

Assoziationsanalysen am *D-Amino-Acid-Oxidase*-Genlocus (*DAO*)
und schizophrenen Störungen

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Hohen Medizinischen Fakultät
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität
Bonn

Husam Suliman
aus Bonn

2010

Angefertigt mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: PD Dr. Johannes Schumacher
2. Gutachter: Prof. Dr. Max P. Baur

Tag der Mündlichen Prüfung: 22.03.2010

Aus dem Institut für Humangenetik der Universität Bonn
Direktor: Prof. Dr. med. M. M. Nöthen

Für meinen Vater

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	9
2	Theoretische Grundlagen	10
2.1	Schizophrene Störungen	10
2.1.1	Klinisches Erscheinungsbild	10
2.1.2	Epidemiologie, Verlauf und Prognose	10
2.1.3	Empirisch-genetische Untersuchungen	11
2.1.3.1	Familienstudien	11
2.1.3.2	Zwillingsuntersuchungen	13
2.1.3.3	Adoptionsuntersuchungen	14
2.1.3.4	Genetischer Übertragungsmechanismus	16
2.2	Genetisch komplexe Erkrankungen	16
2.2.1	Assoziationsuntersuchungen	17
2.2.2	Kopplungsungleichgewicht	18
2.3	Molekulargenetische Befunde bei schizophrenen Störungen	18
2.3.1	Chromosom 13q34 – Das <i>G72</i> -Gen	19
2.3.2	Chromosom 12q24 – Das <i>DAO</i> -Gen	19
2.3.3	Assoziationsanalysen am <i>DAO</i> -Genlocus und schizophrenen Störungen	20
2.4	Die glutamaterge Neurotransmission und schizophrene Störungen	23
2.4.1	N-Methyl-D-Aspartat-Rezeptoren	23
2.4.2	D-Serin und <i>D-amino acid oxidase</i>	24
3	Zielsetzung der vorliegenden Arbeit	26
4	Material und Methoden	27
4.1	Untersuchungskollektiv	27
4.2	Laborchemische Untersuchungen	27
4.2.1	Untersuchte Varianten	27
4.2.2	Isolierung und Aufbereitung der humanen genomischen DNA	30
4.2.3	Das Prinzip der Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	31

4.2.4	PCR für die Genotypisierung der STR-Marker (ABI 377 Sequenzer)	32
4.2.5	PCR für die Genotypisierung der SNP-Marker (TaqMan, Tecan 324)	33
4.2.6	Elektrophorese auf dem Automatischen Sequenzierer (ABI 377)	34
4.2.6.1	Vorbehandlung der Glasplatten	34
4.2.6.2	Herstellung des 4,25%igen Polyacrylamidgels	34
4.2.6.3	Elektrophorese	35
4.2.7	Bestimmung der PCR-Fragmentlängen	35
4.2.8	Analyse der Genotypen	35
4.2.9	Statistische Auswertung	36
5	Ergebnisse	37
5.1	Einzelmarkeranalyse	37
5.1.1	SNP rs987044	38
5.1.2	SNP rs11114071	38
5.1.3	SNP rs3916982	39
5.1.4	SNP rs7136681	39
5.1.5	SNP-1-Intron1	40
5.1.6	SNP rs4964766	40
5.1.7	SNP rs2070586	41
5.1.8	SNP-2-Intron1	41
5.1.9	SNP rs2111902	42
5.1.10	SNP rs7980427	42
5.1.11	SNP rs3918346	43
5.1.12	SNP rs3741775	43
5.1.13	SNP rs11114086	44
5.1.14	SNP rs3825251	44
5.1.15	SNP rs3918347	44
5.1.16	SNP-3-Exon11	45
5.1.17	SNP rs7313861	45
5.1.18	SNP rs10746135	46
5.1.19	SNP rs3918305	46
5.1.20	STR-Marker STR-1-dao2 und STR-2-dao3	46

5.2	Multimarkeranalyse.....	47
5.2.1	Haplotyp-Block 1	47
5.2.2	Haplotyp-Block 2.....	48
5.2.3	Haplotyp-Block 3	49
6	Diskussion	51
Anhang	62
Literaturverzeichnis.....		66
Datenbanken		76
Danksagung		77

Abkürzungsverzeichnis

Aqua dest.	<i>lat.</i> Aqua destillata (destilliertes Wasser), auch Aqua bidest.
CI	Confidence Interval (Konfidenzintervall)
DAO	<i>D-Amino-Acid-Oxidase</i> -Gen, alternativ <i>DAAO</i> oder <i>DAMOX</i> (MIM124050)
DAOA	<i>D-Amino-Oxidase-Activator</i> -Gen (alternativ <i>G72</i>)
df	<i>engl.</i> Degree of Freedom (Freiheitsgrad im χ^2 -Test)
DISC1	Disrupted-In-Schizophrenia-1-Gen
dNTP	Desoxy-Nukleosidtriphosphat
DTNBP1	Dysbindin-Gen
DZ	Dizygote Zwillinge
GRIN	<i>engl.</i> Glutamat Receptor, Ionotropic, N-Methyl-D-Aspartate, Subunit
GWAS	Genomweite Assoziationsanalysen
HWE	<i>engl.</i> Hardy-Weinberg-Equilibrium (Hardy-Weinberg-Gleichgewicht)
IMBIE	Institut für Informatik und Epidemiologie des Universitätsklinikums Bonn
LCL	Lymphoblastoide Zelllinien
LD	<i>engl.</i> Linkage Disequilibrium (Kopplungsungleichgewicht)
MIM	<i>engl.</i> Mendelian Inheritance in Man
MZ	Monozygote Zwillinge
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
NRG1	Neuregulin-1-Gen
OMIM	<i>engl.</i> Online Mendelian Inheritance in Man
OR	<i>engl.</i> Odds Ratio
PAH	Phenylalanin-Hydroxylase-Gen
PCP	Phencyclidin (<i>Angel Dust</i>)
PCR	<i>engl.</i> Polymerase Chain Reaction (Polymerase-Kettenreaktion)
pH	<i>lat.</i> potentia Hydrogenii
SNP	<i>engl.</i> Single-Nucleotide-Polymorphism
STR	<i>engl.</i> Short-Tandem-Repeat
UCSC	University of California, Santa Cruz

1 Einleitung

Schizophrene Störungen stellen mit einer Lebenszeitprävalenz von ca. 1% bei beiden Geschlechtern eine der am häufigsten auftretenden psychiatrischen Krankheiten dar. Im Allgemeinen manifestiert sich die Erkrankung im frühen Erwachsenenalter, oft noch vor Vollendung des 30. Lebensjahres und bei Männern in der Regel früher als bei Frauen. Nur etwa 30% aller Erkrankten erleben nach der ersten Episode eine Vollremission, wohingegen ca. 50% im Verlauf der Krankheit eine oftmals persistierende Residualsymptomatik entwickeln. Diese äußert sich in starken emotionalen, sozialen und/oder kognitiven Defiziten (Huber 2005). Die Symptome stellen für die Betroffenen und deren Familien eine große Belastung dar. Zudem wird etwa die Hälfte aller Patienten mit einer schizophrenen Störung im Laufe ihres Lebens einen Suizidversuch unternehmen; etwa 10% mit Erfolg (Caldwell und Gottesman 1992). Die schizophrenen Störungen zählen somit zu den schwerwiegendsten psychiatrischen Erkrankungen.

Neben zahlreichen Einflüssen aus der Umwelt werden erbliche Faktoren als wichtige Ursache angesehen. Ein aussichtsreicher Ansatz zur Aufklärung der ätiologischen Faktoren schizophrener Störungen liegt daher in der molekularen Genetik. Dabei weisen aktuelle Assoziationsbefunde darauf hin, dass der glutamatergen Neurotransmission für die Entstehung schizophrener Störungen eine Bedeutung zukommt (Abou Jamra et al. 2006). Diese Hinweise bilden die Grundlage der vorliegenden Arbeit.

2 Theoretische Grundlagen

2.1 Schizophrene Störungen

2.1.1 Klinisches Erscheinungsbild

Das Krankheitsbild der schizophrenen Störungen ist ausgesprochen vielgestaltig. Vielfach wird daher auch von einem Formenkreis schizophrener Störungen gesprochen. Eugen Bleuler (1857-1939) differenzierte zwischen Grundsymptomen (Störungen des Denkens, der Affektivität und des Antriebes) und akzessorischen Symptomen (Wahn, Halluzinationen und katatone Störungen). Nach dem Konzept von Kurt Schneider (1887-1967) unterscheidet man zwischen Symptomen ersten und zweiten Ranges. Entscheidend für die Diagnose einer Schizophrenie sind dabei die Symptome ersten Ranges. Hierzu zählen akustische Halluzinationen (Kommentar-, Dialog- oder Imperativstimmen), Störungen des Ich-Erlebens (Gedankenbeeinflussung, Identitätsverlust, Durchlässigkeit der Ich-Grenzen und -Gefühle) und Veränderungen der Wahrnehmung (Wahnwahrnehmung). Die im deutschsprachigen Raum gebräuchlichen Diagnosekriterien des *ICD-10* (WHO 2004) orientieren sich am Konzept von Kurt Schneider. Das im angelsächsischen Raum gebräuchliche *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders* (DSM-IV 1994) ist dagegen mehr symptomorientiert und basiert auf der Unterteilung in Positivsymptomatik (Wahnphänomene, Halluzinationen, desorganisierte Sprache, grob desorganisiertes oder katatonisches Verhalten) und Negativsymptomatik (Affektverflachung, Alogie und Willensschwäche).

2.1.2 Epidemiologie, Verlauf und Prognose

Das Lebenszeitrisiko, an einer Schizophrenie zu erkranken, liegt bei etwa 1% (DSM-IV 1994). Die Erkrankung beginnt in der Regel zwischen der Pubertät und dem 30. Lebensjahr. Häufigkeitsgipfel zeigen sich bei Männern zwischen dem 20. und 25. Lebensjahr, bei Frauen zwischen dem 25. und 30. Lebensjahr. Bei ungefähr 50% der Fälle kommt es nach einer oder mehreren Episoden zur Ausbildung einer Residualsymptomatik (Huber 2005). Eine vollständige Remission mit Rückkehr zum prämorbidem Leistungsniveau ist hingegen seltener. Als Prädiktoren für eine günstige Prognose gelten unter anderem ein spätes Ersterkrankungsalter, ein akuter Erkrankungsbeginn, eine ausgeprägte Positivsymptomatik, eine gute prämorbidie Anpassung, ein ausgeglichenes emotionales Familienmilieu und eine unkomplizierte Persönlichkeitsstruktur (Huber 2005).

2.1.3 Empirisch-genetische Untersuchungen

Nur wenige ätiologisch relevante Risikofaktoren für die Ausbildung einer schizophrenen Störung konnten bislang identifiziert werden. Beispielsweise postuliert die Arbeitsgruppe um Torrey einen Zusammenhang zwischen dem erhöhten Geburtenaufkommen Betroffener in Winter- und Frühjahrsmonaten und erhöhten Infektionsrisiken der schwangeren Mütter durch Influenza und Coxsackie B-Viren als mögliche Krankheitsursache (Torrey et al. 1997). Ergebnisse von Verdoux et al. (1997) deuten darauf hin, dass Mütter von Schizophrenen 2,7-fach häufiger eine positive Anamnese prä- und perinataler Komplikationen aufweisen. Eine positive lineare Korrelation zwischen der Inzidenz schizophrener Störungen und der Bevölkerungsdichte konnte eine Studie aus den Niederlanden zeigen (Marcelis et al. 1998). Bei den genannten Faktoren handelt es sich jedoch um schwache und unspezifische Risiken, die auch für andere psychiatrische Erkrankungen zutreffen.

Den stärksten Prädiktor für die Ausbildung einer schizophrenen Störung stellt demgegenüber die genetische bzw. familiäre Belastung dar. Die Bedeutung der genetischen Faktoren am Entstehungsprozess schizophrener Störungen konnte durch eine Vielzahl von Familien-, Zwillings- und Adoptionsstudien belegt werden.

2.1.3.1 Familienstudien

In der bisher umfangreichsten Übersichtsarbeit fasste Gottesman (1991) die Ergebnisse von über 40 Familienstudien zusammen, die an belasteten Familien vorwiegend europäischer Herkunft erhoben wurden (s. Tabelle 1). In späteren Familienstudien, bei denen auch moderne und operationalisierte Diagnosesysteme Verwendung fanden, wurden ähnliche Risikoziffern ermittelt (Cardno und Gottesman 2000, Kendler und Diehl 1993, Maier et al. 1993, Parnas et al. 1993). Bei den Familienstudien konnten zwei Faktoren identifiziert werden, die einen besonderen Einfluss auf das Erkrankungsrisiko haben. Zum einen steigt das Erkrankungsrisiko mit der Zunahme des Verwandtschaftsgrades zu einem Betroffenen. Entsprechend haben monozygote Zwillinge ein Risiko von 48%, an einer schizophrenen Störung zu erkranken, wenn der andere Zwilling bereits erkrankt ist. Mit zunehmender Entfernung der Verwandtschaft zu einem Betroffenen tritt der entsprechend gegenteilige Effekt auf, d. h. das Erkrankungsrisiko sinkt. Zum anderen steigt das Morbiditätsrisiko mit der Anzahl erkrankter Familienmitglieder. So liegt das Risiko eines Kindes von einem betroffenen Elternteil bei 13%, ebenfalls zu erkranken. Ist zusätzlich noch ein Geschwister schizophren erkrankt, steigt das Risiko auf 17%. Sind beide Elternteile von einer

schizophrenen Störung betroffen, liegt das Erkrankungsrisiko sogar bei 46% (s. Tabelle 1).

A. Lebenszeitrisko von Familienangehörigen schizophrener Patienten

Verwandschaftliche Beziehung	Anteil gemeinsamer Gene (%)	Morbiditätsrisiko (%)
Basisrisiko		1%
Drittgradig Verwandte	12,5%	
Cousins und Cousine		2%
Zweitgradig Verwandte	25%	
Enkelkinder		5%
Erstgradig Verwandte	50%	
Eltern		6%
Geschwister		9%
Kinder		13%
Geschwister bei einem zusätzlich betroffenen Elternteil		17%
Kind mit zwei betroffenen Elternteilen		46%

B. Konkordanzraten für mono- und dizygote Zwillinge

	Anteil gemeinsamer Gene (%)	Morbiditätsrisiko (%)
Dizygote Zwillinge	50%	17%
Monozygote Zwillinge	100%	48%

Tabelle 1: Ergebnisse von Familien- (A) und Zwillingsstudien (B) bei schizophrenen Störungen (entnommen aus Gottesmann 1991).

Unterschiedliche genetische Komponenten werden auch für die individuelle Ausprägung schizophrener Störungen von Bedeutung sein (Verlauf, Prägnanztypen). Diese (genetische) Heterogenität stellt ein Problem bei den formal- und molekulargenetischen Analysen dar. Ziel zahlreicher Forschungsarbeiten war es daher, spezifische Krankheitsfaktoren zu identifizieren, die eine (genetische) Homogenisierung schizophrener Störungen ermöglichen. Diesbezüglich scheint dem Erstmanifestationsalter nach einer Studie der Arbeitsgruppe um Kendler keine große Bedeutung zuzukommen (Kendler et al. 1996). So zeigte sich, dass das Ersterkrankungsalter nicht mit einer hohen familiären Belastung korreliert ist. Eine weitere Studie von Kendler und Diehl (1993) zeigte ebenfalls keine familiäre Häufung von bestimmten Verlaufsformen schizophrener Störungen (paranoid-halluzinatorisch, hebephren, kataton). Die Arbeitsgruppe um

Beckmann berichtet hingegen von einer starken intrafamiliären Homogenität mit beinahe autosomal-dominantem Erbgang bei der periodischen Katatonie, einer Verlaufsform schizophrener Störungen unter Verwendung der kaum gebräuchlichen nosologischen Einteilung nach Leonhard (Beckmann et al. 1996, Leonhard 1957).

In Familien von Personen mit schizophrener Störung zeigen sich auch gehäuft andere psychiatrische Erkrankungen. So wurde eine Häufung der sog. Spektrumerkrankungen beobachtet. Es handelt sich um Symptome, die denen einer schizophrenen Störung ähnlich sind. Die Arbeitsgruppen um Kendler und um Maier konnten unabhängig voneinander eine deutliche Häufung von Spektrumerkrankungen in Familien Schizophrener finden (Kendler et al. 1993, Maier et al. 1994). Auch schizotype Persönlichkeitsstörungen und schizoaffektive Störungen zeigen eine Kosegregation mit schizophrenen Störungen (Cardno et al. 1999, Kendler et al. 1994). Aufgrund der empirischen Beobachtungen liegt die Vermutung nahe, dass den genannten Störungen zum Teil die gleichen genetischen Dispositionsfaktoren zugrunde liegen wie den schizophrenen Störungen.

Ebenfalls häufig mit der Schizophrenie einhergehend ist eine ausgeprägte depressive Symptomatik, der erst in jüngster Vergangenheit auch klinisch eine größere Beachtung zukommt (Birchwood et al. 2000, Maina et al. 2001, Marino et al. 1993). So hat man im Rahmen der Schizophrenie-Früherkennung festgestellt, dass eine Vielfalt der sog. prodromalen Symptome einer Depression sehr nahe kommt und diese bereits bis zu fünf Jahre vor dem eigentlich klinischen Ausbruch der Schizophrenie bestehen (Chapman et al. 1994, Häfner et al. 2004, Rosen et al. 2006).

2.1.3.2 Zwillingsuntersuchungen

Eine weitere Möglichkeit zum Nachweis des Einflusses genetischer Faktoren am Entstehungsprozess schizophrener Störungen liegt in der Durchführung von Zwillingsuntersuchungen. So lässt der Vergleich zwischen den Konkordanzraten mono- und dizygoter Zwillingspaare einen Rückschluss auf den genetischen Anteil an der Krankheitsentstehung zu.

Gottesman fasste zahlreiche zwischen 1963 und 1987 durchgeführte Studien an Zwillingspartnern schizophren Erkrankter zusammen (s. Tabelle 1). Hierbei zeigten sich Konkordanzraten von 48% bei monozygoten Zwillingen (MZ) und von 17% bei dizygoten Zwillingen (DZ) (Gottesman und

Wolfgram 1991). In jüngerer Zeit wurden fünf weitere Zwillingsuntersuchungen durchgeführt. Dabei fanden operationalisierte Diagnosekriterien Anwendung. Hierbei zeigten sich Konkordanzraten unter monozygoten Zwillingspaaren, die zwischen 41% (Cardno et al. 1999) und 48% (Onstad et al. 1991) liegen. Die Konkordanzrate für monozygote Zwillingspaare erhöhte sich unter Berücksichtigung weiterer Erkrankungen des schizophrenen Formenkreises sogar auf 65% (Franzek und Beckmann 1998). Für dizygote Zwillingspaare zeigten sich Konkordanzraten bis zu 11% (Klaning et al. 1996). Auch für zweieiige Zwillinge erhöhte sich die Konkordanzrate, wenn das Phänotypspektrum erweitert wurde; sie lag bei 28% (Franzek und Beckmann 1998).

Aus den genannten Untersuchungen haben mehrere Autoren die erklärbare ätiologische Varianz (Heritabilität) genetischer Faktoren geschätzt. Gottesman zufolge liegt sie zwischen 41% und 86% (Gottesman und Wolfgram 1991). Cardno et al. (1999) geben eine Heritabilität von 82% bis 84% an und in der Untersuchung von Cannon et al. (1998) ergab sich eine Heritabilität von 83%. Nach einer Metaanalyse, der viele der o. g. Untersuchungen zugrunde gelegt wurden, kommt genetischen Faktoren ein Anteil von etwa 84% an der Ätiologie der schizophrenen Störungen zu (Cardno und Gottesman 2000).

Dass die genetisch disponierenden Faktoren auch über phänotypisch nicht erkrankte Individuen übertragen werden, konnten Zwillingsuntersuchungen ebenfalls nachweisen. So fanden Gottesman und Bertelsen (1989) bei Untersuchungen der Nachkommen diskordant-betroffener Zwillingspaare vergleichbar erhöhte Erkrankungsziffern bei Nachkommen des erkrankten als auch des nicht-erkrankten Zwillings.

2.1.3.3 Adoptionsuntersuchungen

Um eine zuverlässigere Aussage darüber treffen zu können, inwieweit die beobachtete familiäre Häufung einer Erkrankung auf genetische Faktoren oder Umweltfaktoren zurückzuführen ist, reichen Familien- und Zwillingsstudien nicht aus. Adoptionsstudien stellen dabei einen guten Ansatz dar, den Beitrag genetischer Faktoren unabhängig von peristatischen Faktoren zu beurteilen.

