Aus der Klinik für Psychiatrie und Psychotherapie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Genetische Assoziationsstudie zwischen verschiedenen Polymorphismen von Reelin mit der Diagnose Schizophrenie und Volumina krankheitsassoziierter Gehirnareale

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Claudia Elisabeth Bröckert, geb. Liensdorf

aus Dessau

Gutachter/in: 1. Prof. Dr. med. I. Puls

2. Prof. Dr. med. P. Falkai

3. Prof. Dr. med. M. M. Nöthen

Datum der Promotion: 03.09.2010

Vorwort

Ein schwarzes Schaf in der Familie zu haben, ist nicht selten.

Eine verwandte Person, die man nur selten sieht, von der nur Schlechtes geredet wird bzw. von der man weiter nichts weiß.
Als ich noch klein war, konnte ich nicht verstehen, warum meine Familie jemanden verstößt, obwohl sie doch eigentlich so eng miteinander verbunden ist. Keiner konnte mir mehr erzählen über meinen Onkel und warum er von Familienfeiern und Geburtstagen ausgegrenzt wurde.
Meine Mutter sagte, dass er verrückt sei, dass er seine Medikamente nicht regelmäßig nehme und dass er so große Wut in sich trage. Doch wenn ich ihm begegnete, fielen mir solche Dinge nicht auf und ich sah einen ruhigen und schüchternen Mann.
Meine Großmutter nahm ihn trotz aller Vorfälle immer wieder bei sich auf. Es war eben ihr Sohn. Doch immer wieder fingen die Wutausbrüche und die eigenartigen Verhaltensweisen von Neuem an. Mit Gewalt und richterlicher Anordnung wurde er zurück hinter verschlossene Türen verbannt.
Das letzte Mal sah ich ihn bei der Beerdigung meiner Großmutter. Wieder ruhig und schüchtern. Und traurig.

Heute wird mir erzählt, dass er auf gepackten Koffern sitzt und wartet. Wartet, dass er nach Hause kann. Zurück in ein zu Hause, das es nicht mehr gibt.
Als Kind fragte ich mich immer, was das für eine Erkrankung sein sollte und erst durch mein Studium bekam seine Geschichte einen Namen: **Schizophrenie.**

Inhalt

1 Einleitung 7

1.1 Schizophrenie 7

1.1.1 Historie der Schizophrenie 7

1.1.2 Symptome und Diagnosestellung 8

1.1.3 Verlauf und Therapie 9

1.1.4 Ätiologie der Schizophrenie 10

1.1.4.1 Neurotransmitter 10

1.1.4.2 Genetische Studien 12

1.1.4.3 Neuroanatomische Veränderungen 15

1.1.4.3.1 Makroskopische Befunde 15

1.1.4.3.2 Mikroskopische Befunde 17

1.1.4.4 Befunde aus funktionellen Bildgebungsstudien 18

1.1.4.5 Psychosoziale Faktoren 20

1.1.5 Endophänotypen 20

1.2 Reelin 21

1.2.1 Struktur und Funktion 21

1.2.2 Zusammenhang zwischen Reelin und Schizophrenie 23

1.2.3 Assoziationsstudien zwischen Reelin und Schizophrenie 24

2 Fragestellung 27

3 Material und Methoden 29

3.1 Material 29

3.1.1 Probanden und klinische Untersuchungen 29

3.1.2 Labormaterial 30

3.1.2.1 Geräte 30

3.1.2.2 Verbrauchsmaterialien 31

3.1.2.3 Chemikalien, Enzyme 31

3.1.3 Software 32

3.2 Methoden 33

3.2.1 DNA Extraktion mit Qiagen FlexiGene DNA Kit 33

3.2.2 Single Nukleotid Polymorphismen (SNPs) - Genotypisierung 33

3.2.2.1 Auswahl der SNPs 34
3.2.2.2 Auswahl der Primer und Restriktionsenzyme 36
3.2.2.3 Polymerasekettenreaktion (PCR) 36
3.2.2.4 Agarosegel-Elektrophorese 38
3.2.2.5 Restriktionslängenpolymorphismus (RFLP) 38
3.2.3 Mikrosatellitenanalyse 39
3.2.3.1 Auswahl der Mikrosatelliten 40
3.2.3.2 Auswahl der Mikrosatelliten-Primer 41
3.2.3.3 Mikrosatelliten PCR 42
3.2.3.4 Mikrosatellitenanalyse 43
3.2.4 Statistische Auswertung 44

4 Ergebnisse 47
4.1 Demographische Daten 47
4.1.1 Verteilung von Alter und Geschlecht 47
4.1.2 Volumina-Verteilung in den Experimentalgruppen 47
4.1.3 Einflussfaktoren auf das Volumen 48
4.2 Single Nukleotid Polymorphismen (SNPs) 49
4.2.1 Allelverteilung in Population und im Experiment 49
4.2.2 SNP-Ausprägungen getrennt nach Diagnose 50
4.2.3 SNPs und Volumina 52
4.2.4 Dominanzmodelle 58
4.2.4.1 Dominanzmodelle und Diagnose 58
4.2.4.2 Dominanzmodelle und Volumen 59
4.3 Haplotypen 62
4.3.1 Verteilung der Haplotypen im Gesamtkollektiv und getrennt nach Diagnose 62
4.3.2 Haplotypen und Volumen 65
4.4 Mikrosatelliten 68
4.4.1 Verteilung der Mikrosatelliten im Gesamtkollektiv und getrennt nach Diagnose 68
4.4.2 Mikrosatelliten und Volumen 74

5 Diskussion 78
5.1 Zusammenfassung und Bewertung der Ergebnisse 78
5.1.1 Einfluss der Polymorphismen auf die Diagnose 78
5.1.2 Einfluss der Polymorphismen auf das Gehirnvolumen 79
5.1.3 Funktionelle Effekte der signifikanten Polymorphismen 81
5.1.4 Zusammenhang zwischen Schizophrenie und Volumetrie – Einfluss von Reelin auf beide Komponenten 84
5.2 Limitationen der Arbeit 86
5.3 Ausblicke 87
5.4 Fazit 88

6 Zusammenfassung 89

7 Literatur 91

8 Tabellen und Abbildungen 99

9 Abkürzungen 102

10 Danksagung 104

11 Eidesstattliche Erklärung 105

12 Lebenslauf 106

1 Einleitung

1.1 Schizophrenie

1.1.1 Historie der Schizophrenie

Seit dem Altertum sind „Geisteskrankheiten“, „Verrücktheiten“, „Irrsinn“ oder auch „Wahnsinn“ bekannt. Schon im griechischen und römischen Altertum befassten sich die Intellektuellen mit den unerklärlichen Geschehnissen und Beschreibungen ihrer Zeitgenossen. Diese vorwissenschaftlichen Beschreibungen finden sich zum Beispiel in Homers Schriften, Hippokrates Aufzeichnungen und in der griechischen Mythologie wieder. Bestimmte Begriffe wie Manai für Wahnsinn, Oistros für Verrücktheit und Phrenes für Verstandsverwirrungen deuten auf die beobachteten Vorkommnisse hin und wurden zum Teil auf gewisse, neu erfundene Götter übertragen (1).

Emil Kraeplin fasste die oben genannten Begriffe erstmals 1896 unter dem Begriff „Dementia praecox“ zusammen und grenzte somit eine Geisteskrankheit von anderen Verhaltensauffälligkeiten wie der „Manie“ oder dem sich „im Alter entwickelnden Schwachsinn“ ab (2).

E. Bleuler (3) entwickelte 1911 das heute noch gültige Krankheitskonzept der Schizophrenie. Dabei unterschied er drei Grundsymptome, welche mit Störungen des Denkens (Zerfahrenheit und zusammenhangsloses, alogisches Denken), der Affektivität (Ambivalenz, instabile Stimmungslage, Gefühlseinbrüche, Ratlosigkeit) und des eigenen Ichs (Rückzug aus der Wirklichkeit, Desintegration von Fühlen, Wollen und Handeln) einhergehen. Die akzessorischen Symptome wie Wahn (Verfolgung, Kontrolle), Halluzinationen und katatone Störungen (Stupor, Bewegungsstereotypen, psychomotorische Unruhe) sind individuell ausgeprägt.

Kurt Schneider entwickelte das Konzept weiter und differenzierte zwischen Symptomen ersten und zweiten Ranges. Sein Konzept erklärt Wahnwahrnehmung, dialogische akustische Halluzinationen, Gedankenlautwerden, Gedankenentzug, Gedankeneingebung, Gedankenausbreitung und weitere Beeinflussungserlebnisse, die sich auf den Körper beziehen, als Symptome ersten Ranges. Den Wahneinfall, sonstige Halluzinationen (optisch, olfaktorisch), Affektveränderungen und Ratlosigkeit werden als Symptome zweiten Ranges bezeichnet.

J.H. Jackson nahm eine weitere Einteilung in *positive* (Halluzinationen, Wahnwahrnehmung und formale Denkstörungen) und *negative* Symptome (Apathie, Alogie, sozialer Rückzug, Anhedonie, Affektverflachung und Aufmerksamkeitsstörung) vor (4).

1.1.2 Symptome und Diagnosestellung

Zur Diagnosestellung von psychiatrischen Krankheiten gibt es zwei verschiedene Klassifikationssysteme. In der psychiatrischen Praxis wird die Diagnose der Schizophrenie über die Diagnosekriterien des ICD-10 gestellt (5). Zusätzlich existiert noch die Klassifikation nach DSM-IV (6), welches hauptsächlich in der Forschung genutzt wird. Die erste Tabelle zeigt die diagnostischen Kriterien und Formen der Schizophrenie in beiden Systemen:

Tabelle 1: Zusammenfassung von ICD-10 und DSM-IV

	ICD-10	**DSM-IV**
Typen	F20.0 paranoide Schizophrenie F20.1 hebephrene Schizophrenie F20.2 katatone Schizophrenie F20.3 undifferenzierte Schizophrenie F20.4 postschizophrene Depression F20.5 schizophrenes Residuum F20.6 Schizophrenia simplex F20.8 sonstige Schizophrenie F20.9 nicht näher bezeichnete Schizophrenie	Desorganisierter Typus Katatoner Typus Paranoider Typus Residualer Typus Undifferenzierter Typus
Kriterien	**1.** Gedankenlautwerden, -eingebung, -entzug, -ausbreitung **2.** Kontroll-, Beeinflussungswahn **3.** Stimmen: kommentierend oder dialogisch **4.** bizarrer Wahn **5.** anhaltende Halluzinationen jeder Sinnesmodalität **6.** Neologismen, Gedankenabreißen oder Einschiebungen in den Gedankenfluss **7.** katatone Symptome: Erregung, Haltungsstereotypien, wächserne Biegsamkeit **8**. „negative“ Symptome: Apathie, Sprachverarmung, verflachte oder inadäquate Affekte → ein Symptom aus 1-4, oder zwei Symptome aus 5-8 → Symptomatik mind. 1 Monat → Ausschluss somatischer Erkrankungen und Substanzeinwirkungen	**A:** Charakteristische Symptome: Wahn, Halluzinationen, desorganisierte Sprechweise, grob desorganisiertes oder katatones Verhalten, negative Symptome - mind. 2 von 5 Symptomen, länger als 1 Monat, wenn Wahn bizarr ist oder Halluzinationen kommentierende oder dialogisierende Stimmen sind, ist ein Monat ausreichend **B:** Soziale/berufliche Leistungseinbußen in einem oder mehreren Lebensbereichen **C:** Dauer mind. 6 Monaten, davon mind. 1 Monat mit Symptomen von A **D:** Ausschluss von schizoaffektiver und affektiver Störung **E:** Ausschluss von Substanzeinfluss und somatischer Krankheitsfaktor **F:** Beziehung zu einer tiefgreifenden Entwicklungsstörung

Aus klinischer Sicht spielt die Unterscheidung zwischen Positiv- (Wahn, Halluzinationen, bizarres Verhalten) und Negativsymptomatik (Antriebsverlust, Affektverflachung, Sprachverarmung) eine sehr wichtige Rolle, um die vordringlichen Symptome pharmakologisch optimal zu behandeln.

1.1.3 Verlauf und Therapie

Weltweit beträgt die Lebenszeitprävalenz (Erkrankungswahrscheinlichkeit) für eine Schizophrenie 1%, und die Inzidenz (jährliche Neuerkrankungsrate) liegt bei ca. 0,7% (7). Der Beginn einer Schizophrenie (Prodromalphase) kann schleichend oder akut einsetzen und wird meistens durch die Negativsymptomatik bestimmt. Diese Prodromalphase kann ein bis fünf Jahre andauern und wird von sozialem Rückzug, emotionaler Distanzierung, Stimmungslabilität und Apathie geprägt (8). Das Ersterkrankungsalter unterscheidet sich hinsichtlich des Geschlechts und befindet sich hauptsächlich bei Männern zwischen 15 und 25 Jahren und bei Frauen zwischen 25 und 35 Jahren (9).

Der weitere Verlauf kann vielgestaltig sein: Dieser kann stagnieren, aktiv oder in Teilremission verlaufen (Residualsymptomatik = schwächer und relative Negativsymptomatik). Bei ca. 17% der Patienten bleibt eine Ersterkrankung folgenlos (10) und bei ca. 57% kommt es zu einem chronischen Verlauf, charakterisiert durch ein regelmäßiges Wiederkehren der Symptomatik (Rezidive) mit unterschiedlich langer Dauer und Häufigkeit (11). Ein günstiger Krankheitsverlauf wird von verschiedenen Faktoren beeinflusst: Weibliches Geschlecht, hoher sozialer Status, verheiratete Patienten, keine an Schizophrenie erkrankten Familienmitglieder, ein akuter Beginn, kaum Negativsymptome und eine späte Erstmanifestation (12). Für ein optimales Behandlungskonzept werden pharmakologische Behandlungsverfahren, psychologische Interventionen und ein soziotherapeutisches Hilfssystem vereint (13).

Die medikamentöse Therapie wird phasenspezifisch der Akuttherapie, Rezidivprophylaxe und Langzeittherapie angepasst. Dabei sind Antipsychotika Mittel der Wahl in allen Situationen. Atypische Neuroleptika, auch Atypika genannt, sollten bevorzugt eingesetzt werden, besonders bei kognitiver Beeinträchtigung. Atypika wirken u.a. als Antagonisten des serotonergen $5HT_{2a}$ Rezeptors gegen die Negativsymptomatik und reduzieren somit diese Symptome. Weiterhin besitzen sie eine partielle Affinität zu den Dopamin D2 Rezeptoren und mildern damit auch die Positivsymptomatik. Beispiele für solche Wirkstoffe sind Olanzapin, Risperidon und Quetiapin. Zwar können auch bei der Einnahme von Atypika unerwünschte Nebenwirkungen auftreten

(Sedierung, Gewichtszunahme, Herzrhythmusstörungen, metabolische und hämatologische Nebenwirkungen), die die Patienten jedoch oft weniger beeinträchtigen als die älteren Typika. Typika besitzen hingegen eine sehr starke antagonistische Wirkung auf die Dopaminrezeptoren. Sie bewirken eine Reduzierung der Dopaminaktivität und mildern so die Positivsymptomatik. Sie weisen ein weites Spektrum an Nebenwirkungen auf wie Frühdyskinesien (unwillkürliche Muskelzuckungen), Akathesie (sitzende Unruhe) und Parkinsonoid (Tremor, Rigor, Akinese). Die Auswahl der empfohlenen typischen Antipsychotika ist auf wenige Wirkstoffe wie z.B. Haloperidol begrenzt. Dieses wird noch heute in der Akuttherapie einer Exazerbation eingesetzt. Durch die schnelle Wirkungsentfaltung und starke Sedierung kann man einem psychotischen Patienten sehr schnell helfen (14, 15).

1.1.4 Ätiologie der Schizophrenie

Wie viele andere psychiatrische Erkrankungen ist die Schizophrenie multifaktoriell bedingt. Weder die Erbanlagen noch die Umweltfaktoren allein sind im Regelfall ausreichend, die Erkrankung auszulösen. Diese Verkettung von Erbfaktoren und Umweltfaktoren wird durch den Begriff „Vulnerabilitäts-Stress-Modell“ beschrieben (16). Somit setzt sich die Ätiologie der Schizophrenie aus biologischen (Genetik, Morphologie des Gehirns, pathobiochemische Befunde), psychologischen (Ich-Entwicklungsdefizite, inkonsequente Erziehung, „double bind“) und Umwelt- bzw. soziokulturellen Faktoren (Jahreszeit bei der Geburt, Sozialschichteinfluss) zusammen (17).

Der aktuelle Forschungsstand beinhaltet verschiedene pathophysiologische Ursachen. Im Folgenden werden verschiede Modelle und Erkenntnisse zusammengetragen, die relevant für die Ausbildung dieser Erkrankung sind (18).

1.1.4.1 Neurotransmitter

Die Botenstoffe des Gehirns liegen bei gesunden Personen in einem Gleichgewicht vor und erzeugen somit eine optimale Funktion. Durch Hypo- bzw. Hyperaktivität einzelner Transmittersysteme entsteht ein Ungleichgewicht, welches die Entstehung bestimmter psychiatrischer Symptome mit bedingt.

Dopamin:

Dopamin ist ein biogenes Amin, welches an der postsynaptischen Membran die weitere Signaltransduktion der Neurone aktiviert. Im Mittelhirn gebildet (Substantia nigra) kontrolliert es u.a. die extrapyramidale Motorik in den Basalganglien.

Es besteht eine unterschiedliche Verteilung der Dopaminrezeptortypen im Kortex und subkortikalen Strukturen. Im Frontalhirn entsteht bei schizophrenen Patienten durch überwiegende D1-Rezeptorstimulation eine Hypoaktivität, welche u.a. Ursache für die Negativsymptomatik ist. Über D2-Rezeptoren im mesolimbischen System werden Hippocampus und Amygdala überstimuliert. Durch diese Hyperaktivität werden Symptome hervorgerufen, welche sich in Wahrnehmungsstörungen und Halluzinationen äußern. Durch die Einführung von Neuroleptika wurden deren Antagonismus zum Dopaminrezeptor und eine daraus resultierende Reduktion der Positivsymptomatik erkannt. Die Hypothese der erhöhten Dopaminfreisetzung und die Wirkung der Antipsychotika wurden durch PET Studien belegt. Bei langjähriger Gabe von typischen Neuroleptika beobachtet man Nebenwirkungen, die sich in der Störung der Motorik (Akathesie, Dyskinesien, Parkinsonoid) zeigen (19), (20).

Glutamat:

Glutamat ist der wichtigste exzitatorische Transmitter im Gehirn. Über seine ionotropen und metabotropen Rezeptoren Ampa und NMDA beeinflusst er Kognition, Gedächtnis und Plastizität des Gehirns. Durch eine NMDA-Rezeptordysfunktion kommt es zu einer Überaktivierung bzw. Unterfunktion des glutamatergen Systems. Eine ständige Erhöhung führt zu einer Überstimulation und kann zum Untergang von glutamatsensitiven Neuronen führen (sogenannte Exzitotoxizität). Durch die Applikation des NMDA-Antagonisten Ketamin kann man eine Psychose auslösen, die ebenfalls mit kognitiven Störungen einhergeht und der schizophrenen Psychose sehr ähnlich ist (21), (22).

Serotonin:

Dieses biogene Amin besitzt verschiedene Rezeptortypen, die an unterschiedlichen Signalkaskaden beteiligt sind. Die Rezeptoren können dabei in vier Gruppen eingeteilt werden (5-HT_1; 5-HT_2; 5-HT_3 und 5-HT_4). Außerhalb des Zentralen Nervensystems gebildet, aktiviert Serotonin über 5-HT_4 die Darmmuskulatur, begünstigt Bronchialkonstriktion und moduliert den Kreislauf. 5-HT_3 Rezeptoren vermitteln über Mediatoren Schmerz, Erbrechen und Übelkeit im ZNS und peripheren C-Fasern. Relevant für die Schizophrenie sind die Untertypen 5-HT_{1A} und der funktionell besser untersuchte 5-HT_{2A}. Gebildet in den Raphekernen des ZNS, kann es über

verschiedene Transmittersysteme (indirekt über GABA und direkt über Glutamat) einen wesentlichen Einfluss auf Wahrnehmung und Empfinden nehmen (23).
Auf diese Eigenschaften stieß man durch die Untersuchung der Wirkung von LSD, einer halluzinogenen Droge. Im ZNS führt LSD über das Serotoninsystem agonistisch im limbischen System und frontalen Kortex zu Halluzinationen und Gedächtnisstörungen (24).
Heute weiß man, dass der 5-HT_{2A} Rezeptor eine der Wirkungsgrundlagen der neueren atypischen Psychopharmaka mit Ausnahme von Aripiprazol ist. Durch die antagonistische Wirkung auf die Serotonin-Rezeptoren werden Negativsymptome und Halluzinationen reduziert (25).

1.1.4.2 Genetische Studien

Aus vielfältigen Familien-, Zwillings- und Adoptionsstudien weiß man, dass es eine genetische Komponente bei der Entwicklung der Schizophrenie gibt. Da eineiige Zwillinge in ihren Genen eine 100%ige, zweieiige Zwillinge eine 50%ige Übereinstimmung aufweisen, wird eine erhöhte Konkordanz von Krankheitsmerkmalen bei eineiigen Zwillingen als Hinweis für eine deutliche genetische Beteiligung bei der Entstehung der Erkrankung gewertet (26). Das Erkrankungsrisiko für eine Schizophrenie liegt bei ca. 50% für monozygote Zwillinge, unabhängig davon, ob sie getrennt oder gemeinsam bei den Eltern aufwachsen. Kinder eines schizophrenen Elternteils erkranken mit einer Wahrscheinlichkeit von 10-20%. Die Adoption von Kindern aus betroffenen Familien durch gesunde Adoptiveltern kann das Risiko für die Adoptivkinder, eine Schizophrenie zu entwickeln, nur unwesentlich senken (27), (28). Das Erkrankungsrisiko von Kindern nicht-schizophrener Eltern steigt zudem nicht wesentlich, wenn sie in einer Adoptivfamilie aufwachsen, in der ein Elternteil schizophren ist. Diese Adoptionsstudien sind daher ein wichtiger Beweis für eine wesentliche genetische Komponente in der Schizophrenie. In der folgenden zweiten Tabelle sind die wichtigsten Zwillingsstudien zusammengefasst. Diese zeigen Konkordanzraten von bis zu 75% (29).

Tabelle 2: Ergebnisse von Zwillingsstudien bei Schizophrenie nach Maier et al. 1999

Autoren	Anzahl untersuchter Paare		Konkordanzraten in%	
	MZ	DZ	MZ	DZ
Kringlen 1976 (30)	555	90	45	15
Farmer et al. 1987 (31)	21	21	48	10
Franzek et al. 1996 (32)	21	18	75	11
Cannon et al. 1998 (26)	134	374	46	9
Onstad et al. 1991 (33)	31	28	48	4

MZ= monozygote Zwillinge, DZ= dizygote Zwillinge

Diese Ergebnisse zeigen eindeutige Tendenzen eines Einflusses von genetischen Faktoren, die aber nicht den Mendel‘schen Vererbungsregeln folgen, sondern das Resultat eines sehr komplexen Vererbungsmusters sind (34). Genau wie bei Asthma oder Hypertonie zeigt sich auch bei der Schizophrenie eine Abstufung des Schweregrades von leicht bis schwer: Schwer erkrankte Patienten haben mehr betroffene Verwandte als leichter Erkrankte. Das Erkrankungsrisiko der Familienmitglieder fällt in Abhängigkeit des Verwandtschaftsgrades steil ab. Dies sind typische Kennzeichen von multifaktoriell - polygenen Erkrankungen (35).
Außerdem fand man bei Zwillingsstudien heraus, dass bei den Nachkommen monozygoter Zwillingspaare vergleichbar erhöhte Erkrankungsrisiken vorliegen, auch wenn ein Zwilling phänotypisch gesund ist. Man kann somit davon ausgehen, dass gesunde Angehörige schizophren erkrankter Patienten die genetischen Anlagen vererben können, auch wenn sie selbst gesund sind (36).

Kopplungsstudien

Durch Kopplungsstudien kann man innerhalb von erkrankten Familien bestimmte chromosomale Lokalisationen konkretisieren, in denen sich eventuelle Risikogene befinden. Mit Hilfe von Markern werden chromosomale Areale identifiziert, die bei betroffenen Familienangehörigen identisch sind. Man benutzt das Maß der Kopplung, auch LOD score genannt, als Effektgröße für krankheitsassoziierte Areale. Ein Wert > 3 ist nahezu beweisend bei monogenen Erbgängen, während ein Wert >2 ein guter Hinweis bei komplexen Erkrankungen ist.

Diese identifizierten chromosomalen Regionen erstrecken sich über viele hundert Gene, können dementsprechend nur einen ungefähren Bereich eingrenzen. Die Ergebnisse in der Literatur hinsichtlich der Schizophrenie sind widersprüchlich. Zwei Metaanalysen werteten die Ergebnisse aus Genom-Scans aus, indem sie nur erfolgreiche Studien mit LOD Scores zwischen 2 und 3 in die Analyse einbezogen und somit deren Irrtumswahrscheinlichkeiten (p-Werte) prüften (37). Die nächste Tabelle gibt eine Übersicht über die bisher identifizierten Chromosomenregionen:

Tabelle 3: Relevante Chromosomenregionen aus zwei Metaanalysen

Metaanalyse	Chromosomenregion	p- Werte
Badner & Gershon 2002 (38)	**8p**	$p < 10^{-4}$
	13q	$p < 7 \times 10^{-5}$
	22q	$p < 9 \times 10^{-5}$
Lewis et al. 2003 (39)	**2q**	$p < 0.000417$
	1q, 3p, 5q, 6p, 8p, 11q, 14p, 20q, 22q	$p < 0,05$.

p= kurzer Arm des Chromosoms, q= langer Arm des Chromosoms

Assoziationsstudien

Mit dieser Art von Studien untersucht man spezifische Genomabschnitte bzw. einzelne Gene, die bei oben erwähnten Kopplungsstudien entdeckt wurden, oder die sich durch ihre Funktion als interessant erwiesen. Hierbei wird eine hohe Anzahl von Patienten mit einer Kontrollstichprobe verglichen und auf Unterschiede der genetischen Ausprägung untersucht. Auf pathophysiologischen Grundlagen basierend, beforscht man unter anderem Gene, die für Rezeptoren der oben genannten Neurotransmitter codieren. Die Untersuchung der Dopaminrezeptoren DRD3 (40) und DRD2 (41) und des Serotoninrezeptors HTR_{2A} (42) erbrachte positive Assoziationen zwischen den Genen und der Diagnose Schizophrenie. Das einen Glutamatrezeptor codierende GRM3-Gen steht ebenfalls in Verbindung mit der Erkrankung (43). Weitere positive Assoziationen wurden für Neuroregulin, welches bei der Expression von Glutamatrezeptoren beteiligt ist, Dysbindin, ein Protein zur Effektverstärkung des Glutamatrezeptors und COMT, ein Enzym, welches Katecholamine inaktiviert, gezeigt (44).

1.1.4.3 Neuroanatomische Veränderungen

1.1.4.3.1 Makroskopische Befunde

In der Übersichtsarbeit von Shenton et al. (45) wurden randomisierte Magnetresonanztomographie- (MRT) Studien im Zeitraum von 1988 bis 2000 analysiert. Dabei ergaben sich folgende Erkenntnisse im Zusammenhang von Hirnmorphologie und Schizophrenie: 80% der Studien fanden eine Vergrößerung der Ventrikelräume, 73% einen vergrößerten dritten Ventrikel, 74% entdeckten Volumenreduktionen des medialen Temporallappens, und 100% aller Studien fanden Substanzdefizite in Amygdala, Hippocampus, Gyrus parahippocampalis und Gyrus temporalis superior. Bei dem letzten Areal fanden 76% der Studien spezifische Volumenunterschiede im Vergleich von grauer und weißer Substanz. Weitere Auffälligkeiten bei schizophrenen Patienten konnten für folgende Regionen gezeigt werden: Cavum septum pellucidum 92%, Basalganglien 68%, Corpus callosum 63%, Thalamus 42%, Cerebellum 31%.

