

Molekulargenetische Untersuchung der bipolaren Störung

Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von

Anna Katharina Maaser-Hecker

aus

Neuwied

Bonn 2025

Angefertigt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

Gutachter/Betreuer: Prof. Dr. Markus M. Nöthen

Gutachter: Prof. Dr. Jörg Höhfeld

Tag der Promotion: 04.11.2025

Erscheinungsjahr: 2025

Inhaltsverzeichnis

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	III
ABBILDUNGSVERZEICHNIS	VI
TABELLENVERZEICHNIS	VII
1 EINLEITUNG.....	1
1.1 Die bipolare Störung	1
1.1.1 Therapie der bipolaren Störung	3
1.1 Theoretische Grundlagen.....	6
1.1.1 Die genetische Architektur der bipolaren Störungen.....	6
1.1.2 Kopplungsanalyse.....	6
1.1.3 Genomweite Assoziationsstudien.....	8
1.1.4 Rolle von microRNAs bei der Entwicklung der bipolaren Störung.....	14
1.1.5 <i>Next Generation Sequencing</i> – Technologien der nächsten Generation	17
1.1.6 Seltene genetische Varianten bei der Entwicklung der bipolaren Störung.....	18
1.2 Beitrag zu veröffentlichten Studien	24
2 ZIELSETZUNG.....	25
3 MATERIAL UND METHODEN	26
3.1 Geräte	26
3.2 Plastik- und Einwegmaterial.....	27
3.3 Chemikalien, Puffer, Lösungen, Reagenzien und Enzyme	27
3.4 Kommerzielle Systeme (Kits)	28
3.5 Patienten, Kontrollkollektive und Familien.....	29
3.5.1 Kollektive des BD GWAS-Datensatzes.....	29
3.5.2 Kubanische Familien	30
3.6 Methoden	32
3.6.1 Übersicht der Studien	32
3.6.2 Genomweite Assoziationsanalyse von microRNAs.....	33
3.6.3 Regionale Assoziationsplots.....	33
3.6.4 <i>Follow-up</i> Analyse der assoziierten miRNAs - Expression im Gehirn.....	34
3.6.5 Untersuchung der miRNA Zielgene.....	35
3.6.6 Signalweg-Analyse der miRNA-Zielgene.....	35
3.6.7 Allgemeine molekularbiologische Methoden.....	36
3.6.8 Genotypisierung mittels DNA-Mikroarray	40
3.6.9 Schätzung der Verwandtschaftsstruktur in den kubanischen Familien.....	41
3.6.10 Polygener Risikoscore in den kubanischen Familien	41
3.6.11 Exomsequenzierung der kubanischen Familien.....	42
3.6.12 Analyse der WES-Daten mit der Varbank.....	43
3.6.13 Annotation genetische Varianten.....	44

3.6.14	Validierung genetischer Varianten mittels Sanger	45
3.6.15	Expression der Kandidatengene im humanen Gehirn (kubanische Familien)	45
3.6.16	BipEx Datenbank.....	45
3.6.17	Nicht-parametrische Kopplungsanalyse (kubanische Familien).....	46
4	ERGEBNISSE.....	47
4.1	Identifizierung von BD-assoziierten microRNAs	47
4.1.1	Priorisierung der miRNAs.....	49
4.1.2	Zielgenanalyse der <i>miR-499</i> , <i>miR-708</i> und <i>miR-1908</i>	49
4.1.3	Biologische Signalwege impliziert durch miRNA Zielgene.....	51
4.1.4	Dual-Luciferase-Reportergen-Assay	53
4.2	Exomsequenzierung kubanischer BD-Familien und Untersuchung des polygenen Risikos	54
4.2.1	Validierung der Verwandtschaftsstruktur	54
4.2.2	Analyse der populationsbezogenen Substruktur	55
4.2.3	Ermittlung des polygenen Risikoscores	56
4.2.4	Analyse der WES-Daten und die Identifizierung seltener Kandidatenvarianten.....	57
4.2.5	Segregation und Validierung der seltenen genetischen Varianten	59
4.2.6	Expression im humanen Gehirn	61
4.2.7	Replikation in der BipEx Datenbank.....	61
4.2.8	Nicht-parametrische Kopplungsanalyse	63
5	DISKUSSION.....	64
5.1	Häufige Varianten – miRNAs	64
5.2	Mehrfach betroffene kubanische Familien	71
6	ZUSAMMENFASSUNG	78
	LITERATURVERZEICHNIS	81
	APPENDIX.....	110
	DANKSAGUNG.....	120

Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
Abb.	Abbildung
ACB	<i>African Caribbean in Barbados</i>
AMDP	<i>Association for Methodology and Documentation in Psychiatry</i>
ASW	<i>African Ancestry in Southwest USA</i>
ATP	Adenosintriphosphat
BD	Bipolare Störung (<i>bipolar disorder</i>)
bidest.	Bidestilliert
BipEx	<i>Bipolar Exomes</i>
bp	Basenpaare
BSC	<i>Bipolar Sequencing Consortium</i>
BWA	Software zum Mappen von Sequenzen gegen ein Referenzgenom (<i>Burrows-Wheeler Aligner</i>)
°C	Grad Celsius
C	Cytosin
Ca ²⁺	Calciumionen
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat (<i>cyclic adenosine monophosphate</i>)
CCG	<i>Cologne Center for Genomics</i>
Chr	Chromosom
CI	Konfidenzintervall
CID-S	<i>Composite International Diagnostic Screener</i>
cM	Centimorgan (1 % Rekombinationswahrscheinlichkeit pro Meiose)
CNV	Kopienzahlvariante (<i>copy number variant</i>)
dbSNP	Datenbank der Einzelnukleotidpolymorphismen (<i>The Single Nucleotide Polymorphism database</i>)
<i>de novo</i>	neu entstanden; nicht vererbte Mutation
DIGS	<i>Diagnostic Interview for Genetic Studies</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>desoxyribonucleic acid</i>)
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
dsDNA	doppelsträngige DNA
DSM	<i>Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders</i>
EB	Elutionspuffer
EKT	Elektrokonvulsionstherapie
eQTL	<i>Expression-Quantitative-Trait-Locus</i>
<i>et al.</i>	und andere (<i>et alii</i>)
EtBr	Ethidiumbromid
EtOH	Ethanol
ExAC	<i>Exome Aggregation Consortium</i>
Exo I	Exonuklease I
Exo III	Exonuklease III
FDR	Fehlerrate (<i>false discovery rate</i>)
FIGS	<i>Family Interview for Genetic Studies</i>
For	vorwärts (<i>forward</i>)
G	Guanin
GAP	GTPase-aktivierendes Protein
GATK	<i>Genome Analysis Toolkit</i>
gDNA	genomische DNA
GenDG	Gendiagnostikgesetz
GO	<i>Gene Ontology</i>
GPCR	G-Protein-gekoppelter Rezeptor (<i>G-protein-coupled receptor</i>)

GRCh37	spezifische Version des humanen Referenzgenoms, Synonym hg19 (<i>Genome Reference Consortium Human Build 37</i>)
GRCh38	spezifische Version des humanen Referenzgenoms, Synonym hg38 (<i>Genome Reference Consortium Human Build 38</i>)
GWAS	Genomweite Assoziationsstudie (<i>genome-wide association study</i>)
h	Stunde (<i>hora</i>)
H ₀	Nullhypothese
H ₂ O	Wasser
h ²	Heritabilität (<i>heritability</i>)
HAE	hereditäres Angioödem (<i>hereditary angioedema</i>)
HGNC	HUGO <i>Gene Nomenclature Committee</i>
HWE	Hardy-Weinberg Gleichgewicht (<i>Hardy-Weinberg equilibrium</i>)
IBD	Herkunftsgleichheit; herkunftsgleich (<i>identity by descent</i>)
IBS	<i>Iberian populations in Spain</i>
ICD	<i>International Classification of Diseases</i>
InDel	Insertion/Deletion
iPSC	induzierte pluripotente Stammzelle (<i>induced pluripotent stem cell</i>)
k	IBD Zustand
kb	Kilobasenpaar
KEGG	<i>Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes</i>
Kuba I/II	kubanische Familie eins/zwei
LD	Kopplungsungleichgewicht (<i>linkage disequilibrium</i>)
LOD	Logarithmus des Verhältnisses zweier Wahrscheinlichkeiten (<i>logarithm of the odds</i>)
LoF	<i>Loss-of-Function</i>
-log(<i>p</i>)	negativer dekadischer Logarithmus des <i>p</i> -Werts
M	molare Masse
MAF	minore Allelfrequenz
Mb	Megabase
MD	Majore Depression (<i>major depression</i>)
min	Minute
miR/miRNA	microRNA
mL	Milliliter
MM	Mastermix
mM	Millimolar, Dezimalpräfix eines Molars (Stoffmengenkonzentration mol/L)
MooDs	<i>Systematic Investigation of the Molecular Causes of Major Mood Disorders and Schizophrenia</i>
μL	Mikroliter
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure (<i>messenger ribonucleic acid</i>)
N	Anzahl
NA	nicht verfügbar (<i>not available</i>)
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
ng	Nanogramm
NGS	Sequenzierung der nächsten Generation (<i>next generation sequencing</i>)
nM	Nanomolar, dezimaler Bruchteil eines Molars, Stoffmengenkonzentration
BD NOS	nicht näher bezeichnete bipolare Störung (<i>not otherwise specified</i>)
nt	Nukleotid, Baustein von Nukleinsäuren
Oligos	Oligonukleotide
OR	Chancenverhältnis (<i>odds ratio</i>)
<i>p</i>	Wahrscheinlichkeit (<i>probability</i>)
Pat.	Patienten
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
PGC	<i>Psychiatric Genomics Consortium</i> , ehemals <i>Psychiatric GWAS Consortium</i>

pLI	<i>Probability of Loss-of-Function Intolerance</i>
pmol	Pikomol
PTV	Protein-trunkierende Variante (<i>protein truncating variant</i>)
PUR	<i>Puerto Rican in Puerto Rico</i>
QC	Qualitätskontrolle (<i>quality control</i>)
RPKM	Normalisierung für Sequenzierungstiefe und Genlänge (<i>reads per kilobase million</i>)
rs ID	SNP Identifikationsnummer (<i>reference SNP ID number</i>)
r ²	Quadrat des Korrelationskoeffizienten zwischen zwei genetischen Loci
SAB	schizoaffektive Störung (bipolarer Typ)
SADS/SADS-L	<i>Schedule for Affective Disorders and Schizophrenia</i>
SBS	Sequenzierungstechnologie, die fluoreszenzmarkierte Nukleotide und reversible Terminatorchemie nutzt (<i>sequencing by synthesis</i>)
SCAN	<i>Schedules for Clinical Assessment in Neuropsychiatry</i>
SCID	<i>Structured Clinical Interview for DSM disorders</i>
SCZ	Schizophrenie
SNP	Einzelnukleotidpolymorphismus (<i>single nucleotide polymorphism</i>)
SNV	Einzelnukleotidvariante (<i>single nucleotide variant</i>)
T	Thymin
TSI	<i>Toscani in Italia</i>
U	Einheit (<i>Unit</i>)
UCSC	<i>University of California, Santa Cruz</i>
VEGAS	<i>Versatile gene-based association study</i>
WebGestalt	<i>Web-based Gene Set Analysis Toolkit</i>
WES	Exomsequenzierung (<i>whole exome sequencing</i>)
WGS	Gesamtgenomsequenzierung (<i>whole genome sequencing</i>)
WHO	Weltgesundheitsorganisation (<i>World Health Organisation</i>)
♀	weiblich
♂	männlich

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1 Paradigma zur Identifikation krankheitsassoziierten genetischer Varianten.....	8
Abb. 2 Identifizierung von Risikoloci für die BD.....	12
Abb. 3 miRNA Biogenese, Struktur und Funktion.....	14
Abb. 4 Kosten pro Genom	17
Abb. 5 Stammbäume der beiden untersuchten kubanischen Familien.	31
Abb. 6 Übersicht der beiden Studien und der entsprechenden Arbeitsabläufe	32
Abb. 7 Quantil-Quantil (Q-Q) Diagramm.....	47
Abb. 8 Regionale Assoziationsplots für die drei vielversprechendsten miRNAs.....	50
Abb. 9 Gerichtete azyklische Graphen der GO-Kategorien.	52
Abb. 10 <i>Heatmap</i> der IBD-Verteilung der kubanischen Individuen.	54
Abb. 11 Populationsbezogene Substruktur	55
Abb. 12 Skalierte BD PRS	56
Abb. 13 Regionale Assoziationsplots für die miRNAs mit nominal signifikanten <i>p</i> -Werten, die nicht priorisiert wurden.	112

Tabellenverzeichnis

Tab. 1 Phänotypische Daten der Patienten mit BD und Kontrollen nach QC	29
Tab. 2 Reaktionsansatz für die Standard-PCR.....	38
Tab. 3 Standard-PCR Programm	38
Tab. 4 Reaktionsansatz für die Sequenzier-PCR.....	39
Tab. 5 Temperaturprogramm für die Sequenzier-PCR.....	39
Tab. 6 Test auf Überrepräsentation für unterschiedliche p -Wert Schwellen.....	48
Tab. 7 Ergebnisse der Locus-basierten Analyse für die neun korrekturstabilen miRNAs.	48
Tab. 8 Vergleich der Ergebnisse der genbasierten Tests für die neun miRNAs, die nach Korrektur für multiples Testen signifikant waren, basierend auf der LD-Struktur der HapMap Phase 2 oder des <i>1000 Genome Projects</i>	49
Tab. 9 Zielgen und Signalweg-Analyse für <i>miR-499</i> , <i>miR-708</i> und <i>miR-1908</i>	51
Tab. 10 Übersichtsprotokoll des WES-Datensatzes der kubanischen Familien.....	57
Tab. 11 Priorisierte seltene Varianten identifiziert in den untersuchen kubanischen BD- Patienten	58
Tab. 12 Übersicht zur Segregationsanalyse, Expression der implizierten Gene im Gehirn und Ergebnisse der NPL-Analysen.....	59
Tab. 13 Kandidatenvarianten der beiden kubanischen Familien im Datensatz des <i>BipEx Projects</i>	62
Tab. 14 Die 64 genomweit signifikanten Loci für BD aus der aktuell größten GWAS für BD	110
Tab. 15 GWAS für die BD.....	111
Tab. 16 Übersicht der 107 im Gehirn exprimierten miRNA Zielgene assoziiert mit BD mit einem genbasierten $p < 0,05$	113
Tab. 17 Signifikante Anreicherung von miRNA Zielgenen in biologischen Signalwegen	113
Tab. 18 Primersequenzen für PCR und Sanger Sequenzierung.....	114
Tab. 19 Potenziell funktionelle Varianten mit $MAF \leq 5\%$ identifiziert in den kubanischen Familien.....	115

1 Einleitung

1.1 Die bipolare Störung

Die bipolare Störung (BD) gehört zu den affektiven Störungen und zählt neben der Schizophrenie (SCZ) und der Depression (MD, *major depression*) zu den schwerwiegendsten psychiatrischen Erkrankungen weltweit (Ferrari et al., 2016; Vos et al., 2017). Die BD ist durch extreme Stimmungsschwankungen gekennzeichnet. Menschen, die von dieser Erkrankung betroffen sind, erleben Phasen von übermäßigem Hochgefühl und Energie, sowie depressive Episoden (American Psychiatric Association - DSM-5 Task Force, 2013). Diese starken Kontraste in der Stimmung beeinflussen das tägliche Leben der Betroffenen und haben erhebliche Auswirkungen auf ihre sozialen Beziehungen und berufliche Leistungsfähigkeit (Ferrari et al., 2016). Daher gehört die BD zu den Hauptursachen für Invalidität und verursacht immense gesundheitsökonomische Folgekosten (Fajutrao et al., 2009; Ferrari et al., 2016; Stimmel, 2004). Rund 1 % der Allgemeinbevölkerung erkrankt im Laufe des Lebens an einer BD (Merikangas et al., 2011) und häufig leiden Patienten an weiteren psychiatrischen, aber auch metabolischen oder kardiovaskulären Komorbiditäten (Amann et al., 2017). Zusammen mit einem erhöhten Suizidrisiko stellt dies eine tiefgreifende psychosoziale Belastung für die Betroffenen und deren Angehörige dar. Die BD bleibt eine Herausforderung für die moderne Psychiatrie, da ihre Ursachen, Verläufe und optimalen Behandlungsansätze noch nicht vollständig verstanden sind.

Die heutige Diagnose der BD entwickelte sich aus dem Begriff „manisch-depressives Irresein“, der von dem deutschen Psychiater Emil Kraepelin Ende des 19. Jahrhunderts geprägt wurde (Craddock & Owen, 2010). Derzeit wird der Phänotyp der BD ausschließlich nach klinischen Merkmalen definiert, einen zuverlässigen Diagnosetest, wie beispielsweise Bluttests zur Untersuchung geeigneter Biomarker, gibt es bislang nicht (Alda et al., 2009; Craddock & Sklar, 2009; Tkachev et al., 2023; Tomasik et al., 2024). Das *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders* (DSM) und die *International Classification of Diseases* (ICD) sind Kataloge, die mentale Störungen erläutern und klassifizieren, mit dem Ziel die Diagnose, Behandlung und Forschung zu verbessern. Die BD wird in der aktuellen Version des DSM, dem DSM-5, unter den affektiven Störungen geführt und es werden drei Hauptformen unterschieden. Die folgenden Beschreibungen beruhen auf erwähntem Klassifikationssystem (American Psychiatric Association - DSM-5 Task Force, 2013): (i) Bipolare Störung Typ I (BD I): Das Auftreten von mindestens einer manischen Episode, welcher hypomanische oder depressive Episoden vorausgehen oder folgen können. Depressive Phasen sind jedoch keine Bedingung für die Diagnose einer BD I; auch rezidivierende manische Episoden sind hinreichend für die Diagnose der BD I (Severus & Bauer 2013). (ii) Bipolare Störung Typ II (BD II): Die Kriterien für mindestens

eine depressive und eine hypomanische Phase (leichte Manie) sind erfüllt. Im Gegensatz zu der Manie interferiert eine Hypomanie nicht deutlich mit dem beruflichen Alltag oder den zwischenmenschlichen Beziehungen der Betroffenen. (iii) Nicht näher bezeichnete bipolare Störung (BD NOS, *not otherwise specified*): Eine Kategorie für diejenigen maniformen Zustände, die nicht in eine der anderen Hauptkategorien einzuordnen sind, z.B. im Falle wiederkehrender hypomanischer Phasen.

Das zentrale Charakteristikum der BD liegt im chronisch rezidivierenden Verlauf der (hypo-)manischen und depressiven Episoden, die Einfluss auf die Stimmung, Kognition und das Verhalten haben (Budde et al., 2017). Im Folgenden werden die Kriterien der jeweiligen Episode für die Diagnose einer BD vorgestellt und stützen sich auf das DSM (American Psychiatric Association - DSM-5 Task Force, 2013; Mason et al., 2016). Die phänomenologischen Nuancen manischer bzw. hypomanischer Phasen umfassen einen gesteigerten Antrieb sowie unangemessen euphorische und/oder eine gereizte Stimmung. Neben auffälligen Stimmungsänderungen, sind außerdem Symptome wie ein gesteigertes Selbstbewusstsein, Rededrang, Ideenflucht, vermindertes Schlafbedürfnis, gesteigerte Risikobereitschaft, der Verlust sozialer Hemmungen sowie eine erhöhte Libido charakteristisch. Von den Betroffenen wird eine solche Phase oft als positiv empfunden, jedoch birgt sie ein großes Potential sozioökonomische Schäden zu verursachen (Begley et al., 2001; Dembek et al., 2023). Die Hypomanie ist eine leichter ausgeprägte Form der Manie und eine solche Episode unterscheidet sich neben ihrer Dauer insbesondere darin, dass das Ausmaß der gehobenen Stimmung und gesteigerten Aktivität nicht vollständig das berufliche und soziale Funktionsniveau beeinträchtigt. Im Gegensatz dazu zeichnet sich die depressive Episode durch Symptome wie Traurigkeit, Niedergeschlagenheit, Suizidgedanken, Schlafstörungen, Pessimismus, sowie Konzentrations- und Gedächtnisschwierigkeiten aus. Oft treten die Wechsel zwischen (Hypo-)Manie und Depression lebenslang auf und lassen sich in ihrer Abfolge nicht vorhersagen, dazwischen liegen in der Regel jeweils krankheitsfreie, sogenannte euthyme Perioden. Insbesondere depressive Episoden dominieren den Verlauf der BD; Patienten erleben diese durchschnittlich dreimal häufiger als (hypo-)manische Episoden (Judd et al., 2002, 2003; Kupka et al., 2007). Zudem sind es jene depressiven und gemischten Episoden, in denen die Suizidalität im Vergleich zur Allgemeinbevölkerung am stärksten ausgeprägt ist (Miller & Black, 2020). Das Lebenszeitrisiko für Selbsttötungsversuche und durchgeführte Suizide ist bei Patienten mit BD eines der höchsten unter den psychiatrischen Erkrankungen (Tondo et al., 2003; Vieta & Valentí, 2013). Epidemiologische Daten belegen bezüglich der Prävalenz für BD keinen signifikanten Unterschied zwischen den biologischen Geschlechtern, jedoch ist die Depression die vorherrschende Polarität bei Frauen und die (Hypo-)Manie bei Männern (Nivoli et al., 2011). Die erste Manifestation einer BD tritt in der Regel im frühen Erwachsenenalter auf (Dell’Osso et al., 2016). Patienten erhalten nicht selten zunächst eine Fehldiagnose

und/oder die Diagnose der BD wird erst Jahre nach dem Auftreten erster Symptome gestellt und korrekt behandelt (Baca-Garcia et al., 2007). Dies führt dazu, dass sich das Leiden der Patienten verlängern und der Krankheitsverlauf verschlechtern kann, bis eine adäquate Behandlung eingeleitet wird (Ghaemi et al., 2000).

Die genauen Ursachen, die zu der Entwicklung einer BD führen, sind bisher nicht vollständig geklärt, aber es wird angenommen, dass eine Kombination von genetischen, neurobiologischen sowie Umweltfaktoren eine Rolle spielt (Craddock & Sklar, 2013). Die BD zählt daher zu den multifaktoriellen Erkrankungen und hat eine hohe Heritabilität von etwa 60-85 % (Bienvenu et al., 2011; Lichtenstein et al., 2009; McGuffin et al., 2003; Nöthen et al., 2019a; Song et al., 2015). Dies deutet darauf hin, dass genetische Faktoren eine bedeutende Rolle spielen und eine signifikante Prädisposition oder Suszeptibilität vorliegt. Für Individuen, deren enge Blutsverwandte, wie Eltern oder Geschwister, von der Erkrankung betroffen sind, besteht ein bis zu zehnmal höheres Risiko, selbst an der BD zu erkranken (J. W. Smoller & Finn, 2003; Taylor et al., 2002). Die Forschung auf diesem Gebiet befindet sich in einem fortlaufenden Prozess, um die vielschichtigen Interaktionen der Risikofaktoren zu verstehen und damit die Grundlage für verbesserte Therapien für Patienten zu schaffen. Ein umfassendes Verständnis dieser komplexen Erkrankung ist entscheidend, um wirksamere Präventions- und Behandlungsstrategien zu entwickeln und den Betroffenen eine gesteigerte Lebensqualität zu ermöglichen. Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit den genetischen Ursachen der BD und beleuchtet insbesondere den Beitrag von microRNAs (miRNAs) und seltenen genetischen Varianten zur Krankheitsentstehung.

