

Aus der
Klinik und Poliklinik für Psychiatrie, Psychosomatik und Psychotherapie
der Universität Würzburg
Direktor: Professor Dr. med. Deckert

***Fzd3* - Haplotypanalyse bei schizophrenen und bipolaren
Psychosen**

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät

der

Bayerischen Julius-Maximilians-Universität zu Würzburg
vorgelegt von

Michael Melchers

aus Bad Kissingen

Würzburg, Februar 2014

Referent: Prof. Dr. A. Reif
Koreferent: Prof. Dr. M. Romanos
Dekan: Prof. Dr. M. Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: Dienstag, der 23.09.2014

Der Promovend ist Facharzt für Innere Medizin

Ana, Hannah und meinen Eltern in Liebe und Dankbarkeit gewidmet

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Einführung in die Schizophrenie	1
1.1.1 Die Historie der Schizophrenie	1
1.1.2 Aktuelle Klassifikation	4
1.1.3 Klassifikation nach Leonhard	7
1.1.4 Epidemiologie	8
1.1.5 Ätiopathogenese	8
1.1.5.1 Neuronale Transmitterstörungen als Ursache der Schizophrenie	8
a) die Dopaminhypothese	8
b) die 5-Hydroxytryptaminhypothese / Serotoninhypothese	9
c) die Glutamathypothese	10
1.1.5.2 Neuropathologische Korrelate der Schizophrenie	10
a) Makroskopische Befunde	10
b) Neuropathologische Befunde	12
c) Befunde in der funktionellen Bildgebung	13
1.1.6 Genetische Prädisposition	14
1.2 Bipolare Störungen	17
1.2.1 Klassifikation, Klinik und Genese	17
1.3 Gemeinsamkeiten von bipolaren Störungen und Schizophrenien	18
1.4. Der Wnt/FZD-Signalweg	19
1.5 Das humane Frizzled-3-Gen (<i>Fzd3</i>)	22
2. Fragestellung und Zielsetzung dieser Arbeit	24
3. Material und Methoden	26
3.1 Material	26
3.1.1 Fall- und Kontrollgruppe	26
3.1.2 Material zur Durchführung der PCR und der Gelelektrophorese	28
3.1.2.1 Chemikalien	28
3.1.2.2 Puffer	28
3.1.2.3 Verwendete Geräte und Materialien	29

3.1.2.4 cDNA-Herstellung	30
3.1.2.5 Nukleotide	30
3.1.2.6 Enzyme	30
3.1.2.7 Wasser	30
3.1.2.8 Oligonukleotidprimer	30
3.1.3 Material für Allel-spezifische Primerextension und die MALDI-TOF Massenspektrometrie	31
3.1.3.1 Geräte	31
3.1.3.2 Chemikalien	31
3.1.3.3 Kits	32
3.1.3.4 Auswertungssoftware	32
3.2 Methoden	32
3.2.1 Die Polymerasekettenreaktion (PCR)	32
3.2.1.1 Reaktionsansätze der PCR	33
3.2.1.2 Amplifizierung der DNA	33
3.2.1.3 Gelelektrophorese	34
3.2.1.4 Alkalischer Phosphatase Verdau (SAP-Verdau)	34
3.2.1.5 Primer-Extension Reaktion	34
3.2.1.6 Reinigung des Primer-Extension-Produktes	35
3.2.1.7 MALDI-ToF-Massenspektrometer	36
3.3 Statistische Analyse und Haplotyp-Analyse	37
4. Ergebnisse	38
4.1 Einzelmarker-Assoziationstest bei Schizophrenie	38
4.2 Haplotypanalyse für Schizophrenie	39
4.3 Einzelmarker-Assoziationstest bei bipolarer Störung	40
4.4 Haplotypanalyse für bipolare Störungen	41
5. Diskussion	42
5.1 Ziel der Arbeit	42
5.2 Ergebnisse der Arbeit	43
5.2.1 <i>Fzd3</i> und Schizophrenie	43

5.2.1.1 Einzelmarkerassoziationen	43
5.2.1.2 Haplotypassoziation	43
5.2.2 <i>Fzd3</i> und bipolare Störungen	44
5.2.2.1 Einzelmarkerassoziationen	44
5.2.2.2 Haplotypassoziation	44
5.3 Vergleich bisheriger Resultate mit den Ergebnissen vorliegender Arbeit	44
<u>6. Zusammenfassung</u>	<u>49</u>
<u>7. Literatur</u>	<u>50</u>

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Symptome 1. und 2. Ranges nach Kurt Schneider	3
Tabelle 2:	Diagnosekriterien der Schizophrenie nach DSM-IV	5
Tabelle 3:	Symptomkriterien der Schizophrenie nach ICD-10	5
Tabelle 4:	Subgruppen der Schizophrenie nach ICD-10	6
Tabelle 5:	Phänotypische Auswirkungen bei knockout-Varianten im Wnt-Signalweg	21
Tabelle 6:	Sequenzen der verwendeten Primer	31
Tabelle 7:	Reaktionsansätze der PCR	33
Tabelle 8:	Genotypfrequenzen für die Schizophrenie	38
Tabelle 9:	Haplotypanalyse für die Schizophrenie	40
Tabelle 10:	Genotypfrequenzen für die bipolare Störung	41
Tabelle 11:	Haplotypanalyse für die bipolare Störung	41

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Die Wnt/FZD-Signalkaskade	20
Abbildung 2:	Schematische Darstellung von <i>FZD3</i>	24
Abbildung 3:	Haplotypblockstruktur von <i>FZD3</i>	25
Abbildung 4:	Der MALDI-Prozess	36
Abbildung 5:	Time-of-Flight-Analyse	37

1. Einleitung

1.1 Einführung in die Schizophrenie

1.1.1 Die Historie der Schizophrenie

Der Umgang mit von Geisteskrankheit betroffenen Menschen reicht bis in die römisch-griechische Antike zurück. Der römische Autor Celsus formuliert bereits im 1. Jahrhundert nach Christus erstmalig ein Regelwerk für die Behandlung psychisch Kranker. Krankheitsbilder wie die Depression werden auf eine Störung der Säftebalance in der seit Hippokrates bekannten Vier-Säfte-Lehre zurückgeführt und können nur durch die Entfernung der krankheitsauslösenden „materia peccans“ geheilt werden. Therapiemaßnahmen wie die psychische Beeinflussung durch die „heilsame Lüge“, den „heilsamen Schmerz“ und vor allem das von Empathie geprägte „heilsame Gespräch“, sollen zur Reinigung der Körpersäfte führen. (Luderer 1999).

Das durchaus als humanistisch zu bezeichnende Therapiemodell von Celsus überdauert die Jahrhunderte in vielen Teilen Europas bis ins Mittelalter. Im Zeitalter der Inquisition gelten psychisch Erkrankte als von Dämonen Besessene und werden verfolgt, weggeschlossen oder gar ermordet. Viele fristen ein menschenunwürdiges Dasein in sogenannten „Tollhäusern“, in denen sie ohne ärztliche Behandlung in Ketten liegen. Erst der Humanitätsgedanke der Aufklärung führt 1793 zur Befreiung der „Irren“ aus ihrer misslichen Lage durch den französischen Arzt Philippe Pinel. Pinel (1745 - 1826) und sein Schüler Esquirol (1772 – 1840) fordern eine neue Form des Umgangs mit den Erkrankten, der durch Milde, Zuwendung und Geduld geprägt sein soll. Pinel wird zum Begründer der französischen Psychiatrietradition und beeinflusst entscheidend die Entwicklung der Psychiatrie in Europa (Möller et al. 2005).

1896 legt der deutsche Psychiater Emil Kraepelin (1856 – 1926) erstmals eine Einteilung psychischer Erkrankungen vor, in der er die *Dementia praecox* („frühzeitige Verblödung“) als Überbegriff für endogene, zu einem Defektzustand führende Psychosen, vom manisch-depressiven Irresein mit guter Prognose

abgrenzt. Kraepelin wählt als Unterscheidungskriterien die „pathologische Anatomie“, die Ätiologie, die Symptomatologie, sowie den Krankheitsverlauf (Möller et al. 2005). Trotz der klinischen Heterogenität begreift Kraepelin die *Dementia praecox* als „Krankheitseinheit“, die sich aus gemeinsamer Klinik, Ursache und Verlauf zusammensetzt (Pillmann et al. 2004):

„Besässen wir auf einem der drei Gebiete, der pathologischen Anatomie, der Aetiologie und der Symptomatologie des Irreseins eine durchaus erschöpfende Kenntnis aller Einzelheiten, so würde sich nicht nur von jedem derselben her eine einheitliche und durchgreifende Einteilung der Psychosen auffinden lassen, sondern jede dieser drei Gruppierungen würde auch diese Forderung der Grundpfeiler unserer wissenschaftlichen Forschung überhaupt – mit den beiden anderen wesentlich zusammenfallen“ (Kraepelin 1896).

Während der neuropathologisch ausgerichtete Carl Wernicke (1848 – 1905) Geisteskrankheiten als hirnlokale Erkrankungsprozesse unterschiedlicher Genese beschreibt und den einheitlichen Begriff der *Dementia praecox* zeitlebens ablehnt, stellt Kraepelin die symptomatologisch-diskreptive Beobachtung der Patienten zur Differenzierung der Krankheitsentitäten in den Vordergrund und bezieht damit deutliche Position gegen Wernickes Theorie des organischen Korrelats (Pillmann & Möller 2004).

1911 greift Eugen Bleuler Kraepelins Konzept der *Dementia praecox* auf und postuliert erstmals Grundsymptome, die allen Formen gemeinsam sind. Bleuler grenzt die Grundsymptome *Zerfahrenheit des Denkens*, *Affektverflachung*, *Ambivalenz im Fühlen*, *Handeln und Wollen*, *Autismus* und *Depersonalisierung* von akzessorischen Symptomen wie *Wahn*, *Halluzinationen* und *Störungen des Ich-Erlebens* ab.

Die voneinander abgrenzbaren Symptomenkomplexe sind für Bleuler der Ausdruck einer Persönlichkeitsspaltung, die zur Desintegration der psychischen Funktionen des Ichs führen soll. Um diesen Erkenntnissen Rechnung zu tragen und aufgrund seiner klinischen Beobachtungen, dass die von Kraepelin beschriebene *Dementia praecox* nicht generell zur Demenz führt, prägt er den Begriff der Schizophrenie

(Bleuler 1911; Ebert 1995). Bleuler begreift vor allem die Ambivalenz als charakteristisches Symptom schizophrener Erkrankung:

„Unter den Geisteskrankheiten ist es fast nur die Schizophrenie (Dementia praecox), deren Symptomatologie die Ambivalenzmechanismen benutzt, diese aber in so ausgiebigem Maße, daß man versucht ist, zu vermuten, es seien ausschließlich ambivalente Komplexe, die sich Zugang in die Wahngedanken verschaffen und eventuell sogar das Manifestwerden der Krankheit bedingen können“ (Bleuler 1914; Sponzel 2002).

Bleulers Grundsymptome galten nach gängiger Lehrmeinung als charakteristisch für die Schizophrenie – eine Diagnosestellung erlauben sie allerdings nicht. 1938 veröffentlicht Kurt Schneider, auf Bleulers Werk basierend, eine Zusammenstellung von Symptomen ersten und zweiten Ranges, die eine sichere Diagnose ermöglichen (Ebert 1995) sollen und die die Grundlage für spätere Klassifikationssysteme legten:

	<u>Symptome 1. Ranges</u>	<u>Symptome 2. Ranges</u>
Akustische Halluzinationen	Dialogische Stimmen Kommentierende Stimmen Gedankenlautwerden	Sonstige akustische Halluzinationen
Leibhalluzinationen	Leibliche Beeinflussungserlebnisse	
Halluzinationen auf anderen Sinnes-Gebieten		Optische,olfaktorische, gustatorische
Ichstörungen	Gedankeneingebung Gedankenentzug Gedankenausbreitung Willensbeeinflussung	
Wahn	Wahnwahrnehmung	Wahneinfall/-gedanke

Tabelle 1: Symptome 1. und 2. Ranges nach Kurt Schneider

Durch Schneiders Symptome des ersten Ranges werden eindeutige Ein- und Ausschlusskriterien für die Diagnose Schizophrenie postuliert; mit der Diagnose der Schizophrenie ist nun ein bestimmter Symptomenkomplex verknüpft.

1.1.2 Aktuelle Klassifikationen

Die heute international Anwendung findenden Diagnoseschlüssel ICD-10 (International Statistical Classification of Diseases) der Weltgesundheitsorganisation (WHO, 1998) und das DSM-IV (Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders) der American Psychiatric Association (1996) sind Weiterentwicklungen der historischen Klassifikationen und versuchen, psychiatrische Erkrankungen unter Berücksichtigung neuester empirischer Untersuchungsergebnisse zu systematisieren und zu operationalisieren.

Das DSM-IV trägt der Komplexität psychiatrischer Erkrankungen durch die Abbildung der Symptome in insgesamt 5 Achsen Rechnung:

Achse I:	Klinische Störungen und andere klinisch relevante Probleme
Achse II:	Persönlichkeitsstörungen und geistige Behinderung
Achse III:	Medizinische Krankheitsfaktoren
Achse IV:	Psychosoziale und umgebungsbedingte Probleme
Achse V:	Globale Erfassung des Funktionsniveaus.

Das DSM-IV verlangt im Gegensatz zum ICD-10 Störungsanzeichen über mindestens 6 Monate, sowie produktive Symptomatik für mindestens einen Monat, bestehend aus mindestens zwei Symptomenkomplexen:

Kriterien-Gruppe	Symptomatik
1	Wahn
2	Halluzinationen
3	desorganisiertes Sprechen
4	desorganisiertes /katatonos Verhalten
5	negative Symptome

Subtyp
Paranoider Typus
Desorganisierter Typus
Katatoner Typus
Undifferenzierter Typus
Residualer Typus

Tabelle 2: Diagnosekriterien der Schizophrenie nach DSM-IV

Das ICD-10 teilt die Symptomatik der Schizophrenie in 9 Gruppen ein, wobei für die Diagnosestellung mindestens ein Symptom aus der Gruppe 1 – 4, oder mindestens zwei Symptome aus der Gruppe 5 – 8, welche mindestens über einen Zeitraum von einem Monat bestehen müssen, gefordert werden.

Kriterien-Gruppe	Symptomatik
1	Gedankenlautwerden, Gedankeneingebung, Gedankenentzug, oder Gedankenausbreitung
2	Inhaltliche Denkstörungen in Form von Kontrollwahn, Beeinflussungswahn, Gefühl des Gemachten, (Wahnwahrnehmungen)
3	Akustische Halluzinationen in Form kommentierender, dialogischer oder anderer Stimmen, die aus einem Teil des Körpers kommen
4	Anhaltender, kulturell unangemessener oder völlig unrealistischer (bizarrer) Wahn (z.B. übermenschliche Fähigkeiten zu besitzen)
5	Anhaltende Halluzinationen jeder Sinnesmodalität über Wochen und Monate.
6	Gedankenabreißen oder Einschlebung in den Gedankenfluss, was zu Zerfahrenheit, Danebenreden oder Wortneubildungen (Neologismen) führt

7	Katatone Symptome wie Erregung, Haltungstereotypien oder wächserne Biagsamkeit (Flexibilitas cerea), Negativismus, Mutismus und Stupor
8	„Negative“ Symptome wie auffällige Apathie, Sprachverarmung, verflachter oder inadäquater Affekt, zumeist mit sozialem Rückzug und verminderter sozialer Leistungsfähigkeit
9	Sehr eindeutige und durchgängige Veränderungen bestimmter umfassender Aspekte des Verhaltens, die sich in Ziellosigkeit, Trägheit, einer „in sich selbst verlorenen Haltung“ und sozialem Rückzug manifestieren

Tabelle 3: Symptomkriterien der Schizophrenie nach ICD-10

Unterschieden werden 7 Subgruppen mit unterschiedlicher Prävalenz. Die paranoide Schizophrenie, mit 40% die häufigste Form, gehört zusammen mit der hebephrenen (15%), sowie der katatonen (15%) Schizophrenie, zu den drei klassischen Schizophrenien:

Code	Subtyp	Charakterisierung
F 20.0	Paranoide Schizophrenie	Häufigster Subtyp der schizophrenen Psychosen. Wahn und Halluzinationen stehen im Vordergrund
F 20.1	Hebephrene Schizophrenie	Insbesondere im Jugendalter auftretender Subtyp. Affektive Störungen vor allem im Sinne von läppischer Grundstimmung, leerer Heiterkeit und Gleichgültigkeit stehen mit formalen Denkstörungen im Vordergrund
F 20.2	Katatone Schizophrenie	Psychomotorische (katatone) Symptome im Vordergrund. Risikoreicher Subtypus bei Gefahr der perniziösen, lebensbedrohlichen Katatonie
F 20.3	Undifferenzierte Schizophrenie	Zustandsbilder, die die Schizophreniekriterien erfüllen, ohne jedoch einer der Unterformen F 20.0 – 20.2 zu entsprechen
F 20.4	Postschizophrene Depression	Depressive Episode, die innerhalb eines Jahres nach einer schizophrenen Episode auftritt. Schizophrene Symptome müssen noch vorhanden sein, beherrschen aber nicht mehr das klinische Bild
F 20.5	Schizophrenes Residuum	Folgezustand einer Schizophrenie mit im Vordergrund stehender Negativsymptomatik
F 20.6	Schizophrenia simplex („blande Psychose“)	Langsam, chronisch verlaufende Schizophrenie ohne produktive Symptome wie Wahn oder

	Halluzinationen. Bei heterogenem Symptombild sehr seltener und mit großer diagnostischer Unsicherheit behafteter Subtypus.
--	--

Tabelle 4: Subgruppen der Schizophrenie nach ICD-10

1.1.3 Klassifikation nach LEONHARD

Ein weiteres, im heutigen, klinischen Alltag nur noch selten verwandtes Klassifikationssystem, ist die Systematik nach Wernicke, Kleist und Leonhard.

