2	51,1	40,0	8,9
Y	1,7	38,3	60,0	20,0	56,7	23,3

Die Allelreihenfolge (Allel1/Allel2) des Ergebnisteils wurde beibehalten (Allel 1 = selteneres Allel in der Gesamtstichprobe, Allel 2 = häufigeres Allel).

P = Patientenkollektiv; K = Kontrollkollektiv; E = Europäer (Utah [USA], nord- und westeuropäischer Herkunft); C = Han-Chinesen (Beijing); J = Japaner (Tokio); Y = Yoruba, ein westafrikanisches Volk (Nigeria)

6 Diskussion

europäischem Ursprung), Asiaten (Chinesen und Japaner) und Afrikaner. Betrachtet man die Genotyp- und Allelverteilung der untersuchten SNPs im NRG3-Gen, fällt die ethnische Diversität zwischen den einzelnen Ethnien unmittelbar auf (vgl. Tabelle 6-1). Die Allel- und Genotypfrequenzen der vorliegenden Studie ähneln denen der europäischen Stichprobe aus dem IHC. Dies spricht für die Validität der Ergebnisse.

Die laut IHC regelmäßig großen Unterschiede in der Genotyp- und Allelverteilung zwischen den Ethnien zeigen, wie wichtig die Trennung der Stichproben anhand ihrer Abstammung ist. Sowohl in der vorliegenden Studie als auch in den besprochenen Studien zu NRG3-Polymorphismen (vgl. Kapitel 2.2.4) wurde dies durchgeführt. Darin könnte eine mögliche Ursache der fehlenden Reproduzierbarkeit signifikanter Assoziationen zwischen verschiedenen Studien liegen.

Als Beispiel für interethnische Unterschiede, wurden in mehreren NRG3-Studien signifikante Assoziationen von rs10883866, rs10748842 und rs6584400 mit Schizophrenie und dem Merkmal Wahn bei Patienten mit europäischer Herkunft (Chen et al. 2009 bei Aschkenasi-Juden, Kao et al. 2010 bei weißen Amerikanern, Morar et al. 2010 bei Westaustraliern) beobachtet, die aber an asiatischen Kohorten, genauer Koreaner (Pasaje et al. 2011) und Han-Chinesen (Wang et al. 2008; Zhang et al. 2013), nicht wiederholt werden konnten. Hier zeigen sich interessante Unterschiede im interethnischen Vergleich der Allelfrequenzen. Das Risikoallel rs10883866-G findet sich lt. IHC in der europäischen Kohorte mit 8%, im Vergleich nur mit 3% in der chinesischen und 6% in der japanischen Kohorte. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass Europäer, die rs10883866-G häufiger aufweisen, eine höhere Suszeptibilität in Bezug auf diese Variation zeigen als Asiaten. Die Allelfrequenz des Risikoallels rs6584400-A beläuft sich in der europäischen Stichprobe hingegen nur auf 10%, verglichen in der chinesischen mit 82% und in der japanischen mit 78%. Während Europäer mit rs6584400-A häufiger an Schizophrenie erkranken, zeigt sich bei Asiaten mit rs6584400-A, die insgesamt betrachtet dieses Allel um ein Vielfaches häufiger aufweisen, keine Assoziation zur Erkrankung. Die Ursache dieses interethnischen Unterschieds wurde bisher nicht erforscht. Die Allelfrequenz des Risikoallel rs10748842-T ist in der europäischen Kohorte geringfügig seltener (92%) als in der asiatischen (97% und 94%); Europäer mit rs10748842-T erkranken öfter an Schizophrenie, wohingegen bei Asiaten kein statistischer Zusammenhang zur Erkrankung nachgewiesen wurde. Die verschiedene Auswirkung des Risikoallels auf den Genotyp Schizophrenie ist auch in diesem Beispiel noch nicht untersucht.

Grad der Verwandtschaft

Um den komplexen Erbgang der Schizophrenie, bei dem die Wahrscheinlichkeit einer Erkrankung vom Grad der Verwandtschaft zu einem Schizophreniekranken abhängt, und um die Erkenntnis miteinzubinden, dass verschiedene Suszeptibilitäts-Polymorphismen der Schizophrenie auch für das Auftreten anderer psychiatrischer Erkrankungen von Bedeutung sein können, wurden in der vorliegenden Arbeit drei Untergruppen aus der Gesamtgruppe der Schizophreniepatienten gebildet. Die deutlich unterschiedlichen Befunde in diesen insgesamt vier Patientengruppen unterstützen die Hypothese der unterschiedlich anteiligen Penetranz des Genotyps auf die Ausbildung des Phänotyps Schizophrenie. Diese Penetranz hängt u. a. davon ab, ob es sich um eine familiäre oder spontan aufgetretene Schizophrenie handelt. Eine vergleichbare Studie liegt sowohl in Bezug auf NRG3, als auch auf andere Kandidatengene der Schizophrenie, nicht vor.

Hingegen wurden bereits Studien zu NRG3 und anderen Kandidatengenen bezüglich der Pleiotropie veröffentlicht (Berrettini et al. 2000, Craddock und Owen 2007; Rapoport et al. 2009).

Alter der Studienteilnehmer

Das Alter in Patienten- und Kontrollkollektiv sollte zur aussagekräftigen Vergleichbarkeit annähernd gleich sein. Zudem sollte das Alter der Teilnehmer nicht zu niedrig, sondern nach Möglichkeit höher als das Prädilektionsalter von ca. 21 Jahren bei Männern bzw. 30 Jahren bei Frauen (Ochoa et al. 2012) sein, da bei den Kontrollprobanden eine Erkrankung in späteren Jahren nicht sicher auszuschließen ist.

Die vorliegende Arbeit beinhaltete Patienten im Durchschnittsalter von 37,7 Jahren und Kontrollprobanden mit 46,3 Jahren. Zwar liegt bei beiden Kollektiven das Durchschnittsalter darüber, doch ist die Standardabweichung mit 11,34 bei den Patienten und 15,69 bei den gesunden Kontrollen breit gefächert. Daher kann gerade bei den jüngeren Kontrollprobanden eine spätere Manifestation der Erkrankung nicht sicher ausgeschlossen werden.

Bei zu jungen Patienten herrscht die Einschränkung, dass für sie der Verlauf und die Phase der einschneidendsten Psychose nicht so klar einschätzbar sind wie für ältere Patienten mit längerer Krankheitsmanifestation. Dieser Einwurf ist auch Hinblick auf Studien zu beachten, die die Symptomatik und neurokognitiven Defizite und Endophänotypen mitberücksichtigen.

Diagnoseverfahren und Einschlusskriterien

Streng formulierte Ein- und Ausschlusskriterien für die Zulassung zu Studien sind für die Güte der erhobenen Befunde unabdingbar. Die Gütekriterien bestehen aus Objektivität, Reliabilität und Validität (Lienert und Raatz 1998).

Für die Diagnosestellung der Schizophrenie kam das SKID, Achse I und II zur Anwendung, um den Ansprüchen von Objektivität und Reliabilität genüge zu tun. Mittels der PANSS konnte anhand zusätzlicher Patientenangaben die Einteilung in einen Subtypus fundierter vorgenommen werden.

Die strenge Diagnosestellung erhöht die Reliabilität der vorliegenden Studie. Differenzialdiagnosen wie z. B. schizoaffektive Störungen wurden ausgeschlossen. Zwar häufen sich in der gegenwärtigen Forschung molekulare Befunde, die eine gemeinsame genetische Grundlage beider Erkrankungen postulieren (Maier et al. 1999; Heckers 2009). Jedoch empfiehlt sich eine nach klinischen Kriterien deutliche Eingrenzung des Begriffs Schizophrenie, um spezifische genomische Befunde zu erheben. Eine daran anschließende vergleichende Studie kann gemeinsame molekularbiologische Pfade bei den verschiedenen Phänotypen aufdecken.

In anderen Studien wurde die Trennung weniger streng gehandhabt; so hatten z. B. bei Fallin et al. (2005) von der Patientengruppe Schizophrenie und schizoaffektive Störung nur ein Fünftel die Diagnose Schizophrenie.

Neben der ausführlichen Anamnese-Erhebung und der Inspektion des befundenden Arztes wurden auch Arztbriefe einbezogen. Das Interview fand auf einer vertrauensvollen Ebene statt, damit der Patient die Möglichkeit hatte, seine Krankengeschichte möglich vollständig und wahrheitsgemäß wiederzugeben. Trotzdem besteht in dieser Methodik und Herangehensweise die Gefahr, dass Inhalte vom Patienten bewusst oder ungewollt falsch wiedergegeben werden.

Auch sind Schwierigkeiten in Definitionen zu beachten. Das Ersterkrankungsalter stellt ein anschauliches Beispiel dar: es kann als Zeitpunkt des Auftretens erster Symptome, des ersten ärztlichen Kontakts oder der ersten stationären Einweisung aufgefasst werden. In den Diagnosemanualen herrschen diesbezüglich ebenso Unterschiede. Gemäß den Kriterien des DSM-IV (*American Psychiatric Association* 1994) wurde für diese Studie das Erkrankungsalter als der Zeitpunkt festgelegt, sobald die Diagnose laut DSM-IV gestellt werden konnte.

Zudem besteht die Problematik, dass auch wenn das Interview von einem erfahrenen Psychiater gehalten wird, subjektive Einschätzungen bzw. Meinungen stets miteinfließen

6 Diskussion

können, und somit über die endgültige Diagnose entscheiden. In manchen Abschnitten des SKID wird sogar nur nach den Einschätzungen des Untersuchers gefragt, womit Schwierigkeiten unausweichlich sind, das Kriterium der Objektivität zu erfüllen.

Auch sind viele Symptome aus der Psychiatrie an sich auch schwer zu definieren bzw. sind die Übergänge fließend. Bei unterschiedlichen Untersuchern können die Diagnosen variieren. Auch darunter leiden potentiell Objektivität und Reliabilität (Lienert und Raatz 1998).

In der vorliegenden Arbeit wurden die Patienten nicht in Untergruppen nach ihrem Schizophrenie-Typus oder vorhandenen Symptomen unterteilt, womit eine phänotypisch teilweise erheblich variierende Patientengruppe als ein gemeinsames Kollektiv behandelt wurde. Die fehlende Aufteilung der Schizophreniepatienten in Subklassifizierungen kann als Schwäche der Auswertung angesehen werden.

Kontrollkollektiv

Auch die gesunden Kontrollen wurden nach strengen Einschluss- und Ausschlusskriterien ausgewählt. Dazu gehörte vor allem, dass die Eigen- und Familienanamnese bezüglich psychiatrischer oder neurologischer Erkrankungen unauffällig war. Durch zeitaufwändige Fragebögen und Interviews wurde die Gefahr, nicht geeignete Teilnehmer einzuschließen, auf ein Minimum gesenkt. In Studien anderer Arbeitsgruppen wurden mitunter die Kontrollen weniger streng begutachtet. Mitunter wurden lediglich Blutspender als Kontrollkollektiv verwendet. Als Beispiele für GWAS wurden Blutspender ohne Screening nach evtl. vorhandenen psychiatrischen Erkrankungen von Kirov et al. (2009) verwendet, sowie in einzelnen Proben von O'Donovan et al. (2008). In Studien zu NRG3 verwendeten Benzel et al. (2007) und zu einem bestimmten Anteil Zhang et al. (2013) Blutspender; in den anderen NRG3-Studien wurde auf den Ausschluss von psychiatrischen Erkrankungen im Kontrollkollektiv geachtet.

Studiendesign

Durch das Studiendesign einer Assoziationsanalyse gelingt eine Abschätzung der genetischen Komponente in der Ätiologie der Erkrankung.

Jedoch gilt es zu berücksichtigen, dass genetische Differenzen zwischen ethnischen, geographischen und sozialen Schichten die Vergleichbarkeit der Ergebnisse beeinträchtigen. Signifikante Befunde können also aufgrund fehlender Schichtung zustande kommen. Daher

sollte eine sorgfältige Stratifikation in Ethnie, geographischer Herkunft und sozialer Schicht erfolgen, um die so entstehenden Subgruppen besser vergleichen zu können.

Die vorliegende Studie berücksichtigte Ethnie, geographische Herkunft und den Bildungsstand (höchster Schulabschluss). Andere sozialen Variablen wie z. B. monatliches Einkommen wurden nicht berücksichtigt.

Auf die Verwendung einer Bonferroni-Korrektur wurde aufgrund des präliminären Charakters der Studie verzichtet. Dadurch sollte sichergestellt werden, dass möglichst viele potenziell interessante Ergebnisse, die ohnehin in einer unabhängigen Stichprobe repliziert werden müssten, präsentiert werden können. Interessante Befunde wie die aus der vorliegenden Studie erhalten somit die Chance einer Replikation unter einem stringenteren Signifikanzniveau.

6.3 Fragen in der Genetik-Forschung der Schizophrenie

Neben den genannten methodischen Problemen gibt es noch eine Reihe anderer Gründe für inkonsistente Daten, die an dem lückenhaften Verständnis der Erkrankung an sich liegen.