In drei Studien zeigten sich dabei übereinstimmend signifikant erhöhte Erkrankungsrisiken für aus Familien schizophrener Eltern adoptierter Kinder im Vergleich mit Kontrollkollektiven (Higgins 1976, Tienari und Wynne 1994, Wender et al. 1974). Weiterführende Untersuchungen ergaben, dass das Erkrankungsrisiko adoptierter Kinder nicht betroffener Eltern unabhängig

davon ist, ob sie in einer Familie mit oder in einer Familie ohne betroffenen Elternteil aufwuchsen (Wender et al. 1974). Higgins (1976) konnte zusätzlich zeigen, dass es keinen Einfluss auf das Erkrankungsrisiko hat, wenn Kinder von schizophrenen Eltern in einer gesunden Adoptivfamilie oder bei ihren biologischen Eltern aufwachsen. Ein erkrankter Elternteil scheint somit kein entscheidender "Umweltfaktor" bei der Krankheitsentstehung zu sein.

Weiterhin besteht die Möglichkeit, das Erkrankungsrisiko der Angehörigen von adoptierten Schizophrenen mit dem von Angehörigen nicht betroffener Adoptivkinder zu vergleichen. Kety et al. (1994) analysierten die Ergebnisse zwei zuvor durchgeführter dänischer Adoptionsstudien. Den Untersuchungen wurde die Krankheitsklassifikation von Eugen Bleuler zugrunde gelegt, wobei die Diagnose *chronische Schizophrenie* enge Krankheitskriterien erfüllte und die Diagnose *latente Schizophrenie* zudem Erkrankungen mit Schizophrenie-ähnlicher Symptomatik einschloss. Sie konnten zeigen, dass 5% der biologischen Angehörigen schizophrener Patienten an einer *chronischen Schizophrenie* erkrankt waren, im Gegensatz zu 0,4% der Angehörigen des Kontrollkollektivs. Unter Verwendung der Definition *latente Schizophrenie* stieg das Erkrankungsrisiko auf 10,8% bei biologisch Verwandten von Schizophrenen gegenüber 1,7% bei Angehörigen des Kontrollkollektivs.

Kendler et al. (1994) führten eine Re-Analyse dieser Untersuchung unter Verwendung von DSM-III-Kriterien durch, die ähnliche Ergebnisse zeigte. Dass auch schizoaffektive Störungen und schizotype Persönlichkeitsstörungen signifikant häufiger bei biologischen Familienangehörigen adoptierter Schizophrener vorkommen, fand ebenfalls Bestätigung.

Zusammenfassend erlauben die durchgeführten Adoptionsuntersuchungen folgende Aussagen: (1) An der Entstehung von Schizophrenien haben genetische Faktoren einen entscheidenden Anteil. (2) Die genetische Disposition lässt sich auch auf Schizophrenie-verwandte Störungen erweitern. (3) Familiär-spezifische Faktoren scheinen als disponierende Risikofaktoren bei der Krankheitsentstehung keine große Bedeutung zu haben. Zu diesem Ergebnis kommen auch alle durchgeführten Familienuntersuchungen.

2.1.3.4 Genetischer Übertragungsmechanismus

Übereinstimmend weisen die formalgenetischen Untersuchungen darauf hin, dass die schizophrenen Störungen zu den genetisch komplexen (multifaktoriellen) Krankheiten zählen. Dabei liegen bei einem Individuum gleichzeitig Risikovarianten in mehreren Vulnerabilitätsgenen vor, wobei auch exogene Faktoren die Krankheitsdisposition beeinflussen. Die Vulnerabilitätsgene werden dabei in individueller Kombination bei Erkrankten vorliegen und in Wechselwirkung mit anderen Genen und exogenen Faktoren zur Erkrankung führen.

2.2 Genetisch komplexe Erkrankungen

Neben den zytogenetisch erfassbaren Erkrankungen waren es anfangs die monogenen Krankheiten, die mit modernen molekulargenetischen Methoden aufgeklärt wurden. So konnten bis heute über 2500 monogene Erkrankungen molekulargenetisch charakterisiert und über die Datenbank *Online Mendelian Inheritance in Man* (OMIM) öffentlich gelistet werden (McKusick 2007). Monogen vererbte Erkrankungen sind auf Defekte in einem einzelnen Gen zurückzuführen und folgen den Mendelschen Regeln. Demgegenüber sind genetisch komplexe Erkrankungen nicht auf Defekte in einem Gen zurückzuführen. Auch lassen sie sich nicht einfach segregierenden Erbgängen zuordnen. Vielmehr sind Varianten in mehreren Genen an der phänotypischen Ausprägung einer Erkrankung beteiligt (s. a. o.).

Zahlreiche Faktoren erschweren jedoch die Identifikation der einzelnen Krankheitsvarianten:

(1) Unvollständige Penetranz und Phänokopie. Das Fehlen einer einfachen Beziehung zwischen einer Risikovariante und dem Auftreten einer Krankheit offenbart sich in zweierlei Weise. Die Krankheit tritt in manchen Fällen auch bei Vorliegen der Variante nicht auf (unvollständige Penetranz) oder die Krankheit tritt auf, obwohl die Variante nicht vorliegt (Phänokopie). Beide Phänomene weisen darauf hin, dass zusätzliche endogene und exogene Faktoren bei der Krankheitsentwicklung von Bedeutung sind.

(2) Heterogenität. Verschiedene ätiologische Faktoren können unabhängig voneinander an der Ausprägung desselben Phänotyps beteiligt sein. Im Zusammenhang mit genetischen Einflussfaktoren spricht man von genetischer Heterogenität.

(3) Interaktion. Sie bezeichnet das Vorliegen von Synergismen zwischen mehreren genetischen und/oder äußeren Einflussfaktoren, wodurch sich der jeweilige Effekt multiplikativ verstärkt. Interaktionen können in Form von Gen-Gen-Interaktionen oder in Form von Gen-Umwelt-

Interaktionen vorliegen.

Grundsätzlich ist die Identifikation der einzelnen Einflussfaktoren umso schwieriger, je größer deren Anzahl und je geringer deren Effektstärken sind. Für die Mehrzahl genetisch komplexer Erkrankungen ist es allerdings nicht möglich, die Anzahl und die Effektstärken der zugrunde liegenden Faktoren a priori abzuschätzen.

2.2.1 Assoziationsuntersuchungen

Eine Möglichkeit Krankheitsgene bei genetisch komplexen Erkrankungen zu identifizieren, liegt in der Durchführung von Assoziationsuntersuchungen. Unter Assoziation versteht man das überzufällig häufige Vorkommen eines Risikofaktors in einem Patientenkollektiv. Dieser Risikofaktor ist bei genetischen Assoziationsanalysen eine bestimmte DNA-Sequenzvariante. Es wird verglichen, ob bestimmte Allele oder Genotypen einer Variante bzw. Haplotypen (der von den Eltern vererbte Komplex gekoppelter Allele eines chromosomalen Bereichs) häufiger bei Patienten- als bei Kontrollkollektiven vorkommen. Ist dies der Fall, dann ist die Variante bzw. der Haplotyp mit der Erkrankung assoziiert.

Eine positive Assoziation kann allerdings verschiedene Ursachen haben:

- (1) Bei dem assoziierten Allel handelt es sich um die krankheitsverursachende Variante. Sie stellt also einen ätiologischen Faktor dar, der die Erkrankungswahrscheinlichkeit kausal erhöht.
- (2) Die assoziierte Variante trägt selbst nicht zu der Krankheit bei. Sie liegt aber chromosomal in engster räumlicher Nähe zu der am Krankheitsgeschehen beteiligten Genveränderung und es besteht ein sog. Kopplungsungleichgewicht (Linkage Disequilibrium, LD) zwischen der untersuchten und der krankheitsverursachenden Variante (s. Kopplungsungleichgewicht).
- (3) Die Allel-, Genotyp- oder Haplotyp-Verteilung zwischen dem Patienten- und dem Kontrollkollektiv ist zufällig unterschiedlich oder Unterschiede des genetischen Hintergrunds zwischen beiden Kollektiven führen zur Assoziation. Letztgenanntes bezeichnet man als Stratifikation. Durch die Untersuchung ethnisch gleicher Kollektive versucht man, diese zu vermeiden.

Bei den Genen, die Assoziationsstudien zugrunde gelegt werden, wird zwischen positionellen und funktionellen Kandidatengenen unterschieden. Positionelle Kandidatengene liegen in chromosomalen Regionen, in denen sich zuvor Hinweise auf das Vorliegen von

Dispositionsgenen gezeigt haben. In der Regel handelt es sich dabei um Kopplungsregionen. Kopplung beschreibt die gemeinsame Vererbung eines Allels mit einem Krankheitsphänotyp innerhalb einer hochbelasteten Familie. Es wird davon ausgegangen, dass die Erkrankung gemeinsam mit einer genetischen Variante segregiert, wenn die Risikovariante und die untersuchte Variante auf einem Chromosom in nur geringem Abstand zueinander liegen. Bei Kopplungsanalysen wird also eine Aussage über die chromosomale Lokalisation eines potentiellen Krankheitsgens getroffen. Bei funktionellen Kandidatengenen handelt es sich demgegenüber um Gene, denen aufgrund ihrer Funktion eine Bedeutung am Entstehungsprozess der Erkrankung zukommen könnte. Beispielsweise stellen Gene, die für Rezeptoren unterschiedlicher Neurotransmitter kodieren, Kandidatengene für Assoziationsanalysen bei neuropsychiatrischen Krankheiten dar.

2.2.2 Kopplungsungleichgewicht

Von einem Kopplungsungleichgewicht spricht man, wenn bestimmte Allele – in o. g. Fall untersuchtes und krankheitsverursachendes Allel – an zwei benachbarten Genorten überzufällig häufig gemeinsam auftreten. Ein Kopplungsungleichgewicht entsteht in der Evolution dann, wenn bei einer Person eine krankheitsverursachende genetische Veränderung auftritt (sog. *Gründer*) und sich ein großer Teil von zukünftig Erkrankten auf diese Person zurückführen lässt. In den nachfolgenden Generationen wird dann die dem krankheitsverursachenden Allel benachbarte DNA-Sequenz (des *Gründers*) ebenfalls überzufällig häufig zu finden sein.

Beeinflussende Faktoren des Kopplungsungleichgewichts sind meiotische Rekombinationen. Die Wahrscheinlichkeit, dass zwei benachbarte Allele durch Rekombinationen getrennt werden, korreliert dabei mit der Größe ihres Abstands auf dem Chromosom und mit dem evolutionären Alter.

2.3 Molekulargenetische Befunde bei schizophrenen Störungen

Auf molekulargenetischer Ebene sind gerade die Forschungsergebnisse der jüngsten Vergangenheit beachtlich. Basierend auf den Ergebnissen genomweiter Kopplungsuntersuchungen ist eine Reihe chromosomaler Regionen identifiziert worden, in denen mit großer Wahrscheinlichkeit Krankheitsgene für schizophrene Störungen lokalisiert sind. Dies betrifft die chromosomalen Bereiche auf 1q21-q22, 1q42, 5q21-q33, 6p22-p24, 6q21-q25, 8p21-p22, 10p11-p15, 13q32-q34 und 22q11-q13 (Craddock et al. 2005). Es wurden bereits mehrere

Gene identifiziert, deren Bedeutung an der Krankheitsentstehung schizophrener Störungen durch positive Replikationen belegt zu sein scheint. Insbesondere sind dies das *Disrupted-In-Schizophrenia-1*-Gen (*DISC1*) auf Chromosom 1q42 (Hennah et al. 2006), das *Dysbindin*-Gen (*DTNBP1*) auf Chromosom 6p22-p24 (Williams et al. 2005), das *Neuregulin-1*-Gen (*NRG1*) auf Chromosom 8p21-p22 (Tosato et al. 2005) und das *G72*-Gen (auch *D-Amino oxidase activator* (*DAOA*) genannt) auf Chromosom 13q32-q34 (Abou Jamra et al. 2006).

2.3.1 Chromosom 13q34 – Das *G72*-Gen

Die chromosomale Region 13q ist wegen mehrerer Kopplungsbefunde für die Erforschung schizophrener Störungen interessant. Blouin et al. (1998) führten eine genomweite Kopplungsanalyse mit 452 Mikrosatelliten-Markern an 54 Familien durch und fanden, dass Marker im Bereich 13q32 mit Schizophrenie gekoppelt sind. Darauffolgend konnten weitere Analysen Kopplung zwischen Varianten auf Chromosom 13q und schizophrenen Störungen zeigen (Brzustowicz et al. 1999, Shaw et al. 1998). Aufgrund der Kopplungshinweise führten Chumakov et al. (2002) eine Assoziationsanalyse auf 13q34 mit 191 Single-Nucleotide-Polymorphisms (SNPs) durch, die über ein 5Mb großes Segment verteilt lagen. Sie fanden starke Assoziationshinweise zwischen SNPs, die im *G72*-Gen lokalisiert sind, und zwei unabhängigen Fall-Kontroll-Kollektiven mit schizophrener Störung. Durch funktionelle Untersuchungen konnten sie zudem zeigen, dass *G72* (*DAOA*) in vitro mit dem *DAO*-Gen auf 12q24 interagiert. Das *DAO*-Gen wurde dadurch zum funktionalen Kandidatengen für schizophrene Störungen.

2.3.2 Chromosom 12q24 – Das *DAO*-Gen

Die chromosomale Region 12q24 wurde bereits vor der Identifizierung des *DAO*-Gens (s. o.) mit schizophrenen Störungen in Zusammenhang gebracht. Die Gruppe um Kennedy identifizierte starke Kopplungshinweise auf 12q23-24 für die *Darier* Erkrankung, eine autosomal-dominante Genodermatose. Zum Teil wurde über ein gehäuftes Auftreten dieser Krankheit mit psychischen Störungen berichtet (Kennedy et al. 1995). Weitere Hinweise auf Kopplung in dieser Region konnten Wilcox et al. (2002) bei ihren Untersuchungen an europäischen und amerikanischen Geschwisterpaaren finden, die von einer schizophrenen Störung betroffen waren. Die Kopplungspeaks lagen auf 12q22 und im *Phenylalanin-Hydroxylase*-Gen (*PAH*) auf 12q23.

DAO kodiert für das Enzym *D-amino acid oxidase* (*DAO*, weitere Bezeichnungen sind *DAAO* und *DAMOX* (MIM124050)), das als Flavoprotein mit hoher Spezifität D-Enantiomere von

Aminosäuren enzymatisch abbaut. Welche physiologische Funktion das Enzym insbesondere in höheren Organismen hat, war lange Zeit ungeklärt. Bevor *DAO* im menschlichen ZNS nachgewiesen werden konnte, nahm man an, dass es in bestimmten Geweben von Säugetieren als entgiftendes Agens fungiert (Pilone 2000, Pollegioni et al. 2007).

Mit seinem Nachweis im menschlichen Gehirn und Befunden, wonach sich die Konzentrationen von *DAO* und D-Serin reziprok verhalten (Hashimoto und Oka 1997), lag die Vermutung nahe, dass *DAO* am Abbau von D-Serin beteiligt ist und damit eine regulatorische Komponente in der NMDA-Rezeptor-Neurotransmission einnimmt (Mothet et al. 2000). D-Serin fungiert nämlich als Koagonist an NMDA-Rezeptoren.

Fukui und Miyake (1992) gelang die Klonierung des *DAO*-Gens, das auf Chromosom 12q24 lokalisiert ist, aus elf Exons besteht und auf genomischer Ebene etwa eine Größe von 20 kb umfasst.

2.3.3 Assoziationsanalysen am *DAO*-Genlocus und schizophrenen Störungen

Wie oben bereits erwähnt konnten Chumakov et al. (2002) erstmals Hinweise dafür finden, dass *DAO* eine Bedeutung am Entstehungsprozess schizophrener Störungen zukommt. Mittels *yeast-2-hybrid*-Analysen konnten sie zeigen, dass *DAO* mit *G72* interagiert. In vitro wiesen sie die Aktivierung von *DAO* durch *G72* nach, indem sie die Oxidation von D-Serin durch *DAO* unter stetiger Zugabe von rekombinantem *G72* erfassten. Unter konstant bleibender Konzentration von *DAO* nahm die D-Serin- im Verhältnis zu der *G72*-Konzentration und der Inkubationszeit ab (Chumakov et al. 2002). Anschließend führten sie Assoziationsanalysen mit Varianten im *DAO*-Gen und zwei Fall-Kontroll-Kollektiven mit schizophrenen Störungen durch (213 Patienten vs. 241 Kontrollen und 183 Patienten vs. 183 Kontrollen). Dabei ergaben sich positive Assoziationshinweise zur Schizophrenie für die *DAO*-Varianten rs2111902, rs3918346, rs3741775 und rs3918347. Bei weiterführenden Untersuchungen der Gruppe konnten die In-vitro-*G72-DAO*-Interaktionshinweise auch biostatistisch bestätigt werden. Unter Zugrundelegung der am meisten assoziierten SNPs an beiden Genloki ergaben die logistischen Regressionsanalysen Hinweise auf eine Gen-Gen-Interaktion (Chumakov et al. 2002).

Die von Chumakov et al. (2002) erhobene Assoziationen am *DAO*-Lokus und schizophrenen Störungen konnten im Folgenden mehrfach repliziert werden (s. a. Tabelle 2): Schumacher et al. (2004) führten eine Replikationsstudie an einem deutschen Patienten-Kontroll-Kollektiv durch

(299 Schizophrene und 300 Kontrollen). Auch sie konnten zeigen, dass drei der von Chumakov beschriebenen Marker (rs2111902, rs3918346, rs3741775) im *DAO*-Lokus mit der Schizophrenie assoziiert sind. Becker et al. (2005) analysierten diesen Datensatz und zusätzliche SNPs, die am *G72*-Lokus in diesem Kollektiv genotypisiert wurden. Hierbei konnten sie die *G72-DAO*-Interaktion auch auf Haplotypebene mit dem biostatistischen Programm *FAMHAP* nachweisen.

Liu et al. (2004) fanden positive Assoziationshinweise in einem chinesischen Fall-Kontroll-Kollektiv (547 Schizophrene und 536 Kontrollen). Sie untersuchten sechs SNP-Marker, wovon rs3741775 in der Einzelmarker-Analyse signifikant war. Auch die Haplotypanalyse ergab signifikante Befunde in dem chinesischen Kollektiv.

Studie/Jahr	Population	Polymorphismen	Patienten/Kontrollen	Assoziation
Chumakov et al. 2002	Kanada	rs2111902 (A/C) rs3918346 (C/T) rs3741775 (T/G) rs3918347 (A/G)	213/241	positiv
Schumacher et al. 2004	Deutschland	rs2111902 (A/C) rs3918346 (C/T) rs3741775 (G/T)	299/300	positiv
Liu et al. 2004	China	rs3741775 (T/G)	547/536	positiv
Yamada et al. 2005	Japan	rs3918305 (G/A)	570/570	positiv
	Japan	-	80 Trios	negativ
Liu et al. 2006	Taiwan	-	218 Familien	negativ
Wood et al. 2007	USA	rs2070586 (A/G) rs2111902 (T/C) rs3918346 (T/C) rs3825251 (G/A)	311/291	positiv
Corvin et al. 2007	Irland	rs2111902 (T/G) rs3918346 (C/T)	297/812	positiv

Tabelle 2: Übersicht bislang durchgeführter Assoziationsanalysen am *DAO*-Lokus bei schizophrenen Störungen.

Yamada et al. (2005) genotypisierten neben den bereits mehrfach untersuchten SNP-Markern rs2111902, rs3918346 und rs3741775 drei weitere *DAO*-Marker (rs4623951, rs3825251 und rs3918305). Sie führten sowohl eine Fall-Kontroll-Untersuchung (570 Patienten und 570 gesunde Kontrollen) als auch eine familienbasierte Assoziations-Untersuchung durch (124 Familien, davon 80 komplette Trios). In der Einzelmarker-Analyse war rs3918305 mit der Erkrankung assoziiert. In der Haplotypanalyse war die Markerkombination rs3918305-rs3741775-rs3825251 signifikant zu der schizophrenen Störung assoziiert. Die positiven Befunde ergaben sich jedoch ausschließlich im Fall-Kontroll-Kollektiv, das familienbasierte Kollektiv zeigte keinen Hinweis auf Assoziation. In einem dritten Kollektiv überprüften sie weiterführend den Beitrag von *DAO*, indem sie den möglichen Zusammenhang von Allelen am *DAO*-Lokus und dem Serumspiegel von D- und L-Serin bei Patienten untersuchten. Hierbei ergaben sich keine signifikanten Ergebnisse.