Federführend war hier vor allem Karl Leonhard (1904 – 1988), der auf den Arbeiten von Kleist und Wernicke basierend, ein sehr detailliertes Klassifikationssystem der endogenen Psychosen schuf. Leonhards Augenmerk lag auf exakten psychopathologischen Längs- und Querschnittsbeschreibungen, um verschiedene Subtypen der endogenen Psychosen hinsichtlich ihres Verlaufs und ihrer Prognose abzugrenzen.

Zu den Erkrankungen mit guter Prognose, die in jeder Krankheitsphase ohne Residuen ausheilen können, zählte er die monopolar phasische Psychosen, die manisch-depressive Erkrankung und die bipolar angelegten, phasisch verlaufenden zyklischen Psychosen. Eine schlechte Langzeitprognose, da die Erkrankungen schubweise mit Ausbildung von residualen Symptomen einhergehen, sah er in den Unterformen der Schizophrenie im engeren Sinne. Hier unterschied er die systematischen von den unsystematischen Schizophrenien.

Als unsystematische Schizophrenien bezeichnete Leonhard eine Subgruppe bestehend aus affektvoller Paraphrenie, der Kataphasie, sowie der periodischen Katatonie. Die unsystematischen Schizophrenien verlaufen größtenteils remittierend oder bisweilen klar periodisch. Die Bipolarität sowie ein akuter Beginn sind weitere Charakteristika. Die systematischen Schizophrenien unterscheiden sich vor allem in der Schärfe ihrer Symptomgestaltung, dem schleichenden Beginn und der schlechteren Prognose. Leonhard unterteilte die systematischen Schizophrenien in die systematischen Katatonien, die Hebephrenien, sowie die systematischen Paraphrenien. Diese drei Krankheitsbilder differenzierte Leonhard weiter in jeweils vier bis sechs Subtypen (Leonhard 1999).

1.1.4 Epidemiologie

Die Punktprävalenz der schizophrenen Psychosen liegt je nach Studie zwischen 0,2 – 2%, die Inzidenzrate bei ca. 0,05% (Möller et al. 2005). Etwa 1% der Durchschnittsbevölkerung erkrankt im Laufe ihres Lebens an einer Schizophrenie, wodurch die Erkrankung aufgrund ihrer schweren Symptomatik enorme gesellschaftliche Bedeutung gewinnt.

Das Prädilektionsalter der Psychose ist bei Männern durchschnittlich das 21. Lebensjahr, Frauen erkranken etwa 5 Jahre später. Insgesamt betrachtet sind Männer und Frauen gleichhäufig betroffen, wobei das männliche Geschlecht in der Regel früher erkrankt und die Erstmanifestation bei 90% der Patienten vor dem 30. Lebensjahr beobachtet wird. Da etwa 50% aller Schizophrenien zwischen der Pubertät und dem 30. Lebensjahr beginnen, sind in erster Linie junge Menschen von dieser gesellschaftlich-stigmatisierenden Psychose betroffenen. Der berufliche und soziale Abstieg ist meist vorprogrammiert, eine spezifische Milieu-Prädisposition besteht nicht. Die Suizidrate unter schizophrenen Patienten beträgt etwa 10% (Ebert 1995; Möller et al. 2005).

1.1.5 Ätiopathogenese

1.1.5.1 Neuronale Transmitterstörungen als Ursache der Schizophrenie

a) die Dopaminhypothese

Klassische antipsychotisch-wirkende Neuroleptika wie Haloperidol blockieren in erster Linie postsynaptische D₂-Dopaminrezeptoren im mesolimbischen System. Diese Beobachtung, und die Tatsache, dass Dopaminfreisetzende Substanzen wie Amphetamine psychotische Symptome auslösen können, führten zur Hypothese, die Schizophrenie werde durch ein Überangebot an Dopamin ausgelöst. PET-Analysen (Positronenemissionstomographie) zeigten außerdem eine gesteigerte Empfindlichkeit der D₂-Dopaminrezeptoren bei an der Psychose erkrankten Probanden. Eine Hyperdopaminergie als alleinige Ursache der Schizophrenie lässt sich nicht postulieren, da die Blockade der D₂-Rezeptoren kaum Wirkung auf die Negativsymptomatik zeigt. Weiterhin tritt die antipsychotische Wirkung der Neuroleptika erst nach Wochen ein, obwohl die Sättigung der D₂-Dopaminrezeptoren innerhalb von Stunden erfolgt. Weniger das „zuviel“ oder „zuwenig“ an Dopamin scheint eine Rolle zu spielen, sondern eine Imbalance in den dopaminergen Bahnsystemen des ZNS. Auch die Bedeutung der zur Familie der D₂-Rezeptoren

gehörenden D₃- und D₄-Rezeptoren, denen bisher weniger Aufmerksamkeit gewidmet wurde, muss nach Studien von Joyce und Meador-Woodruff neu überdacht werden (Harrison 1999b; Joyce et al. 1997; Möller et al. 2005).

b) die 5-Hydroxytryptaminhypothese / Serotoninhypothese

Verschiedene Studien zeigten, dass halluzinogene Substanzen aus der Klasse der Indol-Derivate (z.B. LSD) und Phenethylamine (z.B. Mescaline) an die Schizophrenie erinnernde, psychotische Symptome auslösen können. Beide Stoffklassen sind 5-Hydroxytryptamin (5-HT, Serotonin)-Agonisten und gaben Anlass zur Postulierung der Serotoninhypothese der Schizophrenie. Die guten klinischen Erfolge der vor allem am 5-HT_{2a} -Rezeptor ansetzenden, atypischen Neuroleptika wie Clozapin (Leponex®) in der Behandlung dieser Psychose, haben das wissenschaftliche Interesse am Serotoninsystem als mögliche Ursache der Schizophrenie gesteigert. Polymorphismen im 5-HT_{2a}-Rezeptorgen senken möglicherweise das Risiko für die bipolare Störung (Williams et al. 1997). In mehreren Studien ließ sich bei nicht pharmakologisch behandelten Patienten, postmortal eine Erniedrigung der 5-HT_{2a} -Rezeptordichte im frontalen Kortex (Harrison 1999a), sowie eine erhöhte Anzahl kortikaler 5-HT_{1a} – Rezeptoren feststellen (Burnet et al. 1997). Da Trichard et al. 1998 in einer PET Studie keine Veränderung der 5-HT_{2a} -Rezeptordichte bei jungen, noch unbehandelten Patienten fanden, wird vermutet, dass sich eine Abweichung erst im Laufe des Krankheitsprozesses entwickelt (Harrison 1999b).

Störungen des Serotoninstoffwechsels als mögliche Ursache der Schizophrenie, stellen bisher eine noch nicht endgültig bewiesene Hypothese dar und bedürfen weiterer Forschung. Das Hauptaugenmerk wird in weiteren Studien auf der Rolle von 5-HT in der neuronalen Entwicklung liegen, sowie auf den Interaktionen am 5-HT_{2a} -Rezeptor im präfrontalen Kortex. Auch die Verschaltungen zwischen dopaminerger und serotonerger Signaltransmission könnten die Serotoninhypothese erklären. (Harrison 1999b)

c) Die Glutamathypothese

Glutamat ist der wichtigste exzitatorische Neurotransmitter im menschlichen Kortex und wirkt an ionotropen und metabotropen Rezeptoren. Die ionotropen Rezeptoren werden in drei Klassen unterteilt: N-Methyl-D-Aspartat- (NMDA), α -Amino-3-Hydroxy-5-Methyl-4-Isloxazol-Propionsäure- und Kainat-Rezeptoren und vermitteln die Rezeptorantwort durch die Öffnung von Ionenkanälen. Die metabotropen Rezeptoren gehören zu den phylogenetisch ältesten G-Protein- gekoppelten Rezeptorproteinen.

Javitt und Zukin zeigten, dass Phencyclidinderivate (PCP, „Angel dust“) und andere nicht-kompetitive Antagonisten des NMDA-Rezeptors psychotische Symptome, die an die Schizophrenie erinnern, auslösen können. (Javitt et al. 1991) Die Tatsache, dass PCP bei Gesunden sowohl zu Positiv (z.B. die Störung des Ich-Erlebens) - als auch zu Negativ (z.B. Anhedonie) - Symptomen führen kann, gab Anlass zur Fokussierung auf den NMDA-Rezeptor und zur Postulierung der Glutamathypothese als mögliche Ursache für schizophrene Psychosen. Bislang wurden drei Mechanismen beschrieben, die einen Zusammenhang zwischen dem glutaminergen System und der Krankheitsentstehung herstellen könnten: die Interaktion von glutaminergem und dopaminergem System, die Exzitotoxizität des Glutamats und die, durch Glutamat bedingte Entwicklungsstörungen der kortikokortikalen Verbindungen. (Carlsson et al. 1990; Deakin et al. 1997; Harrison 1999b; Olney et al. 1995)

1.1.5.2 Neuropathologische Korrelate der Schizophrenie

a) Makroskopische Befunde

In einer Vielzahl von Studien konnten am makroskopischen Präparat *post mortem*, oder durch bildgebende Verfahren wie Computertomographie (CT) und Magnetresonanztomographie (MRT) in vivo, strukturelle Anomalitäten des Gehirns bei Schizophrenen festgestellt werden.

Johnstone et al. konnten 1976 mittels einer CT-Untersuchung von 17, an einer chronischen Schizophrenie erkrankten Patienten, eine Vergrößerung der lateralen Ventrikel nachweisen. Dabei fand sich eine Korrelation zwischen dem Grad der Ventrikeldilatation und der kognitiven Beeinträchtigung des Erkrankten (Johnstone et al. 1976). Eine Erweiterung des 3. und 4. Ventrikels bei Schizophrenen konnte in

vielen Studien gezeigt werden. Die Einordnung der Schizophrenien in verschiedene Subtypen anhand des Verhältnisses zwischen Gehirnmasse und Ventrikelgröße (VBR, *ventricle-brain ratio*) ließ sich aber nicht halten (Daniel et al. 1991). Eine Meta-Analyse der CT-Studien ergab eine durchschnittliche Effektgröße der VBR von $d = 0.70$, korrespondierend mit einer fehlenden Überschneidung von 43% zwischen Kontrollgruppe und Fallgruppe (Raz et al. 1990). Lawrie und Abukmeil veröffentlichten 1998 ein Review, in dem sie die Ergebnisse von 40 MRT- Studien verglichen: sie fanden im Median in 40% der Fälle eine Vergrößerung der Ventrikel; weiterhin im Median einen Verlust von cerebralem Gewebe von 3%, eine Reduktion der Temporallappen (6% links, 9,5% rechts) und des Amygdala-Hippokampus-Komplex (6,5% links, 5,5% rechts). Die Vergrößerung der lateralen Ventrikel betrug im Median links 44% und 36% rechts. Die Reduktion an Gehirngewebe scheint vor allem die graue Substanz zu betreffen, während die weiße Substanz relativ vermehrt ist (Lawrie et al. 1998; Zipursky et al. 1998). In neuroradiologischen Zwillingsstudien mit monozygoten und dizygoten Zwillingen, in denen ein Zwilling an einer Schizophrenie erkrankt und das andere Geschwister gesund ist, konnten die gleichen morphologischen Befunde erhoben werden: bei den erkrankten Zwillingen fand sich eine deutliche Erweiterung der Ventrikel im Vergleich zu den nicht betroffenen Geschwistern, ebenso eine reduzierte Größe des Kortex und des Hippokampus. Eine Veränderung der gyralen Anatomie, die in einigen Studien beschrieben wird, ist vermutlich nicht genetisch determiniert, sondern von Umwelteinflüssen abhängig (Noga et al. 1996; Reveley et al. 1982; Suddath et al. 1990).

Verschiedene Studien konnten auch subkortikale Auffälligkeiten bei Schizophrenen nachweisen: eine Größenzunahme des Striatums, die abhängig vom Geschlecht des Patienten und der antipsychotischen Therapie zu sein scheint (Chakos et al. 1994; Heitmiller et al. 2004; Keshavan et al. 1994), sowie eine vermutlich mit der Erkrankung assoziierte Reduktion der Thalamusgröße, bzw. der thalamischen Aktivität (Andreasen et al. 1994; Buchsbaum et al. 1996).

b) Neuropathologische Befunde

Jakob und Beckmann wiesen Auffälligkeiten in der Zytoarchitektur des entorhinalen Kortex bei schizophrenen Patienten *post mortem* nach, die sie auf Störungen der neuronalen Migration in der Gehirnentwicklung zurückführen. Vor allem in der Lamina II zeigten sich histologische Anomalitäten wie pathologische Clusterbildungen der prä- α -Zellen. Diese Befunde konnten nur teilweise repliziert werden (Akil et al. 1997; Beckmann et al. 1991; Bernstein et al. 1998; Falkai et al. 2000; Jakob et al. 1989; Jakob et al. 1986).

Einige Studien konnten Veränderungen in der Anordnung der Pyramidenzellen des Hippokampus feststellen. Während im gesunden Gehirn die Neurone des Stratum pyramidale ihre Dendriten, palisadenartig angeordnet, ins Stratum radiatum und Stratum lacunosum-moleculare entsenden, fanden sich bei histologischen Hippokampuspräparaten schizophrener Patienten eine deutliche Unordnung der Schichtenarchitektur und eine veränderte Orientierung der Dendriten, die vor allem die Regionen CA1, CA2 und das Subiculum betrafen. Die absolute Anzahl und Größe der Pyramidenzellen des Cornu Ammonis war verringert. Auch dieser neuropathologische Befund konnte nur teilweise repliziert werden (Altshuler et al. 1987; Benes et al. 1991; Christison et al. 1989; Kovelman et al. 1984; Zaidel et al. 1997a; Zaidel et al. 1997b).

Veränderungen der Subplatten-Neurone könnten ebenfalls ein Korrelat der Schizophrenie darstellen. Die Neurone der Subplatten-Zone gehören zu den ersten postmitotischen Nervenzellen des menschlichen Kortex und stehen mit dem Thalamus in Verbindung, noch bevor die eigentlichen Zielzellen der Zonen V und VI des Kortex in der Ventrikulär-Zone entstehen (McConnell et al. 1989). Die Neurone der Subplatten-Zone nehmen damit eine Schlüsselstellung in der Ausbildung der kortikalen und thalamikokortikalen Regelkreise ein. Im Verlauf der Kortikogenese geht ein Teil dieser Neurone durch Apoptose zu Grunde, während ein anderer Teil in der weißen Substanz persistiert. Die Subplatten-Zone zeichnet sich durch eine hohe Vulnerabilität aus – bei Schädigungen dieser Neurone ist die Ausbildung der thalamikokortikalen Bahnen empfindlich gestört (McQuillen et al. 2005). In histochemischen Untersuchungen, in denen die Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid-

Phosphat-Diaphorase als Marker benutzt wurde, konnte bei Schizophrenen eine größere Anzahl von Subplatten-Neuronen in tieferen Schichten des frontalen und temporalen Kortex gefunden werden, während interstitielle Subplatten-Neurone in der Kontrollgruppe eher oberflächlich in der weißen Substanz anzutreffen waren (Akbarian et al. 1993; Akbarian et al. 1996). Entsprechend den Befunden von Akbarian et al., fanden Anderson et al. (Anderson et al. 1996) unter Verwendung eines monoklonalen Antikörpers eine erhöhte Dichte von Subplatten-Neuronen im Interstitium der weißen Substanz von Schizophrenen. Eine größere Dichte ließ sich jedoch nur in den oberflächlicheren Schichten feststellen, wohingegen in den tieferen Schichten keine Anomalität im Vergleich zur Kontrollgruppe gefunden werden konnte.

Die synaptische Verschaltung des Hippokampus und insbesondere des für kognitive Prozesse zuständigen dorsolateralen präfrontalen Kortex ist ein weiterer Schwerpunkt neuropathologischer Forschung. In der Zusammenschau der Befunde lässt sich eine generelle Reduktion von präsynaptischen Markerproteinen wie Synaptophysin bei erkrankten Personen feststellen. Auch postsynaptisch scheinen die Markerproteine der synaptischen Verschaltung quantitativ verringert zu sein, wobei die Datenlage hierzu relativ gering ist. Der verringerte Proteinspiegel könnte auf eine niedrige Dichte interneuronaler Kontakte, auf abnormale synaptische Vesikel, oder auf eine genetische Dysregulation der Proteintranskription hinweisen. Eine klare Aussage, inwiefern eine Reduktion von Synaptophysin und anderen Proteinen der Synapse, als Indikator der Schizophrenie zu sehen ist, lässt sich noch nicht formulieren (Harrison 1999b).

c) Befunde in der funktionellen Bildgebung

1974 postulierten Ingvar und Franzén erstmals eine als „Hypofrontalität“ bezeichnete Minderdurchblutung bzw. einen Hypometabolismus im frontalen Kortex (Ingvar et al. 1974). Der frontale Kortex, insbesondere der posterolaterale präfrontale Kortex ist für höhere kognitive Fähigkeiten wie beispielsweise das Arbeitsgedächtnis oder die kognitive Umstellungsfähigkeit zuständig – Fähigkeiten die bei schizophrenen Patienten meist gestört sind. In vielen nuklearmedizinischen Untersuchungen, die die Perfusion oder die Glucoseutilisation im Frontalhirn mittels PET (Keshavan et al. 1994) oder Single Photon Emission Computed Tomography (SPECT) maßen, konnte

ebenfalls die Hypofrontalität bei Schizophrenen nachgewiesen werden. Walter et al. setzten 2003 funktionelles MRT zur Aktivitätsmessung im frontalen Kortex ein und konnten keine Minderung der Aktivität im Vergleich zur Kontrollgruppe feststellen (Walter et al. 2003). In einer erneuten Untersuchung wiesen sie vielmehr eine dynamische Dysfunktion des präfrontalen Kortex nach: im Gegensatz zum gesunden Probanden, ist bei Erkrankten die Spezialisierung des lateralen Präfrontalkortex für verbalen Input (links) und räumlichen Input (rechts) aufgehoben. Weiterhin fehlt die Koppelung zwischen Frontal- und Temporallappen. Diese neuroradiologischen Befunde korrelieren mit den Ergebnissen neuropathologischer Studien, die die Schizophrenie als ein „Diskonnektivitätssyndrom“ beschreiben (Walter 2005).