Man kann diese Veränderungen dabei aus verschiedenen Perspektiven betrachten (vulnerabilitäts-, krankheits-, und verlaufsassoziiert). Entweder sind die strukturellen Abweichungen schon angelegt und auch bei Verwandten auffindbar, so dass sie möglicherweise sogar einen Vulnerabilitätsmarker darstellen. Die Metaanalyse von Vita et al. (46) verglich 21 Studien mit entsprechenden Arealen. Die Gesamtvolumina und die Hippocampus-Volumina waren konsistent bereits bei Ersterkrankten vermindert, während die lateralen Ventrikel beiderseits signifikant vergrößert waren im Vergleich zu gesunden Probanden. Auch die Metaanalyse von Boos et al. 2007 (47) konnte zeigen, dass die antipsychotische Medikation nicht ausschließlich für die Volumenreduktion verantwortlich ist. Erstgradig phänotypisch gesunde Verwandte, welche keine Psychopharmaka einnahmen, wiesen ebenfalls ein vermindertes Volumen auf. Patienten und Verwandte unterschieden sich im Ausmaß der Substanzminderung. Im Hippocampus traten die größten Gruppenunterschiede auf, weitere Unterschiede zeigten sich in der Amygdala.

Weiterhin ist möglich, dass die Volumenreduktionen durch den Krankheitsverlauf oder damit verbundenen Faktoren entstehen (z.B. durch Medikamente, Exazerbationen der Erkrankung). Eine weitere Theorie beschreibt die Veränderungen der Volumina als Bestandteil eines chronischen Verlaufes. In diesem Zusammenhang wurden die Volumenreduktionen als das Resultat eines Neuropiluntergangs dargestellt (bestehend aus Dendriten, Axonen, Synapsen und Neurotransmittern) (48). Die Gruppe um Meisenzahl (49) untersuchte 2008 Volumenunterschiede zwischen ersterkrankten Patienten und chronisch schizophrenen Personen.

Die Grundhypothese war, dass sich der Fokus der Volumenreduktion mit zunehmender Krankheitsdauer verändert. Der Untersuchungsgegenstand war die Graue Substanz. Das globale Volumen nahm im Verlauf der Erkrankung ab. Die bilateralen perisylvischen Regionen (inferiorer frontaler, inferiorer parietaler, supramarginaler und temporaler Gyrus) zeigten die stärksten Reduktionen. Insula, Hippocampus und Amygdala waren bereits bei Ersterkrankten signifikant verkleinert. Es zeigte sich, dass ein bereits initial vermindertes Gehirnvolumen durch einen chronischen Verlauf zusätzlich negativ beeinflusst wird.

Eine bessere Methode zur Auswertung volumetrischer MRT-Daten gegenüber der manuellen Bestimmung ist die Voxel-based Morphometrie (VBM), da die entstehenden Daten nach standardisierten Koordinaten bestimmt werden und damit objektiver sind. Diese Methode war die Voraussetzung folgender zwei Metaanalysen, die sich speziell mit den Veränderungen der grauen Substanz beschäftigten:

In der Metaanalyse von Glahn et al. (50) wurden 31 MRT-Studien in Bezug auf Gruppenunterschiede in der Dichte der Grauen Substanz untersucht. Dabei wurden für die Auswertung der Daten die Koordinaten aus jedem einzelnen Artikel verwendet. Bei der Analyse der insgesamt 1195 schizophrenen Patienten und 1262 Kontrollen ergab sich eine verminderte Volumendichte der grauen Substanz bei Schizophreniepatienten in folgenden Regionen: Insula, Gyrus cingulatus anterius, Gyrus parahippocampalis links, Gyrus frontalis medius links, Gyrus postcentralis, Thalamus. Zusätzlich wurde festgestellt, dass Patienten in striatalen Regionen eine erhöhte Volumendichte der grauen Substanz besaßen.

Die Metaanalyse von Fornito et al. (51) fasste die Ergebnisse aus 37 MRT Studien zusammen und untersuchte somit 1646 Patienten und 1690 Kontrollen. Der Fokus wurde hierbei auf die Gruppenunterschiede zwischen schizophrenen Patienten und gesunden Kontrollen in Bezug auf die Dichte und das Volumen der grauen Substanz gelegt. Die Patientengruppe zeigte dabei folgende Charakteristika: Die Reduktion der Dichte war generell deutlicher ausgeprägt und konsistenter als die Volumenreduktion der grauen Substanz und zeigte sich besonders in der Insula, im Gyrus präfrontalis medialis, im Gyrus temporalis medialis und in den striatalen Regionen. Eine Volumenreduktion beobachtete man vermehrt im dorsomedialen Gyrus frontalis, sowie in den orbitofrontalen und orbitolateralen Regionen. Diese Metaanalyse unterstützt eine Beteiligung frontaler, limbischer und subkortikaler Regionen bei der Genese der Schizophrenie.

1.1.4.3.2 Mikroskopische Befunde

Die regelrechte Hirnentwicklung entsteht in der Histogenese während des zweiten Trimenons der Schwangerschaft (52). Die laminäre Schichtung wird initiiert durch die Proliferation und Migration von Cajal-Retzius-Zellen. Diese bereits ausdifferenzierten Zellen liegen in der Vorläuferschicht des Endhirnbläschens, der späteren Lamina I. Von dort aus bilden sie ein extrazelluläres vertikales Radiärgliafaserwerk. Dieses dient als Leitstruktur für die undifferenzierten Nervenzellen (aus dem Neuroepithel) zur Migration in die späteren Schichten. Im erwachsenen Gehirn sind Cajal-Retzius-Zellen nur noch geringfügig vorhanden, da sie nach der Migrationshilfe in den programmierten Zelltod übergehen (53).

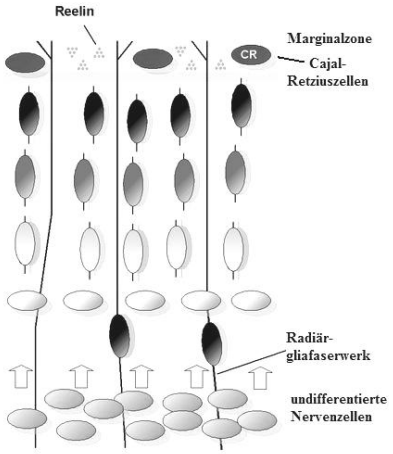

Abbildung 1: Schematische Darstellung der Corticoneogenese (54)

Die ersten hirnmorphologischen Abweichungen wurden durch histologische Untersuchungen an postmortem Gewebe von schizophrenen Patienten erkannt (55). Insbesondere im präfrontalen und temporalen Kortex sowie in subkortikalen Strukturen (Hippocampus, Amygdala) wurden veränderte Zytoarchitektur, Orientierungsstörungen der Pyramidenzellen und ein reduziertes Gesamtgewicht festgestellt (56).

Erst mit neueren neuropathologischen Methoden gelang es, Areal-, Schicht-, und zellspezifische Veränderungen darzustellen. Gyrus dentatus und Cornu ammonis bilden zusammen die Hippocampusformation. Diese besitzen jeweils nur eine neuronale Zellschicht mit zwei verschiedenen Zellarten (Körnerzellen, GABAerge Interneurone). Bei einem Teil schizophren erkrankter Menschen wurde eine Orientierungsstörung der Zellachsen in der Körnerzellenschicht gefunden und vielfach bestätigt (57). Eine veränderte Zytoarchitektur der faserreichen angrenzenden Laminae erklärt den volumengeminderten Hippocampus, nicht aber eine Neuronenverminderung (58). Diese faserreichen Bereiche bestehen aus den afferenten Axonen anderer subcortikaler Strukturen (Thalamus, Tegmentum) und beeinflussen damit die

Körnerzellen des Hippocampus. Verminderte Fasersysteme des Hippocampus werden mit der verminderten Expression von Synaptophysin (für die Bildung von Vesikeln in der Synapse) in Verbindung gebracht. Dagegen sind die GABAergen Interneurone auch in der Anzahl vermindert.

Im angrenzenden entorrhinalen Kortex (Gyrus parahippocampalis) ist die typische laminäre Schichtung bei schizophrenen Patienten verschoben. Außen liegende Neurone scheinen in tieferen Rindenbereichen zu verbleiben (59).

Zytoarchitektonisch besteht der frontale Kortex aus sechs Schichten. Lamina I ist dabei die äußerste Schicht. Die sechs Laminae bestehen wiederum aus zwei Zelltypen: Pyramidenzellen, deren Axone die Schicht verlassen und je nach Lamina auf ipsilaterale, kontralaterale und subkortikale (Thalamus, Striatum, Hirnstamm) Areale projizieren, sowie Interneurone, die jeweils exzitatorisch oder inhibitorisch auf die Pyramidenzellen wirken (60). Bei schizophrenen Patienten fanden Kolluri et al. (61) eine Reduktion des Dendritensytems in Lamina III. In postmortem Untersuchungen fand man hier eine Reduktion der hemmenden GABAergen Interneurone (62), welche wiederum die Aktivität der Pyramidenzellen beeinflussen. Akbarian et al. (63) fanden eine erhöhte Dichte reifender interstitieller Neurone in der tieferen weißen Substanz. Dagegen fanden sich in den oberflächlichen Schichten weniger Neurone dieser Art. Diese Unterschiede sind ein weiteres Indiz für eine fehlerhafte Migration und ein Grund für die unzureichende Vernetzung subkortikaler Afferenzsysteme (64).

1.1.4.4 Befunde aus funktionellen Bildgebungsstudien

Das funktionelle MRT (fMRT) und damit verbundenen der BOLD Effekt (Blood Oxygen Level Dependent) wird häufig in funktionellen Bildgebungsstudien verwendet. Bei der Durchführung kognitiver Tests oder Verhaltensbeobachtungen werden die Neurone der involvierten Areale angeregt und mit oxygeniertem Blut perfundiert. Dieser Signalanstieg wird bildmorphologisch im Gegensatz zu weniger durchbluteten Arealen erfasst und als neuronal aktivierte Region erkannt. Verschiedene Tests werden zur Gehirnstimulation genutzt. Durch Subtraktion der Grundaktivität von der Arbeitsaktivität kann der Aktivitätsanstieg in den stimulierten Arealen bestimmt werden. (65).

Die Metaanalyse von Minzenberg et al. (66) untersuchte 41 fMRT Studien, die vor 2007 publiziert worden sind. Alle eingeschlossenen Studien untersuchten das Arbeitsgedächtnis mit Hilfe von standardisierten Aufgaben (Tasks: N-back-Test mit kontinuierlicher Variation der

Gedächtnisbelastung, CPT-Daueraufmerksamkeitstest und Stroop-Task als kognitiver Verarbeitungstest). Das Ergebnis zeigte, dass Kontrollen und schizophrene Patienten ähnliche kortikal-subkortikale Aktivierungsmuster hatten. Diese waren hauptsächlich im dorsolateralen und ventrolateralen präfrontalen Kortex, im anterioren Gyrus cingulatus und im Thalamus. Getrennt nach Diagnose zeigten Patienten eine verminderte Aktivierung im linken dorsolateralen präfrontalen Kortex, im linken dorsalen anterioren Gyrus cingulatus und im mediodorsalen Nukleus des Thalamus. Der Grad der Aktvierung veränderte sich zwischen den Gruppen sowie bei verschiedenen Aufgabenstellungen und Schwierigkeitsgraden.

Eine weitere Studie (67) befasste sich mit dem Zusammenhang von Emotion und Kognition bei schizophrenen Patienten. Dysfunktionen in neuronalen Strukturen können sich auf die Interaktion von negativen Emotionen und Arbeitsgedächtnis auswirken. In dieser Studie sollten zwölf Patienten und zwölf Kontrollen einen N-Back-Task durchführen, während intermittierend neutrale und negative visuelle Emotionsstimuli auftraten. Es wurden Gruppenunterschiede hinsichtlich Arbeitsgedächtnis, Emotion und deren Interaktion evaluiert. Die Patienten präsentierten eine verminderte Leistung im Arbeitsgedächtnis gegenüber den Kontrollen in folgenden Regionen: dorsolateraler präfrontaler Kortex, Gyrus cingulatus anterius und inferiorer parietaler Kortex.

Im Emotionstest wiesen Patienten ebenfalls eine verminderte Gehirnaktivität in ausgedehnten Regionen, inklusive des linken orbitofrontalen Kortex und des Gyrus frontalis medius auf. Der Unterschied in den aktivierten Arealen bestätigte sich ebenfalls bei der Interaktion von Emotion und Gedächtnis. Hier veränderte und verminderte sich das kortikale Aktivierungsmuster bei Patienten im Vergleich zu den Kontrollen. Bei erkrankten Personen wurde das thalamokortikale System aktiviert, inklusive Precuneus, Gyrus angulus und Gyrus cingulatus medius.

Das soziale Gehirn setzt sich aus verschiedenen Aspekten zusammen (Kognition, Gedächtnis, emotionalem Denken und Entscheidungsfähigkeit). Bei Schizophreniepatienten zeigten sich veränderte neuronale Aktivierungen im medialen präfrontalen Kortex, in der Amygdala und im inferioren Parietallappen. Diese unterschiedlichen Aktivierungsmuster zeigten eine Interaktion zwischen sozialer Abweichung und bekannter neurochemischer Dysregulierung (68, 69).

1.1.4.5 Psychosoziale Faktoren

Verschiedene psychologische Modelle erkennen an, dass die Schizophrenie organische Ursachen hat, jedoch häufig durch psychosoziale Variablen ausgelöst wird. An dieser Stelle soll kurz die Theorie der belastenden Lebensereignisse und die der familiären Fehlkommunikation erwähnt werden. Bestimmte Life-Events (Übergang von Schule zum Beruf, Tod, Trennung, Verlust des Arbeitsplatzes) werden von den Erkrankten schlechter verarbeitet und werden häufig als Auslöser bzw. als Ursache für eine Exazerbation der Erkrankung beobachtet. Das Konzept der „high expressed Emotions“ beschreibt einen familiären Kommunikationsstil, der von kritischen Kommentaren und gleichzeitiger, entmündigender Überbehütung des Elternhauses geprägt ist (70).

1.1.5 Endophänotypen

Der Etablierung von Endophänotypen vorausgegangen ist die Problematik der vielfältigen und sich überschneidenden Symptome von Schizophrenie und anderen psychiatrischen Erkrankungen. Zudem ist davon auszugehen, dass die klinische Diagnose der Schizophrenie keine einheitliche Entität ist, sondern verschiedene pathophysiologische Prozesse einschließt (Heterogenität).

Die Untersuchung von Endophänotypen dient dazu, bestimmte neurobiologische Korrelate zu identifizieren, die eine stringente Genetik aufweisen. Das bedeutet, dass bestimmte Defizite bzw. Veränderungen, z.B. bei Augenfolgebewegungen (71), Kognition (72) oder Ventrikelvolumen (73) bei Schizophreniepatienten und in eingeschränktem Ausmaß auch bei deren gesunden Verwandten beobachtet werden, nicht aber bei gesunden Kontrollprobanden. Diese Endophänotypen werden auf genetische Einflussfaktoren hin untersucht. Dadurch erhofft man sich ein besseres Verständnis für die pathobiologischen Mechanismen, die diesen Endophänotypen zugrunde liegen. Ein Vorteil gegenüber klassischen Assoziationsstudien ist die Reduzierung weiterer genetischer, psychosozialer und Umweltfaktoren, da von einer deutlich weniger komplexen neurobiologischen Grundlage der Endophänotypen ausgegangen wird. Über die Erkenntnis dieser genetischen Korrelate erhofft man sich Erkenntnisse hinsichtlich der Pathophysiologie der Schizophrenie sowie einer besseren Subtypisierung.

1.2 Reelin

1.2.1 Struktur und Funktion

Die codierende DNA für das Reelinprotein befindet sich auf dem langen Arm des Chromosoms 7 und spannt sich zwischen 102.899.473 und 103.417.198 bp auf. Das Gen besitzt 65 Exons in der Größenvariation von sechs Basenpaaren (Exon 64) bis 1104 Basenpaaren (Exon 65). Dabei bestehen die Introns aus wesentlich mehr Basenpaaren als die Exons. Das erste und längste Intron, welches sich der 5'UTR anschließt, besteht aus ca 80 kb, was ein ungefähr ein Fünftel der Genlänge ausmacht (74,75). Die folgende Abbildung stellt die physikalische Lage der Exon- und Intron-Abschnitte auf dem Gen dar. Die Exons sind dabei als senkrechte Balken auf dem Gen markiert.

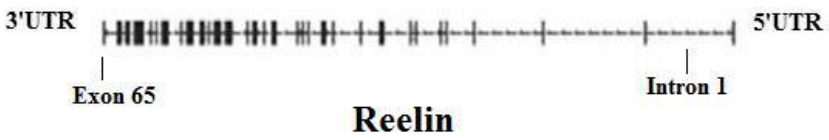

Abbildung 2: Intron und Exon Einteilung im Reelingen

Das Protein weist ein relatives Molekulargewicht von 388 kDa auf und besteht aus 3461 Aminosäuren. Die folgende Abbildung stellt ein dreidimensionales Modell des Reelinproteins dar:

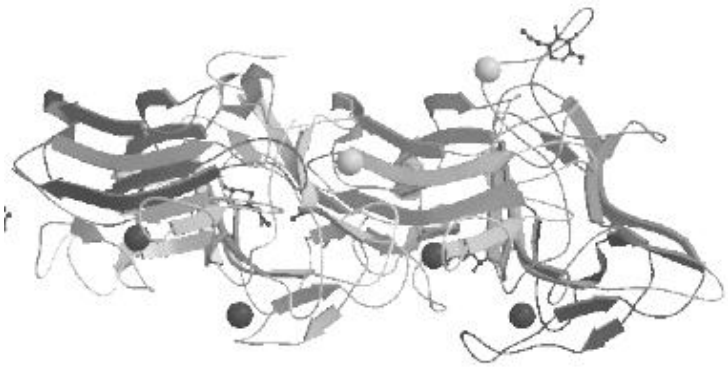

Abbildung 3: Dreidimensionales Modell des Reelinproteins (76)

Reelin besitzt zu verschiedenen Zeitpunkten der Entwicklung des Gehirnes unterschiedliche Funktionen. Während der Embryonalphase wird Reelin von Cajal-Retzius-Zellen gebildet. Diese befinden sich hauptsächlich in der Marginalzone des Neokortex und Hippocampus. Von dort wirkt Reelin als Migrationshilfe für die Pre-Plate Neurone aus der Ventrikularzone. Diese

wandern entlang des radialen Gliafaserwerkes in Richtung äußere Schichten und Marginalzone. Hier wirkt Reelin als Stopp-Signal und positioniert die Neurone an ihren endgültigen Bestimmungsorten (53).

Im postnatalen Gehirn begünstigt Reelin das neuronale Wachstum und die Konnektivität der Fasersysteme, welche die Grundlage der synaptischen Plastizität sind (77). Deshalb wird es im adulten Gehirn hauptsächlich in Regionen (präfrontalen Kortex, Temporallappen und Hippocampus) mit hoher Neurotransmissionrate gebildet (Lernen und Gedächtnis). Dort produzieren GABAerge Interneurone aus der Schicht II-IV und Cajal-Retzius-Zellen aus der Schicht I Reelin (78). Die genaue Signalkaskade von Reelin wird in der folgenden Abbildung illustriert:

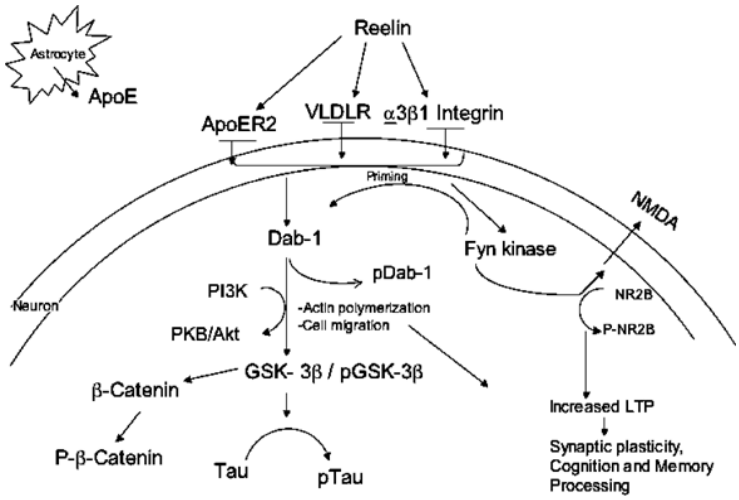

Abbildung 4: Signalkaskade von Reelin (76)

Das extrazelluläre Reelin kann durch seine zentrale Domäne an drei verschiedene Rezeptoren binden:

- Apolipoprotein E Rezeptor 2: **ApoER2**
- very low density lipoprotein (VLDL) receptor: **VLDLR**
- **α3β1 Integrin**

Diese Rezeptoren aktivieren im Neuron Serin-Threonin-Kinasen, welche zur Phosphorylierung von Dab1 führen. Diese phosphorylierten Proteine bilden wiederum das Substrat für weitere Signalkaskaden, welche Grundlage für die Zellmigration, Interaktion, Plastizität, Neurotransmission und Langzeitpotenzierung sind. Gleichzeitig inhibiert Reelin auch Kaskaden durch Ubiquitinierung und Tau-Phosphorylierung, die die Nervenzelle zur Apoptose auffordern und zur Neurodegeneration beitragen.

Durch die Aktivierung einer SRC-Tyrosinkinase wird die direkte Untereinheit (NR2B) des NMDA-Rezeptors phosphoryliert und diese in ihre aktive Form überführt (79).
Reelin ist in vielfältigen neurobiologischen Prozessen involviert, die zur Integrität und Stabilisierung des adulten neuronalen Systems beitragen.

1.2.2 Zusammenhang zwischen Reelin und Schizophrenie

Homozygote Reeler-Mäuse zeigten durch eine Spontanmutation des Reelingens einen absoluten Mangel am Protein Reelin und gleichzeitig ausgedehnte Defekte der kortikalen Schichtung und der synaptischen Konnektivität. Diese Tiere präsentierten schwere Defizite in der motorischen Koordination, kognitive Einbußen, Lernschwäche und cerebelläre Ataxie. Bei der histologischen Untersuchung dieser Mäusegehirne fand man eine gestörte neuronale Zellschichtung in Hippocampus und Cerebellum, in der die inneren Laminae nach außen verlagert waren. Die folgende Abbildung zeigt die aufgehobene zelluläre Schichtung von Reeler-Mäusen im Vergleich zu gesunden Mäusegehirnen.

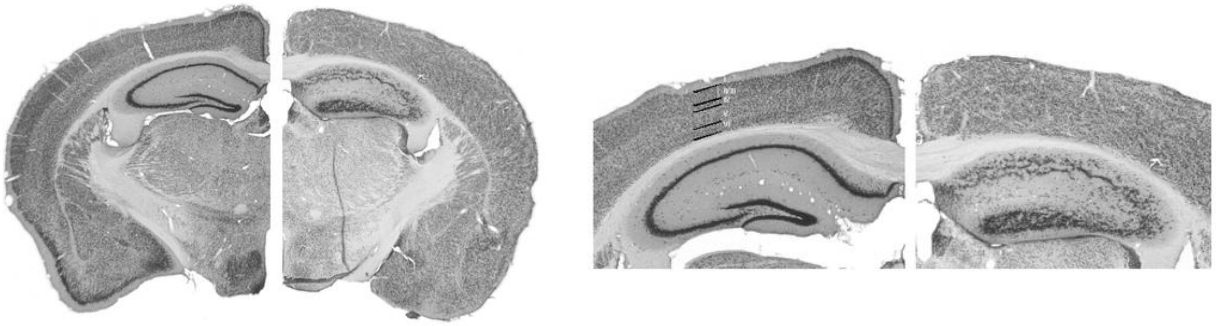

Abbildung 5: Immunhistochemische Färbung (Zellkern "Neu-N") eines Frontalschnittes durch eine Wildtyp-Hemisphäre (links) und einer Hemisphäre der Reeler-Maus (rechts) (80)

Durch den Vergleich der postmortem Befunde von Gehirnschnitten schizophrener Patienten und Reeler-Mäusen fielen histologische (77) und neurochemische Ähnlichkeiten auf, die mit den oben genannten pathobiologischen Befunden vergleichbar waren (81). Aufgrund einer 94%igen Übereinstimmung der codierenden DNA des Reelinproteins bei Maus und Mensch geht man von einer ähnlichen Funktionsweise aus.Verschiedene Untersuchungen von postmortem Gewebe schizophrener Patienten bestätigten eine 50%ige Reduktion der Reelin-mRNA im dorsolateralen und präfrontalen Kortex (82, 83).

Die Gruppe um Guidotti (84) untersuchte ein Kollektiv aus 60 postmortem Gehirnen. Darunter waren gleich verteilt schizophrene, unipolar depressive und bipolare Patienten sowie Kontrollen. Untersuchungsgegenstand war dabei Reelin und das zytosolische Adaptorprotein der Glutaminsäuredecarboxylase (GAD 67). Das Ergebnis zeigte eine 30-50%ige Reduktion der Reelinexpression bei den Schizophreniepatienten und bei den Probanden mit Bipolarer Störung und Psychose. Dieses Ergebnis zeigte sich unabhängig von Dosierung und Anwendungsdauer einer antipsychotischen Pharmakotherapie.

Die Studie von Eastwood (52) verglich 2003 mittels imunhistochemischer Marker zwölf postmortem Gehirne schizophrener Patienten mit 14 Kontrollen. Zuerst wurden die Interneurone der weißen Substanz des Gyrus temporalis durch den Antikörper Neu-N markiert. Danach wurde mittels In-Situ Hybridisierung die produzierte Reelinmenge dargestellt. Die Ergebnisse zeigten einen signifikanten Unterschied zwischen Kontrollen und Patienten, wobei die Erkrankten eine reduzierte Dichte der Neurone und eine geringere Reelinexpression aufwiesen. 2006 wurde diese Beobachtung auch im dorsolateralen präfrontalen sowie superioren temporalen Kortex und in der Hippocampusformation und im Gyrus parahippocampalis bestätigt (85), (86). Diese Reelin-produzierenden Areale stimmen mit den pathophysiologischen betroffenen Arealen bei der Schizophrenie überein. Durch fehlerhafte und unzureichende Neuroplastizität sowie gestörte Corticoneogenese könnten akustische Halluzinationen im Gyrus temporalis superior, Lern- und Gedächtnisstörungen im Hippocampus und Affektverflachungen im präfrontalen Kortex entstehen (87).

Persico et al. (88) untersuchte 2006 ein GGC-Repeat (Mikrosatelliten) in der 5'UTR Region von Reelin, um eine mögliche Ursache für die reduzierte Reelin-mRNA aufzudecken. Methodisch wurden dabei mittels Restriktion artifizielle Wiederholungen des GGC-Repeats in das Gen eingebaut. Anschließend wurde mRNA und Proteinmenge gemessen. Die mRNA war mit zunehmender Wiederholungsanzahl von GGC-Tripletts thermostabiler in der Sekundärstruktur und erschwerte somit den Ableseprozess in den Ribosomen. Die produzierte Reelinmenge sank signifikant.

1.2.3 Assoziationsstudien zwischen Reelin und Schizophrenie

In den folgenden Abschnitten werden verschiedene Studien zusammengefasst, die verschiedene Polymorphismen (Mikrosatelliten, SNPs) und expressionsmodulierende Faktoren (Methylierung) des Reelingens bei schizophrenen Patienten und Kontrollen untersuchten.

Mikrosatelliten

Die Studie von Goldberger et al. (89) versuchte, eine Assoziation zwischen dem GCC-Repeat in der 5'UTR des Reelingens und der Schizophrenie zu finden. Die DNA wurde hinsichtlich signifikanter Unterschiede zwischen Patienten und Kontrollen sowie „Medikamenten-Respondern" und „Non-Respondern" untersucht. Es zeigte sich kein Zusammenhang zwischen den Wiederholungen und der Erkrankung. Allerdings wiesen „Non-Responder" im Vergleich zu „Respondern" signifikant häufiger zehn GCC-Wiederholungen auf, was für einen Zusammenhang zwischen Reelin und Therapieresistenz sprechen könnte. Methodisch ähnliche Studien von Huang et al. (90), Akahane et al. (91) und Chen et al. (92) zeigten ebenfalls keine Assoziation zwischen dem GCC-Repeat in der Promoterregion und der Diagnose Schizophrenie.