Klärung eines einheitlichen Verständnisses der Schizophrenie

Kraepelin führte im ausgehenden 19. Jahrhundert eine dichotome Einteilung ein, wonach er die Schizophrenie den Affektiven Störungen gegenüberstellte, in der Vorstellung, dass die Gründe der Erkrankung streng zu trennen wären. Die Brücke zwischen beiden Entitäten soll die Schizoaffective Störung bilden (Kasanin 1933). Diese Einteilung hält sich bis in die Gegenwart. Hingegen, gerade durch Ergebnisse aus Familienstudien und Molekulargenetik wurde die Dichotomie in Frage gestellt, und eine gemeinsame genetische Grundlage von Schizophrenie und Affektiven Störungen wird gegenwärtig mit Belegen fundiert (Maier et al. 1993; Heckers 2009). Die Diskussion um die Forderung von diagnostischen Kriterien, die auf molekulargenetischen Befunden gründet (Craddock und Owen 2005, 2007; Craddock et al. 2007), ist in ihrem Ende noch nicht absehbar.

Auch für NRG3 gibt es Befunde von Polymorphismen, die dieselben Merkmale bei Schizophreniepatienten und Bipolar Typ I Erkrankten modulieren: bei Meier et al. (2013) erzielten in neurokognitiven Testungen beide Patientengruppen, welche bei SNP rs6584400 entweder den Genotyp GA oder AA präsentierten, bessere Ergebnisse als Patienten mit Genotyp GG. Die Ergebnisse sprechen dafür, dass die Assoziation zwischen NRG3 und

6 Diskussion

Aufmerksamkeitsleistung nicht spezifisch für Schizophrenie ist, sondern auch auf andere psychiatrische Störungen erweitert werden kann.

Schizophrenie als variantenreiche Erkrankung

Schizophrenie zeigt eine hohe Diversität in Symptomatik, Verlauf und Therapieresponse (Tandon et al. 2008a, 2008c). Sie wird in fünf unterschiedliche Subtypen eingeteilt, doch die individuelle Symptomatik kann auch innerhalb eines Subtyps differieren.

Die Heterogenität des Erscheinungsbildes bekräftigt die Vermutung, dass verschiedene Krankheiten zu der Entität Schizophrenie gezählt werden müssen. Eine solche Erklärung könnte die differierenden biologischen Befunde erklären.

Hinzu kommt die schwere Abgrenzbarkeit von anderen psychiatrischen Erkrankungen wie schizoaffektiver Störung, oder schizotype, schizoide bzw. paranoide Persönlichkeitsstörung (Craddock und Owen 2007; Heckers 2009).

Schizophrenie als multifaktorielle Erkrankung

In Bezug auf die Genetik gilt die Schizophrenie als komplex. Hinzu kommt, dass das individuelle „Ansprechen“ auf die einzelnen Suszeptibilitätsmarker unterschiedlich ist (Gejman et al. 2010; Hatzimanolis et al. 2013). Der klinische Phänotyp kann unterschiedlich ausfallen, auch wenn Polymorphismen von Erkrankten und Gesunden einander gleichen.

Eine Erklärung dafür liefert das multifaktorielle Konzept, wonach neben der Genetik auch Umweltfaktoren auf die Manifestation einwirken (Tandon et al. 2008b). Die Erforschung psychologischer und soziologischer Einwirkungen erbringt, wie auch die Molekularbiologie, regelmäßig neue Erkenntnisse.

Schizophrenie als genetisch komplexe Erkrankung

Nach einer weitgehend anerkannten Annahme fußt die Genetik der Schizophrenie auf einem bestimmten Spektrum an Mutationshäufigkeiten, mit einer Mischung aus häufigen (*common*) Mutationen mit kleinem Einfluss (z. B. SNPs) und seltenen (*rare*) Mutationen mit großem Einfluss (z. B. CNVs) (Sebat et al. 2009; Gejman 2010).

Hingegen konnten nicht alle Studienergebnisse Evidenz für diese Betrachtung erbringen. Eine genomweite Analyse von SNPs und CNVs erbrachte keine signifikanten Zusammenhänge von Suszeptibilitätsmarkern (Need et al. 2009). Allerdings unterstützen auch diese Ergebnisse die Vermutung, dass es spezifische Genomregionen für die Schizophrenie-Entstehung gibt, die sehr selten sind und die auch nur wenige Patienten miteinander teilen (Need et al. 2009).

Klärung der Funktion genetischer Polymorphismen

Neben dem Auffinden der Gene und Genvarianten, ist das Verständnis über deren Funktionalität ein weiterer wichtiger Schritt. Weitaus die meisten gefundenen genetischen Varianten liegen in nicht-kodierenden Bereichen. Der Anteil und die Mechanismen, mit denen sie Einfluss auf die Genexpression nehmen, sind noch weitgehend ungeklärt. Introns und Intergenregionen bedürfen daher weiterer Aufklärung. Auch sind die Funktionen genetischer Varianten in kodierenden Regionen in weiten Teilen noch unbekannt: wenn z. B. ein Allelwechsel zu einem Aminosäurewechsel führt, bleibt die Frage der funktionellen Relevanz. Inwiefern solch strukturelle Veränderungen, eingeleitet durch identifizierte Polymorphismen, auch zu Alterationen im Phänotyp führen, gilt es weiter zu untersuchen.

Als Beispiel für NRG3 seien die Risikoallele rs6584400-A, rs10883866-G und rs10748842-T genannt, wovon sich rs10883866 und rs10748842 im kompletten LD befinden (Chen et al. 2009) und welche in enger Nachbarschaft zu einem alternativen Promotor liegen. Dieser Promotor bedient die zwei ZNS-spezifischen Isoformen hFBNRG3 (bzw. NRG-b) und NRG3-d (Morar et al. 2011). Morar et al. (2011) vermuteten von rs6584400-A und rs10883866-G, auf das alternative Spleißen zugunsten dieser Isoformen einzuwirken. Bei Trägern von rs10883866-G und rs6584400-A ließen sich überdurchschnittliche Leistungen im CPT-DS sowie eine häufigere Wahnsymptomatik feststellen. Dies suggeriert, dass beide SNPs die Sensitivität für Wahrnehmung und Vigilanz modulieren, wobei sich diese Modulation bei Erkrankten anders auswirkt als bei gesunden Individuen: so könnte man rs6584400-A als einen protektiven Faktor für erkrankte Individuen ansehen, mit dem kognitive Fähigkeiten gesteigert werden (Morar et al. 2011).

Der Nachweis der Variante rs10748842-T ergab höhere Transkriptionsraten von den Isoformen Klasse II und III, welche eine pathologische Verschiebung (*Shift*) in der Balance der NRG3-Isoformen in Richtung instabile Polypeptide darstellt (Kao et al. 2010). Patienten mit einem solchen *Shift* litten häufiger unter Schizophrenie.

Neben NRG3 wurden auch für andere Suszeptibilitätsgene wie NRG1 (Law et al. 2006; Tan et al. 2007) oder DISC1 (Nakata et al. 2009) Hinweise gefunden, dass eine Dysregulation von Isoformen, hervorgerufen durch Polymorphismen, für die Schizophrenie-Entstehung relevant sein können.

Hingegen müssen derartig deutliche Befunde nicht immer zu finden sein. Boer et al. (2009) führten eine histologische *post-mortem*-Untersuchung an 20 Schizophreniepatienten, 8 Patienten mit Bipolarer Störung Typ I und 20 gesunden Kontrollprobanden durch, indem sie die Transkriptionsraten von Neuregulin 1 α und Neuregulin 3 in Brodmann Area 46 maßen.

6 Diskussion

Die Proteinlevel zeigten bei beiden Patientengruppen keine Unterschiede im Vergleich zu gesunden Kontrollen. Dieser Befund sagt unter anderem aus, dass veränderte Transkriptionsraten nicht global in jedem Gehirnareal auftreten müssen, sondern vermutlich auf spezifische Gehirnareale zugeschnitten sind (Boer et al. 2009).

Ein anderes funktionales Beispiel, das NRG3 betrifft, ist die Veränderung von Medikamenten-Wirkung und Nebenwirkung. Für das atypische Neuroleptikum Iloperidon kann als Nebenwirkung eine QTc-Verlängerung im Elektrokardiogramm (EKG) auftreten, wobei auch der Polymorphismus rs4933824 in NRG3 in Verdacht steht, das Risiko erhöhen (Volpi et al. 2009).

Pleiotropie

Es mehren sich Berichte von Suszeptibilitätsloci für Schizophrenie, die sich mit anderen psychiatrischen Erkrankungen überschneiden, wie z. B. mit Bipolarer Störung Typ I (Berrettini 2000; Craddock und Owen 2007). Gemeinsamkeiten mit der Bipolaren Typ I Störung liegen z. B. in der Prävalenz, im Prädispositionsalter und in der Symptomatik (die Hälfte der Patienten entwickeln psychotische Symptome). Auch Polymorphismen des NRG3-Gens (z. B. rs6584400) wurden gehäuft sowohl bei Schizophrenie- als auch Bipolar-Erkrankten entdeckt (Meier et al. 2013).

Pleiotrope Effekte von Kandidatenloci werden auch für Schizophrenie und Autismus postuliert, vor allem bei Kindern (Rapoport et al. 2009). Analoge Symptome sind z. B. Störungen der sozialen Interaktion und einige Negativsymptome (Konstantareas und Hewitt 2001). Auf Kandidatengenlocus 10q22.3-q23.31 wurden *Low-copy repeats* (LCR) entdeckt, die zu rekurrenten Mikrodeletionen führen und Auffälligkeiten in Verhalten und neuronaler Entwicklung begünstigen, wie z. B. Autismus, Hyperaktivität und psychiatrische Erkrankungen (Balciuniene et al. 2007).

Auch für das Aufmerksamkeits-Defizit-Hyperaktivitätssyndrom (ADHS) werden Polymorphismen des NRG3-Gens diskutiert (Sonuga-Barke et al. 2008).

Endophänotypen

In der molekularbiologischen Forschung psychiatrischer Erkrankungen nimmt die Ermittlung der genetischen Grundlage neurokognitiver und behavioraler Merkmale mittlerweile einen großen Stellenwert ein. Das Konzept der Endophänotypen beruht auf der Annahme, dass einzelne Genvarianten in erster Linie nicht für eine Erkrankung wie die Schizophrenie verantwortlich sind, sondern für quantitative Merkmale wie z. B. neurokognitive Defizite. Mit

6 Diskussion

Exploration dieser Merkmale soll eine Brücke zwischen heterogenem Phänotyp und vielen einzelnen genetischen Befunden mit jeweils nur kleinem Betrag zur Phänotyp-Entstehung geschlagen werden (Gottesman und Gould 2003; Braff et al. 2007). Ein bestimmter Phänotyp, z. B. Störungen im Arbeitsgedächtnis, mit entsprechend assoziierter Allelvariante, kann somit auch als Vulnerabilitätsmarker für Schizophrenie angesehen werden (Wedenoja et al. 2008). In Bezug auf das NRG3-Gen gab es wiederholt Hinweise, dass Polymorphismen (rs10883866, rs10748842, rs6584400) Einfluss auf verbesserte Aufmerksamkeitsleistung und Vigilanz nehmen, gleichzeitig aber auch ein Risiko für das Auftreten von florider Wahnsymptomatik bergen (Chen et al. 2009; Morar et al. 2011; Meier et al. 2013). Aus diesem Grund stellte sich wiederholt die Frage, ob diese Marker eher mit bestimmten quantitativen Merkmalen assoziiert sind, die für die Schizophrenie charakteristisch sind, als mit der Erkrankung an sich (Kao et al. 2010; Pasaje et al. 2011; Zhang et al. 2013).

Das Konzept der Endophänotypen wurde inzwischen auch auf CNVs ausgeweitet; so fanden Raychaudhuri et al. (2010) Assoziationen in den funktionalen Gen-Sets „Neuronale Aktivität“ und „Lernen“.

Epistatische Effekte

Epistatische Effekte beschreiben Wechselwirkungen unter Genen, die sich auf den Phänotypen auswirken. Das bedeutet, dass die Aktivität eines Gens die Expression eines oder mehrerer anderer Gene stimuliert oder inhibiert.

Genetische Assoziationsstudien haben eine Reihe von Genen und epistatischen Interaktionen auch innerhalb des NRG-ErbB-Signalwegs entdeckt, welche das Risiko der Entwicklung einer Schizophrenie erhöhen, inklusive NRG3, NRG1 und ErbB4 (Benzel et al. 2007). Diese Befunde suggerieren das Vorhandensein eines pathogenetischen Netzwerkes (Kao et al. 2010).

Epigenetik

Die Rolle der Epigenetik könnte in der Aufklärung von phänotypischen Veränderungen liegen, welche durch veränderte Gensequenzen nicht erklärbar sind. Die genomische Prägung (*Imprinting*) beschreibt eine Veränderung der Genexpression aufgrund der Tatsache, dass entweder nur das maternale oder paternale Gen aktiv ist. Für das Imprinting erforderlich sind epigenetische Modifikationen wie z. B. Chromatin-Modifikationen oder DNA-Methylierungen an sogenannten Cytosin-phosphat-Guanin-(CpG-)Inseln, welche häufig in Promotorbereichen liegen und somit funktionell relevant sind. Imprinting stellt nicht nur die Ursache für neuropsychiatrische Erkrankungen wie das Angelman-Syndrom dar (Dagli et al.