1.1.6 Genetische Prädisposition

Nach heutigem Wissenstand besitzt die Schizophrenie eine multifaktorielle Genese, wobei eine genetisch bedingte Prädisposition vermutlich im Vordergrund steht. Familien-, Zwillings- und Adoptionsstudien zeigen im Vergleich zur Durchschnittsbevölkerung in den betroffenen Patientenfamilien eine deutlich erhöhte Morbidität für die Psychose. Das Risiko für erstgradig Verwandte beträgt etwa 10%, bei Angehörigen zweiten Grades liegt die Wahrscheinlichkeit einer Erkrankung bei ca. 5%. Sind beide Elternteile schizophren, steigt das Risiko der Kinder auf 40% an. Zwillingsstudien zeigen die genetische Prädisposition am deutlichsten: während die Konkordanzrate bei dizygoten Zwillingen im Mittel bei 17% liegt, beträgt sie bei monozygoten Zwillingen 48%. (Gottesman 2001) – nach der Galton'schen Regel ist demnach von einer starken hereditären Komponente auszugehen.

In Adoptivstudien konnte festgestellt werden, dass Kinder mit genetisch bedingtem erhöhten Risiko, auch in gesunden Pflegefamilien häufiger an einer Schizophrenie erkranken, als gesunde Adoptivkinder bei erkrankten Pflegeeltern (Ebert 1995; Möller et al. 2005). Um die genetische Komponente der Schizophrenie näher zu untersuchen, fanden verschiedene Methoden Anwendung. Bei Familien, bei denen mehrere Mitglieder erkrankt waren, konnten Kopplungsanalysen durchgeführt werden. Hierbei untersuchte man mehrere spezifische DNA-Sequenzen als Marker für eine chromosomale Region, ob diese unter den Blutverwandten vererbt wurden.

Die Assoziationsanalyse gestattet den Vergleich einer größeren Anzahl nicht verwandter Schizophreniekranker mit einem gesunden Kontrollkollektiv. Das Augenmerk liegt hierbei auf der Untersuchung von möglichen Varianten in sogenannten „Kandidatengenen“, d.h. Gene, deren Variabilität möglicherweise eine wichtige Rolle in der Pathogenese der Erkrankung darstellen. Sogenannte Einzelbasenpolymorphismen (*Single Nucleotide Polymorphisms*, SNPs) oder Repeat-Polymorphismen (Di-, Tri-, oder Polynukleotide. VNTR, *Variable Number of Tandem Repeats*) dienen hierbei als genetische Marker.

Im menschlichen Genom finden sich etwa 3 Millionen SNPs, die u.a. die große Variabilität der DNA-Sequenz bedingen – allerdings sind nur wenige mit einer Erkrankung assoziiert. Weiterhin zeigte sich im Rahmen der Entdeckung der Haplotypblockstruktur des menschlichen Genoms, dass es Regionen beinahe ohne jegliche Rekombinationsereignisse gibt, die sich mit Regionen mit hoher Rekombinationsdichte – sogenannten „Hotspots“ – abwechseln. Zur Charakterisierung der häufigen Haplotypblöcke können daher die entsprechenden spezifischen Polymorphismen herangezogen werden. Der Begriff Kopplungsungleichgewicht ($LD = \textit{linkage disequilibrium}$) definiert das abhängige Auftreten der Allele von Genen, wenn diese auf einem Chromosom nahe beieinander liegen. Die Allele der anderen Polymorphismen stehen mit den untersuchten Varianten im Kopplungsungleichgewicht, so dass sie daraus ableitbar sind und zur Charakterisierung der häufigen Haploblöcke herangezogen werden können.

Entscheidend, um eine Kausalität der assoziierten Variante im Hinblick auf die entsprechende Erkrankung festzustellen, ist der Nachweis der Beeinflussung von Genexpression, Proteinfunktion und physiologischen Parametern durch den Polymorphismus (Freudenberg 2002).

Die Identifizierung möglicher Kandidatengene der Schizophrenie ist ein hochkomplexes und oft frustantes Betätigungsfeld, da eine Vielzahl von Genen sowie deren Genprodukte, die zu Wechselwirkungen führen können, eine Prädisposition für die Erkrankung bedingen. Die Studienlage deutet auf eine polygene Vererbung hin, bei der z. B. das Dysbindin-Gen (*DTNBP1*) auf Chromosom 6, das Neuroregulin-Gen (*NRG1*) auf Chromosom 8, das Catechol-O-

Methyltransferase-Gen (*COMT*, 22q11), das *G72*-Gen (Locus 13q22-34) , dessen Genprodukt mit der D-Aminosäure-Oxidase interferiert, sowie das *RGS4*-Gen (ein Regulator im G-Proteinsignalweg, 1q21-q22) als wichtige Kandidatengene in Betracht gezogen werden (Owen et al. 2003). Allerdings finden sich für alle potentiellen Kandidatengene sowohl Studien, die eine Assoziation belegen, als auch Studien, die diese Assoziation nicht nachvollziehen konnten. Die Diskrepanz dieser Studienergebnisse wird u.a. auf ethnische Unterschiede zwischen den untersuchten Populationen zurückgeführt. Weitere Gründe könnten allerdings auch die genetische sowie klinische Heterogenität der Krankheitsentitäten Schizophrenie und bipolarer Störung sein (Mirnics et al. 2001).

Die genetische Prädisposition ist allerdings nicht zu 100% penetrant. Im Sinne eines Vulnerabilitätsmodells bedarf es eines „*second hits*“, d.h. weiteren Faktoren wie z. B. einschneidende „Life-events“, die zur Manifestation der Psychose führen. Genetische Faktoren führen ebenso wie psychosoziale Faktoren, die familiär und soziokulturell geprägt sein können, zusammen mit evtl. vorliegenden organischen Schäden des Gehirns zur Prädisposition für die Erkrankung an einer Schizophrenie. Als mögliche Auslöser für den Erkrankungsbeginn lassen sich bei vielen Patienten retrospektiv wichtige Lebensereignisse wie Trennungen, Trauerfälle oder auch Drogenmissbrauch identifizieren (Möller et al. 2005).

1.2 Bipolare Störungen

1.2.1 Klassifikation, Klinik und Genese

Affektive Störungen, die sowohl depressive als auch manische Phasen beinhalten, werden als bipolare Störungen bezeichnet. Nach den Kriterien der ICD-10 können die affektiven Störungen unterteilt werden in die manische Episode (Ziffer F30), die bipolare affektive Störung (F31), die depressive Episode (F32), die rezidivierenden depressiven Störungen (F33), die anhaltenden affektiven Störungen (F34) sowie sonstige affektive Störungen (F38). Die Extrempole der bipolaren Störung, die Manie und die Depression, wechseln sich episodenhaft mit Phasen, die durch normale oder beinahe normale Stimmungslage geprägt sind, ab. Die depressiven Phasen sind allerdings deutlich häufiger.

Typische, für die Diagnose einer Manie nach ICD-10 geforderte Symptome, sind die eu- bis dysphorische Stimmungslage, die Antriebssteigerung, Ideenflucht, verminderter Schlafbedarf, Größenwahn, gesteigerte Libido, Größenwahn und Verlust sozialer Hemmungen. Die depressive Phase zeichnet sich durch die Negativierung manischer Symptome aus: erhöhtes Schlafbedürfnis, Antriebsminderung, Konzentrationsschwäche, deprimierter Affekt bis zu Suizidgedanken oder Suizidversuch, psychomotorische Agitiertheit und vermindertes Selbstwertgefühl.

Analog zur Schizophrenie ist die bipolare Störung ein komplexes Krankheitsbild, deren Entstehung am ehesten mittels eines multimodalen Vulnerabilitätskonzepts erklärt werden kann, welches auf genetischen, neurobiologischen, neuroendokrinen, und psychophysiologischen Faktoren fußt. (Möller et al. 2005)

Die Erbllichkeit einer bipolaren Störung lag in mehreren Zwillingsstudien bei ca. 80 – 90% (Craddock et al. 2006; Kendler 2001; McGuffin et al. 2003). Das Erkrankungsrisiko für Kinder mit einem an einer unipolaren Depression erkranktem Elternteil, lag bei ca. 10%, bei bipolaren Psychosen bei ca. 20%. Das Morbiditätsrisiko stieg auf 50 – 60%, wenn beide Eltern an einer bipolaren Psychose leiden.

1.3 Gemeinsamkeiten von bipolaren Störungen und der Schizophrenie

Die Lebenszeitprävalenz beider Erkrankungen liegt bei 1%, wobei das Ersterkrankungsalter gehäuft zwischen dem 15. und 25. Lebensjahr liegt (Tsuang et al. 2002). Die Suizidrate ist ebenfalls bei beiden Erkrankungen deutlich erhöht.

Auch in der Klinik lassen sich zahlreiche Parallelen finden, so können ebenso Patienten mit einer bipolaren Störung psychotische Symptome wie Halluzinationen, Denkstörungen und Wahnvorstellung aufweisen, während viele schizophrene Patienten auch an bipolaren Stimmungsschwankungen leiden. Analog finden sich ebenfalls Gemeinsamkeiten in der medikamentösen Behandlung – affektstabilisierende Therapeutika, die bei bipolaren Störungen die Therapie erster Wahl darstellen, werden zum Teil auch bei schizophrenen Patienten eingesetzt, während atypische Antipsychotika, die erfolgreich bei der Schizophrenie Anwendung finden, auch stimmungsstabilisierende und antimanische Wirkung zeigen.

Aufgrund dieser Gemeinsamkeiten beider Erkrankungen liegt der Verdacht nahe, dass auch genetische Parallelen, d.h. gleiche Kandidatengene vorliegen könnten. Berrettini zeigte anhand von Zwillings- und Adoptionsstudien, dass bipolare Psychosen sowie die Gruppe der Schizophrenien über eine gleiche genetische Basis verfügen (Berrettini 2002; Berrettini 2000a; Berrettini 2000b). In Familienstudien fand sich ein erhöhtes Morbiditätsrisiko für Menschen, bei denen erstgradig Verwandte an einer Schizophrenie, einer schizoaffektiven Psychose oder einer unipolaren Störung litten (Kendler 2001; Somnath et al. 2002; Wray 2012).

Bisher konnten mehrere mögliche genetische Hotspots nachgewiesen werden. Das *G72*-Gen, welches auf Chromosom 13 (13q22-34) liegt und mit dem D-Aminosäure-Oxidase (*DAAO*)-Gen auf 12q24-11 interferiert, scheint mit beiden Krankheitsentitäten assoziiert zu sein (Bass et al. 2009; Chumakov et al. 2002; Detera-Wadleigh et al. 2006; Hattori et al. 2003; Sklar 2002). Auch der Locus Chr. 12q24-2, auf dem u.a. das *NOS-1*-Gen liegt, erwies sich als weiterer Hotspot (Degn et al. 2001; Detera-Wadleigh 1999; Ewald et al. 1998; Shink et al. 2005). Positive Assoziationen fanden sich auch für das *MCL 1*-Gen auf Chromosom 22q13 (Verma et al. 2005).

1.4 Der Wnt/FZD-Signalweg

Der sogenannte „Wnt-Signalweg“ nimmt eine Schlüsselstelle in der Embryogenese und der Entstehung von familiär polypossem Darmkrebs ein. „Wnt“ steht für „wingless“ da Veränderungen dieses Signalweges zunächst bei der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* untersucht wurden, deren Wnt-knockout-Varianten eine Fehlanlage der Flügel aufwiesen (Sharma et al. 1976). Hier und in nachfolgenden Studien zeigte sich, dass die Wnt-Glykoproteine und ihre nachgeschalteten, siebenfach durch die Zellmembran gewundenen Rezeptorproteine des Frizzled-Typs (FZD), durch Interaktion mehrerer Proteine die Transkription von Wnt-Zielgenen steuern.

Der Wnt-Rezeptor wird von seinem Liganden, dem Wnt-Protein besetzt. Für die Aktivierung ist allerdings ein Ko-rezeptor, ein transmembranöses low-density-Lipoprotein LRP (*receptor related protein*), welches zusammen mit dem Wnt-Protein und dem Frizzled-Rezeptor einen trimerischen Komplex bildet und damit den Wnt-Rezeptor aktiviert. Bei Vertebraten fand man als Ko-rezeptor LRP5 und LRP6 (Pinson et al. 2000; Tamai et al. 2000). Der aktivierte Rezeptor beeinflusst mehrere intrazelluläre Proteine: das Dishevelled-Protein, GSK-3 β (Glycogen synthase kinase 3 β), Axin, das Tumorsuppressor-Protein APC (*Adenomatous Polyposis Coli*) und β -Catenin, das ein Regulator der Transkription ist. APC, GSK-3 β und Axin bilden bei nicht aktiviertem Rezeptor intrazellulär einen Komplex und regulieren über Proteasome den Spiegel von β -Catenin. Wird der Wnt-Rezeptor nun durch seinen Liganden besetzt, wird DSH aktiviert welches wiederum inhibierend auf den Komplex aus Axin/APC/GSK-3 β wirkt und damit den Abbau von β -Catenin verhindert. Als Konsequenz kumuliert β -Catenin im Zytoplasma und im Nucleus. Dieser sogenannte kanonische Signalweg führt über die Assoziation von β -Catenin mit den HMG-(*high mobility group*) Box-Transkriptionsfaktoren der *TCF* (*T-cell factor*)-*LEF* (*lymphocyte enhancer factor*)-Familie zur Aktivierung kanonischer Wnt-Zielantigene. Unterbleibt diese Bindung, fungiert TCF als ein Suppressor der Transkription (Abbildung 1).

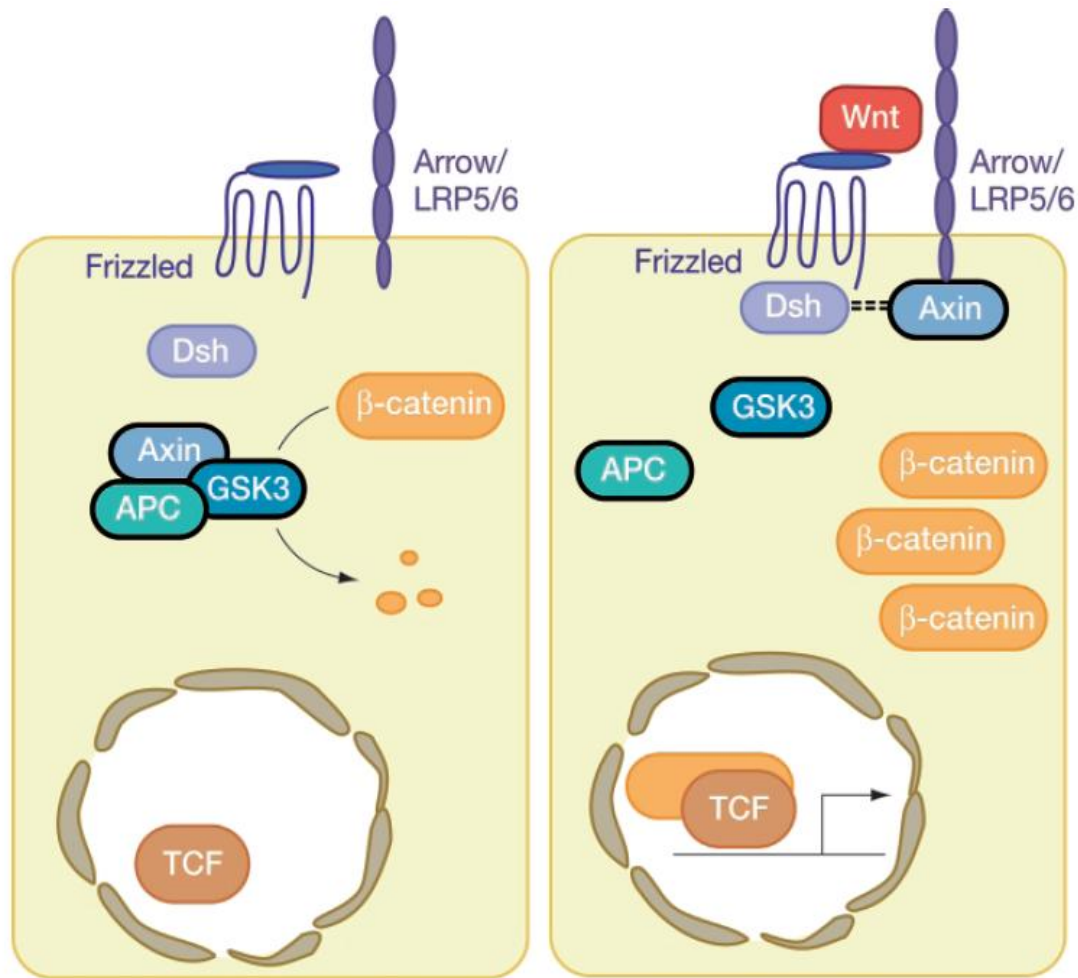


Abbildung 1: Die Wnt/FDZ-Signalkaskade. Linkes Bild: nicht aktivierter Komplex, rechtes Bild: Aktivierung durch den Wnt-Liganden (Logan et al. 2004)

Im nicht-kanonischen Pathway wird das Signal nicht durch β -Catenin, sondern durch andere Faktoren wie JNK (*c-Jun N-terminale Kinase*), PKC (Proteinkinase C) und CamKII (*Ca²⁺/Calmodulin-dependent kinase II*) übertragen. Biologische Prozesse die mit dem nicht-kanonischen Wnt-Signalweg assoziiert werden konnten, sind beispielsweise die Augenentwicklung und die Neuralleistenwanderung (De Calisto 2005; Maurus 2005).