In einer Studie von Wedenoja et al. (93) wurden verschiedene neuropsychologische Endophänotypen bei 186 Familien mit schizophrenem Hintergrund auf signifikante Zusammenhänge mit Reelin untersucht. Das Ergebnis zeigte Assoziationen zwischen Reelin-Mikrosatelliten und visuellem bzw. verbalem Arbeitsgedächtnis, Erinnerungsgedächtnis und exekutiver Funktion, jedoch keinen Zusammenhang mit der Diagnose Schizophrenie.

SNPs

Gregório et al. (94) untersuchten 32 Polymorphismen von 30 Genen, die bei der pathologischen Gehirnentwicklung von Schizophrenie involviert sein könnten, darunter auch Reelin. Durch PCR-technische Methoden wurden diese Gene analysiert und mit im MRT erhobenen Volumendaten verglichen. Dabei zeigte sich ein signifikanter Zusammenhang zwischen rs362691und der Erweiterung der Ventrikelräume beiderseits. Dieser SNP rs362691 befindet sich im Exon 22 und durch die alternative Base verändert sich die Aminosäuresequenz von Valin zu Leucin.

Aus den identifizierten Chromosomenlokalisationen (1q32.2-q42, 2q, 4q31, 5q und 7q22) einer großen finnischen Kopplungsstudie untersuchten Wedenoja et al. (93) das Chromosom 7q21-q31. Vier geographisch aneinander liegende Gene (GRM 3, RELN, SEMA3A und VGF) aus dieser Region wurden mittels molekulargenetischer Methoden auf eine mögliche Assoziation zwischen verschiedenen SNPs und der Diagnose Schizophrenie untersucht. Sie benutzten 352 Kernfamilien mit schizophrenem Hintergrund aus dieser finnischen Studie. Keiner der ausgewählten Polymorphismen zeigte eine Assoziation mit der Erkrankung.

Die Gruppe um Shifman (95) untersuchte 2008 mittels einer genomweiten Assoziationsstudie 194 SNPs bei insgesamt 2274 Schizophrenie-Patienten und 4401 Kontrollen. Sie entdeckten eine Variante von rs7341475, einem SNP des Reelingens aus dem vierten Intron, welches bei weiblichen Schizophrenie-Patientinnen im Vergleich zu gesunden Frauen signifikant häufiger auftrat. Das relative Risiko erhöhte sich um das 2,1 fache, sobald Frauen das gg-Allel an dieser Position trugen.

Methylierung

Eine veränderte Reelinexpression kann zudem durch epigenetische Mechanismen erreicht werden. Dazu zählt die Hypermethylierung von Promoterregionen, die eine Gen-Inaktivierung („gene silencing“) bewirken kann (96). Hierdurch können veränderte Expressionsmuster erzeugt werden. Die Studie von Grayson et al. aus dem Jahr 2005 (97) erforschte dieses Phänomen bei schizophrenen Patienten hinsichtlich Reelin. Prinzipiell war bei Schizophreniepatienten ein vermehrtes Methylierungsmuster gegenüber Kontrollen zu beobachten. Dieses war aber nicht an allen Stellen des Reelingens gleich verteilt, sondern man entdeckte auch eine atypische und verstärkte Methylierung des Gens bei Patienten. Ein solcher Unterschied zeigte sich u.a. in einer expressionsregulierenden Region.

Die Studie von Tamura et al. (98) untersuchte ebenfalls die Methylierung des Reelinpromotors in Bezug auf psychiatrische Erkrankungen. Während bei gesunden Probanden ein Zusammenhang zwischen Methylierungsgrad und Alter beobachtet wurde, zeigte sich dieser Effekt nicht bei schizophrenen und bipolaren Patienten, so dass von einer gestörten Regulation der Methylierung bei diesen Patienten auszugehen ist.

2 Fragestellung

Durch das Vorliegen von alternativen Basen im Bereich von genregulierenden Arealen kann es zu einer veränderten Transkription der DNA kommen. Basenfolgeveränderungen in der aminosäurecodierenden Region führen hingegen zu einem veränderten Protein, entweder mit einem einzelnen Aminosäureaustausch, durch ein verschobenes Leseraster zu einer Reihe falscher Aminosäuren oder aufgrund eines vorzeitig eingeführten Schlusscodons zu einem verkürzten Protein.

Reelin, ein wichtiger Mediator bei der Corticoneogenese, kann in verringerter Konzentration nicht die optimale laminäre Schichtung bestimmter Hirnstrukturen sicherstellen. Dadurch werden proliferierende Neurone atypisch platziert, was zu einer Verminderung bzw. Veränderung der grauen Substanz führt. Dies kann im adulten Gehirn zu einer fehlerhaften Konnektivität führen und miteinander kommunizierende Gehirnareale beeinträchtigen. Daraus können arealbezogene Symptome der Schizophrenie (Hippocampus-Lernen, Gyrus frontalis-Affektion, Gyrus temporalis superior - akustische Halluzinationen) resultieren. Die Theorie eines Zusammenhangs zwischen Reelin und der Diagnose Schizophrenie entwickelte sich aus histologischen postmortem Untersuchungen an schizophrenen Gehirnen und der Entdeckung des Reelingens bei Mäusen und seiner Funktion.

Die Relevanz einer genetischen Untersuchung von Reelin bei schizophrenen Patienten beruht auf folgenden Grundlagen:

- Die Entstehung schizophrener Erkrankungen ist bis heute noch nicht erklärt. Jedoch bestätigten vielfältige Zwillings- und Adoptionsstudien, dass die Genetik einen wesentlichen Beitrag leistet.
- Die Volumenminderung ist vererbbar und nicht ausschließlich bedingt durch die Medikation oder Folge eines degenerativen Krankheitsprozesses. Dies wurde in verschiedenen MRT Studien beschrieben, sowohl mit Verwandten als auch mit unterschiedlich schwer erkrankten schizophrenen Patienten.
- Reelin ist durch seine Funktion ein relevanter Kandidat bei der fehlerhaften Migration von Neuronen im schizophrenen Gehirn und stellt einen wichtigen Faktor bei der Corticoneogenese dar.
- Bei postmortem Untersuchungen von schizophrenen Patienten wurde eine 50%ige Reelinreduktion im Gehirn nachgewiesen.

- Histologische Untersuchungen zeigten, dass Gehirne schizophrener Patienten eine veränderte kortikale Schichtung in Regionen aufweisen, in denen andere Studien eine verminderte Reelinexpression belegten.
- Bei der Schizophrenie betroffene pathophysiologische Areale (Hippocampus, Gyrus präfrontalis) stimmen mit den Gebieten überein, in denen sich eine Reelinreduktion zeigte.
- Reelin ist im adulten Gehirn an der Aktivierung von NMDA-Rezeptoren beteiligt, welche in der Pathogenese der Schizophrenie einen zentralen Vulnerabilitätsfaktor darstellen.

Die vorliegende Studienarbeit untersucht Polymorphismen des Reelingens in Zusammenhang mit der Diagnose Schizophrenie. Zudem soll geprüft werden, inwiefern ausgewählte Gehirnareale einen Zusammenhang mit den Allelausprägungen dieser Polymorphismen zeigen. Zwei zentrale Fragestellungen ergeben sich somit für diese Studienarbeit:

Gibt es einen Zusammenhang zwischen dem Reelin-Gen und der Diagnose Schizophrenie, bzw. besteht ein erhöhtes Risiko zu erkranken, wenn bestimmte Allelausprägungen der Polymorphismen vorliegen?

Zeigen Volumina einzelner cerebraler Regionen eine Assoziation mit genetischen Varianten des Reelingens?

Um den Einfluss von Reelin auf die Diagnose und Gehirnvolumina schizophrener Patienten festzustellen, sollte ein Probandenkollektiv mit 148 Personen untersucht werden, welches aus einer schizophrenieerkrankten Gruppe und einer dazu passenden Kontrollgruppe besteht. Ziel dieser Untersuchung ist es, durch laboranalytische Methoden die Basensequenz der Polymorphismen im Reelingen bei den Probanden zu ermitteln und die Frequenzen der Genotypen zu errechnen. Durch statistische Berechnungen werden eventuelle signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen herausgestellt. Zusätzlich werden diese Allelfrequenzen mit im MRT erhobenen Volumendaten ausgewählter Gehirnareale verglichen.

3 Material und Methoden

Bei der gesamten Untersuchung und Durchführung wurde stets drauf geachtet, dass die Grundsätze der Charité zur Sicherung der wissenschaftlichen Praxis beachtet wurden.

3.1 Material

3.1.1 Probanden und klinische Untersuchungen

Für diese Studie wurde im Vorfeld ein Ethikvotum eingeholt und alle Teilnehmer unterschrieben eine Einverständniserklärung. Alle klinischen Daten, Bildgebungsdaten und Blutproben wurden von der Arbeitsgruppe Bildgebung der Klinik für Psychiatrie und Psychotherapie der Charité Berlin (CCM) gesammelt.

Die Patientengruppe von 74 Personen wurde in der Klinik für Psychiatrie und Psychotherapie der Charité Berlin rekrutiert. Die Diagnose der paranoid halluzinatorischen Schizophrenie wurde mittels dem Statistischen Manual der Mental Disorders (DSM-IV) und der internationalen Klassifikation der Krankheiten (ICD-10) gestellt. Die Patienten befanden sich entweder in ihrer ersten Episode der Erkrankung und waren daher unmediziert bzw. waren exazerbiert und bekamen bereits vorher Medikamente. Zusätzlich konnten weitere Erkrankungen der Achse I und II im strukturierten Interview (SCID) ausgeschlossen werden. Zur Erfassung der aktuellen Psychopathologie wurde die „Positive und Negative Syndrom-Skala“ (PANSS) sowie die „klinische Gesamteindruck Skala“ (CGI) durchgeführt, um den Schweregrad der Symptomatik zu charakterisieren.
Die Kontrollgruppe bestand aus 74 freiwilligen Teilnehmern, die weder selbst psychiatrische Erkrankungen der Achse I oder II noch psychiatrisch erkrankte Verwandte ersten Grades aufwiesen. Ausgeschlossen wurden auch solche Probanden, die einen aktuellen Drogenkonsum oder Abusus berichteten. Zudem wurde ein Urin- Drogentest durchgeführt.
Im weiteren wurde bei jedem Probanden eine Magnetresonanztomographie (MRT) mit dem Magnetom Vision 1,5T von Siemens durchgeführt, um ausgewählte Gehirnareale (Gyrus frontalis medius, Gyrus frontalis inferior und Pars orbitalis, Insula, Gyrus parahippocampalis, Gyrus temporalis superior, Amygdala, Ncl. caudatus, Thalamus) darzustellen. Aus diesen

digitalen Daten wurde mittels dem „Statistical Parametric Mapping“ (SPM) Programm die Größe der einzelnen Volumina errechnet.

Zum Schluss wurden von allen Studienteilnehmern Blutproben zur DNA-Extraktion entnommen. Die folgenden zwei Abbildungen geben einen Überblick über die untersuchten Regionen:

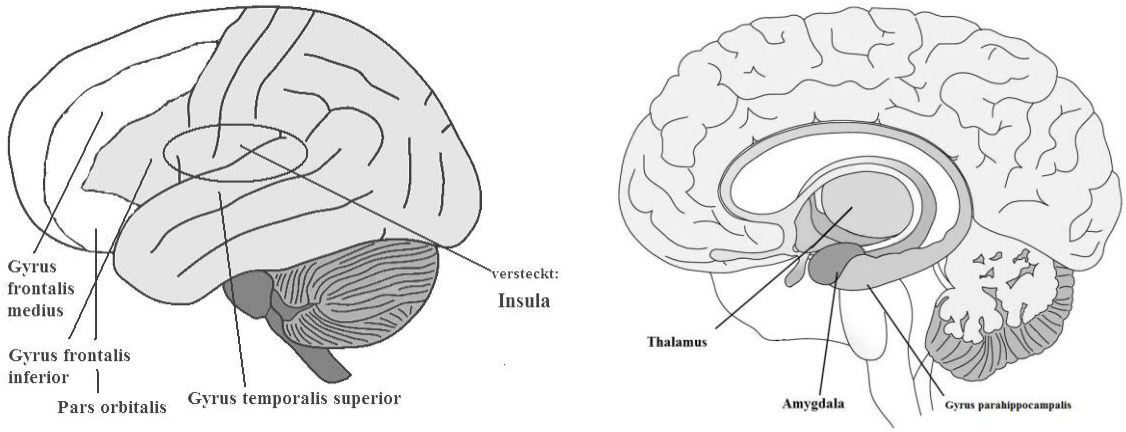

Abbildung 6 und Abbildung 7: Darstellung der untersuchten Gyri und Gehirnareale (aus 99, 100)

3.1.2 Labormaterial

3.1.2.1 Geräte

310 Genetic Analyzer	Applied Biosystems, Foster City, USA
Elektrophoresekammer Maxi Large	Harnischmacher, D
Gelträger, Gelkämme	Harnischmacher, D
Magnetrührer Variomag	H+P Labortechnik, München, D
Oberwaagenschale ALS 120-4N	Kern & Sohn, Balingen, D
Nano-Drop	EQLAB GmbH
Pipetten	Eppendorf, Hamburg, D
Spektrophotometer	Nanodrop Technologies, USA
Thermocenter	SalvisLab, RotkreuzCH
Thermocycler Typ 2720	Applied Biosystems, Foster City, USA
Videodokumentationssystem	Intas Science Imaging Instruments GmbH
Zentrifuge LMC 3000	G. Kisker GbR, Steinfurt D
Zentrifuge Universal 30Rf	Hettich, Tuttlingen, D

3.1.2.2 Verbrauchsmaterialien

Streifenröhrchen für acht Proben (strip- tubes)	Applied Biosystems
EDTA Röhrchen	Sarstedt, Nümbrecht, D
Flachdeckelstreifen (8;12)	ABgene, Epsom UK
Kapillaren (47cm) für Genetic Analyzer	Applied Biosystems
Mikrotestplatte	G.Kisker GbR, Steinfurt D
PCR Platten für 96 Proben	ABgene, Epsom UK
PCR Rack	G.Kisker GbR, Steinfurt D
Pippettenspitzen	Sarstedt, Nümbrecht, D
Reagenzgefäße (1,0 µl;1,5 µl; 2,0 µl)	Sarstedt, Nümbrecht, D
Röhrchen (15 ml; 50 ml)	Falcon, Heidelberg, D
Zentrifuge Universal 30Rf	Hettich, Tuttlingen, D

3.1.2.3 Chemikalien, Enzyme

10xPCR-Puffer	Rapidozym, Berlin, D
50 bp DNA Leiter	Fermentas, St. Leon Roth, D
Agarose SERVA 11404	SERVA electrophoresis, Heidelberg, D
Aqua bidest	Charité, Berlin, D
Borsäure	Merck, Darmstadt, D
Bromphenolblau	Carl Roth, Karlsruhe, D
DMSO	Merck, Darmstadt, D
DNA- Polymerisationsmix (dNTP) 10 mM	Rapidozym, Berlin, D
EDTA	Merck, Darmstadt, D
Ethanol	Merck, Darmstadt, D
Ficoll	Carl Roth, Karlsruhe, D
FlexiGene DNA Kit 250	QIAGEN, Hilden, D
GeneScan -500 LIZ Größenstandard	Applied Biosystems
Hi-Di Formamide	Carl Roth, Karlsruhe, D
Isopropanol	Merck, Darmstadt, D
Magnesiumchlorid	Bio Therm, Gaithersburg, USA
Polymer Pop 6	Applied Biosystems

Primer für Mikrosatelliten	biomers.net GmbH, Ulm, D
Primer für SNPs	Tib Mobiol, Berlin, D
SybrGold	Invitrogen, Karlsruhe, D
Restriktionsenzyme:	Fermentas, St. Leon Roth, D
Nhe 1, Bts 1, Fok ,1 BssS1, BsaH1, Sty 1, HinP1I, BstY1, Mfe1, Sml1, Bsm A1	NEB, Frankfurt a. M., D
Taq-DNA-Polymerase 5 U/ml	Rapidozym, Berlin, D
Tris	Merck, Darmstadt, D
Ultra gereinigtes water	Invitrogen, Karlsruhe, D

3.1.3 Software

SPSS 14.0	Statistical Package for Social Science, SPSS
Blast-Algorithmen	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ blast/bl2seq/wblast2.cgi
Data Collection	Applied Biosystems
Ensembl	http://www.ensembl.org
Gene Mapper v 4.0	Applied Biosystems
HAP	http://research.calit2.net/hap/
MS Word	Microsoft, USA
NCBI	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/
NEB Cutter	http://tools.neb.com/NEBcutter2/
PAINT.net	Microsoft, USA
Primer Express 3.0	Applied Biosystems
SPM2	http://www.fil.ion.ucl.ac.uk/spm
UCSC	http://genome.ucsc.edu

3.2. Methoden

3.2.1 DNA Extraktion mit Qiagen FlexiGene DNA Kit

Nach dem Auftauen der EDTA-Blutproben wurden 15 ml Lysepuffer (FG1) zu 8 ml Vollblut in ein Falconröhrchen gegeben und ca. 10-mal geschwenkt. Anschließend wurde die Probe für 8 min bei 5000 rpm mit Softeinstellung zentrifugiert. Der Überstand wurde abgetrennt und verworfen und das Röhrchen umgekehrt zum Trocknen auf Filterpapier gestellt. Dieser Lyseschritt wurde drei Mal wiederholt, wobei beim zweiten Mal 5 ml FG1 und anschließend 3 ml Lysepuffer benutzt und nur 5 min lang zentrifugiert wurde.

Im zweiten Schritt wurden 4 ml Puffer FG2 und 40 µl Protease zum Pellet dazugegeben und gemischt, bis die Flüssigkeit homogen erschien. Diese Mischung wurde in ein kleineres Röhrchen überführt und für 15 min bei 65 ºC inkubiert. Hierbei sollte die Farbe von hellrot nach olivgrün wechseln, was die Denaturierung der Proteine anzeigt.

Beim dritten Schritt wurden 4 ml Isopropanol überführt und gemischt, bis die DNA–Stränge als Niederschlag sichtbar wurden. Anschließend wurde die Probe für 3 min bei 4000 rpm zentrifugiert, der Überstand vorsichtig abgetrennt und das Röhrchen umgedreht zum Trocknen auf Filterpapier gestellt.

Im vierten Schritt wurden 4 ml Ethanol zum Waschen der DNA pipettiert und nach kurzem Vormischen mit der DNA für ca. 3 min bei 4000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde wieder vorsichtig abgetrennt und trocknete bei 25°C für 40 min, damit das restliche Ethanol verdampfte.

Für die Lagerung wurde mit 300 µl FG3 die getrocknete DNA rehydriert. Somit entstand eine durchschnittliche Konzentration von 20-80ng/µl, welche mit dem Nano-Drop Spektrophotometer gemessen wurde. Die gewonnene DNA-Probensammlung lagerte bis zur Analyse bei 4°C.

3.2.2 Single Nukleotid Polymorphismen (SNPs) - Genotypisierung

99,9% des Erbgutes sind bei allen Menschen identisch. SNP`s stellen nicht die einzige, allerdings die häufigste Variation im Erbgut dar. An durchschnittlich jeder 500.-1000. Stelle ist eine Base des Genoms gegen eine andere ausgetauscht. Insgesamt etwa drei bis sechs Millionen solcher Variationen kommen vermutlich im Erbgut vor. Ein solcher Einzelnukleotid-Polymorphismus liegt dann vor, wenn an einer bestimmten Basenposition des genetischen Codes alternativ zwei verschiedene Basen, beide mit einer Wahrscheinlichkeit von über 1% auftauchen. SNPs gehen auf Mutationen zurück, die sich im Laufe der menschlichen Evolution ereignet

haben. Zwei Drittel aller SNPs bestehen aus dem Austausch von Cytosin mit Thymin, da Cytosin im Wirbeltier-Genom häufig methyliert wird. Durch spontan auftretende Desaminierung wird aus 5-Methylcytosin Thymin. Man schätzt, dass SNPs etwa 90 Prozent der genetischen Diversität der Menschheit ausmachen und damit die individuellen phänotypischen Variationen zwischen Menschen zum Hauptteil mitgestalten. Der Großteil dieser Polymorphismen hat wahrscheinlich keinen Effekt auf die Zellfunktion. Liegen diese jedoch in regulatorischen Einheiten oder codierenden Regionen von Genen, können sie die Expression oder die Struktur eines Proteins beeinflussen, im Einzelfall mit der Folge, dass sie für gewisse Krankheiten prädisponieren.

3.2.2.1 Auswahl der SNPs

Zuerst wurde auf den Internet-Seiten des „National Center for Biotechnology Information“ (NCBI; http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/), der Universität von Kalifornien, Santa Cruz (UCSC Genome Browser; http://genome.ucsc.edu) und bei Ensembl (http://www.ensembl.org) nach allen vorhandenen SNPs von Reelin recherchiert. Aus dieser Vielzahl wurde nach bestimmten Kriterien selektiert: Die SNPs sollten in etwa gleichen physikalischen und genetischen Abständen über das Gen verteilt sein sowie besonders innerhalb von Exons, regulatorischen Einheiten oder Splicing-Abschnitten liegen. Das Auftreten der Alternativbasen sollte innerhalb der Population etwa zwischen 30 und 70% liegen. Auch die Validierung der SNPs sollte durch vorangegangene etablierte Methoden bestätigt sein. Für jeden SNP wurde anschließend über den Genome Browser der Universität von Kalifornien, Santa Cruz die entsprechende genomische Sequenz ermittelt, um mittels BLAST-Algorithmus von NCBI beide Sequenzen zu vergleichen und auf Vollständigkeit zu überprüfen.
Die folgende vierte Tabelle zeigt alle untersuchten SNPs des Reelingens mit der entsprechenden Chromsomenposition, Lokalisation innerhalb des Gens und dem Heterozygotenindex in der europäischen bzw. kaukasischen Population sowie Validierung und Allelvarianten:

Tabelle 4: Zusammenfassung der SNPs

SNP	Chromosomen position	Intron/Exon ggf. synonym/ nicht synonym	Gesamt-Population	Validierung	Allele evolutionär älteres Allel
rs2965087	102899221	3'UTR	CEU HAP: G = 0,317 A = 0,683	1, 2, 3 ,4 , 5	A/G G
rs1062831	102911443	Exon 62 synonym	European: G = 0,071 A = 0,929	1, 2, 3	A/G nicht ermittelbar
rs736707	102917639	Intron 59	HapMap CEU: T = 0,767 C = 0,233	1, 2, 4, 5	C/T C
rs2229864	102942941	Exon 50 synonym	HapMap CEU: T = 0,704 C = 0,296	1, 2, 3, 4, 5	C/T C
rs362746	102966831	Exon 45 synonym	HapMap CEU: G = 0,025 A = 0,975	1, 2, 5	A/G A
rs362726	102994470	Intron 31	HapMap CEU: T = 0,633 C = 0,367	1, 2, 4, 5	C/T C
rs362642	103037107	Intron 22	HapMap CEU: T = 0,450 C = 0,550	1, 2, 3, 4, 5	C/T T
rs362691	103038397	Exon 22 nicht synonym Val-Leu	HapMap CEU: G = 0,867 C = 0,133	1 ,2, 4, 5	C/G G
rs2072402	103079157	Intron 15	HapMap CEU: C = 0,947 A = 0,053	1, 2, 4, 5	A/C A
rs17286505	103113482	Intron 10	HapMap CEU: C = 0,430 G = 0,570	2, 5	C/G C
rs264373	103252106	Intron 3	Caucasian CEPH: G = 0,462 C = 0,538	1, 2, 3, 4	C/G G

Validierungen: 1 = bestätigt durch multiple, unabhängige Einsendungen zum refSNP cluster; 2 = bestätigt mit Frequenz oder Genotypendaten: das seltenere Allel wurde in mind. zwei Chromosomen beobachtet, 3 = validiert durch Bestätigung des Einsenders, 4 = alle Allele wurden in mind. zwei Chromosomen beobachtet, 5 = genotypisiert durch das HapMap Projekt.

3.2.2.2 Auswahl der Primer und Restriktionsenzyme

Primer sind artifiziell hergestellte kurze Nukleotid-Sequenzen, die sich komplementär an Einzelstränge der DNA anlagern, und damit die Doppelstrangbindungsstelle der *Taq*-Polymerase bilden.

Die Primersequenzen für die genomischen Areale der o.a. SNPs wurden nach folgenden Kriterien ausgewählt: PCR-Produkt ca. 400-500 bp, Primer ca. 18-22 bp, Anfang und Ende mit C bzw. G, 60% Anteil von C und G, keine Tripletts sowie ein Punktwert für die errechnete Annealingtemperatur von 56-60 Grad (C, G = 4; A, T = 2) (101). Bis zur weiteren Verarbeitung lagerten die Primer im Gefrierschrank bei -20°C.

3.2.2.3 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Polymerasekettenreaktion (Polymerase Chain Reaction, kurz: PCR) dient der Vervielfältigung der DNA (102). Sie beruht auf einem wiederkehrenden Zyklus aus drei Schritten:

Im ersten Zyklus wird die DNA bei 94°C für fünf Minuten und bei allen folgenden Zyklen für eine Minute in zwei Einzelstränge gespalten (Denaturierung). Dann folgt die Anlagerung der spezifischen Primer bei ca. 50-70°C für eine Minute (Annealing). Bei 72 °C erfolgt anschließend die Neusynthese der DNA-Fragmente für eine Minute anhand der vorgegeben einsträngigen DNA-Matrizen und den einzeln vorliegenden dNTP mittels der *Taq* Polymerase (Extension). Durch diese Wiederholungen verdoppelt sich bei jedem Zyklus die Anzahl kopierter DNA-Moleküle. So wächst der Anteil der DNA exponentiell. Nach ca. 25-35 Zyklen entstehen auf diese Weise aus einem einzigen DNA-Doppelstrang mehrere Millionen Moleküle (103). Im Vorfeld der Analyse wurden die optimalen Bedingungen der einzelnen PCRs mittels Gradientencycler ermittelt, welcher ebenfalls nach dem Prinzip der Polymerasekettenreaktion arbeitet und innerhalb eines Versuchs verschiedene Annealingtemperaturen einschließt.

Die folgende Tabelle beinhaltet für jeden SNP die Primersequenzen, die optimale Annealingtemperatur, die Menge an $MgCl_2$ sowie die Restriktionsenzyme.

Tabelle 5: Zusammenfassung der PCR-Bedingungen für die SNPs

SNP	Forward Primer 5´→3´	Reverse Primer 5´→3´	Annealing Temperatur in °C	$MgCl_2$ (50mM) in µl	Enzym
rs2965087	gagacaagcgttagcagctag	ctgctaattactctgtaattccac	56	0,8	*Nhe1*
rs1062831	gtggcattggtgcattaac	ctgttatgccagctactag	60	0,9	*Bts1*
rs736707	cagatggcaccggtcgtg	Gctgcgcttctcatccag	64	0,8	*Fok1*
rs2229864	ctacaccactggaacatctg	gcctggatcagaacgactg	57	0,8	*BssS1*
rs362746	ctatctggagacggcatac	cagtgccagttctgagcag	65	0,9	*BsaH1*
rs362726	gttaaaagacataaatccagttc	gatgagccttcaggtccac	59	1,2	*Sty1*
rs362642	gcatacatttgacatatg	gtcagttggaatacaatgcttg	54	0,8	*Hin 6I*
rs362691	caccaagttttctggggaagat	caggaatgccttccaagtatg	56	0,8	*BstY1*
rs2072402	gaatgaatggccttacaaatgtc	gggtgagtacattctctgag	56	1,2	*Mfe1*
rs17286505	cttctaagtactagtaggttaccg	caagtacagaggtgaagtc	58	0,9	*Sml1*
rs264373	cacttggagttctgcacag	gactgaactggcatagcag	62	0,6	*BsmA1*

Die folgende Rechnung zeigt einen Beispiel-Ansatz einer Reaktionslösung für eine Probe. Je nach Konzentration von $MgCl_2$ variierte das Volumen von Aqua dest, um auf ein konstantes Gesamtvolumen von 19µl für jede Probe zu gelangen.