1.1.1 Therapie der bipolaren Störung

Die BD ist eine dimensionale Erkrankung, das heißt sie umfasst das gesamte Spektrum der affektiven Symptomatik in Bezug auf Schwere und Polarität (Judd et al., 2002). Die Behandlung stellt eine komplexe Herausforderung dar, denn dieselbe Therapie, die eine Depression lindert, kann im Gegenzug eine Manie, Hypomanie oder *Rapid Cycling* auslösen (Judd et al., 2002; Kato, 2019; Peet, 1994). *Rapid Cycling* definiert eine Verlaufsform der BD mit vier oder mehr Episoden innerhalb eines Jahres. Selbst unter gezielter Behandlung erleiden rund 37 % der Patienten innerhalb eines Jahres einen Rückfall in eine Depression oder Manie (Gitlin et al., 1995).

Das übergeordnete Ziel einer jeden Behandlung ist daher die Stabilisierung, um langfristig einen Rückfall zu vermeiden und das psychosoziale und berufliche Funktionsniveau des Patienten zu verbessern (Clarkin et al., 1998). In Deutschland existiert die „S3-Leitlinie zur Diagnostik und Therapie Bipolarer Störungen“, die darauf abzielt, Wissen zu bestimmten Versorgungsfragen zu evaluieren, konträre Standpunkte zu erörtern und eine Behandlungsstrategie unter Berücksichtigung von Nutzen und Risiken zu entwickeln (DGBS e.V. & DGPPN e.V., 2019). Eine umfassende Therapie berücksichtigt

neurobiologische und psychosoziale Ursachen sowie prädiktive Faktoren wie vergangene Episoden, Suizidversuche, Familienanamnese und Komorbiditäten sowie das soziale Unterstützungssystem (Fountoulakis et al., 2012; Miklowitz et al., 2007; Miklowitz & Johnson, 2009). Bei Behandlungsbeginn ist der Aufbau einer therapeutischen Beziehung zwischen Patienten und Arzt sowie das Einbeziehen von Angehörigen in Aufklärung und Behandlung ausschlaggebend für positive Therapieeffekte (Norcross & Lambert, 2018; Perlick et al., 2010).

Die moderne Psychopharmakologie wurde in den 1950er Jahren mit der Einführung des Lithiumcarbonats und dem ersten wirksamen antipsychotischen Wirkstoff, Chlorpromazin, eingeläutet (R. J. Baldessarini et al., 2019). Zusätzlich werden seit den 1970er Jahren Antiepileptika, die eine antimanische Wirkung gezeigt haben, in der Kurzzeitbehandlung der BD eingesetzt (beispielsweise Carbamazepin und Valproat) (R. J. Baldessarini et al., 2019). In der phasenspezifischen Akuttherapie der Manie kommen überwiegend Stimmungsstabilisierer (Lithium und Antiepileptika) sowie Antipsychotika zum Einsatz (beispielsweise Olanzapin, Risperidon und Haloperidol). Evidenzbasierte Richtlinien empfehlen Antipsychotika der zweiten Generation (beispielsweise Aripiprazol, Olanzapin, Risperidon, Ziprasidon und Quetiapin) in Monotherapie oder in Kombination mit Lithium oder Valproat als eine geeignete Akutbehandlung (Morsel et al., 2018).

Obwohl die bipolare Depression für einen Großteil der Gesamtkrankheitslast der BD verantwortlich ist, haben sich nur wenige Behandlungen bei akuten Episoden als langfristig wirksam erwiesen. Die Behandlung akuter depressiver Episoden der BD mit Antidepressiva in Monotherapie ist umstritten (Frye et al., 2011), da die Datenlage oftmals widersprüchlich ist. Antidepressiva oder antidepressiv wirksame atypische Neuroleptika werden daher gewöhnlich in Kombination mit einem Stimmungsstabilisierer eingesetzt, um einen möglichen Umschlag in eine (Hypo-)Manie oder einen gemischten Zustand zu vermeiden bzw. zu verzögern. Die Langzeittherapie mit Lithium zeigte Hinweise auf ein verringertes Risiko für einen Rückfall in Manie und Depression (Geddes et al., 2004) sowie ein verringertes Suizidrisiko (R. Baldessarini et al., 2008).

Die Psychotherapie ist ein wichtiger Bestandteil der Behandlung der BD und ist ein interaktiver Prozess (Miklowitz et al., 2021), der unter anderem darauf abzielt, Rezidivprophylaxe, Minderung von Symptomen und eine Steigerung der Lebensqualität für den Patienten zu erlangen. Eine umfassende Aufklärung über alle Aspekte der BD (Symptomatik, Verlauf, Ursachen, Bedeutung der regelmäßigen Einnahme von Psychopharmaka) bildet die Basis, um dem Patienten eine Art Anleitung zur Selbstbeobachtung zu vermitteln. Bei der familienfokussierten Therapie wird die Familie oder andere zentrale Bezugspersonen früh in das therapeutische Programm integriert (Miklowitz & Chung, 2016).

Einige nicht-medikamentöse somatische Therapieverfahren wie beispielsweise die Elektrokonvulsionstherapie (EKT) sind eine Option für Patienten mit einer behandlungsresistenten Depression. Studien liefern konsistente Hinweise, dass die EKT in einer akuten bipolaren Depression oder gemischten Phase wirksamer ist als eine pharmakologische Behandlung (Ciapparelli et al., 2001; Schoeyen et al., 2015). Trotz einer spärlichen Evidenzlage ist die Lichttherapie eine geeignete zusätzliche Behandlungsoption, da es nur sehr wenige Nebenwirkungen gibt und sie von den Patienten gut akzeptiert wird (Hirakawa et al., 2020).

Ungeachtet nennenswerter Fortschritte der letzten Jahrzehnte ist das Wissen über die zugrunde liegenden Krankheitsmechanismen immer noch unvollständig. Es fehlen validierte pharmakologisch relevante Ziele sowie adäquate Zell- und Tiermodelle, sodass bis heute keine Kausaltherapie für die BD existiert (Geddes & Miklowitz, 2013).

1.1 Theoretische Grundlagen

1.1.1 Die genetische Architektur der bipolaren Störungen

Die genetische Architektur einer Erkrankung beschreibt die Gesamtheit der genetischen Merkmale, die für den erblich bedingten Anteil der phänotypischen Varianz verantwortlich sind (Visscher et al., 2017). Dies umfasst die Anzahl der kausalen genetischen Varianten, die Größe ihrer Effekte auf den Phänotyp, ihre Allelfrequenzen und ihre Interaktionen untereinander sowie mit der Umwelt (Gratten et al., 2014; Timpson et al., 2018). Das Verständnis der genetischen Architektur und wie sie durch Mutation, natürliche Selektion und genetischen Drift geformt wird, ist daher von wesentlicher Bedeutung für ein erfolgreiches Studiendesign zur Aufklärung genetischer Grundlagen und Krankheitsursachen.

Bereits in frühen Arbeiten wurde über eine familiäre Häufung der BD berichtet (Strömberg, 1967). Formalgenetische Familien- und Zwillingsstudien sowie populationsbasierte Kohorten lieferten dann Evidenz für einen erheblichen Beitrag genetischer Faktoren (Bienvenu et al., 2011; Lichtenstein et al., 2009; McGuffin et al., 2003; Nöthen et al., 2010; Strömberg, 1967; Taylor et al., 2002). Das relative Risiko für Verwandte ersten Grades ist etwa 5–10-fach erhöht im Vergleich zur Allgemeinbevölkerung (J. W. Smoller & Finn, 2003; Taylor et al., 2002). Obwohl zahlreiche Studien konsistente Ergebnisse für einen substanziellen Beitrag genetischer Varianten zur Ätiologie der BD liefern, ist bisher nicht vollständig klar welche biologischen Signalwege und Gene bei der Entstehung der BD eine Rolle spielen (Gratten et al., 2014; Lichtenstein et al., 2009; Mullins et al., 2021; O'Connell & Coombes, 2021; N. Wray, 2012). Ausgewählte Methoden und Hypothesen zur Untersuchung der genetischen Architektur der BD, die in der vorliegenden Arbeit angewandt wurden, werden in den folgenden Kapiteln näher beschrieben und die dadurch erzielten Erkenntnisse bezüglich der genetischen Ursachen der BD herausgestellt.

1.1.2 Kopplungsanalyse

Das Genom des Menschen besteht in der Regel aus 46 Chromosomen (Tjio & Levan, 1956), 44 Autosomen und zwei geschlechtsbestimmenden Chromosomen (Gonosomen). Die Autosomen können in 22 verschiedene Chromosomenpaare eingeteilt werden, wobei je ein Chromosom eines Paares von jedem Elternteil vererbt wird. Diese Chromosomen können unterschiedliche Varianten eines Locus, z.B. eines Gens, enthalten. Alternative Versionen von Genen oder anderen Loci an bestimmten Positionen auf homologen Chromosomen werden Allele genannt.

Homologe Chromosomen werden unabhängig voneinander vererbt. Entsprechend der Mendel'schen Unabhängigkeitsregel werden demnach Allele auf unterschiedlichen

Chromosomen mit einer Wahrscheinlichkeit von 50 % gemeinsam vererbt (Mendel, 1996).

Im Folgenden wird beschrieben, wie sich in familienbasierten Studien mittels der sogenannten Kopplungsanalyse die Position von mit dem Phänotyp assoziierten Loci eingrenzen lässt. Die Grundlage dieses Verfahrens ist die Genkopplung. Vereinfacht wurde Folgendes angenommen: Je näher zwei genetische Loci auf einem Chromosom beieinander liegen, umso seltener werden sie durch Rekombination während der Meiose getrennt (Morgan, 1915). Die Rekombinationswahrscheinlichkeit zwischen zwei Loci hängt im Allgemeinen von der physikalischen Distanz der Loci ab, das genaue Verhältnis variiert aber entlang des Genoms. Heute weiß man, dass mehrere Zehntausend *Hotspots* für Rekombination im Genom existieren, die erhöhte Rekombinationsraten aufweisen können (Myers et al., 2005). Die in diesem Zusammenhang eingeführte Maßeinheit, das centiMorgan (cM), quantifiziert die genetische Distanz zweier Loci auf einem Chromosom. Der genetische Abstand zwischen zwei Loci beträgt 1 cM, wenn die Rekombinationsfrequenz zwischen diesen Loci 1/100 bzw. 1 % pro Meiose beträgt (Edwards et al., 1996; Munk et al., 2017; Teare & Barrett, 2005).

Die Grundidee einer nicht-parametrischen Kopplungsanalyse (NPL, *non-parametric linkage*) beruht auf dem Konzept des *identity by descent* (IBD, Herkunftsgleichheit) (Strauch et al., 2002; Teare & Barrett, 2005). Wird beispielsweise Geschwistern dasselbe Allel vom selben Elternteil vererbt, so ist dieses Allel IBD, da ihre Allele identisch sind und denselben genetischen Ursprung haben. Im Gegensatz dazu können Allele auch identisch, aber unterschiedlicher Herkunft sein, diese sind dann lediglich *identity by state* (Zustandsgleichheit).

Zum Beispiel ergeben sich in einem Geschwisterpaar an einem autosomalen Locus die drei möglichen IBD-Zustände: 0 (keine Übereinstimmung durch Abstammung), 1 (eine Übereinstimmung von einem Allel durch Abstammung) und 2 (eine Übereinstimmung von zwei Allelen durch Abstammung). In Abwesenheit einer Assoziation mit dem Phänotyp (Null Hypothese H_0), berechnen sich die korrespondierenden Wahrscheinlichkeiten basierend auf den Mendel'schen Regeln, zu $p(\text{IBD} = 0) = 0,25$, $p(\text{IBD} = 1) = 0,5$ und $p(\text{IBD} = 2) = 0,25$ (Teare & Barrett, 2005). Bei der NPL werden nun in einem familienbasierten Datensatz anhand der Genotypen die tatsächlichen IBD Muster geschätzt und deren potenzielle Abweichung von der Erwartung unter der H_0 mit den Phänotyp-Ausprägungen verglichen.

Ein Vorteil der NPL gegenüber den parametrischen Methoden ist ihre Robustheit, wenn der tatsächliche Erbgang nicht bekannt ist, was bei komplexgenetischen Erkrankungen üblicherweise der Fall ist (Teare & Barrett, 2005). Allerdings verfügen modellfreie (nicht-parametrische) Methoden über eine geringere statistische Aussagekraft zum Nachweis vorliegender, kausaler Zusammenhänge (Kruglyak et al., 1996).

Eine Kopplungsanalyse in ausgewählten Familien mit mehreren Betroffenen oder Merkmalsträgern bietet das einmalige Potenzial seltene Varianten mit potenziell starken Effekten in segregierenden genetischen Regionen zu lokalisieren. Bei vielen monogenen Erkrankungen, bei denen ein einzelnes oder einige wenige Gene mit starkem Effekt zur phänotypischen Ausprägung der Erkrankung führen, konnten Kopplungsanalysen erfolgreich chromosomale Regionen mit kausalen genetischen Loci identifizieren (Gusella et al., 1983; Rommens et al., 1989). Bei psychiatrischen Erkrankungen konnten Kopplungsanalysen jedoch der Komplexität des genetischen Beitrags nicht Rechnung tragen und sind retrospektiv kritisch zu beurteilen (Nöthen et al., 2019).

1.1.3 Genomweite Assoziationsstudien

Die Einführung der Mikroarray-Technologie zu Beginn der 2000er Jahre markierte einen Meilenstein, da sie erstmals eine genomweite Erfassung der genetischen Variabilität auf Ebene häufiger Einzelnukleotidpolymorphismen (SNPs, *single nucleotide polymorphisms*) ermöglichte. Diese Neuerung bildete die Grundlage für genomweite Assoziationsstudien (GWAS, *genome-wide association studies*) und die Identifizierung genetischer Suszeptibilitätsfaktoren. Das übergeordnete Ziel von GWAS ist es, die genetischen Ursachen von Erkrankungen zu verstehen und basierend auf diesen Erkenntnissen bessere Behandlungsmöglichkeiten oder gar Präventionen zu entwickeln (Visscher et al., 2017). GWAS bestehen aus genomweiten Einzelvariantentests, die mit Hilfe einer Regression häufige genetische Marker, üblicherweise SNPs mit einer minoren Allelfrequenz (MAF) $\geq 1\%$ und kleiner Effektstärke, auf Assoziation mit einem Phänotyp testen (Abb. 1).

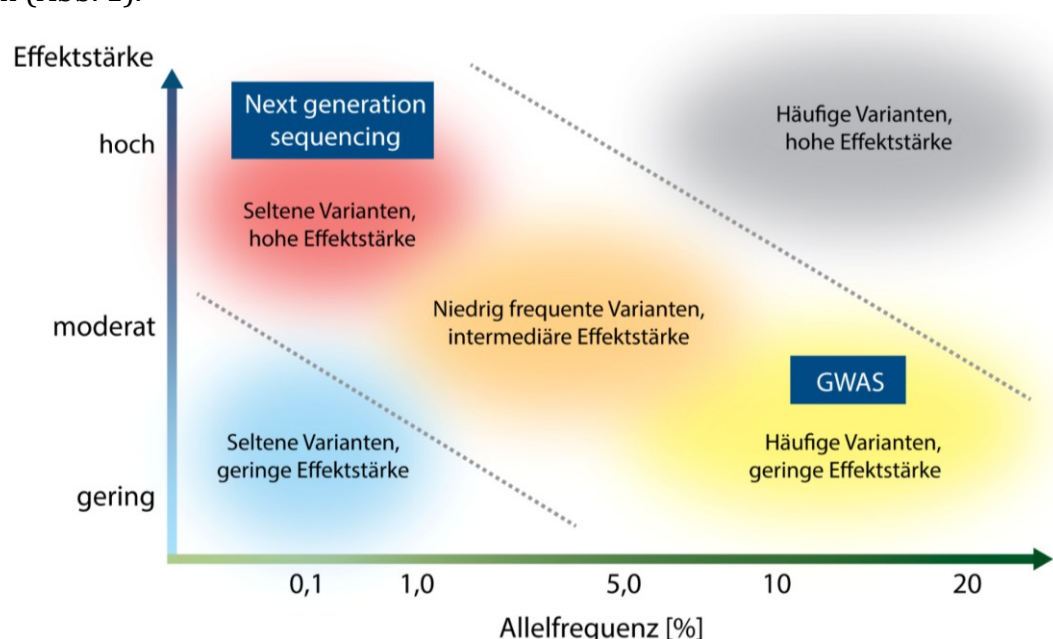


Abb. 1 Paradigma zur Identifikation krankheitsassoziiierter genetischer Varianten.

Zusammenhang zwischen der Effektstärke und der Allelfrequenz in der Allgemeinbevölkerung. Mittels GWAS lassen sich häufige genetische Varianten mit einer geringen Effektstärke identifizieren. Die Anwendung von *next generation sequencing*-Methoden und familienbasierte Studien erlauben die Identifikation seltener Varianten mit einer höheren Effektstärke. Modifiziert nach Manolio et al. (2009).

GWAS nutzen das Kopplungsungleichgewicht (*linkage disequilibrium*, LD), die Korrelationsstruktur zwischen genetischen Varianten im humanen Genom, welches durch evolutionäre Prozesse wie Mutationen, Rekombination, natürliche Selektion und genetischen Drift geformt wurde. Im Jahre 2003 bot die Arbeit des *International HapMap Projects* der Wissenschaftsgemeinschaft hierfür einen wichtigen Meilenstein. Erstmals wurde eine Kartierung des humanen Genoms auf Basis der Frequenzen und LD zwischen genetischen Varianten öffentlich zugänglich und nutzbar gemacht (Belmont et al., 2003). Die statistische *Power* einer GWAS eine genetische Assoziation mit einem Merkmal zu detektieren, ist im Wesentlichen abhängig von i) der Größe der Stichprobe, ii) den Effektgrößen der genetischen Varianten, iii) der Frequenz ebendieser Varianten und iv) dem LD zwischen den untersuchten Markern und dem unbekannten kausalen genetischen Locus (Visscher et al., 2017; Wu et al., 2022). Im Verlauf des letzten Jahrzehnts wurde das SNP-Array Design stets angepasst, um das menschliche Genom effizient über geeignete *tag*-SNPs abzudecken. Diese SNPs sind so ausgewählt, auch auf Basis der Ergebnisse des *HapMap Projects*, dass sie den Großteil der häufigen genetischen Variation mittels LD erfassen (Wallace et al., 2007). Durch stete Nachfrage und Verbesserung konnten ebenfalls *Arrays* für spezielle Hypothesen und Studien entworfen werden, um sowohl phänotyp- als auch ethnizitätsspezifische Signale im und außerhalb des kodierenden Bereichs des Genoms erfassen zu können.

Die Detektion von Phänotyp-SNP Assoziationen erlauben Einblicke in die genetische Architektur und bilden die Grundlage zur Identifikation neuer Risikogene, *drug targets*, und biologischen Markern, sowie personalisierter Risikoprädiktion und genotypspezifischer Therapie (Tam et al., 2019).

GWAS bilden einen komplementären Ansatz zu den Kopplungsanalysen, welche ursprünglich bei monogenetischen Erkrankungen sehr erfolgreich angewendet wurden. Bei multifaktoriellen Erkrankungen spielen beide Ansätze in unterschiedlichen Bereichen der genetischen Architektur ihre Vorteile aus. Für Diabetes Typ 2 wurde beispielsweise eine Region auf Chromosom 10 durch eine Kopplungsanalyse identifiziert und GWAS konnten später das Gen *TCF7L2* auf Chromosom 10 als Suszeptibilitätsfaktor bestimmen (Del Bosque-Plata et al., 2021; Grant et al., 2006; Reynisdottir et al., 2003). Es sei jedoch zu betonen, dass für die BD und andere komplexgenetische Erkrankungen nur die Ergebnisse von GWAS weitreichende und replizierbare Erkenntnisse geliefert haben, was in der genetischen Architektur der BD begründet liegen könnte (siehe auch 1.1.2.).

Kritiker der GWAS führen an, dass SNPs nur einen geringen Teil der Heritabilität komplexgenetischer Erkrankungen erklären können und die Assoziation einer genetischen Variante an einem genomischen Locus nicht direkt Auskunft über das relevante Gen oder den zugrunde liegenden Mechanismus gibt, denn rund 80-90 % der mit einer Krankheit assoziierten GWAS-Befunde liegen im nicht-kodierenden Bereich des Genoms (Hindorff et al., 2009; Watanabe et al., 2019). Dennoch gelten GWAS heute als ein

mächtiges Instrument der Genetik und haben unser Verständnis der genetischen Architektur multifaktorieller Erkrankungen in den letzten 20 Jahren rasant vorangebracht. Weiterhin sind GWAS-Ergebnisse Ausgangspunkt weiterführender Analysen, die sich diese Daten zu Nutze machen bzw. über Integration weiterer Omics Datenebenen diese anreichern (Visscher et al., 2017).

GWAS bei der bipolaren Störung

Die Befunde und Erkenntnisse der GWAS haben unser Verständnis der BD grundlegend verändert. Erstmals wurden reproduzierbare Ergebnisse für spezifische Marker und die hochpolygene genetische Architektur erzielt.