2012), sondern wird auch für klinische Phänotypen diskutiert, die der Schizophrenie zugerechnet werden (Crespi und Badcock 2008).

Eine abweichende Genexpression aufgrund von Allel-Unterschieden (*biased allelic expression*), die wiederum durch Imprinting oder stochastische Vorgänge (*stochastic processes*) verursacht sind, konnte jüngst auch für NRG3 nachgewiesen werden (Lin et al. 2012).

6.4 Ausblick

Das Bemühen, NRG3 als sicheren Suszeptibilitätslocus für die Schizophrenie zu identifizieren, ist auch mit der vorliegenden Arbeit nicht möglich. Dies liegt zum einen daran, dass kaum Studien vorliegen, die dieselben Polymorphismen untersucht haben. Zum anderen ist eine Unterteilung des Patientenkollektivs, wie es in dieser Arbeit vorliegt, von anderen Forschungsgruppen der Schizophrenie noch nicht aufgegriffen worden. Zudem sind die Befunde dieser Studie, die zwar Signifikanz bzw. einen Trend dazu aufweisen, im direkten Vergleich der vier Patientengruppen in ihrer Schnittmenge wenig homogen. Außerdem ist zu beachten, dass auch die Ergebnisse anderer NRG3-Studien in keine einheitliche Richtung zeigen.

Dies wirft Fragen nach den Ursachen auf. Auch nach intensiver Erforschung können entscheidende genetische Unterschiede zwischen Erkrankten und Gesunden noch unbekannt bzw. bei den bekannten Gensequenzen ihre Bedeutung für die Pathogenese noch nicht ausreichend verstanden sein.

Möglich wäre auch, dass Kandidatengene wie z. B. NRG3 keine Auswirkung auf eine Manifestation der Erkrankung haben, und die gefundenen Assoziationen zufällig sind.

Dass es sich bei der Schizophrenie um eine schwer in Kategorien einordenbare Krankheit handelt, erschwert die Wissensgenerierung. Gerade daher sind neue Herangehensweisen hilfreich, wie z. B. die Operationalisierung einzelner quantitativer Merkmale bzw. Endophänotypen, die mit Schizophrenie häufig gekoppelt auftreten. Eine solche Verfeinerung der Diagnose Schizophrenie, Abstand nehmend von einem binären Status (Schizophrenie ja/nein), hin zu einem differenzierten Betrachten einzelner Charakteristika, kann wesentlich zum besseren Verständnis der entdeckten genetischen Differenzen beitragen.

6 Diskussion

Die technischen Möglichkeiten zur genomweiten Exploration entwickeln sich rasant. Genomweite Scans mit Hochdurchsatz-Sequenzierung haben sich heute fest etabliert, womit sich der Informationsstand im exponentiellen Maß quantitativ erweitert hat. Damit erhöht sich das Outcome auch qualitativ, da die Ergebnisse in Zusammenschau betrachtet werden können.

Angesichts der Problematik, dass viele Studien zu NRG3 und anderen Kandidatengen signifikante Ergebnisse erbrachten, die jedoch von Nachfolgeuntersuchungen nicht reproduziert werden konnten, deuten auf die Notwendigkeit von Rekrutierung großer Stichproben hin. Auch Metaanalysen sind diesbezüglich interessant, da sie eine effiziente Möglichkeit darstellen, Studien mit evtl. voneinander abweichenden Aussagen vergleichbar zu machen. Mit diesen Herangehensweisen können durch Vergrößerung der Stichprobe Genloci mit kleinsten Risikoeffekten gefunden werden, die sonst unerkannt bleiben würden.

Unter der Zielsetzung, bedeutende genetische Zusammenhänge der Schizophrenie aufzudecken, darf die Sorgfalt in der Auswahl der einzelnen Teilnehmer nicht leiden. Das Erkennen und der Ausschluss von psychiatrischen und somatischen Differenzialdiagnosen ist die Voraussetzung aussagekräftiger Ergebnisse. Auch in anderen Bereichen wie z. B. Ethnie gilt es, bestmögliche Übereinstimmungen in der Kohorte zu erreichen.

Allerdings ist man von einer validen individuellen Risikoeinschätzung auf Grundlage genetischer Befunde noch weit entfernt. Diesbezüglich wird weiterhin die Rekrutierung großer Kohorten notwendig sein. Die vorliegende Studie liefert einen moderaten Beitrag dazu.

7 Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
5-HT	5-Hydroxytryptamin, Serotonin
95%-KI	95%-Konfidenzintervall
bp	Basenpaare
CD-Cluster	<i>cognitive deficit</i> -Cluster
cM	Centimorgan
CNV	Genkopieanzahlvariante, <i>Copy number variation</i>
CPT-DS	<i>Degraded-stimulus continuous performance task</i>
CS-Cluster	<i>cognition spared</i> -Cluster
CT	Computertomographie
D'	<i>linkage disequilibrium</i> Determinant
DNA	<i>Desoxynucleinacid</i> , Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat
DSM-IV	<i>Diagnostic and Statistic Manual for Mental Disorders, fourth edition</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	<i>Epidermal growth factor</i>
EGFR	<i>Epidermal growth factor receptor</i>
ErbB	<i>Erythroblastic leukemia viral oncogene homolog</i>
ErbBR	<i>Erythroblastic leukemia viral oncogene homolog receptor</i>
GABA	Gamma-Amino-Buttersäure
gDNA	genomische DNA
GHCl	Guanidiniumhydrochlorid
GSMA	<i>genome scan meta-analysis</i>
GWAS	genomweite Assoziationsstudie
hFBNRG3	<i>human foetal brain neuregulin 3</i>
HLOD	<i>Heterogeneity logarithm of odds</i>
HWE	Hardy-Weinberg-Equilibrium
ICD-10	<i>International Classification of Diseases, tenth edition</i>
Ig	Immunglobulin
IHC	<i>International HapMap Consortium</i>
ISC	<i>International Schizophrenia Consortium</i>
kb	Kilobasenpaare
LD	Kopplungsungleichgewicht, <i>linkage disequilibrium</i>
LOD	<i>logarithm of odds</i>
LSD	Lysergsäurediethylamid
MAF	<i>minor allele frequency</i>
MALDI	<i>Matrix-assisted Laser Desorption/Ionisation</i>
MHC	<i>major histocompatibility complex</i>
mRNA	<i>messenger</i> -Ribonukleinsäure
MRT	Magnetresonanztomographie
MSP	<i>multiple scan probability</i>
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
NPL-Score	<i>nonparametric linkage score</i>
NRG	Neuregulin
OPCRIT	<i>Operational Criteria Checklist for Psychotic Illness</i>
PANSS	<i>Positive and Negative Syndrome Scale</i>
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCP	Phencyclidin
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> (Polymerase-Kettenreaktion)
r ²	Quadrat des Korrelationskoeffizienten
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	<i>revolutions per minute</i> , Umdrehungen pro Minute
RTK	Rezeptortyrosinkinase
SAP	<i>Shrimp Alkaline Phosphatase</i>
SBE	Einzelbasenveränderung, <i>single base extension</i>
SKID	Strukturiertes klinisches Interview nach DSM-IV-Kriterien
SNP	Einzelbasenpolymorphismus, <i>single nucleotide polymorphism</i>
SPEM	<i>smooth pursuit eye movement</i>
TMT	<i>Trail Making Test</i>
TOF	<i>time of flight</i>
ZNS	Zentralnervensystem

8 Literaturverzeichnis

Abi-Dargham A, Moore H (2003): Prefrontal DA transmission at D1 receptors and the pathology of schizophrenia. *Neuroscientist* 9(5): 404-416

Aleman A, Kahn RS, Selten JP (2003): Sex differences in the risk of schizophrenia: evidence from meta-analysis. *Arch Gen Psychiatry* 60(6): 565-571

Alex KD, Pehek EA (2007): Pharmacologic mechanisms of serotonergic regulation of dopamine neurotransmission. *Pharmacol Ther* 113(2): 296-320

Alroy I, Yarden Y (1997): The ErbB signaling network in embryogenesis and oncogenesis: signal diversification through combinatorial ligand-receptor interactions. *FEBS Lett* 410(1): 83-86

American Psychiatric Association (eds., 1994): *Diagnostic and statistical manual of mental disorders* (4th ed., DSM-IV). Washington DC: American Psychiatric Association.

Andreasen NC (1999): A unitary model of schizophrenia: Bleuler's "fragmented phrene" as schizencephaly. *Arch Gen Psychiatry* 56(9): 781-787

Andreasen NC, Olsen S (1982): Negative v positive schizophrenia. Definition and validation. *Arch Gen Psychiatry* 39(7): 789-794

Anton ES, Ghashghaei HT, Weber JL, McCann C, Fischer TM, Cheung ID, Gassmann M, Messing A, Klein R, Schwab MH, Lloyd KC, Lai C (2004): Receptor tyrosine kinase ErbB4 modulates neuroblast migration and placement in the adult forebrain. *Nat Neurosci* 7(12): 1319-1328

Assimacopoulos S, Grove EA, Ragsdale CW (2003): Identification of a Pax6-dependent epidermal growth factor family signaling source at the lateral edge of the embryonic cerebral cortex. *J Neurosci* 23(16): 6399-6403

Avila MT, Hong LE, Moates A, Turano KA, Thaker GK (2006): Role of anticipation in schizophrenia-related pursuit initiation deficits. *J Neurophysiol* 95(2): 593-601

Badner JA, Gershon ES (2002): Meta-analysis of whole-genome linkage scans of bipolar disorder and schizophrenia. *Mol Psychiatry* 7(4): 405-411

Bae JS, Pasaje CF, Park BL, Cheong HS, Kim JH, Kim JY, Shin JG, Park CS, Kim BJ, Lee CS, Lee M, Choi WH, Shin TM, Hwang J, Shin HD, Woo SI (2012): Genetic association analysis of ErbB4 polymorphisms with the risk of schizophrenia and SPEM abnormality in a Korean population. *Brain Res* 1466: 146-151

Balciuniene J, Feng N, Iyadurai K, Hirsch B, Charnas L, Bill BR, Easterday MC, Staaf J, Oseth L, Czapansky-Beilman D, Avramopoulos D, Thomas GH, Borg A, Valle D, Schimmenti LA, Selleck SB (2007): Recurrent 10q22-q23 deletions: a genomic disorder an 10q associated with cognitive and behavioral abnormalities. *Am J Hum Genet* 80(5): 938-947

8 Literaturverzeichnis

Banerjee A, Macdonald ML, Bergmann-Winter KE, Hahn CG (2010): Neuregulin1-erbB4 pathway in schizophrenia: From genes to an interactome. *Brain Res Bull* 83(3-4): 132-139

Bebbington P, Kuipers E (2003): Schizophrenia and psychosocial stresses. In: Hirsch SR, Weinberger DR: Schizophrenia. Second Edition. Blackwell Science, Oxford UK

Benes FM, Berretta S (2001): GABAergic interneurons: Implications for understanding Schizophrenia and bipolar disorder. *Neuropsychopharmacology* 25(1): 1-27

Benson DA, Karsch-Mizrachi I, Lipman DJ, Ostell J, Wheeler DL (2004): GenBank: update. *Nucleic Acids Res* 32 (Database issue): D23–D26

Benzel I, Bansal A, Browning BL, Galwey NW, Maycox PR, McGinnis R, Smart D, St Clair D, Yates F, Purvis I (2007): Interactions among genes in the ErbB-Neuregulin signalling network are associated with increased susceptibility to schizophrenia. *Behav Brain Funct* 3:31

Berger M (2008): Psychische Erkrankungen; Klinik und Therapie; unter systematischer Berücksichtigung von Übersichtsarbeiten der Cochrane-Collaboration und des Centre for Reviews and Dissemination. Urban & Fischer Verlag, München

Berrettini WH (2000): Are schizophrenic and bipolar disorders related? A review of family and molecular studies. *Biol Psychiatry* 48(6): 531-538

Bickeböller H, Fischer C (2007): Einführung in die Genetische Epidemiologie. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg

Bleich A, Brown SL, Kahn R, van Praag HM (1988): The role of serotonin in schizophrenia. *Schizophr Bull* 14(2): 297–315

Bleuler E (1911): Dementia praecox oder Gruppe der Schizophrenien. In: Aschaffenburg G (ed): Handbuch der Psychiatrie. Deuticke Verlag, Leipzig

Bleuler M (1972): Die schizophrenen Geistesstörungen im Lichte langjähriger Kranken- und Familiengeschichten. Thieme Verlag, Stuttgart

Boer S, Berk M, Dean B (2009): Levels of neuregulin 1 and 3 in Brodmann's area 46 from subjects with schizophrenia and bipolar disorder. *Neurosci Lett* 466(1): 27-29

Bogerts B (1995): Hirnstrukturelle Untersuchungen an schizophrenen Patienten. In: Lieb K, Riemann D, Berger M (Hrsg): Biologisch-psychiatrische Forschung. Ein Überblick. Fischer Verlag, Stuttgart, Jena

Boteva K, Lieberman J (2003): Reconsidering the classification of schizophrenia and manic depressive illness – a critical analysis and new conceptual model. *World J Biol Psychiatry* 4(2): 81–92