Aqua dest.	14 µl
Puffer (10x PCR Puffer)	2,0 µl
dNTPs (2mM)	1,0 µl
$MgCl_2$ (50 mM)	0,8 µl
Primer F (5 µmol/ml)	0,5 µl
Primer R (5 µmol/ml)	0,5 µl
Taq Polymerase (5U/µl)	0,2 µl
Gesamtvolumen für eine Probe	**19 µl**

Dieser Reaktionsmix wurde für jede DNA Probe auf einer PCR-Mikrotiterplatte vorgelegt und 1µl DNA hinzugefügt. Im PCR-Thermocycler durchlief jede Probe dann 35 Zyklen.

3.2.2.4 Agarosegel-Elektrophorese

Für die Vorbereitung einer Agarosegel-Elektrophorese wurde zuerst eine Gelplatte mit Probentaschen hergestellt. Das 2%-ige Agarosegel bestand aus 4 g SERVA Agarose und 200 ml TBE-Puffer, welches zuerst mittels Magnetrührer vermischt und in der Mikrowelle erhitzt wurde. Danach wurde es auf einem Gelträger ausgegossen und mit Gelkämmen zur Taschen-Platzierung versehen.

Für die Durchführung einer Elektrophorese wurden 10 µl der PCR-Produkte mit 10 µl des Ladepuffers (0,25% Bromphenolblau; 15% Ficoll in 100 ml 10x TBE) auf eine Mikrotiterplatte aufgetragen und danach für 1 min zentrifugiert. Anschließend wurde jede Probe (10 µl) in eine Geltasche auf dem Agarosegel aufgetragen. Bei jedem Lauf wurde neben den Proben 3 µl einer 50 bp DNA-Leiter als Größenstandard aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte in einer mit 1xTBE gefüllten Gelkammer (Maxilarge von Roth) bei 120 V, 170 mA für 30-60 min. Aufgrund ihrer negativen Ladung wandern die DNA-Fragmente innerhalb dieses elektrischen Feldes abhängig von ihrer Größe unterschiedlich schnell durch die netzähnlichen Polysaccharidstrukturen des Agarosegels zu der positiven Elektrode.

Anschließend wurde das Agarosegel in ein Färbebad (5 µl SYBR-Gold + 600 ml 1xTBE) für 60 Minuten gelegt. So färbten sich die DNA-Banden an und wurden mit einem Gelbetrachtungssystem unter UV-Licht (260 nm) abfotografiert (104).

3.2.2.5 Restriktionslängenpolymorphismus (RFLP)

Restriktionsenzyme erkennen und schneiden DNA an spezifischen Schnittstellen (bestimmte Erkennungssequenzen). Diese Fähigkeit ist die Grundlage bei der Identifizierung der Polymorphismen. Durch Kenntnis der exakten enzymatischen Schnittstellen einerseits und Beobachtung der Fragmentlängen nach Restriktion andererseits sind Rückschlüsse auf die genaue Basensequenz des Polymorphismus möglich und die jeweiligen Allelkombinationen können bestimmt werden.

Menschliche Körperzellen besitzen einen diploiden Chromosomensatz. Folglich liegen im Zellkern jeweils zwei Allele jedes Gens vor. Somit ergeben sich drei Möglichkeiten für die Kombination der DNA-Fragmente, die durch Restriktion entstehen können. Wenn beide Allele den gleichen Polymorphismus tragen, welcher von den Enzymen nicht erkannt wird, so ist der Proband homozygot 1. Schneidet das Enzym nur ein Allel und das andere nicht, liegt

Heterozygotie vor. Stimmen beide DNA-Fragmente mit den erwarteten enzymatisch erzeugten Fragmenten überein, so ist der Proband homozygot 2 (105).

Für die Durchführung der Untersuchung wurde ein Restriktionsmix aus 7 µl Wasser, 2 µl NEB-Puffer und 1 µl Enzym für jede Probe angesetzt. Zusammen mit 10 µl des PCR Produktes wurde das Gemisch bei 55°C bis 60°C je nach Optimum des Enzyms für 16 h im Thermocenter inkubiert. Für die spezifischen Enzyme jedes SNPs siehe Tabelle fünf. Die entstandenen DNA-Fragmente wurden mittels Agarosegel-Elektrophorese ihrer Größe nach aufgetrennt und für die Auswertung fotographisch dokumentiert.

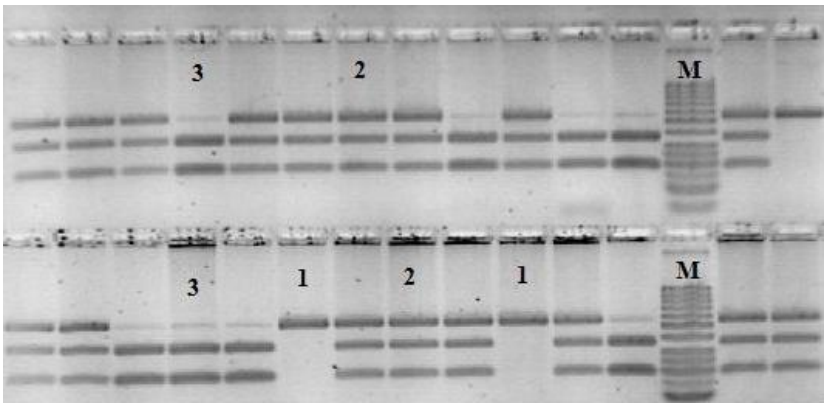

Abbildung 8: Beispiel einer Gelplatte mit elektrophoretisch getrennten DNA-Proben aus Humanblut. 1 = homozygot 1; 2 = heterozygot; 3 = homozygot 2, M = Marker/ Längenstandard

3.2.3 Mikrosatellitenanalyse

Mikrosatelliten sind kurze, nicht notwendigerweise codierende DNA-Sequenzen, bestehend aus zwei bis sechs Basenpaarfolgen und einer Wiederholungsfrequenz von 50-80 Kopien (106). Diese Regionen sind hochpolymorph, d.h. in der Regel existiert eine große Anzahl verschieden langer Wiederholungen innerhalb einer Population (107). Somit haben diese Marker neben den SNPs eine große Bedeutung für die genomische Variabilität der Menschheit. Am häufigsten sind die Dinukleotid-Wiederholungen vom Typ (CA)n. Mikrosatelliten kommen durchschnittlich alle vier Kilobasen vor und machen somit etwa 0,5% des Genoms aus (108). Da diese Längenpolymorphismen nach den Mendel'schen Regeln vererbt werden, sind Mikrosatelliten daher als genetische Marker geeignet und konnten bereits bei der Lokalisation von Krankheitsgenen eine Rolle spielen, wie zum Beispiel bei Morbus Huntington (109). Das besondere hierbei ist ein einzelner Mikrosatellit (CAG Repeat), der die Krankheit verursacht.

3.2.3.1 Auswahl der Mikrosatelliten

Bei der Recherche wurde auf den Internetseiten von Ensembl und der Universität von Kalifornien, Santa Cruz (UCSC) nach bekannten Mikrosatelliten auf dem Reelin-Gen gesucht. Bei Ensembl wurden drei Mikrosatelliten innerhalb des Reelin-Gens und zwei Marker in der näheren Genumgebung gefunden. Bei UCSC waren 13 (Di- und Trinukleotid-Wiederholungen) innerhalb und drei in direkter Nachbarschaft des Gens dargestellt. Hierfür gab es keine weiteren Literatur- oder Häufigkeitsangaben. Mittels des BLAST-Algorithmus von NCBI wurden die 300 benachbarten Basen der einzelnen Mikrosatelliten im Genom dargestellt und durchnummeriert. So entstanden die Namen dieser Marker für das weitere Vorgehen.

Es ergaben sich nur bei drei Markern übereinstimmende Ergebnisse beider Quellen. Diese wurden direkt zur Analyse ausgewählt. Aus den zehn restlich aufgelisteten Wiederholungen des UCSC Genome-Browsers wurden sieben weitere ausgesucht. Da nahe zusammen liegende Mikrosatelliten im Rahmen von Kopplung mit höherer Wahrscheinlichkeit gemeinsam vererbt werden, wurde darauf geachtet, dass die ausgewählten Mikrosatelliten einen ausreichenden Abstand zu benachbarten Mikrosatelliten aufweisen.

Von den insgesamt 15 gefundenen Markern wurden zwölf zur experimentellen Sequenzanalyse ausgewählt. Erst im weiteren Verlauf stellten sich zwei Mikrosatelliten als nicht labortechnisch analysierbar heraus, da auch unter verschiedenen Bedingungen keine PCR-Amplifizierung gelang. Die Mikrosatelliten MS2 und MS3 wurden aufgrund ihrer direkten Nachbarschaft ausgeschlossen. Die folgende Tabelle fasst die untersuchten Mikrosatelliten in 3'→5' Richtung zusammen.

Tabelle 6: Zusammenfassung der Mikrosatelliten

Mikrosatellit/ ggf. ID bei NCBI	Chromosomenposition	Lage im Reelingen	Basensequenz
MS 1 D7S2509	102774502	ca. 125 kb entfernt von 3'UTR	$(CA)_n$
MS 5	103205567	Intronbereich	$(CA)_n$
MS 7 D7S504	103252311	Intronbereich	$(GT)_n$
MS 9 D7S796	103358352	Intronbereich	$(TATC)_n$

Mikrosatellit/ ggf. ID bei NCBI	Chromosomenposition	Lage im Reelingen	Basensequenz
MS 10	103358552	Intronbereich	$(TG)_n$
MS 11	103390330	Intronbereich	$(TG)_n$
MS 14 D7S3120	103416992	5'UTR-Region	$(GCC)_n$
MS 15	103465432	ca. 48 kb entfernt von 5'UTR	$(AC)_n$

3.2.3.2 Auswahl der Mikrosatelliten-Primer

Die Primer wurden so gewählt, dass sie auf der DNA die Sequenz der Mikrosatelliten eingrenzten. Sie wurden nach folgenden Regeln entwickelt:

Die Länge sollte zwischen 20-24 Basen liegen und ein Gesamtprodukt von ca. 200-400 bp DNA eingrenzen. Nach dem Prinzip G; C= 4°C, und A; T= 2°C sollte die errechnete Annealingtemperatur bei ca.55-65°C liegen und das Verhältnis von GC/AT ausgeglichen sein. Diese selbst ausgewählten Primer wurden anschließend mit dem Programm Primer Express auf Interaktionen zwischen den Primern, Bildung von Sekundärstrukturen und Spezifität im Genom untersucht.

Die Reverse-5'-Primer wurden mit den Floureszenzfarbstoffen Atto 565 oder 6-FAM Phosphoramidit markiert. Die in Wasser gelösten 5´und 3´-Primer lagerten bis zur weiteren Verarbeitung lichtgeschützt bei -20°C. Die folgende Tabelle zeigt die Primersequenzen und Markierungen der verschiedenen Mikrosatelliten.

Tabelle 7: Überblick über Mikrosatelliten-Primer

Mikrosatellit	Primer F 5' ´→ 3'	Primer R 5' ´→ 3' Fluoreszenzmarkierung
MS 1	Gtccataagcagcattagtcatg	cacctctaggtacttcatatttg Atto 565
MS 5	Ggtgatatcacttcaagctaac	gaagtatgtgaactcagacactc 6-Fam
MS 7	Ccagtcaggcttcaatcagtgg	ctggcatcatggaagactgaac 6-Fam

Mikrosatellit	Primer F 5' ´→ 3'	Primer R 5' ´→ 3' Fluoreszenzmarkierung
MS 10	gattataggcatgagccaccg	ctgtaacttgttataatgaggag 6-Fam
MS 11	cactgaggcacctcaccagtag	ggtaccatgtccttagacagtg 6-Fam
MS 14	ctgcggtacctaccatggtattcttg	cgtctcccgcggaacttctcgg 6-Fam
MS 15	gtagttcccactgcttgagaag	gattgcacatatccatgagatac 6-Fam

3.2.3.3 Mikrosatelliten PCR

Durch zyklische Denaturierung (bei 94°C für fünf Minuten im ersten und eine Minute in den weiteren Zyklen), Anlagerung (zw. 60°C und 72°C für eine Minute) und Extension (72°C für eine Minute) wurden die markierten DNA-Fragmente in 25-40 Zyklen vervielfältigt. Um die optimalen Bedingungen für die $MgCl_2$- und Primerkonzentrationen zu bestimmen, wurde im Vorfeld ebenfalls für jedes Primerpaar eine Gradienten-PCR durchgeführt. Die Amplifikate wurden teilweise verdünnt, um in der Genotypisierung eine Peakhöhe zu erreichen, die eine eindeutige Auswertung ermöglichte. Die folgende Tabelle beschreibt für jeden Mikrosatellit die Versuchsbedingungen:

Tabelle 8: Zusammenfassung der Reaktionsbedingungen für die Mikrosatellitenanalyse

Mikrosatellit	Annealing Temperatur in °C	$MgCl_2$ (50mM) in µl	Primer Volumen	Anzahl der Zyklen	Verdünnung Amplifikat/ DNA	Zusatz
MS 1	58	0,6	0,25	35	**Amplifikat** 1:10	-
MS 5	58	0,6	0,25	35	**Amplifikat** 1:50	-
MS 7	58	0,6	0,4	35	**Amplifikat** 1:50	-
MS 9	68	0,6	0,4	35	**Amplifikat** 1:20	-
MS 10	68	1,2	0,5	35	**DNA** 1:10	-
MS 11	60	0,5	0,4	25	**Amplifikat** 1:10	-
MS 14	72	1	0,5	40	-	DMSO 5%
MS 15	60	0,6	0,4	25	**Amplifikat** 1:50	-

Um den Prozess zu beschleunigen, wurde eine Multiplex-PCR gleichzeitig für mehrere Mikrosatelliten durchgeführt. Die folgende Tabelle zeigt Bedingungen und Zusammensetzungen der Multiplex-PCRs. Die Annealingtemperaturen wurden aus den Einzelversuchen übernommen. Die folgende Tabelle zeigt die veränderten Reaktionslösungen für einen Ansatz mit 1 µl DNA und einem Gesamtvolumen des Reaktionsansatzes von 20 µl.

Tabelle 9: Zusammensetzung der einzelnen Multiplex-PCRs

MS	Aqua dest.	Puffer	dNTP`s	$MgCl_2$	Primer F pro MS	Primer R pro MS	*Taq*-Polymerase	Verdünnung des Amplifikates
1+5+7	12,9 µl	2 µl	2 µl	1,2 µl	0,25 µl	0,25 µl	0,4 µl	1:50
11+15	12,6 µl	2,0 µl	2,0 µl	1,0 µl	0,25 µl	0,25 µl	0,4 µl	-

3.2.3.4 Mikrosatellitenanalyse

Ziel dieser Analyse war es, die genaue Anzahl der Nukleotid-Wiederholungen zu erfassen. Die unbekannt großen Fragmente aus der PCR wurden mittels dem 310 Genetic Analyzer analysiert. Die floureszenzmarkierten Produkte wurden über einen Autosampler elektrokinetisch in eine mit Polymer gefüllte Kapillare injiziert. Das Polymer POP 6 diente dabei als Trennmedium zwischen den Fragmenten. Anschließend wurden die unterschiedlichen DNA-Bruchstücke ihrer Größe nach aufgetrennt und passierten ein Fenster, in dem die Farbstoffe durch einen Laser angeregt wurden. Mittels CCD-Kamera wurden die unterschiedlichen Wellenlängen aufgenommen und als elektrisches Signal gespeichert. Die signalintensivsten Peaks entsprachen dem gesuchten Gen-Stück (Allel) und seiner genauen Größe. Alle anderen Peaks, die diesen Allelsignalen vorangingen, folgten oder um die Hälfte kleiner waren, wurden als Artefakt-Signale (Stotterbanden, Schattenbanden) gewertet. Diese entstehen während der PCR. Dabei hinterlässt die *Taq* Polymerase bei einigen DNA-Fragment-Enden Adenylsäurereste, sogenannte „Plus A Artefakte“. Es entstehen unvollständige Amplifikate, so dass eine gewisse Variation in den Fragmentgrößen auftritt. Das passiert bei etwa 5–10% der DNA Kopien.
Abbildung 9 zeigt ein entsprechendes Elektropherogramm.

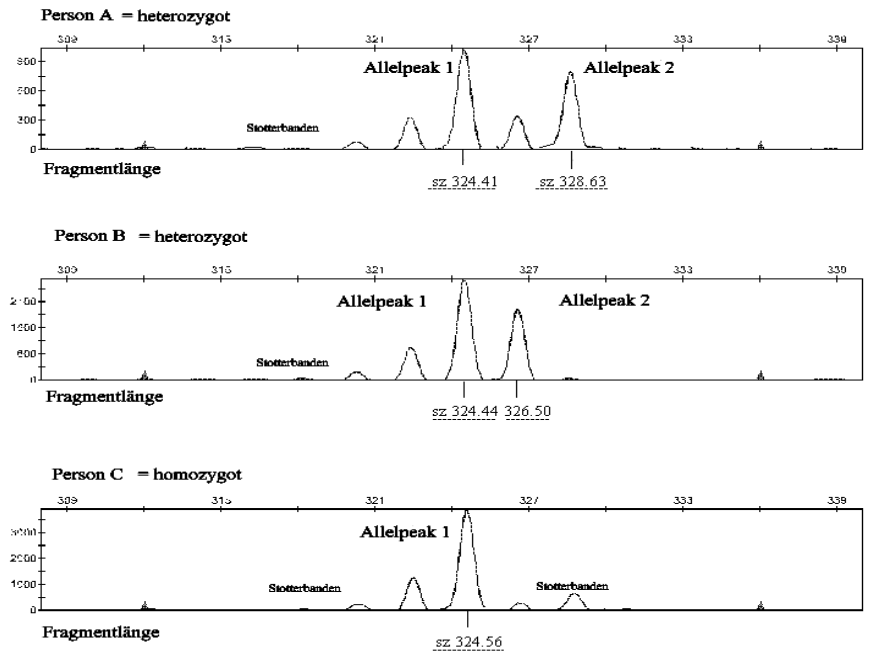

Abbildung 9: Beispiel für die Auftrennung eines Dinukleotid-Repeats aus Humanblut . Patient A = heterozygot, Patient B = heterozygot, Patient C = homozygot

Diese Methode wurde für die Untersuchung der o.g. Mikrosatelliten folgendermaßen angewandt: Zur Vorbereitung für die kapillarelektrophoretische Fragmentlängendetektion wurde ein Mix aus 12 µl Formamid und 0,2 µl DNA-Marker (500 LIZ Size Standard) als interner Längenstandard für jede PCR-Probe vorgelegt. Darauf wurde 1µl des PCR-Produktes (oder verdünnt) pipettiert. Dieser Mix wurde anschließend zur Denaturierung für 5 Minuten bei 95°C in den Thermocycler gestellt und danach im ABI Gene Prism 310 analysiert. Die gesammelten Daten wurden durch die Gene Mapper Software analysiert.

Aus den Fragmentgrößen konnte durch Subtraktion der bekannten Sequenz vor und nach dem Mikrosatelliten auf die unbekannte Wiederholungszahl der Di-, Tri-, und Tetranukleotiden geschlossen werden.

3.2.4 Statistische Auswertung

Zu Beginn wurden die Frequenzen der SNP-Varianten, der Dominanz-Varianten, der Haplotypen und der Mikrosatelliten für die Kontroll- und die Patientengruppe berechnet. Diese Verteilungshäufigkeiten stellen die Grundlage für die folgenden Berechnungen dar.

Berechnung der Haplotypen

Nach der Genotypen-Analyse der SNPs wurden durch das Internetprogramm HAP (http://research.calit2.net/hap) für jeden Probanden die wahrscheinlichsten Haplotypen für beide Chromosomen konstruiert. Bei heterozygoten Trägern eines SNP´s stellt sich die Frage, auf welchem der beiden homologen Chromosomen (mütterliches oder väterliches) die jeweilige Base liegt, wie also die Phase der genetischen Varianten ist. Die Ergebnisse werden als Blöcke aus mehreren Allelen dargestellt, welche mit hoher Wahrscheinlichkeit gemeinsam vererbt werden.

Genetik und Diagnose

Für die Auswertung der Zusammenhänge zwischen den genetischen Markern und der Diagnose wurde eine binär logistische Regressionsanalyse durchgeführt.

Binär bedeutet hierbei, dass die abhängige Variabel (Diagnose) ein dichotomes Ereignis ist (krank oder gesund). Durch die Logarithmierung können die Grenzen dieses dichotomen Ereignisses aufgehoben und die relativen Gewichtungen der unabhängigen Variablen x (Alter, Geschlecht, Genotypengruppe) errechnet werden.

Der Vorteil dieser Analyse gegenüber anderen Verfahren war die Berechnung der Odds Ratios für die einzelnen unabhängigen Variablen, z.B. der Genotypengruppen. Die Odds-Ratios geben an, um wie viel sich das relative Risiko der einzelnen Gruppe erhöht oder verringert.

Außerdem wurden die Irrtumswahrscheinlichkeiten (p-Werte) berechnet, mit denen man bei $p < 0{,}05$ annehmen konnte, dass sich z.B. die Genotypengruppen hinsichtlich ihrer Aussagekraft in Bezug auf die Diagnosestellung signifikant unterschieden und es sich nicht um einen zufälligen Befund handelte.

Genetik und Volumina

Das Allgemeine lineare Modell für Volumenberechnungen

Für die Auswertung der Zusammenhänge zwischen Volumina und verschiedenen Ausprägungen der SNPs wurde das lineare Modell ausgewählt. Dieses Modell versucht, eine abhängige Variable y (Volumen) mit einer linearen Kombination aus verschiedenen unabhängigen Variablen und deren Gewichtung zu erklären.

$$yi = \beta_0 + \beta_1 \bullet x_{i1} + \beta_2 \bullet x_{i2} + \beta_3 \bullet x_{i3} + \ldots + \varepsilon i$$

Formel 1: Linearkombination des Allgemeinen linearen Modells

yi: abhängige Variable eines Individuums = Volumen eines Gehirnareals eines Probanden

β_0: Regressionskonstante

$\beta_{1/2/3}$: Regressionskoeffizienten, Wichtungsfaktoren der unabhängigen Variablen

x_1: erste unabhängige Variabel (Alter)

x_2: zweite unabhängige Variabel (Geschlecht)

x_3 dritte unabhängige Variabel (Genotypengruppe)

εi : Residuen

In SPSS wurde mit Hilfe dieses Modells folgende Frage geklärt:

Um wie viel Volumen veränderte sich der Mittelwert eines Gehirnareals bei einer Genotypengruppe im Vergleich zu den anderen Gruppen?

Wie groß war die Irrtumswahrscheinlichkeit, wenn die untersuchten Genotypengruppen einen signifikanten Unterschied hinsichtlich der Mittelwerte der Volumina aufzeigten?

4 Ergebnisse

4.1 Demographische Daten

4.1.1 Verteilung von Alter und Geschlecht

Die Kontrollgruppe bestand aus 74 Personen und war im Mittel 37 Jahre alt mit einer Standardabweichung von 12,5 Jahren. Die Altersspannweite lag zwischen 22 und 59 Jahren. Die Geschlechterverteilung wird in folgender Tabelle beschrieben:

Tabelle 10: Geschlechtsverteilung der Kontrollgruppe

Geschlecht	Anzahl n	Prozent
männlich	61	82,4
weiblich	13	17,6
total	74	100,0

Die Patientengruppe von 74 Personen war im Mittel 33 Jahre alt mit einer Standardabweichung von 11,4 Jahren. Die Altersspannweite lag zwischen 19 und 65 Jahren. Die Geschlechterverteilung ist in folgender Tabelle zusammengefasst beschrieben:

Tabelle 11: Geschlechtsverteilung der Patientengruppe

Geschlecht	Anzahl n	Prozent %
männlich	53	71,6
weiblich	21	28,4
total	74	100,0

4.1.2 Volumina-Verteilung in den Experimentalgruppen

Die Volumeneinheiten einzelner Regionen und Gyri wurden mittels MRT gemessen und mit Hilfe von SPM ausgewertet. Dabei wurden jeweils die linke und die rechte Seite einzeln berechnet.

Tabelle 12: Mittelwerte der Volumina, gesamt und getrennt nach Diagnose

	Mittelwerte der Volumina in mm^3					
	Gesamt		**Kontrollen**		**Patienten**	
Regionen	**Links**	**Rechts**	**Links**	**Rechts**	**Links**	**Rechts**
			Areale			
Amygdala	1462,69	1332,25	1473,67	1.336,17	1450,36	1327,86
Insula	9493,28	9663,17	9.589,91	9.751,69	9384,79	9563,76
Thalamus	2214,95	1940,30	2.177,29	1.912,92	2.257,21	1.971,05
			Gyri			
Gyrus frontalis medius	15.805,48	17.621,52	15.767,99	17.6373,42	15.847,57	17.6037,60
Gyrus frontalis medius et inferior orbitalis	10.557,40	10.159,97	10.620,51	10.280,93	10.486,53	10.024,14
Gyrus temporalis superior	9.748,55	11.888,14	9.761,98	11.838,42	9733,45	11.943,97
Gyrus parahippocampalis	5.027,42	6.063,28	5.024,01	6.076,51	5031,23	6048,41

4.1.3 Einflussfaktoren auf das Volumen

Diagnose

Im Allgemeinen linearen Modell (multivariate Varianzanalyse) konnte ermittelt werden, inwieweit die Mittelwerte der Volumina in den einzelnen Regionen signifikante Unterschiede zwischen den Patienten und Kontrollen aufwiesen. Dabei zeigten die Areale und Gyri in Tabelle 13 einen signifikanten Unterschied in Bezug auf die Diagnose.

Tabelle 13: Gehirnareale mit signifikanten Unterschieden zwischen Kontrollen und Patienten

Region		Volumenveränderung in mm^3	p-Wert
Insula	links	- 493,76	**0,008**
	rechts	- 513,13	**0,008**
Gyrus frontalis medius et inferior orbitalis	links	- 446,19	**0,044**
	rechts	- 582,15	**0,012**

Alter

In Bezug auf das gerundete Durchschnittsalter der Experimentalgruppe von 36 Jahren verloren Patienten und Gesunde mit jedem zusätzlichen Jahr eine bestimmte Menge an Volumen, die abhängig von dem jeweiligen Gehirnareal war.

Geschlecht:

Das Geschlecht beeinflusste das Volumen der einzelnen Regionen ($p < 0,002$). Außer im Thalamus zeigten alle Regionen größere Volumina bei den männlichen Probanden.

Im weiteren Verlauf der Berechnungen wurden diese drei Parameter als feste Faktoren bzw. Kovariaten in alle statistischen Auswertungen einbezogen.

4.2 Single Nukleotid Polymorphismen (SNPs)

4.2.1 Allelverteilung in Population und im Experiment

Für das Auftreten der SNPs in der Population und im Experimentalkollektiv (Heterozygotenindex) stellt die nächste Tabelle einen Überblick dar. Die Literaturwerte wurden aus NCBI für eine kaukasische Population bzw. aus dem „HAP MAP CEU“ Sample ausgewählt.

Tabelle 14: SNP Verteilung in Population und im Experiment

SNP	Literaturangaben für die Gesamtpopulation		Heterozygotenindex im Experiment
rs2965087	HAP MAP CEU :	G = 0,317 A = 0,683	G = 0,293 A = 0,706
rs1062831	Europäisch:	G = 0,071 A = 0,929	G = 0,126 A = 0,874
rs736707	HAP MAP CEU:	T = 0,767 C = 0,233	T = 0,695 C = 0,305
rs2229864	HAP MAP CEU:	T = 0,704 C = 0,296	T = 0,500 C = 0,500
rs362746	HAP MAP CEU:	G = 0,025 A = 0,975	G = 0,047 A = 0,953
rs362726	HAP MAP CEU:	T = 0,633 C = 0,367	T = 0,575 C = 0,425
rs362642	HAP MAP CEU:	T = 0,450 C = 0,550	T = 0,445 C = 0,555
rs362691	HAP MAP CEU:	G = 0,867 C = 0,133	G = 0,986 C = 0,014
rs2072402	HAP MAP CEU:	C = 0,947 A = 0,053	C = 0,959 A = 0,041
rs17286505	HAP MAP CEU:	C = 0,430 G = 0,570	C = 0,476 G = 0,524
rs264373	Europäisch CEPH:	G = 0,462 C = 0,538	G = 0,492 C = 0,508

4.2.2 SNP-Ausprägungen getrennt nach Diagnose

Die folgende Tabelle zeigt die prozentualen Verteilungen der Polymorphismus-Varianten in den einzelnen Gruppen.