Die erste GWAS zur BD wurde im Jahr 2007 veröffentlicht und umfasste etwa 2000 Patienten und 3000 Kontrollen (Burton et al., 2007). In dieser Studie wurde kein genomweit signifikanter SNP für die BD identifiziert und rs420259, lokalisiert auf Chromosom 16p12, wurde als SNP mit dem stärksten Assoziationssignal ($p = 6,3 \times 10^{-8}$) berichtet. Es folgten weitere GWAS und die Zahl der untersuchten Patienten und Kontrollen wurde stetig vergrößert (Baum et al., 2008; Burton et al., 2007; Ferreira et al., 2008; Sklar et al., 2008). Im Jahr 2011 publizierte die *Bipolar Disorder Working Group* des internationalen *Psychiatric GWAS Consortiums* (PGC-BD) eine primäre GWAS, die Assoziationssignale mit genomweiter Signifikanz in den Regionen von *ANKK1* und *SYNE1* entdeckte. Eine Replikation in einer unabhängigen Kohorte erbrachte jedoch keine weitere Evidenz für diese Befunde, was die Autoren auf eine Überschätzung des originalen Chancenverhältnis (OR, *odds ratio*) zurückführten (*winner's curse*) (Sklar et al., 2011). Schließlich wurden in einer dritten Analyse alle Patienten und Kontrollen zusammen untersucht. Dabei erreichte das Assoziationssignal für rs4765913 in *CACNA1C* ($p = 1,82 \times 10^{-9}$) genomweite Signifikanz und erstmals wurde eine signifikante Assoziation, mit rs12576775 als stärkstes Signal ($p = 2,77 \times 10^{-8}$), im intronischen Bereich des Gens *ODZ4* identifiziert (Sklar et al., 2011). Eine Signalweganalyse implizierte eine signifikante Anreicherung für den *Pathway* spannungsabhängige Calciumkanalaktivität (Sklar et al., 2011). Dieser Befund stützte frühere Literatur zur Rolle von Ionenkanälen bei der BD und stimmungsstabilisierende Effekte von Ionenkanal-modulierenden Medikamenten (Levy & Janicak, 2000; Sklar et al., 2011). Das vom *ODZ4*-Gen kodierte Protein gehört zu den Teneurinen, eine Familie von Transmembranproteinen, die eine wichtige Rolle bei der Signaltransduktion und der korrekten neuronalen Vernetzung während der Entwicklung spielen (Sklar et al., 2011). Die bemerkenswerteste Entdeckung der Studie war nach Einschätzung der Autoren die Vielzahl an Replikationssignalen mit identischer Effektrichtung. Diese Beobachtung ist konsistent mit einem hochpolygenen Krankheitsmodell, mit vielen häufigen Suszeptibilitätsvarianten mit relativ schwachen Effekten (Sklar et al., 2011). Ferner beobachteten Sklar et al. (2011), dass innerhalb von

drei der fünf Hauptbefunde nicht-kodierende RNAs lokalisiert waren. Darunter war beispielweise *miR-708*, die im ersten Intron von *ODZ4* lokalisiert ist. Damit stellte die Studie das erste Mal einen Zusammenhang zwischen miRNAs und der BD her (Sklar et al., 2011). Im Jahr 2014 führten Mühleisen und Kollegen eine GWAS mit 9747 Patienten und 14278 Kontrollen durch und detektierten 56 genomweit signifikante SNPs in fünf unabhängigen Regionen (Mühleisen et al., 2014). Die Ergebnisse dieser Studie bestätigten drei bereits bekannte Risikoloci (*ANK3*, *ODZ4* und *TRANK1*) und identifizierten zwei neue Regionen; *ADCY2* und einen Bereich zwischen *MIR2113* und dem Gen *POU3F2* (Chen et al., 2013; Ferreira et al., 2008; Mühleisen et al., 2014; Sklar et al., 2011). Das Gen *ADCY2* ist im humanen Gehirn exprimiert und kodiert für ein Protein, welches eine zentrale Rolle in der cAMP-Signalkaskade spielt (Ostrom et al., 2012; Stengel et al., 1992). Ein SNP (rs1906252), der im starken LD mit dem Top-SNP (rs12202969) in der Region zwischen *MIR2113* und *POU3F2* steht, gehörte zu den signifikantesten Befunden in einer GWAS zur Informationsverarbeitungsgeschwindigkeit bei 991 gesunden älteren Probanden (Luciano et al., 2011). Im Jahr 2019 führten Stahl et al. eine GWAS für die BD mit 20352 Patienten und 31358 Kontrollen europäischer Herkunft durch (Stahl et al., 2019). Zudem schlossen sie eine weitere Analyse für 822 Varianten mit $p < 1 \times 10^{-4}$ an, in der weitere 9412 Patienten und 137760 Kontrollen getestet wurden. Die Kombination aus GWAS und Folgeanalyse führte zur Identifizierung von 30 Loci mit genomweit signifikanter Assoziation mit BD, wovon 20 Loci zuvor noch unbekannt waren. Das stärkste Assoziationssignal wurde für rs9834970 am *TRANK1* Locus erfasst ($p = 5,7 \times 10^{-12}$). Unter den identifizierten Loci befanden sich Gene, die für Ionenkanäle und -transporter (*CACNA1C*, *SCN2A* und *SLC4A1*), Rezeptoren für Neurotransmitter (*GRIN2A*) und synaptische Bausteine (*RIMS1* und *ANK3*) kodieren. Daraus folgerten Stahl et al. (2019), dass Calciumkanäle im Gehirn sowie die Regulation von Neurotransmittern eine wichtige Rolle in der Krankheitsentstehung der BD spielen könnten. Zwei Jahre später publizierten Mullins et al. die bis dahin größte GWAS mit 41917 Patienten und 371549 Kontrollen mit europäischer Herkunft (Mullins et al., 2021). Insgesamt 57 verschiedene BD-Kohorten aus Europa, Nordamerika und Australien wurden hierfür vereint und harmonisiert. Diese Metaanalyse konnte 64 unabhängige Loci mit genomweit signifikanter Assoziation mit BD identifizieren, wovon 33 bis dahin noch nicht bekannt waren (Tab. 14). Die Autoren vermuten, dass diese GWAS einen Wendepunkt in der Identifizierung von BD Risikoloci darstellt und dass die weitere Vergrößerung der untersuchten Kohorten, die Entdeckung von Risikovarianten dramatisch beschleunigen wird (Abb. 2)

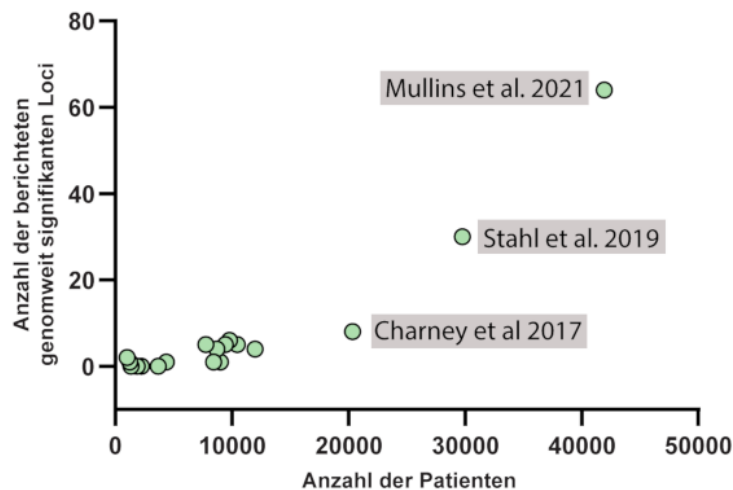


Abb. 2 Identifizierung von Risikoloci für die BD.

Die Anzahl der identifizierten genomweit signifikanten Risikoloci für die BD aufgetragen gegen die Anzahl der untersuchten Patienten aus den jeweiligen Studien. Abkürzung: BD, bipolare Störung. Modifiziert nach Hara et al. (2022).

Dennoch wurden im Vergleich zu ähnlichen Untersuchungen zur SCZ weniger genomweit signifikante Varianten für die BD identifiziert (Pardiñas et al., 2018). In Folgeanalysen wurde eine signifikante Überrepräsentation von Genen festgestellt, die im Gehirn exprimiert sind und in synaptischen biologischen Signalwegen eine Rolle spielen. Insbesondere Gene, die spezifisch in Neuronen des präfrontalen Cortex und Hippocampus exprimiert werden (Mullins et al., 2021). Zudem konnte durch die Integration von *Expressions-Quantitative-Trait-Loci* (eQTL) Daten eine Auswahl von Genen identifiziert werden, für die übereinstimmende Hinweise vorlagen, dass deren Assoziation mit BD durch die Genexpression vermittelt wird. Unter diesen war beispielsweise das Gen *HTR6*, welches für einen Serotoninrezeptor kodiert, auf den Antipsychotika und Antidepressiva wirken oder *MCHR1*, ein *drug target* des Antipsychotikums Haloperidol (Mullins et al., 2021; Wishart et al., 2018). Diese und andere Genprodukte stellen mögliche Ziele für bereits bekannte Medikamente dar oder bieten potenziell neue Therapiemöglichkeiten für die BD, und die Autoren schlagen diese als interessante und vielversprechende Kandidaten für funktionelle Analysen vor (Mullins et al., 2021). Der polygene Risikoscore (PRS, *polygenic risk score*) berechnet die gewichtete Anzahl der Risikoallele eines Individuums, um den kumulativen Effekt genomweiter Risikovarianten zu erfassen (Mistry et al., 2018; N. R. Wray et al., 2014). Für die BD konnte der PRS durchschnittlich 4,57 % der phänotypischen Varianz innerhalb der europäischen Kohorten erklären. Die sogenannte SNP-Heritabilität (h^2_{SNP}) wurde auf 24,6 % in der Kohorte basierend auf Sklar et al. (2011) bzw. 11,9 % in den Kohorten externer Studien geschätzt. Die beobachtete Differenz führen Mullins et al. (2021) teilweise auf den Einschluss von Patienten aus Biobanken zurück, die möglicherweise eine heterogenere klinische Präsentation oder weniger schwere Erkrankungen aufweisen. Zusätzlich schwankten die Anteile von Patienten mit BD I oder BD II innerhalb der Kohorten, was zu weiterer klinischer und

genetischer Heterogenität zwischen den Datensätzen beitrug. Trotz dieser Heterogenität hat die Kombination der Kohorten zur Verbesserung der statistischen *Power* beigetragen, was die Identifikation neuer Risikovarianten ermöglichte (Mullins et al., 2021). In Anwendung auf unabhängige Kohorten mit unterschiedlichen Ethnizitäten erklärte der PRS, jedoch nur noch $\sim 2\%$ (Population ostasiatischer Abstammung) oder weniger (Population afroamerikanischer Abstammung) der phänotypischen Varianz der BD. Einerseits weist das auf Unterschiede in der Allelfrequenz und der Kopplungsungleichgewichtsstruktur hin (Duncan et al., 2019; Martin et al., 2019), andererseits betont dies auch den dringenden Bedarf an Studien, die größere Datensätze mit unterrepräsentierten Ethnizitäten einschließen. Obwohl der PRS ein unverzichtbar wertvolles Instrument für die Forschung ist, um Datensätze zu beschreiben und Erkrankungen besser zu verstehen, haben heutige PRS nicht genügend Aussagekraft, um Anwendung in der Klinik zu finden, da sie eine präzise Risikoeinschätzung für Patientengruppen nicht erlauben (Lewis & Vassos, 2020; Torkamani et al., 2018).

Darüber hinaus wurde eine signifikante genetische Korrelation (r_g) der BD mit zahlreichen anderen psychiatrischen Erkrankungen insbesondere mit der SCZ ($r_g = 0,68$) und der MD ($r_g = 0,44$) festgestellt (Mullins et al., 2021). Interessanterweise konnten auch Hinweise auf eine positive genetische Korrelation zwischen BD und anderen Merkmalen wie Zigarettenkonsum pro Tag, problematischem Alkoholkonsum sowie der Schlafqualität identifiziert werden (Mullins et al., 2021). Durch stete Erweiterung der Studiengröße und die Integration von zusätzlichen Omics-Daten lässt sich der fehlende Anteil der Heritabilität immer weiter aufklären. Beispielsweise konnte der genetische Beitrag für menschliche Größe nun fast vollständig geklärt werden (Yengo et al., 2022). Diese Studie umfasst die Untersuchung von mehr als 5,4 Millionen Individuen unterschiedlicher Abstammung und identifizierte 12111 unabhängige SNPs, die signifikant mit der Körpergröße assoziiert sind und nahezu die gesamte SNP-basierte Erblichkeit von rund 40-50 % erklären (Yengo et al., 2022).

Trotz dieser erheblichen Fortschritte wurde bisher nur ein kleiner Teil der genetischen Ätiologie der BD aufgedeckt und die spezifischen biologischen Krankheitsmechanismen sind weiterhin unvollständig verstanden. Die fortlaufende Analyse umfangreicher Patienten- und Kontrollkohorten erweitert jedoch kontinuierlich die Liste der genetischen Befunde. Die Studie von Mullins et al. (2021) bestätigte, dass die BD eine außerordentlich hochpolygene Erkrankung ist und schätzungsweise 8600 Varianten 90 % der h^2_{SNP} erklären. Daher wird erwartet, dass viele weitere SNPs von zukünftigen Studien identifiziert werden müssen, die gemeinsam zur genetischen Architektur der BD beitragen. Diese Ergebnisse bieten nicht nur neue Einblicke in mögliche therapeutische Ansätze, sondern dienen auch als Grundlage für zukünftige funktionale Studien, die das Verständnis und die Behandlung der BD verbessern können.

1.1.4 Rolle von microRNAs bei der Entwicklung der bipolaren Störung

Untersuchungen zur SCZ deckten eine signifikante Anreicherung von GWAS-Assoziationssignalen in Zielgenen der *MIR137* auf und konnten dadurch einen potenziellen Zusammenhang zwischen GWAS-Ergebnissen und dem Wirkmechanismus eines miR-regulierten Netzwerks auf die Krankheitsentstehung der SCZ herstellen (Sullivan et al., 2012). Zum Zeitpunkt der Durchführung der hier vorgestellten Studie gab es noch keine systematische und genomweite Untersuchung zur Aufklärung einer Beteiligung von miRNAs im Bereich der BD. Durch die genetische Überlappung von SCZ und BD erschien es daher naheliegend, die Hypothese zu überprüfen, ob miRNAs und die von ihnen regulierten Zielgene zur Entstehung der BD beitragen (Forstner et al., 2015). MiRNAs sind kleine, hochkonservierte nichtkodierende Einzelstrang-RNAs, die spezifisch die Genexpression auf posttranslationaler Ebene regulieren (He & Hannon, 2004). Die Expression von miRNAs ist zell- und gewebsspezifisch sowie zeitlich kontrolliert (Kosik, 2006). MiRNAs werden durch die RNA Polymerase II transkribiert (Cai et al., 2004) und das entstandene Primärtranskript (pri-miR, 100-1000 nt) wird von dem Drosha-DGCR8 Komplex zu der *precursor* miRNA (pre-miR, ~70 nt) nukleär prozessiert (Denli et al., 2004) (Abb. 3).

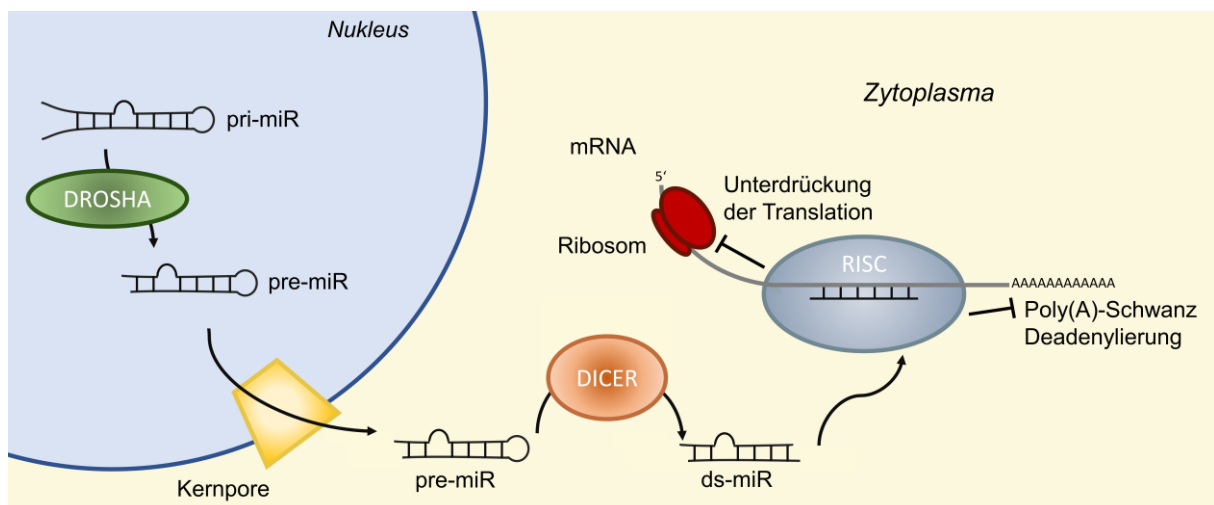


Abb. 3 miRNA Biogenese, Struktur und Funktion.

Die pri-miR wird von dem Drosha-DGCR8 Komplex zu der pre-miR nukleär prozessiert. Die pre-miR wird ins Zytoplasma exportiert und dort durch Dicer in die ds-miR geschnitten. Die reife miR wird in den RISC integriert und kann so spezifisch an einen Bereich der mRNA seiner Zielgene binden. Gewöhnlich wird die Proteinbiosynthese durch Unterdrückung der Translation oder durch Induktion der Deadenylierung manipuliert. Abkürzungen: pri-miR, Primärtranskript der microRNA; Drosha-DGCR8 Komplex, Enzymkomplex bestehend aus einem RNA bindenden Protein und einer RNase III; pre-miR, *precursor* miR; ds-miR, doppelsträngiges Fragment der miR; RISC, *RNA-induced silencing complex*; mRNA, *messenger RNA*. Modifiziert nach Geaghan und Cairns (2015)

Anschließend wird die pre-miR ins Zytoplasma exportiert und dort durch die RNase III Dicer in eine 21-25 nt lange ds-miR geschnitten und daraufhin entwunden (He & Hannon, 2004). Die reife miRNA wird in einen Ribonukleoproteinkomplex integriert (RISC, *RNA-induced silencing complex*) und kann so spezifisch an einen Bereich der Boten RNAs (mRNA, *messenger RNA*) seiner Zielgene binden, der meist in dem 3'-untranslatierten

Bereich liegt (Kawamata & Tomari, 2010; Maffioletti et al., 2014a). Dieser Bereich ist komplementär zur *Seed* Region, den Basen 2-7 des 5'-Endes der miRNA (Bartel, 2009). Gewöhnlich regulieren miRNAs die Proteinbiosynthese durch Unterdrückung der Translation oder durch Induktion der Deadenylierung, was letztlich zum Abbau der mRNAs führt (Bartel, 2004).

MiRNAs übernehmen eine wichtige Aufgabe in nahezu allen zell- und entwicklungsbiologischen Prozessen (Ha & Kim, 2014). Friedman et al. (2009) berichteten, dass mehr als 60 % aller humanen proteinkodierenden Gene mindestens ein konserviertes miRNA Bindemotiv enthalten und auch neuere Studien zeichnen weiterhin ein komplexes Bild von miRNA-Zielgen Interaktionen (Diener et al., 2024). Da einzelne miRNAs hunderte von unterschiedlichen mRNAs binden und mRNAs ihrerseits von mehreren miRNAs reguliert werden können, entsteht ein dynamisches und fein koordiniertes Netzwerk (O'Carroll & Schaefer, 2013).

Das menschliche Gehirn ist aus morphologisch und funktionell sehr unterschiedlichen Zellen aufgebaut. Jedes der rund 100 Milliarden Neuronen ist wiederum synaptisch verbunden mit tausenden weiteren Neuronen (Herculano-Houzel, 2009). Die Komplexität der verarbeiteten Informationen und die Fähigkeit der kontinuierlichen Umgestaltung übersteigt bei weitem die jedes anderen Systems im menschlichen Körper. Kern dessen ist die Spezialisierung der Neuronen und ihr entsprechendes Netzwerk basierend auf streng kontrollierter Genexpression, wobei die miR-abhängige Regulation ein möglicher Kontrollmechanismus sein könnte (O'Carroll & Schaefer, 2013). Es gibt Hinweise darauf, dass miRNAs Prozesse beeinflussen, die an der Entwicklung des Gehirns und der synaptischen Plastizität beteiligt sind (Forstner et al., 2013; Schratt, 2009). Die davon abgeleitete Fragestellung, ob miRNAs auch eine Rolle bei der Entstehung von psychiatrischen Erkrankungen wie der BD spielen, wurde in einigen Studien untersucht (Forstner et al., 2015; A. H. Kim et al., 2010; Moreau et al., 2011). Es wurden z.B. Veränderungen des Expressionsmusters von miRNAs in *post mortem* Gewebe des präfrontalen Cortex von Patienten mit BD festgestellt, was die obige Hypothese weiter stützt (A. H. Kim et al., 2010; Moreau et al., 2011). Eine weitere Untersuchung des präfrontalen Cortex von Patienten mit psychiatrischen Erkrankungen zeigte, dass einige miRNAs, wie miR-219, bei Patienten mit BD und SCZ im Vergleich zur Kontrollgruppe eine erhöhte Expression aufwiesen (Smalheiser et al., 2014). In einer Studie, die den *MIR137/MIR2682*-Locus untersuchte, wurde eine seltene nicht kodierende Variante identifiziert, die mit der SCZ und BD assoziiert ist und durch eine verringerte Expression von *MIR137/MIR2682* potenziell das Erkrankungsrisiko erhöht (Duan et al., 2014). Bavamian et al. (2015) untersuchten die Expression von miR-34a mit Hilfe von induzierten pluripotenten Stammzellen (iPSC, *induced pluripotent stem cell*), die von Patienten mit BD und gesunden Kontrollen stammten. Die differenzierten neuronalen Kulturen zeigten ein erhöhtes miR-34a Level im Vergleich zu denen gesunder Probanden.

Die Autoren schlugen vor, dass eine erhöhte miR-34a Konzentration wiederum zu einer stärkeren Inhibierung von Zielgenen wie beispielsweise *ANK3*, einem replizierten Risikogen für BD, führen könnte, was wiederum eine Veränderung in der neuronalen Differenzierung und synaptischer Plastizität erklären könnte (Bavamian et al., 2015). Die erhöhte Expression von miR-34a in BD im Vergleich zu gesunden Kontrollen konnte in einem weiteren Zellmodell repliziert werden (Hewitt et al., 2023). In dieser Studie wurde ein beschleunigter Übergang von neuronalen Vorläuferzellen in ein neuronales Stadium beobachtet, was auf ein frühes pathophysiologisches Merkmal der BD hinweisen könnte und die Hypothese einer Beteiligung von miRNAs an der Entstehung der BD unterstützt (Hewitt et al., 2023). Allerdings gab es auch kritische Stimmen, die anmerkten, dass in der Studie unzureichende Informationen zu mehreren wichtigen Aspekten berichtet wurden. Dies betraf insbesondere die Qualitätskontrolle bei der Generierung der iPSC-Linien, klinische Details zu den iPSC-Spendern sowie weitere methodische Einzelheiten (Yde Ohki et al., 2024).

Zusammenfassend bilden die genetische Aufarbeitung und Interpretation von GWAS-Signalen die Grundlage für weiterführende funktionelle Untersuchungen, beispielsweise in Zellmodellen, um mögliche Wirkmechanismen von miRNAs über ihre regulierten Netzwerke weiter zu entschlüsseln.