Die Arbeitsgruppe um Wood et al. (2007) untersuchte fünf putative Risikogene für schizophrene Störungen und konnte ausschließlich für den *DAO*-Lokus signifikante Assoziationsergebnisse finden. Die Marker rs2070586, rs2111902, rs3918346 und rs3825251 waren mit der Erkrankung assoziiert, das Kollektiv umfasste 311 Patienten mit schizophrenen und 140 Patienten mit schizoaffektiven Störungen sowie 291 gesunde Kontrollen.

In einem irischen Fall-Kontroll-Kollektiv (373 Patienten und 812 Kontrollen) fanden Corvin et al. (2007) signifikante Assoziationshinweise für die SNP-Marker rs2111902 und rs3918346. Für die Marker rs3741775 und rs888531 ergaben sich jedoch keine positiven Befunde.

Bei dem Kollektiv von Liu et al. (2006) handelt es sich bislang um das einzige, in dem Marker am *DAO*-Lokus keine Assoziation zu schizophrenen Störungen zeigten. Sie führten eine Replikationsuntersuchung an 218 betroffenen taiwanesischen Familien durch. Weder die Einzelmarker-, noch die Haplotypanalysen ergaben für die drei Marker rs2111902, rs3918346 und rs3741775 Hinweise auf Assoziation.

2.4 Die glutamaterge Neurotransmission und schizophrene Störungen

Seit Längerem wird vermutet, dass Störungen der glutamatergen Neurotransmission von Bedeutung für die Pathogenese der schizophrenen Störung sind (Carlsson et al. 1999, Coyle 1996). Insbesondere Veränderungen im Bereich der N-Methyl-D-Aspartat-Rezeptoren (NMDA-Rezeptoren) scheinen mit dem Auftreten von schizophrenen Störungen assoziiert zu sein. So zeigen beispielsweise Konsumenten der Substanz Phencyclidin (*PCP*, *Angel Dust*) Symptome, die einer schizophrenen Störung hinsichtlich Positiv- sowie Negativsymptomatik ähnlich sind (Olney et al. 1999). Ebenfalls unter Einfluss des Narkosemittels Ketamin wurde über Schizophrenie-ähnliche Symptome berichtet (Newcomer et al. 1999). Beide Substanzen sind potente Antagonisten an NMDA-Rezeptoren und führen zu deren Hypofunktion (Abi-Saab et al. 1998). Eine verminderte Signaltransduktion an NMDA-Rezeptoren scheint somit die Entstehung schizophrener Symptome zu begünstigen (Olney et al. 1999).

2.4.1 N-Methyl-D-Aspartat-Rezeptoren

N-Methyl-D-Aspartat-Rezeptoren sind heteromere ligandengesteuerte Ionenkanäle, die mit verschiedenen intrazellulären Proteinen interagieren (McBain und Mayer 1994). Sie gehören zu der Familie der Glutamaterezeptoren, die die vorherrschenden exzitatorischen Rezeptoren im Säugetier-ZNS sind. Sieben Gene aus den Genfamilien *GRIN1*, *GRIN2A-D* und *GRIN3A-B* kodieren für die sieben bislang bekannten Untereinheiten der NMDA-Rezeptoren (Dingledine et al. 1999, Nishi et al. 2001).

Jeder NMDA-Rezeptor besitzt zwei Substratbindungsstellen, eine für Glutamat und eine für den Koagonisten Glycin bzw. D-Serin (s. u.). Analysen von mutierten GRIN1- und GRIN2-Untereinheiten deuten darauf hin, dass die Glycin-Bindungsstelle auf der GRIN1-Untereinheit lokalisiert ist und die Glutamat-Bindungsstelle auf der GRIN2-Untereinheit liegt (Anson et al. 1998, Hirai et al. 1996, Kuryatov et al. 1994, Laube et al. 1997). Die Substratbindung führt zur Öffnung eines Ca^{2+} -Ionenkanals unter Expulsion von Mg^{2+} .

Hauptsächlich sind NMDA-Rezeptoren an postsynaptischen Membranen zu finden, seltener auch präsynaptisch (Liu et al. 1994). Sie haben verschiedene Aufgaben bei der Neurotransmission. Unter anderem ist die Aktivierung des NMDA-Rezeptors mit langanhaltenden Veränderungen in der Intensität der synaptischen Übertragung, d. h. der Langzeitpotenzierung, assoziiert (Ali und Salter 2001). Außerdem spielen NMDA-Rezeptoren eine wichtige Rolle bei der Organisation von

afferenten Fasern in der neuronalen Entwicklung (Collingridge und Singer 1990). Über diese und weitere Funktionen ist der NMDA-Rezeptor an einer ganzen Reihe physiologischen Prozesse involviert (v. a. synaptisches Lernen und Gedächtnisbildung) und wahrscheinlich auch an pathologischen Prozessen beteiligt (schizophrene Störungen, Epilepsie, Morbus Alzheimer, Morbus Parkinson, Chorea Huntington) (Loftis und Janowsky 2003).

2.4.2 D-Serin und *D-amino acid oxidase*

Aminosäuren kommen im menschlichen Organismus fast ausschließlich als sog. L-Enantiomere vor. Die Bedeutung von D-Enantiomeren wurde dabei lange Zeit als vernachlässigbar gering eingeschätzt. Neuere Untersuchungen konnten jedoch größere Mengen von D-Aminosäuren auch beim Menschen nachweisen (Dunlop et al. 1986, Nagata et al. 2006, Nagata et al. 1992a, Nagata et al. 1992b, Nagata et al. 1992c). Auch das D-Enantiomer der Aminosäure Serin konnte im menschlichen Gehirn nachgewiesen werden; v. a. im Bereich von NMDA-Rezeptoren im präfrontalen Cortex (Hashimoto et al. 1993). Die höchste D-Serin-Konzentration findet sich dabei in Astrozyten Typ II des Vorderhirns (Schell et al. 1995), die mit einer hohen Expression von NMDA-Rezeptoren korreliert.

Die Annahme, dass Glycin der einzige Koagonist am NMDA-Rezeptor ist, wurde unter anderem durch die Arbeiten von Matsui et al. (1995) und Mothet et al. (2000) widerlegt. Sie konnten nämlich zeigen, dass D-Serin ebenso wirkungsvoll an der Glycin-Bindungsstelle agiert. Die D-Serin-Konzentrationen entsprechen oder übersteigen dabei sogar die Konzentrationen von Glycin in bestimmten Hirnregionen. Dabei wird D-Serin hauptsächlich in der grauen Substanz im Bereich von NMDA-Rezeptoren nachgewiesen (Hashimoto et al. 1995, Schell et al. 1997).

Im Serum und im Liquor von schizophrenen Patienten fand man im Vergleich zu gesunden Kontrollen niedrigere D-Serin-Spiegel (Hashimoto et al. 2003, Kumashiro et al. 1995). Ausgehend von der Hypofunktions-Hypothese der NMDA-Rezeptoren bei schizophrenen Störungen und dem niedrigeren D-Serin-Spiegel bei Patienten wurde postuliert, dass D-Serin als NMDA-Rezeptor-Agonist therapeutisch bei schizophrenen Störungen eingesetzt werden könnte. Contreras (1990) zeigte zuvor im Tierversuch, dass die Gabe von D-Serin die Wirkungen von NMDA-Rezeptor-Antagonisten deutlich reduziert. Klinische Studien folgten daraufhin mit dem Ziel, das Spektrum der NMDA-Rezeptor-Koagonisten auf ihre therapeutische Wirksamkeit hin zu untersuchen. So konnte die adjuvante Gabe von Glycin sowohl die positiven als auch die

negativen Symptome einer schizophrenen Störung deutlich verbessern (Heresco-Levy et al. 1996, Heresco-Levy et al. 1999). D-Serin, das adjuvant zu Neuroleptika gegeben wurde, verbessert ebenfalls die Symptomatik schizophrener Störungen (Tsai et al. 1998). Auch die Kombination von D-Serin mit atypischen Neuroleptika (Risperidon und Olanzapin) zeigte gute Erfolge bei der Behandlung schizophrener Störungen, vor allem bei therapierefraktären Verlaufsformen (Evins et al. 2001, Heresco-Levy 2003, Heresco-Levy et al. 2005).

3 Zielsetzung der vorliegenden Arbeit

In Zusammenschau aller bisherigen molekulargenetischen und -biologischen Befunde stellt *DAO* ein interessantes Kandidatengenes für schizophrene Störungen dar. Das korrespondierende Protein interagiert auf zellulärer Ebene mit *G72 (DAOA)*, das am Entstehungsprozess schizophrener Störungen beteiligt zu sein scheint (s. 2.3.1). Als Enzym baut *DAO* unmittelbar D-Serin ab, das einen Koaktivator an NMDA-Rezeptoren darstellt (s. 2.4.2). Eine *DAO*-Überfunktion könnte zum Beispiel einen gesteigerten Abbau von D-Serin zur Folge haben. Sollte dies Hirnregionen betreffen, in denen D-Serin als NMDA-Koaktivator von Bedeutung ist, könnte es zu einer Unterfunktion der glutamatergen Neurotransmission kommen. Dieses käme einem Effekt gleich, der durch die Blockade von NMDA-Rezeptoren hervorgerufen wird und zu Schizophrenie-ähnlichen Erscheinungsbildern führt. Neben diesen funktionellen Überlegungen sind auch die bisherigen Kopplungs- und Assoziationsuntersuchungen am *DAO*-Lokus bei schizophrenen Störungen vielversprechend (s. 2.3.1 und 2.3.3).

Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher, den Beitrag des *DAO*-Lokus am Entstehungsprozess schizophrener Störungen zu untersuchen. Hierfür führten wir Assoziationsanalysen zwischen genetischen Varianten am *DAO*-Lokus und einem Fall-Kontrollkollektiv mit schizophrenen Störungen deutscher Herkunft durch. Zudem waren das Erfassen der genomischen Struktur bzw. Architektur des *DAO*-Lokus und die Einengung des *DAO*-Bereichs, in dem die krankheitsdisponierende(n) Variante(n) wahrscheinlich lokalisiert ist (sind), Ziele der vorliegenden Untersuchung.

4 Material und Methoden

4.1 Untersuchungskollektiv

Das Untersuchungskollektiv dieser Studie stammte der Herkunft nach aus Deutschland. Es umfasste insgesamt 531 Patienten, die an der Klinik für Psychiatrie des Universitätsklinikums Bonn rekrutiert wurden und einheitlich an einer schizophrenen Störung erkrankt waren. 241 Patienten (45.4%) waren weiblichen, 290 Patienten (54.6%) männlichen Geschlechts. Die Kontrollgruppe bestand aus insgesamt 755 Individuen, davon waren 380 Frauen (50.3%) und 375 Männer (49.7%). Die Diagnosen wurden durch erfahrene Psychiater unter Berücksichtigung der DSM-IV-Kriterien (1994) gestellt und basierten zudem auf SCID-I-Interviews (*Structured Clinical Interview for DSM-IV*, DSM-IV 1994, First 1997), der Krankengeschichte und der Familienanamnese. Bei den untersuchten Patienten handelt es sich um das erweiterte Kollektiv der Analyse von Schumacher et al. (2004) (299 Patienten, 300 Kontrollen). Die vorliegende Arbeit stellt eine Weiterführung dieser Studie dar.

Alle Patienten und Kontrollpersonen wurden vor der Blutabnahme über die geplanten molekulargenetischen Untersuchungen informiert und gaben ihr mündliches und schriftliches Einverständnis zur Verwendung ihrer DNA-Proben für die geplanten Untersuchungen. Da es sich um Untersuchungen am Menschen handelt, wurde das entsprechende Studiendesign der lokalen Ethikkommission vorgelegt und durch diese genehmigt.

Die DNA-Proben wurden vom Institut für Humangenetik der Universität Bonn für die Verwendung zur weiteren genetischen Analysen aufgearbeitet und als Untersuchungsgegenstand der vorliegenden Arbeit zur Verfügung gestellt.

4.2 Laborchemische Untersuchungen

4.2.1 Untersuchte Varianten

Insgesamt wurden 21 genetische Varianten untersucht. Hierbei handelte es sich um zwei Short-Tandem-Repeats (STRs) und 19 Single-Nucleotide-Polymorphisms (SNPs).

Ein Teil der SNPs wurde aufgrund vorbeschriebener positiver Assoziationshinweise zu schizophrenen Störungen ausgewählt (Chumakov et al. 2002, Schumacher et al. 2004). Elf SNPs sowie die beiden STRs wurden der Datenbank *UCSC Genome Browser* entnommen. Kriterium der Auswahl war die möglichst gute Abdeckung des *DAO*-Genlokus (geringe Inter-Marker-Abstände).

Die aus der *UCSC*-Datenbank ausgewählten SNPs wurden vor den Assoziationsanalysen durch Re-Sequenzierungen an ausgewählten Patienten des Kollektivs validiert. Dabei fanden sich drei weitere geeignete SNPs, welche bislang in keiner Datenbank abgelegt sind (SNP-1-Intron1, SNP-2-Intron1, SNP-3-Exon11). Tabelle 3 und Abbildung 1 geben die untersuchten Varianten samt ihrer Lokalisation, Allele und Abstände zueinander wieder.

Nr.	Marker	Position (UCSC)	Abstand (bp)	Repeat/Polymorphismus
1	rs987044	107774485	0	A/G
2	rs11114071	107777164	2679	C/T
3	rs3916982	107778235	1071	A/C
4	rs7136681	107794635	16400	A/G
5	SNP-1-Intron1	107798908	912	C/T
6	STR-1-dao2	107799037	129	(CA) _n
7	STR-2-dao3	107799381	344	(CA) _n
8	rs4964766	107800546	1165	C/T
9	rs2070586	107801849	1303	A/G
10	SNP-2-Intron1	107802452	603	C/T
11	rs2111902	107802876	424	G/T
12	rs7980427	107805439	2563	A/G
13	rs3918346	107806013	574	C/T
14	rs3741775	107807732	1719	G/T
15	rs11114086	107810528	2796	C/T
16	rs3825251	107812113	1585	A/G
17	rs3918347	107817449	5336	A/G
18	SNP-3-Exon11	107818848	22	C/T
19	rs10746135	107837943	19095	C/G
20	rs7313861	107848738	10795	C/T
21	rs3918305	107855291	6553	A/G

Tabelle 3: Übersicht der in der vorliegenden Arbeit untersuchten Short-Tandem-Repeat- und Single-Nucleotide-Polymorphism-Marker am *DAO*-Lokus.

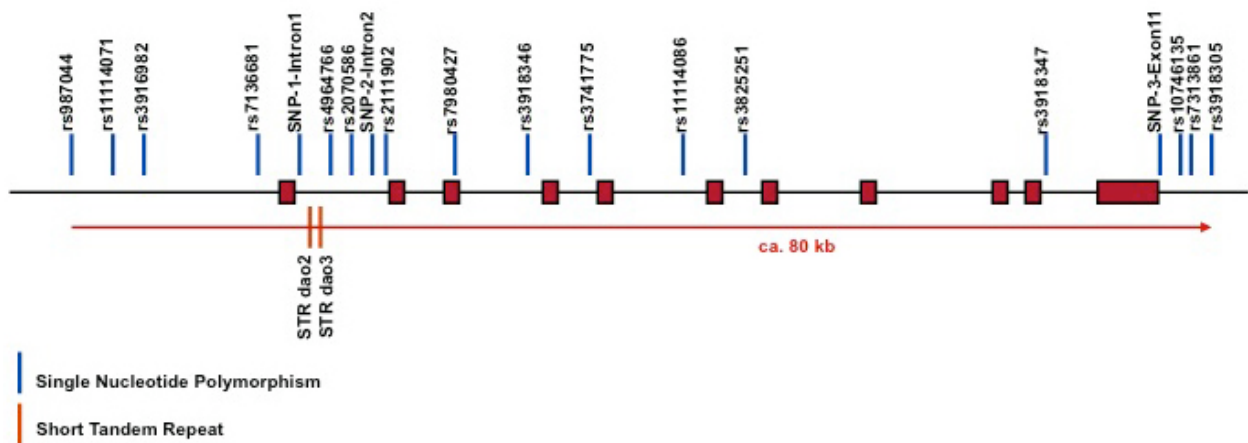


Abbildung 1: Genetische *DAO*-Struktur (Exons, Introns); sowie skizziert die relative Lokalisation der vorliegend untersuchten Single-Nucleotide-Polymorphism-Marker.

17 SNP-Marker wurden am GSF-Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit in Neuherberg unter Verwendung des *MassARRAY*-Systems (Sequenom, San Diego, USA) auf einem modifizierten BrukerBiflex MALDI-TOF Massenspektrometer (Sequenom) nach der Methode von Ding und Cantor (2003) genotypisiert.

Zwei SNP-Marker (rs7313861, rs10746135) wurden mit dem *TaqMan*-System (ABI, Foster City, USA) und dem Tecan 384 Ultra Reader (Tecan US, Durham, USA) genotypisiert. Die beiden STR-Marker wurden unter elektrophoretischer Auftrennung mit einem automatischen ABI-377-Sequenzierer (ABI, Foster City, USA) untersucht.

4.2.2 Isolierung und Aufbereitung der humanen genomischen DNA

Die hochmolekulare menschliche DNA wird aus kernhaltigen Leukozyten frischen Blutes, dem EDTA als Antikoagulans zugesetzt wird, isoliert. Angewandt wird die Aussalzmethode nach Miller et al. (1988):

- 10 ml Frischblut wird mit 30 ml Frischblutlysispuffer versetzt, mehrfach invertiert, 15 Minuten auf Eis lysiert und 15 Minuten bei 4°C und 1500 rpm zentrifugiert.
- Nach Dekantierung des Überstandes wird das Leukozytenpellet zweimal vorsichtig mit je 5 ml Kernlysispuffer gewaschen, in 10 ml Kernlysispuffer resuspendiert, mit 660 µl 10% SDS und 500 µl Pronase (20 mg/ml) versetzt und über Nacht bei 37°C im Wasserbad inkubiert.
- Danach werden 3,2 ml gesättigte NaCl-Lösung (6 M) zugegeben. Nach kräftigem Schütteln der Reaktionsgefäße werden sie 10 Minuten bei 4000 rpm und Raumtemperatur zentrifugiert, mehrmals invertiert und erneut 10 Minuten bei 4000 rpm und RT zentrifugiert.
- Das entstandene Proteinpellet wird verworfen und der Überstand mit 1 Vol Isopropanol versetzt und bis zum Ausfallen der DNA leicht geschwenkt.
- Die präzipitierte DNA wird mit einem sauberen Glashaken aus der Lösung "gefischt" und nach dem Waschen in 70% Ethanol in 400 µl TE⁻⁴ (pH 8,0) gelöst.

Folgende Reagenzien fanden Verwendung:

- Frischblutlysispuffer: 155 mM NH₄Cl
10 mM KHCO₃
0,1 mM EDTA
- Kernlysispuffer (pH 8,2): 10 mM Tris-HCl (pH 8,0)
400 mM NaCl
2 mM EDTA (pH 8,0)
- 1x Tris-EDTA (TE): 10 mM Tris
1mM EDTA

4.2.3 Das Prinzip der Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (Polymerase Chain Reaction (PCR)) ist ein von Mullis und Faloona (1987) etabliertes Verfahren zur enzymatischen Amplifikation von DNA. Unter Kenntnis der beiden flankierenden DNA-Sequenzen können Genabschnitte selektiv in vitro vervielfältigt werden. Aufgrund der exponentiellen Amplifikation wird eine Anreicherung der ursprünglich in einer oder weniger Kopien vorliegenden DNA um den Faktor 10^6 bis 10^7 erreicht.

Der zu amplifizierende DNA-Abschnitt liegt zunächst in doppelsträngiger Form vor und wird durch Hitze-Denaturierung in eine einzelsträngige DNA überführt. Die Einzelstränge dienen als Matrize für die Synthese neuer komplementärer DNA-Stränge. Als Startermoleküle für die DNA-Synthese finden synthetische Oligonukleotide (Primer) Verwendung. Dies sind DNA-Fragmente, die den zu vervielfältigenden DNA-Abschnitt flankieren. Die Elongation des zu amplifizierenden Abschnitts erfolgt durch eine thermostabile DNA-Polymerase. Die Polymerase verlängert Oligonukleotide, die einem DNA-Abschnitt angelagert sind, durch den Anbau der zu der vorliegenden DNA-Matrize komplementären Nukleotiden. Die Synthese erfolgt immer in $5' \rightarrow 3'$ -Richtung, ausgehend von den $3'$ -OH-Enden der Primer.