Tabelle 15: SNP Ausprägungen im Gesamtkollektiv und getrennt nach Diagnose

	Genotypenverteilung in %		
SNP	**Gesamtkollektiv**	**Kontrollen**	**Patienten**
rs2965087	aa = 53,4 ga = 25,0 gg = 14,9	Aa =52,7 ga = 28,4 gg = 12,2	aa = 54,1 ga = 21,6 gg = 17,6
rs1062831	gg = 1,4 ga = 22,3 aa = 75,7	Gg = 1,4 ga = 27,0 aa = 71,6	gg = 1,4 ga = 17,6 aa = 79,7
rs736707	cc = 9,5 tc = 41,2 tt = 48,0	Cc = 12,2 tc = 40,5 tt = 45,9	cc = 6,8 tc = 41,9 tt = 50,0
rs2229864	tt = 21,6 ct = 54,7 cc = 21,6	tt = 21,6 ct = 55,4 cc = 20,3	tt = 21,6 ct = 54,1 cc = 23,0
rs362746	aa = 90,5 ag = 9,5 gg = 0,0	Aa = 86,5 ag = 13,5 gg = 0,0	aa = 94,6 ag = 5,4 gg = 0,0
rs362726	tt = 32,4 tc = 48,6 cc = 17,6	tt = 29,7 tc = 50,0 cc = 20,3	tt = 35,1 tc = 47,3 cc = 14,9
rs362642	tt = 20,9 tc = 44,6 cc = 31,8	tt = 23,0 tc = 47,3 cc = 28,4	tt = 18,9 tc = 41,9 cc = 35,1
rs362691	gg = 98,6 gc = 0,0 cc = 1,4	Gg = 97,3 gc = 0,0 cc = 2,7	gg=100,0 gc = 0,0 cc = 0,0
rs2072402	cc = 91,9 ca = 8,1 aa = 0,0	Cc = 90,5 ca = 9,5 aa = 0,0	cc = 93,2 ca = 6,8 aa = 0,0
rs17286505	cc = 23,0 cg = 48,6 gg = 27,7	Cc = 14,9 cg = 50,0 gg = 33,8	cc = 31,1 cg = 47,3 gg = 21,6
rs264373	gg = 26,4 gc = 41,9 cc = 27,7	Gg = 18,9 gc = 52,7 cc = 25,7	gg = 33,8 gc = 31,1 cc = 29,7

Um zu überprüfen, ob sich die Genotypen-Gruppen in Bezug auf die Diagnose unterschieden, wurde eine Regressionsanalyse durchgeführt, welches folgende Ergebnisse erbrachte:

Tabelle 16: Signifikanzwerte und relatives Risiko von rs17286505 und rs264373

SNP		p-Wert	Odds Ratio
rs17286505	**cc vs. cg**	0,071	0,446
	cc vs. gg	**0,021**	**3,146**
	cg vs. gg	0,403	1,405
rs264373	**gg vs. cg**	**0,011**	**0,332**
	cc vs. gg	0,358	1,540
	cc vs. cg	0,111	0,512

In Tabelle 16 kann man erkennen, dass rs17286505 und rs264373 einen Einfluss auf die Diagnose hatten. Alle anderen SNP-Varianten wiesen keine signifikanten Unterschiede in Bezug auf die Diagnose auf und sind deshalb hier nicht dargestellt.

rs17286505:

Personen, die cc trugen, hatten ein 3,1 fach erhöhtes relatives Risiko, an Schizophrenie zu erkranken. Der homozygote cc-Genotyp zeigte den stärksten Effekt auf die Erkrankung. Gruppen mit cc und gg unterschieden sich hinsichtlich ihrer Vorhersagekraft zur Diagnose (outcome) signifikant.

rs264373:

Wenn der heterozygote gc-Genotyp bei Personen vorlag, so sank das relative Risiko, an Schizophrenie zu erkranken um das 0,3 fache. Die Gruppen mit gc und gg unterschieden sich hinsichtlich der Diagnose signifikant.

4.2.3 SNPs und Volumina

Zum leichteren Verständnis werden im Folgenden nur die signifikanten SNPs aufgezählt, die einen Einfluss auf das Volumen erzielten. Bei den Berechnungen sind die Diagnose, das Geschlecht und das Alter als Kovariaten einbezogen worden. Diese werden im Weiteren nicht mehr einzeln erwähnt.

SNP rs2965087

Die folgende Tabelle fasst die Berechnungen der Genotypen, der Volumenänderung und der Irrtumswahrscheinlichkeit p zusammen.

Tabelle 17: Signifikante Volumenveränderungen durch rs2965087

Region		Genotypen	Volumenveränderung in mm^3	p-Wert
Insula	links	**aa vs. gg**	+789,96	**0,021**
	rechts	**aa vs. gg**	+754,46	**0,046**
Thalamus	rechts	**aa vs. gg**	+222,70	**0,025**
		ag vs. gg	+284,58	**0,006**
Gyrus frontalis medius et inferior orbitalis	links	**aa vs. gg**	+1109,34	**0,015**
		ag vs. gg	+981,93	**0,026**
	rechts	**aa vs. gg**	+1022,01	**0,022**
		ag vs. gg	+953,59	**0,028**
Gyrus temporalis superior	links	**aa vs. gg**	+819,34	**0,039**

rs1062831

Die folgende Tabelle beschreibt die Berechnungen der Genotypen, der Volumenänderung und der Irrtumswahrscheinlichkeit p.

Tabelle 18: Signifikante Volumenveränderungen durch rs1062831

Region		Genotypen	Volumenveränderung in mm^3	p-Wert
Insula	links	**gg vs. ga**	+1857,03	**0,011**
	rechts	**gg vs. ga**	+1871,03	**0,021**
		aa vs. ga	+658,57	**0,034**
Gyrus frontalis medius et inferior orbitales	links	**gg vs. ga**	+1992,42	**0,041**
	rechts	**gg vs. ga**	+2236,06	**0,020**
Gyrus temporalis superior	links	**gg vs. ga**	+1716,56	**0,044**

rs736707

Die folgende Tabelle fasst die Berechnungen der Genotypen, der Volumenänderung und der Irrtumswahrscheinlichkeit p zusammen.

Tabelle 19: Signifikante Volumenveränderungen durch rs736707

Region		Genotypen	Volumenveränderung in mm^3	p-Wert
Insula	links	**cc vs. ct**	+1015,47	**0,008**
		cc vs. tt	+863,49	**0,043**
	rechts	**cc vs. ct**	+919,80	**0,028**
Thalamus	rechts	**cc vs. tt**	+249,42	**0,037**
Gyrus frontalis medius	rechts	**cc vs. ct**	+2022,67	**0,034**
Gyrus frontalis medius et inferior orbitalis	links	**cc vs. ct**	+1125,78	**0,026**
	rechts	**cc vs. ct**	+1069,58	**0,031**
Gyrus temporalis superior	links	**cc vs. tt**	+1182,21	**0,018**
		cc vs. ct	+1339,84	**0,003**

rs2229864

Die folgende Tabelle fasst die Berechnungen der Genotypen, der Volumenänderung und der Irrtumswahrscheinlichkeit p zusammen.

Tabelle 20: Signifikante Volumenveränderungen durch rs2229864

Region		Genotypen	Volumenveränderung in mm^3	p-Wert
Gyrus temporalis superior	rechts	**ct vs. tt**	+863,50	**0,025**

rs17286505

Die folgende Tabelle fasst die Berechnungen der Genotypen, der Volumenänderung und der Irrtumswahrscheinlichkeit p zusammen.

Tabelle 21: Signifikante Volumenveränderungen durch rs17286505

Region		Genotypen	Volumenveränderung in mm^3	p-Wert
Gyrus frontalis medius	**links**	**cg vs. gg**	+1032,60	**0,012**
	rechts	**cg vs. gg**	+997,10	**0,025**
Gyrus frontalis medius et inferior orbitales	**links**	**cg vs. gg**	+505,56	**0,036**
Gyrus temporalis superior	**links**	**cg vs. gg**	+485,90	**0,032**

Zusätzliche Berechnungen:

Aufgrund der errechneten Signifikanz zwischen Diagnose und rs17286505 wurden weiterführend die Experimentalgruppen getrennt und hinsichtlich einer Assoziation mit den Volumetriedaten untersucht. Hierbei zeigte sich für das Patientenkollektiv in keinem Gehirnareal eine Assoziation mit einer Polymorphismusvariante. In der Kontrollgruppe zeigte sich ein Einfluss dieses SNPs auf einzelne Gehirnareale. Die folgende Tabelle beschreibt die signifikant beeinflussten Gehirnareale durch rs17286505 in der Kontrollgruppe.

Tabelle 22: Signifikante Volumenveränderungen bei den Kontrollen durch rs17286505

Region		Genotypen	Volumenveränderung in mm^3	p-Wert
Amygdala	rechts	**cg vs. gg**	+61,28	**0,048**
Insula	links	**cg vs. gg**	+548,87	**0,031**
	rechts	**cg vs. gg**	+551,40	**0,039**
Thalamus	links	**cg vs. gg**	+136,94	**0,034**
	rechts	**cg vs. gg**	+166,22	**0,013**
Gyrus frontalis medius	links	**cg vs. gg**	+2070,96	**<0,001**
	rechts	**cg vs. gg**	+2130,71	**<0,001**
Gyrus frontalis medius et inferior orbitalis	links	**cg vs. cc**	+1010,72	**0,001**
	rechts	**cg vs. gg**	+839,78	**0,004**
Gyrus temporalis superior	links	**cg vs. gg**	+697,86	**0,018**
	rechts	**cg vs. gg**	+656,30	**0,043**

rs264373

Die folgende Tabelle fasst die Berechnungen der Genotypen, die Volumenänderung und die Irrtumswahrscheinlichkeit p zusammen.

Tabelle 23: Signifikante Volumenveränderungen durch rs264373

Region		Genotypen	Volumenveränderung in mm^3	p-Wert
Amygdala	links	**gc vs. cc**	-73,31	**0,016**
	rechts	**gg vs. cc**	-83,46	**0,010**
		gc vs. cc	-75,27	**0,009**
Insula	links	**gg vs. cc**	-617,79	**0,008**
		gc vs. cc	-739,10	**0,000**
	rechts	**gg vs. cc**	-635,21	**0,013**
		gc vs. cc	-654,99	**0,005**
Thalamus	links	**gg vs. cc**	-168,90	**0,009**
		gc vs. cc	-146,57	**0,011**
	rechts	**gg vs. cc**	-175,71	**0,007**
		gc vs. cc	-153,39	**0,008**
Gyrus frontalis medius	links	**gc vs. gg**	-983,75	**0,004**
		gc v. cc	-1434,07	**0,004**
	rechts	**gc vs. gg**	-1546,98	**0,003**
		gc vs. cc	-1106,88	**0,033**
Gyrus frontalis medius et inferior orbitalis	links	**gc vs. cc**	-777,26	**0,005**
	rechts	**gc vs. cc**	-779,05	**0,004**
Gyrus parahippocampalis	links	**gg vs. cc**	-264,83	**0,024**
		gc vs. cc	-335,19	**0,002**
	rechts	**gc vs. cc**	-348,08	**0,007**
Gyrus temporalis superior	links	**gg vs. cc**	-703,64	**0,009**
		gc. Vs. cc	-876,94	**0,000**
	rechts	**gg vs. cc**	-621,73	**0,049**
		gc vs. cc	-941,95	**0,001**

Zusätzliche Berechnungen:

Aufgrund der errechneten Signifikanz zwischen Diagnose und rs3264373 wurden weiterführend die Experimentalgruppen für diesen SNP getrennt und hinsichtlich einer Assoziation mit den Volumetriedaten untersucht. Hierbei zeigte sich, dass bei den Kontrollen nur ein Areal assoziiert war, während sich für die Patienten keine Veränderung zu Tabelle 24 ergab.

Tabelle 24: Signifikante Volumenveränderungen bei den Kontrollen durch rs264373

Region		Genotypen	Volumenveränderung in mm^3	p-Wert
Thalamus	links	**gg vs. cc**	-221,82	**0,008**

Tabelle 25: Signifikante Volumenveränderungen bei den Patienten durch rs264373

Region		Genotypen	Volumenveränderung in mm^3	p-Wert
Amygdala	links	**gg vs. cc**	-97,73	**0,011**
		gc vs. cc	-108,50	**0,005**
	rechts	**gg vs. cc**	-97,11	**0,017**
		gc vs. cc	-97,03	**0,017**
Gyrus frontalis medius	rechts	**gc vs. cc**	-1330,14	**0,042**
Gyrus frontalis medius et inferior orbitalis	links	**gc vs. cc**	-833,59	**0,027**
	rechts	**gc vs. cc**	-1069,85	**0,006**
Insula	links	**gg vs. cc**	-688,98	**0,013**
		gc vs. cc	-950,33	**0,001**
	rechts	**gg vs. cc**	-726,31	**0,022**
		gc vs. cc	-957,93	**0,003**
Gyrus parahippocampalis	links	**gc vs. cc**	-582,02	**<0,001**
	rechts	**gc vs. cc**	-554,37	**0,003**
		gc vs. gg	-350,45	**0,048**
Gyrus temporalis superior	links	**gc vs. cc**	-1178,86	**0,001**
	rechts	**gc vs. cc**	-1369,44	**0,001**
		gc vs. gg	-817,94	**0,032**
Thalamus	links	**gc vs. cc**	-167,13	**0,037**

4.2.4 Dominanzmodelle

Prinzip der Dominanzmodelle

Das Erstellen von Dominanzmodellen dient zur Errechnung von signifikanten Einflüssen eines Polymorphismus, wenn man eine Ausprägung als dominant ansieht. Man erstellt zwei Modelle bei zwei alternativen Basen und addiert jeweils die Frequenzen der heterozygoten Träger dem dominant betrachteten Allel hinzu.

4.2.4.1 Dominanzmodelle und Diagnose

Um zu überprüfen, ob sich die dominanten Allele von rezessiven Allelen hinsichtlich der Diagnose unterschieden, wurde eine logistische Regressionsanalyse durchgeführt:

Tabelle 26: Signifikanzwerte und relatives Risiko von rs17286505dom G und rs264373dom C

SNP	Genotypen	p-Wert	Odds Ratio
rs17286505dom G	(gg+gc) vs. cc	0,028	2,534
rs264373dom C	(cc+cg) vs. gg	0,037	2,296

Hier zeigten sich signifikante Unterschiede bei den Allelgruppen hinsichtlich der Diagnose für rs17286505 und rs264373. Folgende Aussagen konnten für die einzelnen SNPs getroffen werden:

rs17286505:

Rezessive C-Träger (cc) unterschieden sich von dominanten G-Trägern (gg, cg) in der Vorhersagekraft der Diagnose. Rezessive cc-Träger hatten ein 2,5 fach erhöhtes Risiko, an einer Schizophrenie zu erkranken. Im Vergleich dazu waren Personen, die entweder gg- oder cg-Genotypen zeigten, signifikant häufiger gesund. Diese Ergebnisse stehen im Konsens mit den Berechnungen der einzelnen Genotypvarianten von rs17286505 in Abschnitt 4.2.2.

rs264373:

Die Gruppe mit den rezessiven G-Trägern (gg) unterschieden sich von den dominanten C-Trägern (cc, gc) in der Vorhersagekraft der Diagnose.

Rezessive G-Träger (gg) hatten ein erhöhtes Risiko von 2,29 zu erkranken. Diese Berechnungen passen ebenfalls zu den Ergebnissen aus 4.2.2. Hier präsentierten signifikant mehr Patienten den homozygoten gg-Polymorphismus.

4.2.4.2 Dominanzmodelle und Volumen

Im folgenden Abschnitt wurde berechnet, ob die Allele der SNPs im Dominanzmodell einen Einfluss auf das Volumen verschiedener Areale besaßen. Zusammenfassen zeigten sich keine wesentlichen Unterschiede im Vergleich zu den Ergebnissen des linearen SNP-Modells:

rs2965087 im Dominanzmodell A (aa+ag)

Bei dem Vergleich von rezessivem G-Allel und dominantem A-Allel wurde der Thalamus folgendermaßen beeinflusst:

Tabelle 27: Signifikant beeinflusste Gehirnareale durch rs2965087 im Dominanzmodell A

Region		Genotypen	Volumenveränderung in mm^3	p-Wert
Thalamus	links	**(aa+ag) vs. gg**	+157,14	**0,038**
	rechts	**(aa+ag) vs. gg**	+175,94	**0,023**

rs2965087 im Dominanzmodell G (gg+ga)

Es ergaben sich durch den Vergleich der Genotypen folgende Assoziationen hinsichtlich des Volumens:

Tabelle 28: Signifikant beeinflusste Gehirnareale durch rs2965087 im Dominanzmodell G

Region		Genotypen	Volumenveränderung in mm^3	p-Wert
Amygdala	rechts	**(gg+ga) vs. aa**	+59,75	**0,027**
Insula	links	**(gg+ga) vs. aa**	+440,96	**0,033**
Gyrus temporalis superior	links	**(gg+ga) vs. aa**	+592,70	**0,014**

rs1062831 im Dominanzmodell G (gg + ga vs. aa)

In folgendem Dominanzmodell konnten durch den Vergleich der Genotypen folgende Ergebnisse errechnet werden:

Tabelle 29: Signifikant beeinflusste Gehirnareale durch rs1062831 im Dominanzmodell G

Region		Genotypen	Volumenveränderung in mm^3	p-Wert
Insula	links	**(gg+ga) vs. aa**	-540,61	**0,013**
	rechts	**(gg+ga) vs. aa**	-579,19	**0,015**
Gyrus parahippocampalis	links	**(gg+ga) vs. aa**	-224,36	**0,032**

rs362746 im Dominanzmodell G (gg+ga vs. aa)

Für diesen SNP ergaben sich durch den Vergleich der Genotypen folgende signifikante Volumenveränderungen:

Tabelle 30: Signifikant beeinflusste Gehirnareale durch rs362746 im Dominanzmodell G

Region		Genotypen	Volumenveränderung in mm^3	p-Wert
Insula	links	**(gg+ga) vs. aa**	+653,25	**0,043**
Gyrus temporalis superior	links	**(gg+ga) vs. aa**	+789,03	**0,036**

rs17286505 im Dominanzmodell C (cc + cg vs. gg)

Hierbei ergaben sich durch den Vergleich der Genotypen folgende signifikante Volumenveränderungen:

Tabelle 31: Signifikant beeinflusste Gehirnareale durch rs17286505 im Dominanzmodell C

Region		Genotypen	Volumenveränderung in mm^3	p-Wert
Gyrus frontalis medius et inferior orbitalis	links	**(cc+cg) vs. gg**	+567,97	**0,034**
	rechts	**(cc+cg) vs. gg**	+526,12	**0,048**
Gyrus temporalis superior	links	**(cc+cg) vs. gg**	+523,73	**0,030**

rs264373 im Dominanzmodell G (gg + gc, vs. cc)

In der folgenden Tabelle 32 werden die signifikant veränderten Gehirnareale beschrieben, welche durch die Genotypen des rs264373 beeinflusst worden sind.

Tabelle 32: Signifikant beeinflusste Gehirnareale durch rs264373 im Dominanzmodell G

Region		Genotypen	Volumenveränderung in mm^3	p-Wert
Amygdala	links	**(gg+gc) vs. cc**	-67,99	**0,014**
	rechts	**(gg+gc) vs. cc**	-71,10	**0,006**
Insula	links	**(gg+gc) vs. cc**	-550,20	**0,005**
	rechts	**(gg+gc) vs. cc**	-559,63	**0,009**
Thalamus	links	**(gg+gc) vs. cc**	-130,26	**0,010**
	rechts	**(gg+gc) vs. cc**	-114,63	**0,025**
Gyrus frontalis medius et inferior orbitalis	rechts	**(gg+gc) vs. cc**	-503,80	**0,044**
Gyrus parahippocampalis	links	**(gg+gc) vs. cc**	-305,26	**0,001**
	rechts	**(gg+gc) vs. cc**	-262,34	**0,022**
Gyrus temporalis superior	links	**(gg+gc) vs. cc**	-578,15	**0,011**
	rechts	**(gg+gc) vs. cc**	-696,60	**0,008**

4.3 Haplotypen

4.3.1 Verteilung der Haplotypen im Gesamtkollektiv und getrennt nach Diagnose

Die Erstellung der Haplotypen mittels des Online-Services HAP (http://research.calit2.net/hap/) berechnete neben den wahrscheinlichsten Haplotypen für jeden Probanden die Kopplung zwischen den elf SNPs, was zu einer Einteilung der untersuchten SNPs in vier Blöcke führte.

Block 1

Block 1 bestand aus folgenden SNPs: rs2965087, rs1062831 und rs736707. Dargestellt sind in Tabelle 31 die vier häufigsten Varianten mit ihren Verteilungen in dem Studienkollektiv.

Tabelle 33: Block 1, Frequenzen der Haplotypen im Experimentalkollektiv und getrennt nach Diagnose

Block1	**Auftreten des Haplotypen in %** 0 = nicht vorhanden 1 = einmal vorhanden 2 = zweimal vorhanden		
SNP-Kombination	**Gesamt**	**Kontrollen**	**Patienten**
AAT	0= 19,6 1= 43,9 2= 36,5	0= 18,9 1= 47,3 2= 33,8	0= 20,3 1= 40,5 2= 39,2
GAC	0= 73,6 1= 21,6 2= 4,7	0= 73,0 1= 21,6 2= 5,4	0= 74,3 1= 21,6 2= 4,1
AAC	0= 86,5 1= 12,8 2= 0,7	0= 87,8 1= 10,8 2= 1,4	0= 85,1 1= 14,9 2= 00,0
GAT	0= 90,5 1= 8,1 2= 1,4	0= 91,9 1= 8,1 2= 0,0	0= 89,2 1= 8,1 2= 2,7

Um zu prüfen, ob sich diese prozentualen Verteilungen in Bezug auf die Diagnose unterschieden, wurde die logistische Regression durchgeführt. Es ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen.

Block 2

Block 2 bestand aus den folgenden SNPs: rs2229864, rs362746 und rs362726. Die vier häufigsten Haplotypenvarianten sind, getrennt nach Diagnose, in Tabelle 32 aufgelistet.

Tabelle 34: Block 2, Frequenzen der Haplotypen im Experimentalkollektiv und getrennt nach Diagnose

Block2	**Auftreten des Haplotypen in %** 0= nicht vorhanden 1= einmal vorhanden 2 = zweimal vorhanden		
SNP-Kombination	**Gesamt**	**Kontrollen**	**Patienten**
TAT	0= 44,6 1= 45,3 2= 10,1	0= 47,3 1= 43,2 2= 9,5	0= 41,9 1= 47,3 2= 10,8
CAT	0= 55,4 1= 41,2 2= 3,4	0= 60,8 1= 35,1 2= 4,1	0= 50,0 1= 47,3 2= 2,7
CAC	0= 60,1 1= 37,8 2= 2,0	0= 56,8 1= 41,9 2= 1,4	0= 63,5 1= 33,8 2= 2,7
TAC	0= 69,6 1= 25,7 2= 4,7	0= 70,3 1= 23,0 2= 6,8	0= 68,9 1= 28,4 2= 2,7

Um zu prüfen, ob diese prozentualen Verteilungen zwischen Patienten und Kontrollen einen signifikanten Unterschied zeigten, wurde eine logistische Regression durchgeführt. Hier ergaben sich ebenso keine signifikanten Unterschiede.

Block 3

Der Block 3 bestand aus den folgenden SNPs: rs362642, rs362691, rs2072402 und rs17286505. Die folgende Tabelle listet die Frequenzen der vier häufigsten Haplotypen im Gesamtkollektiv und getrennt nach Diagnose auf.

Tabelle 35: Block 3, Frequenzen der Haplotypen im Experimentalkollektiv und getrennt nach Diagnose

Block 3	**Auftreten des Haplotypen in %** 0= nicht vorhanden 1= 1mal vorhanden 2 = 2mal vorhanden		
SNP-Kombination	**Gesamt**	**Kontrollen**	**Patienten**
CGCC	0= 50,0 1= 41,2 2= 8,8	0= 55,4 1= 37,8 2= 6,8	0= 44,6 1= 44,6 2= 10,8
TGCG	0= 50,7 1= 40,5 2= 8,8	0= 40,5 1= 48,6 2= 10,8	0= 60,8 1= 32,4 2= 6,8
CGCG	0= 60,1 1= 36,5 2= 3,4	0= 60,8 1= 36,5 2= 2,7	0= 59,5 1= 36,5 2= 4,0
TGCC	0= 73,6 1= 24,3 2= 2,0	0= 78,4 1= 21,6 2= 0,0	0= 68,9 1= 27,0 2= 4,1

Um zu prüfen inwieweit sich die prozentualen Verteilungen unterschieden, wurde die logistische Regressionsanalyse benutzt, um die Odds Ratio und die Signifikanz zu berechnen.

Die Haplotypvariante TGCG unterschied sich signifikant (p=0,023) hinsichtlich in der diagnostischen Vorhersagekraft zwischen „nicht vorhanden“ und „einmal vorhanden“ von den anderen Varianten im dritten Block. Wenn der Haplotyp einmal vorhanden war, sank bei diesen Trägern das relative Risiko um das 0,43 fache. Personen, die diesen TGCG-Block nicht trugen, waren signifikant häufiger erkrankt. Solche, die diesen Block einmal im Genom hatten, waren signifikant häufiger gesund.

Block 4

Dieser Block bestand aus einem SNP: rs264373. Die Verteilung und die Frequenzen der möglichen Ausprägungen wurden im Abschnitt 4.2.2 bereits dargestellt.

4.3.2 Haplotypen und Volumen

Bei diesen Berechnungen wurden ebenfalls die Diagnose, das Alter und das Geschlecht als Kovariaten berücksichtigt.

Block 1:

Die folgenden Haplotypen zeigten einen signifikanten Einfluss auf das Volumen bestimmter Gehirnreale:

Tabelle 36: Signifikante Gehirnareale durch die Haplotypen des ersten Blocks

Region		Vergleich der Haplotypenanzahl	Volumenveränderung in mm^3	p-Wert
		Haplotyp AAT		
Insula	links	einmal vs. zweimal	-438,65	**0,022**
Gyrus temporalis superior	links	einmal vs. zweimal	-555,40	**0,014**
		Haplotyp GAT		
Insula	links	einmal vs. zweimal	-1940,52	**0,041**
	rechts	nicht vs. zweimal	-2119,90	**0,032**
		einmal vs. zweimal	-2686,22	**0,009**
Gyrus frontalis medius	links	nicht vs. zweimal	-3960,75	**0,047**
		einmal vs. zweimal	-4615,64	**0,025**
	rechts	nicht vs. zweimal	-4292,22	**0,046**
		einmal vs. zweimal	-5312,22	**0,017**
Gyrus parahippocampalis	links	nicht vs. zweimal	-1110,14	**0,011**
		einmal vs. zweimal	-1316,65	**0,004**
Gyrus temporalis superior	rechts	nicht vs. zweimal	-2730,74	**0,024**
		einmal vs. zweimal	-3464,16	**0,006**

Region		Vergleich der Haplotypenanzahl	Volumenveränderung in mm^3	p-Wert
		Haplotyp AAC		
Amygdala	links	nicht vs. einmal	-86,21	**0,013**
Insula	links	Nicht vs. einmal	-552,69	**0,033**
	rechts	Nicht vs. einmal	-694,43	**0,013**
Gyrus parahippocampalis	links	einmal vs. Nicht	-278,41	**0,028**

Dieser Block enthielt die SNPs: rs2965087, rs1062831 und rs736707. Diese drei Polymorphismen zeigten ebenfalls signifikante Assoziationen mit den Volumina der oben genannten Gehirnareale.

Block 2

Die folgende Tabelle 37 beinhaltet alle beeinflussten Regionen und deren p-Werte durch Haplotypen des zweiten Blocks.