Die Funktionen der Wnt-Zielgene sind mannigfaltig, so zeigten sich bei knockout-Varianten bei Wirbeltieren schwerwiegendste Veränderungen des Phänotypes. Die Bandbreite reichte von erhöhter Sterblichkeit im Embryonalstadium, Abnormalität in der ZNS-Entwicklung bis zu starken Veränderungen und Fehlanlagen der Gliedmaßen.

Die hohe Variabilität der Auswirkungen auf den Phänotyp bei Dysfunktionen in den Wnt-Zielgenen, lassen vermuten, dass die jeweilige Zielzelle selbst den Schweregrad der Veränderung bedingt (Logan & Nusse 2004).

Wnt mutant phenotypes in the mouse			
Gene	Knockout (KO) phenotypes or other functions	Redundancies/ similarities with other KO	References
<i>Wnt1</i>	Deficiency in neural crest derivatives, reduction in dorsolateral neural precursors in the neural tube (with <i>Wnt3A</i> KO) Decrease in thymocyte number (with <i>Wnt-4</i> KO)	Redundant with <i>Wnt3a</i> and <i>Wnt4</i> ; Similar to TCF1	(Ikeya et al. 1997, Mulroy et al. 2002)
<i>Wnt3</i>	Early gastrulation defect, Perturbations in establishment and maintenance of the apical ectodermal ridge (AER) in the limb	In limbs, similar to loss of β -catenin	(Barrow et al. 2003, P. Liu et al. 1999)
<i>Wnt3a</i>	Paraxial mesoderm defects, tailbud defects, deficiency in neural crest derivatives, reduction in dorsolateral neural precursors in the neural tube (with <i>Wnt1</i> KO) Loss of hippocampus Somitogenesis defects	Redundant with <i>Wnt1</i> , Similar to LEF1/TCF1	(Aulehla et al. 2003; Galceran et al. 1999, 2000; Ikeya et al. 1997; Lee et al. 2000; Yoshikawa et al. 1997)
<i>Wnt4</i>	Defects in female development; absence Mullerian duct, defects in adrenal gland development Decrease in thymocyte number (with <i>Wnt1</i> KO)	<i>Wnt1</i>	(Heikkila et al. 2002, Mulroy et al. 2002, Vainio et al. 1999)
<i>Wnt5a</i>	Truncated limbs and AP axis Defects in distal lung morphogenesis Chondrocyte differentiation defects, perturbed longitudinal skeletal outgrowth Inhibits B cell proliferation, produces myeloid leukemias and B-cell lymphomas in heterozygotes		(Li et al. 2002, Liang et al. 2003, Yamaguchi et al. 1999, Y. Yang et al. 2003)
<i>Wnt7a</i>	Female infertility; in males, Mullerian duct regression fails Delayed maturation of synapses in cerebellum		(Hall et al. 2000, Parr & McMahon 1998)
<i>Wnt7b</i>	Placental development defects Respiratory failure; defects in early mesenchymal proliferation leading to lung hypoplasia		(Parr et al. 2001, Shu et al. 2002)
<i>Wnt11</i>	Ureteric branching defects and kidney hypoplasia		(Majumdar et al. 2003)

Tabelle 5: Phänotypische Auswirkungen bei knockout-Varianten im Wnt-Signalweg (Logan & Nusse 2004)

1.5 Das humane Frizzled-3-Gen (*Fzd3*)

Der Wnt/FZD-Signalweg hat eine wichtige Rolle in der Entwicklung des zentralen Nervensystems durch Regulierung der Neurogenese, der Synaptogenese und der Migration der Nervenzellen, inne (Deardorff et al. 2001). Auch in der frühen Entwicklung des Kleinhirns ist der Wnt/FZD-Signalweg über die Transkription von Wnt-1, einem Protoonkogen-Protein, welches die Neurogenese im Mesenzephalon und Kleinhirn bei der Maus reguliert, maßgeblich von Bedeutung (McMahon et al. 1990). Bezüglich psychischer Störungen fanden sich bei an einer Schizophrenie erkrankten Patienten sowohl eine Reduzierung von GSK-3 β im präfrontalen Kortex; sowie eine Alteration der Spiegel von β -Catenin und Wnt-1 im Hippokampus (Beasley et al. 2001; Cotter et al. 1998; Kozlovsky et al. 2001; Miyaoka et al. 1999).

Das humane „Frizzled 3“-Gen (*Fzd3*) nimmt eine wichtige Rolle als Kandidatengen der Schizophrenie ein: das 70kb lange, aus 8 Exons bestehende und auf Chromosom 8p21 gelegene Gen, kodiert - nur 3 Mb vom Genlokus des Neuroregulin entfernt - für den siebenfach transmembranös gelegenen Frizzled-Glykoproteinrezeptor. Diese Region zeigte sich in mehreren Studien als Schizophrenie-Locus (Gurling et al. 2001; Liu et al. 2005; Park et al. 2004).

Der von *Fzd3* kodierte transmembranöse Rezeptor für Glykoproteine im Wnt-Signalweg wird im adulten ZNS stark exprimiert (Wang et al. 2006). Die Synptogenese, Neurogenese, sowie die neuronale Entwicklung und Migration der Nervenzellen wird maßgeblich durch den Wnt-Signalweg beeinflusst. In Tierversuchen zeigten sich in der Untersuchung des Gehirns von *Fzd3*-knockout-Mäusen schwerwiegende Veränderungen in der weißen Substanz – axonale Bahnen waren entweder nur stark rarifiziert vorhanden oder im Vergleich zum Wildtyp nicht angelegt. Betroffen waren vor allem die vordere Kommissur, das Corpus callosum, der Fornix, die Capsula interna (thalamokortikale und kortikothalamische Bahnen), die Stria medularis, die Stria terminalis sowie die Kommissur des Hippocampus. Interessanterweise fand sich weiterhin eine nicht physiologische Faserverbindung zwischen rechtem und linkem Thalamus direkt unterhalb der optischen Bahnen (Wang et al. 2006).

In weiteren Untersuchungen zeigte sich bei *Fzd3*-inaktivierten Mausmodellen eine deutliche Beeinträchtigung der Entwicklung des sympathischen Nervensystems. *Fzd3* scheint ein wichtiger Regulator der Proliferation und Differenzierung der sympathischen Neuroblasten zu sein. Weiterhin fand sich bei artifiziell gestörtem Regelkreis eine deutlich erhöhte Apoptoserate. In Mausmodellen zeigte sich eine deutliche Größenabnahme der sympathischen Ganglien, weiterhin war die periphere Innervierung insuffizient, da die Axone ihr Innervationsziel nicht erreichten. Diese Mäuse fielen durch erniedrigte β -Catenin-Spiegel, einem wichtigen Transkriptionsfaktor in der Wnt-Signalkaskade, auf. (Armstrong et al. 2011)

2003 wurden in einer chinesischen Studie Familientrios (ein Erkrankter plus beide Elternteile) bezüglich deren Assoziation mit drei SNPs im *FZD3*-Gen untersucht. Hier fand sich in der getesteten Population eine signifikante Assoziation für alle drei SNPs (Yang et al. 2003b). Weitere Assoziationsstudien eines japanischen und eines Han-chinesischen Fall- und Kontrollkollektivs im Hinblick auf zwei SNPs und deren Haplotypanalyse konnten dieses Ergebnis replizieren (Katsu et al. 2003; Zhang et al. 2004).

2004 wurde eine britische Studie initiiert, die bei der Untersuchung von britischen Familientrios, d.h. dem ersten kaukasischen Sample, keine Assoziation zwischen den drei untersuchten SNPs und den entsprechenden Haplotypen (Wei et al. 2004) fanden. In weiteren japanischen Fall-Kontrollstudien konnte ebenfalls keine Assoziation für 4 SNPs und ihren Haplotypen mit Schizophrenie, sowie bei bipolarer Störung und unipolarer Depression, gezeigt werden (Hashimoto et al. 2005; Ide et al. 2004). Auch in einer koreanischen Untersuchung konnte keine Assoziation von *Fzd3* mit Schizophrenie festgestellt werden. In dieser Meta-Analyse zeigte sich für alle bisher untersuchten Haplotypblöcke keine signifikante Assoziation (Jeong et al. 2006).

Im Kontrast zu diesen Ergebnissen erschien 2011 eine Studie, die erneut 5 SNPs an 81 chinesischen Patienten untersuchte, die zur Va-Minderheit aus Yunnan gehörten. Hier fanden sich wiederum sowohl auf Ebene der Einzelmarker als auch in der Haplotypanalyse statistisch signifikante Assoziationen. (Kang et al. 2011)

2. Fragestellung und Zielsetzung dieser Arbeit

Bisher wurde nur eine einzige nicht-asiatische Population bezüglich einer Assoziation zwischen dem *Fzd3*-Gen und der Schizophrenie bzw. der bipolaren Störung untersucht. Gegenstand dieser Arbeit war daher die Untersuchung von 3 SNPs (Abb. 2) - **rs960914** (intronisch gelegen, IVS3+258 T>C), **rs2241802** (im Exon 5, 435 G>A) und **rs352203** (intronisch gelegen, IVS5+9020 T>C) - sowie deren Haplotypen (Abb. 3) bei 192 Patienten, die an einer chronischen Schizophrenie litten, und 56 Patienten mit einer bipolaren Störung in einer Fall-Kontrollstudie, um eine mögliche Assoziation zwischen der Erkrankung und *Fzd3* in kaukasischen Populationen zu untersuchen. Als Vergleichsgruppe wurden 284 gesunde Blutspender aus der gleichen unterfränkischen Region herangezogen.

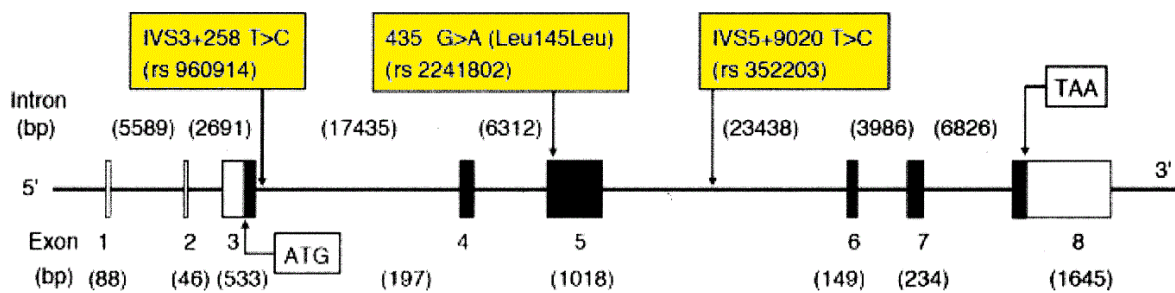


Abbildung 2: Lage der drei untersuchten SNPs auf einer schematischen Darstellung des *Fzd3*-Gens. Protein-kodierende Regionen werden durch schwarze, untranslatierte Bereiche durch weiße Kästchen symbolisiert. Die Länge der Exons- und Introns ist in Klammern angegeben. Das Start- (ATG) und Stoppcodon (TAA) ist ebenfalls aufgetragen (Darstellung verändert nach Ide et al. 2004)

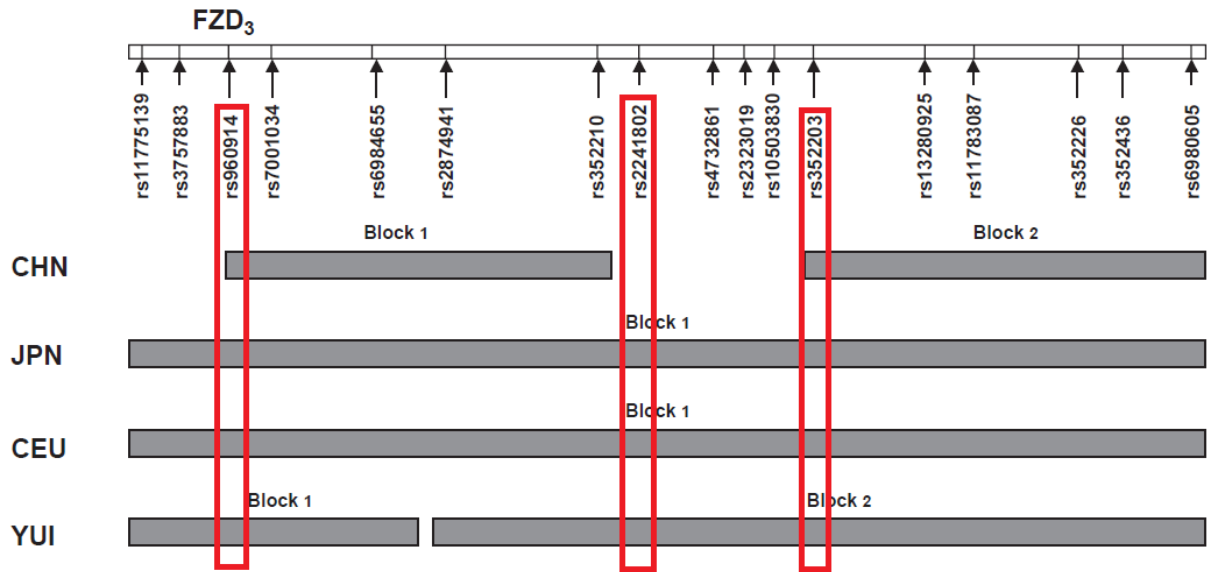


Abbildung 3: Haplotypblock-Struktur des *Fzd3*-Gens (modifiziert nach Jeong et al, 2006) sowie die in dieser Arbeit untersuchten SNPs. Die rot markierten SNPs wurden in der vorliegenden Arbeit untersucht und decken beide Haplotypblöcke ab. Weiterhin werden zum Vergleich bisher an verschiedenen Populationen untersuchte Haplotyp-Blöcke aufgezeigt: CHN: Han-Chinesen in Beijing; JAP – Japaner in Tokyo, Japan; CEU: Einwohner in Utah, USA, mit Vorfahren aus Nord- und Westeuropa; YRI: Yoruba in Ibadan, Nigeria.

3. Material und Methoden

3.1. Material

3.1.1. Fall- und Kontrollgruppe

Die Kontrollgruppe bestand aus 284 anonymen, gesunden Personen aus dem unterfränkischen Raum, die im Rahmen einer Blutspende für die Studie rekrutiert wurden. Das mittlere Alter lag bei 35 ± 13 Jahren, das Verhältnis Männer zu Frauen bei 150:134.

Die Fallgruppe bestand aus 192 Patienten mit der Diagnose Schizophrenie, sowie aus 56 Patienten mit einer bipolaren Störung (F31 nach ICD-10), die jeweils an der Universitätsklinik für Psychiatrie in Würzburg nach schriftlicher Aufklärung und Einwilligung rekrutiert wurden. Zur Diagnosestellung wurden semistrukturierte Interviews nach dem AMDP-System von erfahrenen Fachärzten der Psychiatrie durchgeführt; weiterhin wurden Kasuistiken und Ergebnisse bereits erhobener Diagnostik aus auswärtigen Kliniken zur Diagnosesicherung herangezogen. Auch die Fremdanamnese aus dem familiären Umfeld fand Beachtung. Die Einteilung in die Untergruppen der Schizophrenie erfolgte gemäß ICD-10. Um der Heterogenität des klinischen Bildes der Erkrankungen Rechnung zu tragen, verwandten wir zur Differenzierung der Untergruppen neben dem ICD-10 auch die Klassifikation von Leonhard. Folgende Subgruppen fanden Einschluss in die Untersuchung:

Patienten pro Subgruppe	Subgruppe der Schizophrenien nach ICD-10
56	Paranoide Schizophrenie
39	Hebephrene Schizophrenie
6	Katatonische Schizophrenie
9	Undifferenzierte Form der Schizophrenie
25	Residuale Schizophrenie
7	Schizophrenia simplex
3	Schizophrenie, nicht andersweitig spezifiziert
13	Wahnhafte Störung
37	Schizoaffektive Störung

Alle Patienten waren chronisch erkrankt, wiesen also keine Vollremission auf.

56 weitere Patienten wurden nach ICD-10 als bipolar erkrankt eingeordnet (ICD-10 F31, nur Patienten mit einer Bipolar-I Störung, i. e., mindestens einer vollen Manie).

Alle Patienten der untersuchten Gruppe waren frei von signifikanten neurologischen Erkrankungen, mentaler Retardierung, oder somatischer Krankheit, die zu einer organischen Psychose führen können. Ebenfalls wurden Patienten mit einer substanzbezogenen, psychotischen Erkrankung ausgeschlossen. Sowohl das Patienten- als auch das Kontrollkollektiv war genetisch homogen (Reif et al. 2006).

Gemäß der Klassifikation nach Leonard konnten die Patienten wie folgt eingeteilt werden:

Patienten pro Subgruppe	Subgruppe nach Leonard	
55	Affektvolle Paraphrenie	Unsystematische Schizophrenie nach Leonard
55	Periodische Katatonie	
36	Kataphasie	
33	Systematische Hebephrenie	Systematische Schizophrenie nach Leonard
7	Systematische Paraphrenie	
6	Systematische Katatonie	
56	Manisch-depressive Erkrankung	

146 Patienten (entsprechend: 55 Patienten mit affektvoller Paraphrenie, 55 Patienten mit periodischer Katatonie, sowie 36 Patienten mit Kataphasie) litten an einer Typ A Schizophrenie (unsystematische Schizophrenie) mit einem mittleren Ersterkrankungsalter von 28 +/- 10 Jahren. 46 Patienten (entsprechend: 33 Patienten mit systematischer Hebephrenie, 7 Patienten mit systematischer Paraphrenie und 6 Patienten mit systematischer Katatonie) waren an einer Typ B Schizophrenie nach Leonard (systematische Schizophrenie), mit einem mittleren Ersterkrankungsalter von 26 +/- 6 Jahren, erkrankt.