1.1.5 Next Generation Sequencing – Technologien der nächsten Generation

Die Sequenziertechnologien der nächsten Generation (NGS, *next generation sequencing*), haben die Untersuchung der genetischen Variabilität des humanen Genoms tiefgreifend revolutioniert. NGS ermöglicht die massiv parallele Sequenzierung von Tausenden von Genen gleichzeitig und überwindet damit viele der Beschränkungen der Sanger-Sequenzierung (Bamshad et al., 2011; Ng et al., 2010). Die rasante Entwicklung des letzten Jahrzehnts und das Angebot erschwinglicher kommerzieller Kits (Abb. 4) hat es ermöglicht, dass die NGS-Technologie in nahezu alle genetischen Forschungsbereiche und die medizinische Diagnostik Einzug gehalten hat. Die modernen Sequenzierverfahren können im Hochdurchsatz angewendet werden und ermöglichen beispielsweise die Sequenzierung eines menschlichen Genoms innerhalb eines Tages. Im Vergleich dazu wurde das erste humane Genom im Rahmen des in den 1990er Jahren gestarteten, internationalen Humangenomprojekt (*Human Genome Project*) sequenziert, aber erst 2003 offiziell für entschlüsselt erklärt (Collins et al., 2003). Die Sequenzierung umfasste dabei aber nur den euchromatischen Anteil des Genoms und lies damit weitere 8 % unaufgedeckt (Nurk et al., 2022).

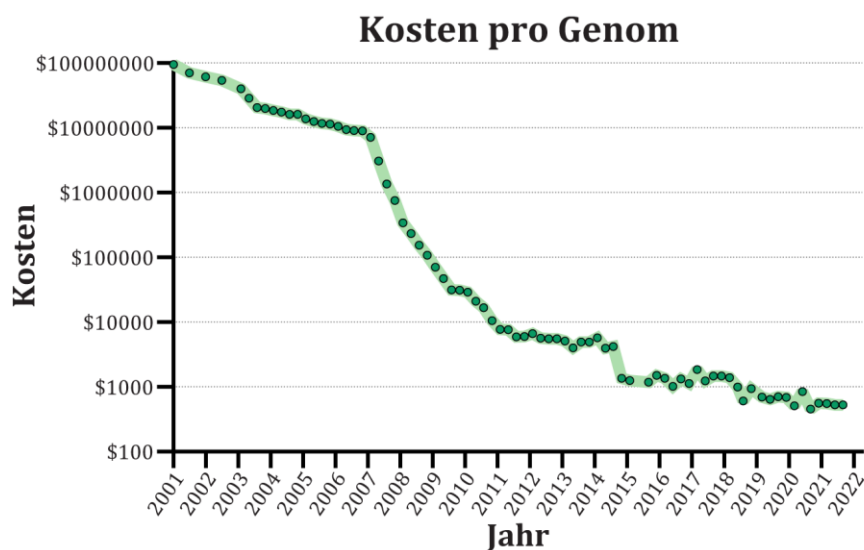


Abb. 4 Kosten pro Genom.

Dargestellt ist die Kostenentwicklung für die Sequenzierung eines humanen Genoms. Daten basierend auf Wetterstrand KA. DNA Sequencing Costs. NHGRI Genome Sequencing Program (GSP), www.genome.gov/sequencingcostsdata.

Die in dieser Arbeit verwendete NGS-Methode war die Exomsequenzierung (WES, *whole exome sequencing*), die sich auf den kodierenden Bereich des Genoms fokussiert. Das Exom umfasst die Gesamtheit aller Exone und macht beim Menschen etwa 1-2 % des gesamten Genoms aus (Lander et al., 2001). Hierfür wird die genomische DNA fragmentiert und mit Hilfe einer RNA-Bibliothek werden die Zielsequenzen angereichert und mit Adaptern versehen. Diese Adaptersequenzen ermöglichen die Bindung und Immobilisierung an eine Glasflusszelle (*Flowcell*). Die angereicherten Fragmente werden zu Clustern amplifiziert; ein entscheidender Schritt, um die Einzelstränge der DNA zu

vervielfältigen, damit sie während der Sequenzierung erfasst werden können. Über die Technologie namens *Sequencing by Synthesis* (SBS) wird jede Base nacheinander hinzugefügt und die DNA-Sequenz durch die jeweiligen Fluoreszenzsignale detektiert (Rodriguez & Krishnan, 2023).

Ein wesentlicher Vorteil gegenüber der Arraytechnologie ist beispielsweise die Identifizierung neuer Varianten und eine höhere Auflösung. Die Möglichkeit, Tausende von genetischen Varianten pro Individuum zu identifizieren, hat jedoch zu Schwierigkeiten bei der Interpretation dieser Varianten für Merkmale und Krankheiten geführt (Ng et al., 2010). Dies gilt insbesondere im Kontext genetischer Prädispositionen und personalisierter Therapieansätze. Ebenso stellt sich die Frage des Umgangs mit Zufallsbefunden (*incidental findings*), die zwar keinen unmittelbaren Bezug zur ursprünglichen klinischen oder wissenschaftlichen Fragestellung haben, jedoch potenziell klinische Relevanz aufweisen können.

1.1.6 Seltene genetische Varianten bei der Entwicklung der bipolaren Störung

Es wird geschätzt, dass häufige genetische Varianten mit kleinem Effekt rund 20 – 30 % der phänotypischen Varianz der BD erklären (Lee et al., 2011; Mullins et al., 2021; Stahl et al., 2019). Die mit Hilfe von GWAS ermittelte Heritabilität ist demnach niedriger als die Schätzungen aus Zwillings- und Familienstudien. Das liegt in erste Linie daran, dass diese SNP-Daten vorwiegend die Effekte häufigerer Varianten erfassen und auf klinisch und genetisch heterogenen Patientenkohorten basieren (Mullins et al., 2021). Die sogenannte „*hidden heritability*“ beschreibt den bisher noch nicht aufgeklärten Anteil der Heritabilität und umfasst den möglichen Einfluss seltener genetischer Varianten, epigenetische und epistatische Effekte, Gen-Umweltinteraktionen sowie zahlreiche genetische Varianten mit sehr kleinem Effekt (Gibson, 2010). Studien wie die von Mullins et al. (2021) haben unser Verständnis von BD als hochpolygene Erkrankung gestärkt und gezeigt, dass noch viele weitere nicht identifizierte SNPs an der Entwicklung der BD beteiligt sind.

Der Fortschritt im Feld der Sequenzierungstechnologien und fallende Kosten haben es ermöglicht Exome und ganze Genome effizient zu sequenzieren (Claussnitzer et al., 2020; Gratten et al., 2014). Durch internationale Bemühungen genetische Daten zu bündeln und zu harmonisieren, konnten für die SCZ beispielsweise bereits genomweit signifikante Assoziationen von seltenen genetischen Varianten identifiziert werden (Singh et al., 2016, 2022). Für die BD liegen bisher keine genomweit oder exomweit signifikanten Ergebnisse für einen Beitrag seltener genetischer Varianten mit einer höheren Penetranz vor. Die geringe Evidenz für eine Beteiligung von seltenen genetischen Varianten könnte in zu kleinen Stichprobengrößen, aber auch in den uneinheitlichen Studiendesigns und nicht zuletzt in der komplexen genetischen Architektur der BD begründet liegen (Kataoka et al., 2016).

Die Rolle seltener genetischer Varianten in der BD ist Gegenstand aktueller Forschung. Neue Technologien haben die Identifizierung von seltenen Varianten auf der Ebene des Hochdurchsatzes ermöglicht. Zunächst wurden gezielte Untersuchungen von Kandidatengenen durchgeführt. Später wurden durch das WES genetische Varianten im kodierenden Bereich des Genoms identifiziert und dann durch *whole genome sequencing* (WGS) schließlich das gesamte allelische Spektrum des menschlichen Genoms erfasst. Durch kontinuierlich wachsende Datensätze und Konsortien besteht nun die Möglichkeit, selbst sehr seltene und potenziell kausale genetische Varianten mit höherer Effektstärke erstmals statistisch zu bewerten. Seltene Varianten weisen besondere Merkmale auf, darunter ein geringeres Kopplungsungleichgewicht mit flankierenden Varianten, einen größeren Effekt einiger seltener Varianten auf die Genfunktion und -expression sowie eine größere Populationsspezifität, wodurch seltene Varianten eine einzigartige Rolle in der Genetik komplexer Krankheiten spielen (Momozawa & Mizukami, 2020).

Mutationen im Exom, dem kodierenden Bereich des Genoms, darunter synonyme, *missense*- und *nonsense*-Mutationen, sind aufgrund ihrer direkten Auswirkung auf die Proteinstruktur einfacher zu interpretieren (Hara et al., 2022). Daher präsentieren sie sich als geeigneter Gegenstand für umfassende funktionelle Untersuchungen. Es wird angenommen, dass diese Mutationen einen stärkeren Effekt oder höheren Einfluss haben als genetische Varianten in nichtkodierenden Abschnitten (Claussnitzer et al., 2020). Das liegt zum einen daran, dass das kodierende Genom oft unter stärkerem evolutionärem Druck steht, um die Konservierung der Proteinstruktur und -funktion zu wahren. Nicht kodierende Bereiche hingegen haben möglicherweise eine größere Kompensationskapazität für genetische Varianten. Da diese Varianten weniger direkte funktionale Auswirkung haben, stehen sie unter geringerem selektivem Druck (Asthana et al., 2007; Kryukov et al., 2005). Folglich haben seltene nicht-synonyme genetische Varianten in kodierenden Bereichen eher eine höhere Penetranz (Gibson, 2011). Durch ihren unmittelbaren Einfluss auf die Proteinstruktur besteht eine höhere Wahrscheinlichkeit, dass sie einen Phänotyp oder Erkrankung verursachen, was wiederum direkt für die molekulare Diagnostik oder die Generierung von validen Krankheitsmodellen genutzt werden kann (Hara et al., 2022). Etablierte und standardmäßig verwendete Algorithmen zur Bewertung der Pathogenität einer genetischen Variante sind beispielsweise SIFT (*sorting tolerant from intolerant*), Provean (*protein variation effect analyzer*), PolyPhen-2 (*Polymorphism Phenotyping v2*), MutationTaster oder der LRT (*likelihood ratio test*) (Adzhubei et al., 2010; Choi & Chan, 2015; Chun & Fay, 2009; P. Kumar et al., 2009; Schwarz et al., 2014). Dennoch gibt es auch Hinweise auf die Existenz von Varianten in regulatorischen Bereichen des Genoms, die über Mechanismen wie die Modulation der Genexpression einen signifikanten Einfluss auf biologische Merkmale und Erkrankungen haben können (Ellingford et al., 2022). Insgesamt trägt die Identifizierung und Charakterisierung solcher Varianten wesentlich

dazu bei, ein tieferes Verständnis der genetischen Grundlagen von Erkrankungen zu erlangen sowie diagnostisch relevante Informationen zu gewinnen (Ellingford et al., 2022).

Für die BD hat sich eine seltene Kopienzahlvariation (CNV, *copy number variation*), eine Deletion oder Duplikation größerer DNA-Abschnitte, am Locus 16p11.2 nach Bonferroni Korrektur als genomweit signifikant erwiesen (Green et al., 2016). Zunächst wurde diese 650 kb große Duplikation in einer großen *de novo* Studie für SCZ beschrieben und wurde später dann auch als Risikofaktor für die BD identifiziert. Weiterhin ist dieser CNV mit Autismus und Intelligenzminderung assoziiert, was weitere Hinweise für die Überlappung und Vernetzung neuropsychiatrischer und neurologischer Erkrankungen aufzeigt (Ghebranious et al., 2007; R. A. Kumar et al., 2008; McCarthy et al., 2009; Weiss et al., 2008). Die meisten bisherigen Studien zu CNVs beruhen auf der SNP-Array Technologie, welche keine zuverlässige Detektion von kleineren CNVs ermöglicht. Durch Untersuchung von immer mehr NGS-Daten ist jedoch zu erwarten, dass durch das höhere Auflösungsvermögen eine große Anzahl von kleineren Strukturvarianten im gesamten Humangenom detektiert werden wird (Escaramís et al., 2015). Einige dieser kleineren CNVs könnten Assoziationen mit BD und anderen neuropsychiatrischen Erkrankungen aufweisen und möglicherweise eine bedeutende Rolle bei der Krankheitsentstehung spielen.

Zur Identifizierung hoch penetranter, seltener Einzelvarianten wurden unterschiedliche Strategien verfolgt. Die Analyse von großen, mehrfach betroffenen Familien bietet den Vorteil, dass man Segregationsereignisse über mehrere Generationen verfolgen kann. Die Hypothese ist, dass seltene Varianten, die von betroffenen Individuen in großen Mehrgenerationenfamilien geteilt werden, wesentlich zum Krankheitsrisiko beitragen könnten (More et al., 2023). Vorherige familienbasierte Studien für die BD konzentrierten sich hauptsächlich auf die Untersuchung von informativen betroffenen Personen (Georgi et al., 2014; Goes et al., 2016; Strauss et al., 2014). Dabei wurde zwischen den Studien keine seltene und potenziell funktionelle Variante identifiziert, die innerhalb der Familie mit dem Phänotyp segregierte. Die Arbeit von Strauss et al. (2014) identifizierte beispielsweise eine Variante in dem Gen *KCNH7*, das für ein spannungsgesteuertes Kaliumkanal-Protein kodiert. Goes et al. (2016) verfolgten einen kombinierten Ansatz, indem sie zunächst 36 betroffene Personen aus acht Familien untersuchten und die Ergebnisse anschließenden in einer unabhängigen Kohorte von Patienten und Kontrollpersonen validierten. Dabei stellten sie fest, dass die 82 seltenen, segregierenden Kandidatenvarianten Gene implizierten, die in Gen-Sets angereichert waren, die beispielsweise mit SCZ und Autismus in Verbindung gebracht wurden (Goes et al., 2016). Mit einem ähnlichen Studiendesign identifizierten Ament et al. (2015) 26 seltene Kandidatenvarianten die gezielt in einer unabhängigen Kohorte resequenziert wurden. Dabei fanden sie Hinweise auf eine Anreicherung in Genen und Signalwegen, die an

neuronaler Erregbarkeit beteiligt sind (Ament et al., 2015). Eine andere Studie von Rao et al. (2017) untersuchte 15 betroffene Personen aus vier mehrfach betroffenen Familien mit BD. Die Studie identifizierte 14 seltene und potenziell funktionelle Varianten, welche IBD geteilt wurden und Hinweise auf eine mögliche Rolle der GTPase-Aktivierung lieferten (Rao et al., 2017). Durch die Untersuchung von 186 Personen, darunter sowohl gesunde als auch mit BD erkrankte Familienmitglieder, aus 40 mehrfach betroffenen Familien identifizierten Cruceanu et al. (2018) mittels WES eine Anreicherung seltener, segregierender und potenziell funktioneller Varianten in Genen der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren. In späteren Studien, wie der von Toma et al. (2018) wurden in 15 mehrfach betroffenen Familien insgesamt 117 Personen untersucht, darunter 72 an BD erkrankte. Neben der WES-Analyse zur Identifizierung von SNVs wurden auch SNP-Array Daten genutzt, um den Fokus auf verschiedene Variantenklassen wie CNVs und *de novo* Varianten zu erweitern. Einer der Hauptbefunde war die Überrepräsentation von seltenen potenziell funktionellen Kandidatenvarianten in Genen der postsynaptischen Dichte ($p = 0,002$) (Toma et al., 2018). Für die Klasse der protein-trunkierenden Varianten (PTVs) konnte in einer genomweiten *Burden*-Analyse kein signifikanter Unterschied zwischen betroffenen und gesunden Verwandten festgestellt werden. Es zeigte sich jedoch eine signifikante Korrelation mit dem Erkrankungsalter ($p = 0,017$), was von den Autoren dahingehend interpretiert wurde, dass PTVs zu einem beschleunigten Ausbruch der Symptome beitragen könnten (Toma et al., 2018). In einer umfangreichen Studie von Forstner et al. (2020) wurden 81 Personen aus 27 großen und mehrfach betroffenen Familien mit BD untersucht. Durch eine WES-Analyse wurden insgesamt 378 seltene, potenziell funktionelle Varianten identifiziert, die von mindestens drei Familienmitgliedern geteilt wurden (Forstner et al., 2020). Diese Varianten implizierten 368 unterschiedliche Gene, wobei acht dieser Gene in zwei unabhängigen Familien seltene und segregierende Varianten aufwiesen. Fünf dieser Gene trugen Varianten mit vollständiger oder nahezu vollständiger Penetranz. Darunter waren die beiden vielversprechendsten Kandidatengene *RGS12* und *NCKAP5* (Forstner et al., 2020). Das Gen *RGS12* ist im humanen Gehirn exprimiert und kodiert ein GTPase aktivierendes Protein (GAP), welches Signalwege von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCR) reguliert, welche wiederum *ADCY2*, ein bekanntes Risikogen für BD, steuern (Mühleisen et al., 2014; Snow et al., 1998). Des Weiteren stärken Befunde aus WES-Analysen für SCZ, die seltene *de novo* Varianten in *RGS12* identifizierten, die genetische Überlappung von BD und SCZ (Forstner et al., 2020; Guipponi et al., 2014; B. Xu et al., 2011). Für das Protein kodiert durch *NCKAP5* wurde bisher keine Funktion beschrieben, jedoch wurde das Gen *NCKAP5* unter anderem in GWAS für die BD und SCZ berichtet (K. S. Wang et al., 2010). Eine Anreicherungsanalyse der 368 Gene ergab eine signifikante Anreicherung in Signalwegen und Gen-Sets, die zuvor in *de novo* Studien zu Autismus ($p_{\text{adj}} < 0,006$) und SCZ ($p_{\text{adj}} = 0,015$) berichtet wurden. Die Ergebnisse der Studie von Forstner et al. (2020)

deuten demnach auf eine mögliche genetische Überschneidung zwischen Autismus, SCZ und BD auf der Ebene seltener genetischer Varianten hin. Im Jahr 2021 untersuchten Toma et al. (2021) die Beteiligung von seltenen und häufigen Varianten an der Krankheitsentstehung der BD durch WES und eine Kopplungsanalyse von 117 Familienmitgliedern (darunter 50 Patienten mit BD) aus 15 australischen Familien mit hoher Prävalenz für affektive Störungen. Dabei wurde ein signifikantes Kopplungssignal auf Chromosom 10q11-q21 identifiziert (Exponentieller Logarithmus der Quoten [LODexp] = 3,03; $p = 0,046$), welches 36 proteinkodierende Gene überspannte. Interessanterweise war darunter *ANK3*, ein bekanntes Risikogen für die BD (Charney et al., 2017; Ferreira et al., 2008; Mühleisen et al., 2014; Mullins et al., 2021; Schulze et al., 2009; Sklar et al., 2011; Smoller et al., 2013). Eine konditionale Kopplungsanalyse zeigte jedoch, dass sich das Kopplungssignal nicht durch bekannte häufige Risikovarianten oder Varianten in LD erklären lässt (Toma et al., 2021). Eine familienbasierte Segregationsanalyse mit 34 seltenen Varianten in 14 Genen innerhalb des Kopplungsintervalls wies auf einen Beitrag seltener Varianten in den im Gehirn exprimierten Genen *NRBF2* ($p = 0,005$), *PCDH15* ($p = 0,002$) und *ANK3* ($p = 0,014$) hin (Toma et al., 2021). Das Proteinprodukt des Gens *PCDH15* spielt eine Rolle in der neuronalen Differenzierung und Synapsenbildung (Hawi et al., 2018) und Strukturvarianten, die *PCDH15* überspannen, wurden ebenfalls bei Patienten mit BD berichtet (Hawi et al., 2018; Noor et al., 2014). *NRBF2* kodiert für ein Protein, das an Autophagieprozessen beteiligt ist, welche für das Überleben und die Funktion von Neuronen unerlässlich sind (Toma et al., 2021).

Eine kohortenbasierte Studie von Palmer et al. (2022) präsentiert die Ergebnisse der *Bipolar Exome* (BipEx) Kollaboration, eine Untersuchung mittels WES, die 13933 Patienten mit BD und 14422 Kontrollen umfasste. Es wurden signifikante Anreicherungen von sehr seltenen PTVs in Genen festgestellt, die unter evolutionärem Druck stehen ($pLI \geq 0,9$, *probability of Loss-of-Function (LoF) Intolerance*; Wahrscheinlichkeit wie intolerant ein Gen gegenüber Varianten ist, die zu einem Funktionsverlust führen) ($p = 5,0 \times 10^{-5}$). Die PTVs waren zudem in Genen angereichert, die in einer großen SCZ Exom Metaanalyse impliziert wurden (Singh et al., 2022). Genbasierte Analysen, die Daten beider Studien kombinierten, konnten das Gen *AKAP11* als exomweit signifikanten Risikolocus für beide psychiatrische Erkrankungen identifizieren ($p = 2,83 \times 10^{-9}$) (D. Liu et al., 2023; Palmer et al., 2022). Das Gen *AKAP11* kodiert für ein A-Kinase Ankerprotein 11, welches mit GSK3B interagiert und potenziell beteiligt ist am Wirkungsmechanismus von Lithium, einem Stimmungsstabilisierer der standardmäßig bei der Behandlung der BD eingesetzt wird. Dies und die solide statistische Evidenz sprechen für *AKAP11* als Risikolocus für das BD-SCZ-Spektrum (Palmer et al., 2022).

Insgesamt wird angenommen, dass sowohl häufige als auch seltene genetische Varianten in Wechselwirkung untereinander und mit Umweltfaktoren die genetische Grundlage der BD bilden (O'Connell & Coombes, 2021). Die hier vorgestellten Forschungsbemühungen, die sowohl GWAS als auch gezielte Untersuchungen seltener genetischer Variationen umfassen, spielen eine entscheidende Rolle bei der Entwicklung eines umfassenderen Verständnisses der genetischen Faktoren, die dieser komplexen psychiatrischen Erkrankung zugrunde liegen. Ziel ist es die biologischen Signalwege zu entschlüsseln, die an der Entstehung der Krankheit beteiligt sind. Weitere Studien sind notwendig, um die Zusammenhänge zwischen seltenen kodierenden Varianten und der BD sowie ihren Subtypen zu erforschen, ebenso wie die genetische Überschneidung mit anderen psychiatrischen Erkrankungen wie der SCZ.

1.2 Beitrag zu veröffentlichten Studien

Die in der vorliegenden Arbeit vorgestellten Ergebnisse sind Teil von Publikationen, die in anerkannten Fachzeitschriften mit *Peer-Review* veröffentlicht wurden. Die Studie „*Genome-wide analysis implicates microRNAs and their target genes in the development of bipolar disorder*“ wurde im Fachjournal *Translational Psychiatry* (Forstner et al., 2015) publiziert, während der Originalartikel „*Exome sequencing in large, multiplex bipolar disorder families from Cuba*“ in der frei zugänglichen Fachzeitschrift *PLoS ONE* (Maaser et al., 2018) veröffentlicht wurde. Die Beiträge der Autor*innen für die Studien sind in den jeweiligen Abschnitten zu Methoden und Ergebnissen kenntlich gemacht und beschrieben.