Tabelle 37: Signifikante Gehirnareale durch die Haplotypen des zweiten Blocks

Region		Vergleich der Haplotypenanzahl	Volumenveränderung in mm^3	p-Wert
		Haplotyp CAC		
Amygdala	rechts	nicht vs. zweimal	-153,57	**0,036**
		einmal vs. zweimal	-174,44	**0,018**
Thalamus	links	nicht vs. zweimal	-290,07	**0,044**
		einmal vs. zweimal	285,18	**0,050**
		Haplotyp TAT		
Gyrus frontalis medius et inferior orbitalis	links	einmal vs. zweimal	+809,16	**0,033**

Dieser Block beinhaltete die SNPs rs2229864, rs362746 und rs362726. Im Vergleich zu den Einzelberechnungen (Signifikanz mit bestimmten Arealen) ergab der SNP rs2229864 andere beeinflusste Areale (Amygdala und Gyrus temporalis superior).

Block 3

In der folgenden Tabelle 38 werden alle Gehirnareale zusammengefasst, die von den Haplotypen des dritten Blocks beeinflusst wurden.

Tabelle 38: Signifikante Gehirnareale durch die Haplotypen des dritten Blocks

Region		Vergleich der Haplotypenanzahl	Volumenveränderung in mm^3	p-Wert
		Haplotyp CGCG		
Thalamus	links	einmal vs. nicht	-98,38	**0,036**
		Haplotyp CGCC		
Insula	links	einmal vs. zweimal	+703,16	**0,027**
		einmal vs. nichts	+469,84	**0,006**
Gyrus frontalis medius	links	einmal vs. nicht	+804,43	**0,032**
Gyrus frontalis medius et inferior orbitalis	links	einmal vs. zweimal	+893,56	**0,028**
		einmal vs. nicht	+508,90	**0,019**
	rechts	einmal vs. zweimal	+922,93	**0,029**
Gyrus temporalis superior	links	einmal vs. zweimal	+731,03	**0,050**
		einmal vs. nicht	+509,12	**0,011**
	rechts	einmal vs. zweimal	+921,02	**0,029**
		einmal vs. nicht	+445,30	**0,047**

Dieser Block beinhaltete die rs362642, rs362691, rs2072402 und rs17286505. Davon zeigte der letzte Polymorphismus in den Einzelberechnungen signifikante Ergebnisse.

Block 4

Dieser Block bestand aus dem SNP rs264373. Die signifikant beeinflussten Gehirnvolumina für diesen Polymorphismus sind im Abschnitt 4.2.3 zusammengefasst dargestellt.

4.4 Mikrosatelliten

Das menschliche Genom besteht aus zwei Chromosomensätzen und daher besitzt jedes Individuum zwei Allele. Die Genotypisierung ergibt somit zwei verschiedene Größen für jeden Mikrosatelliten (MS), welche als größeres Allel und kleineres Allel bezeichnet werden. Für diese Allele wurden in der Vergangenheit Modelle erstellt, in denen entweder das große oder das kleine Allel einen Einfluss auf Diagnose oder Volumen besaßen.

4.4.1 Verteilung der Mikrosatelliten im Gesamtkollektiv und getrennt nach Diagnose

Mikrosatellit 1, $(CA)_n$

Die folgenden zwei Tabellen zeigen die Ergebnisse aus der ersten Mikrosatellitenanalyse und beschreiben die Häufigkeit der Wiederholungen dieses Dinukleotides im Gesamtkollektiv der Studie und getrennt nach Diagnose.

Tabelle 39: MS1, kleineres Allel, gesamt und getrennt nach Diagnose

Kleineres Allel	Häufigkeit der Wiederholungen in %				
	15	16	17	18	19
Gesamt	1,4	44,8	42,8	10,3	0,7
Gesund	0,0	33,8	49,3	16,9	0,0
Krank	2,7	55,4	36,5	4,1	1,4

Tabelle 40: MS 1, größeres Allel, gesamt und getrennt nach Diagnose

Größeres Allel	Häufigkeit der Wiederholungen in %								
	16	17	18	19	20	21	22	23	24
Gesamt	15,9	29,7	20,7	5,5	8,3	9,7	4,8	4,1	1,4
Gesund	15,5	25,4	26,8	8,5	7,0	8,5	2,8	2,8	2,8
Krank	16,2	33,8	14,9	2,7	9,5	10,8	6,8	5,4	0,0

Mikrosatellit 5, $(CA)_n$

Die folgenden zwei Tabellen fassen die Ergebnisse des fünften Mikrosatelliten zusammen und beinhalten die Häufigkeiten dieses Dinukleotides im Gesamtkollektiv und getrennt nach Diagnose.

Tabelle 41: MS 5, kleineres Allel, gesamt und getrennt nach Diagnose

Kleineres Allel	**Häufigkeit der Wiederholungen in %**					
	14	**16**	**17**	**18**	**20**	**21**
Gesamt	36,1	2,7	51,0	1,4	4,1	4,8
Gesund	32,9	4,1	50,7	2,7	2,7	6,8
Krank	39,2	1,4	51,4	0,0	5,4	2,7

Tabelle 42: MS 5, größeres Allel, gesamt und getrennt nach Diagnose

Größeres Allel	**Häufigkeit der Wiederholungen in %**							
	14	**17**	**18**	**19**	**20**	**21**	**22**	**23**
Gesamt	1,4	38,1	2,7	0,7	12,9	27,2	8,8	8,2
Gesund	1,4	42,5	1,4	0,0	12,3	27,4	6,8	8,2
Krank	1,4	33,8	4,1	1,4	13,5	27,0	10,8	8,1

Mikrosatellit 7, $(GT)_n$

Die Analyse des siebten Mikrosatelliten ergab folgendes Verteilungsmuster für das kleinere und größere Allel im untersuchten Kollektiv.

Tabelle 43: MS 7, kleineres Allel, gesamt und getrennt nach Diagnose

Kleineres Allel	**Häufigkeit der Wiederholungen in %**										
	14	**16**	**19**	**20**	**21**	**22**	**23**	**24**	**25**	**26**	**27**
Gesamt	0,7	24,5	15,0	15,0	25,9	5,4	2,7	3,4	2,7	2,7	2,0
Gesund	1,4	23,3	15,1	11,0	28,8	5,5	5,5	2,7	4,1	2,7	0,0
Krank	0,0	25,7	14,9	18,9	23,0	5,4	0,0	4,1	1,4	2,7	4,1

Tabelle 44: MS 7, größeres Allel, gesamt und getrennt nach Diagnose

Größeres Allel	Häufigkeit der Wiederholungen in %														
	16	**19**	**20**	**21**	**22**	**23**	**24**	**25**	**26**	**27**	**28**	**29**	**30**	**31**	**32**
Gesamt	4,1	2,7	8,2	11,6	10,2	12,2	4,1	6,1	15,6	6,1	3,4	4,8	5,4	4,8	0,7
Gesund	1,4	5,5	5,5	11,0	9,6	13,7	2,7	6,8	15,1	8,2	4,1	5,5	5,5	4,1	1,4
Krank	6,8	0,0	10,8	12,2	10,8	10,8	5,4	5,4	16,2	4,1	2,7	4,1	5,4	5,4	0,0

Mikrosatellit 9, $(TATC)_n$

Die nächsten zwei Tabellen fassen die Ergebnisse des neunten Mikrosatelliten zusammen und beinhalten die Häufigkeiten dieses Dinukleotides im Gesamtkollektiv und getrennt nach Diagnose.

Tabelle 45: MS 9, kleineres Allel, gesamt und getrennt nach Diagnose

Kleineres Allel	Häufigkeit der Wiederholungen in %								
	9	**10**	**11**	**12**	**13**	**14**	**15**	**16**	**17**
Gesamt	2,7	2,1	7,5	29,5	23,3	28,1	4,8	1,4	0,7
Gesund	4,1	1,4	8,2	28,8	27,4	24,7	2,7	1,4	1,4
Krank	1,4	2,7	6,8	30,1	19,2	31,5	6,8	1,4	0,0

Tabelle 46: MS 9, größeres Allel, gesamt und getrennt nach Diagnose

Größeres Allel	Häufigkeit der Wiederholungen in %						
	11	**12**	**13**	**14**	**15**	**16**	**17**
Gesamt	0,7	4,8	11,0	32,9	37,7	8,9	4,1
Gesund	0,0	6,8	11,0	31,5	32,9	15,1	2,7
Krank	1,4	2,7	11,0	34,2	42,5	2,7	5,5

Mikrosatellit 10, $(TG)_n$

Die folgenden zwei Tabellen präsentieren die Ergebnisse für MS 10:

Tabelle 47: MS 10, kleineres Allel, gesamt und getrennt nach Diagnose

Kleineres Allel	Häufigkeit der Wiederholungen in %						
	20	21	22	23	24	25	26
Gesamt	3,5	69,4	6,9	15,3	2,8	1,4	0,7
Gesund	2,8	62,0	8,5	23,9	1,4	1,4	0,0
Krank	4,1	76,7	5,5	6,8	4,1	1,4	1,4

Tabelle 48: MS 10, größeres Allel, gesamt und getrennt nach Diagnose

Größeres Allel	Häufigkeit der Wiederholungen in %						
	20	21	22	23	24	25	26
Gesamt	0,7	23,6	10,4	25,0	20,8	13,9	5,6
Gesund	1,4	25,4	8,5	29,6	19,7	12,7	2,8
Krank	0,0	21,9	12,3	20,5	21,9	15,1	8,2

Mikrosatellit 11, $(TG)_n$

Die nächsten zwei Tabellen fassen die Verteilung im gesamten Experimentalkollektiv und getrennt nach Diagnose zusammen.

Tabelle 49: MS 11, kleineres Allel, gesamt und getrennt nach Diagnose

Kleineres Allel	Häufigkeit der Wiederholungen in %				
	10	11	12	13	14
Gesamt	0,7	46,3	38,1	2,7	12,2
Gesund	0,0	38,4	45,2	1,4	15,1
Krank	1,4	54,1	31,1	4,1	9,5

Tabelle 50: MS 11, größeres Allel, gesamt und getrennt nach Diagnose

Größeres Allel	Häufigkeit der Wiederholungen in %				
	11	**12**	**13**	**14**	**15**
Gesamt	6,1	33,3	2,0	57,8	0,7
Gesund	4,1	35,6	1,4	57,5	1,4
Krank	8,1	31,1	2,7	58,1	0,0

Mikrosatellit 14, $(GCC)_n$

Dieser Mikrosatellit ist bereits von vorherigen Studien untersucht worden. In der folgenden Tabelle werden die aktuellen Verteilungen der vorliegenden Studie präsentiert.

Tabelle 51: MS 14, kleineres Allel, gesamt und getrennt nach Diagnose**.**

Kleineres Allel	Häufigkeit der Wiederholungen in %					
	5	**6**	**7**	**8**	**9**	**11**
Gesamt	11,6	53,7	7,5	25,2	0,7	1,4
Gesund	6,8	60,3	1,4	30,1	0,0	1,4
Krank	16,2	47,3	13,5	20,3	1,4	1,4

Tabelle 52: MS 14, größeres Allel, gesamt und getrennt nach Diagnose

Größeres Allel	Häufigkeit der Wiederholungen in %									
	5	**6**	**7**	**8**	**9**	**10**	**11**	**12**	**13**	**14**
Gesamt	3,4	13,6	16,3	56,5	,7	2,7	4,1	1,4	0,7	0,7
Gesund	2,7	13,7	5,5	68,5	0,0	1,4	4,1	1,4	1,4	1,4
Krank	4,1	13,5	27,0	44,6	1,4	4,1	4,1	1,4	0,0	0,0

Mikrosatellit 15, $(AC)_n$

Die Ergebnisse aus der Analyse von MS 15 werden in den nächsten zwei Tabellen zusammengefasst.

Tabelle 53: MS 15, kleineres Allel, gesamt und getrennt nach Diagnose

Kleineres Allel	Anzahl der Wiederholungen								
	14	**16**	**17**	**18**	**19**	**20**	**21**	**22**	**23**
Gesamt	0,7	2,7	1,4	2,0	31,3	23,8	27,2	9,5	1,4
Gesund	1,4	1,4	2,7	1,4	47,9	19,2	20,5	4,1	1,4
Krank	0,0	4,1	0,0	2,7	14,9	28,4	33,8	14,9	1,4

Tabelle 54: MS 15, größeres Allel, gesamt und getrennt nach Diagnose

Größeres Allel	Anzahl der Wiederholungen						
	19	**20**	**21**	**22**	**23**	**24**	**26**
Gesamt	8,8	7,5	29,9	38,8	10,9	2,7	1,4
Gesund	13,7	9,6	38,4	30,1	5,5	2,7	0,0
Krank	4,1	5,4	21,6	47,3	16,2	2,7	2,7

Logistische Regression der Mikrosatelliten

Um zu prüfen, ob sich diese relativen Häufigkeiten getrennt nach Diagnose signifikant unterschieden, wurden mittels logistischer Regression die Odds Ratios und die Signifikanzen berechnet.

Tabelle 55: Signifikanz und Odds Ratio von MS 1 und MS 15.

Mikrosatellit	p-Wert	Odds Ratio
MS 1, kleineres Allel	**0,009**	**0,500**
MS 1, größeres Allel	0,711	1,031
MS 15, kleineres Allel	**0,002**	**1,572**
MS 15, größeres Allel	**0,000**	**1,899**

Die obige Tabelle zeigt, dass sich die relativen Häufigkeiten der beiden Experimentalgruppen Wiederholungen bei den Mikrosatelliten 1 und 15 signifikant unterschieden. Betrachtete man die einzelnen Modelle, waren signifikante Unterschiede in den Modellen MS 1, kleineres Allel sowie MS 15, beide Allele zu finden. Die anderen Mikrosatelliten wiesen keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Diagnosegruppen auf und sind aus diesem Grund nicht ausführlich dargestellt.

MS 1

Im Modell des dominanten kleineren Alleles unterschieden sich die Häufigkeiten der Nukleotidwiederholungen zwischen den beiden Gruppen signifikant mit p=0,009. Dabei stieg das Risiko, an einer Schizophrenie zu erkranken, mit abnehmender Anzahl der Wiederholungen (um das 0,5 fache pro reduzierten Dinukleotid).

MS 15

Die Probandengruppen unterschieden sich signifikant im Auftreten von MS 15. Im Modell des dominanten kleineren Alleles lag die Irrtumswahrscheinlichkeit bei p=0,002. Patienten hatten dabei überzufällig mehr Wiederholungen von $(AC)_n$. Dabei stieg das Risiko, an Schizophrenie zu erkranken um das 1,6 fache mit jeder zusätzlichen Dinukleotidgruppe.

Das Modell des dominanten größeren Allels ergab ebenfalls einen signifikanten Unterschied in der Anzahl der Wiederholungen. Auch hier zeigte sich, dass Schizophreniepatienten im Gegensatz zu den Kontrollpersonen mehr Wiederholungen des Mikrosatelliten besaßen ($p<0,001$). Dabei erhöhte sich das relative Risiko um 1,9 fache pro zusätzlichen Dinukleotid.

4.4.2 Mikrosatelliten und Volumen

Im Folgenden werden nur die Mikrosatelliten aufgezählt, welche einen signifikanten Einfluss auf das Volumen einzelner Gehirnareale und Gyri besaßen. Diese Ergebnisse wurden mittels Allgemeinen linearen Modell berechnet. Die Kovariaten Alter, Geschlecht und Diagnose wurden in die Berechnungen einbezogen und werden im Folgenden nicht mehr erwähnt. Alle Volumenwerte sind Mittelwerte.

Mikrosatellit 1, $(AC)_n$

Dieser Marker beeinflusste signifikant, bei steigender Anzahl der Wiederholungen, folgende Gehirnareale im Modell des dominanten kleineren Allels.

Tabelle 56: Signifikant beeinflusste Gehirnareale durch MS 1

Modell	Region		Volumenveränderung pro zusätzlicher Wiederholung in mm^3	p-Wert
Kleineres Allel	**Insula**	links	+280,71	**0,023**
	Thalamus	rechts	-69,07	**0,045**

Mikrosatellit 7, $(GT)_n$

Durch eine steigende Anzahl von Dinukleotiden zeigte sich eine negative Korrelation mit folgender Gehirnregion.

Tabelle 57: Signifikant beeinflusste Gehirnareale durch MS 7

Modell	Region		Volumenveränderung pro zusätzlicher Wiederholung in mm^3	p-Wert
Größeres Allel	**Thalamus**	rechts	-16,91	**0,049**

Mikrosatellit 9, $(TATC)_n$

Tabelle 58 fasst die assoziierten Gehirnareale von MS 9 zusammen.

Tabelle 58: Signifikant beeinflusste Gehirnareale durch MS 9

Modell	Region		Volumenveränderung pro zusätzlicher Wiederholung in mm^3	p-Wert
Kleineres Allel	**Amygdala**	links	-17,98	**0,030**
	Insula	links	-124,67	**0,037**
		rechts	-148,53	**0,021**
	Gyrus temporalis superior	links	-200,07	**0,013**

Modell	Region		Volumenveränderung pro zusätzlicher Wiederholung in mm^3	p-Wert
Größeres Allel	**Amygdala**	rechts	-26,29	**0,040**
	Insula	links rechts	-231,05 -262,46	**0,025** **0,017**
	Gyrus frontalis medius	links rechts	-553,03 -562,95	**0,006** **0,014**
	Gyrus frontalis medius et inferior orbitalis	links rechts	-231,05 -262,47	**0,025** **0,017**
	Gyrus Parahippocampalis	links	-116,53	**0,031**
	Gyrus temporalis superior	links rechts	-342,62 -433,76	**0,005** **0,002**

Mikrosatellit 14, $(GCC)_n$

Die folgende Tabelle beschreibt die Volumenänderung des beeinflussten Areals im Modell des größeren Allels.

Tabelle 59: Signifikant beeinflusste Gehirnareale durch MS 14

Modell	Region		Volumenveränderung pro zusätzlicher Wiederholung in mm^3	p-Wert
Größeres Allel	**Amygdala**	rechts	+24,48	**0,020**

Mikrosatellit 15

Der Mikrosatellit 15 veränderte mit steigender Anzahl der Wiederholungen folgendes Areal bei der Experimentalgruppe.

Tabelle 60: Signifikant beeinflusste Gehirnareale durch MS 15

Modell	Region		Volumenveränderung pro zusätzlicher Wiederholung in mm^3	p-Wert
Kleineres Allel	Thalamus	rechts	-39,47	0,023

5 Diskussion

5.1 Zusammenfassung und Bewertung der Ergebnisse

5.1.1 Einfluss der Polymorphismen auf die Diagnose

Der SNP rs17286505 befindet sich im Intron 10 des Reelingens. Personen mit einer cc-Variante waren signifikant häufiger erkrankt als Personen mit einem gg-Genotyp. Im Dominanzmodell 2 bestätigte sich der negative Einfluss von cc. Rs17286505 war auch mit der nicht risikobehafteten G-Variante Bestandteil des signifikanten Haplotypen TGCG. Bei Personen mit diesem Haplotypen sank das relative Risiko, an einer Schizophrenie zu erkranken.

Der SNP rs264373 befindet sich im Intron 3 des Reelingens. Hier präsentierten sich folgende Ergebnisse: gc-Träger waren im Vergleich zu gg-Trägern signifikant häufiger gesund. Dieses Ergebnis bestätigte sich auch im Dominanzmodell. Hier lag das homozygote G-Allel signifikant häufiger bei erkrankten Personen vor. Rs264373 befand sich unter den 10 untersuchten SNPs aus der Studie von Wedenoja et al. (93). Diese fanden jedoch keine Assoziation bei den 352 untersuchten Kernfamilien.

Zwei Mikrosatelliten von Reelin zeigten ebenfalls signifikant unterschiedliche Ergebnisse in Bezug auf die Diagnosestellung und die Anzahl der Wiederholungen. MS 1 ist ca. 125 kb außerhalb der 5'UTR des Reelingens. Signifikant weniger Dinukleotide $(CA)_n$ erhöhten das Risiko pro Nukleotidgruppe um das 0,5 fache, an einer Schizophrenie zu erkranken. MS 15 befindet sich ca. 48 kb entfernt von der 3'UTR des Reelingens. Mehr Wiederholungen von $(AC)_n$ erhöhten das relative Risiko um das 1,9 fache pro Nukleotidgruppe. Personen mit einer vermehrten Anzahl dieser Dinukleotide hatten häufiger die Diagnose Schizophrenie ($p<0,001$).

SNP rs362691 zeigte bei dieser experimentellen Untersuchung keinen Einfluss auf die Diagnose und keine Assoziation mit dem Gehirnvolumen. Dieser nicht-synonyme SNP befindet sich im Exon 22. Auch Gregório et al. (94) untersuchte 2009 diesen SNP in Bezug auf die Erkrankung und fand ebenfalls keine Assoziation.

Der Mikrosatellit 14, ein GCC Repeat in der 5'UTR, wurde bei einigen Studien (Goldberger et al. (89), Huang et al. (90), Akhane et al. (91), Cheng et al. (92) auf eine Assoziation zwischen Diagnose und Anzahl der Wiederholungen untersucht, ebenfalls ohne signifikante Ergebnisse zu erlangen. Nur Persico et al. (88) entdeckten 2006 einen signifikanten Zusammenhang mit einer steigenden Anzahl der Wiederholungen dieser repetitiven Trinukleotidsequenz.

Die hier vorliegende Studie beinhaltete größtenteils neue, noch nicht zuvor untersuchte Polymorphismen. Auch verschiedene vorhergehende Studien versuchten über genetische Marker des Reelingens, bestimmte Assoziationen zur Diagnose Schizophrenie darzustellen. Diesen Zusammenhang konnte lediglich die Studie von Shifman et al. (95) aufzeigen, wobei sich dieses Ergebnis nur auf das weibliche Geschlecht bezog. In unserer Studie war es im Gegensatz zu den anderen gelungen, bei vier Polymorphismen eine signifikante Beziehung zwischen Ausprägung und Schizophrenie zu erbringen.

Die Ergebnisse der vorliegenden Studie legen nahe, dass Reelin neben anderen Risikogenen einen wesentlichen Beitrag zur Genese der Schizophrenie leisten könnte und somit als zusätzliches Suszeptibiltitätsgen angesehen werden muss. Einzelne SNPs und Mikrosatelliten haben eine Assoziation mit der Diagnose gezeigt. Nach Korrektur für multiples Testen bleiben diese Ergebnisse zwar nicht signifikant, eine Replikationsstudie, die gezielt diese Polymorphismen untersucht, sollte jedoch folgen. Eine Risikoerhöhung um das 3,1fache stellt zwar keine Erklärung des genetischen Ursprungs dieser Erkrankung dar, jedoch ist bei der Schizophrenie bekannt, dass viele kleine Gendefekte additiv und multiplikativ das Risiko wesentlich erhöhen. Evidenz hierfür findet sich in Zwillings- und Adoptionsstudien, die einen genetischen Einfluss von bis zu 75% postulieren (29).

5.1.2 Einfluss der Polymorphismen auf das Gehirnvolumen

Initial wurde bei unserer Arbeit untersucht, ob sich Kontroll- und Patientengruppe generell hinsichtlich ihrer cerebralen Volumetriedaten unterscheiden. Diese Beobachtung wurde in der Literatur mehrfach gezeigt und durch Metaanalysen unterstützt. (45, 46, 49)

Diese Beziehung konnte nur bei zwei Gehirnarealen bestätigt werden: Die Volumina des linken Gyrus frontalis medialis et inferior orbitalis und der linken Insula waren in unserer Studie bei den Patienten im Vergleich zu den Kontrollen verkleinert. Eine verkleinerte Insula ist in Studien bereits zuvor beobachtet worden, deshalb scheinen diese Befunde homogen zu sein, ebenso die Ergebnisse bezogen auf den Gyrus frontalis medius. Eine Beteiligung des Gyrus frontalis medius ist aufgrund der Affektverflachung, einem Hauptsymptom der Schizophrenie, gut nachvollziehbar. Im Zusammenhang mit diesem Symptom wird auch der Begriff der Hypofrontalität benutzt.

Die Metaanalyse von Glahn et al. (50) beruht ebenfalls auf mit VBM errechneten Daten und kann somit als passende Vergleichsstudie herangezogen werden. Die oben genannten Reduktionen der Insula und des Gyrus frontalis medius links sind übereinstimmend mit denen dieser Metaanalyse. Bei Glahn et al. wie auch in anderen Studien wurden Reduktionen in weiteren Regionen gezeigt, die auch in dieser vorliegenden Studie untersucht, allerdings nicht als unterschiedlich identifiziert wurden.
Hier stellt sich die Frage, weshalb sich die Ergebnisse in unserer Studie unterscheiden. Die Experimentalgruppe ist relativ klein gegenüber anderen Studien. Zudem ist das Bild der Schizophrenie sehr heterogen, wobei möglicherweise Patienten mit verschiedenen pathophysiologischen Prozessen eingeschlossen werden. Diese stellen nicht notwendigerweise gleichermaßen den Grund für die Volumenreduktion dar. Ein relativ kleines Probandenkollektiv ist daher möglicherweise nicht in der Lage, die normalerweise gefundenen Volumenunterschiede abzubilden. Zudem könnte es sich bei dieser fehlenden Kongruenz auch um methodisch bedingte Unterschiede und Einschränkungen der strukturellen Bildgebung handeln.

Die Analyse der Polymorphismen in Bezug auf das Volumen zeigte folgende interessante Ergebnisse:
Der einflussreichste SNP hinsichtlich des Volumens in unserer Studie war rs264373 aus dem Intron 3, welcher sich auch in unserer Assoziationsstudie mit der Diagnose als signifikant herausgestellt hatte. Dieser SNP zeigte in mehreren, für die Schizophrenie wichtigen Arealen einen signifikanten Einfluss. Wedenoja et al. (93) untersuchten diesen SNP hinsichtlich verschiedener Endophänotypen (Aufmerksamkeit, Lernen und Gedächtnis) bei betroffenen Kernfamilien und konnten keine Assoziation nachweisen. Da dieser Polymorphismus in unserer Studie ebenfalls mit der Diagnose eine signifikante Assoziation offenbarte, wurde der Einfluss auf die Volumetriedaten getrennt nach Diagnosegruppe untersucht. Hierbei zeigte sich, dass sich der Effekt des SNPs auf die Patientengruppe beschränkte. Das G-Allel zeigte sich vermehrt bei Schizophreniepatienten und war zudem bei Patienten mit einem verkleinerten Volumen in mehreren cerebralen Regionen assoziiert.
Rs17286505 zeigte zunächst im Gesamtkollektiv eine Assoziation mit vergrößerten Gehirnarealen bei Trägern des C-Allels. Weil der SNP signifikant mit der Diagnose assoziiert war, wurden weiterführend Kontroll- und Patientengruppe getrennt untersucht. Dabei stellte sich heraus, dass nur die Volumina der Kontrollgruppe beeinflusst wurden. Die Haplotypenanalyse unterstützte diese Daten. Möglicherweise existieren bestimmte unbekannte Mechanismen in

Zusammenhang mit diesem Marker, die nur das Gehirnvolumen gesunder Probanden beeinflussen, aber bei Patienten gestört sind.

Die Studiengruppe um Gregório (94) zeigte 2008 zudem für SNP rs362691 eine Assoziation mit dem Ventrikelvolumen bei schizophrenen Patienten. In der vorliegenden Arbeit wurde das Ventrikelvolumen nicht untersucht, aber andere Areale präsentierten keine Assoziation mit diesem SNP.

Betrachtet man zusammenfassend die Ergebnisse unserer Studie hinsichtlich Volumen versus Polymorphismen, so kann man folgende Rangliste der mit Reelin am häufigsten assoziierten Gehirnareale aufstellen: Insula > Gyrus temporalis superior > Gyrus frontalis medius et inferior orbitalis > Thalamus > Gyrus frontalis medius, Amygdala > Gyrus parahippocampalis. Diese beschriebenen Regionen entsprechen sowohl den für die Schizophrenie relevanten cerebralen Gebieten wie auch den reelinproduzierenden Arealen. Vorangegangene Studien zeigten in diesen Bereichen eine 30 – 50 % Reduktion des Proteins (82). Die Studiengruppe um Eastwood (52) beobachtete diese hauptsächlich im Gyrus temporalis. Zusätzlich bestätigte sich in weiteren Studien eine verminderte Konzentration der Reelin-mRNA im dorsolateralen und präfrontalen Kortex, in der Hippocampusformation und dem angrenzenden Gyrus parahippocampalis (83).