Die Studie wurde von der Ethik Kommission der Universität Würzburg genehmigt.

3.1.2 Material zur Durchführung der PCR und der Gelelektrophorese

3.1.2.1 Chemikalien

Bezeichnung	Hersteller
Agarose	BIOZYM, Rockland, USA
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	SIGMA-ALDRICH Chemie, Steinheim
Ethidiumbromid	SIGMA-ALDRICH Chemie, Steinheim
KCL	APPLICHEM, Darmstadt
MgCl ₂	APPLICHEM, Darmstadt
Tris-Acetat, Tris-HCL	MERCK, Darmstadt
Tween 20	APPENLICHEM, Darmstadt
100 bp DNA-Leiter	PEQLAB, Erlangen

3.1.2.2 Puffer

Bezeichnung	Zusammensetzung
1 x TAE Puffer	40mM Tris-Acetat 1 mM EDTA pH (8,0)
PCR-Puffer	500mM KCL 100 mM Tris-HCL (pH 8,3) 0,25% (v/v) Tween 20 0,25 mg/ml BSA 10mM oder 15 mM MgCl ₂
PCR Goldstar-Puffer	750 mM Tris-HCL (pH9) 200mM (NH ₄) ₂ SO ₄ 0,1% Tween-20
Hotstar-Puffer	Quiagen
Lysispuffer	155 mM NH ₄ CL 10 mM KHCO ₃ 0,1 mM EDTA (pH evtl. mit 15% HCL auf 7,4 einstellen)
Kernlysispuffer	10 mM Tris-HCL pH 8

	400 mM NaCL 2 mM Na ₂ EDTA-Puffer pH ca. 8,2
--	---

3.1.2.3 Verwendete Geräte und Materialien

Bezeichnung	Gerät	Hersteller
<i>Autoclav</i>	SANOclav	WOLF, Bad Überkingen-Hausen
<i>Biosphere Filter Tips 10 µl</i>		EPPENDORF / GILSON Hamburg
<i>Cycler</i>	T-1 Thermocycler UNO II Thermoblock	BIOMETRA, Göttingen
<i>Dokumentation</i>	ChemiDoc XRS System	BIO-RAD, München
<i>Elektrophorese</i>	Kammern, Kämme	PEQLAB, Erlangen
<i>Eppendorf Röhrchen 1,5ml</i>		EPPENDORF, Hamburg
<i>Frischhaltefolie</i>		WENTUS Kunststoffe GmbH, Höxter
<i>Heizrührplatte</i>		GLW, Würzburg
<i>Multiply-µ Strip Pro Biosphere</i>		SARSTEDT, München
<i>PCR Softtubes 0,2 ml</i>		BIOZYM DIAGNOSTIK GmbH, Oldendorf
<i>Pipetten</i>		EPPENDORF, Hamburg
<i>Pipettenspitzen 10 µl, 100µl, 200µl, 1000µl</i>		SARSTEDT, Nürnberg
<i>Spannungsgeräte</i>	Consort Electrophoresis Power Supply E 431; Elektrophorese-Powerpack P24; Gene Power Supply GPS 200/400	PEQLAB, Erlangen BIOMETRA, Göttingen PHARMACIA, Freiburg
<i>UV-Transilluminator</i>		UVP, Upland
<i>Videoprinter</i>	Video Graphic Printer UP- 895CE	SONY, Tokio

VORTEX	Microspin FV-2400	LAB4YOU, Berlin
Waage T	PM 300	METTLER, Gießen
Zentrifuge	Megafuge 1. OR	HERAEUS INSTR., Osterode

3.1.2.4 cDNA-Herstellung

Bezeichnung	Hersteller
<i>iScript™ cDNA Synthesis-Kit</i>	BIO-RAD, Hercules CA, USA
<i>Gene Ruler™ 100bp DNA Ladder</i>	MBI FERMENTAS GmbH, St. Leon-Rot
<i>8 x Loading Dye Solution</i>	FERMENTAS GmbH, St. Leon-Rot

3.1.2.5 Nukleotide

Bezeichnung	Hersteller
<i>DNTP- Mix (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)</i>	PEQLAB, Erlangen

3.1.2.6 Enzyme

Bezeichnung	Hersteller
<i>Taq-Polymerase</i>	BIO-RAD, München
<i>TERMlpol-Polymerase</i>	Solis BioDyne

3.1.2.7 Wasser

H₂O-Merk

3.1.2.8 Oligonukleotidprimer

Bezeichnung	Hersteller
<i>5'- und 3'-Primer</i>	BioTeZ GmbH, Berlin

Sequenzen der eingesetzten Primer:

SNP	Forward-Primer (F)	Reverse-Primer (R)	Eigenschaft	Annealing-Temperatur
SNP 1: rs960914	5'-CTT AAA TTT TAA ACT TCT GAA TGG GT-3'	5'-TAA AAA TGT ATA TGT TTT GCT TCA G-3'	Intronisch, IVS3+258 T>C	52,8°C
SNP 2: rs2241802	5'-CTA TGA AAT AGC GAG CAA ATG ACA-3'	5'-GGA AAT CCA AAC TGT TAG ATC GTG-3'	Exon 5, 435 G>A	56,8°C
SNP 3: rs352203	5'- ATG ACT TCC TAG GGC CAA ACC TC-3'	5'- GCA AAA ACT AAT GGC CAG CAA TGT-3'	Intronisch, IVS5+902 0 T>C	61°C

Tabelle 6: Sequenzen der verwendeten Primer

3.1.3 Material für Allel-spezifische Primerextension und die MALDI-TOF Massenspektrometrie

3.1.3.1 Geräte

<i>AnchorChip 96 Target Plate</i>	Bruker Daltonik, Bremen
<i>MALDI-TOF autoflex 1-Massenspektrometer</i>	Bruker Daltonik, Bremen
<i>PCR-Cycler, T1-Thermocycler</i>	Biometra GmbH, Göttingen
<i>UV-Cleavage Lamp CL- 366</i>	Bruker Daltonik, Bremen
<i>Software: flexAnalysis flexControl</i>	Bruker Daltonik, Bremen
<i>Tischzentrifuge Microspin FV-2400</i>	BioSan, Riga, Lettland
<i>Tischzentrifuge Galaxy</i>	Mini Merck Eurolab, Saarbrücken

3.1.3.2 Chemikalien

<i>10x Reaction Buffer C (500 mM Tris-HCl, pH 9,5) SOLIS</i>	SOLIS BIODYNE, Tartu, Estonia
<i>3-Hydroxypicolinic (3-HPA)</i>	Bruker Daltonik, Bremen
<i>Amonium Acetat (für MALDI) 99%</i>	Fluka Chemie GmbH, Buchs, Schweiz
<i>Agarose low EEO</i>	AppliChem, Darmstadt
<i>1kb DNA Ladder, GeneRuler</i>	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
<i>ddNTP (A, T, G, C) 20 mM</i>	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
<i>Di-amoniumhydrogencitrat (DAC), 98%</i>	SIGMA-ALDRICH, Steinheim
<i>DNA-Polymerase, Thermipol</i>	SOLIS BIODYNE, Tartu, Estonia
<i>H₂O</i>	Nanopure
<i>MgCl₂, 25 mM</i>	SOLIS BIODYNE, Tartu, Estonia
<i>Shrimp Alkalische Phosphatase (Lazarov et al.)</i>	USB, Cleveland, Ohio, USA
<i>FZD3 Primer</i>	BioTeZ Berlin-Buch GmbH, Berlin

SAP-Reaktionspuffer	USB, Cleveland, Ohio, USA
---------------------	---------------------------

3.1.3.3 Kits

DNA purification Kit, genostrep 96	Bruker Daltonik, Bremen
------------------------------------	-------------------------

3.1.3.4 Auswertungssoftware

Office Word 2003 (Microsoft, Unterschleißheim)
 SPSS für Windows 9,0 (SPSS Inc., Chicago, USA)
 GENECOUNTING Software
 GPOWER

3.2. Methoden

3.2.1 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Polymerasekettenreaktion ist eine Methode zur Amplifizierung von selektiven DNA-Sequenzen durch wiederholte Synthese. Die Hybridisierung von Starter-Oligonukleotiden (sog. *Primer*) an die denaturierten DNA-Stränge erzielt die gewünschte Spezifität.

Der PCR-Prozess umfasst in der Regel 30-50 Wiederholungszyklen, die in einem sogenannten Thermocycler durchgeführt werden. Der einzelne Zyklus kann in drei Einzelschritte unterteilt werden: die Denaturierung der Ausgangs-DNA (sog. *Template*), die Primerhybridisierung (*Annealing*), sowie die Elongation (*Polymerisation*) der gewünschten Zielsequenz.

Zur Denaturierung des DNA-Doppelstrangs, d.h. zur Aufspaltung der Wasserstoffbrückenbindungen um zwei komplementäre Einzelstränge zu erhalten, muss die DNA auf ca. 95°C erhitzt werden. Im ersten Zyklus wird die Ausgangs-DNA länger erhitzt um eine vollständige Auftrennung der Einzelstränge zu gewährleisten. In der Annealingphase muss die Reaktionstemperatur auf die primerspezifische Annealingtemperatur abgesenkt werden, um eine korrekte Primerhybridisierung zu erhalten. Wird die Annealingtemperatur zu hoch gewählt, bleibt eine Hybridisierung aus, bei zu niedriger Temperatur ist eine Anlagerung an falscher Stelle möglich.

Nach der Primerhybridisierung werden die fehlenden Stränge zwischen den Primern mit Hilfe der Taq-Polymerase aus *Thermus aquaticus*, vom 3' Ende komplementär mit freien Nukleotiden, bei einer Temperatur von 72°C, aufgefüllt. Die optimale Annealingtemperatur muss experimentell bestimmt werden

3.2.1.1 Reaktionsansätze der PCR

Primer	rs960914	rs2241802	rs352203
MgCl ₂ 15mM	2,5 µl	2,5 µl	3,75 µl
2,5 mM Nuk. jew.	1,0 µl	1,0 µl	1,5 µl
Forward Primer (pmol/µl)	0,7 µl	0,5 µl	0,8 µl
Reverseprimer (pmol/µl)	0,7 µl	0,5 µl	0,8 µl
House-Taq (U)	0,3 µl	0,3 µl	0,6 µl
Template (ng/µl)	1,5 µl	1,2 µl	1,5 µl
H ₂ O	18,3 µl	19 µl	28,55 µl
Annealingtemperatur	52,8°C	56,8°C	61°C
Zyklenanzahl	35	35	40

Tabelle 7: Reaktionsansätze der PCR

3.2.1.2 Amplifizierung der DNA

Die Amplifizierung von **rs960914**, **rs2241802** und **rs352203** wurde unter den gleichen Bedingungen durchgeführt. Für eine initial vollständige Denaturierung der Ausgangs-DNA im Thermocycler, wurde vor dem ersten Zyklus zunächst eine Temperatur von 95°C für 3min gewählt. Alle nachfolgenden Zyklen liefen unter folgenden Bedingungen: Denaturierung bei 95°C für 45s, gefolgt von oben aufgeführter, primerspezifischen Annealingtemperatur für 45s, anschließend die Elongation bei 72°C für 45s. Dieser Ablauf wurde bei **rs960914** und **rs2241802** 35 mal wiederholt, bei **rs352203** 40 mal. Die finale Elongation erfolgte jeweils bei 72°C für 3 Minuten.

3.2.1.3 Gelelektrophorese

Um das Ergebnis der PCR, d.h. die gezielte Amplifizierung einer selektiven DNA-Sequenz, zu kontrollieren bzw. eine Kontamination des Produktes auszuschließen, macht man sich die negative Ladung der DNA-Moleküle und die damit gegebene Bewegung im elektrischen Feld zu Nutze.

Mittels eines geeigneten Trägermaterials (Polyacrylamid oder Agarose), welches unter elektrischer Spannung gesetzt wird, können DNA-Moleküle aufgrund von Bandenbildung gemäß ihres Molekulargewichtes nach der Größe unterschieden werden. Verwendet wurden 2%ige Agarosegele. Durch das Vermischen von 2g Agarose mit 100ml 1xTAE-Puffer erhielt man nach circa 2 minütigem Erhitzen, ein polymerisiertes Gel. Nach Abkühlung des Geles auf ca. 50°C wurden 3 µl Ethidiumbromid hinzugefügt, um das DNA-Produkt unter UV-Beleuchtung aufgrund des entstehenden Ethidiumbromid-DNA-Komplexes sichtbar machen zu können. Das noch flüssige Gel wurde in Gelträger mit Kämmen gegossen, wodurch das Gel nach Aushärtung Taschen für die DNA-Proben aufwies. 5 µl jeder DNA-Probe wurden mit 7 µl Blaupuffer versetzt und anschließend in eine Geltasche pipettiert. Durch das Anlegen von 120 V für eine Stunde erfolgte die Auftrennung der Banden unter Zuhilfenahme einer Negativprobe, sowie einer 1kb-DNA-Leiter als Referenz. Das Ergebnis wurde auf einem UV-Tisch kontrolliert und photographisch dokumentiert.

3.2.1.4 Alkalischer Phosphatase Verdau (SAP-Verdau)

Um noch enthaltene Reste von desoxy-Nukleotidtriphosphaten (dNTPs) zu entfernen, wurden die Reaktionsprodukte mittels Shrimp Alkalischer Phosphatase (Lazarov et al. 2005) verdaut. Die SAP dephosphoryliert dNTPs und entfernt Primer durch Verdau. Das Gesamtvolumen des Verdau betrug 9 µl, bestehend aus 7 µl des Amplifikationsproduktes sowie 2 µl SAP-Mix bestehend aus 0,4 µl SAP (1 U/µl) und 1,6 µl SAP-Reaktionspuffer. In einem Thermocycler wurde der SAP-Verdau durchgeführt. Bei 37°C betrug die Inkubationszeit 45min, die Inaktivierung des Enzyms erfolgte bei 90°C für 10min.

3.2.1.5 Primer-Extension Reaktion

Nach Abschluss des SAP-Verdau wurde das gereinigte Volumen von 9 µl mit 6 µl Primer-Extension-Mix (PE-Mix) versetzt. Der PE-Mix enthält 10 pmol SNP-

spezifische Primer, 1,5U Thermipolymerase in 1,5x Tris-HCL-Puffer, 4nmol didesoxy-Nukleotidtriphosphat (ddNTPs), 2mM MgCl₂ und H₂O. Die angewandten Primer haben eine Länge von 20 – 24 Basen und sind entsprechend komplementär der Sequenz direkt 3' vor dem jeweiligen SNP. Am 5'-Ende erfolgte eine Biotin-Markierung, wodurch eine Anheftung an eine Streptavidin-Platte gewährleistet wird. Ein Photolinker an siebter bzw. achter Stelle des 3'-Ende des Primers ermöglicht die Abspaltung des Primers mittels UV-Licht.

Mit Hilfe eines Thermocyclers wurde die Primer-Extension mit einem Gesamtvolumen von 15µl folgendermaßen durchgeführt: Denaturierung bei 94°C für 1 min., anschließend 35 Zyklen mit 94°C für 10s mit jeweils einem Annealingsschritt bei 60°C für 1min. Die Elongation des Primers um jeweils eine Base erfolgte während des Temperaturanstiegs von 60°C auf 94°C . Der letzte Schritt betrug 1min bei 72°C (Althoff 2005).

3.2.1.6 Reinigung des Primer-Extension-Produktes

Nach erfolgter Amplifizierung wurde das Produkt mit Hilfe des *DNA Purification Kits genostrep 96* gereinigt. Dafür wurde aus der PE-Reaktion 15 µl mit 4 µl Bindepuffer vermischt und auf eine mit Streptavidin beschichtete, 96-well Platte aufgebracht. Hier sorgt die Biotin-Markierung für eine gute Bindung. Die Inkubationszeit bei Raumtemperatur betrug 30min. Im Anschluss wurde nach Abnahme des Überstandes jedes Well zweimal mit 40µl Waschpuffer insgesamt 10mal hoch und runter pipettiert. Diese Prozedur wurde mit einem zweiten Waschpuffer wiederholt.

Nach Entfernung der Waschpuffer wurde 20 µl Elutionspuffer in jedes Well gegeben. Mittels einer UV-Lampe (CL- 366 Bruker Daltonik) wurden die Probe für 15 Minuten mit einem UV-Licht der Länge 366nm bestrahlt. Aufgrund des UV-Licht labilen Photolinkers konnten die Primer dabei abgespalten werden. Nach erneutem 10maligen Pipettieren, wurde 1µl der gereinigten Probe auf jede mit Matrix vorbereitete Position des MALDI-ToF-Targets (Matrix-Assisted Laser Disorbition/Ionisation in Verbindung mit einer Time-of-Flight Analyse) gegeben, um anschließend die Messung im Massenspektrometer durchzuführen (Althoff 2005).

3.2.1.7 MALDI-ToF Massenspektrometer

Der 1987 von Karas und Hillenkamp in Münster entwickelte MALDI (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation)-Prozess gewährleistet eine schonende Ionisierung von Biomolekülen ohne größere Fragmentation. Voraussetzung für dieses Verfahren ist die Ko-Kristallisation von Biomolekül und Matrix. Für die Untersuchung von RNA und DNA eignet sich vor allem die von Becker et. al 1993 entwickelte organische Matrix aus 3-Hydroxypikolinsäure. Durch den etwa 1 – 5 ns andauernden Beschuss des entstandenen Kristalls in einem Hochvakuum (8×10^{-7} mbar) mit einem kurzen Laserpuls wird der Analyt ionisiert und geht in die Gasphase über. Die Target-Matrix schützt die Probe vor photolytischer Zersetzung und verhindert Wechselwirkungen zwischen den Probemolekülen, weiterhin begünstigt sie die Ionisierung und kann die Laserenergie absorbieren (Schematische Darstellung Abbildung 4).