Die PCR läuft in drei Schritten ab:

1. Hitze-Denaturierung der Matrizen-DNA bei 95°C
2. Hybridisierung der Primer an die DNA-Matrize bei $45\text{-}72^\circ\text{C}$ (Annealing)
3. Synthese des Komplementärstranges durch die thermostabile Taq-Polymerase bei 72°C (Elongation)

Da in jedem Durchlauf sowohl die ursprüngliche DNA-Matrize als auch die bisher synthetisierten DNA-Kopien amplifiziert werden, kommt es zu einer exponentiellen Vermehrung der PCR-Produkte. Der oben beschriebene Zyklus wird in der Regel zwischen 30 bis 40 Mal wiederholt, wodurch eine Anreicherung um den Faktor 10^6 bis 10^7 erreicht wird.

Ein PCR-Reaktionansatz enthält die folgenden Komponenten:

- Die Matrizen-DNA
- Ein Paar gegenläufig orientierter Primer (Oligonukleotide)
- PCR-Puffer
- $MgCl_2$
- Vier Desoxy-Nukleosidtriphosphate (dNTPs)
- Die thermostabile DNA-Polymerase

4.2.4 PCR für die Genotypisierung der STR-Marker (ABI 377 Sequenzer)

Folgende Komponenten wurden in einem Reaktionsgefäß gemischt und anschließend in die Mikrotiterplatten pipettiert (s. Tabelle 4). Die PCR erfolgte in Thermocyclern (MJ-Research PTC-200, Watertown, USA), wobei ein Touchdown-Programm verwendet wurde, bei dem die Hybridisierungstemperatur jeden vierten bzw. dritten Zyklus um $1^\circ C$ sinkt, bis sie $55^\circ C$ erreicht (s. Tabelle 5).

Reagens	Volumen (μl)	Konzentration/Inhalt
DNA	2,0 μl	20 ng/ μl
Q-Solution	2,0 μl	
Premix	5,0 μl	Taq-Polymerase, Puffer, $MgCl_2$
H ₂ O	2,4-2,7 μl (je nach Primer)	
Primer	0,3-0,6 μl (je nach Primer)	Forward- und Reverse-Primer

Tabelle 4: Reaktionsansatz der Polymerase-Kettenreaktion für die Genotypisierung der Short-Tandem-Repeats (STRs) auf dem ABI 377 Sequenzierer.

Schritt	Temperatur	Dauer
1	95°C	15 min
2	95°C	30 sec
3	63-61°C	1 min 30 sec
4	72°C	30 sec
<i>Schritt 2-4: insgesamt 12 mal</i>		
5	95°C	30 sec
6	60-55°C	1 min 30 sec
7	72°C	30 sec
<i>Schritt 5-7: insgesamt 18 mal</i>		
8	60°C	30 min

Tabelle 5: Automatisches Touchdown-Programm für die Polymerase-Kettenreaktion auf dem Thermocycler MJ-Research PTC-200.

4.2.5 PCR für die Genotypisierung der SNP-Marker (TaqMan, Tecan 324)

Folgende Komponenten wurden in einem Reaktionsgefäß gemischt und anschließend in die 384-Well-Mikrotiterplatten mit den vorgelegten DNA-Proben (lyophilisiert) pipettiert (s. Tabelle 6). Die PCR erfolgte in sog. Thermocyclern (MJ-Research PTC-200, Watertown, USA), wobei das vom Hersteller (ABI, Foster City, USA) empfohlene Programm verwendet wurde. Anschließend wurde die Platte unter Schutz vor direktem Licht zur Fluoreszenzerfassung in das Lesegerät Tecan 384 Ultra Reader (Tecan US, Durham, USA) gelegt (s. Tabelle 7).

Reagens	Volumen (µl)	Konzentration/Inhalt
DNA	0 µl (lyophilisiert)	20 ng
TaqMan® Universal PCR Master Mix	2,5 µl	
20x Assays-on-Demand™ Genotyping Mix	0,25 µl	
H ₂ O	2,25 µl	

Tabelle 6: Reaktionsansatz der Polymerase-Kettenreaktion für die Genotypisierung der Single-Nucleotide-Polymorphisms (SNPs) nach dem TaqMan-Ansatz (ABI, Foster City, USA).

Dauer und Temperaturen		
Jeder Schritt insgesamt 40 mal		
Initialschritt 10 min 95°C	Denaturierung 15 sec 92°C	Hybridisierung/Synthese 1 min 60°C

Tabelle 7: Automatisches Thermocycler-Programm für die Polymerase-Kettenreaktion auf dem Thermocycler MJ-Research PTC-200 (Herstellerempfehlung für TaqMan-Analysen; ABI, Foster City, USA).

4.2.6 Elektrophorese auf dem Automatischen Sequenzierer (ABI 377)

4.2.6.1 Vorbehandlung der Glasplatten

Die Glasplatten für die Elektrophorese wurden mit einem Detergenz (Extran) behandelt, mit Aqua dest. gespült und mit Isopropanol gereinigt. Danach wurden die Abstandhalter (Spacer, 0,2 mm) aufgelegt und die Glasplatten in einer vorgesehenen Apparatur zusammengesetzt.

4.2.6.2 Herstellung des 4,25%igen Polyacrylamidgels

Die 40%ige Acrylamid-Lösung (Acrylamid, Bisacrylamid = 29:1) wurde in Aqua bidest. gelöst, durch einen 0,2 µm Filter abfiltriert und bei 4°C aufbewahrt. 18 g Harnstoff wurden in 24 ml bidest. H₂O gelöst, mit 5,6 ml der 40%igen Acrylamid-Lösung gemischt, durch einen 0,2 µm Filter filtriert und entgast. Daraufhin wurde die Lösung in ein Becherglas überführt, mit 6 ml 10xTBE-Puffer, 250 ml 10%iger Ammoniumpersulfatlösung sowie 35 µl TEMED versetzt und anschließend sofort zwischen die vorbereiteten Glasplatten gegossen. Nach Einsetzen der Kämme polymerisierte das Gel 1 h in horizontaler Lage.

Reagenzien, die bei der Herstellung des 4,25%igen Polyacrylamidgels Verwendung fanden:

- Acrylamid
- Bisacrylamid
- Harnstoff (Urea)
- 10xTBE-Puffer:
 - 500 mM Tris (Tris-(hydroxymethyl-)aminomethan)
 - 500 mM Borsäure
 - 20 mM EDTA, pH 8,0
- Ammoniumpersulfatlösung (10%): 10 g Ammoniumpersulfat
100 ml H₂O
- TEMED (N',N',N',N-Tetramethyldiamin)

4.2.6.3 Elektrophorese

Für die Elektrophorese wurde das Gel vertikal in den ABI 377 eingespannt und eine obere und untere Pufferkammer mit 1xTBE gefüllt. Die optimale Lauftemperatur betrug 51°C, so dass das Gel zunächst vorgeheizt werden musste. In einem Kontrolllauf (Pre-Run) maß der Laser, ob sich Verunreinigungen auf den Glasplatten befanden. Anschließend wurden die PCR-Produkte aufgetragen. Dazu wurden 2,5 µl jedes PCR-Produktes mit 2 µl einer Lösung, bestehend aus einem internen DNA-Längenstandard (GS-500) und einem farbigen Ladepuffer, bei 95°C zwei Minuten lang denaturiert. Anschließend wurde jeweils 2,5 µl in die Geltaschen pipettiert, manuell bei 36 Geltaschen, mit Pipettierhilfe (Gele-Mate, World Precision Instrument, Berlin) bei 96 Geltaschen. Die Laufzeit hing von der Fragmentgröße ab und betrug in der Regel zwischen 2-3 h bei 2400 Volt.

4.2.7 Bestimmung der PCR-Fragmentlängen

Die Bestimmung der PCR-Fragmentlängen erfolgte mit Hilfe des ABI-Genotyper-Softwareprogramms. Der mit den PCR-Produkten aufgetragene interne Längenstandard (Genescan-500, Perkin Elmer, Vaterstetten) ist farbstoffmarkiert, kann jedoch von den anderen markierten PCR-Produkten unterschieden werden. Die bekannten Fragmentlängen des Standards dienen der Erzeugung einer Kalibrierungskurve, mit deren Hilfe die Längen der PCR-Produkte durch Extrapolation ermittelt werden könnten.

Zur genauen Bestimmung der Produktlängen wurde eine Kontroll-DNA (Ceph 1347-02) parallel analysiert, deren Fragmentlänge bekannt ist.

4.2.8 Analyse der Genotypen

Anhand des internen Längenstandards und der Kontroll-DNA fand eine automatische Bestimmung der Genotypen durch die Softwareprogramme Genescan Analysis Version 2.1.1 und Genotyper Version 2.0 (ABI, Foster City, USA) statt. Die so ermittelten Genotypen wurden daraufhin von zwei Personen, die keine Kenntnis über den Erkrankungsstatus hatten, unabhängig voneinander gelesen. Bei unklaren Genotypen wurde die Analyse vollständig wiederholt.

Die Mendelsche Vererbung der Markerallele wurde anschließend mit dem Programm CPC (Check-Pedigree-Consistency, M. Knapp, IMBIE, Bonn) überprüft. Wenn im Einzelfall

inkompatible Genotypen auftraten, wurde die DNA der betreffenden Person nochmals durch PCR vervielfältigt und die Genotypen neu bestimmt.

4.2.9 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der Untersuchungen wurde von Herrn PD Dr. Becker am Institut für Medizinische Biometrie, Informatik und Epidemiologie (IMBIE) des Universitätsklinikums Bonn durchgeführt.

Zunächst wurde die Häufigkeitsverteilung der Genotypen im Kontrollkollektiv mit einem χ^2 -Test ($df = 1$) auf eine mögliche Abweichung vom Hardy-Weinberg-Gleichgewicht geprüft. Die Genotyp- und Allelfrequenzen der einzelnen Marker des Patienten- und des Kontrollkollektivs wurden daraufhin mit dem Cochran-Armitage-Trend-Test verglichen (Armitage 1955). Mittels Bonferroni-Korrektur wurde für Multiples Testen korrigiert. Für die Multimarker-Analyse wurde die Verteilung der Haplotypen mit dem Programm *FAMHAP* verglichen (Becker und Knapp 2004).

5 Ergebnisse

Gegenstand der vorliegenden Arbeit sind Assoziationsanalysen zwischen genetischen Varianten im Gen *D-amino acid oxidase (DAO)* und schizophrenen Störungen. Aufgrund zahlreicher Vorbefunde, u. a. positiver Assoziationshinweise, der Genlokalisierung in der Kopplungsregion auf 12q24 und der Funktion im Bereich der glutamatergen Neurotransmission, handelt es sich bei dem *DAO*-Gen um ein aussichtsreiches Kandidatengen für schizophrene Störungen (s. a. Theoretische Grundlagen). Das hier untersuchte deutsche Kollektiv umfasste 531 Patienten und 755 Kontrollen. Insgesamt wurden 21 genetische Varianten am *DAO*-Lokus untersucht. Hiervon entstammten elf SNPs und die beiden STRs der *UCSC*-Datenbank und wurden vor der Genotypisierung durch Re-Sequenzierungen validiert. Drei weitere SNPs (SNP-1-Intron1, SNP-2-Intron1 und SNP-3-Exon11) sind bislang in keiner Datenbank abgelegt. Fünf SNPs wurden aufgrund vorbeschriebener Assoziationsbefunde mit schizophrenen Störungen ausgewählt (Chumakov et al. 2002, Schumacher et al. 2004). Es sind die einzigen Varianten, die zuvor an Kollektiven mit schizophrenen Störungen untersucht wurden.

Im Folgenden werden zunächst die Ergebnisse der Einzelmarkeranalyse dargestellt. Dabei wurden die Allel- und Genotyp-Verteilungen der untersuchten Varianten zwischen Patienten und Kontrollen auf statistisch signifikante Unterschiede hin untersucht. Zuvor wurden mögliche Abweichungen vom Hardy-Weinberg-Gleichgewicht (HWE) für jeden Marker überprüft. Anschließend werden die Ergebnisse der Haplotypanalysen dargestellt.

5.1 Einzelmarkeranalyse

Insgesamt sieben der 19 untersuchten SNP-Marker zeigten im Cochran-Armitage-Trend-Test signifikant unterschiedliche Allel- und Genotyp-Verteilungen zwischen Patienten und Kontrollen (rs11114071, rs4964766, rs2070586, SNP-2-Intron1, rs2111902, rs3918346, rs3741775). Die Marker rs2111902, rs3918346, rs3741775 waren dabei bereits Gegenstand der Assoziationsstudie von Schumacher et al. (2004). Der Marker rs3918347 fiel wegen HWE-Abweichung aus der statistischen Betrachtung heraus. Die restlichen 13 Marker ergaben keinen weiteren Hinweis auf signifikante Unterschiede zwischen den untersuchten Gruppen. Die beiden untersuchten STR-Marker STR-1-dao2 und STR-2-dao3 zeigten ebenfalls keine Unterschiede zwischen Patienten und Kontrollen.

5.1.1 SNP rs987044

Die Einzelmarkeranalyse zeigte für den SNP rs987044 keine signifikant unterschiedliche Allel- und Genotyp-Verteilung zwischen Patienten und Kontrollen (s. Tabelle 8).

Marker (Allele)	Allelverteilung		Genotypenverteilung						p-Wert
	Kontrollen	Patienten	Kontrollen			Patienten			
			1/1	1/2	2/2	1/1	1/2	2/2	
rs987044 (A/G)	0,419 (G)	0,438 (G)	0,342	0,515	0,161	0,312	0,500	0,188	0,342

Tabelle 8: Einzelmarkeranalyse des Single-Nucleotide-Polymorphism (SNP) rs987044. Die Berechnungen ergaben keine signifikanten Unterschiede in der Verteilung.

5.1.2 SNP rs11114071

Für den SNP-Marker rs11114071 ergaben sich signifikant unterschiedliche Allel- und Genotyp-Verteilungen. Das Allel C war mit 30% bei Patienten signifikant häufiger als bei Kontrollen (26,3%) ($p=0,040$, Odds Ratio (OR) 1,20, 95% Confidence Interval (CI) 1,00-1,44) (s. Tabelle 9).

Marker (Allele)	Allelverteilung		Genotypenverteilung						p-Wert
	Kontrollen	Patienten	Kontrollen			Patienten			
			1/1	1/2	2/2	1/1	1/2	2/2	
rs11114071 (C/T)	0,263 (C)	0,300 (C)	0,064	0,397	0,538	0,074	0,452	0,474	0,040

Tabelle 9: Einzelmarkeranalyse des Single-Nucleotide-Polymorphism (SNP) rs11114071. Die Berechnungen ergaben mit einem p-Wert von 0,040 einen signifikanten Unterschied in der Verteilung des Allels C zugunsten der untersuchten Patienten.

5.1.3 SNP rs3916982

Die Einzelmarkeranalyse zeigte für den SNP rs3916982 keine signifikant unterschiedliche Allel- und Genotyp-Verteilung zwischen Patienten und Kontrollen (s. Tabelle 10).

Marker (Allele)	Allelverteilung		Genotypenverteilung						p-Wert
	Kontrollen	Patienten	Kontrollen			Patienten			
			1/1	1/2	2/2	1/1	1/2	2/2	
rs3916982 (A/C)	0,493 (C)	0,530 (C)	0,264	0,486	0,250	0,223	0,495	0,282	0,074

Tabelle 10: Einzelmarkeranalyse des Single-Nucleotide-Polymorphism (SNP) rs3916982. Die Berechnungen ergaben keine signifikanten Unterschiede in der Verteilung.

5.1.4 SNP rs7136681

Die Einzelmarkeranalyse zeigte für den SNP rs7136681 keine signifikant unterschiedliche Allel- und Genotyp-Verteilung zwischen Patienten und Kontrollen (s. Tabelle 11).

Marker (Allele)	Allelverteilung		Genotypenverteilung						p-Wert
	Kontrollen	Patienten	Kontrollen			Patienten			
			1/1	1/2	2/2	1/1	1/2	2/2	
rs7136681 (A/G)	0,478 (G)	0,493 (G)	0,258	0,527	0,215	0,253	0,509	0,238	0,491

Tabelle 11: Einzelmarkeranalyse des Single-Nucleotide-Polymorphism (SNP) rs7136681. Die Berechnungen ergaben keine signifikanten Unterschiede in der Verteilung.

5.1.5 SNP-1-Intron1

Die Einzelmarkeranalyse zeigte für den SNP-1-Intron1 keine signifikant unterschiedliche Allel- und Genotyp-Verteilung zwischen Patienten und Kontrollen (s. Tabelle 12).

Marker (Allele)	Allelverteilung		Genotypenverteilung						p-Wert
	Kontrollen	Patienten	Kontrollen			Patienten			
			1/1	1/2	2/2	1/1	1/2	2/2	
SNP-1-Intron1 (C/T)	0,897 (C)	0,911 (C)	0,802	0,190	0,008	0,825	0,173	0,002	0,224

Tabelle 12: Einzelmarkeranalyse des Single-Nucleotide-Polymorphism (SNP) SNP-1-Intron1. Die Berechnungen ergaben keine signifikanten Unterschiede in der Verteilung.

5.1.6 SNP rs4964766

Für den SNP-Marker rs4964766 zeigten sich signifikant unterschiedliche Allel- und Genotyp-Verteilungen zwischen Patienten und Kontrollen ($p=0,049$, OR 1,22, 95% CI 1,00-1,50). Allel C war dabei signifikant zur schizophrenen Störung assoziiert (81,7% vs. 78,5% in Kontrollen) (s. Tabelle 13).

Marker (Allele)	Allelverteilung		Genotypenverteilung						p-Wert
	Kontrollen	Patienten	Kontrollen			Patienten			
			1/1	1/2	2/2	1/1	1/2	2/2	
rs4964766 (C/T)	0,785 (C)	0,817 (C)	0,612	0,347	0,041	0,666	0,302	0,032	0,049

Tabelle 13: Einzelmarkeranalyse des Single-Nucleotide-Polymorphism (SNP) rs4964766. Die Berechnungen ergaben mit einem p-Wert von 0,049 einen signifikanten Unterschied in der Verteilung des Allels C zugunsten der untersuchten Patienten.

5.1.7 SNP rs2070586

Der Marker rs2070586 zeigte die stärksten Assoziationshinweise ($p=0,015$, OR 1,31, 95% CI 1,06-1,62). Das Allel G war dabei signifikant zur schizophrenen Störung assoziiert (84,4% vs. 80,5% in Kontrollen) (s. Tabelle 14).

Marker (Allele)	Allelverteilung		Genotypenverteilung						p-Wert
	Kontrollen	Patienten	Kontrollen			Patienten			
			1/1	1/2	2/2	1/1	1/2	2/2	
rs2070586 (A/G)	0,805 (G)	0,844 (G)	0,049	0,292	0,659	0,026	0,259	0,715	0,015

Tabelle 14: Einzelmarkeranalyse des Single-Nucleotide-Polymorphism (SNP) rs2070586. Die Berechnungen ergaben mit einem p-Wert von 0,015 einen signifikanten Unterschied in der Verteilung des Allels G zugunsten der untersuchten Patienten.

5.1.8 SNP-2-Intron1

Der zu rs2070586 flankierende SNP-2-Intron1 ergab mit einer Allelfrequenz von 15,1% (Allel T) bei Patienten gegenüber 11,9% bei Kontrollen ebenfalls einen Assoziationshinweis ($p=0,017$, OR 1,31, 95% CI 1,04-1,62) (s. Tabelle 15).

Marker (Allele)	Allelverteilung		Genotypenverteilung						p-Wert
	Kontrollen	Patienten	Kontrollen			Patienten			
			1/1	1/2	2/2	1/1	1/2	2/2	
SNP-2-Intron1 (C/T)	0,119 (T)	0,151 (T)	0,773	0,215	0,012	0,709	0,280	0,011	0,017

Tabelle 15: Einzelmarkeranalyse des Single-Nucleotide-Polymorphism (SNP) SNP-2-Intron1. Die Berechnungen ergaben mit einem p-Wert von 0,017 einen signifikanten Unterschied in der Verteilung des Allels T zugunsten der untersuchten Patienten.

5.1.9 SNP rs2111902

Der Marker rs2111902, der bereits in den Untersuchungen von Chumakov et al. (2002) und Schumacher et al. (2004) Assoziation zeigte, war mit einer Allelfrequenz von 74,2% (Allel T) signifikant zur schizophrenen Störung assoziiert (69,9% bei Kontrollen, $p=0,021$, OR 1,24, 95% CI 1,03-1,49) (s. Tabelle 16).