5.1.3 Funktionelle Effekte der signifikanten Polymorphismen

Interessanterweise lagen in unserer Studie die einflussreichsten genetischen Varianten entweder in Richtung 5’UTR oder 3’UTR. Keiner der signifikanten SNPs lag im zentralen Bereich des Gens. Die Abbildung 10 stellt die physikalische Lokalisation der signifikanten Polymorphismen innerhalb des Reelingens dar. Die Darstellung wurde begrenzt auf Marker, die entweder mindestens zwei cerebrale Areale beeinflusst haben oder zusätzlich auf die Diagnose einen Einfluss zeigten:

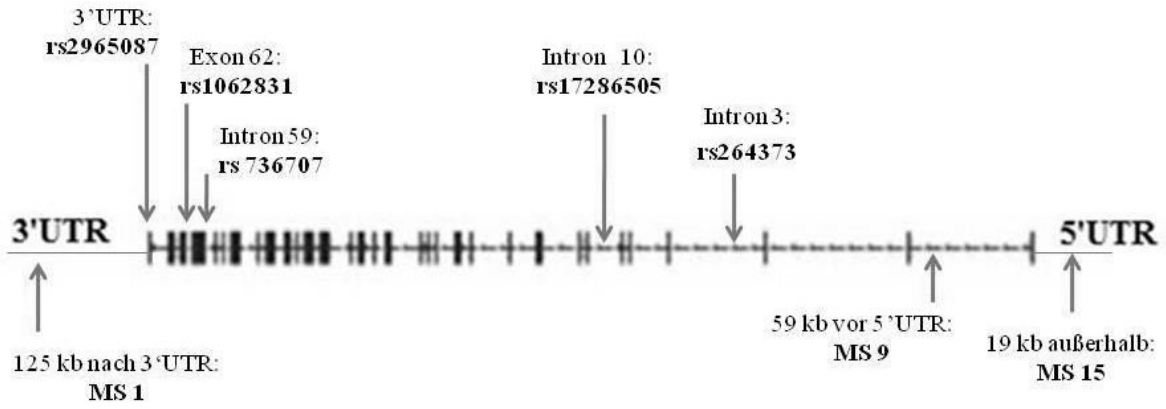

Abbildung 10: Darstellung der signifikanten Polymorphismen und ihrer Lokalisation innerhalb des Gens

Möglicherweise bewirken diese Polymorphismen eine veränderte Reelinexpression. Dabei gibt es verschiedene Hypothesen, wie diese SNPs innerhalb und außerhalb der codierenden Sequenz eine Veränderung der Reelinproduktion erreichen können.

Beim alternativen Splicing (110, 111) werden unterschiedliche mRNAs und damit alternative Proteine produziert, indem die Intron-Exon Grenzen als variabel angesehen werden. Die Basensequenz im Exon-Intron-Übergang dient als Erkennungssequenz für Splicing-Mediatoren. Dieses Phänomen wurde von der Gruppe um Royaux et al. (75) am 3' Ende des Maus-Reelingens beobachtet. Bezogen auf die vorliegenden Befunde könnte der SNP rs736707 ein theoretisches Splicing an dieser Stelle durch die alternative Base verhindern. Die Exons würden nicht regelhaft zusammengefasst werden und dadurch entstünde ein verändertes Protein. Die Konzentration und damit Funktion des physiologischen Reelinproteins wäre somit reduziert.
Eine andere Theorie für einen Effekt von SNPs in den Introns liegt im Kopplungsgleichgewicht zwischen einzelnen genetischen Varianten. Benachbarte Polymorphismen werden aufgrund von Kopplung häufig gemeinsam vererbt. So können signifikante SNPs aus Intronbereichen mit nicht untersuchten benachbarten codierenden SNPs vererbt werden (37). Dieses Phänomen könnte die Signifikanz von rs17286505 und rs264373 erklären. Die SNPs in den benachbarten Exonbereichen wurden in dieser Studie nicht näher untersucht, weil für diese in der Literatur keine Heterozygotenindices bekannt waren und sie zudem nur in geringem Umfang zuvor validiert wurden. Mögliche nicht-synonyme SNPs aus Exon 3 und 10 sind codierende Bestandteile des N-Terminus von Reelin. Dieser beeinflusst die Bindungsaffinität des zentralen Reelindomäne auf die Rezeptoren VLDLR, ApoER2 und α3β1 Integrin (77).

An den 3’ und 5’ Enden wie auch außerhalb des Genes befinden sich regulatorische Einheiten, welche die Transkription beeinflussen (112). In diesen Bereichen binden spezifische Transkriptionsfaktoren, die über Signalkaskaden die Genexpression direkt steigern oder hemmen. Transkriptionsfaktoren regulieren unter anderem die Bindung der RNA-Polymerase an Promotoren. Veränderungen der Basensequenz in diesen Bereichen können daher zu einer Modulation der Transkription führen. MS 9 könnte durch seine relative Nähe zu der 5’UTR unbekannte expressionssteigernde Erkennungssequenzen beeinträchtigen.

Die eigentliche Promotorregion befindet sich direkt am Anfang des Genes (5’UTR) und dient als Startpunkt für die Transkription der DNA und Ansatz der RNA-Polymerase. In dieser Region befindet sich der SNP rs2965087. Durch Austausch der einzelnen Base könnte sich die Erkennungssequenz für bestimmte Transkriptionsfaktoren verändern und zu einem oben genannten Mechanismus führen. Die Methylierung von Promoterregionen ist ebenfalls ein expressionsmodulierender Mechanismus. Dieser wurde bereits in Kapitel 1.2.4 erläutert. Die Studie von Tamura et al. (98) erkannte einen signifikanten Zusammenhang zwischen Methylierung der 5`Promoter- Region und der Reelinexpression in postmortem Gehirnen.

Weiter entfernt vom Gen liegen die Enhancer-Regionen (Verstärker). Diese können bis zu mehrere tausend Basen vor (upstream) oder hinter (downstream) dem Promoter liegen. Die dreidimensionale Faltung der DNA ermöglicht diesen Sequenzen, mit der Promotersequenz direkt zu kommunizieren und die Transkription zu verändern (113). Durch eine Veränderung der Nukleotidsequenz ist eine veränderte DNA-Faltung möglich, durch die sich das Enhancer-Element räumlich von der Promotorregion distanziert. MS 15 befindet sich mit ca. 48 kb Abstand vor der 5’UTR Region außerhalb von Reelin, MS 1 liegt mit 125kb außerhalb der 3’UTR Region. Bei der Entfernung von 125 kb handelt es sich zwar um eine relativ weite Distanz zum Gen, die jedoch noch immer Enhancer-Regionen beinhalten kann (114).

Das Prinzip der veränderten Faltung wurde bereits von Persico et al. (88) bei Reelin entdeckt. Die Gruppe untersuchte den MS 14 $(GCC)_n$, welcher sich in der 5’UTR im Exon 1 befindet, in Bezug auf die Reelin-mRNA Reduktion. Die Autoren konnten eine Assoziation zwischen verlängerter Anzahl der Wiederholungen und der Reelinreduktion feststellen. Die Begründung liegt in den steigenden Energieentropien. Auf diese Weise soll es schwieriger werden, die RNA in den Ribosomen abzulesen und zu Proteinen zu verarbeiten.

Im Exon liegende SNPs, die in der Transkription keine Veränderung des Aminsosäuretripletts aufgrund des degenerierten Codes hervorrufen, werden als synonyme SNPs bezeichnet. Diese alternativen Sequenzen können während der weiteren mRNA-Prozessierung zu einer veränderten Funktionsweise des Proteins führen, z.B. durch eine fehlerhafte Faltung in dieser Domäne (115).

Allerdings wird nicht die gesamte Funktion des Proteins beeinflusst, sondern nur die entsprechende Untereinheit. Der synonyme SNP rs1062831 liegt im Exon 62 und könnte durch diesen Mechanismus zu einer veränderten Funktion führen. Das Exon 62 codiert den C-Terminus des Reelinproteins (77). Eine alternative Base in diesem Bereich könnte die Faltung und somit die Funktion des Proteins beeinträchtigen.

5.1.4 Zusammenhang zwischen Schizophrenie und Volumetrie – Einfluss von Reelin auf beide Komponenten

In unserer Arbeit zeigte sich ein signifikanter Unterschied in den Volumina von linker Insel und linkem Gyrus frontalis medius et inferior orbitalis zwischen gesunden Kontrollen und schizophrenen Patienten. Die Gruppe um Meisenzahl et al. (49) fasste Ergebnisse aus MRT Studien zusammen, die die Unterschiede zwischen Patienten in der ersten schizophrenen Episode und chronisch Erkrankten untersuchten. Der Fokus wurde dabei vor allem auf die Graue Substanz gelegt. Die bilateralen perisylvianischen Regionen (inferiorer frontaler, inferiorer parietaler, supramarginaler und temporaler Gyrus) und die Insula zeigten die stärksten Volumenreduktionen. Auch Hippocampus und Amygdala waren signifikant verkleinert. Diese Befunde waren bereits bei Ersterkrankten ausgeprägt vorhanden und verstärkten sich im chronischen Verlauf. Von einer bereits vor Beginn der Erkrankung angelegten Störung der Corticoneogenese ist daher auszugehen, die sich im weiteren Verlauf verstärkt. Die pathologischen Befunde bei gesunden Angehörigen von schizophrenen Patienten sprechen für eine genetische Beteiligung bei der Entstehung dieses Defektes.

Dementsprechend gibt es verschiedene Hypothesen hinsichtlich des Zusammenhangs zwischen Volumenreduktion und Schizophrenie, die sowohl eine bereits bei Geburt vorliegende Volumenreduktion, wie auch die Aggravation im Krankheitsverlauf erklären: Eine Theorie stützt sich auf die verkleinerten Volumina bei verwandten Personen von Schizophreniepatienten und geht von einer genetisch determinierten Volumenänderung aus, bei der ähnliche pathophysiologische Mechanismen eine Rolle spielen, wie bei der Diagnose der Schizophrenie (48). Andererseits könnte eine neuronale Toxizität die Volumenreduktion verursachen, welche aufgrund erhöhter Glutamatspiegel im Rahmen des Krankheitsverlaufs der Schizophrenie zu beobachten ist (22).

Bei beiden grundsätzlichen Entstehungstheorien spielt Reelin aufgrund seiner Signalkaskaden und Funktionen eine Rolle. Dieses Gen stellt einen zentralen Faktor bei der Corticoneogenese dar. Es dient als Stoppsignal für die migrierenden Neurone aus der Ventrikularzone. Wenn Reelin ungenügend vorliegt, wird diese regelhafte Schichtung gestört, nachfolgende Prozesse werden negativ beeinflusst und eine Volumenreduktion einzelner Areale resultiert bereits in der Embryonalphase. Im adulten Gehirn dagegen werden durch ein vermindertes oder fehlerhaftes Reelin alle nachfolgenden Prozesse und Signalkaskaden beeinflusst. Das würde die synaptische Plastizität (Lernen und Gedächtnis) und Glutamattransmission beeinflussen, welche eine zentrale Rolle bei der Pathogenese von Schizophrenie darstellen.

Aus den übereinstimmenden Gebieten von Volumenreduzierung und Reelinreduktion lässt sich in jedem Fall ein relevanter Einfluss von Reelin vermuten. Neben den strukturellen Veränderungen kommt es zu weiteren dysfunktionalen Mechanismen, die die schizophrenietypischen Symptome hervorrufen. Hier treten pathologische Veränderungen der Neurotransmitter in den Vordergrund, denen Reelin ebenfalls eine zentrale Rolle zugeteilt wird. Das Konzept erklären Falkai und Wobrook (48) als das der Basisvulnerabilität mit zwei pathobiologischen Voraussetzungen:

Die erste Voraussetzung der Genese der Schizophrenie liegt in der Reduktion von GABAergen Interneuronen, die reduziert angelegt oder normal verteilt und dysfunktional sind. Wird GABA reduziert, kommt es zur Überaktivierung des glutamatergen Systems und der dopaminergen Transmission. Diese drei Transmittersysteme spielen in der Pathophysiologie der Schizophrenie eine zentrale Rolle, wie in Kapitel 1.1.4.1 beschrieben. In histologischen Untersuchungen fiel auf, dass in Regionen, die bei Schizophreniepatienten ein verkleinertes Volumen hatten, die interstitiellen GABAergen Interneurone in reduzierter Zahl vorlagen. Reelin wird in den GABAergen Interneuronen gebildet. Deren Dysfunktion könnte mit einer Reelinreduktion in Verbindung stehen.

Die zweite Voraussetzung ist die NMDA-Rezeptordysfunktion. Hier sind auch die bekannten Kandidatengene Dysbindin und Neuroregulin beteiligt. Die NMDA-Dysfunktion führt zur Aufhebung der Kontrolle des glutamatergen Systems. Eine Überaktivierung dieses Systems, die auch durch physiologische Stressoren entstehen kann, führt zu einer veränderten Vernetzung der Synapsen und zu einer veränderten neuronalen Transmission, sowie zu einem neuronalen Untergang bei selbstinduzierter Apoptose der Nervenzellen (22). Reelin aktiviert über SRC-Tyrosinkinasen direkt eine Untereinheit des NMDA-Rezeptors (NR2B), um ihn durch Phosphorylierung in seine aktive Form zu überführen (75). Wenn diese Signalkaskade gestört ist, kommt es zu einer Dysfunktion des NMDA-Rezeptors.

Reelin ist offensichtlich auf unterschiedliche Weise in die pathophysiologischen Prozesse der Schizophrenie und auch der damit assoziierten Volumenreduktion in einzelnen cerebralen Regionen involviert. Ein Einfluss von genetischen Polymorphismen des Gens auf die Diagnose, wie auch auf die Hirnvolumina bei schizophrenen Patienten und gesunden Kontrollen, so wie wir es in unserer Studie gezeigt haben, ist daher wahrscheinlich. Es ist denkbar, dass Reelin die Volumenreduktionen beeinflusst und bei gleichzeitigem Vorhandensein weiterer Suszeptibilitätsgene und damit verbundener pathophysiologischer Prozesse Symptome der Schizophrenie auftreten.

5.2 Limitationen der Arbeit

Ein Kritikpunkt dieser Assoziationsstudie ist die Inhomogenität des Patientenkollektivs. Ein Problem ist insbesondere die Herkunft der Patienten, da große Unterschiede der Allelverteilungen zwischen ethnischen Populationsgruppen vorliegen. Die Probanden wurden zwar nach ihrer direkten Herkunft befragt und dementsprechend auch ausgeschlossen, dennoch kann innerhalb einer europäischen Metropole wie Berlin nicht sichergestellt werden, dass es sich um ideale genetisch homogene Populationen handelt.

Wenn das Gehirn signifikant mit jedem Jahr an Volumen verliert, könnte eine zu groß gewählte Altersspannweite der Grund für heterogene Ergebnisse sein. Um den Einfluss dieser Variablen klein zu halten, wurde das Alter als Kovariate in die Berechnungen einbezogen.

Ein weiterer interferierender Faktor könnte die Medikation sein, da die Patienten z.T. schon über Jahre mit Typika oder Atypika mediziert waren, andere auch unmediziert. Verschiedene Studien haben einen Einfluss der Pharmakotherapie auf Gehirnvolumina gezeigt.

Da die paranoid-halluzinatorische Schizophrenie ein sehr heterogenes Spektrum darstellt, ist es zudem nicht klar, inwiefern bei den untersuchten Patienten vergleichbare pathophysiologische Prozesse stattfinden. Die gleichzeitige Analyse der volumetrischen Daten weg von der Diagnose und hin zu eindeutig messbaren Variablen im Sinne der Endophänotypentheorie, soll hier zu eindeutigeren Ergebnissen führen.

Ein weiterer Kritikpunkt der vorliegenden Studie liegt in der Auswahl der untersuchten genetischen Polymorphismen: Sie unterlagen bestimmten Auswahlkriterien und sollten damit das Gen möglichst vollständig abdecken. Dennoch stellten sie unter dem Aspekt der Größe des Gens nur punktuelle Ausschnitte dar. Zudem befanden sich viele der SNPs in nichtcodierenden Regionen, für die eine funktionelle Relevanz bisher nicht eindeutig belegt ist. Die Analyse der

entsprechenden Haplotypen, die die Ergebnisse der SNP-Untersuchung häufig bestätigte, spricht dennoch für eine gewisse Relevanz der Daten.
Die gewählte Experimentalkollektivgröße von 148 Personen reichte aus, um signifikante Assoziationen herauszustellen, sowohl zu der Diagnose wie auch den volumetrischen Daten. Einschränkend ist jedoch zu sagen, dass sämtliche p-Werte nicht für multiples Testen korrigiert wurden. Die Studie sollte daher in einem weitaus größeren Umfang bei einem unabhängigen Kollektiv erneut durchgeführt werden, um die Ergebnisse zu replizieren und somit die Reliabilität zu gewährleisten.

5.3 Ausblicke

Reelin wird sicherlich nicht das „Schizophrenie-Gen“ darstellen, welches es in dieser Form auch nicht gibt. Vielfältige Forschungsprojekte ergaben bei einigen anderen Genen signifikante Ergebnisse, die bereits durch weitere Untersuchungen bestätigt worden sind. Deshalb ist es wichtig, die gefundenen signifikanten Polymorphismen weiter im Fokus zu behalten und durch Folgestudien zu replizieren. Ziel all dieser genetischen Assoziationsstudien ist es, die möglichen Risikogene zusammenzufassen und in ein System zu bringen, welches die vielfältigen Wirkungen und Interaktionen der involvierten Faktoren erklärt.
Die genaue Pathophysiologie der Schizophrenie ist trotz intensiver Forschungsbemühungen ein großes Feld mit unbekannten Variablen und Mechanismen. Durch die Analyse vieler möglicher Gene und die Identifizierung entscheidender genetischer Varianten kommt zunehmend Licht in die Ätiopathogenese, die es ermöglicht, die Erkrankung und die zugrundeliegenden Pathomechanismen besser zu verstehen.
Das bessere Verständnis der Erkrankung kann zudem dazu beitragen, gezielter in die betroffenen Pathologien eingreifen zu können. Die Entdeckung auch neuer involvierter Systeme bei der Pathogenese der Schizophrenie schafft alternative Ansätze für die medikamentöse Therapie. Zudem ist auch die gezielte und individuelle Pharmakotherapie im Rahmen der Pharmakogenetik ein weiteres Ziel genetischer Untersuchungen.
Weiterhin ist mittelfristig die Identifizierung von Risikopatienten ein anzustrebendes Ziel. Dabei werden sowohl die strukturellen Untersuchungen, die genetischen Daten, wie auch die (prä)klinische Symptomatik eine Rolle spielen. Durch Zusammenführung dieser Befunde soll das Ziel erreicht werden, frühzeitiger und effizienter die Diagnose zu stellen, um somit frühzeitiger mit der Therapie beginnen zu können.

Eine Reihe von Studien hat gezeigt, dass damit einerseits der Krankheitsverlauf positiv beeinflusst werden kann, andererseits bestimmte neurodegenerative Prozesse, die möglicherweise durch eine floride Symptomatik angestoßen werden, aufgehalten werden können.

Die Behandlung der chronischen Schizophrenie erfordert eine kostenintensive Therapie, lange und wiederholte Krankenhausaufenthalte und arbeitsproduktive Ausfälle. Präventive Behandlungen genetisch risikobehafteter Menschen mit einer präklinischen Symptomatik wären ökonomisch günstiger für das Gesundheitswesen. Auch für den potentiellen Schizophrenie-Patienten ergäbe sich somit die Hoffnung auf eine langfristig bessere Lebensqualität. Einschränkend ist hier zu sagen, dass eine frühzeitige Identifizierung von möglichen risikobehafteten Allelen auch zu einer Stigmatisierung und damit zu einer ungünstigen Beeinflussung des Krankheitsverlaufs von Risikopatienten führen kann.

5.4 Fazit

Diese Studie konnte Zusammenhänge zwischen Polymorphismen des Reelingens und der Erkrankung Schizophrenie sowie krankheitsassoziierter Gehirnareale darstellen. Dieses Ergebnis präsentierte sich bei einem Kollektiv von 148 Probanden.

Um diese Beobachtungen zu bestätigen, sollten diese Polymorphismen an größeren Stichprobenzahlen getestet werden. Erst bei einer Replizierbarkeit dieser Ergebnisse in einem großen Kollektiv kann man davon ausgehen, dass dieses Gen einen zentralen Faktor in der Pathogenese darstellt und neben Neuroregulin und Dysbindin als weiteres „sicheres“ Suszeptibiltitätsgen angesehen werden kann. Reelin scheint Einfluss auf die Größe einzelner Gehirnvolumina zu haben, aber wie diese regulativen Prozesse stattfinden, ist bisher unbekannt. Weitere molekularbiologische Studien müssen folgen, um diese Zusammenhänge zu verstehen. Tierexperimentale Studien, z.B. mit der Reelermaus können diese Untersuchungen unterstützen.

6 Zusammenfassung

Schizophrenie ist eine komplexe Erkrankung mit einer deutlichen genetischen Komponente. Dies wurde in Zwillingsstudien und Adoptionsstudien mit Konkordanzraten zwischen 50 und 75% gezeigt (29). Aus histopathologischen Untersuchungen ging hervor, dass die neuronale Schichtung in den Gehirnen erkrankter Patienten gestört ist (53). Bestimmte Gene, wie Reelin, steuern in der Embryonalperiode die Migration und Ausrichtung der Neurone (55). In Tierexperimenten mit heterozygoten Reeler-Mäusen konnte man Ähnlichkeiten von Verhaltensweisen und histologischen Befunden bei schizophrenen Patienten beobachten (81).
In der vorliegenden Studie wurden genetische Varianten des Reelingens bei Schizophreniepatienten und gesunden Kontrollpersonen genotypisiert und deren Assoziation mit volumetrischen MRT-Daten verschiedener krankheitsassoziierter Areale verglichen.

Diese Fall-Kontrollstudie bestand aus 74 Patienten mit der Diagnose paranoid-halluzinatorische Schizophrenie und 74 gesunden Kontrollpersonen. Alle Studienteilnehmer erhielten ein MRT zur Erfassung der volumetrischen Daten verschiedener Gehirnareale. Zudem wurden Blutproben zur DNA-Extraktion entnommen. Elf SNPs des Reelingens wurden nach Lokalisation, funktioneller Relevanz und Validierung ausgewählt. Darunter befanden sich neun noch nicht untersuchte und zwei bereits durch andere Studien untersuchte SNPs. Die Genotypisierung erfolgte mit Hilfe von Restriktionsfragment-Längenpolymorphismen.
Weitere acht (ein bereits mehrfach untersuchter mit heterogenen Ergebnissen und sieben unbekannte) Mikrosatelliten wurden ebenfalls nach den genannten Kriterien ausgewählt und bei allen Probanden genotypisiert.

Die Berechnungen mittels Regressionsanalyse und dem Allgemeinen Linearen Modell ergaben mehrere Assoziationen hinsichtlich Diagnose und Gehirnvolumen. Die SNPs rs17286505 und rs264373 zeigten eine signifikante Assoziation mit der Diagnose der Schizophrenie und dem Volumen einzelner Gehirnareale. Zusätzlich präsentierten die zwei Mikrosatelliten (MS1 und MS15) am 5’- und 3’-Ende des Gens signifikante Zusammenhänge mit der Diagnose.
Weitere Polymorphismen zeigten einen Zusammenhang mit den Volumina krankheitsassoziierter Gehirnareale, darunter der Gyrus temporalis superior, eine Hauptregion der reelinproduzierenden GABAergen Interneurone und Ursprungsregion für das Symptom Halluzination, sowie der Gyrus frontalis medius, welcher bei einem verringerten Volumen einen Zusammenhang mit Affektverflachung und Schizophrenie erklärt.

Es fiel auf, dass die relevanten Polymorphismen eine relative Nähe zum 5' und 3'-Ende des Genes besaßen, in denen genregulierende Mechanismen vermutet werden.
Folgende Rangliste der häufigsten assoziierten Gehirnareale konnte erstellt werden: Insula > Gyrus temporalis superior > Gyrus frontalis medius et inferior orbitalis > Thalamus > Gyrus frontalis medius, Amygdala > Gyrus parahippocampalis.

Die Ergebnisse dieser Studie zeigten den Einfluss von bestimmten Genotypen des Reelingens auf die Diagnosestellung und Morphologie des Gehirns. Über unterschiedliche Mechanismen können diese Polymorphismen einen Beitrag zur Senkung der verfügbaren Reelinmenge im Gehirn leisten. Die Reduktion von Reelin könnte zu einer Beeinträchtigung der reelingesteuerten Corticoneogenese führen, was zu einer Volumenabnahme reelinproduzierender Areale (Gyrus temporalis, frontalis et parahippocampalis) (52, 82) führt. Außerdem würden alle nachgeschalteten Signalkaskaden von Reelin dysfunktional verändert. Dazu zählen die direkte Aktivierung von NMDA-Rezeptoren und die Beeinflussung der reelinproduzierenden GABAergen Interneurone, welche mit dem dopaminergen System interferieren (78).
Reelin ist nicht das „Schizophreniegen", welches aufgrund der multifaktoriellen Genese der Erkrankung auch nicht existiert. Dennoch sprechen die Ergebnisse dieser Untersuchung für eine Relevanz von Reelin bei der Pathogenese der Schizophrenie, so dass weitere Studien folgen sollten, die diesen Zusammenhang genauer untersuchen.

7 Literatur

1 **Leibbrand W**, Wettley A. Griechisch- Römisches Altertum, Vererbung und Entartung. In: Der Wahnsinn, Geschichte der abendländischen Psychopathologie. Erftstadt, Germany, area Verlag GmbH 2005; :7-15, 519-540.

2 **Kraeplin E**. Psychiatrie, Abel (Meixner), Leipzig 1893.

3 **Bleuler E**. Dementia praecox oder Gruppe der Schizophrenien, Deuticke, Leipzig Wien, 1911.

4 **Hughlings-Jackson:** Selected Writings, Taylor J (Hrsg.) London: Hodder and Stoughton Ltd, 1931.

5 **World Health Organization**. International classification of diseases (10th edition). WHO. Geneva 1994.

6 **American Psychiatric Association.** Diagnostical and statistical manual of mental disorders (4th edition). American Psychiatric Press. Washington DC 1994.

7 **Tandon R**, Keshavan MS, Nasrallah HA. Schizophrenia, "just the facts" what we know in 2008. 2. Epidemiology and etiology. Schizophr Res 2008;102:1-18.

8 **Häfner H**, Hambrecht M, Löffler W, et al. Is schizophrenia a disorder of all ages? A comparison of first episodes and early course over the life-cycle. Psychol Med 1998;28:357-65.

9 **Wunn E**. Basics Psychiatrie. Elsevier GmbH München 2006;1:30-35.

10 **Tölle R**, Windgassen K. Psychiatrie. Berlin Heidelberg: Springer Verlag 2006;14:191-30.

11 **Möller HJ**. Course and long-term treatment of schizophrenic psychoses. Pharmacology 2004;2:126-35.

12 **Wolf K**. Psychotische Störungen. In: Notfall & Hausarztmedizin 2006;32: 217-220.

13 **Deutsche Gesellschaft für Psychiatrie, Psychotherapie und Nervenheilkunde** DGPPN: S3 Praxisleitlinien in Psychiatrie und Psychotherapie. Steinkopff-Verlag 2005.

14 **Fleischhacker WW**, Hummer M. Pharmakotherapie der Schizophrenie. Nervenarzt 2006;77(2):77-98.

15 **Cordes J**, Arends M, Mobascher A, et al. Potential clinical targets of repetitive transcranial magnetic stimulation treatment in schizophrenia. Neuropsychobiology 2006;54:87-99.

16 **McGuffin P**. Nature and nurture interplay: schizophrenia. Psychiatr Prax 2004;2:189-93.

17 **Dilling H**, Reimer C. Schizophrene Psychosen. In: Psychiatrie und Psychotherapie. Berlin Heidelberg: Springer Verlag, 1997;3:103- 118.

18 **Gross G**. Therapy of subclinical (subdiagnostic) syndromes of schizophrenia spectrum. Fortschr Neurol Psychiatr 2001;69(2):95-100.