Bottlender R, Strauss A, Möller HJ (2000): Impact of duration of symptoms prior to first hospitalization on acute outcome in 998 schizophrenic patients. *Schizophr Res* 44(2): 145–150

8 Literaturverzeichnis

- Bowers MB Jr, Hoffman FJ Jr (1984): Homovanillic acid in rat caudate and prefrontal cortex following phencyclidine and amphetamine. *Psychopharmacology* 84(1): 136–137
- Braff DL, Freedman R, Schork NJ, Gottesman II (2007): Deconstructing schizophrenia: an overview of the use of endophenotypes in order to understand a complex disorder. *Schizophr Bull* 33(1): 21-32
- Braun I, Genius J, Grunze H, Bender A, Möller HJ, Rujescu D (2007): Alterations of hippocampal and prefrontal GABAergic interneurons in an animal model of psychosis induced by NMDA receptor antagonism. *Schizophr Res* 97(1-3): 254-263
- Breitbart RE, Andreadis A, Nadal-Ginard B (1987): Alternative splicing: a ubiquitous mechanism for the generation of multiple isoforms from single genes. *Annu Rev Biochem* 56: 467-495
- Britsch S (2007): The neuregulin-I/ErbB signaling system in development and disease. *Adv Anat Embryol Cell Biol* 190: 1-65
- Brown GW, Birley JLT (1970): Social precipitants of severe psychiatric disorders. In: Hare EH, Wing JK (eds) *Psychiatric epidemiology*. Oxford University Press, London
- Brown GW, Birley JLT, Wing JK (1972): Influence of family life on the course of schizophrenic disorders: A replication. *British Journal of Psychiatry* 121: 241–258
- Bublil EM, Yarden Y (2007): The EGF receptor family: spearheading a merger of signaling and therapeutics. *Curr Opin Biol* 19(2): 124-134
- Buonanno A (2010): The neuregulin signaling pathway and schizophrenia: from genes to synapses and neural circuits. *Brain Res Bull* 83(3-4): 122-131
- Buonanno A, Fischbach GD (2001): Neuregulin and ErbB receptor signaling pathways in the nervous system. *Curr Opin Neurobiol* 11(3): 287-296
- Burden S, Yarden Y (1997): Neuregulins and their receptors: a versatile signaling module in organogenesis and oncogenesis. *Neuron* 18(6): 847-855
- Byrne M, Agerbo E, Bennedsen B, Eaton WW, Mortensen PB (2007): Obstetric conditions and risk of first admission with schizophrenia: a Danish national register based study. *Schizophr Res* 97(1-3): 51-59
- Cabedo H, Luna C, Fernandez AM, Gallar J, Ferrer-Montiel A (2002): Molecular determinants of the sensory and motor neuron-derived factor insertion into plasma membrane. *J Biol Chem* 277(22): 19905-19912
- Cahn W, Hulshoff Pol HE, Lems EB, van Haren NE, Schnack HG, van der Linden JA, Schothorst PF, van Engeland H, Kahn RS (2002): Brain volume changes in first-episode schizophrenia: a 1-year follow-up study. *Arch Gen Psychiatry* 59(11): 1002–1010
- Cahn W, van Haren NE, Hulshoff Pol HE, Schnack HG, Caspers E, Laponder DA, Kahn RS (2006): Brain volume changes in the first year of illness and 5-year outcome of schizophrenia. *Br J Psychiatry* 189: 381–382

8 Literaturverzeichnis

- Calaora V, Rogister B, Bismuth K, Murray K, Brandt H, Leprince P, Marchionni M, Dubois-Dalcq M (2001): Neuregulin signaling regulates neural precursor growth and the generation of oligodendrocytes in vitro. *J Neurosci* 21(13): 4740-4751
- Cannon-Spoor HE, Potkin SG, Wyatt RJ (1982): Measurement of premorbid adjustment in chronic schizophrenia. *Schizophr Bull* 8(3): 470-484
- Cardno AG, Gottesman II (2000): Twin studies of schizophrenia: from bow-and-arrow concordances to star wars Mx and functional genomics. *Am J Med Genet* 97(1): 12-17
- Carpenter G (2003): ErbB-4: mechanism of action and biology. *Exp Cell Res* 284(1): 66-77
- Carteron C, Ferrer-Montiel A, Cabedo H (2006): Characterization of a neural-specific splicing form of the human neuregulin 3 gene involved in oligodendrocyte survival. *J Cell Sci* 119(Pt5): 898-909
- Chen PL, Avramopoulos D, Lasseter VK, McGrath JA, Fallin MD, Liang KY, Nestadt G, Feng N, Steel G, Cutting AS, Wolynec F, Pulver AE, Valle D (2009): Fine mapping on chromosome 10q22-q23 implicates Neuregulin 3 in schizophrenia. *Am J Hum Genet* 84(1): 21-34
- Chen YJ, Johnson MA, Lieberman MD, Goodchild RE, Schobel S, Lewandowski N, Rosoklija G, Liu RC, Gingrich JA, Small S, Moore H, Dwork AJ, Talmage DS, Role LW (2008): Type III neuregulin-1 is required for normal sensorimotor gating, memory-related behaviours, and corticostriatal circuit components. *J Neurosci* 28(27): 6872-6883
- Ciampi L, Müller C (1976): *Lebensweg und Alter der Schizophrenen. Eine katamnestiche Langzeitstudie bis ins Senium.* Springer Verlag, Berlin
- Clarke GM, Anderson CA, Pettersson FH, Cardon LR, Morris AP, Zondervan KT (2011): Basic statistical analysis in genetic case-control studies. *Nat Protoc* 6(2): 121-133
- Clarke MC, Harley M, Cannon M (2006): The role of obstetric events in schizophrenia. *Schizophr Bull* 32(1):3-8
- Cohen CI, Palekar N, Barker J, Ramirez PM (2012): The relationship between trauma and clinical outcome variables among older adults with schizophrenia spectrum disorders. *Am J Psychiatry* 20(5): 408-415
- Comer RJ (2001): *Klinische Psychologie. 2. deutsche Auflage.* Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg
- Cook RS, Garrett JT, Sánchez V, Stanford JC, Young C, Chakrabarty A, Rinehart C, Zhang Y, Wu Y, Greenberger L, Horak ID, Arteaga CL (2011): ErbB3 ablation impairs PI3K/Akt-dependent mammary tumorigenesis. *Cancer Res* 71 (11): 3941-3951
- Corfas G, Roy K, Buxbaum JD (2004): Neuregulin 1-ErbB signaling and the molecular/cellular basis of schizophrenia. *Nat Neurosci* 7(6): 575-580
- Coyle JT, Tsai G, Goff D (2003): Converging evidence of NMDA receptor hypofunction in the pathophysiology of schizophrenia. *Ann N Y Acad Sci* 1003: 318-327

8 Literaturverzeichnis

Craddock N, O'Donovan MC, Owen MJ (2007): Phenotypic and genetic complexity of psychosis. Invited commentary on ... schizophrenia: a common disease caused by multiple rare alleles. *Br J Psychiatry* 190: 200-203

Craddock N, Owen MJ (2005): The beginning of the end for the Kraepelinian dichotomy. *Br J Psychiatry* 186: 364-366

Craddock N, Owen N (2007): Rethinking psychosis: the disadvantages of a dichotomous classification now outweigh the advantages. *World Psychiatry* 6(2): 84-91

Crespi B, Badcock C (2008): Psychosis and autism as diametrical disorders of the social brain. *Behav Brain Sci* 31(3): 241-261

Crow TJ (1980): Molecular pathology of schizophrenia: more than one disease process? *Br Med J* 280(6207): 66-68

Cutting J (2003): Descriptive psychopathology. In: Hirsch SR & Weinberger DR: *Schizophrenia*. Second Edition. Blackwell Science, Oxford UK

Dagli A, Buiting K, Williams CA (2012): Molecular and clinical aspects of Angelman Syndrome. *Mol Syndromol* 2(3-5): 100-112

Davis KL, Kahn RS, Ko G, Davidson M (1991): Dopamine in schizophrenia: a review and reconceptualization. *Am J Psychiatry* 148(11): 1474-1486

Dean K, Bramon E, Murray RM (2003): The causes of schizophrenia: neurodevelopment and other risk factors. *J Psychiatr Pract* 9(6): 442-454

DeLisi LE (2008): The effect of cannabis on the brain: can it cause brain anomalies that lead to increased risk for schizophrenia? *Curr Opin Psychiatry* 21(2): 140-150

DeLisi LE, Sakuma M, Maurizio AM, Relja M, Hoff AL (2004): Cerebral ventricular change over the first 10 years after the onset of schizophrenia. *Psychiatry Res* 130(1): 57-70

Demling J (1988): Zur Suizidalität schizophrener Erkrankter: klinische und biologische Aspekte. In: Kaschka WP, Joraschky P, Lungershausen E (Hrsg): *Die Schizophrenie. Biologische und familiendynamische Konzepte zur Pathogenese*. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg

Dunham HW (1965): *Community and schizophrenia: An epidemiological analysis*. Wayne State University Press, Detroit

Dunn M, Sinha P, Campbell R, Blackburn E, Levinson N, Rampaul R, Bates T, Humphreys S, Gullick WJ (2004): Co-expression of neuregulin 1, 2, 3 and 4 in human breast cancer. *J Pathol* 203(2): 672-680

Eaton WW (1985): Epidemiology of schizophrenia. *Epidemiol Rev* 7: 105-126

Ebert T, Kotler M (2005): Prenatal exposure to influenza and the risk of subsequent development of schizophrenia. *Isr Med Assoc J* 7(1): 35-38

8 Literaturverzeichnis

Eilam R, Pinkas-Kramarski R, Ratzkin BJ, Segal M, Yarden Y (1998): Activity-dependent regulation of Neu differentiation factor/neuregulin expression in rat brain. *Proc Natl Acad Sci USA* 95(4): 1885-1893

Emsley R, Chiliza B, Schoeman R (2008): Predictors of long-term outcome in schizophrenia. *Curr Opin Psychiatry* 21(2): 173-177

Fallin MD, Lasseter VK, Avramopoulos D, Nicodemus KK, Wolyniec PS, McGrath JA, Steel G, Nestadt G, Liang KY, Haganir RL, Valle D, Pulver AE (2005): Bipolar I disorder and schizophrenia: a 440-single-nucleotide polymorphism screen of 64 candidate genes among Ashkenazi Jewish case-parent trios. *Am J Hum Genet* 77(6): 918-936

Fallin MD, Lasseter VK, Wolyniec PS, McGrath JA, Nestadt G, Valle D, Liang KY, Pulver AE (2003): Genomewide linkage scan for schizophrenia susceptibility loci among Ashkenazi Jewish families shows evidence of linkage on chromosome 10q22. *Am J Hum Genet* 73(3): 601-611

Falls DL (2003): Neuregulins: functions, forms, and signaling strategies. *Exp Cell Res* 284(1): 14-30

Falls DL, Rosen KM, Corfas G, Lane WS, Fischbach GD (1993): ARIA, a protein that stimulates acetylcholine receptor synthesis, is a member of the neu ligand family. *Cell* 72(5): 801-815

Fanous AH, Kendler KS (2005): Genetic heterogeneity, modifier genes, and quantitative phenotypes in psychiatric illness: searching for a framework. *Mol Psychiatry* 10(1): 6-13

Faraone SV, Hwu HG, Liu CM, Chen WJ, Tsuang MM, Liu SK, Shieh MH, Hwang TJ, Ou-Yang WC, Chen CY, Chen CC, Lin JJ, Chou FH, Chueh CM, Liu WM, Hall MH, Su J, Van Eerdewegh F, Tsuang MT (2006): Genome scan of Han Chinese schizophrenia families from Taiwan: confirmation of linkage to 10q22.3. *Am J Psychiatry* 163(10): 1760-1766

Flames N, Long JE, Garratt AN, Fischer TM, Gassmann M, Birchmeier C, Lai C, Rubenstein JL, Marin O (2004): Short- and long-range attraction of cortical GABAergic interneurons by neuregulin-1. *Neuron* 44(2): 251-261

Freudenberg J, Freudenberg-Hua Y (2012): Testing the genomic enrichment of a large copy number variation within schizophrenia linkage regions. *Psychiatr Genet* 22(6): 294-297

Galvez-Buccollini JA, Proal AC, Tomaselli V, Trachtenberg M, Coconcea C, Chun J, Manschreck T, Fleming J, Delisi LE (2012): Association between age at onset of psychosis and age at onset of cannabis use in non-affective psychosis. *Schizophr Res* 139(1-3): 157-160

Garcia RA, Vasudevan K, Buonanno A (2000): The neuregulin receptor ErbB-4 interacts with PDZ-containing proteins at neuronal synapses. *Proc Natl Acad Sci USA* 97(7): 3596-3601

Gejman PV, Sanders AR, Duan J (2010): The role of genetics in the etiology of schizophrenia. *Psychiatr Clin North Am* 33(1): 35-66

Genecards (2013): <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=NRG3&search=nrg3>

Gibbons AS, Scarr E, McLean C, Sundram S, Dean B (2009): Decreased muscarinic receptor binding in the frontal cortex of bipolar disorder and major depressive disorder subjects. *J Affect Disord* 116(3): 184-191