Marker (Allele)	Allelverteilung		Genotypenverteilung						p-Wert
	Kontrollen	Patienten	Kontrollen			Patienten			
			1/1	1/2	2/2	1/1	1/2	2/2	
rs2111902 (G/T)	0,699 (T)	0,742 (T)	0,477	0,443	0,080	0,540	0,403	0,057	0,021

Tabelle 16: Einzelmarkeranalyse des Single-Nucleotide-Polymorphism (SNP) rs2111902. Die Berechnungen ergaben mit einem p-Wert von 0,021 einen signifikanten Unterschied in der Verteilung des Allels T zugunsten der untersuchten Patienten.

5.1.10 SNP rs7980427

Die Einzelmarkeranalyse zeigte für den SNP rs7980427 keine signifikant unterschiedliche Allel- und Genotyp-Verteilung zwischen Patienten und Kontrollen (s. Tabelle 17).

Marker (Allele)	Allelverteilung		Genotypenverteilung						p-Wert
	Kontrollen	Patienten	Kontrollen			Patienten			
			1/1	1/2	2/2	1/1	1/2	2/2	
rs7980427 (A/G)	0,914 (G)	0,933 (G)	0,005	0,161	0,834	0,006	0,121	0,873	0,074

Tabelle 17: Einzelmarkeranalyse des Single-Nucleotide-Polymorphism (SNP) rs7980427. Die Berechnungen ergaben keine signifikanten Unterschiede in der Verteilung.

5.1.11 SNP rs3918346

Der Marker rs3918346, der bereits in den Untersuchungen von Chumakov et al. (2002) und Schumacher et al. (2004) Assoziation zeigte, war mit einer Allelfrequenz von 77,4% (Allel C) signifikant zur schizophrenen Störung assoziiert (73,9% bei Kontrollen, $p=0,039$, OR 1,21, 95% CI 1,00-1,46) (s. Tabelle 18).

Marker (Allele)	Allelverteilung		Genotypenverteilung						p-Wert
	Kontrollen	Patienten	Kontrollen			Patienten			
			1/1	1/2	2/2	1/1	1/2	2/2	
rs3918346 (C/T)	0,739 (C)	0,774(C)	0,527	0,424	0,049	0,585	0,377	0,038	0,039

Tabelle 18: Einzelmarkeranalyse des Single-Nucleotide-Polymorphism (SNP) rs3918346. Die Berechnungen ergaben mit einem p-Wert von 0,039 einen signifikanten Unterschied in der Verteilung des Allels C zugunsten der untersuchten Patienten.

5.1.12 SNP rs3741775

Der Marker rs3741775, der bereits in den Untersuchungen von Chumakov et al. (2002) und Schumacher et al. (2004) Assoziation zeigte, war mit einer Allelfrequenz von 46,1% (Allel G) signifikant zur schizophrenen Störung assoziiert (42,2% bei Kontrollen, $p=0,046$, OR 1,17, 95% CI 1,00-1,38) (s. Tabelle 19).

Marker (Allele)	Allelverteilung		Genotypenverteilung						p-Wert
	Kontrollen	Patienten	Kontrollen			Patienten			
			1/1	1/2	2/2	1/1	1/2	2/2	
rs3741775 (G/T)	0,422 (G)	0,461 (G)	0,160	0,523	0,317	0,210	0,503	0,287	0,046

Tabelle 19: Einzelmarkeranalyse des Single-Nucleotide-Polymorphism (SNP) rs3741775. Die Berechnungen ergaben mit einem p-Wert von 0,046 einen signifikanten Unterschied in der Verteilung des Allels G zugunsten der untersuchten Patienten.

5.1.13 SNP rs11114086

Die Einzelmarkeranalyse zeigte für den SNP rs11114086 keine signifikant unterschiedliche Allel- und Genotyp-Verteilung zwischen Patienten und Kontrollen (s. Tabelle 20).

Marker (Allele)	Allelverteilung		Genotypenverteilung						p-Wert
	Kontrollen	Patienten	Kontrollen			Patienten			
			1/1	1/2	2/2	1/1	1/2	2/2	
rs11114086 (C/T)	0,840 (C)	0,863 (C)	0,702	0,277	0,022	0,740	0,246	0,014	0,114

Tabelle 20: Einzelmarkeranalyse des Single-Nucleotide-Polymorphism (SNP) rs11114086. Die Berechnungen ergaben keine signifikanten Unterschiede in der Verteilung.

5.1.14 SNP rs3825251

Die Einzelmarkeranalyse zeigte für den SNP rs3825251 keine signifikant unterschiedliche Allel- und Genotyp-Verteilung zwischen Patienten und Kontrollen (s. Tabelle 21).

Marker (Allele)	Allelverteilung		Genotypenverteilung						p-Wert
	Kontrollen	Patienten	Kontrollen			Patienten			
			1/1	1/2	2/2	1/1	1/2	2/2	
rs3825251 (A/G)	0,836(A)	0,859 (A)	0,693	0,286	0,021	0,733	0,251	0,015	0,108

Tabelle 21: Einzelmarkeranalyse des Single-Nucleotide-Polymorphism (SNP) rs3825251. Die Berechnungen ergaben keine signifikanten Unterschiede in der Verteilung.

5.1.15 SNP rs3918347

Der Marker rs3918347 fiel wegen Abweichungen vom Hardy-Weinberg-Gleichgewicht (HWE) aus der statistischen Betrachtung heraus.

5.1.16 SNP-3-Exon11

Die Einzelmarkeranalyse zeigte für den SNP-3-Exon11 keine signifikant unterschiedliche Allel- und Genotyp-Verteilung zwischen Patienten und Kontrollen (s. Tabelle 22).

Marker (Allele)	Allelverteilung		Genotypenverteilung						p-Wert
	Kontrollen	Patienten	Kontrollen			Patienten			
			1/1	1/2	2/2	1/1	1/2	2/2	
SNP-3-Exon11 (C/T)	0,846 (T)	0,856 (T)	0,019	0,270	0,711	0,017	0,253	0,730	0,483

Tabelle 22: Einzelmarkeranalyse des Single-Nucleotide-Polymorphism (SNP) SNP-3-Exon11. Die Berechnungen ergaben keine signifikanten Unterschiede in der Verteilung.

5.1.17 SNP rs7313861

Die Einzelmarkeranalyse zeigte für den SNP rs7313861 keine signifikant unterschiedliche Allel- und Genotyp-Verteilung zwischen Patienten und Kontrollen (s. Tabelle 23).

Marker (Allele)	Allelverteilung		Genotypenverteilung						p-Wert
	Kontrollen	Patienten	Kontrollen			Patienten			
			1/1	1/2	2/2	1/1	1/2	2/2	
rs7313861 (C/T)	0,583 (C)	0,587 (C)	0,338	0,490	0,172	0,358	0,458	0,184	0,849

Tabelle 23: Einzelmarkeranalyse des Single-Nucleotide-Polymorphism (SNP) rs7313861. Die Berechnungen ergaben keine signifikanten Unterschiede in der Verteilung.

5.1.18 SNP rs10746135

Die Einzelmarkeranalyse zeigte für den SNP rs10746135 keine signifikant unterschiedliche Allel- und Genotyp-Verteilung zwischen Patienten und Kontrollen (s. Tabelle 24).

Marker (Allele)	Allelverteilung		Genotypenverteilung						p-Wert
	Kontrollen	Patienten	Kontrollen			Patienten			
			1/1	1/2	2/2	1/1	1/2	2/2	
rs10746135 (C/G)	0,795 (C)	0,799 (C)	0,636	0,318	0,046	0,629	0,341	0,030	0,781

Tabelle 24: Einzelmarkeranalyse des Single-Nucleotide-Polymorphism (SNP) rs10746135. Die Berechnungen ergaben keine signifikanten Unterschiede in der Verteilung.

5.1.19 SNP rs3918305

Die Einzelmarkeranalyse zeigte für den SNP rs3918305 keine signifikant unterschiedliche Allel- und Genotyp-Verteilung zwischen Patienten und Kontrollen (s. Tabelle 25).

Marker (Allele)	Allelverteilung		Genotypenverteilung						p-Wert
	Kontrollen	Patienten	Kontrollen			Patienten			
			1/1	1/2	2/2	1/1	1/2	2/2	
rs3918305 (A/G)	0,624 (G)	0,626 (G)	0,157	0,439	0,404	0,136	0,477	0,387	0,917

Tabelle 25: Einzelmarkeranalyse des Single-Nucleotide-Polymorphism (SNP) rs3918305. Die Berechnungen ergaben keine signifikanten Unterschiede in der Verteilung.

5.1.20 STR-Marker STR-1-dao2 und STR-2-dao3

In der Einzelmarkeranalyse waren die beiden STR-Marker STR-1-dao2 ($p=0,179$) und STR-2-dao3 ($p=0,669$) nicht signifikant zur schizophrenen Störung assoziiert.

5.2 Multimarkeranalyse

Für die Haplotypuntersuchungen wurde zunächst die genomische Haplotyp-Block-Struktur am *DAO*-Lokus analysiert. Es zeigte sich, dass drei Haplotyp-Blöcke in diesem Bereich vorliegen und die analysierten Varianten innerhalb dieser Blöcke ein hohes Kopplungsungleichgewicht (LD) zueinander aufweisen (s. Abbildung 2). Der erste Haplotyp-Block (Haplotyp-Block 1) umfasst dabei die Marker 1, 2 und 3 (rs987044, rs11114071, rs3916982). Der zweite Haplotyp-Block (Haplotyp-Block 2) umfasst die Marker 8 bis 18 (rs4964766, rs2070586, SNP-2-Intron1, rs2111902, rs7980427, rs3918346, rs3741775, rs11114086, rs3825251, SNP-3-Exon11). Der dritte Haplotyp-Block (Haplotyp-Block 3) wird von den Markern 19 bis 21 gebildet (rs7313861, rs10746135, rs3918305). Die Marker rs3918347, rs7136681, SNP-1-Intron1 und die beiden STR-Marker (STR-1-dao2, rs3220845) konnten keinem der drei Haplotyp-Blöcke zugeordnet werden. Ihre Allelfrequenzen waren hierfür entweder zu selten (SNP-Marker) oder die Anzahl verschiedener Allele zu hoch (STR-Marker).

5.2.1 Haplotyp-Block 1

Die Assoziationsanalysen mit Markern des Haplotyp-Block 1 zeigten, dass die Verteilung der einzelnen Haplotypen zwischen Patienten und Kontrollen signifikant unterschiedlich war (globaler p-Wert 0,0475). Allerdings war die Frequenz von einzelnen Haplotypen dabei nicht signifikant unterschiedlich zwischen Patienten und Kontrollen (s. Tabelle 26).

Haplotyp	Frequenz Patienten	Frequenz Kontrollen	p-Wert
1-4-1	0,465	0,499	n.s.
1-4-2	0,085	0,082	n.s.
3-2-2	0,293	0,268	n.s.
3-4-1	0,002	0,007	n.s.
3-4-2	0,143	0,142	n.s.
			global p=0,0475

Tabelle 26: Multimarker-Analyse des Haplotyp-Blocks 1. Betroffen sind die Marker 1-3. Die Berechnungen ergeben einen globalen p-Wert von 0,0475. Die Frequenzen der einzelnen Haplotypen unterscheiden sich nicht signifikant.

5.2.2 Haplotyp-Block 2

Die Assoziationsanalyse mit Markern des Haplotyp-Block 2 (Marker 8-18) zeigte ebenfalls eine signifikant unterschiedliche Verteilung der einzelnen Haplotypen zwischen Patienten und Kontrollen (globaler p-Wert 0,0421). Der 10-Marker-Haplotyp C-G-T-T-G-C-G-C-A-T war mit einer Frequenz von 14,4% bei Patienten vs. 11,5% bei Kontrollen signifikant zu schizophrenen Störungen assoziiert ($p=0,033$) (s. Tabelle 27). Übereinstimmend mit den Ergebnissen der Einzelmarkeranalyse zeigten sich die stärksten Assoziationshinweise im Haplotyp-Block 2 beim Betrachten des 3-Marker-Haplotyps rs2070586-SNP-2-Intron1-rs2111902. Bei dieser detaillierten Analyse ergab sich ein globaler p-Wert von 0,00064, der auch einer Korrektur für Multiples Testen standhielt ($p=0,00974$). Auf der Ebene der einzelnen Haplotypen war dabei der Haplotyp G-T-C zu schizophrenen Störungen assoziiert ($p=0,015$) (s. Tabelle 28). Die Frequenz dieses Haplotyps entspricht dabei der des o. g. assoziierten 10-Marker-Haplotyps (15% bei Patienten vs. 11,9% bei Kontrollen).

Haplotyp	Frequenz Patienten	Frequenz Kontrollen	p-Wert
C-G-C-T-G-C-G-C-A-T	0,264	0,240	n.s.
C-G-C-T-G-C-T-C-A-T	0,307	0,321	n.s.
C-G-C-G-G-C-G-C-A-T	0,039	0,046	n.s.
C-G-C-G-G-T-T-T-G-C	0,034	0,042	n.s.
C-G-T-T-G-C-G-C-A-T	0,144	0,115	0,033
T-A-C-G-A-T-T-C-A-T	0,054	0,063	n.s.
T-A-C-G-G-T-T-T-G-C	0,091	0,106	n.s.
T-G-C-G-A-T-T-C-A-T	0,017	0,022	n.s.
			global p=0,0421

Tabelle 27: Multimarker-Analyse des Haplotyp-Blocks 2. Betroffen sind die Marker 8-18. Die Berechnungen ergeben einen globalen p-Wert von 0,0421. Nur der 10-Marker-Haplotyp C-G-T-T-G-C-G-C-A-T ist zugunsten der untersuchten Patienten signifikant ($p=0,033$).

Haplotyp	Frequenz Patienten	Frequenz Kontrollen	p-Wert
G-C-T	0,583	0,565	n.s.
G-T-T	0,15	0,119	0,015
G-C-G	0,107	0,120	n.s.
A-C-T	0,001	0,012	n.s.
A-C-G	0,158	0,184	n.s.
			global p=0,00064
			nach Korrektur p=0,00974

Tabelle 28: 3-Marker-Analyse des Haplotyp-Blocks 2. Betroffen sind die Marker 9-11. Die Berechnungen ergeben nach Korrektur einen globalen p-Wert von 0,00974. Nur der 3-Marker-Haplotyp G-T-T ist zugunsten der untersuchten Patienten signifikant ($p=0,015$).

5.2.3 Haplotyp-Block 3

Die Multimarkeranalyse am Haplotyp-Block 3 (SNP 19-21) ergab keine signifikanten Assoziationshinweise. Die Haplotyp-Verteilung zeigte keinen Unterschied zwischen Patienten und Kontrollen ($p=0,3671$). Zudem war die Frequenz einzelner Haplotypen zwischen dem Patienten- und Kontrollkollektiv nicht unterschiedlich ($p \geq 0,05$).

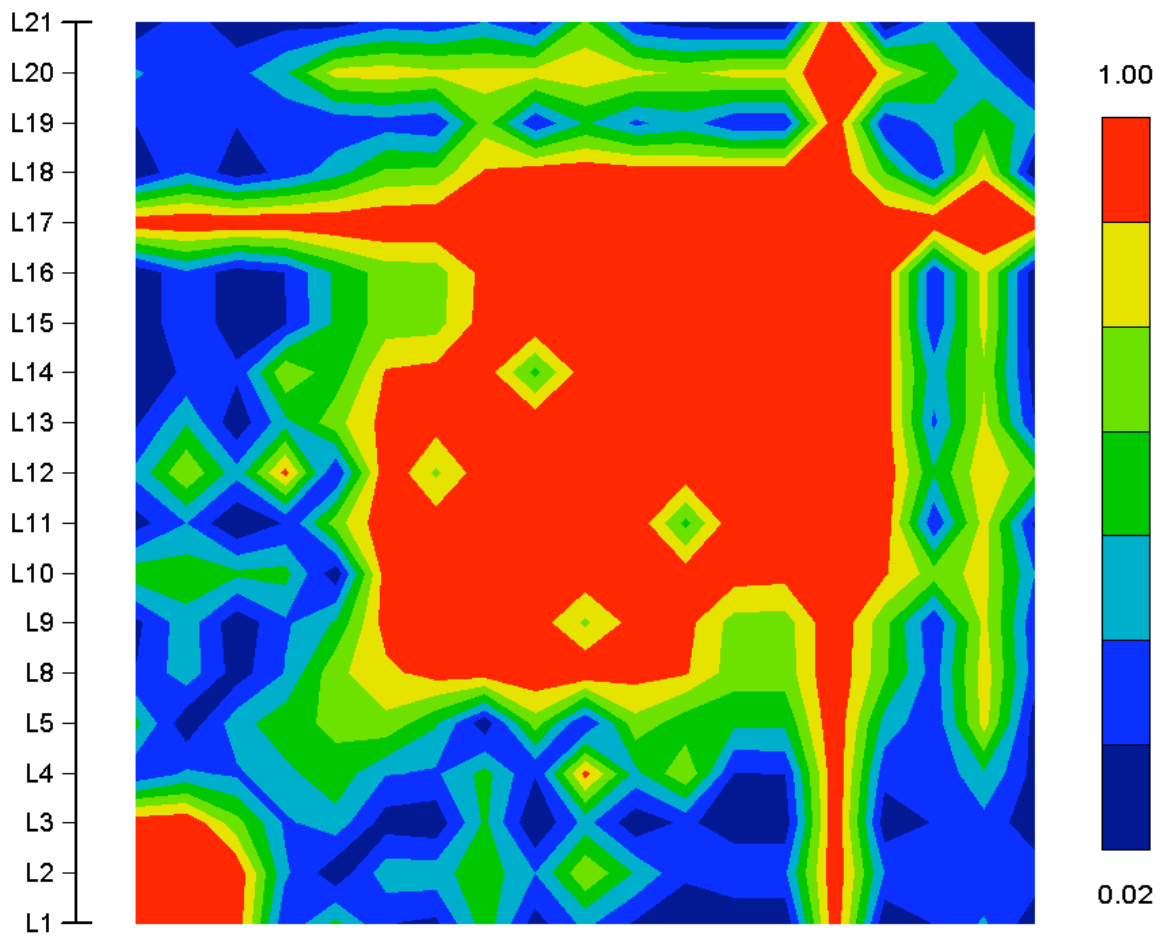


Abbildung 2: Haplotyp-Block-Struktur am *DAO*-Lokus

L1 bis L21 stellen die untersuchten Marker dar. Die farbliche Skalierung gibt die Stärke des Kopplungsungleichgewichtes (LD) zwischen den Varianten wieder (rot entspricht starkem LD (1.00), blau schwachem LD (0.02)). Es bilden sich drei unterschiedliche Haplotyp-Blöcke am *DAO*-Lokus ab (von Marker L1-L3, L8-L18 und L19-L21).

6 Diskussion

Der Aufklärung der genetischen Ursachen für psychiatrische Erkrankungen kommt große Bedeutung zu. Sie wird auch zunehmend durch die fortlaufenden technologischen und bioinformatischen Weiterentwicklungen, mit den Informationen des *Humanen Genom Projekts* und des *HapMap Projekts* und den immer aussagekräftigeren Patientenkollektiven möglich. Gerade bei psychiatrischen Krankheiten, für die die biologischen Ursachen (noch) weitestgehend ungeklärt sind, stellen identifizierte Risikogene die entscheidenden Ausgangspunkte dar, um die zugrunde liegende Pathophysiologie aufzuklären. In einem interdisziplinären Forschungsansatz wird es dann u. a. darum gehen, die krankheitsdisponierenden Abläufe in den – mit den Risikogenen assoziierten – Pathways zu verstehen und deren Eignung als therapeutische Targets und Biomarker für die Prävention und Prognose zu prüfen. Mit den Kliniken werden Korrelationsanalysen zwischen den Krankheitsgenen und Umweltfaktoren, Therapieformen, spezifischen Symptomen und Endophänotypen zu einer zunehmend molekular geprägten Krankheitsklassifikation führen.