19 **Seemann P**. Dopamine receptors and the dopamine hypothesis of schizophrenia. Synapse 1987;2:133-52.

20 **Snyder SH**. The dopamine hypothesis of schizophrenia: focus on the dopamine receptor. Am J Psychiatry 1976;133:197–2.

21 **Goff DC**, Coyle JT. The emerging role of glutamate in the pathophysiology and treatment of schizophrenia. American Journal of Psychiatry 2001;158:1367–77.

22 **Sodhi M**, Wood KH, Meador-Woodruff J. Role of glutamate in schizophrenia: integrating excitatory avenues of research. Expert Rev Neurother 2008;9:1389-406.

23 **Küttler M.** Gewebshormone und ihre Antagonisten. In: Allgemeine Pharmakologie und Toxikologie. Urban&Fischer 2002;18:214.

24 **Geyer MA**, Vollenweider FX. Serotonin research: contributions to understanding psychoses. Trends Pharmacol Sci 2008;9:445-53.

25 **Laruelle M**, Abi-Dargham A, Casanova MF, et al. Selective abnormalities of prefrontal serotonergic receptors in schizophrenia. J Neural Transm 1992;36:91-131.

26 **Cannon TD**, Kaprio J, Lönnqvist J, Huttunen M, Koskenvuo M. The genetic epidemiology of schizophrenia in a Finnish twin cohort. Arch Gen Psychiatry 1998;55:67-74.

27 **Kendler KS**, Gruenberg AM, Kinney DK. Independent diagnoses of adoptees and relatives as defined by DSM-III in the provincial and national samples of the Danish Adoption Study of Schizophrenia. Arch Gen Psychiatry 1994;51:456-68.

28 **Kety SS**, Wender PH, Jacobsen B et al. Mental illness in the biological and adoptive relatives of schizophrenic adoptees. Arch Gen Psychiatry 1994;51:442-55.

29 **Maier W**, Lichtermann D, Rietschel M, et al. Genetik schizophrener Störungen. Nervenarzt 1999;70:955–69.

30 **Kringlen E**. Twins still our best method. Schizphr Bull 1976;2:429-433.

31 **Farmer AE**, McGuffin P, Gottesman II. Twin concordance for DSM-III schizophrenia. Scrutinizing the validity of the definition. Arch Gen Psychiatry 1987;44(7):634-41.

32 **Franzek E**, Beckmann H. Genetic heterogenity of schizophrenia. Results of a systematic twin study. Nervenarzt 1996;67(7):583-94.

33 **Onstad S**, Skre I, Torgersen S, Kringlen E. Twin concordance for DSM-III-R schizophrenia. Acta Psychiatr Scand 1991;83(5):395-401.

34 **Shih R A**, Belmonte PL, Zandi PP. A review of the evidence from family, twin and adoption studies for a genetic contribution to adult psychiatric disorders. Int Rev psychiatry 2004;16:260-83.

35 **Bailer U**, Aschauer H, Kasper S, Genetik der Schizophrenie. Journal für Neurologie, Neurochirurgie und Psychiatrie 2002;3:25-31.

36 **Gottesman II**, Bertelsen A. Confirming unexpressed genotypes for schizophrenia. Arch Gen Psychiatry 1989;46:867–72.

37 **Fabisch H**, Kroisel PM, Fabisch K. Genetic Risk factors in schizophrenia. Fortschr Neurol Psychiatrie 2005;73:44-50.

38 **Badner JA**, Gershon ES. Meta-analysis of whole-genome linkage scans of bipolar disorder and schizophrenia. Mol Psychiatry. 2002;7:405-11.

39 **Lewis CM**, Levinson DF, Wise LH, et al. Genome scan meta-analysis of schizophrenia and bipolar disorder, part II: Schizophrenia. Am J Hum Genet 2003;73:34-48.

40 **Jönsson EG**, Flyckt L, Burgert E, et al. Dopamine D3 receptor gene Ser9Gly variant and schizophrenia: association study and meta-analysis, Psychiatr Genet 2003;1:1-12.

41 **Glatt SJ**, Faraone SV, Tsuang MT. Meta-analysis identifies an association between the dopamine D2 receptor gene and schizophrenia. Mol Psychiatry 2003;11:911-5.

42 **Abdolmaleky HM**, Faraone SV, Glatt SJ, Tsuang MT. Meta-analysis of association between the T102C polymorphism of the 5HT2a receptor gene and schizophrenia, Schizophr Res 2004;67:53-62.

43 **Fujii Y**, Shibata H, Kikuta R, et al. Positive associations of polymorphisms in the metabotropic glutamate receptor type 3 gene (GRM3) with schizophrenia. Psychiatr Genet 2003;2:71-6.

44 **Lewandowski KE**. Relationship of catechol-O-methyltransferase to schizophrenia and its correlates: evidence for associations and complex interactions. Harv Rev Psychiatry 2007;5:233-44.

45 **Shenton ME**, Dickey CC, Frumin M, McCarley RW. A review of MRI findings in schizophrenia. Schizophr Res 2001;49(1-2):1-52.

46 **Vita A**, De Peri L, Silenzi C, Dieci M. Brain morphology in first-episode schizophrenia: A meta-analysis of quantitative magnetic resonance imaging studies. Schizophr Res 2006;82:75-88.

47 **Boos HB**, Aleman A, Cahn W, Hulshoff, Pol H, Kahn RS. Brain volumes in relatives of patients with schizophrenia: a meta-analysis. Arch Gen Psychiatry 2007;3:297-4.

48 **Falkai P,** Wobrock T; Schneider-Axmann T, Gruber O. Schizophrenia as a Brain Disorder and its Development. Fortschritte der Neurologie, Psychiatrie 2008;76:63-67.

49 **Meisenzahl EM**, Koutsouleris N, Bottlender R, et al. Structural brain abnormalities at different stages of schizophrenia. A voxel based morphometric study. Schizophr Res 2008;104:44-60.

50 **Glahn DC**, Laird AR, Ellison-Wright I, et al. Meta-analysis of gray matter anomalies in schizophrenia: application of anatomic likelihood estimation and network analysis. Biol Psychiatry 2008;64:774-81.

51 **Fornito A,** Yücel M, Patti J, et al. Mapping grey matter reductions in schizophrenia: an anatomical likelihood estimation analysis of voxel-based morphometry studies. Schizophr Res 2009;108:104-13.

52 **Eastwood SL**, Harrison PJ. Interstitial white matter neurons express less reelin and are abnormally distributed in schizophrenia: towards an integration of molecular and morphologic aspects of the neurodevelopmental hypothesis. Mol Psychiatry 2003;8:821-31.

53 **Frotscher M**. Cajal-retzius Cells, Reelin and the formation of Layers. Curr Opin Neurobiol 1998;8:570-75.

54 http://de.wikipedia.org/wiki/Reeler-Maus

55 **Weinberger DR**, Wagner RL, Wyatt RJ. Neuropathological studies of schizophrenia: a selective review. Schizophr Bull 1983;9:193-212.

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

57 **Casanova MF**, Rothberg B. Shape distortion of the hippocampus: a possible explanation of the pyramidal cell disarray reported in schizophrenia. Schizophr Res 2002;55:19-24.

58 **Harrison PJ**. The neuropathology of schizophrenia: a critical review of the data and their interpretation. Brain 1999;122:593-624.

59 **Jönsson SA**, Luts A, Guldberg-Kjaer N, Ohman R. Pyramidal neuron size in the hippocampus of schizophrenics correlates with total cell count and degree of cell disarray. Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci 1999;249:169-73.

60 **Lewis DA**. Structure of the human prefrontal kortex. Am J Psychiatrie 2004;161:1366.

61 **Kolluri N**, Sun Z, Sampson AR, Lewis DA. Lamina-specific reductions in dendritic spine density in the prefrontal kortex of subjects with schizophrenia. Am J Psychiatry 2005;162:1200-2.

62 **Pierri JN**, Chaudry AS, Woo TU, Lewis DA. Alterations in chandelier neuron axon terminals in the prefrontal kortex of schizophrenic subjects. Am J Psychiatry 1999;56:1709-19.

63 **Akbarian S**, Kim JJ, Potkin SG, Hetrick WP, Bunney WE Jr. Maldistribution of interstitial neurons in prefrontal white matter of the brains of schizophrenic patients. Arch Gen Psychiatry 1996;53:425-36.

64 **Kalus P,** Falkai P, Heinz A. Strukturelle und funktionelle Hirnveränderungen bei schizophrenen Psychosen: Hinweis auf eine frühe neuronale Entwicklungsstörung? Nervenarzt 2008;79:275-87.

65 **Walter H**, Erk S, Spitzer M, eds. FMRT: Ein Instrument der psychiatrischen Grundlagenforschung. In Forum Neuroscience Schizophrenie. Stuttgart, Germany: Georg Thieme Verlag 2006;1:49-62.

66 **Minzenberg MJ**, Laird AR, Thelen S, Carter CS, Glahn DC. Meta-analysis of 41 Functional Neuroimaging Studies of Executive Function in Schizophrenia. Psychiatry Res 2009;66:811-22.

67 **Pauly K**, Seiferth NY, Kellermann T, et al. Cerebral dysfunctions of emotion-cognition interactions in adolescent-onset schizophrenia. J Am Acad Child Adolesc Psychiatry 2008;47:1299-310.

68 **Brunet-Gouet E**, Decety J. Social brain dysfunctions in schizophrenia: a review of neuroimaging studies. Psychiatry Res 2006;148:75-92.

69 **Gallagher HL**, Frith CD. Functional imaging of „theory of mind“. Trends Cogn Sci. 2003;7:77-83.

70 **Otte C**, Rädler T. Ätiologie und Pathogenese der Schizophrenie. Naber D, Lambert M, eds. Schizophrenie. Stuttgart, Germany: Georg Thieme Verlag 2004;1:43-56.

71 **Kathmann N**, Hochrein A, Uwer R, Bondy B. Deficits in gain of smooth pursuit eye movements in schizophrenia and affective disorder patients and their unaffected relatives. Am J Psychiatry 2003;160:696-702.

72 **Green MF**. Cognitive impairment and functional outcome in schizophrenia and bipolar disorder. J Clin Psychiatry 2006;67:12.

73 **McDonald C**, Marshall N, Sham PC, et al. Regional brain morphometry in patients with schizophrenia or bipolar disorder and their unaffected relatives. Am J Psychiatry 2006;163:478-487.

74 **DeSilva U**, D'Arcangelo G, Braden V, et al. The human reelin gene: isolation, sequencing, and mapping on chromosome 7. Genome Res 1997;2:157-64.

75 **Royaux I**, Lambert D, Rouvroit C, D'Arcangelo G, Demirov D, Goffinet. AM Genomic organization of the mouse reelin gene. Genomics 1997;2:240-50.

76 http://www.pdb.org/pdb/explore.do?structureId=2E26

77 **D'Arcangelo G**. Reelin mouse mutants as models of kortikal development disorders. Epilepsy Behav 2006;1:81-90.

78 **Fatemi SH**. Reelin glycoprotein: structure, biology and roles in health and disease. Mol Psychiatry 2005;10:251-57.

79 **Beffert U**, Durudas A, Weeber EJ, et al. Functional dissection of Reelin signaling by site-directed disruption of Disabled-1 adaptor binding to apolipoprotein E receptor 2: distinct roles in development and synaptic plasticity. J Neurosci 2006;7:2041-52.

80 http://www. de.wikipedia.org/wiki/Reeler-Maus.

81 **Grayson DR**, Chen Y, Costa E, et al. The human reelin gene: transcription factors (+), repressors (-) and the methylation switch (+/-) in schizophrenia. Pharmacol Ther 2006;1:272-86.

82 **Impagnatiello F**, Guidotti AR, Pesold C, et al. A decrease of reelin expression as a putative vulnerability factor in schizophrenia. Proc Nat Acad Sci 1998;26:15718-23.

83 **Bar I**, Lambert de Rouvroit C, Goffinet AM. The evolution of kortikal development. An hypothesis based on the role of the Reelin signaling pathway. Trends Neurosci 2000;12:633-8.

84 **Guidotti A**, Auta J, Davis JM, et al. Decrease in reelin and glutamic acid decarboxylase 67 (GAD67) expression in schizophrenia and bipolar disorder: a postmortem brain study. Arch Gen Psychiatry 2000;11:1061-9.

85 **Costa E**, Chen Y, Davis J, et al. REELIN and schizophrenia: a disease at the interface of the genome and the epigenome. Mol Interv 2002;1:47-57.

86 **Abdolmaleky HM**, Cheng KH, Russo A, et al. Hypermethylation of the reelin (RELN) promoter in the brain of schizophrenic patients: a preliminary report. Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet 2005;1:60-6.

87 **Sharon L**, Eastwood SL, Harrison PJ. Cellular Basis of Reduced Kortikal Reelin Expression in Schizophrenia. Am J Psychiatry 2006;163:540-42.

88 **Persico AM**, Levitt P, Pimenta AF. Polymorphic GGC repeat differenttially regulates human reelin gene expression levels. J Neural Transm 2006;113:1373-82.

89 **Goldberger C**, Gourion D, Leroy S, Schürhoff F, et al. Population-Based and Family-Based Association Study of 5'UTR Polymorphism of the Reelin Gene and Schizophrenia. Am J Genetics Part B 2005;137:51-55.

90 **Huang C**, Chen C. Absence of association of a polymorphic GGC repeat at the 5'untranslated region of the reelin gene with schizophrenia. Psychiatry Res 2006;142:89-92.

91 **Akahne A**, Kunugi H, Tanaka H, Nanko S. Association analysis of polymorphic CGG repeat in 5'UTR of the reelin and VLDR genes with schizophrenia. Schizophr Res 2002;58:37-41.

92 **Chen ML**, Chen SY, Huang CH, Chen CH. Identification of a single nucleotide polymorphism at the 5'promoter region of human reelin gene and association study with schizophrenia. Mol Psychiatry 2002;7:447-448.

93 **Wedenoja J**, Loukola A, Tuulio-Henriksson A et al. Replication of linkage on chromosome 7q22 and association of the regional Reelin gene with working memory in schizophrenia families. Mol Psychiatry 2008; 7:673-84.

94 **Gregório SP**, Sallet PC, Do KA, Lin E, Gattaz WF, Dias-Neto E. Polymorphisms in genes involved in neurodevelopment may be associated with altered brain morphology in schizophrenia: preliminary evidence. Psychiatry Res 2009;1-2:1-9.

95 **Shifman S**, Johannesson M, Bronstein M, et al. Genome-Wide Association Identifies a Common Variant in the Reelin Gene That Increases the Risk of Schizophrenia Only in Women. PLoS Genet 2008;4:e28.

96 **Bastian P**, Waha A, Müller S, Rücker A. Epigenetische Veränderungen in der Karzinogenese des Prostatakarzinoms. Deutsches Ärzteblatt 2004;27:1981-1985.

97 **Grayson DR**, Jia X, Chen Y, Sharma RP, Mitchell CP, Guidotti A, et al. Reelin promoter hypermethylation in schizophrenia. Proc Nat Acad Sci 2005;26:9341-6.

98 **Tamura Y**, Kunugi H, Ohashi J, Hohjoh H. Epigenetic aberration of the human REELIN gene in psychiatric disorders. Mol Psychiatry 2007;12:593-00.

99 http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Gehirn,_lateral_-_Hauptgyri_%2B_Hauptsulci.svg

100 http://home.arcor.de/eberhard.liss/hirnforschung/Roth-Bild1.jpg

101 **Piechocki MP**, Hines RN. Oligonucleotide design and optimized protocol for site-directed mutagenesis. Biotechniques 1994;16:702-7.

102 **Mullis KB**. The unusual origin of the polymerase chain reaction. Sci Am 1990;262:56-61, 64-5.

103 **Sambrook J**, Russell D. Molecular Cloning 2001;2:8.1-8.24.

104 **Sambrook J**, Russell D. Molecular Cloning 2001;2:5.4-5.17.

105 **Skolnick MH**, White R. Strategies for detecting and characterizing restriction fragment length polymorphisms (RFLP's). Cytogenet Cell Genet 1982;32:58-67.

106 **Schlötterer C**. Evolutionary dynamics of microsatellite DNA. Chromosoma 2000;109:365-71.

107 **Weber JL,** Wong C. Mutation of human short tandem repeats. Hum Mol Genet 1993;2:1123-8.

108 **Bennett P**. Demystified Microsatellites. J Clin Pathol:Mol Pathol 2000;53:177-183

109 **Myers RH**. Huntington's Disease Genetics. NeuroRx 2004;2:255-62.

110 **Kol G**, Lev-Maor G, Ast G. Human-Mouse Comparative Analysis reveals that Branch-site plasticity contributes to splicing regulation. Hum Mol Genet 2005;14:1559-68.

111 **Stamm S**, Ben-Ari S, Rafalska I et al. Function of alternative splicing. Gene 2005;344:1-20.

112 **Chatterjee S,** Pal JK. Role of 5'- and 3'-untranslated regions of mRNAs in human diseases. Biol Cell 2009;101:251-62.

113 **West AG,** Fraser P. Remote control of gene transcription. Hum Mol Genet 2005;14:101-11.

114 **Bondarenko VA**, Liu YV, Jiang YI, Studitsky VM. Communication over a large distance: enhancers and insulators. Biochem Cell Biol 2003;81:241-51.

115 **Hunt R**, Sauna ZE, Ambudkar SV, Gottesman MM, Kimchi-Sarfaty C. Silent (synonymous) SNPs: should we care about them? Methods Mol Biol 2009;578:23-39.

8 Tabellen und Abbildungen

Tabelle 1: Zusammenfassung von ICD-10 und DSM-IV 8
Tabelle 2: Ergebnisse von Zwillingsstudien bei Schizophrenie nach Maier et al. 1999 13
Tabelle 3: Relevante Chromosomenregionen aus zwei Metaanalysen 14
Tabelle 4: Zusammenfassung der SNPs 35
Tabelle 5: Zusammenfassung der PCR-Bedingungen für die SNPs 37
Tabelle 6: Zusammenfassung der Mikrosatelliten 40
Tabelle 7: Überblick über Mikrosatelliten-Primer 41
Tabelle 8: Zusammenfassung der Reaktionsbedingungen für die Mikrosatellitenanalyse 42
Tabelle 9: Zusammensetzung der einzelnen Multiplex-PCRs 43
Tabelle 10: Geschlechtsverteilung der Kontrollgruppe 47
Tabelle 11: Geschlechtsverteilung der Patientengruppe 47
Tabelle 12: Mittelwerte der Volumina, gesamt und getrennt nach Diagnose 48
Tabelle 13: Gehirnareale mit signifikanten Unterschieden zwischen Kontrollen und Patienten . 49
Tabelle 14: SNP Verteilung in Population und im Experiment 50
Tabelle 15: SNP Ausprägungen im Gesamtkollektiv und getrennt nach Diagnose 51
Tabelle 16: Signifikanzwerte und relatives Risiko von rs17286505 und rs264373 52
Tabelle 17: Signifikante Volumenveränderungen durch rs2965087 53
Tabelle 18: Signifikante Volumenveränderungen durch rs1062831 53
Tabelle 19: Signifikante Volumenveränderungen durch rs736707 54
Tabelle 20: Signifikante Volumenveränderungen durch rs2229864 54
Tabelle 21: Signifikante Volumenveränderungen durch rs17286505 55
Tabelle 22: Signifikante Volumenveränderungen bei den Kontrollen durch rs17286505 55
Tabelle 23: Signifikante Volumenveränderungen durch rs264373 56
Tabelle 24: Signifikante Volumenveränderungen bei den Kontrollen durch rs264373 57
Tabelle 25: Signifikante Volumenveränderungen bei den Patienten durch rs264373 57
Tabelle 26: Signifikanzwerte und relatives Risiko von rs17286505dom G und rs264373dom C 58
Tabelle 27: Signifikant beeinflusste Gehirnareale durch rs2965087 im Dominanzmodell A 59
Tabelle 28: Signifikant beeinflusste Gehirnareale durch rs2965087 im Dominanzmodell G 59
Tabelle 29: Signifikant beeinflusste Gehirnareale durch rs1062831 im Dominanzmodell G 60
Tabelle 30: Signifikant beeinflusste Gehirnareale durch rs362746 im Dominanzmodell G 60
Tabelle 31: Signifikant beeinflusste Gehirnareale durch rs17286505 im Dominanzmodell C 61

Tabelle 32: Signifikant beeinflusste Gehirnareale durch rs264373 im Dominanzmodell G 61
Tabelle 33: Block 1, Frequenzen der Haplotypen im Experimentalkollektiv und getrennt nach Diagnose 62
Tabelle 34: Block 2, Frequenzen der Haplotypen im Experimentalkollektiv und getrennt nach Diagnose 63
Tabelle 35: Block 3, Frequenzen der Haplotypen im Experimentalkollektiv und getrennt nach Diagnose 64
Tabelle 36: Signifikante Gehirnareale durch die Haplotypen des ersten Blocks 65
Tabelle 37: Signifikante Gehirnareale durch die Haplotypen des zweiten Blocks 66
Tabelle 38: Signifikante Gehirnareale durch die Haplotypen des dritten Blocks 67
Tabelle 39: MS1, kleineres Allel, gesamt und getrennt nach Diagnose 68
Tabelle 40: MS 1, größeres Allel, gesamt und getrennt nach Diagnose 68
Tabelle 41: MS 5, kleineres Allel, gesamt und getrennt nach Diagnose 69
Tabelle 42: MS 5, größeres Allel, gesamt und getrennt nach Diagnose 69
Tabelle 43: MS 7, kleineres Allel, gesamt und getrennt nach Diagnose 69
Tabelle 44: MS 7, größeres Allel, gesamt und getrennt nach Diagnose 70
Tabelle 45: MS 9, kleineres Allel, gesamt und getrennt nach Diagnose 70
Tabelle 46: MS 9, größeres Allel, gesamt und getrennt nach Diagnose 70
Tabelle 47: MS 10, kleineres Allel, gesamt und getrennt nach Diagnose 71
Tabelle 48: MS 10, größeres Allel, gesamt und getrennt nach Diagnose 71
Tabelle 49: MS 11, kleineres Allel, gesamt und getrennt nach Diagnose 71
Tabelle 50: MS 11, größeres Allel, gesamt und getrennt nach Diagnose 72
Tabelle 51: MS 14, kleineres Allel, gesamt und getrennt nach Diagnose. 72
Tabelle 52: MS 14, größeres Allel, gesamt und getrennt nach Diagnose 72
Tabelle 53: MS 15, kleineres Allel, gesamt und getrennt nach Diagnose 73
Tabelle 54: MS 15, größeres Allel, gesamt und getrennt nach Diagnose 73
Tabelle 55: Signifikanz und Odds Ratio von MS 1 und MS 15. 73
Tabelle 56: Signifikant beeinflusste Gehirnareale durch MS 1 75
Tabelle 57: Signifikant beeinflusste Gehirnareale durch MS 7 75
Tabelle 58: Signifikant beeinflusste Gehirnareale durch MS 9 75
Tabelle 59: Signifikant beeinflusste Gehirnareale durch MS 14 76
Tabelle 60: Signifikant beeinflusste Gehirnareale durch MS 15 77

Abbildung 1: Schematische Darstellung der Corticoneogenese 17
Abbildung 2: Intron und Exon Einteilung im Reelingen 21
Abbildung 3: Dreidimensionales Modell des Reelinproteins 21
Abbildung 4: Signalkaskade von Reelin 22
Abbildung 5: Immunhistochemische Färbung (Zellkern "Neu-N") eines Frontalschnittes durch eine Wildtyp-Hemisphäre (links) und einer Hemisphäre der Reeler-Maus (rechts) 23
Abbildung 6 und Abbildung 7: Darstellung der untersuchten Gyri und Gehirnareale 30
Abbildung 8: Beispiel einer Gelplatte mit elektrophoretisch getrennten DNA-Proben aus Humanblut. 39
Abbildung 9: Beispiel für die Auftrennung eines Dinukleotid-Repeats aus Humanblut 44
Abbildung 10: Darstellung der signifikanten Polymorphismen und ihrer Lokalisation innerhalb des Gens 82

10 Abkürzungen

°C	Grad Celsius
µl	Mikroliter
A	DNA-Base, Adenin
ApoER2	Apolipoprotein E Rezeptor 2
Aqua dest.	Aqua destillatum
BLAST	Basic Local Alignement Search Tool
BOLD	blood oxygen level Dependent
bp	Basenpaare
C	DNA-Base, Cytosin
CCD	Charge Coupled Device
CCM	Charité Campus Mitte
CEPH	Centre d'Etude du Polymorphisme Humain
CEU	spezielles europäisches Sample aus HapMap
CGI	clinical global impressions scale, deutsch: klinischer Gesamteindruck
COMT	Catecholamin-Oxidase-Methyltransferase
CPT	contigues performans Test, Daueraufmerksamkeitsstest
CR	Cajal Retziuszellen
Dab1	Disabled-1Gen
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DRD-2	Dopamin-2-Rezeptor
DRD-3	Dopamin-3-Rezeptor
DSM-IV	Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders
DZ	Dizygote Zwillinge
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
fMRT	funktionelle Magnetresonanztomographie
G	DNA-Base, Guanin
GABA	Gamma-Amino Buttersäure
GAD	Glutaminsäuredecarboxylase
GRM 3	metabotroper Glutamatrezeptor
HapMap	Projekt zur Kartographierung der Haplotypen des menschlichen Genoms
5-HT	5-Hydroxytryptamin, Serotonin
ICD-10	International Classification of Diseases, Injuries and Causes of Death
kb	Kilobasen
kDA	Kilodalton
LOD	linkage odds desequilibrium, Maß der Kopplung
mA	Milliampere
$MgCl_2$	Magnesiumchlorid

min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimol
mm^3	Kubikmillimeter
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
MRT	Magnetresonanztomographie
MS	Mikrosatellit
MZ	Monozygote Zwillinge
N-Back	Test mit kontinuierlicher Variation der Gedächtnisbelastung
NCBI	National Center for Biotechnology Information
Ncl.	Nucleus
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
NR2B	Neuroregulin
OR	odds ratio, Chancenverhältnis
p	aus der Statistik: hier Irrtumswahrscheinlichkeit
PANSS	engl.: positive and negative syndrome scale, deutsch: Positiv und Negativsyndrom Skala
PCR	Polymerasekettenreaktion
PET	Positronenemissionstomographie
Primer F	Primer forward
Primer R	Primer reward
RELN	Reelin
rpm	Runden pro Minute
SCID	Strukturiertes klinisches Interview für DSM-IV
SNP	Single Nukleotid Polymorphism
SPM	Statistical Parametric Mapping
SYBR	Eigenname des Färbemittels
T	DNA-Base, Thymin
T als Einheit	Teslar
Taq	*Thermus aquaticus*
TBE	Tris-borate-EDTA
U	Units
USCS	University of Santa Cruz
UTR	untranslated Region
UV	ultraviolett
V	Volt
VBM	voxel based Morphometry
VLDLR	very low density lipoprotein (VLDL) Rezeptor
ZNS	zentrales Nervensystem

10 Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde in der Klinik für Psychiatrie und Psychotherapie der Charité-Universitätsmedizin Berlin durchgeführt.

Mein besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. med. Imke Puls, Herr Dr. rer. nat. Werner Kitzrow und Frau Sarina Richter für die Möglichkeit zur Durchführung der vorliegenden Arbeit in ihrer Forschungsgruppe und vor allem für ihre ständige Präsenz und Hilfestellung bei allen aufgetretenen Problemen und Fragestellungen.

Ich danke meiner Familie und meinem Ehemann für die emotionale Unterstützung und die notwendige Geduld, die solch ein großer Schritt bedarf.

Ich danke Judith Kaste, Anne Schönemann und Gitte Barknowitz, die mir mit ihrem psychologischen und biologischen Fachwissen in vielen gemeinsamen Stunden zur Seite standen.

11 Eidesstattliche Erklärung

„Ich, Claudia Elisabeth Bröckert, geb. Liensdorf, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema: „Genetische Assoziationsstudie zwischen verschiedenen Polymorphismen von Reelin mit der Diagnose Schizophrenie und Volumina krankheitsassoziierter Gehirnareale“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Berlin, den 27. Januar 2010

_____

Claudia Bröckert

12 Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.