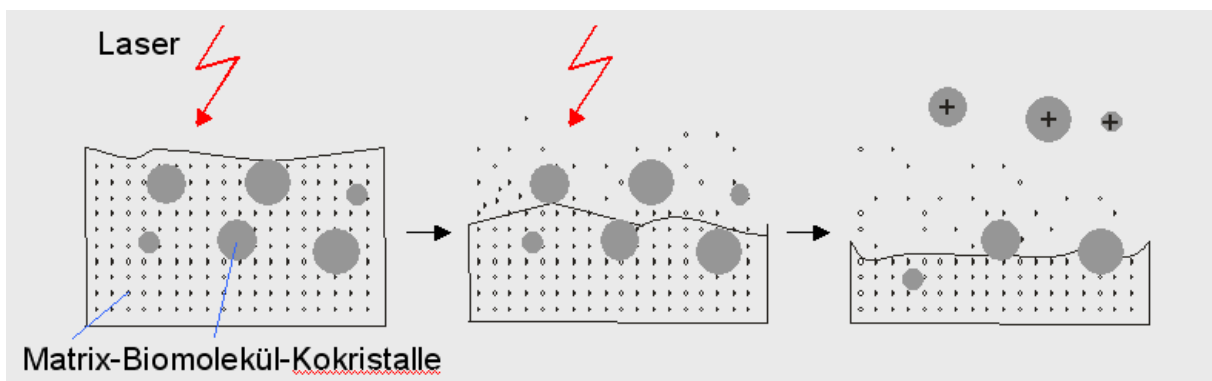


Abbildung 4: Der MALDI-Prozess (Althoff 2005)

Durch die Kombination mit einem ToF-Analysator (Time of Flight), d.h. die Messung der Zeit, die die ionisierten Teilchen durch die Beschleunigung in einem Hochspannungsfeld benötigen, um eine definierte Strecke zwischen Elektrode und Detektor in einem Flugrohr zurückzulegen, kann indirekt die Masse der Einzelproben bestimmt werden (Schematische Darstellung Abbildung 5).

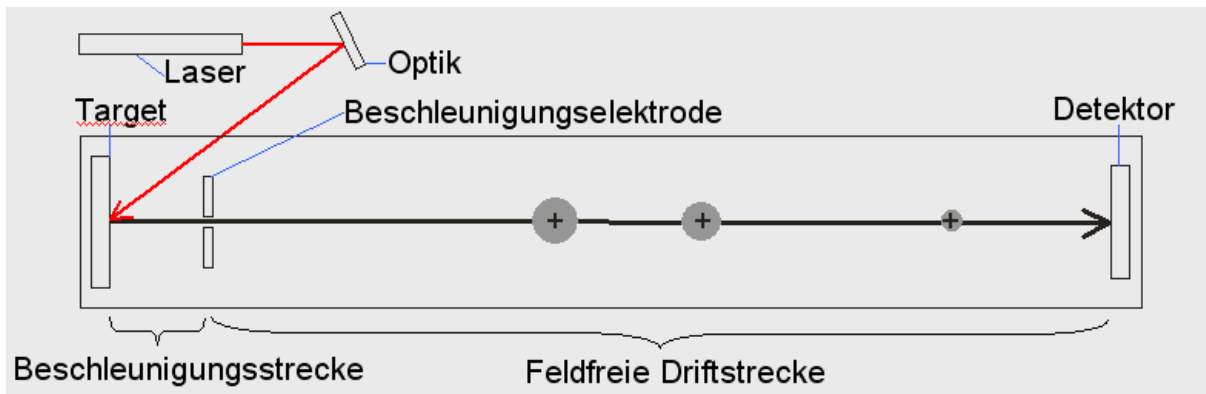


Abbildung 5: Time of Flight - Analyse (Althoff 2005)

Da sich die Amplifikate der Einzelbasenverlängerungen je nach Allel in ihrer Masse ebenso unterscheiden, wie die einzelnen Nukleotide, kann daher auf den vorliegenden Genotyp geschlossen werden. Die untersuchten Massen von Primern und Extensionsprodukten lagen in einem Bereich von 2000 – 3000 Da (Althoff 2005).

3.3 Statistische Analyse und Haplotyp-Analyse

Die Einzelassoziationstests wurden in Form von χ^2 -Tests mit SPSS für Windows 9.0 (SPSS Inc., Chicago, USA) durchgeführt. Um das paarweise bestehende Kopplungsungleichgewicht (*linkage disequilibrium*) zwischen den Polymorphismen zu bestimmen, wurde 2LD angewandt (Zhao 2004).

Durch die Verwendung des Programmes GENECOUNTING wurde ermittelt, in wie weit sich die Frequenz der spezifischen Haplotypen beim Patienten signifikant von der der Kontrollen unterschied. Weiterhin führte das Tool GENECOUNTING/PERMUTE durch das zufällige Zuweisen von Fall-Kontroll-Status Permutationstests auf eine globale Assoziation der Haplotypen durch. Das Programm berechnete hierfür 10.000 Permutationen.

Mit Hilfe des G*POWER Programmes wurden Power-Kalkulationen durchgeführt (Erdfelder 1996).

4. Ergebnisse

3 SNPs wurden in einer Fall-Kontroll-Studie bei 192 an einer Schizophrenie sowie 56 an einer bipolaren Störung (F31 nach ICD-10) leidenden Patienten untersucht. Im Anschluss folgte jeweils eine Haplotypanalyse. Als Kontrollgruppe wurden 284 gesunde Blutspender rekrutiert.

Alle untersuchten Genotypen fanden sich im Hardy-Weinberg-Equilibrium (hier nicht dargestellt). Eine Powerkalkulation mittels G*POWER zeigte, dass das Schizophrenie-Sample ausreichte, um einen Effekt von 0,15 für die Genotypen und 0,10 für die Allele zu ermitteln, d.h. das Sample hatte eine ausreichende Größe, um mittlere Effekte gemäß der Cohen'schen Konvention zu erkennen.

4.1 Einzelmarker-Assoziationstest bei Schizophrenie

Zunächst wurde nach einer möglichen Einzelmarkerassoziation der SNPs mit der Schizophrenie gesucht; im Weiteren wurde der Phänotyp gemäß Leonhard weiter in Typus A und B differenziert.

Kein Einzelmarker war signifikant mit Schizophrenie assoziiert (Tab. 8). Lediglich die Ergebnisse für SNP rs352203 zeigten eine Trend zur Assoziation, der sich allerdings nach der Bonferroni-Korrektur verlor.

SNP		Kontrollen N=284	Summe	SCZ	
			N=189	Typ B N=46	Typ A N=143
rs960914	A/A	81 (0.28)	60 (0.32)	15 (0.33)	45 (0.32)
	A/G	143 (0.50)	100 (0.53)	22 (0.48)	78 (0.55)
	G/G	60 (0.21)	29 (0.15)	9 (0.20)	20 (0.14)
			$\chi^2=2.56$, P=0.278	$\chi^2=0.32$, P=0.850	$\chi^2=3.19$, P=0.203
	A	305 (0.54)	220 (0.58)	52 (0.56)	168 (0.59)
	G	263 (0.46)	158 (0.42)	40 (0.44)	118 (0.41)
			$\chi^2=1.86$, P=0.172	$\chi^2=0.25$, P=0.614	$\chi^2=1.96$, P=0.162

rs2241802	A/A	62 (0.22)	33 (0.18)	8 (0.17)	25 (0.18)
	A/G	145 (0.51)	105 (0.56)	26 (0.56)	79 (0.55)
	G/G	77 (0.27)	51 (0.27)	12 (0.26)	39 (0.27)
			$\chi^2=1.52,$ P=0.469	$\chi^2=0.61,$ P=0.737	$\chi^2=1.20,$ P=0.548
A	269 (0.47)	171 (0.45)	42 (0.46)	129 (0.45)	
G	299 (0.53)	207 (0.55)	50 (0.54)	157 (0.55)	
		$\chi^2=0.41,$ P=0.522	$\chi^2=0.09,$ P=0.761	$\chi^2=0.39,$ P=0.533	
rs352203	C/C	60 (0.21)	26 (0.14)	7 (0.15)	19 (0.13)
	C/T	146 (0.51)	102 (0.54)	25 (0.54)	77 (0.54)
	T/T	78 (0.28)	61 (0.32)	14 (0.30)	47 (0.33)
			$\chi^2=4.43,$ P=0.109	$\chi^2=0.87,$ P=0.647	$\chi^2=4.22,$ P=0.121
C	266 (0.47)	154 (0.41)	39 (0.42)	115 (0.40)	
T	302 (0.53)	224 (0.59)	53 (0.58)	171 (0.60)	
		$\chi^2=3.41,$ P=0.065	$\chi^2=0.63,$ P=0.428	$\chi^2=3.38,$ P=0.066	

Tabelle 8: Genotypfrequenzen für die Schizophrenie (n und %). Weiterhin die jeweils errechneten P und χ^2 -Werte. SCZ: Schizophrenie, Typ A und Typ B als Subgruppen der Schizophrenie gemäß Leonhard, definiert im Methodenteil

4.2. Haplotypanalyse für Schizophrenie

Da alle SNPs in einem signifikanten LD lagen ($D' = 0.92, 0.94$ und $0.63; P < 0.0001$), wurde in einem zweiten Schritt eine Haplotypanalyse durchgeführt. Mittels des Programmes GENECOUNTING wurden geschätzte Haplotyp-Frequenzunterschiede zwischen der Patienten- und der Kontrollgruppe berechnet (Tab. 9)

SNP			Kontrollen	SCZ		
rs960914	rs2241802	rs352203		Summe	Typ B	Typ A
A	A	C	0.02	0.02	0.01	0.02
A	A	T	0.01	0.03*	0.03	0.03*
A	G	C	0.01	0.01	0.00	0.01
A	G	T	0.49	0.53	0.52	0.53
G	A	C	0.43	0.39	0.41	0.38
G	A	T	0.02	0.02	0.00*	0.02
G	G	C	0.01	0.00	0.00	0.00
G	G	T	0.01	0.02	0.02	0.01
P global				0.140	0.402	0.253

Tabelle 9: *, $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ (nicht korrigiert); SCZ: Schizophrenie; BPD, Typ A und Typ B als Subgruppen der Schizophrenie gemäß Leonhard, definiert im Methodenteil.

Die Testung auf eine globale Haplotyp-Assoziation lieferte kein signifikantes Ergebnis (P-Werte 0.14 und 0.27). Wie aus Tabelle 9 nachvollzogen werden kann, fanden sich auf Ebene der spezifischen Haplotypen signifikante Assoziationen, die allerdings nach Durchführung der Korrekturrechnung für multiple Tests verschwanden. Weiterhin war die Auftrittshäufigkeit dieser Haplotypen mit $< 3\%$ sehr gering.

4.3 Einzelmarker-Assoziationstest bei bipolarer Störung

Bei 56 an einer bipolaren Störung leidenden Patienten wurden ebenfalls die oben genannten 3 SNPs bezüglich einer Einzelmarker-Assoziation untersucht (Tab. 10). Auch hier zeigte sich keine Signifikanz für eine Assoziation mit der bipolaren Psychose.

SNP rs960914			Kontr. N=284	BPD N=56	SNP rs2241802			Kontr. N=284	BPD N=56	SNP rs352203			Kontr. N=284	BPD N=56
A/A	81 (0.28)	22 (0.39)	A/A	62 (0.22)	8 (0.14)	C/C	60 (0.21)	9 (0.16)						
A/G	143 (0.50)	26 (0.47)	A/G	145 (0.51)	27 (0.48)	C/T	146 (0.51)	26 (0.46)						
G/G	60 (0.21)	8 (0.14)	G/G	77 (0.27)	21 (0.38)	T/T	78 (0.28)	21 (0.38)						
			$\chi^2=3.03$ P=0.220			$\chi^2=3.12$ P=0.210			$\chi^2=2.44$ P=0.296					
A	305 (0.54)	70 (0.63)	A	269 (0.47)	43 (0.38)	C	266 (0.47)	44 (0.39)						
G	263 (0.46)	42 (0.37)	G	299 (0.53)	69 (0.62)	T	302 (0.53)	68 (0.61)						
			$\chi^2=2.93$ P=0.087			$\chi^2=3.03$ P=0.082			$\chi^2=2.15$ P=0.143					

Tabelle 10: Genotypfrequenzen für die bipolare Störung (BPD, nach n und %) und den Kontrollen (Kontr.). Weiterhin die jeweils errechneten P und χ^2 -Werte.

4.4 Haplotypanalyse für bipolare Störungen

Auch in der Stichprobe der bipolaren Störungen wurde im Anschluss an die Einzelmarkeruntersuchung eine Haplotypanalyse für die drei untersuchten SNPs angeschlossen (Tab. 11). Es zeichnete sich zunächst eine Signifikanz für einen Haplotyp ab, die sich nach Korrektur für multiples Testen nicht bestätigen ließ.

SNP			Kontrollen	BPD
rs960914	rs2241802	rs352203		
A	A	C	0.02	0.04
A	A	T	0.01	0.00
A	G	C	0.01	0.00**
A	G	T	0.49	0.59
G	A	C	0.43	0.34
G	A	T	0.02	0.01
G	G	C	0.01	0.02
G	G	T	0.01	0.01
P global				0.268

Tabelle 11: Haplotypanalyse bezüglich einer Assoziation von FZD mit der bipolaren Störung. ** P<0.01 (unkorrigiert); BPD: bipolare Störung.

5. Diskussion

5.1. Ziel der Arbeit

Eine Metaanalyse aus 12 Zwillingsstudien ergab für die Schizophrenie und die bipolare Störung eine hohe Heritabilität von bis zu 80%. (Sullivan et al. 2003) Aufgrund dieser Befunde ist die genetische Komponente der Erkrankungen in den Mittelpunkt genetisch-psychiatrischer Forschung getreten, um insbesondere neue Therapieansätze in Form von wirkungsvolleren und nebenwirkungsärmeren Medikamenten zu finden. Das *Fzd3*-Gen als wichtige Schlüsselstelle in der Wnt/FZD-Signalkaskade, die die Synapto- und Neurogenese maßgeblich beeinflusst, scheint ein mögliches Kandidatengen für schizophrene und bipolare Psychosen zu sein, insbesondere da es auf einem *Linkage-Hotspot* für schizophrene Psychosen lokalisiert ist.

Die bisherigen Studien, die eine mögliche Assoziation zwischen Veränderungen von *Fzd3* und einer psychiatrischen Erkrankung untersuchten, erbrachten divergente Ergebnisse (Katsu et al. 2003; Yang et al. 2003; Zhang et al. 2004; Ide et al. 2004). Zuletzt fand sich eine positive Einzelmarkerassoziation für **rs2241802** in einer chinesischen Studie (Kang et al. 2011). Lediglich eine Studie untersuchte bisher eine kaukasische Population – 2004 zeigte sich bei 120 britischen Familientrios allerdings keine Assoziation zwischen *Fzd3* und einer Schizophrenieerkrankung (Wei & Hemmings 2004).

Ziel dieser Arbeit war es, die Rolle von *Fzd3* in einer weiteren, nicht-asiatischen Patientengruppe, anhand einer Einzelmarkeruntersuchung sowie nachfolgender Haplotypanalyse unter die Lupe zu nehmen. Die gewählten SNPs waren **rs960914**, **rs2241802** und **rs352203**.

Rekrutiert wurden 192 an einer Schizophrenie leidende Patienten, sowie 56 Patienten mit einer bipolaren Störung. Anhand der relativ engen Einschlusskriterien und der Tatsache, dass nur chronisch erkrankte Patienten in der Studie Einschluss fanden, gelang es, eine möglichst homogene Stichprobe zu untersuchen. Der klinischen Heterogenität der Schizophrenie entgegeneten wir durch zusätzliche

Anwendung der Leonhard-Klassifikation von 1999 (Leonhard 1999). Als gesunde Vergleichsgruppe dienten 284 ortsansässige Blutspender. Das Schizophrenie-Sample wies eine ausreichende Power zur Detektion kleinerer bis mittlerer Effekte auf. Das nur 56 Patienten umfassende Sample der bipolaren Patienten ist allerdings aufgrund der kleinen Stichprobengröße als präliminier anzusehen – hier sollten gegebenenfalls noch Untersuchungen an einer größeren Stichprobe erfolgen.

5.2. Ergebnisse der Arbeit

5.2.1 *Fzd3* und Schizophrenie

5.2.1.1 Einzelmarkerassoziationen

In einer Fall-Kontroll-Studie wurde zunächst nach einer etwaigen Einzelmarker-Assoziation der SNPs **rs960914**, **rs2241802** und **rs352203** des *Fzd3*-Gens gesucht. Im gesamten Sample, das 192 an einer chronischen Schizophrenie leidende Patienten sowie 284 gesunde Probanden einschloss, ließ sich keine Assoziation finden. Auch eine Differenzierung bzw. Gruppierung der Patienten in eine Typ A oder B Schizophrenie nach Leonhard erbrachte keine signifikanten Ergebnisse. Für **rs352203** zeigte sich zunächst ein tendenzieller Trend zur Assoziation, der sich allerdings nach Anwendung der Bonferroni-Korrektur nicht mehr nachweisen ließ.