Bei genetisch komplexen Krankheiten gelingt die Identifikation von Risikogenen durch Assoziationsanalysen, wobei möglichst große und detailliert phänotypisierte Stichproben von Patienten und Kontrollen entscheidend sind. Gene, die aus funktionellen Überlegungen am Krankheitsprozess beteiligt sein könnten und in zuvor identifizierten Kopplungsregionen liegen, stellen besonders aussichtsreiche Kandidaten für Assoziationsanalysen dar. Werden positive Assoziationsbefunde bei genetisch komplexen Krankheiten erhoben, sind Replikationsuntersuchungen an unabhängigen Kollektiven von großer Bedeutung. Hierdurch ist das Erfassen möglicher Stratifikationseffekte und Zufallsbefunde möglich. Bei schizophrenen Störungen konnten durch Assoziationsanalysen in Kopplungsregionen bereits einige Gene identifiziert werden. Von diesen muss angenommen werden, dass sie am Krankheitsprozess beteiligt sind. Es sind das *Disrupted-In-Schizophrenia-1-Gen (DISC1)* auf 1q42 (Hennah et al. 2006), das *Dysbindin-Gen (DTNBP1)* auf 6p22 (Williams et al. 2005), das *Neuregulin-1-Gen (NRG1)* auf 8p12-21 (Tosato et al. 2005) und das *G72-Gen (DAOA)* auf 13q32-34 (Abou Jamra et al. 2006).

Das Ziel der vorliegenden Arbeit lag darin, den möglichen Beitrag des *DAO*-Gens am Entstehungsprozess schizophrener Störungen aufzuklären. Hierfür haben wir 21 genetische *DAO*-Varianten in einer umfangreichen Assoziationsanalyse an einem Fall-Kontroll-Kollektiv

bestehend aus 531 Patienten und 755 Kontrollen deutscher Herkunft untersucht. Gegenstand der vorliegenden Arbeit war auch das Erfassen der genomischen Struktur des *DAO*-Lokus und gegebenenfalls die weitere Einengung (Fine-Mapping) des genomischen Bereichs, in dem die krankheitsdisponierende(n) Variante(n) für schizophrene Störungen lokalisiert ist (sind).

Das *DAO*-Gen, das in der chromosomalen Kopplungsregion 12q24 lokalisiert ist, wurde erstmals von der Gruppe um Chumakov et al. (2002) als Kandidatengen bei schizophrenen Störungen untersucht. Hierbei ergaben sich für vier von acht untersuchten SNP-Markern in *DAO* Assoziationshinweise in einem französisch-kanadischen Kollektiv mit schizophrenen Störungen. Weiterführende funktionelle Untersuchungen konnten zudem zeigen, dass *DAO* wahrscheinlich an der glutamatergen Neurotransmission beteiligt ist (Chumakov et al. 2002). Zum Zeitpunkt des experimentellen Teils der vorliegenden Arbeit lag lediglich eine Replikationsstudie zu den initialen Assoziationsbefunden am *DAO*-Lokus bei schizophrenen Störungen vor. Sie entstammt der eigenen Arbeitsgruppe und wurde an einem Fall-Kontroll-Kollektiv mit schizophrenen Störungen deutscher Herkunft durchgeführt. Es zeigten sich positive Assoziationshinweise bei drei untersuchten Varianten (Schumacher et al. 2004). Die vorliegende Arbeit stellt eine weiterführende und detaillierte Analyse dieser Untersuchung dar.

6.1 *DAO*-Einzelmarkeranalyse – Eigene und unabhängige Befunde

Die Einzelmarkeranalyse zeigte in unserem Kollektiv für sieben SNP-Marker (rs11114071, rs4964766, rs2070586, SNP-2-Intron1, rs2111902, rs3918346, rs3741775) signifikante Assoziation zu schizophrenen Störungen (s. a. Ergebnisse). Sechs der assoziierten Varianten liegen dabei im Haplotyp-Block 2 (s. a. u.), wobei drei dieser Marker die stärksten Assoziationshinweise zur schizophrenen Störung lieferten (rs2070586, SNP-2-Intron1, rs2111902). Im Folgenden werden die Befunde der eigenen Arbeit in Zusammenschau mit den Ergebnissen unabhängiger Assoziationsstudien am *DAO*-Lokus diskutiert. Die Tabelle 29 dient dabei als Übersicht und gibt die in den einzelnen Studien assoziierten Marker am *DAO*-Lokus wieder.

6.1.1 Assoziationsbefunde von *DAO*-Varianten für die Replikation

Insgesamt wurden vier Varianten (rs2111902, rs3918346, rs3741775, rs9318347) im vorliegenden Kollektiv genotypisiert, da sie zuvor Assoziationshinweise in anderen Kollektiven mit schizophrenen Störungen gezeigt hatten. Die SNP-Marker rs2111902, rs3918346 und

rs3741775 waren im Kollektiv der initialen Untersuchung von Chumakov et al. (2002) assoziiert (rs2111902 p=0,017 (OR 1,41), rs3918346 p=0,007 (OR 1,51), rs3741775 p=0,001 (OR 1,53)). Dabei wurden 213 Patienten mit schizophrenen Störungen und 241 Kontrollen untersucht, die kanadisch-französischer Herkunft waren. Im Folgenden konnten Schumacher et al. (2004) im deutschen Kollektiv (299 Patienten, 300 Kontrollen) ebenfalls Assoziation zwischen diesen Varianten und schizophrenen Störungen finden (rs2111902 p=0,026 (OR 1,33), rs3918346 p=0,019 (OR 1,37), rs3741775 p=0,021 (OR 1,31)). Die Befunde konnten im vorliegenden und erweiterten Fall-Kontroll-Kollektiv (Deutschland) bestätigt werden (rs2111902 p=0,021 (OR 1,24), rs3918346 p=0,039 (OR 1,21), rs3741775 p=0,046 (OR 1,17), s. a. Tabelle 29).

Marker (Haplotyp- Block)	Chumakov et al. Kanada	Schumacher et al. Deutschland	Wood et al. USA	Corvin et al. Irland	Liu et al. China	Yamada et al. Japan	Liu et al. Taiwan	Aktuelle Studie Deutschland
rs11114071 (Block 1)	-	-	-	-	-	-	-	0,040 (1,20)
rs4964766 (Block 2)	-	-	-	-	-	-	-	0,049 (1,22)
rs2070586 (Block 2)	-	-	0,012 (-)	-	-	-	-	0,015 (1,31)
SNP-2-Intron1 (Block 2)	-	-	-	-	-	-	-	0,017 (1,31)
rs2111902 (Block 2)	0,017 (1,41)	0,026 (1,33)	0,00056 (1,52)	0,018 (1,29)	n.s.	n.s.	n.s.	0,021 (1,24)
rs3918346 (Block 2)	0,007 (1,51)	0,019 (1,37)	0,00004 (1,71)	0,003 (1,43)	n.s.	n.s.	n.s.	0,039 (1,21)
rs3741775 (Block 2)	0,001 (1,53)	0,021 (1,31)	n.s.	n.s.	0,000001 (1,59)	n.s.	n.s.	0,046 (1,17)
rs3825251 (Block 2)	-	-	0,0025 (-)	-	n.s.	n.s.	-	n.s.
rs3918347 -	0,012 (1,45)	-	-	-	-	-	-	n.s.
rs3918305 (Block 3)	-	-	-	-	-	0,020 (-)	-	n.s.

Tabelle 29: Genetische Varianten am *DAO*-Lokus, die in vorliegender Arbeit untersucht wurden und positive Assoziationshinweise bei der eigenen und/oder bei unabhängigen Untersuchungen zeigten (angegeben sind die p-Werte sowie die Odd Ratios (ORs) in Klammern).

Nach Abschluss unserer experimentellen Arbeiten wurden fünf unabhängige Assoziationsanalysen bei schizophrenen Störungen publiziert, denen o. g. Varianten zugrunde lagen. Wood et al. (2007) untersuchten 451 Patienten und 291 Kontrollen US-amerikanisch-europäischer Herkunft. Hierbei waren zwei der o. g. Varianten zum Erkrankungsstatus assoziiert (rs2111902 $p=0,00056$ (OR 1,52), rs3918346 $p=0,00004$ (OR 1,71), s. a. Tabelle 29). In dem Kollektiv mit irischer Herkunft von Corvin et al. (2007) (373 Patienten, 812 Kontrollen) waren diese Varianten ebenfalls zu schizophrenen Störungen assoziiert (rs2111902 $p=0,018$ (OR 1,29), rs3918346 $p=0,003$ (OR 1,43)). In beiden Kollektiven – Wood et al. (2007) und Corvin et al. (2007) – wurde ebenfalls SNP rs3741775 analysiert, der keine Assoziation zeigte. Die genannten Varianten wurden auch an drei Kollektiven asiatischer Herkunft mit schizophrenen Störungen untersucht. Die Befunde konnten dabei von Yamada et al. (2005) (570 Patienten, 570 Kontrollen japanischer Herkunft) und von Liu et al. (2006) (218 Familien taiwanesischer Herkunft, insgesamt 864 genotypisierte Individuen) auf Einzelmarkerebene nicht bestätigt werden. Demgegenüber konnten Liu et al. (2004) in ihrem Kollektiv mit 547 schizophrenen Patienten und 536 Kontrollen chinesischer Herkunft Krankheitsassoziation bei SNP-Marker rs3741775 finden ($p=0,000001$ (OR 1,59)). Alle anderen von der chinesischen Arbeitsgruppe untersuchten Varianten waren hingegen nicht zur schizophrenen Störung assoziiert (s. Tabelle 29).

Positive Assoziationshinweise für den SNP-Marker rs3918347 ergaben sich bislang lediglich in der initialen Untersuchung von Chumakov et al. (2002) ($p=0,012$ (OR 1,45)). In der vorliegenden Studie konnten die Genotypen dieses Markers nicht analysiert werden, da sie starke Abweichungen vom Hardy-Weinberg-Gleichgewicht (HWE) in den Kontrollen zeigten. Labortechnische Schwierigkeiten bei der Genotypisierung dieser Variante sind hierfür verantwortlich. Der Marker ist auch die einzige der initial untersuchten Varianten, zu dem keine Assoziationsergebnisse von anderen Arbeitsgruppen vorliegen. Es ist davon auszugehen, dass bei unabhängigen Untersuchungen – sofern rs3918347 dort typisiert wurde – ebenfalls technische Schwierigkeiten bei der Genotypisierung aufgetreten sind. Inwieweit die Befunde von Chumakov et al. (2002) zu diesem Marker valide sind, kann durch vorliegende Arbeit nicht geklärt werden.

6.1.2 Assoziationsbefunde von *DAO*-Varianten für das Fine-Mapping

14 Varianten wurden erstmals in vorliegender Arbeit untersucht. Das Ziel lag dabei darin, den eigentlichen Risikobereich innerhalb des *DAO*-Gens durch eine möglichst gute Marker-Abdeckung weiter einzuengen (Fine-Mapping). Für vier der erstmals hier typisierten Varianten

konnten wir positive Assoziationshinweise finden (rs11114071 $p=0,040$ (OR 1,20), rs4964766 $p=0,049$ (OR 1,22), rs2070586 $p=0,015$ (OR 1,31), SNP-2-Intron1 $p=0,017$ (OR 1,31). Bis auf SNP rs11114071 sind sie – wie auch die o. g. assoziierten Varianten – allesamt im Haplotyp-Block 2 lokalisiert (s. Tabelle 29). Einer dieser Marker wurde mittlerweile auch in einer unabhängigen Studie untersucht; unsere Ergebnisse konnten dabei repliziert werden. Wood et al. (2007) fanden eine signifikante Assoziation bei rs2070586 ($p=0,012$, OR keine Angabe) und rs3825251 ($p=0,0025$, OR keine Angabe) in ihrem US-amerikanisch-europäischen Kollektiv mit schizophrenen Störungen (451 Patienten und 291 Kontrollen). Für die übrigen drei Marker, die im vorliegenden Kollektiv Assoziationshinweise gezeigt haben, liegen (bislang) keine Ergebnisse unabhängiger Arbeitsgruppen vor.

Von den zehn Markern, die erstmals im vorliegenden Kollektiv typisiert wurden und die keine Assoziation zu schizophrenen Störungen zeigten, wurde in der Zwischenzeit eine Variante in einem unabhängigen Kollektiv genotypisiert. Es handelt sich um rs3918305, der im Haplotyp-Block 3 lokalisiert ist und der einzige Marker mit positiver Assoziation in dem japanischen Kollektiv (570 Patienten, 570 Kontrollen) von Yamada et al. (2005) war ($p=0,020$, OR keine Angabe, s. a. Tabelle 29).

6.2 *DAO*-Haplotypanalyse – Eigene und unabhängige Befunde

Die Analyse zur genomischen Struktur am *DAO*-Lokus ergab das Vorliegen von drei unterschiedlichen Haplotyp-Blöcken. Bei unseren anschließenden Multimarkeranalysen zeigten sich dabei schwache Assoziationshinweise für Marker in Haplotyp-Block 1, der im 5' Bereich von *DAO* lokalisiert ist. Hier war die Verteilung der einzelnen Haplotypen zwischen Patienten und Kontrollen unterschiedlich, wobei kein einzelner Haplotyp krankheitsassoziiert war (s. a. Ergebnisse). Demgegenüber ergaben sich – übereinstimmend mit der Einzelmarkeranalyse – starke Assoziationen zu schizophrenen Störungen im Bereich von Haplotyp-Block 2. Dieser Haplotyp-Block erstreckt sich zwar über einen Großteil des gesamten *DAO*-Gens (Exon 1 bis Exon 11), die stärkste Assoziation zeigte sich jedoch für einen 3-Marker-Haplotyp, der im Intron 1 von *DAO* liegt (s. a. Ergebnisse).

Die *DAO*-Multimarkeranalysen bei schizophrenen Störungen, die an unabhängigen Kollektiven mit europäischer Herkunft durchgeführt wurden, lassen eine Einordnung unserer Befunde nur unzureichend zu. Chumakov et al. (2002) und Wood et al. (2007) führten keine Haplotypanalysen

bei ihren Untersuchungen durch. Bei der Analyse von Corvin et al. (2007) ergaben sich im Gegensatz zur Einzelmarkeranalyse beim Betrachten der Haplotypen keine signifikante Assoziationen. Das Untersuchungskollektiv von Schumacher et al. (2004), das zwar übereinstimmend für den Haplotyp-Block 2 die stärksten Assoziationshinweise zeigte, stellt keine völlig unabhängige Stichprobe dar.

In den drei Kollektiven asiatischer Herkunft mit schizophrener Störung ergaben die Multimarkeranalysen in zwei Untersuchungen signifikante Assoziationen. Liu et al. (2004) fanden ebenfalls in dem von uns identifizierten Haplotyp-Block 2 signifikante Assoziationshinweise, wobei sich der in diesem Kollektiv assoziierte 6-Marker-Haplotyp (allelisch) von dem deutschen unterscheidet. Mit einer Frequenz von 5,9% bei Patienten gegenüber 1,9% bei Kontrollen ist der asiatische Risikohaplotyp zudem seltener als der von uns identifizierte Haplotyp (15% bei Patienten, 11,9% bei Kontrollen). Ob der von Yamada et al. (2005) bei japanischen Patienten identifizierte 3-Marker-Haplotyp mit dem Risikohaplotyp von Liu et al. (2004) übereinstimmt, ist schwer abzuschätzen. In beiden Untersuchungen fanden unterschiedliche Marker bei den Multimarkeranalysen Verwendung. Allerdings liegt der von Yamada et al. (2005) identifizierte Haplotyp ebenfalls im Haplotyp-Block 2 (rs3741775, rs3825251), wobei ein Marker ebenfalls untersucht wurde (rs3918305), der in Haplotyp-Block 3 lokalisiert ist und den Rekombinations-Hotspot zwischen Block 2 und 3 im deutschen Kollektiv damit überschreitet.

6.3 Der *DAO*-Lokus – Dispositionsfaktor für schizophrene Störungen

Die positiven Assoziationshinweise der vorliegenden sowie der drei unabhängigen Untersuchungen an Kollektiven europäischer Herkunft weisen auf eine Beteiligung des *DAO*-Lokus am Entstehungsprozess schizophrener Störungen hin. Die stärksten Assoziationen ergaben sich dabei übereinstimmend für Varianten im Bereich von *DAO*-Intron 1 (s. Einzelmarkeranalyse, Tabelle 29). Der gleiche Genabschnitt zeigt auch bei asiatischen Kollektiven mit schizophrenen Störungen Assoziation, wobei die Hinweise in der asiatischen Population (bislang) weniger eindeutig sind und die Multimarkeranalysen auf populationspezifische Risikovarianten innerhalb der Risikoregion hinweisen.

Bei Intron 1 von *DAO* handelt es sich auch funktionell um einen sehr interessanten Genbereich. Da das Start- bzw. *ATG*-Codon von *DAO* in Exon 2 lokalisiert ist, führten Fukui und Miyake (1992) umfangreiche *DAO*-Sequenzanalysen im 5'-Bereich des Start-Codons durch. Die stärksten Hinweise für regulatorische Elemente ergaben sich dabei in Intron 1, u. a. mit mehreren Sequenzelementen für eine TATA- und CAAT-Box (s. Anhang). Diesem Genabschnitt – der zugleich starke Assoziationshinweise bei schizophrenen Störungen zeigt – könnte somit eine genregulatorische Funktion zukommen. Der Hypothese, wonach die krankheitsdisponierenden Varianten in diesem Bereich die Expression von *DAO* beeinflussen, kommt umso stärkere Bedeutung zu, da bislang keine kodierende Variante im Bereich des *DAO*-Gens gefunden wurde. Auch die von uns typisierten Marker scheinen nicht direkt krankheitsdisponierend zu sein. Die Ergebnisse aller bioinformatischen Prädiktionsprogramme für das Erfassen funktionell relevanter bzw. genregulatorisch wirkender SNPs sind für die vorliegenden Marker negativ. So scheinen die hier typisierten Varianten vielmehr im Kopplungsungleichgewicht (LD) zu den pathophysiologisch relevanten Veränderungen zu liegen.

7 Ausblick

Die Ergebnisse der vorliegenden Untersuchung stellen einen Beitrag zur Erforschung von schizophrenen Störungen dar. Aufgrund unserer und unabhängiger Assoziationsbefunde ist von einer molekulargenetischen Beteiligung von *DAO* am Entstehungsprozess dieser Krankheitsformen auszugehen, wobei die risikoassoziierte(n) Variante(n) vermutlich im Haplotyp-Block 2 lokalisiert ist (sind). Dabei sollte Intron 1, das im Haplotyp-Block 2 liegt, wegen seiner wahrscheinlichen Beteiligung an der *DAO*-Genregulation, besondere Aufmerksamkeit bei zukünftigen Untersuchungen zukommen. Der Haplotyp-Block 2 (etwa 18,3 kb) bzw. Intron 1 (etwa 4,8 kb) ist auf genomischer Ebene relativ umschrieben. Umfangreiche Re-Sequenzierungen an Patienten, die den assoziierten Abschnitt tragen, stellen daher den nächsten Schritt zur Identifikation der kausalen Risikovariante(n) dar. Die Ergebnisse der Re-Sequenzierungen sollten dabei auch mit denen an Patienten asiatischer Herkunft verglichen werden, die den in dieser Population assoziierten Risikohaplotyp tragen. Die dabei identifizierten Varianten sollten anschließend – priorisiert nach deren potentiellen funktionellen Relevanz (bioinformatische Prädiktionsprogramme) – zellbiologischen Analysen zugeführt werden. Parallel dazu werden quantitative Analysen an lymphoblastoiden Zelllinien (LCL) und (soweit verfügbar) ZNS-Gewebe klären, inwieweit der identifizierte Risikohaplotyp die Expression von *DAO* beeinflusst.

Unabhängig davon werden die Ergebnisse der ersten *Genomweiten Assoziationsanalysen* (GWAS) bei schizophrenen Störungen, die in Kürze veröffentlicht werden, vertiefte Einblicke in deren molekulare Ursachen liefern. Durch die Entwicklung moderner Hochdurchsatztechnologien können inzwischen >1 Mio. SNP-Varianten genomweit analysiert werden, die in konstanten Abständen zueinander liegen und das Erfassen aller häufigen Haplotypen ermöglichen. Hierdurch wird es möglich sein, die Bedeutung des *DAO*-Gens auch im Vergleich mit den sich bei GWAS ergebenden genomweiten Assoziationen in anderen Risikogenen zu beurteilen. Durch die Verfügbarkeit von genomweiten Daten werden zudem Interaktionsanalysen möglich sein, bei denen die vorliegend identifizierten Marker als konditionale Varianten eingesetzt werden können. Von Interesse wird dabei sein, ob der *DAO*-Lokus mit anderen Risikogenen interagiert, die ebenfalls die glutamaterge Neurotransmission betreffen.