2 Zielsetzung

Das Ziel dieser Arbeit war es, das Verständnis der genetischen Grundlagen der BD, einer der häufigsten psychiatrischen Erkrankungen mit multifaktorieller Ätiologie, zu erweitern. In diesem Rahmen wurden zwei distinkte, aber sich ergänzende Studien unter Anwendung aktueller Methoden durchgeführt: die Untersuchung häufiger genetischer Varianten in miRNA Loci und die Analyse seltener, nicht-synonymer Varianten in mehrfach betroffenen Familien mit BD.

Das erste Ziel dieser Arbeit war es den Beitrag häufiger genetischer Varianten, die in miRNA Loci lokalisiert sind, zur Entwicklung der BD zu ergründen. Hierfür wurden die Einzel-SNP-Ergebnisse der zu der Zeit größten BD GWAS verwendet und mithilfe eines adaptierten, Loci-basierten Assoziationstest auf dem miRNA-Level aggregiert. Dies erlaubte die bis dahin erste systematische und genomweite Analyse von miRNA Genen. Zusammen mit einer Signalweg-Analyse der miRNA-Zielgene sollte die potenzielle Rolle häufiger genetischer Varianten in bekannten und im Gehirn exprimierten miRNA kodierenden Genen sowie deren Zielgenen bei der Entstehung der BD untersucht werden.

Das Ziel des zweiten in dieser Arbeit vorgestellten Projekts war es, parallel zu den Erfolgen der GWAS in der Entdeckung von assoziierten häufigen SNPs, die Rolle von seltenen, nicht-synonymen und potenziell funktionellen Varianten in der Suszeptibilität für die BD zu beleuchten. Dazu wurden zwei große, mehrfach betroffene BD-Familien aus Kuba mittels WES untersucht. Eine NGS-Methode, die erstmalig erlaubte das gesamte Exom der ausgewählten Individuen der Familien zu untersuchen. Die hohe Lebenszeitprävalenz für BD in diesen Familien machte sie zu interessanten Kandidaten für die Identifizierung hoch penetranter genetischer Varianten, die über mehrere Generationen mit der Erkrankung segregieren. Zusätzlich wurden PRS erhoben, die auf den kumulativen Informationen genomweiter SNP-Daten beruhen, um die besondere genetische Architektur innerhalb der beiden Familien aufzuklären.

Zusammenfassend erlauben die Ergebnisse dieser Arbeit neue wissenschaftliche Einblicke in die komplexen krankheitsverursachenden Mechanismen der BD. Durch Erhebung, Analyse und Interpretation vorhandener sowie neuer genetischer Daten wurde das Verständnis über das Spektrum der genetischen Variation erweitert, welches der Ätiologie der BD zugrunde liegt.

3 Material und Methoden

3.1 Geräte

Autoklav

- Systec Dx-150, Systec GmbH, Linden, Deutschland
- Varioklav® 135 S Dampfsterilisator, H+P Labortechnik GmbH, Oberschleißheim, Deutschland

DNA-Isolierung

- Magnetic Separation Module I, PerkinElmer chemagen Technology GmbH, Rodgau, Deutschland

DNA-Verwaltung

- 2D-Barcoded 0,5 mL Sample Storage Tube, FluidX Ltd., Cheshire, Vereinigtes Königreich
- 2D CYPHER 1,2 mL Cluster Tube Racks, Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich, Deutschland
- 2D CYPHER Tubes, Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich, Deutschland
- Impression™ Whole Rack 2D & 1D Code Scanner, FluidX Ltd., Cheshire, Vereinigtes Königreich
- LidLock low base rack-96, FluidX Ltd., Cheshire, Vereinigtes Königreich
- SmartScan Solo™ 2D Barcode Reader, Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich, Deutschland
- SmartScan 96 2D Barcode Reader, Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich, Deutschland
- TPE Septum Cap, FluidX Ltd., Cheshire, Vereinigtes Königreich
- X-CAP Semi-Automatic Septum Cap Sealer for Sample Storage Tubes, FluidX Ltd., Cheshire, Vereinigtes Königreich
- XDC-96 Automatic Whole Rack Septum Capping & Decapping Systems, FluidX Ltd., Cheshire, Vereinigtes Königreich

Eismaschine

- AF 80, Scotsman® Ice Systems, Vernon Hills, Illinois, USA

Gelelektrophorese

- GelDoc™ XR System, Bio-Rad Laboratories GmbH, Dreieich, Deutschland
- PowerPac™ HC High-Current Power Supply, Bio-Rad Laboratories GmbH, Dreieich, Deutschland
- Sub-Cell Model 96, Bio-Rad Laboratories GmbH, Dreieich, Deutschland
- TapeStation 2200, Agilent Technologies GmbH, Santa Clara, Kalifornien, USA
- Wide Mini-Sub Cell GT Cell, Bio-Rad Laboratories GmbH, Dreieich, Deutschland

Magnettracks

- 96R Ring Magnet Plate, Alpaqua Engineering, LLC, Beverly, Massachusetts, USA
- DynaMag™-2 Magnet, Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich, Deutschland

Nukleinsäure-Messgeräte

- NanoDrop™ ND-1000 Spektralphotometer, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, USA
- NanoDrop™ ND-8000 8-Kanal Spektralphotometer, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, USA
- Qubit® 2.0 Fluorometer, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
- Tecan GENios Pro Microplate Reader, Tecan Trading AG, Männedorf, Schweiz

Pipettierhilfen

- CellMate II, Matrix Technologies Corp., Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich, Deutschland
- eLINE® Electronic Pipette, Sartorius AG, Göttingen, Deutschland
- Eppendorf Research® plus (variabel), Eppendorf GmbH, Hamburg, Deutschland
- Transferpette® S-8, BRAND GmbH & Co. KG, Wertheim, Deutschland

Pipettierroboter

- Biomek®NX MC, Beckman Coulter GmbH, Krefeld, Deutschland
- Biomek®NX S8, Beckman Coulter GmbH, Krefeld, Deutschland

Reinstwasser-System

- Milli-Q A10 Synthesis, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland

Sequenzierplattformen

- 3130xl Genetic Analyzer, Life Technologies GmbH, Carlsbad, Kalifornien, USA
- cBot, Illumina® Inc., San Diego, Kalifornien, USA
- HiSeq 2500, Illumina® Inc., San Diego, Kalifornien, USA
- MiSeq, Illumina® Inc., San Diego, Kalifornien, USA

Schüttel- und Heizgeräte

- High-Speed microplate Shaker, Illumina® Inc., San Diego, Kalifornien, USA
- IKA™ MS 3 Digital Vortexer, IKA®-Werke GmbH & CO. KG, Staufen im Breisgau, Deutschland
- Magnetrührer, VELP Scientifica™, Usmate, Italien
- Mikrowelle MW 9625, Severin, Sundern, Deutschland
- Vortex Genie 2, Scientific Industries Inc., Bohemia, New York, USA

Thermozykler

- Vapo.protect Mastercycler pro, Eppendorf GmbH, Hamburg, Deutschland

Ultraschallgerät

- Bioruptor®, Diagenode, Liège, Belgien

Waage

- TE3132-DS, Sartorius AG, Göttingen, Deutschland

Zentrifugen

- Megafuge 1.0 R, Heraeus GmbH, Hanau, Deutschland
- Mikrozentrifuge MiniStar silverline, VWR International LLC, Radnor, Pennsylvania, USA

3.2 Plastik- und Einwegmaterial

- 8 Well PCR Tube Strip, 4titude® Ltd, Ockley, Vereinigtes Königreich
- Biomek AP96 P20 Pipette tips 20-100 µL, Beckman Coulter GmbH, Krefeld, Deutschland
- Biomek Reservoir, Beckman Coulter GmbH, Krefeld, Deutschland
- BrandTech™ BRAND™ BIO-CERT™ Filterspitzen (10 µL, 100µL, 1000 µL), BRAND GmbH & Co. KG, Wertheim, Deutschland
- DNA LoBind Tubes, 1,5 mL, PCR clean, Eppendorf GmbH, Hamburg, Deutschland
- FrameStar® 96 Well skirted/non-skirted PCR plate, 4titude® Ltd, Ockley, Vereinigtes Königreich
- FrameStar® 96 with Upstand PCR plate, 4titude® Ltd, Ockley, Vereinigtes Königreich
- Reaction Tubes (1,5 mL/2 mL), Greiner Bio-One International GmbH, Kremsmünster, Österreich
- Handschuhe Peha-Soft nitrile, Hartmann, Heidenheim, Deutschland
- Handschuhe MICRO-TOUCH® Nitra-Tex® EP™, Ansell, Richmond, Australien
- Konische Zentrifugenröhrchen, 15 mL/50 mL, Falcon™, Corning™ Inc., Corning, New York, USA
- Microplate Seal, 4titude® Ltd, Ockley, Vereinigtes Königreich
- PCR Seal, 4titude® Ltd, Ockley, Vereinigtes Königreich
- PCR Tubes (0,2 mL), 4titude® Ltd, Ockley, Vereinigtes Königreich
- Pipettenspitzen, 200 µL, Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland
- Serologische Einweg-Pipetten, 10/25 mL, Corning™ Inc., Corning, New York, USA
- Ultra Low Retention Pipettenspitzen, 0,5-20 µL, BRAND GmbH & Co. KG, Wertheim, Deutschland
- Ultratip Pipettenspitzen, 100–1000µL, Greiner Bio-One International GmbH, Kremsmünster, Österreich

3.3 Chemikalien, Puffer, Lösungen, Reagenzien und Enzyme

- Biozym LE Agarose, Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf, Deutschland
- Bromphenol Blau; (C₁₉H₁₀Br₄O₅S), Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, Missouri, USA
- Dimethylsulfoxid; DMSO (C₂H₆SO), Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, Missouri, USA
- dNTP-Mix (dATP,dGTP,dCTP,dTTP) 10 mM, Labomedic GmbH, Bonn, Deutschland
- Ethanol (EtOH) absolut; (C₂H₅OH), Th. Geyer GmbH & Co. KG., Renningen, Deutschland
- Ethidiumbromid; EtBr (C₂₁H₂₀N₃Br) 1 %, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
- EtOH 96 %, vergällt, WALTER CMP GmbH & Co. KG, Kiel, Deutschland
- Ficoll 400, GE Healthcare GmbH, Düsseldorf, Deutschland

- Ladepuffer: 10 mL 10X TBE, 10 mL 0,1 % Bromphenol Blau, 40 mL 20 % Ficoll, 40 mL H₂O bidest.
- Natriumhypochlorit (NaOCl) (12 %), Roth, Karlsruhe, Deutschland
- Natriumhypochlorit-Lösung 0,4 %: 16,7 mL NaOCl (12 %), 483,3 mL H₂O
- Taq DNA-Polymerase, VWR International LLC., Radnor, Pennsylvania, USA
- TBE Puffer 10X, AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
- Tris-BASE (NH₂C(CH₂OH)₃) (Trizma), Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, Missouri, USA
- Tris-Cl [10mM], pH 8,0: 0,6 g Tris-BASE, 500ml H₂O bidest.
- Tris-EDTA (TE-4): 0,1 mM EDTA, 10mM Tris-Cl pH 8,0
- Wasser; H₂O, Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, Missouri, USA

3.4 Kommerzielle Systeme (Kits)

- Agencourt AMPure XP, Beckman Coulter GmbH, Krefeld, Deutschland
- Agencourt CleanSEQ, Beckman Coulter GmbH, Krefeld, Deutschland
- 5X Big Dye Terminator Cycle Sequencing Kit 3.1, Life Technologies GmbH, Carlsbad, Kalifornien, USA
- Chemagic DNA Blood Kit special, PerkinElmer chemagen Technology GmbH, Rodgau, Deutschland
- DNA Längenstandard 100 bp, AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
- DNA Längenstandard 1 kb, AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
- HiSeq PE Cluster Kit v4 cBot, Illumina® Inc., San Diego, Kalifornien, USA
- HiSeq SBS Kit v4, Illumina® Inc., San Diego, Kalifornien, USA
- Infinium PsychArray-24 BeadChip, Illumina® Inc., San Diego, Kalifornien, USA
- SureSelect Human All Exon V5, Agilent Technologies, Santa Clara, Kalifornien, USA
- TapeStation D1000 Reagenzien, Agilent Technologies, Santa Clara, Kalifornien, USA
- TapeStation D1000 ScreenTapes, Agilent Technologies, Santa Clara, Kalifornien, USA
- TapeStation High Sensitivity D1000 Reagenzien, Agilent Technologies, Santa Clara, Kalifornien, USA
- TapeStation High Sensitivity D1000 ScreenTapes, Agilent Technologies, Santa Clara, Kalifornien, USA
- Quant-iT™ PicoGreen™ dsDNA Assay Kit, Thermo Fisher Scientific Inc., Dreieich, Deutschland
- Quant-iT™ dsDNA Assay Kit, Thermo Fisher Scientific Inc., Dreieich, Deutschland
- Qubit™ dsDNA BR/HS Assay Kit, Thermo Fisher Scientific Inc., Dreieich, Deutschland

3.5 Patienten, Kontrollkollektive und Familien

Im Folgenden werden die Kontroll- und Patientenkollektive sowie die mehrfach betroffenen Familien beschrieben, deren genetische Daten die Grundlage der vorliegenden Arbeit bilden.

3.5.1 Kollektive des BD GWAS-Datensatzes

Für die miRNA-basierten Analysen wurden die Daten von 9747 Patienten mit BD und 14278 gesunden Kontrollen verwendet, die von Mühleisen et al. (2014) publiziert und als Summenstatistiken bzw. Einzel-SNP-Teststatistiken zur Verfügung standen. Diese GWAS beruht auf den Datensätzen des *Systematic Investigation of the Molecular Causes of Major Mood Disorders and Schizophrenia* (MooDS) Konsortiums und der multinationalen *Psychiatric Genomics Consortium Bipolar Disorder Working Group* (PGC-BD) (Sklar et al., 2011). Die genaue Zusammenstellung der untersuchten Patienten und Kontrollkohorten sowie deren Diagnosen sind der folgenden Tabelle 1 zu entnehmen. Bei den MooDS-Datensätzen wurden nur die Kontrollen der Kohorte Deutschland III vollständig auf das Vorliegen neuropsychiatrischer Erkrankungen gescreent. Ebenso wurden rund 33 % der PGC-Kontrollen vor Einschluss in die Analyse gescreent (Tab. 1). Die Studie wurde von den zuständigen Ethikkommissionen genehmigt. Für alle untersuchten Patienten und Kontrollen wurde vor Beginn der Studie eine schriftliche Einwilligung eingeholt (Mühleisen et al., 2014).

Tab. 1 Phänotypische Daten der Patienten mit BD und Kontrollen nach QC

Kohorte	Herkunft	Pat. (N)	Kontr. (N)	BD I (N)	BD II (N)	SAB (N)	BD NOS (N)	Diagnose	Interview
<i>MooDS</i>									
Australien	europäisch	330	1811	254	74	1	1	DSM-IV	DIGS, FIGS, SCID
Deutschland III	deutsch	490	880	249	123	0	118	DSM-IV	AMDP, CID-S, SADS-L, SCID
Polen	polnisch	411	689	316	95	0	0	DSM-IV	SCID
Kanada	europäisch	285	341	198	82	5	0	DSM-IV, RDC	SADS-L
Russland	russisch	316	486	315	1	0	0	DSM-IV	SCID
Deutschland II	deutsch	181	527	176	5	0	0	DSM-IV	AMPD
Spanien	spanisch	253	294	241	12	0	0	DSM-IV	SADS-L
Summe		2266	5028	1749	392	6	119	-	-
<i>PGC</i>									
Primäre GWAS	europäisch, US- amerikanisch	7481	9250	6289	824	263	105	DSM-IIR, DSM-IV, RDC	DIGS, MINI, SADS, SADS-L, SCAN, SCID
Gesamt	-	9747	14278	8038	1216	269	224	-	-

Modifiziert nach Mühleisen et al., 2014. Abkürzungen: AMDP, *Association for Methodology and Documentation in Psychiatry*; BD I, bipolare Störung Typ I; BD II, bipolare Störung Typ II; BD NOS, nicht näher bestimmte bipolare Störung; CID-S, *Composite International Diagnostic Screener*; DIGS, *Diagnostic Interview for Genetic Studies*; DSM-IIR/DSM-IV, *Diagnostic Manual of Mental Disorders*; FIGS, *Family Interview for Genetic Studies*; Kontr., Kontrollen; N, Anzahl an Personen; Pat. Patienten; SAB, schizoaffective Störung (bipolarer Typ); SADS/SADS-L, *Schedule for Affective Disorders and Schizophrenia*; SCAN, *Schedules for Clinical Assessment in Neuropsychiatry*; SCID, *Structural Clinical Interview for DSM disorders*; QC, Qualitätskontrolle.

3.5.2 Kubanische Familien

Die Analyse der kubanischen Familien wurde im Kontext eines kubanisch-dänischen Projektes zur Erforschung der BD und SCZ durchgeführt, und durch die Ethikkommission des *National Center of Medical Genetics* in Havana (Kuba) genehmigt. Von allen Teilnehmern wurde vor Einschluss in die Studie eine schriftliche Einwilligung eingeholt (Maaser et al., 2018). Alle Probanden wurden im Südosten Kubas rekrutiert, 1997 einer ersten psychiatrischen Untersuchung und 2016 einer Folgeuntersuchung unterzogen. Jeder Proband wurde zu Hause von einem in der Forschung tätigen Psychiater in Zusammenarbeit mit einem in Kuba ansässigen Psychiater untersucht.

Basierend auf dem Strukturierten Klinischen Interview (SKID) für das *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders* (DSM-IV), den Informationen von anderen Familienmitgliedern und dem zuständigen Psychiater wurden Diagnosen nach bestmöglicher Einschätzung gestellt.

Die erste kubanische Familie, die im Folgenden Kuba I genannt wird, bestand aus 32 Individuen (59 % weiblich) und sechs Generationen. Von diesen erhielten 17 Personen eine DSM-IV Diagnose für eine psychiatrische Erkrankung. Für elf dieser Individuen stand eine DNA-Probe zur Verfügung. Deren Gesundheitsstatus ist nachfolgend zusammengefasst (Abb. 5 A): BD I (n = 3), BD II (n = 1), BD NOS (n = 1), Alkoholmissbrauch (n = 1) und gesund (keine aktuelle oder lebenslange psychiatrische Störung; n = 5). Vier Individuen mit einer BD Diagnose aus zwei Generationen wurden für die WES ausgewählt. Die zweite kubanische Familie, die im Folgenden Kuba II genannt wird, bestand aus 71 Individuen (46 % weiblich) und vier Generationen. Von diesen erhielten 32 Personen eine DSM-IV Diagnose für eine psychiatrische Erkrankung. Für 20 Individuen, deren Gesundheitsstatus nachfolgend zusammengefasst ist, stand eine DNA-Probe zur Verfügung (Abb. 5 B): BD I (n = 4), BD II (n = 9), MD (n = 1), Alkoholmissbrauch (n = 2) und gesund (keine aktuelle oder lebenslange psychiatrische Störung; n = 4). Für die nachfolgenden Analysen wurde Kuba II in die Teilfamilien 2, 3 und 4 gegliedert. Für die WES wurden elf Individuen mit einer BD Diagnose aus allen Teilfamilien und zwei Generationen ausgewählt. Zusammen wurden demnach 15 Individuen mittels der WES untersucht.

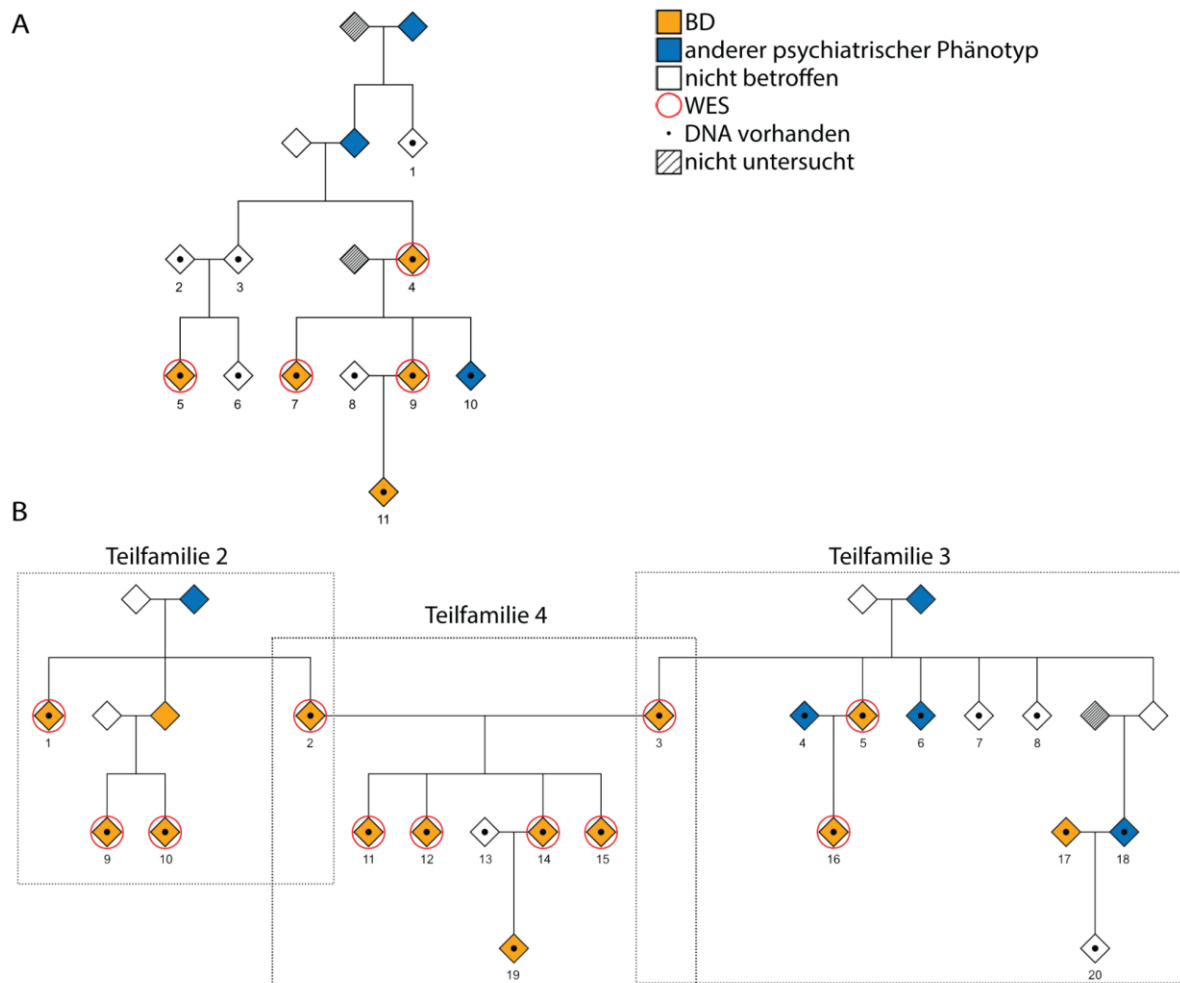


Abb. 5 Stammbäume der beiden untersuchten kubanischen Familien.