8 Literaturverzeichnis

Gizatullin RZ, Muravenko OV, Al-Amin AN, Wang F, Protopopov AI, Kashuba VI, Zelenin AV, Zabarovsky ER (2000): Human NRG3 gene Map position 10q22-q23. *Chromosome Res* 8(6): 560

Goldshmit Y, Erlich S, Pinkas-Kramarski R (2001): Neuregulin rescues PC12-ErbB4 cells from cell death induced by H₂O₂. Regulation of reactive oxygen species levels by phosphatidylinositol 3-kinase. *J Biol Chem* 276(49): 46379-46385

Gonzalez-Maeso J, Ang RL, Yuen T, Chan P, Weisstaub NV, Lopez-Gimenez JF, Zhou M, Okawa Y, Callado LF, Milligan G, Gingrich JA, Filizola M, Meana JJ, Sealfon SC (2008): Identification of a serotonin/glutamate receptor complex implicated in psychosis. *Nature* 452(7183): 93-97

Goodearl AD, Davis JB, Mistry K, Minghetti L, Otsu M, Waterfield MD, Stroobant P (1993): Purification of multiple forms of glial growth factor. *J Biol Chem* 268(24): 18095-18102

Gottesman II, Gould TD (2003): The endophenotype concept in psychiatry: etymology and strategic intentions. *Am J Psychiatry* 160(4): 636-645

Guma A, Martinez-Redondo V, Lopez-Soldado I, Canto C, Zorzano A (2009): Emerging role of neuregulin as a modulator of muscle metabolism. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 298(4): E742-E750

Gururajan A, Manning EE, Klug M, van den Buuse M (2012): Drugs of abuse and increased risk of psychosis development. *Aust N Z J Psychiatry* 46(12): 1120-1135

Häfner H (2003): Gender differences in schizophrenia. *Psychoneuroendocrinol* 28 (2): 17-54

Häfner H (2005): *Das Rätsel Schizophrenie. Eine Krankheit wird entschlüsselt. 3. Auflage. C.H. Beck Verlag, München*

Häfner H, an der Heiden W (2000): Methodische Probleme der Verlaufsforschung an der Schizophrenie. *Fortschr Neurol Psychiatr* 68: 193-205

Häfner H, an der Heiden W (2003): Course and outcome of schizophrenia. In: Hirsch SR, Weinberger DR: *Schizophrenia. Second Edition. Blackwell, Oxford UK*

Haff LA, Smirnov IP (1997): Single-nucleotide polymorphism identification assays using a thermostable DNA polymerase and delayed extraction MALDI-TOF mass spectrometry: *Genome Res* 7(4): 378-388

van Haren NE, Cahn W, Hulshoff Pol HE, Kahn RS (2008): Schizophrenia as a progressive brain disease. *Eur Psychiatry* 23(4): 245-254

Harrison PJ, Weinberger DR (2005): Schizophrenia genes, gene expression, and neuropathology: on the matter of their convergence. *Mol Psychiatry* 10(1): 40-68

Hashimoto R, Straub RE, Weickert CS, Hyde TM, Kleinman JE, Weinberger DR (2004): Expression analysis of neuregulin-1 in the dorsolateral prefrontal cortex in schizophrenia. *Mol Psychiatry* 9(3): 299-307

8 Literaturverzeichnis

- Hatzimanolis A, McGrath JA, Wang R, Li T, Wong PC, Nestadt G, Wolyniec PS, Valle D, Pulver AE, Avramopoulos D (2013): Multiple variants aggregate in the neuregulin signaling pathway in a subset of schizophrenia patients. *Transl Psychiatry* e264. doi: 10.1038/tp.2013.33
- Heckers S (2009): Is schizoaffective disorder a useful diagnosis? *Curr Psychiatry Rep* 11(4): 332-337
- Hill WG, Robertson A (1968): Linkage disequilibrium in finite populations. *Theor Appl Genet* 38 (6): 226–231
- Holmes WE, Sliwkowski MX, Akita RW, Henzel WJ, Lee J, Park JW, Yansura D, Abadi N, Raab H, Lewis GD (1992): Identification of heregulin, a specific activator of p185erbB2. *Science* 256(5060): 1205–1210
- Howard B, Panchal H, McCarthy A, Ashworth A (2005): Identification of the scaramanga gene implicates Neuregulin3 in mammary gland specification. *Genes Dev* 19(17): 2078-2090
- Huang YZ, Won S, Ali DW, Wang Q, Tanowitz M, Du QS, Pelkey KA, Yang DJ, Xiong WC, Salter MW, Mei L (2000): Regulation of neuregulin signaling by PSD-95 interacting with ErbB4 at CNS synapses. *Neuron* 26(2): 443-455
- Hubbard SR, Till JH (2000): Protein tyrosine kinase structure and function. *Annu Rev Biochem* 69: 373–398
- Huber G, Gross G, Schüttler R (1979): Schizophrenie. Eine verlaufs- und sozialpsychiatrische Langzeitstudie. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg
- Hultman CM, Ohman A, Cnattingius S, Wieselgren IM, Lindström LH (1997): Prenatal and neonatal risk factors for schizophrenia. *Br J Psychiatry* 170: 128-133
- Hynes NE, Horsch K, Olayioye MA, Badache A (2001): The ErbB receptor tyrosine family as signal integrators. *Endocr Relat Cancer* 8(3): 151-159
- Ingraham LJ, Kety SS (2000): Adoption studies of schizophrenia. *Am J Med Genet* 97(1): 18-22
- International HapMap Consortium (IHC): The International HapMap Project (2012): <http://hapmap.ncbi.nlm.nih.gov/>
- International HapMap Consortium (IHC): The International HapMap Project, Hapmap Data Phase III (2014): http://hapmap.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-perl/gbrowse/hapmap3r2_B36/
- International Schizophrenia Consortium (ISC, 2008): Rare chromosomal deletions and duplications increase risk of schizophrenia. *Nature* 455(7210): 237–241
- International Schizophrenia Consortium, Purcell SM, Wray NR, Stone JL, Visscher PM, O'Donovan MC, Sullivan PF, Sklar P (2009): Common polygenic variation contributes to risk of schizophrenia and bipolar disorder. *Nature* 460(7256): 748-752
- Jablensky A (2006): Subtyping schizophrenia: implications for genetic research. *Mol Psychiatry* 11(9): 815-836
- Joyce EM, Hutton SB, Mutsatsa SH, Barnes TR (2005): Cognitive heterogeneity in first-episode schizophrenia. *Br J Psychiatry* 187: 516-522

8 Literaturverzeichnis

Kabat JL, Barberan-Soler S, McKenna P, Clawson H, Farrer T, Zahler AM (2006): Intronic alternative splicing regulators identified by comparative genomics in nematodes. *PLoS Comput Biol* 2(7): e86

Kane JM, Möller HJ, Awouters F (1996): Serotonin in antipsychotic treatment – Mechanisms and clinical practice. Dekker Verlag, New York, Basel

Kao WT, Wang Y, Kleinman JE, Lipska BK, Hyde TM, Weinberger DR, Law AJ (2010): Common genetic variation in Neuregulin 3 (NRG3) influences risk for schizophrenia and impacts NRG3 expression in human brain. *PNAS* 107(35): 15619-15624

Kasanin J (1933): The acute schizoaffective psychoses. *Am J Psychiatry* 13: 97-126

Kay SR, Fiszbein A, Opler LA (1987): The positive and negative syndrome scale (PANSS) for schizophrenia. *Schizophr Bull* 13(2): 261-276

Kendler KS, Gruenberg AM, Kinney DK (1994): Independent diagnoses of adoptees and relatives as defined by DSM-III in the provincial and national samples of the Danish Adoption Study of Schizophrenia. *Arch Gen Psychiatry* 51(6): 456-468

Keri S, Kelemen O, Benedek G, Janka Z (2001): Different trait markers for schizophrenia and bipolar disorder: a neurocognitive approach. *Psychol Med* 31(5): 915-922

Kerns JG, Lauriello J (2012): Can structural neuroimaging be used to define phenotypes and course of schizophrenia? *Psychiatr Clin North Am* 35(3): 633-644

Kirov G, Gumus D, Chen W, Norton N, Georgieva L, Sari M, O'Donovan MC, Erdogan F, Owen MJ, Ropers HH, Ullmann R (2008): Comparative genome hybridization suggests a role for NRXN1 and APBA2 in schizophrenia. *Hum Mol Genet* 17(3): 458-465

Kirov G, Grozeva D, Norton N, Ivanov D, Mantripragada KK, Holmans P, International Schizophrenia Consortium, Wellcome Trust Case Control Consortium, Craddock N, Owen MJ, O'Donovan MC (2009): Support for the involvement of large copy number variants in the pathogenesis of schizophrenia. *Hum Mol Genet* 18(8): 1497-1509

Konstantareas MM, Hewitt T (2001): Autistic disorder and schizophrenia: diagnostic overlaps. *J Autism Dev Disord* 31(1): 19-28

Kraepelin E (1896): *Dementia praecox*. *Psychiatrie. Ein Lehrbuch für Studierende und Ärzte*. 5. Auflage. Barth Verlag, Leipzig

Kramer R, Bucay N, Kane DJ, Martin LE, Tarpley JE, Theill LE (1996): Neuregulins with an Ig-like domain are essential for mouse myocardial and neuronal development. *Proc Natl Acad Sci USA* 93(10): 4833-4838

Krystal JH, D'Souza DC, Mathalon D, Perry E, Belger A, Hoffman R (2003): NMDA receptor antagonist effects, cortical glutamatergic function, and schizophrenia: toward a paradigm shift in medication development. *Psychopharmacology (Berl)* 169(3-4): 215-233

Lander ES, Schork NJ (1994): Genetic dissection of complex traits. *Science* 265(5181): 2037-2048

8 Literaturverzeichnis

Law AJ, Kleinman JE, Weinberger DR, Weickert CS (2007): Disease-associated intronic variants in the ErbB4 gene are related to altered ErbB4 splice-variant expression in the brain in schizophrenia. *Hum Mol Genet* 16(2): 129-141

Law AJ, Lipska BK, Weickert CS, Hyde TM, Straub RE, Hashimoto R, Harrison PJ, Kleinman JE, Weinberger DR (2006): Neuregulin 1 transcripts are differentially expressed in schizophrenia and regulated by 5' SNPs associated with the disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 103(17): 6747-6752

Lenz T, Morgan TV, Athanasiou M, Dain B, Reed CR, Kane JM, Kucherlapati R, Malhotra AK (2007): Converging evidence for a pseudoautosomal cytokine receptor gene locus in schizophrenia. *Mol Psychiatry* 12(6): 572-580

Lewis CM, Levinson DF, Wise LH, DeLisi LE, Straub RE, Hovatta I, Williams NM, Schwab SG, Pulver AE, Faraone SV, Brzustowicz LM, Kaufmann CA, Garver DL, Gurling HM, Lindholm E, Coon H, Moises HW, Byerley W, Shaw SH, Mesen A, Sherrington R, O'Neill FA, Walsh D, Kendler KS, Ekelund J, Paunio T, Lönnqvist J, Peltonen L, O'Donovan MC, Owen MJ, Wildenauer DB, Maier W, Nestadt G, Blouin JL, Antonarakis SE, Mowry BJ, Silverman JM, Crowe RR, Cloninger CR, Tsuang MT, Malaspina D, Harkavy-Friedman JM, Svrakic DM, Bassett AS, Holcomb J, Kalsi G, McQuillin A, Brynjolfson J, Sigmundsson T, Petursson H, Jazin E, Zoëga T, Helgason T (2003): Genome scan meta-analysis of schizophrenia and bipolar disorder, part II: schizophrenia. *Am J Hum Genet* 73(1): 34-48

Lewis DA, Levitt P (2002): Schizophrenia as a disorder of neurodevelopment. *Annu Rev Neurosci* 25: 409-432

Lewontin RC (1964): The Interaction of Selection and Linkage. I. General Considerations; Heterotic Models. *Genetics* 49(1): 49-67

Li D, Collier DA, He L (2006): Meta-analysis shows strong positive association of the neuregulin 1 gene (NRG1) with schizophrenia. *Hum Mol Genet* 15(12): 1995-2002

Li H, Chou SJ, Hamasaki T, Perez-Garcia CG, O'Leary DD (2012): Neuregulin repellent signaling via ErbB4 restricts GABAergic interneurons to migratory paths from ganglionic eminence to cortical destinations. *Neural Dev* 7: 10

Lichtenstein P, Yip BH, Björk C, Pawitan Y, Cannon TD, Sullivan PF, Hultman CM (2009): Common genetic determinants of schizophrenia and bipolar disorder in Swedish families: a population-based study. *Lancet* 373(9659): 234-239

Lieberman JA, Perkins D, Belger A, Chakos M, Jarskog F, Boteva K, Gilmore J (2001a): The early stages of schizophrenia: speculations on pathogenesis, pathophysiology, and therapeutic approaches. *Biol Psychiatry* 50(11): 884-897

Lieberman J, Chakos M, Wu H, Alvir J, Hoffman E, Robinson D, Bilder R (2001b): Longitudinal study of brain morphology in first episode schizophrenia. *Biol Psychiatry* 49(6): 487-499