Sollten die genannten Untersuchungen zeigen, dass *DAO* bzw. der assoziierte Pathway von besonders großer Bedeutung für den Entstehungsprozess schizophrener Störungen ist, kommt den

zellbiologischen Untersuchungen zur Aufklärung des Pathomechanismus von *DAO* bzw. des Pathways (s. o.) eine hohe Priorität zu. Auf der Phänotypenebene muss dann auch untersucht werden, ob bestimmte klinische Symptome oder Auffälligkeiten im Bereich der Bildgebung (Endophänotypen) besonders stark mit *DAO* bzw. dem assoziierten Pathway korreliert sind. Dabei wird auch Forschungsarbeiten große Bedeutung zukommen, die der Überprüfung des *DAO*-Gens bzw. des assoziierten Pathways als geeignetes Target für die Entwicklung kausal wirkender Medikamente und als Biomarker (Prävention, Prognose) dienen.

8 Zusammenfassung

Die Zielsetzung der vorliegenden Untersuchung lag darin, den Beitrag des Gens *DAO* am Entstehungsprozess schizophrener Störungen aufzuklären. Bei *DAO* handelt es sich um ein aussichtsreiches Kandidatengen für Assoziationsanalysen bei schizophrenen Störungen. Es liegt in der chromosomalen Region 12q24, zu der replizierte Kopplungshinweise bei schizophrenen Störungen vorliegen (Wilcox et al. 2002). Zudem weisen funktionelle Untersuchungen auf eine *DAO*-Beteiligung an der glutamatergen Neurotransmission hin (Chumakov et al. 2002); ein Pathway, der aufgrund von pharmakologischen Befunden an der Entstehung schizophrener Störungen beteiligt sein könnte (Heresco-Levy et al. 2005). Vor Beginn der eigenen Arbeiten – Assoziationsanalysen mit 21 *DAO*-Varianten an einem deutschen Kollektiv mit schizophrenen Störungen (531 Patienten, 755 Kontrollen) – konnten bereits zwei Untersuchungen Assoziationen zwischen SNPs in *DAO* und dem Erkrankungsstatus nachweisen (Chumakov et al. 2002, Schumacher et al. 2004). Die Analyse von Schumacher et al. (2004) entstammt dabei der eigenen Arbeitsgruppe. Die vorliegende Arbeit stellt eine Weiterführung dieser initialen Untersuchung dar.

Unsere Ergebnisse weisen (i) übereinstimmend mit den Befunden der initialen und anschließenden *DAO*-Assoziationsanalysen auf eine Beteiligung des *DAO*-Lokus am Entstehungsprozess schizophrener Störungen hin. Wir konnten sieben krankheitsassoziierte Marker bei den Einzelmarkeranalysen und einen assoziierten 3-Marker-Risikohaplotyp identifizieren. Durch die relativ hohe Markerabdeckung konnten wir (ii) die genomische Struktur bzw. Architektur des *DAO*-Lokus charakterisieren (Vorliegen von drei unterschiedlichen Haplotyp-Blöcken). (iii) Die eigenen und unabhängigen Assoziationsergebnisse zeigen die stärksten Assoziationshinweise in Haplotyp-Block 2 bzw. Intron 1 des *DAO*-Lokus. Das Vorliegen der krankheitsdisponierenden Genvariante(n) in diesem Bereich muss angenommen werden. Dem Intron 1, das im 5' Bereich des Start-Codons von *DAO* lokalisiert ist (Exon 2), kommt dabei besondere Bedeutung zu. In diesem Bereich weisen Sequenzanalysen auf das Vorliegen von regulatorischen Elementen für die *DAO*-Genexpression hin (Fukui und Miyake 1992).

Die Ergebnisse vorliegender Arbeit bieten die Grundlage für gezielte Re-Sequenzierungsanalysen zur Identifikation der eigentlichen Risikovariante(n) in Bereich von Haplotyp-Block 2 bzw. Intron 1. Zudem sollten *DAO*-Expressionsanalysen an lymphoblastoiden Zelllinien von

Individuen mit dem identifizierten Risikohaplotyp durchgeführt werden. Eine veränderte Genregulation könnte das pathophysiologische Korrelat für schizophrene Störungen am *DAO*-Lokus darstellen. Die zukünftige Forschungsstrategie wird auch durch die Ergebnisse der bald publizierten *Genomweiten Assoziationsanalysen* (GWAS) bei schizophrenen Störungen beeinflusst werden. Hierdurch werden die Bedeutung von *DAO* und die dem Gen beizufügende Priorität gegenüber anderen Risikogenen beurteilbar, die im Rahmen von GWAS bei schizophrenen Störungen identifiziert werden.

Anhang

DAO Intron 1 (Build März 2004)

Unten aufgeführt ist die Sequenz von Intron 1 des *DAO*-Gens. Fukui und Miyake (1992) klärten die Struktur des Gens auf und fanden im Rahmen ihrer Arbeit Abschnitte, die möglicherweise regulatorische Elemente des *DAO*-Gens darstellen. Insbesondere *API*- und *SPI*-Bindungsstellen, sowie *TATA*- und *CAAT*-Boxes könnten regulatorische Einheiten darstellen. Zur weiteren Übersicht sind die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten SNP- und STR-Marker ebenfalls angegeben (s. a. Text und Fukui und Miyake (1992)).

```

ccaccaccagggttcaagcaattctcctgcctcagcctcctgtgtagcca
ggattacaggcacacccccaccactcctggctgattttttgtaattttagt
agagacggggtttcgccatggttgccaggctgggtctcgaactcctgacct
caggtgatccaccaccatggcctcccaaagtgtcagaattacaggtgtg
aggcactgtgcccagccgacctcttttaaaaaaggaaaaataactatgc
agtgagtattttgcatgcattttcttatttcatcttctgtctttttatttg
atgatactaaaggcaggtgtagaggctggattgctaaagctgacccaaa
gaatgcctccctcagggtggttggtccctctctctcaggcctcagtctt
cccatctgtacagtgaggtgcctgcagatctctgggctctaaaaatcaca
gctccatgtttatccctggcagaggaagggcctggagtctgtgcttgc
gtctctgggatacgggagcaaagagccacgcatectcatggcccacacag
gcgtcacctccagtctctccttggectcatctccccagcgtcctggaatg
gcatcgggctggcccaggagcccctgtcctgtgcctctcctttcccctc
aggggctgccaggctgaccacccccaccgcaggccaggcctacagtgcc
catggaacgtcctgacctccccagggtggcagcaggaagaaggaagaa
aggggatcctctccagctggccagagagac agaccttcttgtgct catca
accctccaagaatgctgacctcctccttcccccaaggcctgtccacag
gggcttgagatcagccagaaaagtcaggcaacttttcagggactgggagc
gaggtctcccggccgggctgggtccagtctctgtgggca gtgcagtg cc
gagccccaccctcaagccgtgcctgtccatagctccagactttgacct
TGCACTCCAGTCCGGGCTGGCGGACAGAGGGCTGGAAACAAGACGCTCCA
GAATCAGGAGCTTCCCCTCAGGAAATAGCATCTCTGTGTCCCCGCACTGCA
GTTGTCTGGTCTCTCCAGCAGTTTGGTACTTCCGgtgagtggcagatgca
cctttgagctggggacaggggttgggagaggggagaggcaaaggatttca
tgtcctcccaatgtcaaagacagggtcaacattacagcctaaggcaggt
gacaggaaaggagagatccagcctctcaaacatccagcagagagaccata
ggtaagtgatttttccctccccagcctcagtttcttcacctggaacatg
gggatcataactcccctcttacagcgtgagtctgagtgttaaaagaggtg
gtgcatgtaaagtgcttagagcagatctaggcacatagcaagtactcaaa
tggtagtattattattttttgggtggggagttggtaggctggttctcaaa

```

*glucocorticoid
responsive element*

*sterol-dependent
repressor sequence*

Exon1

cttttatagcttctgttccatttcaaggataaactctgcaaataacttca
 tgagaagtagccgtgtggtgcaaccagggagaactaattatgttcattca
 aatgcctcatctctggcttactgatttttttttttaaaaagaagtctttc
 atattctttgctatgggcacatagcaatcaaaggcatcagctgtctcaga
 ttgccttctaggggacaagggaggctcctaggcagataaatgcaagactga
 aagacaagcagaaagcatcaagtggcaactgcatgccaactgcctaaata
 tttttttggagcagtgacagaaagcggatagaactgggtctaggtccga
 atgctgtcccatactgactggtaaccttggtgggtgacttctcctccc
 taaacctcagtc**ccagcctccagaatgagggcggaaccttccctacttc**
 ctagagcagttgagaggattgagaggattatgtcggtagtctacag
 gtgtctggcaagtggcagagacccaaatacattggttcccttctgctcc
acacttacacagacatttctaatacacacacacacacacacacacacaca
cacacacaaatataataatcccagctgtttgcatcttctgggatacatal
 tccaagcttgctgggttgaagtaatgatgtaaacagaggagaacggcaa
 cactaataaaaaacatcgcaacaacacgaaaatgtccaaccgaataactg
 agctgggtgctgttaagtccaaaagctcattacctacacgcatgaatgat
 tttaacctaaggctggatctgccacatctgacaatctgtctctggcttgtc
 atgaggacctcatgcatttattttgtatttttaaaa**cacacacacacacac**
acacacacacacacacacacgttgctataatcagtgctcaactttgactca
 tatcttgaaatttttttaaaaaagataattgacttaggactcacactttt
 ttccttttaaatttttttttttttttttttttttttttttttttgacagagtttactctt
 gtcacctgggctggagtgcaatggcatgatttctgcccactgcaatctcc
 acctcccaggttcaagggattctcctgctcggcctcccagtagctgga
 atttcaggcgtgcaccacatgccaagctaattttttttgtattttttgtag
 agacagggtttcacatattggccaggctggtcttgaactcc**cgacctca**
 agtgatctgccagcctcgacctcccaaagtgtggaattaaagacgtgag
 ccactgtgcccggcctttttgatctttcattctattcctaccaaacactct
 aaaaattcctacaggcattttattttattttattttatcttattttatat
 tataattttatgtttgaaatgcaggactctgaagcttcagctgttctatt
 taccggcttgattctcagatttttcaaaccatgtgatttactggcaagca
 tggcatttaagcacctaggctta**tgagtcag**gctggcctgggctctgcct
 ctcaccacctgggtgtccaggagctgatattccagtgaggagacaataag
 gcaaggagcttgtcagctctcataaaaagtttatagatgaggtcgggcat
 ggtggctcacgctgtaatcttagcactttgagagtctgaggccagcaaa
 tcacct**tgaggtca**gaagtttgagaccagcctggccaacatggtgaaacct
 tgtcttactaaaaatacaaaaattagccaggcatggttggtgcatgcctg
 taatcccagctactcaggaggctgaggcaggagaatcacctgaaccggg**g**
aggcagagtctgcagtgagcaagattgtaccattgcactccagcctggg
 cgacaagagtgaaactctgtctcgaaaaataaagtttatagatgaggaa

SNP-1-Intron1 valid c-t

STR STR-1-dao2

STR dao 3 rs3220845

cAMP-responsive 1

API binding site

cAMP-responsive 2

SP1 like 1

actgaggttcgattagattaaccaactcatcctggtttgctgggactc
 tgatgcactgacttttagtctgaaagtctgcatcctgggaggaccctcag
ccctgggcaagctgggaggttggtcacctcactcagtcagttgagca
 acttgcccagggttacatggctgggtgtggtgcccagtcaggctgcaacc
 tgggtctgtctgactctcagcctgggccatactgtctcttagattcttca
 tggagaattagaaaaatacagaaagccctttattcctctgccttctcat
 tgttaaca**tataaaaa**tggccaagcgggagggtgagtcaggcacacacctg
 aaagcccagcgtttgggaggctgagggggaggattgcttgagcctagg
 aattggaggtggcagtgagctatgattgtgccactgcactccagcctggg
 tgacagagtgagacctgtctcttaaaaaaagaaaaagagtggtcagct
 ctccggaaattatgcagacagtcaaaaagcccagagaggggaattaactt
 agccaaggtcgcacagcaaggcagaagtgaagccaggtctgactctgcct
 ttctcttctcctctttttttttt**gaggcagaat**ttcgtctgttgccca
 gactggaatgagtggtgcaactcagctcgtgcaacctctgctgcca
 ggttcaagcgattctcctgcctcagcctcccagtagctgggattacagg
 cgctgccaccgcctggctaattttttagtatttcagtagagatgggg
 tttcaccatcttgccagactggtcttgaagtctgacctcgtgatccac
 ccgcctcggcctcccaggtattgggattacaggcgtgaagccactgcagc
 tggctcctcctctctccttttggttcctgcaatgtctttgttctatgtgat
 ttttcaaatgctagagacaggaaggaggtgctgtgtgttgaggcct
 actctgtgcccagcgtggtaccaagaacttttgctaaacttcttatttaa
 tccttaaaatgacctgtgagattgggattaaccctgttttgagatgaa
 gagcttgtgtctccagaggcaaagtatgggggaagagggaagagagaaga
 ccaagggctcctgagaggggctgtcccctaagccccagtatccaagctcg
 ggctcgaagctggaaggagaattgcctagaggaacgatacctttctgttt
 gttggttctatctccaacttggtcttctgaaacccaacagagtcagttc
 ttgtgggctggagccgttttccctcctt**tataaaa**ctaggccatattaag
 aatgtcccgtgtccagggccacaggcccagttgccaggagctgaggtc
 tgc**g**ggaggagagttgtgagtgaaagtatgagggaaagttgaatttggtct
 tctgggcacaaataattctctgttctgcctcagcaggagcctgcagaat
 atttccctgctgtgcccgttaagtagcttcaagggttaaagctggtagg
 ccttctaaacttctcagggcc**caat**cagccctgtgcccgaagcaggtgg
 agttctgtgctggaagaccaagttctgaggccagacactgctctgtcat
 gctcatagctgcatttgctagctgccagcctggcacatggtagggtgtgca
 ttaagcgtgtgttgagtttactcaaattgaaattaagtcacagctgtacc
 atttaactggctgtg**tgacttca**ggtaagtcacatcacctctctgaacca
 cagtttctcctctgtaagacgggactgataacagcagcccctacctcat
 gacagtggtgggagacttgatgaaatggatgcttgtgaaagcacttagtgc
 cggggccagctggctcacagtaggtgctccacaaatgtcagtatattact

*rs4964766 valid c-t***TATA-BOX 1***SP1 like 2***TATA-Box 2***rs2070586 valid g-a***CAAT-Box****cAMP-responsive 3**

tcttttgcacagcagccttgtaaatggttacgtttggcatcttggtc
 aatttc^ccatccatcccctcaagcataggttattagaggttgaagcatct
 tgcccaaagttaacggccagtaggtggcagagctgagtcctgaagccaga
 gcccatcgactaaccaccggcctaccagcctacagttggtcgtgcct
 ctgctgggtcctttctattcccagcccagaaactgggtgtctggggacgc
 tccccagagaaagtgcacattcaccagccgtgtgactgtggccaagtc
 tcggtcacttctccatacctcagtgtttccatttgcaaacgggaacaat
 gatattccttctcctaggggtcatcggaaggtcaaa^{tataaaaa}gggc
 ttggtggtgtctggcaccttctaagccttcagtggtggtggcaatggcg
 ctaaggatgatggagatgatgggtgatgatg^tgtgcctcaacccttctt
 cccacag**GCTGCTGCAATGCGTGTGGTGGTATTGGAGCAGGAGTCATCG**
GGCTGTCCACCGCCCTCTGCATCCATGAGCGCTACCACTCAGTCCTGCAG
CCACTGGACATAAAGGTCTACGCGGACCGCTTCACCCACTCACCACCAC
CGACGTGGCTGCCGGCTCTGGCAGCCCTACCTTTCTGACCCCAACAACC
CACAGGAGGCgtgagtgagggtcacatagggtagcctggggtgcccatgg
 acctaagtctgcagagggagtcaggggtcccatcaccaagagcaagcccc
 ttgtggaagctctgatctagcataaaataaagaaaatgccaggcgtggtg
 gttcacgcctttaatcctagcactttgggaggtcgaggtgggaggatcac
 ttgaggccaggagttccagatcagcctgggcaacgtggtgaaaccccatc
 tctacaaaaatacaaaaaattagccgggcatggtggcgcacacctgtaa
 tcccagctactcgggaggctgaggcaggaaccatttgagcctaggagg
 tgaaggtggcagtgagctgagattccgccactgcactcgtgacagagtga
 gactctgtttcaaaaagaaaaataaagaaaagattcataaatattaag

SNP-2-Intron1 valid c-t

TATA-Box 3

rs2111902 (mdaao4)

valid t-g

Exon2

Literaturverzeichnis

Abi-Saab WM, D'Souza DC, Moghaddam B, Krystal JH. The NMDA antagonist model for schizophrenia: promise and pitfalls. *Pharmacopsychiatry* 1998; 31 Suppl 2, 104-109

About Jamra R, Schmäl C, Cichon S, Rietschel M, Schumacher J, Nöthen MM. The G72/G30 gene locus in psychiatric disorders: a challenge to diagnostic boundaries? *Schizophr Bull* 2006; 32, 4: 599-608

Ali DW und Salter MW. NMDA receptor regulation by Src kinase signalling in excitatory synaptic transmission and plasticity. *Curr Opin Neurobiol* 2001; 11, 3: 336-342

American Psychiatric Association. Task Force on DSM-IV. Diagnostic and statistical manual of mental disorders : DSM-IV. Washington, DC: American Psychiatric Association, 1994

Anson LC, Chen PE, Wyllie DJ, Colquhoun D, Schöpfer R. Identification of amino acid residues of the NR2A subunit that control glutamate potency in recombinant NR1/NR2A NMDA receptors. *J Neurosci* 1998; 18, 2: 581-589

Armitage P. Tests for Linear Trends in Proportions and Frequencies. *Biometrics* 1955; 11,3: 375-386

Becker T, Cichon S, Jonson E, Knapp M. Multiple testing in the context of haplotype analysis revisited: application to case-control data. *Ann Hum Genet* 2005; 69, Pt 6: 747-756

Becker T und Knapp M. A powerful strategy to account for multiple testing in the context of haplotype analysis. *Am J Hum Genet* 2004; 75, 4: 561-570

Beckmann H, Franzek E, Stober G. Genetic heterogeneity in catatonic schizophrenia: a family study. *Am J Med Genet* 1996; 67, 3: 289-300

Birchwood M, Iqbal Z, Chadwick P, Trower P. Cognitive approach to depression and suicidal thinking in psychosis. 1. Ontogeny of post-psychotic depression. *Br J Psychiatry* 2000; 177, 516-521

Blouin JL, Dombroski BA, Nath SK, Lasseter VK, Wolyniec PS, Nestadt G, Thornquist M, Ullrich G, McGrath J, Kasch L, Lamacz M, Thomas MG, Gehrig C, Radhakrishna U, Snyder SE, Balk KG, Neufeld K, Swartz KL, DeMarchi N, Papadimitriou GN, Dikeos DG, Stefanis CN, Chakravarti A, Childs B, Housman DE, Kazazian HH, Antonarakis S und Pulver AE. Schizophrenia susceptibility loci on chromosomes 13q32 and 8p21. *Nat Genet* 1998; 20, 1: 70-73

Brzustowicz LM, Honer WG, Chow EW, Little D, Hogan J, Hodgkinson K, Bassett AS. Linkage of familial schizophrenia to chromosome 13q32. *Am J Hum Genet* 1999; 65, 4: 1096-1103

Caldwell CB und Gottesman, II. Schizophrenia--a high-risk factor for suicide: clues to risk reduction. *Suicide Life Threat Behav* 1992; 22, 4: 479-493

Cannon TD, Kaprio J, Lonnqvist J, Huttunen M, Koskenvuo M. The genetic epidemiology of schizophrenia in a Finnish twin cohort. A population-based modeling study. *Arch Gen Psychiatry* 1998; 55, 1: 67-74

Cardno AG und Gottesman II. Twin studies of schizophrenia: from bow-and-arrow concordances to star wars Mx and functional genomics. *Am J Med Genet* 2000; 97, 1: 12-17

Cardno AG, Marshall EJ, Coid B, Macdonald AM, Ribchester TR, Davies NJ, Venturi P, Jones LA, Lewis SW, Sham PC, Gottesman II, Farmer AE, McGuffin P, Reveley AM, Murray RM. Heritability estimates for psychotic disorders: the Maudsley twin psychosis series. *Arch Gen Psychiatry* 1999; 56, 2: 162-168

Carlsson A, Hansson LO, Waters N, Carlsson ML. A glutamatergic deficiency model of schizophrenia. *Br J Psychiatry Suppl* 1999; 37: 2-6