DNA war für alle nummerierten Individuen markiert mit einem zentralen Punkt vorhanden. Individuen, für die WES-Daten erhoben wurden, sind mit einem roten Kreis gekennzeichnet. Patienten mit der Diagnose BD I, BD II oder BD NOS sind orange und Patienten mit einer anderen psychiatrischen Diagnose, wie rezidivierende MD, einmalige MD oder Alkoholabusus, sind blau unterlegt. Nichtbetroffene Familienmitglieder sind farblich nicht gekennzeichnet und Personen, die nicht befragt wurden, sind grau schattiert. Um die Anonymität der Familien zu wahren, wurden keine Informationen zu den Geschlechtern dargestellt. **A)** Stammbaum von Kuba I und vier ausgewählten Individuen für die Exomsequenzierung. **B)** Stammbaum von Kuba II, der in die Teilfamilien 2, 3 und 4 aufgespalten wurde. Elf Individuen wurden für die WES ausgewählt. Die Abbildung wurde adaptiert aus Maaser et al. (2018). Abkürzungen: BD, bipolare Störung; WES, Exomsequenzierung; NOS, nicht näher bezeichnet.

3.6 Methoden

3.6.1 Übersicht der Studien

Eine Illustration zur Veranschaulichung des Studiendesigns und des Prozessablaufs ist in Abb. 6 zu finden.

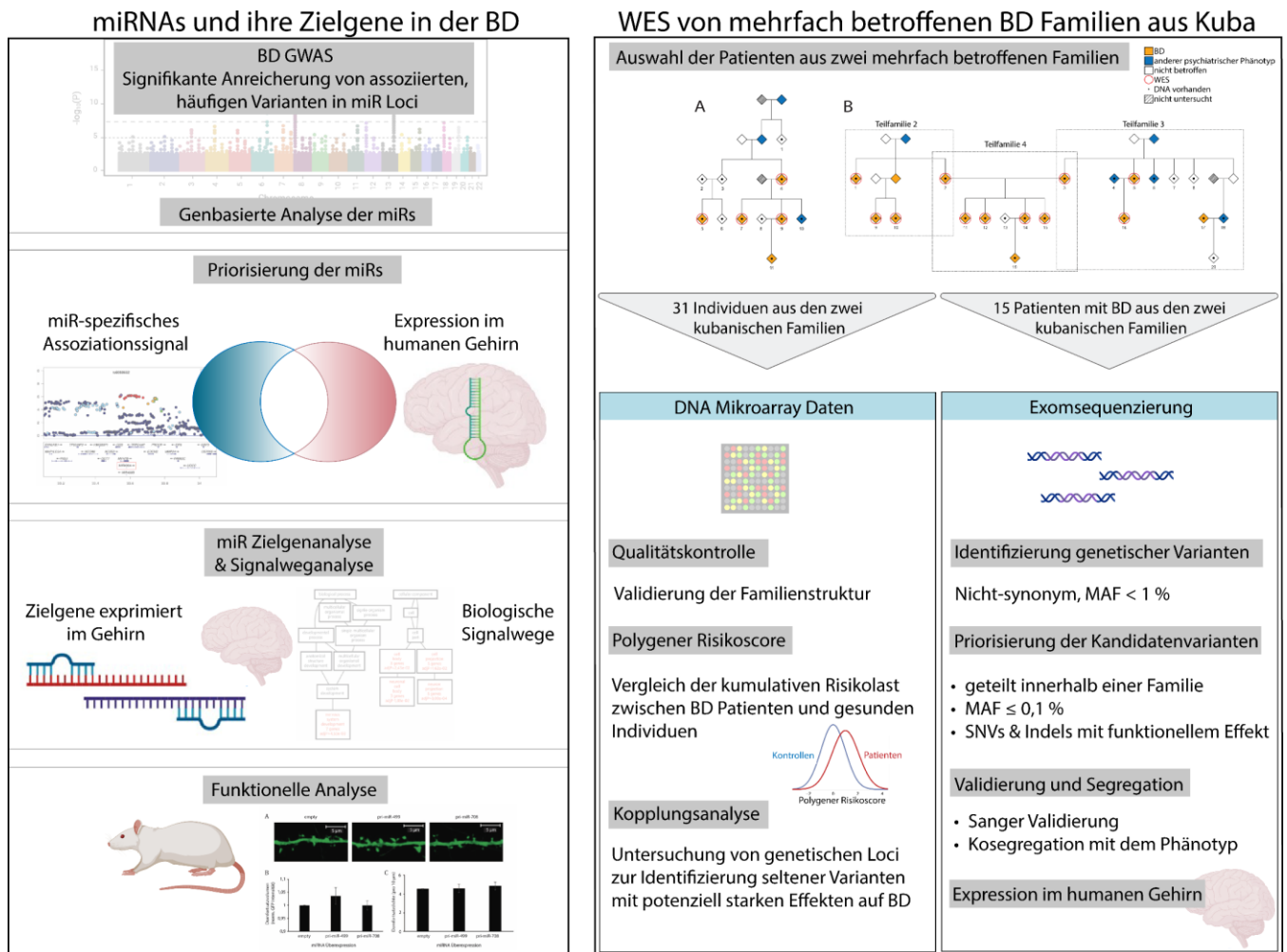


Abb. 6 Übersicht der beiden Studien und der entsprechenden Arbeitsabläufe.

Die methodische Übersicht der beiden hier vorgestellten Studien von Forstner et al. (2015) und Maaser et al. (2018). Abkürzungen: BD GWAS, Genomweite Assoziationsstudie für die bipolare Störung; DNA, Desoxyribonukleinsäure; MAF, minore Allelfrequenz; miRNAs, miRs, microRNA; SNV, Einzelnukleotidvariante; WES, Exomsequenzierung. Die Abbildung wurde mit Hilfe von BioRender.com erstellt und enthält modifizierte Darstellungen aus Forstner et al. (2015) und Maaser et al. (2018).

3.6.2 Genomweite Assoziationsanalyse von microRNAs

Die Summenstatistiken der BD GWAS von Mühleisen et al. (2014) bildeten die Basis für die nachfolgend beschriebenen Analysen zur genomweiten Untersuchung von miRNAs auf Assoziation mit BD, die in der Fachzeitschrift *Translational Psychiatry* mit *Peer-Review* im Jahr 2015 publiziert wurde (Forstner et al., 2015). Die genauen Methoden, die für die Erstellung der zugrundeliegenden Summenstatistiken verwendet wurden, sind in der entsprechenden Veröffentlichung nachzulesen (Mühleisen et al., 2014).

In einem Quantil-Quantil-Diagramm wurde die Quantil-Verteilung der beobachteten p -Werte der GWAS mit der korrespondierenden unter der Nullhypothese (H_0 , keine Assoziation) erwarteten Verteilung der p -Werte auf einer logarithmisch transformierten Skala verglichen. Zudem wurden die p -Werte für drei verschiedene SNP-Kategorien betrachtet, um das entsprechende statistische Signal jenen definierten Einheiten, basierend auf dem humanen Referenzgenom hg19 (GRCh37, *Genome Reference Consortium Human Build 37*), zuzuordnen: (i) SNPs lokalisiert in miRNA kodierenden Genen (ii) SNPs in proteinkodierenden Genen und (iii) SNPs in intergenischen Bereichen. Mit einem einseitigen Fisher's *exact* Test wurde die Signifikanz der Anreicherung von Assoziationssignalen für verschiedene p -Wert Schwellen von Dr. Andrea Hofmann berechnet. In diese Analyse wurden nur SNPs mit einem LD $r^2 < 0,8$ eingeschlossen.

Für die genomweite Assoziationsanalyse von miRNAs wurde der Locus-basierte Ansatz des *versatile gene-based test* (VEGAS, *versatile gene-based association study*) für GWAS von Dr. Andrea Hofmann adaptiert (J. Z. Liu et al., 2010). Dieser Test kombiniert die Einzel-SNP-Teststatistiken innerhalb des Locus in einer geeigneten zusammenfassenden Teststatistik und berechnet die zugehörige Signifikanz auf Basis von Simulationen. Für die vorliegende Arbeit wurden die Top-10 % assoziierten Einzel-SNP-Teststatistiken innerhalb der miRNAs und der ± 20 kb flankierenden Regionen summiert. Die chromosomalen Positionen aller miRNAs wurden von *miRBase release 13.0* ($n = 718$) bezogen (Kozomara & Griffiths-Jones, 2011, 2014). Diese Datenbank umfasst eine Sammlung von miRNAs und bietet Informationen über deren Funktion und ihre potenziellen Zielgene. Die Einzel-SNP-Teststatistiken der BD GWAS konnten so für $n = 609$ autosomale miRNAs und deren flankierenden Sequenz zugeordnet und ausgewertet werden.

Die berechneten Locus-basierten p -Werte wurden für multiples Testen, entsprechend der Anzahl der durchgeführten Tests, mit der Bonferroni-Methode korrigiert.

3.6.3 Regionale Assoziationsplots

Zudem wurden unter Verwendung der Summenstatistiken der BD GWAS die regionalen Assoziationsergebnisse der BD GWAS in Zusammenarbeit mit Dr. Andrea Hofmann und Prof. Andreas Forstner für alle assoziierten miRNAs und ihre ± 500 kb flankierenden

Regionen mit dem webbasierten Tool LocusZoom geplottet (Mühleisen et al., 2014; Pruim et al., 2011). Hierbei wird der negative dekadische Logarithmus der p -Werte gegen die chromosomale Position aufgetragen. Der Korrelationskoeffizient r^2 als Maß für das lokale Kopplungsungleichgewicht zum Index SNP (der SNP mit dem niedrigsten p -Wert innerhalb einer Region) wurde farblich kodiert und Rekombinationshotspots sowie Genloci annotiert. Eine visuelle Inspektion der regionalen Assoziationsergebnisse wurde durchgeführt, um zu bestimmen, ob das statistische Signal spezifisch für die jeweilige miRNA war. Das Assoziationssignal wurde als miRNA-assoziiert definiert, wenn der Index SNP der Region innerhalb des miRNA-Locus lag oder in moderatem bis hohem LD ($r^2 \geq 0,6$) mit dem miRNA-Locus stand.

3.6.4 *Follow-up Analyse der assoziierten miRNAs - Expression im Gehirn*

Daten einer zuvor veröffentlichten Studie, die Expressionsprofile von miRNAs im sich entwickelnden menschlichen Gehirn untersuchte, wurde von Dr. Andrea Hofmann herangezogen, um die Expression der assoziierten miRNAs im humanen Gehirn zu ermitteln (Ziats & Rennert, 2013). Als im humanen Gehirn exprimiert galt eine miRNA, wenn die Gesamtanzahl der *Reads* über alle untersuchten Proben hinweg > 120 war.

Durch eine Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Professor Gerhard Schratt wurde zusätzlich die Expression der assoziierten miRNAs in kortikalen Neuronen und dem Vorderhirn der Ratte untersucht. Hierfür wurde mit dem peqGOLD TriFast Reagenz Gesamt-RNA aus 15 Tage alten Vorderhirnen oder Synaptosomen der Ratte, wie beschrieben in Siegel et al. (2009) isoliert. Die Sequenzierung der RNA-Fragmente, der *RNA library*, wurde an der *Genomics Core Facility* des EMBL (*The European Molecular Biology Laboratory*) in Heidelberg auf einer Illumina HiSeq Plattform (Illumina, San Diego, USA) durchgeführt. Die Auswertung der Expressionsdaten wurde von den Kooperationspartnern mittels der webbasierten Software *MiRanalyzer* (bioinfo2.ugr.es/miRanalyzer/standalone.html) durchgeführt (Hackenberg et al., 2011) und die Daten wurden in Zusammenarbeit mit Dr. Andrea Hofmann und Prof. Andreas Forstner anschließend interpretiert.

Funktionelle Analyse der miR-499 und miR-708 in Rattenneuronen

Um Einblicke in die Rolle der *miR-499* und *miR-708* bei der Regulierung synaptischer Funktion zu erhalten, untersuchte die Arbeitsgruppe von Professor Schratt die Morphogenese dendritischer Dornfortsätze in primären Ratten Hippocampus-Neuronen unter Einfluss einer Überexpression der jeweiligen miRNA.

Mittels Dual-Luciferase-Reporter-Gen-Assay wurde die Effizienz der pri-miR Prozessierung in den Rattenneuronen untersucht, welche mit einer reduzierten Luciferase-Fluoreszenz korreliert. Nach Etablierung des miR-Überexpressionsvektors wurden hippocampale Neurone von Tag-18 Rattenembryonen (*Sprague-Dawley* Ratten,

Charles River Laboratories) transfiziert und nach sechs Tagen fixiert und mittels Konfokalmikroskopie in Hinblick auf die Morphogenese der dendritischen Dornfortsätze untersucht. Die angewendeten Methoden sind im veröffentlichten Artikel ausführlicher beschrieben (Forstner et al., 2015). Die Experimente wurden von den Kooperationspartnern vorgenommen und ausgewertet, und die Ergebnisse wurden in Zusammenarbeit mit Dr. Andrea Hofmann und Prof. Andreas Forstner interpretiert.

3.6.5 Untersuchung der miRNA Zielgene

Die Zielgene der assoziierten *miR-499*, *miR-708* und *miR-1908* wurden über die Datenbank *TargetScan* (release 6.2) bezogen. Deren Expression im humanen Gehirn wurde über einen Abgleich mit den Daten des *Allen human brain atlas* (<https://www.brain-map.org/>) ermittelt. Ein Zielgen wurde als im humanen Gehirn exprimiert definiert, wenn ein Expressionssignal in der Hippocampusformation in mindestens vier der sechs untersuchten Spendergehirne detektiert wurde. Für jedes der Zielgene wurde ein Locus-basierter *p*-Wert mit VEGAS (J. Z. Liu et al., 2010) unter Verwendung der Standardeinstellungen und des BD GWAS-Datensatzes von Mühleisen et al. (2014) von Dr. Andrea Hofmann berechnet.

Zur Berechnung einer potenziellen Anreicherung von BD-assoziierten Zielgenen wurden diese mit 100000 zufällig generierten Sets von im humanen Gehirn exprimierten Genen verglichen. Jedes dieser Sets beinhaltete dieselbe Anzahl Gene wie Zielgene der jeweiligen miRNA.

3.6.6 Signalweg-Analyse der miRNA-Zielgene

Die folgende Analyse konzentrierte sich auf die im humanen Gehirn exprimierten Zielgene der *miR-499*, *miR-708* und *miR-1908*, die einen genbasierten *p*-Wert von $\leq 0,05$ für Assoziation mit BD aufwiesen. Lagen Zielgene in weniger als 100 kb Abstand zueinander oder Top-SNPs zweier Zielgene in moderatem bis starkem LD ($D' \geq 0,4$) vor, wurde das Gen mit dem niedrigeren genbasierten *p*-Wert in die Analyse eingeschlossen, um eine Unabhängigkeit der Signale zu gewährleisten.

Die in Tab. 16 aufgelisteten 107 Zielgene waren in der Signalweg-Analyse inbegriffen. Zur Testung auf Anreicherung der priorisierten Zielgene in bestimmten Gen-Sets, wurden die *Gene ontology* (GO) und *Kyoto Encyclopaedia of Genes and Genomes* (KEGG) Datenbanken mit der webbasierten Software WebGestalt (*Web-based Gene Set Analysis Toolkit*) untersucht. Mit der Bonferroni Methode wurde eine Korrektur für multiples Testen vorgenommen. Die signifikanten biologischen Signalwege wurden zudem gefiltert und enthielten dann mindestens drei Gene pro Gen-Set bzw. Kategorie.

3.6.7 Allgemeine molekularbiologische Methoden

DNA-Isolation

Die molekulargenetischen Untersuchungen der kubanischen Probanden wurden mit bereits isolierter DNA durchgeführt. Das Ausgangsmaterial für die Isolation der DNA waren kernhaltige Leukozyten aus Vollblut der Probanden. Der Isolierungsvorgang der DNA erfolgte unter anderem automatisiert mit Hilfe des Chemagen Magnetic Separation Moduls 1 (PerkinElmer Chemagen Technologie GmbH, Deutschland) nach Herstellerprotokoll oder durch Aussalzen in gesättigter Natriumchloridlösung (Miller et al., 1988). Anschließend wurde die DNA in TE⁻⁴ Puffer eluiert und dauerhaft bei -80 °C gelagert.

DNA-Verwaltung

Aus den DNA-Stocklösungen aller untersuchten kubanischen Individuen wurden zwei Arbeitslösungen hergestellt. Durch Zugabe von TE⁻⁴ wurde zunächst eine 100 ng/μL Verdünnung hergestellt. Anschließend wurde aus dieser eine zweite Verdünnung in H₂O bidest. mit einer Konzentration von 20 ng/μL hergestellt. Das 100 ng/μL Aliquot wurde bei -20 °C gelagert. Die 20 ng/μL Verdünnungen lagerten bei 4 °C. Diese Verdünnungen dienten als Ausgangsmaterial für die molekulargenetischen Analysen, inklusive der Genotypisierung der kubanischen Individuen und der Sequenzierungen mittels Sanger und NGS, die in dieser Arbeit durchgeführt wurden. Alle Verdünnungen wurden mit dem 2D-Barcode-System FluidX oder dem ABgene-System verwaltet.

Konzentrations- und Qualitätsbestimmung von DNA

Das NanoDrop ND-1000 Spektralphotometer bzw. NanoDrop ND-8000 8-Kanal Spektralphotometer wurde zur Ermittlung der DNA-Konzentration im Rahmen der Erstellung einer Arbeitslösung, der Sequenzierung nach Sanger oder der Genotypisierung verwendet. Die Messung wurde unter Einsatz von ~1,5 μL DNA-Lösung durchgeführt. Die Konzentrationsbestimmung beruht auf den spezifischen Absorptionseigenschaften der Basen der DNA, deren Absorptionsmaximum bei 260 nm liegt. Mit der gemessenen optischen Dichte (OD) bei 260 nm und dem spezifischen Extinktionskoeffizienten (50 μg/mL) wird über Anwendung des Lambert-Beer'schen Gesetzes die DNA-Konzentration bestimmt. Durch eine entsprechende Software wurden die Berechnungen automatisch durchgeführt. Zusätzlich wurden Messungen bei 280 nm und 230 nm durchgeführt, deren Ergebnisse Hinweise auf potenzielle Kontamination mit Proteinen bzw. Verunreinigungen durch Salze und organische Verbindungen geben können. Zur genaueren Konzentrationsbestimmung von doppelsträngiger DNA (dsDNA) wurde ein sensitiveres Messverfahren verwendet. Es beruht auf einem Fluoreszenzfarbstoff, der

spezifisch an dsDNA bindet. Für die Messung wurden 1 oder 2 μL DNA-Probe verwendet und mit einer 1:200 verdünnten Reagenzlösung nach Herstellerangaben versetzt. Nach einer Inkubationszeit von 2-10 min wurde die Messung durchgeführt. Dabei wurde entweder das Qubit® 2.0 Fluorometer für die Messung einzelner Proben mit dem Qubit™ Kit verwendet oder der Tecan GENios Pro *Microplate Reader* für Messungen im Hochdurchsatzverfahren im 96-*well* Plattenformat mit dem Quant-iT™ dsDNA Assay Kit oder Quant-iT™ PicoGreen™ dsDNA Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, MA, USA). Diese Methode erlaubt es sowohl die Konzentration der Ausgangslösung präzise zu bestimmen als auch die Qualität der entsprechenden Probenverdünnung abzuschätzen. Zum Einsatz kam ein Filtersatz für eine Anregung bei 485 nm und Detektion der Emission bei 535 nm. Mit Emissionswerten definierter DNA-Standardlösungen wurde durch Zuhilfenahme der Geradengleichung die jeweilige Konzentration von dsDNA in der Probe relativ zu den Standardlösungen bekannter Konzentration ermittelt. Das Qubit® Fluorometer führte diese Berechnung automatisiert durch. Die Konzentrationen aller DNA-Proben für die nachfolgende WES wurden auf diese Weise in Doppelbestimmung ermittelt.

Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR, *polymerase chain reaction*) ist eine Standardmethode zur exponentiellen *in vitro* Vervielfältigung spezifischer genomischer Regionen (Mullis und Faloona 1987). Die PCR basiert auf den folgenden sich wiederholenden Zyklen:

- Denaturierung der dsDNA,
- Hybridisierung sequenzspezifischer Primer (For, *forward* und Rev, *reverse*) an die DNA-Einzelstränge (*Annealing*),
- Verlängerung der Primer mit Desoxynukleosidtriphosphaten (dNTPs) durch eine thermostabile DNA-Polymerase (Elongation).

Notwendig für die spezifische Amplifikation ist, dass die Basensequenz der flankierenden DNA-Abschnitte um die Zielsequenz bekannt ist. Das Design der sequenzspezifischen Primer (18-25 nt) wurde mit Hilfe von *in silico Tools*, wie dem OligoEvaluator™ (<http://www.oligoevaluator.com/OligoEvaluator>) oder dem OligoAnalyzer 3.1 (<https://eu.idtdna.com/calc/analyzer>) durchgeführt. Eine Auflistung der in dieser Arbeit verwendeten Primersequenzen befindet sich in Tab. 18 im Appendix.

Als Ausgangsmaterial für die PCR, auch *Template* genannt, diente in der Regel genomische DNA (gDNA). Ein Standardreaktionsansatz für die PCR ist in (Tab. 2) dargestellt, welche nach dem in Tab. 3 vermerkten Temperaturprotokoll in einem Thermozykler durchgeführt wurde. In Abhängigkeit von der Sequenz der Primer, der Länge der Zielsequenz und dem experimentellen Ziel wurden das Temperaturprofil und die Anzahl der Zyklen angepasst. Verwendet wurde standardmäßig die VWR® *Taq* DNA-Polymerase

(VWR, Darmstadt) eine thermostabile Polymerase isoliert aus dem Organismus *Thermus aquaticus*.