Lienert GA, Raatz U (1998): Testaufbau und Testanalyse. 6. Auflage. Beltz PsychologieVerlagsUnion, Weinheim

Limosin F, Rouillon F, Payan C, Cohen JM, Strub N (2003): Prenatal exposure to influenza as a risk factor for adult schizophrenia. *Acta Psychiatr Scand* 107(5): 331-335

Lin M, Hrabovsky A, Pedrosa E, Wang T, Zheng D, Lachman HM (2012): Allele-biased expression in differentiating human neurons: implications for neuropsychiatric disorders. *PLoS One* 7(8): e44017. doi: 10.1371/journal.pone.0044017

8 Literaturverzeichnis

- Lisman JE, Coyle JT, Green RW, Javitt DC, Benes FM, Heckers S, Grace AA (2008): Circuit-based framework for understanding neurotransmitter and risk gene interactions in schizophrenia. *Trends Neurosci* 31(5): 234-242
- Long W, Wagner KU, Lloyd KC, Binart N, Shillingford JM, Hennighausen L, Jones FE (2003): Impaired differentiation and lactational failure of ErbB4-deficient mammary glands identify ErbB4 as an obligate mediator of STAT5. *Development* 130(21): 5257–5268
- Longart M, Liu Y, Karavanova I, Buonanno A (2004): Neuregulin-2 is developmentally regulated and targeted to dendrites of central neurons. *J Comp Neurol* 472(2): 156-172
- Luby ED, Cohen BD, Rosenbaum G, Gottlieb JS, Kelley R (1959): Study of a new schizophrenomimetic drug: sernyl. *AMA Arch Neurol Psychiatry* 81(3): 363–369
- Lysaker PH, Larocco VA (2008): The prevalence and correlates of trauma-related symptoms in schizophrenia spectrum disorder. *Compr Psychiatry* 49(4): 330-334
- Ma L, Huang YZ, Pitcher GM, Valtschanoff JG, Ma YH, Feng LY, Lu B, Xiong WC, Salter MW, Weinberg RJ, Mei L (2003): Ligand-dependent recruitment of the ErbB4 signaling complex into neuronal lipid rafts. *J Neurosci* 23(8): 3164-3175
- Maier W, Lichtermann D, Minges J, Hallmayer J, Heun R, Benkert O, Levinson DF (1993): Continuity and discontinuity of affective disorders and schizophrenia. Results of a controlled family study. *Arch Gen Psychiatry* 50(11): 871-883
- Maier W, Lichtermann D, Rietschel M, Held T, Falkai P, Wagner M, Schwab S (1999): Genetik schizophrener Störungen. *Nervenarzt* 70(11): 955–969
- Malhotra D, Sebat J (2012): CNVs: harbingers of a rare variant revolution in psychiatric genetics. *Cell* 148(6): 1223-1241
- Marneros A, Deister A, Rohde A (1991): Affektive, schizoaffektive und schizophrene Psychosen. Eine vergleichende Langzeitstudie. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg
- McGue M, Gottesman II (1991): The genetic epidemiology of schizophrenia and the design of linkage studies. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* 240(3): 174-181
- McGuffin P, Farmer A, Harvey I (1991): A polydiagnostic application of operational criteria in studies of psychotic illness. Development and reliability of the OPCRIT system. *Arch Gen Psychiatry* 48(8): 764-770
- McGrath J, Saha S, Chant D, Welham J (2008): Schizophrenia: a concise overview of incidence, prevalence, and mortality. *Epidemiol Rev* 30: 67-76
- Meier S, Strohmaier J, Breuer R, Mattheisen M, Degenhardt F, Mühleisen TW, Schulze TG, Nöthen MM, Cichon S, Rietschel M, Wüst S (2013): Neuregulin 3 is associated with attention deficits in schizophrenia and bipolar disorder. *Int J Neuropsychopharmacol* 16(3): 549-556
- Meltzer HY (1989): Clinical studies on the mechanism of action of clozapine: The dopamine-serotonin hypothesis of schizophrenia. *Psychopharmacology (Berl)* 99: 18–27

8 Literaturverzeichnis

Meltzer HY, Sumiyoshi T (2008): Does stimulation of 5-HT (1A) receptors improve cognition in schizophrenia? *Behav Brain Res* 195(1): 98-102

Meyer U, Feldon J (2009): Neural basis of psychosis-related behaviour in the infection model of schizophrenia. *Behav Brain Res* 204(2): 322-334

Millar JK, Wilson-Annan JC, Anderson S, Christie S, Taylor MS, Semple CA, Devon RS, St Clair DM, Muir WJ, Blackwood DH, Porteous DJ (2000): Disruption of two novel genes by a translocation co-segregating with schizophrenia. *Hum Mol Genet* 9(9): 1415–1423

Moghaddam B, Krystal JH (2012): Capturing the angel in “angel dust”: twenty years of translational neuroscience studies of NMDA receptor antagonists in animals and humans. *Schizophr Bull* 38(5): 942-949

Möller HJ (2004): Course and long-term treatment of schizophrenic psychoses. *Pharmacopsychiatry* 37 Suppl 2: 126–135

Möller HJ, Deister A (2000): Schizophrenie. In Möller HJ, Laux G, Kapfhammer HP (2008): *Psychiatrie und Psychotherapie*. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg

Möller HJ, Laux G, Kapfhammer HP (2008): *Psychiatrie und Psychotherapie Bd. 2 Spezielle Psychiatrie*. 3. Auflage. Springer Verlag, Heidelberg

Möller HJ, von Zerssen D (1986): *Der Verlauf schizophrener Psychosen unter den gegenwärtigen Behandlungsbedingungen*. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg

Morar B, Dragovic M, Waters FA, Chandler D, Kalaydjieva L, Jablensky A (2011): Neuregulin 3 (NRG3) as a susceptibility gene in a schizophrenia subtype with florid delusions and relatively spared cognition. *Mol Psych* 16(8): 860-866

Munafo MR, Thiselton DL, Clark TG, Flint J (2006): Association of the NRG1 gene and schizophrenia: A meta-analysis. *Mol Psychiatry* 11(6): 539-546

Munafo MR, Attwood AS, Flint J (2008): Neuregulin 1 genotype and schizophrenia. *Schizophr Bull* 34(1): 9-12

Murphy KC, Jones LA, Owen MJ (1999): High rates of schizophrenia in adults with velo-cardio-facial syndrome. *Arch Gen Psychiatry* 56(10): 940–945

Murray RM, Lewis SW (1987): Is schizophrenia a neurodevelopmental disorder? *Br Med J (Clin Res Ed)* 295(6600): 681–682

Muthuswamy SK, Gilman M, Brugge JS (1999): Controlled dimerization of ErbB receptors provides evidence for differential signaling by homo- and heterodimers. *Mol Cell Biol* 19(10): 6845-6857

Nakata K, Lipska BK, Hyde TM, Ye T, Newburn EN, Morita Y, Vakkalanka R, Barenboim M, Sei Y, Weinberger DR, Kleinman JE (2009): DISC1 splice variants are upregulated in schizophrenia and associated with risk polymorphisms. *Proc Natl Acad Sci USA* 106(37): 15873-15878

8 Literaturverzeichnis

NCBI, Database of Single Nucleotide Polymorphisms (dbSNP). Bethesda (MD): National Center for Biotechnology Information, National Library of Medicine (2012): <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/>

Need AC, Ge D, Weale ME, Maia J, Feng S, Heinzen EL, Shianna KV, Yoon W, Kasperaviciute D, Gennarelli M, Strittmatter WJ, Bonvicini C, Rossi G, Jayathilake K, Cola PA, McEvoy JP, Keefe RS, Fisher EM, St Jean PL, Giegling I, Hartmann AM, Möller HJ, Ruppert A, Fraser G, Crombie C, Middleton LT, St Clair D, Roses AD, Muglia P, Francks C, Rujescu D, Meltzer HY, Goldstein DB (2009): A genome-wide investigation of SNPs and CNVs in schizophrenia. *PLoS Genet* 5(2): e1000373. doi: 10.1371/journal.pgen.1000373

Ng MY, Levinson DF, Faraone SV, Suarez BK, DeLisi LE, Arinami T, Riley B, Paunio T, Pulver AE, Irmansyah, Holmans PA, Escamilla M, Wildenauer DB, Williams NM, Laurent C, Mowry BJ, Brzustowicz LM, Maziade M, Sklar P, Garver DL, Abecasis GR, Lerer B, Fallin MD, Gurling HM, Gejman PV, Lindholm E, Moises HW, Byerley W, Wijsman EM, Forabosco P, Tsuang MT, Hwu HG, Okazaki Y, Kendler KS, Wormley B, Fanous A, Walsh D, O'Neill FA, Peltonen L, Nestadt G, Lasseter VK, Liang KY, Papadimitriou GM, Dikeos DG, Schwab SG, Owen MJ, O'Donovan MC, Norton N, Hare E, Raventos H, Nicolini H, Albus M, Maier W, Nimgaonkar VL, Terenius L, Mallet J, Jay M, Godard S, Nertney D, Alexander M, Crowe RR, Silverman JM, Bassett AS, Roy MA, Mérette C, Pato CN, Pato MT, Roos JL, Kohn Y, Amann-Zalcenstein D, Kalsi G, McQuillin A, Curtis D, Brynjolfson J, Sigmundsson T, Petursson H, Sanders AR, Duan J, Jazin E, Myles-Worsley M, Karayiorgou M, Lewis CM (2009): Meta-analysis of 32 genome-wide linkage studies of schizophrenia. *Mol Psychiatry* 14(8): 774-785

Nicodemus KK, Luna A, Vakkalanka R, Goldberg T, Egan M, Straub RE, Weinberger DR (2006): Further evidence for association between ErbB4 and schizophrenia and influence on cognitive intermediate phenotypes in healthy controls. *Mol Psychiatry* 11(12):1062-1065

Norton N, Moskva V, Morris DW, Bray NJ, Zammit S, Williams NM, Williams HJ, Preece AC, Dwyer S, Wilkinson JC, Spurlock G, Kirov G, Buckland P, Waddington JL, Gill M, Corvin AP, Owen MJ, O'Donovan MC (2006): Evidence that interaction between neuregulin 1 and its receptor erbB4 increases susceptibility to schizophrenia. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 141B(1): 96-101

Norton N, Williams HJ, Owen MJ (2006): An update on the genetics of schizophrenia. *Curr Opin Psychiatry* 19(2): 158-164

Nuechterlein KH (1983): Signal detection in vigilance tasks and behavioural attributes among offspring of schizophrenic mothers and among hyperactive children. *J Abnorm Psychol* 92(1): 4-28

Nurtdinov RN, Artamonova II, Mironov AA, Gelfand MS (2003): Low conservation of alternative splicing patterns in the human and mouse genomes. *Hum Mol Genet* 12(11): 1313-1320

Ochoa S, Usall J, Cobo J, Labad X, Kulkarni J (2012): Gender differences in schizophrenia and first-episode psychosis: a comprehensive literature review. *Schizophr Res Treatment* 2012. doi: 10.1155/2012/916198

O'Donovan MC, Craddock N, Norton N, Williams H, Peirce T, Moskva V, Nikolov I, Hamshere M, Carroll L, Georgieva L, Dwyer S, Holmans P, Marchini JL, Spencer CC, Howie B, Leung HT, Hartmann AM, Möller HJ, Morris DW, Shi Y, Feng G, Hoffmann P, Propping P, Vasilescu C, Maier W, Rietschel M, Zammit S, Schumacher J, Quinn EM, Schulze TG, Williams NM, Giegling I, Iwata N, Ikeda M, Darvasi A, Shifman S, He L, Duan J, Sanders AR, Levinson DF, Gejman PV, Cichon S, Nöthen MM, Gill M, Corvin A, Rujescu D, Kirov G, Owen MJ, Buccola NG, Mowry BJ, Freedman R, Amin F, Black DW,