Chapman LJ, Chapman JP, Kwapil TR, Eckblad M, Zinser MC. Putatively psychosis-prone subjects 10 years later. *J Abnorm Psychol* 1994; 103, 2: 171-183

Chumakov I, Blumenfeld M, Guerassimenko O, Cavarec L, Palicio M, Abderrahim H, Bougueleret L, Barry C, Tanaka H, La Rosa P, Puech A, Tahri N, Cohen-Akenine A, Delabrosse S, Lissarrague S, Picard FP, Maurice K, Essioux L, Millasseau P, Grel P, Debailleul V, Simon AM, Caterina D, Dufaure I, Malekzadeh K, Belova M, Luan JJ, Bouillot M, Sambucy JL, Primas G, Saumier M, Boubkiri N, Martin-Saumier S, Nasroune M, Peixoto H, Delaye A, Pinchot V, Bastucci M, Guillou S, Chevillon M, Sainz-Fuertes R, Meguenni S, Aurich-Costa J, Cherif D, Gimalac A, Van Duijn C, Gauvreau D, Ouellette G, Fortier I, Raelson J, Sherbatich T, Riazanskaia N, Rogaev E, Raeymaekers P, Aerssens J, Konings F, Luyten W, Macciardi F, Sham PC, Straub RE, Weinberger DR, Cohen N, Cohen D, Ouelette G, Realson J. Genetic and physiological data implicating the new human gene G72 and the gene for D-amino acid oxidase in schizophrenia. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99, 21: 13675-13680

Collingridge GL und Singer W. Excitatory amino acid receptors and synaptic plasticity. *Trends Pharmacol Sci* 1990; 11, 7: 290-296

Contreras PC. D-serine antagonized phencyclidine- and MK-801-induced stereotyped behavior and ataxia. *Neuropharmacology* 1990; 29, 3: 291-293

Corvin A, McGhee KA, Murphy K, Donohoe G, Nangle JM, Schwaiger S, Kenny N, Clarke S, Meagher D, Quinn J, Scully P, Baldwin P, Browne D, Walsh C, Waddington JL, Morris DW, Gill M. Evidence for association and epistasis at the DAOA/G30 and D-amino acid oxidase loci in an Irish schizophrenia sample. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 2007

Coyle JT. The glutamatergic dysfunction hypothesis for schizophrenia. *Harv Rev Psychiatry* 1996; 3, 5: 241-253

Craddock N, O'Donovan MC, Owen MJ. The genetics of schizophrenia and bipolar disorder: dissecting psychosis. *J Med Genet* 2005; 42, 3: 193-204

Ding C und Cantor CR. A high-throughput gene expression analysis technique using competitive PCR and matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight MS. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100, 6: 3059-3064

Dingledine R, Borges K, Bowie D, Traynelis SF. The glutamate receptor ion channels. *Pharmacol Rev* 1999; 51, 1: 7-61

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

Dunlop DS, Neidle A, McHale D, Dunlop DM, Lajtha A. The presence of free D-aspartic acid in rodents and man. *Biochem Biophys Res Commun* 1986; 141, 1: 27-32

Evins AE, Mays VK, Rigotti NA, Tisdale T, Cather C, Goff DC. A pilot trial of bupropion added to cognitive behavioral therapy for smoking cessation in schizophrenia. *Nicotine Tob Res* 2001; 3, 4: 397-403

First MB, Gibbon M, Williams JBW. Structured clinical interview for DSM-IV axis disorders: patient edition. Biometrics Research Department. New York State Psychiatric Institute, New York, 1997

Franzek E und Beckmann H. Different genetic background of schizophrenia spectrum psychoses: a twin study. *Am J Psychiatry* 1998; 155, 1: 76-83

Fukui K und Miyake Y. Molecular cloning and chromosomal localization of a human gene encoding D-amino-acid oxidase. *J Biol Chem* 1992; 267, 26: 18631-18638

Gottesman II und Wolfgram D. Schizophrenia genesis: The origins of madness. New York: Freeman, 1991.

Gottesman II und Bertelsen A. Confirming unexpressed genotypes for schizophrenia. Risks in the offspring of Fischer's Danish identical and fraternal discordant twins. *Arch Gen Psychiatry* 1989; 46, 10: 867-872

Häfner H, Maurer K, Ruhrmann S, Bechdolf A, Klosterkötter J, Wagner M, Maier W, Bottlender R, Moller HJ, Gäbel W, Wolwer W. Early detection and secondary prevention of psychosis: facts and visions. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* 2004; 254, 2: 117-128

Hashimoto A, Kumashiro S, Nishikawa T, Oka T, Takahashi K, Mito T, Takashima S, Doi N, Mizutani Y, Yamazaki T. Embryonic development and postnatal changes in free D-aspartate and D-serine in the human prefrontal cortex. *J Neurochem* 1993; 61, 1: 348-351

Hashimoto A und Oka T. Free D-aspartate and D-serine in the mammalian brain and periphery. *Prog Neurobiol* 1997; 52, 4: 325-353

- Hashimoto A, Oka T, Nishikawa T. Extracellular concentration of endogenous free D-serine in the rat brain as revealed by in vivo microdialysis. *Neuroscience* 1995; 66, 3: 635-643
- Hashimoto K, Fukushima T, Shimizu E, Komatsu N, Watanabe H, Shinoda N, Nakazato M, Kumakiri C, Okada S, Hasegawa H, Imai K, Iyo M. Decreased serum levels of D-serine in patients with schizophrenia: evidence in support of the N-methyl-D-aspartate receptor hypofunction hypothesis of schizophrenia. *Arch Gen Psychiatry* 2003; 60, 6: 572-576
- Hennah W, Thomson P, Peltonen L, Porteous D. Genes and schizophrenia: beyond schizophrenia: the role of DISC1 in major mental illness. *Schizophr Bull* 2006; 32, 3: 409-416
- Heresco-Levy U. Glutamatergic neurotransmission modulation and the mechanisms of antipsychotic atypicality. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2003; 27, 7: 1113-1123
- Heresco-Levy U, Javitt DC, Ebstein R, Vass A, Lichtenberg P, Bar G, Catinari S, Ermilov M. D-serine efficacy as add-on pharmacotherapy to risperidone and olanzapine for treatment-refractory schizophrenia. *Biol Psychiatry* 2005; 57, 6: 577-585
- Heresco-Levy U, Javitt DC, Ermilov M, Mordel C, Horowitz A, Kelly D. Double-blind, placebo-controlled, crossover trial of glycine adjuvant therapy for treatment-resistant schizophrenia. *Br J Psychiatry* 1996; 169, 5: 610-617
- Heresco-Levy U, Javitt DC, Ermilov M, Mordel C, Silipo G, Lichtenstein M. Efficacy of high-dose glycine in the treatment of enduring negative symptoms of schizophrenia. *Arch Gen Psychiatry* 1999; 56, 1: 29-36
- Higgins J. Effects of child rearing by schizophrenic mothers: a follow-up. *J Psychiatr Res* 1976; 13, 1: 1-9
- Hirai H, Kirsch J, Laube B, Betz H, Kuhse J. The glycine binding site of the N-methyl-D-aspartate receptor subunit NR1: identification of novel determinants of co-agonist potentiation in the extracellular M3-M4 loop region. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996; 93, 12: 6031-6036
- Huber G. *Psychiatrie Lehrbuch für Studium und Weiterbildung; 44 Tabellen*. Stuttgart: Schattauer, 2005
- Kendler KS und Diehl SR. The genetics of schizophrenia: a current, genetic-epidemiologic perspective. *Schizophr Bull* 1993; 19, 2: 261-285

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, 6: 456-468

Kendler KS, Karkowski-Shuman L, Walsh D. Age at onset in schizophrenia and risk of illness in relatives. Results from the Roscommon Family Study. *Br J Psychiatry* 1996; 169, 2: 213-218

Kendler KS, McGuire M, Gruenberg AM, O'Hare A, Spellman M, Walsh D. The Roscommon Family Study. III. Schizophrenia-related personality disorders in relatives. *Arch Gen Psychiatry* 1993; 50, 10: 781-788

Kennedy JL, Berg D, Bassett AS, Roy R, King N, Perkins M. Genetic linkage for Darier disease (keratosis follicularis). *Am J Med Genet* 1995; 55, 3: 307-310

Kety SS, Wender PH, Jacobsen B, Ingraham LJ, Jansson L, Faber B, Kinney DK. Mental illness in the biological and adoptive relatives of schizophrenic adoptees. Replication of the Copenhagen Study in the rest of Denmark. *Arch Gen Psychiatry* 1994; 51, 6: 442-455

Klaning U, Mortensen PB, Kyvik KO. Increased occurrence of schizophrenia and other psychiatric illnesses among twins. *Br J Psychiatry* 1996; 168, 6: 688-692

Kumashiro S, Hashimoto A, Nishikawa T. Free D-serine in post-mortem brains and spinal cords of individuals with and without neuropsychiatric diseases. *Brain Res* 1995; 681, 1-2: 117-125

Kuryatov A, Laube B, Betz H, Kuhse J. Mutational analysis of the glycine-binding site of the NMDA receptor: structural similarity with bacterial amino acid-binding proteins. *Neuron* 1994; 12, 6: 1291-1300

Laube B, Hirai H, Sturgess M, Betz H, Kuhse J. Molecular determinants of agonist discrimination by NMDA receptor subunits: analysis of the glutamate binding site on the NR2B subunit. *Neuron* 1997; 18, 3: 493-503

Leonhard K. *Aufteilung der endogenen Psychosen*. Berlin: Akademie-Verlag, 1957

Liu H, Wang H, Sheng M, Jan LY, Jan YN, Basbaum AI. Evidence for presynaptic N-methyl-D-aspartate autoreceptors in the spinal cord dorsal horn. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91, 18: 8383-8387

- Liu X, He G, Wang X, Chen Q, Qian X, Lin W, Li D, Gu N, Feng G, He L. Association of DAAO with schizophrenia in the Chinese population. *Neurosci Lett* 2004; 369, 3: 228-233
- Liu YL, Fann CS, Liu CM, Chang CC, Wu JY, Hung SI, Liu SK, Hsieh MH, Hwang TJ, Chan HY, Chen JJ, Faraone SV, Tsuang MT, Chen WJ, Hwu HG. No association of G72 and D-amino acid oxidase genes with schizophrenia. *Schizophr Res* 2006; 87, 1-3: 15-20
- Loftis JM, Janowsky A. The N-methyl-D-aspartate receptor subunit NR2B: localization, functional properties, regulation, and clinical implications. *Pharmacol Ther* 2003; 97, 1: 55-85
- Maier W, Lichtermann D, Minges J, Hallmayer J, Heun R, Benkert O, Levinson DF. Continuity and discontinuity of affective disorders and schizophrenia. Results of a controlled family study. *Arch Gen Psychiatry* 1993; 50, 11: 871-883
- Maier W, Lichtermann D, Minges J, Heun R. Personality disorders among the relatives of schizophrenia patients. *Schizophr Bull* 1994; 20, 3: 481-493
- Maina G, Albert U, Bada A, Bogetto F. Occurrence and clinical correlates of psychiatric comorbidity in delusional disorder. *Eur Psychiatry* 2001; 16, 4: 222-228
- Marcelis M, Navarro-Mateu F, Murray R, Selten JP, Van Os J. Urbanization and psychosis: a study of 1942-1978 birth cohorts in The Netherlands. *Psychol Med* 1998; 28, 4: 871-879
- Marino C, Nobile M, Bellodi L, Smeraldi E. Delusional disorder and mood disorder: can they coexist? *Psychopathology* 1993; 26, 2: 53-61
- Matsui T, Sekiguchi M, Hashimoto A, Tomita U, Nishikawa T, Wada K. Functional comparison of D-serine and glycine in rodents: the effect on cloned NMDA receptors and the extracellular concentration. *J Neurochem* 1995; 65, 1: 454-458
- McBain CJ und Mayer ML. N-methyl-D-aspartic acid receptor structure and function. *Physiol Rev* 1994; 74, 3: 723-760
- McKusick VA. Mendelian Inheritance in Man and its online version, OMIM. *Am J Hum Genet* 2007; 80, 4: 588-604
- Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* 1988; 16, 3: 1215

Mothet JP, Parent AT, Wolosker H, Brady RO, Jr., Linden DJ, Ferris CD, Rogawski MA, Snyder SH. D-serine is an endogenous ligand for the glycine site of the N-methyl-D-aspartate receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 97, 9: 4926-4931

Mullis KB und Faloona FA. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol* 1987; 155, 335-350

Nagata Y, Higashi M, Ishii Y, Sano H, Tanigawa M, Nagata K, Noguchi K, Urade M. The presence of high concentrations of free D-amino acids in human saliva. *Life Sci* 2006; 78, 15: 1677-1681

Nagata Y, Masui R, Akino T. The presence of free D-serine, D-alanine and D-proline in human plasma. *Experientia* 1992a; 48, 10: 986-988

Nagata Y, Yamamoto K, Shimojo T. Determination of D- and L-amino acids in mouse kidney by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr* 1992b; 575, 1: 147-152

Nagata Y, Yamamoto K, Shimojo T, Konno R, Yasumura Y, Akino T. The presence of free D-alanine, D-proline and D-serine in mice. *Biochim Biophys Acta* 1992c; 1115, 3: 208-211

Newcomer JW, Farber NB, Jevtovic-Todorovic V, Selke G, Melson AK, Hershey T, Craft S, Olney JW. Ketamine-induced NMDA receptor hypofunction as a model of memory impairment and psychosis. *Neuropsychopharmacology* 1999; 20, 2: 106-118

Nishi M, Hinds H, Lu HP, Kawata M, Hayashi Y. Motoneuron-specific expression of NR3B, a novel NMDA-type glutamate receptor subunit that works in a dominant-negative manner. *J Neurosci* 2001; 21, 23: RC185

Olney JW, Newcomer JW, Farber NB. NMDA receptor hypofunction model of schizophrenia. *J Psychiatr Res* 1999; 33, 6: 523-533

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

Parnas J, Cannon TD, Jacobsen B, Schulsinger H, Schulsinger F, Mednick SA. Lifetime DSM-III-R diagnostic outcomes in the offspring of schizophrenic mothers. Results from the Copenhagen High-Risk Study. *Arch Gen Psychiatry* 1993; 50, 9: 707-714

- Pilone MS. D-Amino acid oxidase: new findings. *Cell Mol Life Sci* 2000; 57, 12: 1732-1747
- Pollegioni L, Piubelli L, Sacchi S, Pilone MS, Molla G. Physiological functions of D-amino acid oxidases: from yeast to humans. *Cell Mol Life Sci* 2007; 64, 11: 1373-1394
- Rosen JL, Miller TJ, D'Andrea JT, McGlashan TH, Woods SW. Comorbid diagnoses in patients meeting criteria for the schizophrenia prodrome. *Schizophr Res* 2006; 85, 1-3: 124-131
- Schell MJ, Brady RO, Molliver ME, Snyder SH. D-serine as a neuromodulator: regional and developmental localizations in rat brain glia resemble NMDA receptors. *J Neurosci* 1997; 17, 5: 1604-1615
- Schell MJ, Molliver ME, Snyder SH. D-serine, an endogenous synaptic modulator: localization to astrocytes and glutamate-stimulated release. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995; 92, 9: 3948-3952
- Schumacher J, Jamra RA, Freudenberg J, Becker T, Ohlraun S, Otte AC, Tullius M, Kovalenko S, Bogaert AV, Maier W, Rietschel M, Propping P, Nothen MM, Cichon S. Examination of G72 and D-amino-acid oxidase as genetic risk factors for schizophrenia and bipolar affective disorder. *Mol Psychiatry* 2004; 9, 2: 203-207
- Shaw SH, Kelly M, Smith AB, Shields G, Hopkins PJ, Loftus J, Laval SH, Vita A, De Hert M, Cardon LR, Crow TJ, Sherrington R, DeLisi LE. A genome-wide search for schizophrenia susceptibility genes. *Am J Med Genet* 1998; 81, 5: 364-376
- Tienari PJ und Wynne LC. Adoption studies of schizophrenia. *Ann Med* 1994; 26, 4: 233-237
- Torrey EF, Bowler AE, Clark K. Urban birth and residence as risk factors for psychoses: an analysis of 1880 data. *Schizophr Res* 1997; 25, 3: 169-176
- Tosato S, Dazzan P, Collier D. Association between the neuregulin 1 gene and schizophrenia: a systematic review. *Schizophr Bull* 2005; 31, 3: 613-617
- Tsai G, Yang P, Chung LC, Lange N, Coyle JT. D-serine added to antipsychotics for the treatment of schizophrenia. *Biol Psychiatry* 1998; 44, 11: 1081-1089
- Verdoux H, Takei N, Cassou de Saint-Mathurin R, Murray RM, Bourgeois ML. Seasonality of birth in schizophrenia: the effect of regional population density. *Schizophr Res* 1997; 23, 2: 175-180

Wender PH, Rosenthal D, Kety SS, Schulsinger F, Welner J. Crossfostering. A research strategy for clarifying the role of genetic and experiential factors in the etiology of schizophrenia. *Arch Gen Psychiatry* 1974; 30, 1: 121-128

WHO. ICD10: International Statistical Classification of Diseases and Related Health. Geneva: Word Health Organisation, 2004

Wilcox MA, Faraone SV, Su J, Van Eerdewegh P, Tsuang MT. Genome scan of three quantitative traits in schizophrenia pedigrees. *Biol Psychiatry* 2002; 52, 9: 847-854

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

Wood LS, Pickering EH, Dechairo BM. Significant support for DAO as a schizophrenia susceptibility locus: examination of five genes putatively associated with schizophrenia. *Biol Psychiatry* 2007; 61, 10: 1195-1199

Yamada K, Ohnishi T, Hashimoto K, Ohba H, Iwayama-Shigeno Y, Toyoshima M, Okuno A, Takao H, Toyota T, Minabe Y, Nakamura K, Shimizu E, Itokawa M, Mori N, Iyo M, Yoshikawa T. Identification of multiple serine racemase (SRR) mRNA isoforms and genetic analyses of SRR and DAO in schizophrenia and D-serine levels. *Biol Psychiatry* 2005; 57, 12: 1493-1503

Datenbanken

National Center for Biotechnology information: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

Genome Bioinformatics Group of UC Santa Cruz: <http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgGateway>

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wäre ohne die Hilfe und Unterstützung folgender Personen nicht zustande gekommen.

An erster Stelle sind mein Doktorvater PD Dr. Johannes Schumacher und Prof. Dr. Peter Propping (Direktor des Instituts für Humangenetik des Universitäts-Klinikums Bonn) zu erwähnen, die mir ermöglicht haben, über ein Jahr hinweg im Rahmen des Graduiertenkollegs 246 *Pathogenese des Nervensystems* die experimentellen Arbeiten für diese Dissertation durchzuführen. Für das Vertrauen und die mir gegebenen Möglichkeiten möchte ich mich bei beiden herzlich bedanken.

Mein besonderer Dank gilt den Kollegen und Freunden aus dem Team der Arbeitsgruppe *Psychiatrische Genetik*, ohne die ich meine experimentellen Arbeiten nicht hätte durchführen können. Vor allem danke ich Dr. Rami Abou Jamra für die fachliche und zugleich freundschaftliche Unterstützung. Dr. Axel Hillmer und Dr. Alfredo Ramirez danke ich für den wertvollen fachlichen Rat. Bärbel Lippke und Nadine Kluck unterstützten mich in zahlreichen labortechnischen Aufgaben, mein herzlicher Dank gilt auch ihnen. Helge Neid sorgte stets für das Wohlbefinden und den Zusammenhalt der Arbeitsgruppe.

PD Dr. Tim Becker danke ich für die statistische Berechnung unserer Daten.

Liebe Vanessa, Dir vielen Dank für Deine stete Geduld und Unterstützung. Rainer, Nadja und Yasmin danke ich für das kritische Korrekturlesen. Danke lieber Dix für die schöne Abbildung (beim nächsten Mal wird sie ihren wohlverdienten Platz finden). Boris danke ich nicht nur für die Rettung im letzten Moment.

Mein aufrichtiger Dank gilt insbesondere den Patienten, welche sich mit ihrer Teilnahme bereit erklärt haben die Erforschung psychiatrischer Erkrankungen zu unterstützen. Mein Dank gilt ebenfalls der Psychiatrischen Universitätsklinik Bonn und dem Institut für Humangenetik der Universität Bonn, welche mir die Proben zur vorliegenden Untersuchung zu Verfügung gestellt haben.

Mein größter Dank gilt meinen Eltern und meinen Geschwistern, welche mir in jeder Beziehung und zu jeder Zeit eine große Hilfe waren und es bis heute sind.