Tab. 2 Reaktionsansatz für die Standard-PCR

	Volumen pro Reaktion [μL]
H ₂ O bidest.	18,8
Puffer 10X (mit 15 mM MgCl ₂)	2,5
For Primer (10 μM)	1,0
Rev Primer (10 μM)	1,0
dNTPs (10 mM pro dNTP)	0,5
Template DNA (20 ng/ μL)	1,0
Taq DNA-Polymerase (5 U/ μL)	0,2
Gesamtvolumen	25

Abkürzungen: H₂O bidest., bidestilliertes Wasser; For, *forward*; Rev, *reverse*; dNTP, Desoxynukleosidtriphosphat; Taq, *Thermus aquaticus*; U, *unit*.

Tab. 3 Standard-PCR Programm

Reaktionsphase	Zeit	Temperatur	Zyklen
Initiale Denaturierung	5 min	95 °C	
Denaturierung	1 min	95 °C	25-30X
Annealing	30 s	58 °C – 63 °C	
Elongation	1 min/kb	72 °C	
Finale Elongation	5 min	72 °C	

Abkürzung: kb, Kilobasenpaar.

Gelelektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten

Die Gelelektrophorese ist eine molekularbiologische Methode, die es ermöglicht DNA-Fragmente ihrer Größe entsprechend aufzutrennen. Die DNA besitzt aufgrund ihrer Phosphatgruppen bei neutralem pH-Wert insgesamt eine negative Ladung (Watson & Crick, 2016). Bei Anlegen einer Spannung an die Matrix, bestehend aus Polysaccharid Agarose, wandern die DNA-Moleküle dank dieser physikalischen Eigenschaft zur Anode. Dabei ist die Wanderungsgeschwindigkeit abhängig von der angelegten Spannung sowie der Konzentration der Agarose und verhält sich antiproportional zu der Größe der DNA-Fragmente. Durch Zugabe des in die DNA interkalierenden Ethidiumbromid (EtBr) ist es möglich über Belichtung mit UV-Strahlung eine detektierbare Lichtemission zu erzeugen (Le Pecq & Paoletti, 1966). Die Größe der Fragmente kann über einen Vergleich mit einem geeigneten Längenstandard geschätzt werden (1 kb oder 100 bp DNA-Leiter). Für ein 0,8-2 % (m/V) Agarosegel wurden entsprechende Mengen Agarose in 80 mL TBE-Puffer (1X) bis zur vollständigen Lösung aufgekocht. Anschließend wurde die Lösung unter ständigem Rühren bis auf 50 °C abgekühlt und 6 μL 1 %-ige EtBr-Lösung zugesetzt. Die Lösung wurde in einen Gelträger überführt, in den zuvor geeignete Kämme eingesetzt wurden. Nach vollständigem Erhitzen wurden die Kämme entfernt und das Gel in eine Gelelektrophoresekammer (Bio-Rad, Hercules, USA) mit 1X TBE überführt. Die aufzutrennende DNA-Probe wurde im Verhältnis 1:1 mit 2X Laufpuffer versetzt und in die Geltasche transferiert. Die Elektrophorese wurde durch Anlegen einer Spannung von

80-120 V für 30-45 min durchgeführt. Die Belichtung erfolgte im Anschluss mittels eines UV-Dokumentationsgerätes, dem Gel Doc XR-Systems (Bio-Rad, Hercules, USA).

Diese Methode ermöglicht es die Effizienz einer PCR und die Qualität von gDNA abzuschätzen. Letzteres war Bestandteil der Qualitätskontrolle (QC) von DNA-Proben, welche mittels WES untersucht wurden.

Sequenzierung von DNA-Fragmenten mit der Methode nach Sanger

Eine Sequenzierung dient der Bestimmung der Basenabfolge eines DNA-Moleküls. Die PCR-basierte Sequenzierreaktion beruht auf dem Kettenabbruchverfahren von Sanger (Sanger et al., 1977) und gilt heute noch als relevante Methode, insbesondere für die Validierung genetischer Varianten.

Das PCR-Produkt diente als *Template* und wurde zunächst mit dem Agencourt® AMPure® XP-Kit (Beckman Coulter, CA, USA), basierend auf der *Solid Phase Reversible Immobilization* SPRI® Technologie, mit magnetischen *beads* aufgereinigt (Deangelis et al., 1995) um hochreine DNA, ohne Salze oder andere unerwünschte Produkte, zu erhalten. Im Reaktionsmix der Sequenzier-PCR (Tab. 4) sind neben dNTPs auch ddNTPs (Didesoxynukleosidtriphosphate) enthalten, denen die 3'-Hydroxylgruppe fehlt, was die Verknüpfung an die Phosphatgruppe eines Folgenukleotids verhindert. Die vier ddNTPs enthalten unterschiedliche Fluoreszenzmarkierungen, was eine eindeutige Identifizierung der zuletzt eingebauten Base ermöglicht. Die Sequenzier-PCR wurde mit der unten beschriebenen Programmierung des Thermozyklers durchgeführt (Tab. 5). Das Produkt der Sequenzier-PCR wurde mittels dem Agencourt® CleanSEQ®-Kit nach den Empfehlungen des Herstellers aufgereinigt und anschließend mit dem Kapillar-Sequenziergerät 3130x/ Genetic Analyzer (Thermo Fisher Scientific, MA, USA) sequenziert. Die resultierenden Elektropherogramme im *.ab1 Format wurden mit Hilfe der SeqMan II Software ausgewertet.

Tab. 4 Reaktionsansatz für die Sequenzier-PCR

	Volumen pro Reaktion [µL]
H ₂ O bidest.	13,75
5X Sequencing Buffer	3,75
BigDye® Terminator v3.1 Ready Reaction Mix	0,5
For oder Rev Primer (3,2 µM)	1,0
Template	1,0
Gesamtvolumen	20,0

Abkürzungen: H₂O bidest., bidestilliertes Wasser; For, *forward*; Rev, *reverse*.

Tab. 5 Temperaturprogramm für die Sequenzier-PCR

Reaktionsphase	Zeit	Temperatur	Zyklen
Initiale Denaturierung	1 min	96 °C	
Denaturierung	10 s	96 °C	
Annealing	5 s	50 °C	24X
Elongation	2 min	60 °C	

3.6.8 Genotypisierung mittels DNA-Mikroarray

Die Genotypisierung mittels DNA-Mikroarray ist eine hochdurchsatzbasierte Methode zur Analyse genetischer Varianten im gesamten Genom (Verlouw et al., 2021). Der *Infinium PsychArray BeadChip* (*PsychChip*, Illumina, San Diego, USA) ist speziell für die Untersuchung genetischer Varianten entwickelt worden, die mit psychiatrischen Erkrankungen assoziiert sind. Neben 271000 *tag*-SNPs, sowie 277000 Markern des *Infinium Exome-24 BeadChip*, beinhaltet er zusätzlich rund 50000 Marker in ausgewählten Regionen des Genoms, die eine Assoziation mit psychiatrischen Erkrankungen aufweisen (abgerufen am 2. Februar 2025, von https://emea.illumina.com/library-prep-array-kit-selector/kits-and-arrays/psycharray_24-sample.html).

Die genomweiten DNA-Mikroarray Daten wurden unter Verwendung der entsprechenden Herstellerangaben von der Life & Brain GmbH generiert.

Hierfür wurde mit H₂O bidest. eine 50 ng/μL Verdünnung der DNA-Proben für die kubanischen Individuen, die in dieser Arbeit untersucht wurden, hergestellt. Die DNA wurde enzymatisch fragmentiert und anschließend auf dem *BeadChip* hybridisiert. Dieser enthält Oligonukleotid-Sonden, die spezifisch für Zielsequenzen im Genom sind. Jede Sonde ist auf einem 3 μm großen Kügelchen (*Bead*) verankert, die auf dem *BeadChip* in definierten Positionen immobilisiert sind. Nach der Hybridisierung wird die an die Sonden gebundene DNA verlängert, indem eine Base hinzugefügt wird, die komplementär zur Ziel-DNA ist und einen fluoreszierenden Farbstoff trägt. Der *BeadChip* wird in einen Hochdurchsatz-Scanner ausgelesen, der die Fluoreszenz Signale der markierten Basen detektiert (abgerufen am 2. Februar 2025, von <https://www.illumina.com/science/technology/microarray.html>). Die Analyse der Genotypdaten wurde mit der Illumina Software GenomeStudio v2011.1 durchgeführt. Die Qualitätskontrolle, durchgeführt von Dr. Julian Hecker erfolgte mittels PLINK (<http://zzz.bwh.harvard.edu/plink/download.shtml>) (Purcell et al., 2007) zusammen mit über 13000 weiteren Proben anderer Projekte gemäß der Standardprotokolle des PGC: SNP Genotypisierungsrate > 95 %, Genotypisierungsrate pro Individuum ≥ 98 %, Homozygotitätsrate < 0,2, Entfernen aller invarianten sowie monomorphen SNPs und Ausschluss aller SNPs bei Abweichung vom Hardy-Weinberg-Gleichgewicht mit $p\text{-Wert} \leq 10^{-10}$. Die Imputation wurde mit IMPUTE2 (Howe et al., 2011; Howe et al., 2009) auf Basis der 1.000 *Genomes Project phase 3* Referenz (Auton et al., 2015; Sudmant et al., 2015) und den Standardeinstellungen berechnet. Für die folgenden Analysen wurde die Wahrscheinlichkeitsverteilung über die drei möglichen Genotypen pro Individuum und Variante durch den wahrscheinlichsten Genotyp ersetzt (*best-guess* Genotyp). Bei einer Wahrscheinlichkeit < 90 % wurde der Genotyp an dieser Stelle als fehlend deklariert.

3.6.9 Schätzung der Verwandtschaftsstruktur in den kubanischen Familien

Basierend auf den genomweiten DNA-Mikroarray Daten der beiden kubanischen Familien wurden mithilfe von PLINK 1.9 (<https://www.cog-genomics.org/plink2>) die Verwandtschaftsbeziehungen zwischen allen Paaren von Individuen geschätzt (Chang et al., 2015).

Dafür wurde zunächst eine QC der DNA-Mikroarray Daten unter Verwendung von PLINK 1.9 durchgeführt. Die Filterkriterien erforderten eine Genotypisierungsrate pro SNP von $\geq 95\%$ und eine MAF $\geq 5\%$. Nach zusätzlicher Filterung für Kopplungsungleichgewicht (LD, *linkage disequilibrium*) mit einer Fenstergröße von 500 kb und einer r^2 Schwelle von 0,01, ergab sich eine resultierende Teilmenge auf 9690 SNPs. Auf Basis dieser SNPs wurden die IBD-Proportionen $\hat{\pi} = p(k=2) + 0.5 \times p(k=1)$ zwischen allen Individuen geschätzt und zur Überprüfung der Verwandtschaftsverhältnisse und zum Ausschluss möglicher Probenvertauschung herangezogen.

3.6.10 Polygener Risikoscore in den kubanischen Familien

Anhand des genetischen Risikoprofils ist es möglich eine Stratifikation von Patienten und Kontrollen zu erzielen. Unter Verwendung des sogenannten polygenen Risikoscores (PRS, *polygenic risk score*) lässt sich die polygene Architektur der BD als einzelne Variable erfassen. Die PRS wurden von Dr. Till F. M. Andlauer basierend auf den DNA-Mikroarray Daten für alle direkten Familienmitglieder der kubanischen Familien generiert.

Zunächst wurden in einer unabhängigen GWAS assoziierte Varianten sowie deren Risikoallele und Effektstärken ermittelt. Hierfür wurde die zu der Zeit größte GWAS für BD verwendet, welche 20352 Patienten und 31358 Kontrollen umfasst (Stahl et al., 2018, 2019). Der PRS berechnet sich dann als die mit den Effektstärken gewichtete Anzahl der Risikoallele eines Individuums und erfasst auf diese Weise den Effekt genomweiter Risikovarianten kumulativ.

Basierend auf den *best-guess* Genotypdaten wurde ein Set mit nur einem repräsentativen SNP pro LD-Region mittels PLINK generiert. Die PRS und Inferenz wurden im Anschluss mit R v3.3, basierend auf dem jeweiligen Allel mit positiver Effektrichtung und unter Berücksichtigung der Familienstruktur, berechnet. Die kumulative Risikolast wurde für zehn verschiedene p -Wert Schwellen ermittelt: $< 5 \times 10^{-8}$, $< 1 \times 10^{-7}$, $< 1 \times 10^{-6}$, $< 1 \times 10^{-5}$, $< 1 \times 10^{-4}$, $< 0,001$, $< 0,01$, $< 0,05$, $< 0,1$, und $< 0,2$. Die PRS wurden so skaliert, dass die kleinstmögliche Risikolast = 0 und die größtmögliche Risikolast = 1 entspricht. Die Berechnung der PRS und der Inferenz wurden unter Berücksichtigung der Familienstruktur mit R v3.3 durchgeführt (R Development Core Team. *R: A Language and Environment for Statistical Computing*. 2017).

3.6.11 Exomsequenzierung der kubanischen Familien

Zur Identifizierung seltener genetischer Varianten in zwei mehrfach betroffenen kubanischen Familien wurde das Exom ausgewählter betroffener Individuen sequenziert, um alle Varianten im kodierenden Bereich des Genoms zu erfassen

Vor allem bei monogenetischen Erkrankungen findet die WES Anwendung und ermöglicht drüber hinaus die Identifizierung von potenziellen genetischen Risikovarianten für komplexe Erkrankungen (Rabbani et al., 2014). Zudem ist die Interpretation von genetischen Varianten, die die Aminosäureabfolge von Proteinen verändern, im Allgemeinen einfacher durch funktionelle Analysen zu untersuchen. Aus diesem Grund fokussiert sich die vorliegende Arbeit auf nicht-synonyme genetische Varianten, die die Funktion der implizierten Gene potenziell modulieren bzw. beeinträchtigen. Für die WES wurden insgesamt 15 Individuen von zwei mehrfach betroffenen kubanischen Familien untersucht (Abb. 5).

Bestimmung des Degradationszustandes hochmolekularer genomischer DNA

Die Qualität und der Degradationszustand der gDNA wurde auf einem 0,8 % Agarosegel (Kapitel 3.6.7) überprüft. Hierfür wurden je 100 ng gDNA bei 80 V für 45 min gelelektrophoretisch aufgetrennt und anschließend mittels UV-Dokumentationsgerätes detektiert.

Fragmentierung genomischer DNA

In 0,5 mL Bioruptor® *Microtubes* wurden mindestens 3,5 µg gDNA mit EB Puffer auf 30 ng/µL verdünnt. Mit dem Bioruptor®, wurde mittels Ultraschalltechnologie gDNA in zufällige Fragmente mit einer mittleren Größe von 150-200 bp geschert. Bis zum Start des ersten Ultraschallzyklus wurden die Proben auf Eis gekühlt und dann in der Rotorhalterung in das 4 °C kalte Ultraschallbad gegeben. Eingestellt wurden 2 x 16 Zyklen mit je 30 s Ultraschall und 30 s Pause. Nach Beendigung des ersten Zyklus wurden die Proben mit einer Mikrospin-Zentrifuge zentrifugiert und bis zum zweiten Zyklus auf Eis gelagert. Die resultierende Fragmentgröße wurde mit dem automatisierten Elektrophorese 2200 TapeStation System überprüft.

Automatisierte Gelelektrophorese

Das 2200 TapeStation System von Agilent ermöglicht eine schnelle und automatisierte Gelelektrophorese. Durch Verwendung des D1000 *ScreenTape Assay* oder des *High Sensitivity D1000 ScreenTape Assay* (Sensitivität 0,1 ng/µL bzw. 5 pg/µL) nach Herstellerangaben wurden die Fragmentgröße und die Konzentration der untersuchten Probe bestimmt. Die Auswertung erfolgte mittels 2200 TapeStation *Controller Software* und Agilent TapeStation *Analysis Software*.

Herstellung der DNA-Bibliothek für die WES

Die SureSelectXT Human All Exon V5 Zielbibliothek von Agilent Technologies wurde zur Generierung der DNA-Bibliothek eingesetzt und nach Herstellerangaben verwendet. In diesem Schritt werden die Zielregionen angereichert, die außerdem spezifische Adaptersequenzen erhalten um sie über Hybridisierung an kovalent gebundene komplementäre Oligos an einer Fließzelle (*Flowcell*) zu binden.

Bridge-amplification auf dem cBot

Ausgehend von den über Adapter gebundenen Startmolekülen werden durch eine Festphasen-PCR innerhalb der *Flowcell* sogenannte Cluster aus identischen Molekülen generiert (*Bridge-amplification*). Durch diese Clustervermehrung wird eine Signalverstärkung durch Vergrößerung der Fläche erzielt. Eine maximale Datenausbeute wird durch eine optimale Clusterdichte erreicht, welche über die Auflösungsgrenze der Detektoren limitiert ist. Die Clustervermehrung der DNA-Bibliothek bei der WES wurde im Standardverfahren und nach Herstellerangaben auf dem cBot durchgeführt (PE_HiSeq_Cluster_Kit_v4_cBot_recipe_v9.0).

Sequenzierung auf dem HiSeq2500

Die WES wurde auf dem Illumina HiSeq2500 v4-System (San Diego, USA) mit 2 x 125 bp Leselänge im *sequencing by synthesis* (SBS) und *paired-end* Verfahren durchgeführt. Die SBS-Technologie beruht auf einem zyklischen Prozess der reversible Terminatorchemie und fluoreszenzmarkierte Nukleotide verwendet. In jedem Sequenzierzyklus wird ein Nukleotid komplementär zu der *Template* DNA eingebaut. Folgend wird nach Anregung mit Licht das Nukleotid-spezifische emittierte Fluoreszenzsignal detektiert. Durch das Entfernen der Terminatorgruppe kann im nächsten Zyklus ein weiteres Nukleotid eingebaut werden (für eine Übersicht siehe Metzker (2010)).

Die Sequenzdaten wurden im Anschluss an das *Cologne Center for Genomics* (CCG) transferiert, wo diese mit der *Varbank-Pipeline* prozessiert wurden und über einen gesicherten Zugang für die weitere Auswertung zur Verfügung standen.

3.6.12 Analyse der WES-Daten mit der Varbank

Für die Analyse der Sequenzdaten wurde die Varbank-Software des CCG verwendet (<https://varbank.ccg.uni-koeln.de>). Diese Prozessierungs-*Pipeline* bietet eine benutzerfreundliche Oberfläche und enthält eine Reihe von Standardfiltern, zudem ermöglicht sie eine basale Annotation. Das *Genome Analysis Toolkit* (GATK), und das empfohlene GATK-Standardverfahren wurden angewendet. Das Studiendesign ist auf die Identifizierung seltener und potenziell hochpenetranter genetischer Varianten ausgelegt und daher wurde für heterozygote Varianten mit einer Allelfrequenz von 25-75 %,

bezogen auf das Referenzallel, gefiltert. Die Mindestabdeckung betrug 10X und die Mindestqualität der Variante war > 10 . Um bekannte und Pipeline-spezifische Artefakte auszuschließen, wurden die Standardeinstellungen des Varbank-eigenen Datenbankfilters (basierend auf Daten von Epilepsiepatienten, $n = 511$; und gemischten Patienten- und Kontrollkohorten, $n = 611$) angewendet. Fokus dieser Analyse waren diejenigen genetischen Varianten, die von allen untersuchten Patienten innerhalb einer Familie geteilt wurden.

3.6.13 Annotation genetische Varianten

Die genetischen Varianten wurden gefiltert nach $MAF \leq 0,1 \%$. Als Referenz diente hierfür die Exomdatensammlung des *Exome Aggregation Consortium* (ExAC). ExAC ist ein Zusammenschluss führender Arbeitsgruppen, mit dem Ziel der Wissenschaftswelt WES und WGS-Daten von 60706 unverwandter Individuen zur Verfügung zu stellen. Diese Sammlung umfasst Kollektive, die im Rahmen unterschiedlicher krankheitsspezifischer oder populationsgenetischer Studien erhoben wurden. Durch eine zentrale Harmonisierung der Rohdaten bietet die Plattform eine qualitativ hochwertige und umfangreiche Referenz für zukünftige Studien und bildet eine Basis für Fortschritt in der Forschung und klinischen Genetik (Lek et al., 2016).

Für die Annotation der genetischen Varianten, die in den kubanischen Familien identifiziert wurden, wurde der gesamte ExAC Datensatz (<http://exac.broadinstitute.org>, Version 0.3, 2015) verwendet. Die Abfrage der Allelfrequenzen im Hochdurchsatzverfahren wurde mittels Algorithmus durchgeführt.

Die Analyse der Sequenzdaten konzentrierte sich auf nicht-synonyme Einzelnukleotidvarianten (SNVs, *single nucleotide variants*) sowie kleine Insertionen und Deletionen (InDels), die einen Einfluss auf die primäre Proteinstruktur oder einen starken Spleißstelleneffekt haben. Etablierte und standardmäßig verwendete Algorithmen zur Bewertung der Pathogenität einer genetischen Variante sind SIFT (*sorting tolerant from intolerant*), Provean (*protein variation effect analyzer*), PolyPhen-2 (*Polymorphism Phenotyping v2*), MutationTaster und LRT (*likelihood ratio test*) (Adzhubei et al., 2010; Choi & Chan, 2015; Chun & Fay, 2009; P. Kumar et al., 2009; Schwarz et al., 2014). Die Ergebnisse dieser Algorithmen wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit über dbNSFP v2.8 (dbNSFP, *database of human nonsynonymous SNPs and their functional predictions*), einer Datenbank zur Annotation von nicht-synonymen genetischen Varianten, bezogen (X. Liu et al., 2011, 2013). Ausschließlich Varianten, die von mindestens vier der fünf Algorithmen als potenziell funktionell eingestuft wurden, wurden in die nachfolgenden Analysen einbezogen. Die Prädiktion für InDels wurden mit den Algorithmen MutationTaster und SIFT/Provean (Choi & Chan, 2015; Schwarz et al., 2014) ermittelt. Eingeschlossen wurden InDels, die von mindestens einem der drei Programme als potenziell funktionell eingestuft wurden.

3.6.14 Validierung genetischer Varianten mittels Sanger

Ausgewählte Kandidatenvarianten, also diejenigen seltenen genetischen Varianten, die von allen untersuchten Mitgliedern einer Familie geteilt wurden und als potenziell funktionell eingeschätzt wurden, wurden mittels Sanger-Sequenzierung (siehe Seite 39) verifiziert. In den kubanischen Familien wurde der Genotyp für die identifizierten Varianten in allen Individuen mit verfügbarer DNA ermittelt, um die Kosegregation der Variante mit dem Phänotyp zu erfassen und um mögliche populationsspezifische Effekte abschätzen zu können. Die hierfür verwendeten Primersequenzen sind im Appendix aufgelistet (Tab. 18).