8 Literaturverzeichnis

- Silverman JM, Byerley WF, Cloninger CR; Molecular Genetics of Schizophrenia Collaboration (2008): Identification of loci associated with schizophrenia by genome-wide association and follow-up. *Nat Genet* 40(9): 1053-1055
- Omerovic J, Puggioni EM, Napoletano S, Visco V, Fraioli R, Frati L, Gulino A, Alimandi M (2004): Ligand-regulated association of ErbB-4 of the transcriptional co-activator YAP65 controls transcription at the nuclear level. *Exp Cell Res* 294(2): 469-479
- Owen MJ (2000): Molecular genetic studies of schizophrenia. *Brain Res Brain Res Rev* 31(2-3): 179-186
- Owen MJ, Craddock N, O'Donovan MC (2005): Schizophrenia: genes at last? *Trends Genet* 21(9): 518-525
- Pantelis C, Yucel M, Wood SJ, Velakoulis D, Sun D, Berger G, Stuart GW, Yung A, Philips L, McGorry PD (2005): Structural brain imaging evidence for multiple pathological processes at different stages of brain development in schizophrenia. *Schizophr Bull* 31(3): 672-696
- Pasaje CF, Bae JS, Park BL, Cheong HS, Kim JH, Park TJ, Lee JS, Kim Y, Park CS, Kim BJ, Cha B, Kim JW, Choi WH, Shin TM, Choi IG, Hwang J, Shin HD, Woo SI (2011): Neuregulin does not confer risk for schizophrenia and smooth pursuit eye movement abnormality in a Korean population. *Genes Brain Behav* 10(8): 828-833
- Peles E, Bacus SS, Koski RA, Lu HS, Wen D, Ogden SG, Levy RB, Yarden Y (1992): Isolation of the neu/HER-2 stimulatory ligand: a 44 kd glycoprotein that induces differentiation of mammary tumor cells. *Cell* 69(1): 205-216
- Peles E, Yarden Y (1993): Neu and its ligands: from an oncogene to neural factors. *Bioessays* 15(12): 815-824
- Perianez JA, Rios-Lago M, Rodriguez-Sanchez JM, Adrover-Roig D, Sanchez-Cubillo I, Crespo-Focorro B, Quemada JJ, Barcelo F (2007): Trail Making Test in traumatic brain injury, schizophrenia, and normal ageing: sample comparisons and normative data. *Arch Clin Neuropsychol* 22(4): 433-447
- Petersen L, Sorensen TI (2011): Studies based on the Danish Adoption Register: schizophrenia, BMI, smoking, and mortality in perspective. *Scand J Public Health* 39(7 Suppl): 191-195
- Petronis A (2004): The origin of schizophrenia: genetic thesis, epigenetic antithesis, and resolving synthesis. *Biol Psychiatry* 55(10): 965-970
- Petronis A (2006): Epigenetics and twins: three variations on the theme. *Trends Genet* 22(7): 347-350
- Qiagen (2002): Handbuch für QIAamp DNA Mini Kits und QIAamp DNA Blood Mini Kits.
- Raedler TJ, Bymaster FP, Tandon R, Copolov D, Bean B (2007): Towards a muscarinic hypothesis of schizophrenia. *Mol Psychiatry* 12(3): 232-246
- Ragoussis J, Elvidge GP, Kaur K, Colella S (2006): Matrix-assisted laser desorption/ionisation, time-of-flight mass spectrometry in genomic research. *PLoS Genet* 2(7): e100
- Randrup A, Munkvad I (1965): Special antagonism of amphetamine-induced abnormal behavior: Inhibition of stereotyped activity with increase of some normal activities. *Psychopharmacologia* 7(6): 416-422

8 Literaturverzeichnis

Rapoport JL, Addington AM, Frangou S, Psych MR (2005): The neurodevelopmental model of schizophrenia: update 2005. *Mol Psychiatry* 10(5): 434–449

Rapoport J, Chavez A, Greenstein D, Addington A, Gogtay N (2009): Autism spectrum disorders and childhood-onset schizophrenia: clinical and biological contributions to a relation revisited. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* 48(1): 10-18

Raychaudhuri S, Korn JM, McCarroll SA, International Schizophrenia Consortium, Altshuler D, Sklar P, Purcell S, Daly MJ (2010): Accurately assessing the risk of schizophrenia conferred by rare copy-number variation affecting genes with brain function. *PLoS Genet* 6(9): e1001097. doi: 10.1371/journal.pgen.1001097

Redon R, Ishikawa S, Fitch KR, Feuk L, Perry GH, Andrews TD, Fiegler H, Shapero MH, Carson AR, Chen W, Cho EK, Dallaire S, Freeman JL, González JR, Gratacòs M, Huang J, Kalaitzopoulos D, Komura D, MacDonald JR, Marshall CR, Mei R, Montgomery L, Nishimura K, Okamura K, Shen F, Somerville MJ, Tchinda J, Valsesia A, Woodwark C, Yang F, Zhang J, Zerjal T, Zhang J, Armengol L, Conrad DF, Estivill X, Tyler-Smith C, Carter NP, Aburatani H, Lee C, Jones KW, Scherer SW, Hurles ME (2006): Global variation in copy number in the human genome. *Nature* 444(7118): 444-454

Remschmidt H, Theisen FM (2011): Schizophrenie. Aus der Reihe: Manuale psychischer Störungen bei Kindern und Jugendlichen. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg

Rengarajan K, Cristol SM, Mehta M, Nickerson JM (2002): Quantifying DNA concentrations using fluorometry: a comparison of fluorophores. *Mol Vis* 8: 416-421

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

Riese DJ 2nd, Stern DF (1998): Specificity within the EGF family/ErbB receptor family signaling network. *Bioessays* 20(1): 41–48

Richter V, Guthke J (1996): Leipziger Ereignis- und Belastungsinventar (LEBI). Hogrefe Verlag, Göttingen

van Rossum JM (1966): The significance of dopamine-receptor blockade for the mechanism of action of neuroleptic drugs. *Arch Int Pharmacodyn Ther* 160(2): 492-494

Roth BL, Meltzer HY (1995): The role of serotonin in schizophrenia. In: Bloom FE, Kupfer DJ (eds): *Psychopharmacology: the fourth generation of progress*: Raven Press, New York

Rujescu D, Ingason A, Cichon S, Pietiläinen OP, Barnes MR, Touloupoulou T, Picchioni M, Vassos E, Etinger U, Bramon E, Murray R, Ruggeri M, Tosato S, Bonetto C, Steinberg S, Sigurdsson E, Sigmundsson T, Petursson H, Gylfason A, Olason PI, Hardarsson G, Jonsdottir GA, Gustafsson O, Fossdal R, Giegling I, Möller HJ, Hartmann AM, Hoffmann P, Crombie C, Fraser G, Walker N, Lonnqvist J, Suvisaari J, Tuulio-Henriksson A, Djurovic S, Melle I, Andreassen OA, Hansen T, Werge T, Kiemenev LA, Franke B, Veltman J, Buizer-Voskamp JE; GROUP Investigators, Sabatti C, Ophoff RA, Rietschel M, Nöthen MM, Stefansson K, Peltonen L, St Clair D, Stefansson H, Collier DA (2009): Disruption of the neurexin 1 gene is associated with schizophrenia. *Hum Mol Genet* 18(5): 988-996

8 Literaturverzeichnis

Saha S, Welham J, Chant D, McGrath J (2006): Incidence of schizophrenia does not vary with economic status of the country: evidence from a systematic review. *Soc Psychiatry Psychiatr Epidemiol* 41(5): 338-340

Sammeth M, Foissac S, Guigó R (2008): A general definition and nomenclature for alternative splicing events. *PLoS Comput Biol* 4(8): e1000147

Sanders AR, Duan J, Levinson DF, Shi J, He D, Hou C, Burrell GJ, Rice JP, Nertney DA, Olincy A, Rozic P, Vinogradov S, Buccola NG, Mowry BJ, Freedman R, Amin F, Black DW, Silverman JM, Byerley WF, Crowe RR, Cloninger CR, Martinez M, Gejman PV (2008): No significant association of 14 candidate genes with schizophrenia in a large European ancestry sample: implications for psychiatric genetics. *Am J Psychiatry* 165(4): 497-506

Saß H, Wittchen HU, Zaudig M (1996): Diagnostisches und statistisches Manual psychischer Störungen – DSM-IV (hgg. von American Psychiatric Association; 2. Aufl.). Hogrefe Verlag, Göttingen

Saus E, Brunet A, Armengol L, Alonso P, Crespo JM, Fernandez-Aranda F, Guitart M, Martín-Santos R, Menchón JM, Navinés R, Soria V, Torrens M, Urretavizcaya M, Vallès V, Gratacòs M, Estivill X (2010): Comprehensive copy number variant (CNV) analysis of neuronal pathways genes in psychiatric disorders identifies rare variants within patients. *J Psychiatr Res* 44(14): 971-978

Sawa A, Snyder SH (2002): Schizophrenia: diverse approaches to a complex disease. *Science* 296(5568): 692-695

Schizophrenia Psychiatric Genome-Wide Association Study (GWAS) Consortium (2011): Genome-wide association study identifies five new schizophrenia loci. *Nat Genet* 43(10): 969-976

Schmidtke A, Weinacker B, Fricke S (1996): Epidemiologie von Suizid und Suizidversuch. *Nervenheilkunde* 15: 496-506

Schmucker J, Ader M, Brockschneider D, Brodarac A, Bartsch U, Riethmacher D (2003): ErbB3 is dispensable for oligodendrocyte development in vitro and in vivo. *Glia* 44(1): 67-75

Schneider K (1957): Primäre und sekundäre Symptome bei der Schizophrenie. *Fortschr Neurol Psychiatr* 25(9): 487-490

Schwab S, Wildenauer D (1998): Genetik schizophrener Störungen. *Medizinische Genetik* 10: 391–394

Sebat J, Levy DL, McCarthy SE (2009): Rare structural variants in schizophrenia: one disorder, multiple mutations; one mutation, multiple disorders. *Trends Genet* 25(12): 528-535

Shaposhnikov AV, Komar'kov IF, Lebedeva LA, Shidlovskii IuV (2013): Molecular components of JAK/STAT signaling pathway and its connection with transcription machinery. *Mol Biol* 47 (3): 388-397

Shi J, Levinson DF, Duan J, Sanders AR, Zheng Y, Pe'er I, Dubridge F, Holmans PA, Whitemore AS, Mowry BJ, Olincy A, Farooq A, Cloninger CR, Silverman JM, Buccola NG, Byerley WF, Black DW, Crowe RR, Oksenberg JR, Mirel DB, Kendler KS, Freedman R, Gejman PV (2009): Common variants on chromosome 6p22.1 are associated with schizophrenia. *Nature* 460(7256): 753-757

Shi J, Li Z, Wang T, Li T, Shen J, Zhang F, Chen J, Zhou G, Ji W, Li B, Xu Y, Liu D, Wang P, Yang P, Liu B, Sun W, Wan C, Qin S, He G, Steinberg S, Cichon S, Werge T, Sigurdsson E, Tosato S, Palotie A, Nöthen MM, Rietschel M, Ophoff RA,

8 Literaturverzeichnis

Collier DA, Rujescu D, Clair DS, Stefansson H, Stefansson K, Ji J, Wang Q, Li W, Zheng L, Zhang H, Feng G, He L (2011): Common variants on 8p12 and 1q24.2 confer risk of schizophrenia. *Nat Genet* 43(12): 1224-1227

Shin HD, Park BL, Bae JS, Park TJ, Chun JY, Park CS, Sohn JW, Kim BJ, Kang YH, Kim JW, Kim KH, Shin TM, Woo SI (2010): Association of ZDHHC8 polymorphisms with smooth pursuit eye movement abnormality. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 153B(6): 1167-1172

Silberberg G, Darvasi A, Pinkas-Kramarski R, Navon R (2006): The involvement of ErbB4 with schizophrenia: association and expression studies. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 141B(2): 142-148

Sonuga-Barke EJ, Lasky-Su J, Neale BM, Oades R, Chen W, Franke B, Buitelaar J, Banaschewski T, Ebstein R, Gill M, Anney R, Miranda A, Mulas F, Roeyers H, Rothenberger A, Sergeant J, Steinhausen HC, Thompson M, Asherson P, Faraone SV (2008): Does parental expressed emotion moderate genetic effects in ADHD? An exploration using a genome wide association scan. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 147B(8): 1359-1368

Spitzer M (Hrsg.) (2006): *Forum Neuroscience Schizophrenie*. Thieme Verlag, Stuttgart

Sporn AL, Greenstein DK, Gogtay N, Jeffries NO, Lenane M, Gochman P, Clasen LS, Blumenthal J, Giedd JN, Rapoport JL (2003): Progressive brain volume loss during adolescence in childhood-onset schizophrenia. *Am J Psychiatry* 160(12): 2181-2189

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

Stefansson H, Rujescu D, Cichon S, Pietiläinen OP, Ingason A, Steinberg S, Fossdal R, Sigurdsson E, Sigmundsson T, Buizer-Voskamp JE, Hansen T, Jakobsen KD, Muglia P, Francks C, Matthews PM, Gylfason A, Halldorsson BV, Gudbjartsson D, Thorgeirsson TE, Sigurdsson A, Jonasdottir A, Jonasdottir A, Bjornsson A, Mattiasdottir S, Blondal T, Haraldsson M, Magnusdottir BB, Giegling I, Möller HJ, Hartmann A, Shianna KV, Ge D, Need AC, Crombie C, Fraser G, Walker N, Lonnqvist J, Suvisaari J, Tuulio-Henriksson A, Paunio T, Touloupoulou T, Bramon E, Di Forti M, Murray R, Ruggeri M, Vassos E, Tosato S, Walshe M, Li T, Vasilescu C, Mühleisen TW, Wang AG, Ullum H, Djurovic S, Melle I, Olesen J, Kiemenev LA, Franke B, GROUP, Sabatti C, Freimer NB, Gulcher JR, Thorsteinsdottir U, Kong A, Andreassen OA, Ophoff RA, Georgi A, Rietschel M, Werge T, Petursson H, Goldstein DB, Nöthen MM, Peltonen L, Collier DA, St Clair D, Stefansson K (2008): Large recurrent microdeletions associated with schizophrenia. *Nature* 455(7210): 232-236