5.2.1.2 Haplotypassoziation

Nach erfolgter Einzelmarkeruntersuchung führten wir in einem zweiten Schritt eine Haplotypanalyse durch. Da das menschliche Genom in einer Haplotypblockstruktur vorliegt, können durch SNPs einzelne Haplotypblöcke charakterisiert werden. Die Allele anderer Polymorphismen werden – wenn sie zueinander im sogenannten Kopplungsungleichgewicht stehen – abgeleitet. Aufgrund dieses Phänomens ist es möglich, sich auf die Untersuchung weniger, ausgewählter SNPs zu beschränken. Die in dieser Arbeit untersuchten SNPs lagen im signifikanten LD. Die Haplotypanalyse wurde für die gesamte Stichprobe durchgeführt. Mittels des Computerprogrammes GENECOUNTING konnten geschätzte Haplotyp-Frequenzunterschiede zwischen der Probanden- und Kontrollgruppe errechnet werden. Der Test auf eine globale Haplotypassoziation mit der Schizophrenie fiel

jedoch negativ aus. Auf Ebene der spezifischen Haplotypen fanden sich zunächst signifikante Assoziationen - AAT für Typ A Schizophrenie und GAT für Typ B - , die sich allerdings nach der Korrekturrechnung für multiple Tests nicht mehr nachweisen ließen. Weiterhin lag die Auftrittshäufigkeit dieser Haplotypen bei unter 3%, was die Anfälligkeit für falsch-positive Ergebnisse in relativ kleinen Stichproben erhöht.

5.2.2 *Fzd3* und bipolare Störung

5.2.2.1 Einzelmarkerassoziationen

Die SNPs **rs960914**, **rs2241802** und **rs352203** wurden auch an einem Kollektiv von 56 Patienten, die an einer bipolaren Störung leiden, auf eine etwaige Einzelmarkerassoziation hin untersucht. Analog zu den Ergebnissen im Schizophrenie-Sample zeigte sich auch hier keine signifikante Assoziation.

5.2.2.2 Haplotypassoziation

Auch die Untersuchung des Samples der bipolaren Störungen auf eine Haplotypassoziation, lieferte weder global noch spezifisch ein signifikantes Ergebnis. Die zunächst vorliegende Signifikanz für den Haplotyp **AGC** verlor sich nach Anwendung der Korrekturrechnung für multiple Tests.

5.3 Vergleich bisheriger Resultate mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit

Die ersten Studien, die positive Befunde für eine Assoziation von *Fzd3* und Schizophrenie fanden, untersuchten Patienten asiatischer Populationen – Yang et al. ein Han-Chinesisches Kollektiv und Katsu et al. Erkrankte japanischer Abstammung. (Katsu et al. 2003; Yang et al. 2003b). Nachfolgende Studien konnten deren Resultate nur zum Teil replizieren. Die Untersuchung von 120 Familientrios in einer britischen Stichprobe 2004 beinhaltete erstmalig ein nicht-asiatisches Sample. Auch hier zeigte sich keine positive Assoziation für *Fzd3* als Kandidatengen der Schizophrenie (Wei & Hemmings 2004).

Gegenstand der vorliegenden Arbeit war die Untersuchung von Patienten einer weiteren kaukasischen Population, um zu ermitteln, ob sich die divergierenden Ergebnisse innerhalb asiatischer Samples auch in kaukasischen Populationen

zeigen lassen. Um dem bunten klinischen Bild der Schizophrenie Rechnung tragen zu können, wurden die Patienten nicht nur nach ICD-10 eingeteilt, sondern ebenfalls gemäß der Klassifikation nach Leonhard in den Typus A und B: 146 Patienten, die an einer affektvollen Paraphrenie, einer Kataphasie, oder einer periodischen Katatonie litten, wurden als Typ A – Schizophrenie subsumiert. Diese Gruppe bezeichnete Leonhard als unsystematische Schizophrenien, die sich vor allem durch ihren akuten Beginn, die Bipolarität der Symptome und den großenteils remittierenden bis periodischen Verlauf auszeichnen. Als Typ B fassten wir die Gruppen der systematischen Schizophrenien, bestehend aus systematischer Katatonie, den systematischen Hebephrenien, sowie den systematischen Paraphrenien zusammen. Diese zeichnen sich nach Leonhard vor allem durch ihren schleichenden Beginn und eine schlechte Prognose aus.

Diejenigen SNPs, die sowohl von anderen Studiengruppen als auch von uns untersucht wurden, sind im nachfolgenden Teil fett markiert.

Wei et al. untersuchten 2004 die SNPs **rs2241802**, rs2323019 und **rs352203** an 120 Familientrios – jeweils beide Eltern plus ein betroffener Nachkomme – aus Großbritannien. Diese Studie fand ebenfalls keine Assoziation der Einzelmarker und der jeweiligen Haplotypen mit einer Schizophrenie in einer kaukasischen Population. Die drei untersuchten SNPs deckten im Gegensatz zu unserer Arbeit nur den zweiten Haplotypblock von *Fzd3* ab - der in der chinesischen Originalpublikation postulierte erste Haplotypblock wurde im britischen Sample nicht berücksichtigt. Weiterhin fand sich in der englischen Untersuchung eine auffällige Häufung der beiden evolutionär „alten“ Haplotypen A-C und G-T (**rs2241802-rs352203**). Abgesehen von der Wahl der SNPs, unterscheidet sich die britische Studie auch methodisch von der unseren – während Wei et al. Familientrios heranzogen, wählten wir ein Fall-Kontroll-Setting. Nichtsdestotrotz fand sich in keinem der beiden europäischen Samples eine Assoziationen zwischen *Fzd3* und Schizophrenie. Da die von uns zusammengestellte Stichprobe auf ihre genetische Homogenität hin überprüft wurde (Reif et al. 2006), erscheinen negative Befunde aufgrund von ethnischer Vermischung des Kollektivs eher unwahrscheinlich.

2006 veröffentlichten Jeong und Kollegen eine Studie, in der ein koreanisches Sample bezüglich einer Assoziation zwischen *Fzd3* und der Schizophrenie untersucht wurde, und publizierte gleichzeitig eine Meta-Analyse für die bis 2006 durchgeführten Untersuchungen. (Jeong et al. 2006) Gegenstand der Meta-Analyse waren die Marker **rs2241802** und **rs960914**. Für **rs2241802**, das zwischen 2003 und 2006 von 5 Studiengruppen (Hashimoto et al. 2005; Ide et al. 2004; Katsu et al. 2003; Yang et al. 2003a; Zhang et al. 2004) untersucht wurde – unsere Untersuchung wurde noch nicht in der Metaanalyse berücksichtigt – fand sich nur bei Yang et al. eine signifikante Assoziation; dieser Befund konnte allerdings nicht repliziert werden. Bei einer odds' ratio (OR) von 1.142 (95% CI: 0.946 – 1.377) konnte keine positive Assoziation zwischen **rs2241802** und der Schizophrenie in der Meta-Analyse gefunden werden.

Drei Studiengruppen (Hashimoto et al. 2005; Ide et al. 2004; Katsu et al. 2003) untersuchten **rs960914**. Lediglich Katsu et al. konnten eine signifikante Assoziation nachweisen. In der Meta-Analyse fiel der Befund bei einer OR von 1.079 (95% CI: 0.882~1.320) ebenfalls negativ aus.

2011 fanden Kang et al. in einem kleinen Sample bestehend aus 81 schizophrenen Patienten, die dem Volksstamm der Va in China zugehörig waren, eine positive Einzelmarkerassoziation für **rs2241802**. Es zeigten sich signifikante Unterschiede in den Frequenzen des Genotyps und der Allele zwischen Probanden und Kontrollgruppe. Weiterhin konnte die Studiengruppe eine signifikante Assoziation zu den Frequenzen A-G-C und G-A-T in der Haplotypanalyse nachweisen. (Kang et al. 2011). Da der Volksstamm der Va eine kleine Minorität der chinesischen Bevölkerung darstellt – die Han-Chinesen machen etwa 92% der Einwohner aus – liegt abermals den Verdacht nahe, dass vor allem der ethnisch-genetische Hintergrund eine Rolle spielen könnte.

Die Diskrepanz der Resultate bei kaukasischen Populationen im Vergleich zu den asiatischen Originalarbeiten könnte in der großen Heterogenität der schizophrenen Psychosen begründet sein. Das von uns rekrutierte Patientensample bestand aus chronisch erkrankten Psychotikern mit individuell unterschiedlich stark ausgeprägter Negativsymptomatik. Inwieweit *Fzd3* eventuell eine Rolle bei Psychosen mit guter

Prognose, wie beispielsweise der schizoaffektiven Störung, spielt, kann daher aktuell nicht beantwortet werden.

Die Tatsache, dass die Resultate der asiatischen und der europäischen Studien divergieren, könnte zum einen in der Haploblockstruktur des untersuchten Kollektivs begründet sein: während man in der europäischen Population nur einen einzigen Haploblock findet, der die gesamte Spanne von *Fzd3* umfasst, lassen sich bei Han-Chinesen zwei kleinere, separate Blöcke nachweisen, zwischen denen eine Region mit hoher Rekombinationsrate liegt. Weiterhin ist die Variabilitätsbreite der Haplotypen in diesem Kollektiv deutlich ausgeprägter. Da Yang et al. 2003 für die von ihnen untersuchten SNPs **rs960914**, **rs2241802** und **rs352203** eine positive Assoziation fanden, man aus ihren Daten allerdings von einem intakten, einzigen Haploblock ausgehen muss, liegt der Verdacht nahe, dass das untersuchte Sample nicht repräsentativ für die Han-Chinesische Population war. (Jeong et al. 2006; Yang et al. 2003b) Wie Wei et al. zeigten, lassen sich in der von ihnen untersuchten Stichprobe vor allem zwei evolutionär alte Haplotypen nachweisen; die hohe Varianz der möglichen Haplotypen wie im chinesischen Sample fehlt in kaukasischen Populationen, das *Fzd3*-Gen der Europäer scheint im Vergleich deutlich rekombinationsträger zu sein. Neben einer unterschiedlichen Haploblockstruktur können vor allem aber auch genetische Hintergrundeffekte eine Rolle spielen, die ein *Fzd3*-vermitteltes genetisches Risiko nur in asiatischen Populationen überschwellig werden lassen.

Weitere Gründe für die negativen Befunde könnte eine ungünstige Zusammenstellung des Untersuchungssamples sein: genetische Heterogenität unter den Populationen, divergierende oder ungenügende Definition des klinischen Phänotyps oder eine zu kleine Stichprobengröße sind weitere mögliche Ursachen für fehlende Assoziationsbefunde (Colhoun et al. 2003). Um diese möglichen Störgrößen zu vermeiden, verwandten wir ein stratifiziertes Sample sowie eine zweite klinische Klassifikation zur Einteilung der Probanden. Nichtsdestotrotz konnten wir analog zu den Befunden von Wei et al. keine positive Assoziation zwischen *Fzd3* und Schizophrenie in unserer europäischen Population finden. Auch die Assoziationsbefunde für die Gruppe der 56 Patienten mit einer bipolaren Störung fiel

negativ aus, wobei die Stichprobengröße hier sehr gering angesiedelt war und die Ergebnisse als vorläufig zu betrachten sind.

Eine andere, bisher noch nicht ausreichend untersuchte Erklärung für die diskrepanten Befunde zwischen asiatischer und nicht-asiatischer Population könnte auch die Tatsache sein, dass *Fzd3* mit einigen, ebenfalls auf 8p21-22 gelegenen Genen im Kopplungsungleichgewicht steht und die beobachteten Effekte in erster Linie aus den daraus resultierenden Kombinationen resultieren. Als potentielle Kandidatengene kommen hier vor allem das Prepronociceptin-Gen (PNOC) (Blaveri et al. 2001), das Zink-Finger-Protein-395-Gen (ZNF395) und das Exostosin-like 3-Gen (EXTL3) in Frage.

6. Zusammenfassung

Schizophrenien und bipolare Störungen zeichnen sich durch eine Lebenszeitprävalenz von 1% und eine hohe Heritabilität von bis zu 80% aus. (Sullivan et al. 2003) In der Altersgruppe vom 15. bis zum 44. Lebensjahr nehmen die Schizophrenien den dritten Rang im Bezug auf die durch Behinderung beeinträchtigten Lebensjahre (years of life lived with disability) ein. Sowohl die Schizophrenie als auch die bipolare Störungen sind chronische, bei frühem Ausbruch das ganze Leben einnehmende und bestimmende Erkrankungen, die großes persönliches und familiäres Leid nach sich ziehen und oftmals mit sozialer Stigmatisierung geahndet werden.

Die biologisch orientierte Psychiatrie versucht genauere Kenntnisse der Genese und Pathophysiologie beider Erkrankungen zu gewinnen, um den Betroffenen spezifischere und nebenwirkungsärmere pharmakologische Therapien anbieten zu können. Die hohe Heritabilität der Erkrankungen legt den Verdacht nahe, dass der genetischen Komponente mehr Bedeutung als den Umweltfaktoren in der Pathogenese zukommt. Das auf 8p21 kodierte *Fzd3*-Gen liegt auf einem Hotspot für die Schizophrenie und die bipolare Störung und ist als Teil der Wnt/FZD-Signalkaskade eine wichtige Stellgröße für die Synapto- und Neurogenese im menschlichen ZNS. In einer Fall-Kontroll-Studie wurden in vorliegender Arbeit drei mittels MALDI-ToF bestimmte SNPs bei 192 Patienten, die an einer Schizophrenie leiden, sowie 56 Patienten, die an einer bipolaren Störung erkrankt sind, bezüglich einer möglichen Assoziation untersucht, und mit 284 gesunden Blutspendern als Kontrollgruppe verglichen.

Im Gegensatz zu den Resultaten aus den initialen Publikationen aus China und Japan, konnten wir analog zu den nachfolgenden Studien bei einem globalem p-Wert von 0,268 für die bipolare Störung, sowie p-Werten von 0,402 bzw. 0,253 für das jeweilige Schizophreniesample, keine Assoziation der Einzelmarker und deren Haplotypen mit den Erkrankungen nachweisen. Die differierenden Befunde könnten durch eine genetische Heterogenität, ethnische Unterschiede, nicht vergleichbare Umweltfaktoren, abweichende Zusammensetzung des Patientensamples - wir rekrutieren für die vorliegende Arbeit ausschließlich chronische Patienten – oder auch falsch positive Befunde in den anderen Studien bedingt sein.

7. Literatur

Akbarian S, Bunney WE, Jr., Potkin SG et al. Altered distribution of nicotinamide-adenine dinucleotide phosphate-diaphorase cells in frontal lobe of schizophrenics implies disturbances of cortical development. Arch Gen Psychiatry 1993; 50 (3):169-77.

Akbarian S, Kim JJ, Potkin SG et al. Maldistribution of interstitial neurons in prefrontal white matter of the brains of schizophrenic patients. Arch Gen Psychiatry 1996; 53 (5):425-36.

Akil M, Lewis DA. Cytoarchitecture of the entorhinal cortex in schizophrenia. Am J Psychiatry 1997; 154 (7):1010-2.

Althoff VS. Genotypisierung von SNPs im humanen FZD3-Gen in einem Kollektiv von Schizophrenie-Patienten 2005. Thesis der Biomedizin. Universität Würzburg.

Altshuler LL, Conrad A, Kovelman JA et al. Hippocampal pyramidal cell orientation in schizophrenia. A controlled neurohistologic study of the Yakovlev collection. Arch Gen Psychiatry 1987; 44 (12):1094-8.

Anderson SA, Volk DW, Lewis DA. Increased density of microtubule associated protein 2-immunoreactive neurons in the prefrontal white matter of schizophrenic subjects. Schizophr Res 1996; 19 (2-3):111-9.

Andreasen NC, Arndt S, Swayze V, 2nd et al. Thalamic abnormalities in schizophrenia visualized through magnetic resonance image averaging. Science 1994; 266 (5183):294-8.

Armstrong A, Ryu YK, Chieco D et al. Frizzled3 is required for neurogenesis and target innervation during sympathetic nervous system development. J Neurosci 2011; 31 (7):2371-81.

Bass NJ, Datta SR, McQuillin A et al. Evidence for the association of the DAOA (G72) gene with schizophrenia and bipolar disorder but not for the association of the DAO gene with schizophrenia. *Behav Brain Funct* 2009; 5:28.

Beasley C, Cotter D, Khan N et al. Glycogen synthase kinase-3beta immunoreactivity is reduced in the prefrontal cortex in schizophrenia. *Neurosci Lett* 2001; 302 (2-3):117-20.

Beckmann H, Jakob H. Prenatal disturbances of nerve cell migration in the entorhinal region: a common vulnerability factor in functional psychoses? *J Neural Transm Gen Sect* 1991; 84 (1-2):155-64.

Benes FM, Sorensen I, Bird ED. Reduced neuronal size in posterior hippocampus of schizophrenic patients. *Schizophr Bull* 1991; 17 (4):597-608.

Bernstein HG, Krell D, Baumann B et al. Morphometric studies of the entorhinal cortex in neuropsychiatric patients and controls: clusters of heterotopically displaced lamina II neurons are not indicative of schizophrenia. *Schizophr Res* 1998; 33 (3):125-32.

Berrettini W. Review of bipolar molecular linkage and association studies. *Curr Psychiatry Rep* 2002; 4 (2):124-9.

Berrettini WH. Are schizophrenic and bipolar disorders related? A review of family and molecular studies. *Biol Psychiatry* 2000a; 48 (6):531-8.

Berrettini WH. Genetics of psychiatric disease. *Annu Rev Med* 2000b; 51:465-79.

Blaveri E, Kalsi G, Lawrence J et al. Genetic association studies of schizophrenia using the 8p21-22 genes: prepronociceptin (PNOC), neuronal nicotinic cholinergic receptor alpha polypeptide 2 (CHRNA2) and arylamine N-acetyltransferase 1 (NAT1). *Eur J Hum Genet* 2001; 9 (6):469-72.