Stefansson H, Sarginson J, Kong A, Yates P, Steinthorsdottir V, Gudfinnsson E, Gunnarsdottir S, Walker N, Petursson H, Crombie C, Ingason A, Gulcher JR, Stefansson K, St Clair D (2003): Association of neuregulin 1 with schizophrenia confirmed in a Scottish population. *Am J Hum Genet* 72(1): 83-87

8 Literaturverzeichnis

Stefansson H, Sigurdsson E, Steinthorsdottir V, Bjornsdottir S, Sigmundsson T, Ghosh S, Brynjolfsson J, Gunnarsdottir S, Ivarsson O, Chou TT, Hjaltason O, Birgisdottir B, Jonsson H, Gudnadottir VG, Gudmundsdottir E, Bjornsson A, Ingvarsson B, Ingason A, Sigfusson S, Hardardottir H, Harvey RP, Lai D, Zhou M, Brunner D, Mutel V, Gonzalo A, Lemke G, Sainz J, Johannesson G, Andresson T, Gudbjartsson D, Manolescu A, Frigge ML, Gurney ME, Kong A, Gulcher JR, Petursson H, Stefansson K (2002): Neuregulin 1 and susceptibility to schizophrenia. *Am J Hum Genet* 71(4): 877-892

Stein RA, Staros JV (2000): Evolutionary analysis of the ErbB receptor and ligand families. *J Mol Evol* 50(5): 397-412

Subotnik KL, Schell AM, Chilingar MS, Dawson ME, Ventura J, Kelly KA, Hellemann GS, Huechterlein KH (2012): The interaction of electrodermal activity and expressed emotion in predicting symptoms in recent-onset schizophrenia. *Psychophysiology* 49(8): 1035-1038

Sullivan PF, Kendler KS, Neale MC (2003): Schizophrenia as a complex trait: evidence from a meta-analysis of twin studies. *Arch Gen Psychiatry* 60(12): 1187-1192

Sussman CR, Vartanian T, Miller RH (2005): The ErbB4 neuregulin receptor mediates suppression of oligodendrocyte maturation. *J Neurosci* 25(24): 5757-5762

Sweeney C, Lai C, Riese DJ 2nd, Daimonti AJ, Cantley LC, Carraway KL 3rd (2000): Ligand discrimination in signaling through an ErbB4 receptor homodimer. *J Biol Chem* 275(26): 19803-19807

Tan W, Wang Y, Gold B, Chen J, Dean M, Harrison PJ, Weinberger DR, Law AJ (2007): Molecular cloning of a brain-specific, developmentally regulated neuregulin 1 (NRG1) isoform and identification of a functional promoter variant associated with schizophrenia. *J Biol Chem* 282(33): 24343-24351

Tandon R, Keshavan MS, Nasrallah HA (2008a): Schizophrenia, “just the Facts”. What we know in 2008. Part 1: Overview. *Schizophr Res* 100: 4-19

Tandon R, Keshavan MS, Nasrallah HA (2008b): Schizophrenia, “just the Facts”. What we know in 2008. Part 2: Epidemiology and etiology. *Schizophr Res* 102: 1-18

Tandon R, Nasrallah HA, Keshavan MS (2008c): Schizophrenia, “just the Facts”. 4. Clinical features and conceptualization. *Schizophr Res* 110: 1-23

Tang K, Fu D, Kötter S, Cotter RJ, Cantor CR, Köster H (1995): Matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry of immobilized duplex DNA probes. *Nucleic Acids Res* 23(16): 3126–3131

Tang B, Thornton-Wells T, Askland KD (2011): Comparative linkage meta-analysis reveals regionally-distinct, disparate genetic architectures: application to bipolar disorder and schizophrenia. *PLoS One* 6(4): e19073

Tsuang MT, Faraone SV, Johnson P (1997): *Schizophrenia: The Facts*. Oxford University Press, Oxford UK

Tsuang MT, Gilbertson MW, Faraone SV (1991): The genetics of schizophrenia. Current knowledge and future directions. *Schizophr Res* 4(2): 157-171

8 Literaturverzeichnis

Ushiro H, Cohen S (1980): Identification of phosphotyrosine as a product of epidermal growth factor-activated protein kinase in A-431 cell membranes. *J Biol Chem* 255(18): 8363-8365

Vecchi M, Carpenter G (1997): Constitutive proteolysis of the ErbB-4 receptor tyrosine kinase by a unique, sequential mechanism. *J Cell Biol* 139(4): 995-1003

Vidal GA, Naresh A, Marrero L, Jones FE (2005): Presenilin-dependent gamma-secretase processing regulates multiple ErbB4/Her4 activities. *J Biol Chem* 280(20): 19777-19783

Volpi S, Heaton C, Mack K, Hamilton JB, Lannan R, Wolfgang CD, Licamele L, Polymeropoulos MH, Lavedan C (2009): Whole genome association study identifies polymorphisms associated with QT prolongation during iloperidone treatment of schizophrenia. *Mol Psychiatry* 14(11): 1024-1031

Walsh T, McClellan JM, McCarthy SE, Addington AM, Pierce SB, Cooper GM, Nord AS, Kusenda M, Malhotra D, Bhandari A, Stray SM, Rippey CF, Roccanova P, Makarov V, Lakshmi B, Findling RL, Sikich L, Stromberg T, Merriman B, Gogtay N, Butler P, Eckstrand K, Noory L, Gochman P, Long R, Chen Z, Davis S, Baker C, Eichler EE, Meltzer PS, Nelson SF, Singleton AB, Lee MK, Rapoport JL, King MC, Sebat J (2008): Rare structural variants disrupt multiple genes in neurodevelopmental pathways in schizophrenia. *Science* 320(5875): 539-543

Wang YC, Chen JY, Chen ML, Chen CH, Lai IC, Chen TT, Hong CJ, Tsai SJ, Liou YJ (2008): Neuregulin 3 genetic variations and susceptibility to schizophrenia in a Chinese population. *Biol Psychiatry* 64(12): 1093-1096

Wearden AJ, Tarrier N, Barrowclough C, Zastowny TR, Rahill AA (2000): A review of expressed emotion research in health care. *Clin Psychol Rev* 20(5): 633-666

Wedenoja J, Loukola A, Tuulio-Henriksson A, Paunio T, Elekund J, Silander K, Varilo T, Heikkilä K, Suvisaari J, Partonen T, Lönnqvist J, Peltonen L (2008): Replication of linkage on chromosome 7q22 and association of the regional Reelin gene with working memory in schizophrenia families. *Mol Psychiatry* 13(7): 673-684

Weiss FU, Wallasch C, Campiglio M, Issing W, Ullrich A (1997): Distinct characteristics of heregulin signals mediated by HER3 or HER4. *J Cell Physiol* 173(2): 187-195

Weltgesundheitsorganisation (WHO; 2005): Internationale Klassifikation psychischer Störungen. ICD-10 Kapitel V (F). Klinisch-diagnostische Leitlinien. 5. Auflage. Huber Verlag, Bern

Wilk CM, Gold JM, McMahon RP, Humber K, Iannone VN, Buchanan RW (2005): No, it is not possible to be schizophrenic yet neuropsychologically normal. *Neuropsychology* 19(6): 778-786

Williams NM, O'Donovan MC, Owen MJ (2005): Is the dysbindin gene (DTNBP1) a susceptibility gene for schizophrenia? *Schizophr Bull* 31(4): 800-805

Williams NM, Preece A, Spurlock G, Norton N, Williams HJ, McCreadie RG, Buckland P, Sharkey V, Chowdari KV, Zammit S, Nimgaonkar V, Kirov G, Owen MJ, O'Donovan MC. (2004): Support for RGS4 as a susceptibility gene for schizophrenia. *Biol Psychiatry* 55(2): 192-195

8 Literaturverzeichnis

Wittchen HU, Zaudig M, Fydrich T (1997): Strukturiertes Klinisches Interview für DSM-IV (SKID), Achse I und II. Hogrefe Verlag, Göttingen

Xu B, Roos JL, Levy S, van Rensburg EJ, Gogos JA, Karayiorgou M (2008): Strong association of de novo copy number mutations with sporadic schizophrenia. *Nat Genet* 40(7): 880–885

Xu B, Woodroffe A, Rodriguez-Murillo L, Roos JL, van Rensburg EJ, Abecasis GR, Gogos JA, Karayiorgou M (2009): Elucidating the genetic architecture of familial schizophrenia using rare copy number variant and linkage scans. *Proc Natl Acad Sci USA* 106(39): 16746-16751

Yarden Y, Sliwkowski MX (2001): Untangling the ErbB signalling network. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2(2): 127-137

Yue WH, Wang HF, Sun LD, Tang FL, Liu ZH, Zhang HX, Li WQ, Zhang YL, Zhang Y, Ma CC, Du B, Wang LF, Ren YQ, Yang YF, Hu XF, Wang Y, Deng W, Tan LW, Tan YL, Chen Q, Xu GM, Yang GG, Zuo XV, Yan H, Ruan YY, Lu TL, Han X, Ma XH, Wang Y, Cai LW, Jin C, Zhang HY, Yan Yan J, Mi WF, Yin XY, Ma WB, Liu Q, Kang L, Sun W, Pan CY, Shuang M, Yang FD, Wang CY, Yang JY, Li KQ, Ma X, Li LJ, Liu X, Li QZ, Huang X, Lv LX, Li T, Zhao FP, Huang W, Zhang XJ, Zhang D (2011): Genome-wide association study identifies a susceptibility locus for schizophrenia in Han Chinese at 11p11.2. *Nat Genet* 43(12): 1228-1231

Zeledon M, Taub M, Chen P, Pulver A, Avramopoulos D, Sawa A, Valle D (2011): Microdeletion in 10q23.1 correlated with a subtype of Schizophrenia with severe delusions. Poster Session I Abstracts 106, XIX. World Congress of Psychiatric Genetics. <http://www.wcpg2011.org/Docs/PresentationAbstracts.pdf>

Ziegler A (2002): Genetische Epidemiologie – Gegenwart und Zukunft. *Dtsch Ärztebl* 99(36): A-2342/B-1996/C-1878

Zhang D, Sliwkowski MX, Mark M, Frantz G, Akita R, Sun Y, Hillan K, Crowley C, Brush J, Godowski PJ (1997): Neuregulin-3 (NRG3): a novel neural tissue-enriched protein that binds and activates ErbB4. *Proc Natl Acad Sci USA* 94(18): 9562-9567

Zhang R, Du XY, Yu J, Xu N, Zheng YW, Zhao YL, Ma J (2013): No genetic evidence for Neuregulin 3 conferring risk of schizophrenia in the Chinese population. *Psychiatry Res* 205(3): 279-281

Zhong C, Du C, Hancock M, Mertz M, Talmage DA, Role LW (2008): Presynaptic type III neuregulin 1 is required for sustained enhancement of hippocampal transmission by nicotine and for axonal targeting of alpha7 nicotinic acetylcholine receptors. *J Neurosci* 28(37): 9111-9116

Zwick E, Bange J, Ullrich A (2001): Receptor tyrosine kinase signalling as a target for cancer intervention strategies. *Endocr Relat Cancer* 8(3): 161–173

9 Danksagung

Vor allen anderen, danke ich Herrn Prof. Dr. Dan Rujescu, seit 2012 Direktor der Klinik und Poliklinik für Psychiatrie, Psychotherapie und Psychosomatik an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, mir in seiner Abteilung Molekulare und Klinische Neurobiologie an der Ludwig-Maximilians-Universität München die Durchführung dieser Arbeit ermöglicht zu haben.

Sowohl dem ehemaligen Direktor, Herrn Prof. Dr. med. Hans-Jürgen Möller, wie auch seinem Nachfolger Herrn Prof. Dr. med. Peter Falkai, Direktor der Psychiatrischen Klinik und Poliklinik der Ludwig-Maximilians-Universität München, möchte ich mich ebenso besonders dafür bedanken, die Arbeit an der von ihnen geleiteten Klinik absolvieren zu dürfen.

Frau PD Dr. Ina Giegling danke ich herzlich für ihre kompetente und ausdauernde Unterstützung in fachlichen und organisatorischen Fragen. Frau Dr. biol. hum. Annette Hartmann und Frau Dr. biol. hum. Marion Friedl möchte ich besonders für ihre allwährende Geduld und Zugewandtheit in der Beantwortung sämtlicher molekularbiologischer und studienbezogener Fragen danken. Für die Mitbetreuung des praktischen Teils der vorliegenden Arbeit danke ich Frau Dr. biol. hum. Heike Konnerth. Sie alle hatten entscheidenden Einfluss in meiner Motivation, die vorliegende Studie zu Papier zu bringen.

Meinen Doktoranden-Kolleginnen und Kollegen sowie weiteren Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Molekulare und Klinische Neurobiologie, mit denen zusammen ich den praktischen Teil der Arbeit erlebte, sage ich herzlichen Dank für die Unterstützung.

Letztlich möchte ich meiner Familie und meinen Freunden auf allerherzlichste danken, mich stets darin bestärkt zu haben, die Arbeit erfolgreich abzuschließen.

Eidesstattliche Versicherung

Gruber, Herbert

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt,

dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

Das NRG3-Gen und seine
Bedeutung für die Schizophrenie

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

Rosenheim, 27.11.14

Ort, Datum

—
Unterschrift Doktorandin/Doktorand