Bleuler E. "Dementia praecox oder Gruppe der Schizophrenien", *Handbuch der Psychiatrie*. Leipzig: Deuticke; 1911.

Bleuler E. Die Ambivalenz. Festgabe zur Einweihung der Neubauten der Universität Zürich 18. IV. 1914 (Festgabe der medizinischen Fakultät). In, translator and editor: Zürich: Schulthess & Co; 1914; p. 95-106.

Buchsbaum MS, Someya T, Teng CY et al. PET and MRI of the thalamus in never-medicated patients with schizophrenia. *Am J Psychiatry* 1996; 153 (2):191-9.

Burnet PW, Eastwood SL, Harrison PJ. [³H]WAY-100635 for 5-HT_{1a} receptor autoradiography in human brain: a comparison with [³H]8-OH-DPAT and demonstration of increased binding in the frontal cortex in schizophrenia. *Neurochem Int* 1997; 30:565-74.

Carlsson M, Carlsson A. Schizophrenia: a subcortical neurotransmitter imbalance syndrome? *Schizophr Bull* 1990; 16 (3):425-32.

Chakos MH, Lieberman JA, Bilder RM et al. Increase in caudate nuclei volumes of first-episode schizophrenic patients taking antipsychotic drugs. *Am J Psychiatry* 1994; 151 (10):1430-6.

Christison GW, Casanova MF, Weinberger DR et al. A quantitative investigation of hippocampal pyramidal cell size, shape, and variability of orientation in schizophrenia. *Arch Gen Psychiatry* 1989; 46 (11):1027-32.

Chumakov I, Blumenfeld M, Guerassimenko O et al. Genetic and physiological data implicating the new human gene G72 and the gene for D-amino acid oxidase in schizophrenia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99 (21):13675-80.

Colhoun HM, McKeigue PM, Davey Smith G. Problems of reporting genetic associations with complex outcomes. *Lancet* 2003; 361 (9360):865-72.

Cotter D, Kerwin R, al-Sarraj S et al. Abnormalities of Wnt signalling in schizophrenia--evidence for neurodevelopmental abnormality. *Neuroreport* 1998; 9 (7):1379-83.

Craddock N, Forty L. Genetics of affective (mood) disorders. *Eur J Hum Genet* 2006; 14 (6):660-8.

Daniel DG, Goldberg TE, Gibbons RD et al. Lack of a bimodal distribution of ventricular size in schizophrenia: a Gaussian mixture analysis of 1056 cases and controls. *Biol Psychiatry* 1991; 30 (9):887-903.

Deakin JF, Simpson MD. A two-process theory of schizophrenia: evidence from studies in post-mortem brain. *J Psychiatr Res* 1997; 31 (2):277-95.

Deardorff MA, Tan C, Saint-Jeannet JP et al. A role for frizzled 3 in neural crest development. *Development* 2001; 128 (19):3655-63.

Degn B, Lundorf MD, Wang A et al. Further evidence for a bipolar risk gene on chromosome 12q24 suggested by investigation of haplotype sharing and allelic association in patients from the Faroe Islands. *Mol Psychiatry* 2001; 6 (4):450-5.

Detera-Wadleigh SD. Chromosomes 12 and 16 workshop. *Am J Med Genet* 1999; 88 (3):255-9.

Detera-Wadleigh SD, McMahon FJ. G72/G30 in schizophrenia and bipolar disorder: review and meta-analysis. *Biol Psychiatry* 2006; 60 (2):106-14.

Ebert D. *Psychiatrie systematisch*. 1. Auflage ed. Loch/Württemberg: UNI-MED Verlag AG; 1995.

Erdfelder E F, F, Buchner, A. GPOWER, a general power analyses program. *Instruments and Computers* 28:1-11 1996.

Ewald H, Degn B, Mors O et al. Significant linkage between bipolar affective disorder and chromosome 12q24. *Psychiatr Genet* 1998; 8 (3):131-40.

Falkai P, Schneider-Axmann T, Honer WG. Entorhinal cortex pre-alpha cell clusters in schizophrenia: quantitative evidence of a developmental abnormality. *Biol Psychiatry* 2000; 47 (11):937-43.

Freudenberg JC S. Blockstruktur des menschlichen Genoms. Deutsches Ärzteblatt 99:3190-3195. 2002.

Gottesman IlaE-KL. Family and twin strategies as a head start in defining prodromes and endophenotypes for hypothetical early interventions in schizophrenia. Schizophr Res: 93- 102. 2001.

Gurling HM, Kalsi G, Brynjolfson J et al. Genomewide genetic linkage analysis confirms the presence of susceptibility loci for schizophrenia, on chromosomes 1q32.2, 5q33.2, and 8p21-22 and provides support for linkage to schizophrenia, on chromosomes 11q23.3-24 and 20q12.1-11.23. Am J Hum Genet 2001; 68 (3):661-73.

Harrison PJ. Neurochemical alternations in schizophrenia affecting the putative targets of atypical antipsychotics: focus on dopamine (D1, D3, D4) and 5-HT2a receptors. British Journal of Psychiatry 1999a; 174 (38):41-51.

Harrison PJ. The neuropathology of schizophrenia. A critical review of the data and their interpretation. Brain 1999b; 122 (Pt 4):593-624.

Hashimoto R, Suzuki T, Iwata N et al. Association study of the frizzled-3 (FZD3) gene with schizophrenia and mood disorders. J Neural Transm 2005; 112 (2):303-7.

Hattori E, Liu C, Badner JA et al. Polymorphisms at the G72/G30 gene locus, on 13q33, are associated with bipolar disorder in two independent pedigree series. Am J Hum Genet 2003; 72 (5):1131-40.

Heitmiller DR, Nopoulos PC, Andreasen NC. Changes in caudate volume after exposure to atypical neuroleptics in patients with schizophrenia may be sex-dependent. Schizophr Res 2004; 66 (2-3):137-42.

Ide M, Muratake T, Yamada K et al. Genetic and expression analyses of FZD3 in schizophrenia. Biol Psychiatry 2004; 56 (6):462-5.

Ingvar DH, Franzen G. Abnormalities of cerebral blood flow distribution in patients with chronic schizophrenia. *Acta Psychiatr Scand* 1974; 50 (4):425-62.

Jakob H, Beckmann H. Gross and histological criteria for developmental disorders in brains of schizophrenics. *J R Soc Med* 1989; 82 (8):466-9.

Jakob H, Beckmann H. Prenatal developmental disturbances in the limbic allocortex in schizophrenics. *J Neural Transm* 1986; 65 (3-4):303-26.

Javitt DC, Zukin SR. Recent advances in the phencyclidine model of schizophrenia. *American Journal of Psychiatry* 1991; 148:1301-8.

Jeong SH, Joo EJ, Ahn YM et al. Investigation of genetic association between human Frizzled homolog 3 gene (FZD3) and schizophrenia: results in a Korean population and evidence from meta-analysis. *Psychiatry Res* 2006; 143 (1):1-11.

Johnstone EC, Crow TJ, Frith CD et al. Cerebral ventricular size and cognitive impairment in chronic schizophrenia. *Lancet* 1976; 2 (7992):924-6.

Joyce JN, Meador-Woodruff JH. Linking the Family of D2 Receptors to Neuronal Circuits in Human Brain: Insights into Schizophrenia. *Neuropsychopharmacology* 1997; 16 (6).

Kang C, Zhou L, Liu H et al. Association study of the frizzled 3 gene with Chinese Va schizophrenia. *Neurosci Lett* 2011; 505 (2):196-9.

Katsu T, Ujike H, Nakano T et al. The human frizzled-3 (FZD3) gene on chromosome 8p21, a receptor gene for Wnt ligands, is associated with the susceptibility to schizophrenia. *Neurosci Lett* 2003; 353 (1):53-6.

Kendler KS. Twin studies of psychiatric illness: an update. *Arch Gen Psychiatry* 2001; 58 (11):1005-14.

Keshavan MS, Bagwell WW, Haas GL et al. Changes in caudate volume with neuroleptic treatment. *Lancet* 1994; 344 (8934):1434.

Kovelman JA, Scheibel AB. A neurohistological correlate of schizophrenia. *Biol Psychiatry* 1984; 19 (12):1601-21.

Kozlovsky N, Belmaker RH, Agam G. Low GSK-3 activity in frontal cortex of schizophrenic patients. *Schizophr Res* 2001; 52 (1-2):101-5.

Kraepelin E. *Psychiatrie. Ein Lehrbuch für Studierende und Aerzte. Fünfte, vollständig umgearbeitete Auflage.* ed. Leipzig: Barth Verlag; 1896.

Lawrie SM, Abukmeil SS. Brain abnormality in schizophrenia. A systematic and quantitative review of volumetric magnetic resonance imaging studies. *Br J Psychiatry* 1998; 172:110-20.

Lazarov O, Robinson J, Tang YP et al. Environmental enrichment reduces Abeta levels and amyloid deposition in transgenic mice. *Cell* 2005; 120 (5):701-13.

Leonhard K. *Classification of endogenous psychoses and their differentiated etiology.* 1999; 2nd edn. Springer, Wien New York.

Liu CM, Hwu HG, Fann CS et al. Linkage evidence of schizophrenia to loci near neuregulin 1 gene on chromosome 8p21 in Taiwanese families. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 2005; 134B (1):79-83.

Logan CY, Nusse R. The Wnt signaling pathway in development and disease. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2004; 20:781-810.

Luderer HJ. *Von Aderlässen, Brechkuren und Sturzbädern zur Pharmako-, Psycho- und Soziotherapie am Ende des 20. Jahrhunderts. Zur Geschichte der psychiatrischen Behandlungsverfahren.* 1999.

McConnell SK, Ghosh A, Shatz CJ. Subplate neurons pioneer the first axon pathway from the cerebral cortex. *Science* 1989; 245 (4921):978-82.

McGuffin P, Perroud N, Uher R et al. The genetics of affective disorder and suicide. *Eur Psychiatry* 2003; 25 (5):275-7.

McMahon AP, Bradley A. The Wnt-1 (int-1) proto-oncogene is required for development of a large region of the mouse brain. *Cell* 1990; 62 (6):1073-85.

McQuillen PS, Ferriero DM. Perinatal subplate neuron injury: implications for cortical development and plasticity. *Brain Pathol* 2005; 15 (3):250-60.

Mirnics K, Lewis DA. Genes and subtypes of schizophrenia. *Trends Mol Med* 2001; 7 (7):281-3.

Miyaoka T, Seno H, Ishino H. Increased expression of Wnt-1 in schizophrenic brains. *Schizophr Res* 1999; 38 (1):1-6.

Möller H-J, Laux G, Deister A. *Psychiatrie und Psychotherapie*. 3., überarbeitete Auflage ed: Thieme Verlag; 2005. (Duale Reihe).

Noga JT, Bartley AJ, Jones DW et al. Cortical gyral anatomy and gross brain dimensions in monozygotic twins discordant for schizophrenia. *Schizophr Res* 1996; 22 (1):27-40.

Olney JW, Farber NB. Glutamate receptor dysfunction and schizophrenia. *Arch Gen Psychiatry* 1995; 52 (12):998-1007.

Owen MJ, Williams NM, O'Donovan MC. The molecular genetics of schizophrenia: new findings promise new insights. *Molecular Psychiatry* 2003; 1-14.

Park N, Joo SH, Cheng R et al. Linkage analysis of psychosis in bipolar pedigrees suggests novel putative loci for bipolar disorder and shared susceptibility with schizophrenia. *Mol Psychiatry* 2004; 9 (12):1091-9.

Pillmann F, Möller A. Die Nosologie schizophrener Psychosen - Konzepte von Eugen Bleuler und der Schule Wernicke/Kleist im historischen Streit. *Schweiz Arch Neurol Psychiatr* 2004; 155:254-63.

Pinson KI, Brennan J, Monkley S et al. An LDL-receptor-related protein mediates Wnt signalling in mice. *Nature* 2000; 407 (6803):535-8.

Raz S, Raz N. Structural brain abnormalities in the major psychoses: a quantitative review of the evidence from computerized imaging. *Psychol Bull* 1990; 108 (1):93-108.

Reif A, Herterich S, Strobel A et al. A neuronal nitric oxide synthase (NOS-I) haplotype associated with schizophrenia modifies prefrontal cortex function. *Mol Psychiatry* 2006; 11 (3):286-300.

Reveley AM, Reveley MA, Clifford CA et al. Cerebral ventricular size in twins discordant for schizophrenia. *Lancet* 1982; 1 (8271):540-1.

Sharma RP, Chopra VL. Effect of the Wingless (wg1) mutation on wing and haltere development in *Drosophila melanogaster*. *Dev Biol* 1976; 48 (2):461-5.

Shink E, Morissette J, Sherrington R et al. A genome-wide scan points to a susceptibility locus for bipolar disorder on chromosome 12. *Mol Psychiatry* 2005; 10 (6):545-52.

Sklar P. Linkage analysis in psychiatric disorders: the emerging picture. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 2002; 3:371-413.

Somnath CP, Janardhan Reddy YC, Jain S. Is there a familial overlap between schizophrenia and bipolar disorder? *J Affect Disord* 2002; 72 (3):243-7.

Sponsel R. Ambivalenz. Erfindung und Darstellung des Begriffs durch Eugen Bleuler. Bericht vom Vortrag 1911 und Veröffentlichung 1914 2002 [cited 2002].

Suddath RL, Christison GW, Torrey EF et al. Anatomical abnormalities in the brains of monozygotic twins discordant for schizophrenia. *N Engl J Med* 1990; 322 (12):789-94.

Sullivan PF, Kendler KS, Neale MC. Schizophrenia as a complex trait: evidence from a meta-analysis of twin studies. *Arch Gen Psychiatry* 2003; 60 (12):1187-92.

Tamai K, Semenov M, Kato Y et al. LDL-receptor-related proteins in Wnt signal transduction. *Nature* 2000; 407 (6803):530-5.

Tsuang MT, Stone WS, Faraone SV. Understanding predisposition to schizophrenia: toward intervention and prevention. *Can J Psychiatry* 2002; 47 (6):518-26.

Verma R, Mukerji M, Grover D et al. MLC1 gene is associated with schizophrenia and bipolar disorder in Southern India. *Biol Psychiatry* 2005; 58 (1):16-22.

Walter H. Von der Black-box zum Aquarium. [e-zine] 2005.

Walter H, Wunderlich AP, Blankenhorn M et al. No hypofrontality, but absence of prefrontal lateralization comparing verbal and spatial working memory in schizophrenia. *Schizophr Res* 2003; 61 (2-3):175-84.

Wang Y, Zhang J, Mori S et al. Axonal growth and guidance defects in Frizzled3 knock-out mice: a comparison of diffusion tensor magnetic resonance imaging, neurofilament staining, and genetically directed cell labeling. *J Neurosci* 2006; 26 (2):355-64.

Wei J, Hemmings GP. Lack of a genetic association between the frizzled-3 gene and schizophrenia in a British population. *Neurosci Lett* 2004; 366 (3):336-8.

Williams J, McGuffin P, Nothen MM et al. Meta-analysis of the association between the 5-HT_{2a} receptor T102C polymorphism and schizophrenia. *Lancet* 1997; 349.

Wray NR, Gottesman, II. Using summary data from the danish national registers to estimate heritabilities for schizophrenia, bipolar disorder, and major depressive disorder. *Front Genet* 2012; 3:118.

Yang J, Si T, Ling Y et al. Association study of the human FZD3 locus with schizophrenia. *Biol Psychiatry* 2003a; 54 (11):1298-301.

Yang J, Si T, Ling Y et al. Association study of the human FZD3 locus with schizophrenia. *Biol Psychiatry* 2003b; 54 (11):1298-301.

Zaidel DW, Esiri MM, Harrison PJ. The hippocampus in schizophrenia: lateralized increase in neuronal density and altered cytoarchitectural asymmetry. *Psychol Med* 1997a; 27 (3):703-13.

Zaidel DW, Esiri MM, Harrison PJ. Size, shape, and orientation of neurons in the left and right hippocampus: investigation of normal asymmetries and alterations in schizophrenia. *Am J Psychiatry* 1997b; 154 (6):812-8.

Zhang Y, Yu X, Yuan Y et al. Positive association of the human frizzled 3 (FZD3) gene haplotype with schizophrenia in Chinese Han population. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 2004; 129B (1):16-9.

Zhao JH. 2LD, GENECOUNTING and HAP: Computer programs for linkage disequilibrium analysis. *Bioinformatics* 2004; 20 (8):1325-6.

Zipursky RB, Lambe EK, Kapur S et al. Cerebral gray matter volume deficits in first episode psychosis. *Arch Gen Psychiatry* 1998; 55 (6):540-

Danksagung

Danken möchte ich Herrn Prof. Dr. K. P. Lesch für die Vergabe der Arbeit und die Möglichkeit zur Durchführung molekulargenetischer Experimente in seinem Labor.

Ganz besonders möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. A. Reif bedanken, ohne dessen freundschaftliche und geduldige Betreuung in Kombination mit einem immer offenen Ohr, diese Arbeit wohl bis heute nicht vollendet wäre. Selbiges gilt für Frau T. Töpner, die mir mit engagierter Hilfestellung die Laborarbeit exzellent näher gebracht hat und immer mit Rat und Tat zur Seite stand.

Herrn Prof. Dr. J. Deckert, dem Direktor der Klinik und Poliklinik für Psychiatrie, Psychosomatik und Psychotherapie der Universität Würzburg, möchte ich für die Möglichkeit zur Promotion an seiner Klinik danken.

Frau Prof. Dr. C. Freitag danke ich für die Erstellung der Statistik.

Herrn Prof. Dr. M. Zimmer und Mitarbeitern danke ich für die Kooperation.

Der größte Dank gebührt meinen Eltern, die mir das Studium und so vieles Weitere im Leben ermöglicht haben und deren Liebe mich immer begleiten wird.