3.6.15 Expression der Kandidatengene im humanen Gehirn (kubanische Familien)

Um festzustellen, ob die 17 identifizierten Kandidatengene im menschlichen Gehirn exprimiert werden, wurden die normalisierten RNA-Sequenzierungsdaten des *Genotype-Tissue Expression (GTEx) Project* Portal (<http://www.gtexportal.org/>, 05.11.2017, GTEx dbGaP Version V6p) genutzt. Diese Normalisierungsmethode berücksichtigt die Transkriptlänge sowie die Gesamt-*Read*-Anzahl pro Probe. Kandidatengene mit einem *Reads Per Kilobase Per Million Mapped Reads (RPKM)* von $\geq 0,1$ im Hippocampus-Gewebe wurden als im humanen Gehirn exprimiert klassifiziert.

3.6.16 BipEx Datenbank

Das *Bipolar Exome* Sequenzierungsprojekt (BipEx, <https://bipex.broadinstitute.org/>, Informationen bezogen im April 2024) untersuchte 14210 Patienten mit BD und 14422 gesunde Kontrollen (nach Qualitätskontrolle). Der Großteil dieser Daten wurde in Palmer et al. (2022) analysiert und stellt die bisher größte WES-Studie für BD dar.

Zugänglich über eine Website sind die Anzahlen der beobachteten Allele in Patienten und Kontrollen sowie die Ergebnisse der Einzelvariantentests für Varianten mit mindestens ≥ 10 beobachteten alternativen Allelen in der Gesamtkohorte. Alle chromosomalen Positionen werden im humanen Referenzgenom GRCh38 berichtet. Dies machte die Konvertierung der chromosomalen Positionen der in der vorliegenden Arbeit identifizierten genetischen Varianten notwendig. Hierfür wurde das webbasierte Tool „LiftOver“ verwendet, welches über den *University of California, Santa Cruz (UCSC) Genome Browser* über eine Benutzeroberfläche nutzbar ist. Dieses Werkzeug konvertiert Genomkoordinaten von einer Version des humanen Referenzgenoms in eine andere unter Verwendung einer Sequenzausrichtung (*alignment*). In dem hier vorliegenden Fall wurden die Koordinaten der identifizierten Varianten von GRCh37 auf GRCh38 konvertiert. Da eine Teilmenge unserer Kandidatenvarianten in der BipEx Studie unter 10 beobachtete alternative Allele in der Gesamtkohorte aufwies und somit kein Assoziations-*p*-Wert berichtet wurde, wurden die Assoziations-*p*-Werte für alle in den BipEx Daten vorhandenen Kandidatenvarianten dieser Arbeit auf Basis des Fisher's *exact*

Tests berechnet. Hierfür wurden die beobachteten Allelzahlen der BipEx Studie verwendet. Dieser Schritt bot die Möglichkeit eine konsistente Methode zur Erfassung der p -Werte über die Kandidatenvarianten zu verwenden.

3.6.17 Nicht-parametrische Kopplungsanalyse (kubanische Familien)

Bei einer NPL-Analyse wird untersucht, ob die Merkmalsträger einer Familie häufiger Allele IBD teilen, als es bei einer zufälligen Vererbung zu erwarten wäre (Kruglyak et al., 1996).

Für die Durchführung der NPL-Analyse wurden DNA-Mikroarray Daten der beiden kubanischen Familien und dasselbe SNP-Set wie zur Berechnung der Verwandtschaftsstruktur verwendet. Zunächst wurde eine QC der DNA-Mikroarray Daten unter Verwendung von PLINK 1.9 (<https://www.cog-genomics.org/plink2>) durchgeführt (Chang et al., 2015). Die Genotypisierungsrate pro SNP war $\geq 95\%$ und die MAF $\geq 5\%$. Nach Filterung für Kopplungsungleichgewicht (LD, *linkage disequilibrium*) mit einer Fenstergröße von 500 kb und einer r^2 Schwelle von 0,01, belief sich die Auswahl auf 9690 SNPs. Auf diesem SNP-Satz basierend wurden dann NPL-Analysen für die (Teil-)Familien 1, 2, 3 und 4 durchgeführt. Eingeschlossen waren zudem die 17 priorisierten Kandidatenvarianten aus der Sequenzierungsanalyse. Die beiden NPL Z-Wert Statistiken NPL_{All} und NPL_{Pairs} wurden mit der MERLIN Software Version 1.1.2 berechnet (Abecasis et al., 2002; Whittemore & Halpern, 1994). Beide in MERLIN implementierten Modelle, das lineare Standardmodell und das exponentielle Modell nach Kong & Cox (1997) wurden zur Generierung modellfreier LOD scores (*logarithm of the odds*) angewandt. Individuen mit einer BD I, BD II oder BD NOS Diagnose wurden als „affected“, gesunde Familienmitglieder wurden als „unaffected“ und diejenigen mit einer anderen psychiatrischen Diagnose wurden als „unknown“ klassifiziert.

4 Ergebnisse

4.1 Identifizierung von BD-assozierten microRNAs

Die Ergebnisse der genomweiten Untersuchung von miRNAs und ihrer potenziellen Rolle in der Entwicklung der BD wurden im Originalartikel veröffentlicht und ausführlich präsentiert (Forstner et al., 2015). Im Kontext dieser Arbeit werden die Hauptergebnisse herausgestellt und im Rahmen aktueller Literatur diskutiert.

Um den Einfluss von miRNAs auf die Entwicklung der BD initial zu ergründen, wurden die Einzel-SNP-Teststatistiken der BD GWAS (Mühleisen et al., 2014) auf Basis ihrer genetischen Position in die drei Kategorien, miRNA, Gen (proteinkodierend) und intergenisch eingeteilt und separat auf Anreicherung von Assoziation untersucht.

Die Abweichung von der unter der Null-Hypothese (keine Assoziation der Einzel-SNP-Teststatistiken) erwarteten Quantil-Verteilung der p -Werte weist visuell auf eine allgemeine Anreicherung von BD-assozierten SNPs in miR-Loci hin, welche höher als für in Genen oder in intergenischen Bereichen lokalisierte SNPs erscheint (Abb. 7).

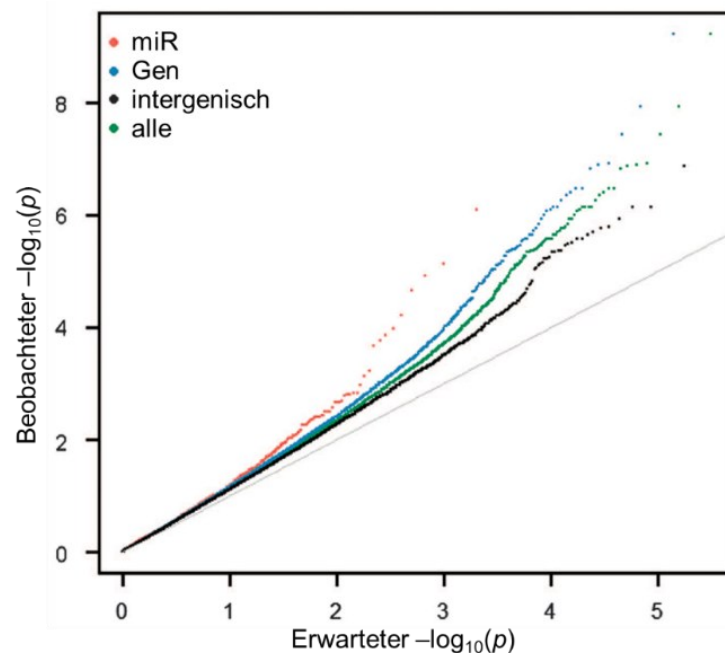


Abb. 7 Quantil-Quantil (Q-Q) Diagramm.

Aufgetragen sind die $-\log$ der beobachteten p -Werte gegen die unter der H_0 erwarteten p -Werte (graue Gerade) für unabhängige SNPs. Hierbei sind die beobachteten p -Werte der SNPs lokalisiert in miRNA Loci (rot), in Genen (blau), intergenisch (schwarz) und die p -Werte aller getesteten SNPs (grün) farblich hervorgehoben. Abbildung modifiziert nach Forstner et al. (2015).

Dieser visuelle Eindruck wurde durch einen Kategorietest mit unterschiedlichen Schwellenwerten für den p -Wert bestätigt, der für $p \geq 1 \times 10^{-6}$ und $< 1 \times 10^{-4}$ eine signifikante Anreicherung für BD-assozierte SNPs in miRNA-Loci zeigte ($p = 0,037$) (Tab.

6). Eine solche signifikante Abweichung wurde ebenfalls für SNPs in Genloci festgestellt ($p = 2,39 \times 10^{-7}$), jedoch nicht für die SNPs in intergenischen Bereichen ($p > 0,99$).

Tab. 6 Test auf Überrepräsentation für unterschiedliche p -Wert Schwellen

p -Wert Schwelle	SNPs in miRNA ± 20 kb	SNPs in Genen	Intergenische SNPs
$< 1 \times 10^{-6}$	0,11	$4,00 \times 10^{-4}$	$> 0,99$
$\geq 1 \times 10^{-6} \text{ \& } < 1 \times 10^{-4}$	0,037	$2,39 \times 10^{-7}$	$> 0,99$
$\geq 1 \times 10^{-4} \text{ \& } < 0,05$	0,041	$1,22 \times 10^{-15}$	$> 0,99$
$\geq 0,05$	0,98	$> 0,99$	$5,53 \times 10^{-18}$

Tests auf Überrepräsentation für unterschiedliche BD-assoziierte p -Wert Schwellen für die folgenden Kategorien: SNPs in miRNA Loci (± 20 kb), SNPs in Genen und SNPs in intergenischen Bereichen. Die Signifikanz der Anreicherung ist angegeben als der einseitige p -Wert des Fisher's *exact* Tests. Abkürzung: kb, Kilobasenpaare. Tabelle modifiziert nach Forstner et al. (2015).

Die Locus-basierte Analyse der BD GWAS-Daten (Mühleisen et al., 2014) mit Hilfe des VEGAS-Tests generierte nominal signifikante p -Werte ($p < 0,05$) für 98 der 609 getesteten miRNAs. Unter den miRNAs mit signifikantem p -Wert war auch *miR-2113*, welche in der ursprünglichen BD GWAS in einer genomweit signifikanten Region auf Chromosom 6 lag (Top-SNP rs12202969, $p_{GC} = 1,08 \times 10^{-8}$; korrigiert mit dem *Genomic Control* Faktor GC) (Devlin & Roeder, 1999).

Nach einer Korrektur für multiples Testen mittels der Bonferroni-Methode für 609 Tests wurde für neun miRNAs eine signifikante Assoziation mit BD beobachtet, die in der folgenden Tabelle aufgeführt sind (Tab. 7).

Tab. 7 Ergebnisse der Locus-basierten Analyse für die neun korrekturstabilen miRNAs.

MicroRNA	Chr	nSNPs	Top-SNP	p Top-SNP	p korr.	miRNA-spezifisch	Gehirn exprimiert
<i>miR-499</i>	20	27	rs3818253	$6,58 \times 10^{-7}$	0,0012	Ja	Ja
<i>miR-640</i>	19	21	rs2965184	$7,23 \times 10^{-7}$	0,0012	Ja	Nein
<i>miR-708</i>	11	72	rs7108878	$3,45 \times 10^{-7}$	0,0012	Ja	Ja
<i>miR-581</i>	5	36	rs697112	$3,61 \times 10^{-6}$	0,0073	Ja	Nein
<i>miR-644</i>	20	12	rs7269526	$1,22 \times 10^{-5}$	0,0104	Nein	Nein
<i>miR-135a-1</i>	3	20	rs9311474	$2,16 \times 10^{-5}$	0,0122	Nein	Ja
<i>let-7g</i>	3	9	rs6445358	$2,23 \times 10^{-5}$	0,0305	Nein	Ja
<i>miR-1908</i>	11	16	rs174575	$2,85 \times 10^{-5}$	0,0353	Ja	Ja
<i>miR-611</i>	11	23	rs174535	$5,03 \times 10^{-5}$	0,0457	Nein	Nein

Abkürzungen: miR/miRNA, MicroRNA; Chr, Chromosom; nSNPs, Anzahl der untersuchten Einzelbasenaustausche; p Top-SNP, p -Wert des Top-SNP im miRNA-Locus; p korr., p -Wert des miR kodierenden Gens nach Korrektur für multiples Testen; miRNA-spezifisch, miRNA-spezifisches Assoziationssignal im regionalen Assoziationsplot; Gehirn exprimiert, Expression im humanen Gehirn nach Ziats und Rennert (2014). Tabelle modifiziert nach Forstner et al. (2015).

Die VEGAS Tests für alle neun identifizierten miRNAs auf Basis der *1000 Genomes* LD-Struktur, anstelle der standardmäßigen *HapMap Phase 2* LD-Struktur, resultierten ebenfalls in nominal signifikanten p -Werten unter $7,20 \times 10^{-5}$ (Tab. 8). Diese zusätzliche

Analyse, motiviert durch die Verwendung unterschiedlicher LD-Referenz-Datensätze bei der Imputation der BD GWAS-Daten, verdeutlicht die Robustheit der Ergebnisse.

Tab. 8 Vergleich der Ergebnisse der genbasierten Tests für die neun miRNAs, die nach Korrektur für multiples Testen signifikant waren, basierend auf der LD-Struktur der HapMap Phase 2 oder des 1000 Genome Projects.

MicroRNA	nSNPs HM2	<i>p</i> Gen HM2	nSNPs 1000G	<i>p</i> Gene 1,000G
<i>miR-499</i>	27	$2,00 \times 10^{-6}$	27	$1,00 \times 10^{-6}$
<i>miR-640</i>	21	$2,00 \times 10^{-6}$	21	$1,00 \times 10^{-6}$
<i>miR-708</i>	72	$2,00 \times 10^{-6}$	72	$3,00 \times 10^{-6}$
<i>miR-581</i>	36	$1,20 \times 10^{-5}$	34	$1,40 \times 10^{-5}$
<i>miR-644</i>	12	$1,70 \times 10^{-5}$	12	$8,00 \times 10^{-6}$
<i>miR-135a-1</i>	20	$2,00 \times 10^{-5}$	20	$2,00 \times 10^{-5}$
<i>let-7g</i>	9	$5,00 \times 10^{-5}$	10	$2,50 \times 10^{-5}$
<i>miR-1908</i>	16	$5,80 \times 10^{-5}$	16	$6,10 \times 10^{-5}$
<i>miR-611</i>	23	$7,50 \times 10^{-5}$	23	$7,20 \times 10^{-5}$

Abkürzungen: miR, MicroRNA; nSNPs, Anzahl der untersuchten SNPs; HM2, HapMap Phase 2 Daten; 1000G, 1,000 Genomes Project Daten; *p* Gen, nominale genbasierte *p*-Werte. Tabelle modifiziert nach Forstner et al. (2015).

4.1.1 Priorisierung der miRNAs

Durch visuelle Überprüfung konnte für fünf der neun miRNAs (*miR-499*, *miR-708*, *miR-1908*, *miR-640*, *miR-581*) mit korrekturstabilem Signal (Tab. 7) eine miR-spezifische Assoziation festgestellt werden (Abb. 8 und Abb. 13). Weiterhin konnte für fünf der neun miRNAs eine Expression im humanen Gehirn gezeigt werden (Tab. 7). Ferner waren drei dieser miRNAs (*miR-499*, *miR-708* und *miR-135a-1*) ebenfalls im Vorderhirn der Ratte exprimiert. Eine dahingehende Untersuchung der anderen miRNAs war nicht möglich, da sie grundsätzlich keine Expression in der Ratte zeigten (Kozomara & Griffiths-Jones, 2014). Priorisiert wurden diejenigen miRNAs, die sowohl ein miRNA-spezifisches Signal als auch Expression im humanen Gehirngewebe zeigten. Entsprechend wurden *miR-499*, *miR-708* und *miR-1908* als vielversprechendste Kandidaten für weitergehende Analysen konstatiert. Die regionalen Assoziationsplots der priorisierten Kandidaten-miRNAs sind Abb. 8 zu entnehmen.

4.1.2 Zielgenanalyse der *miR-499*, *miR-708* und *miR-1908*

Die drei miRNAs, *miR-499*, *miR-708* und *miR-1908*, hatten jeweils 296, 181 und 67 Zielgene von denen entsprechend 97 %, 96 % und 84 % eine Expression im Hirngewebe zeigten (Tab. 9). Es konnte keine signifikante Anreicherung von mit BD-assoziierten Genen in diesen miRNA Zielgenen festgestellt werden. Nach Korrektur für multiples Testen mit der Bonferroni Methode, war die Teststatistik für ein Zielgen (*KLC2*) von *miR-1908*, zwei Zielgene (*NRAS* und *CREB1*) von *miR-708* und vier Zielgene (*GPC6*, *C16orf72*, *WDR82* und *CACNB2*) von *miR-499* signifikant für eine Assoziation mit BD (Tab. 9).

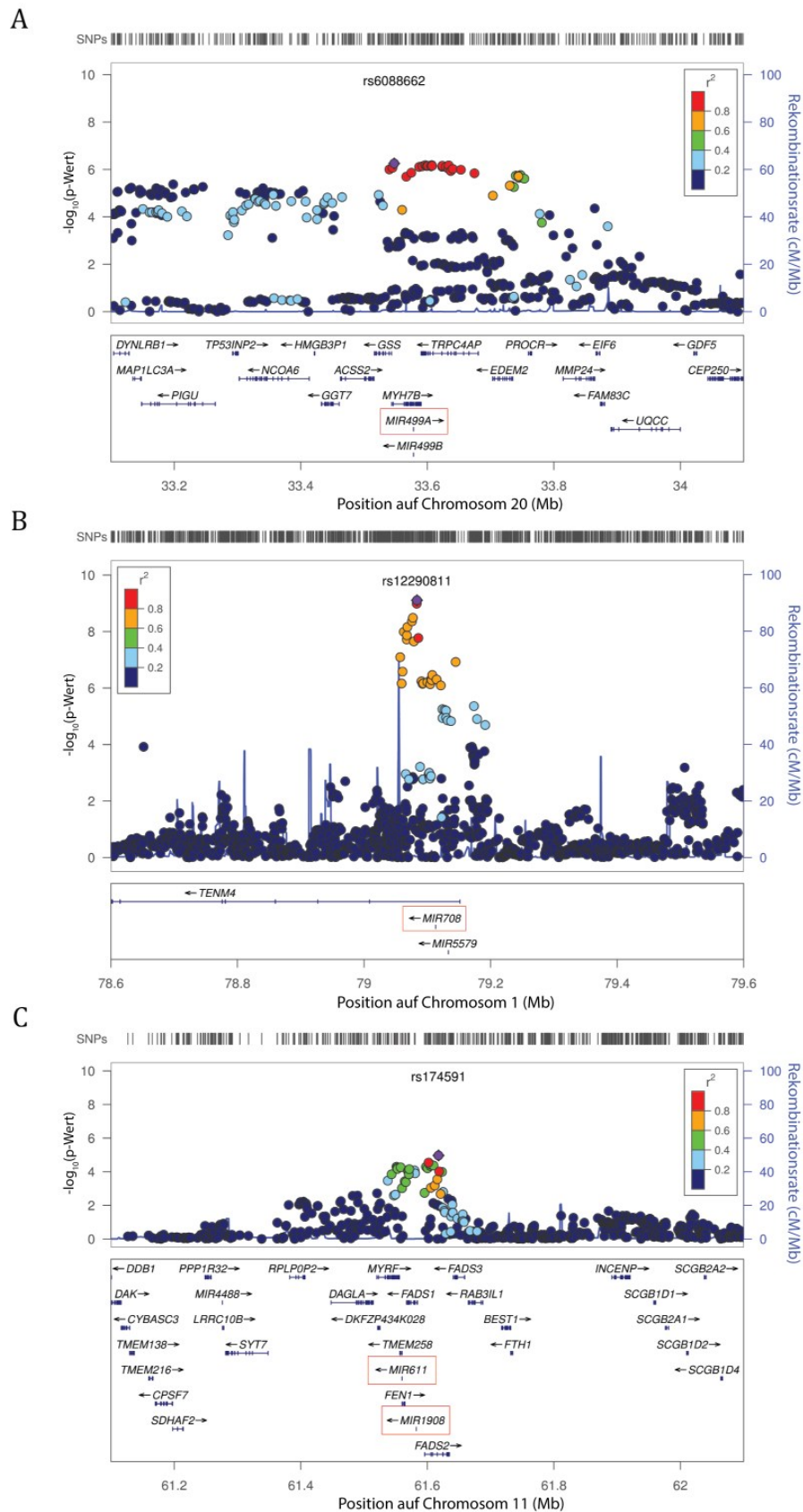


Abb. 8 Regionale Assoziationsplots für die drei vielversprechendsten miRNAs.

Regionale Assoziationsplots für **A) miR-499**, **B) miR-708**, **C) miR-1908** (miR-611 ist ebenfalls abgebildet, aber nicht priorisiert, da das Signal nicht miR-spezifisch ist) und ± 500 kb flankierende Region. Die Assoziationsergebnisse genotypisierter und imputierter SNPs sind als $-\log_{10}(p\text{-Wert})$ angegeben. Der am stärksten assoziierte SNP ist unter Angabe der entsprechenden rs ID als Raute in violett dargestellt. Die Farbe der anderen SNPs ist entsprechend ihres r^2 zu dem am stärksten assoziierten SNP kodiert. Die Rekombinationsrate mit ihrer Skalierung auf der zweiten y-Achse wird als blaue Linie dargestellt. Abbildung modifiziert nach Forstner et al., 2015.

Tab. 9 Zielgen und Signalweg-Analyse für *miR-499*, *miR-708* und *miR-1908*.

microRNA	Anzahl exp. Zielgene	Anzahl exp. Zielgene, $p < 0,05$	p -Wert Anreicherung	Anzahl sign. Zielgene (korr.)	Anzahl sign. Signalwege
<i>miR-499-5p</i>	286	59	0,7172	4	12
<i>miR-708-5p</i>	174	37	0,9265	2	1
<i>miR-1908-5p</i>	56	17	0,1422	1	5

Ergebnisse der Zielgen-Analyse der drei im Gehirn exprimierten miRNAs, die ein miR-spezifisches, korrekturstabiles Assoziationssignal mit BD zeigten. Abkürzungen: miR, microRNA; Anzahl exp. Zielgene, Anzahl der im humanen Gehirn exprimierten Zielgene der entsprechenden miR; Anzahl exp. Zielgene, $p \leq 0,05$, Anzahl der im humanen Gehirn exprimierten Zielgene mit einem genbasierten $p \leq 0,05$; p -Wert Anreicherung, p -Wert der Anreicherungsanalyse (χ^2 -Test); Anzahl sign. Zielgene (korr.), Anzahl der signifikanten Zielgene nach Bonferroni Korrektur für multiples Testen; Anzahl sign. Signalwege, Anzahl der signifikanten biologischen Signalwege mit $p \leq 0,05$. Tabelle modifiziert nach Forstner et al. (2015).

4.1.3 Biologische Signalwege impliziert durch miRNA Zielgene

Die Analyse der im humanen Gehirn exprimierten Zielgene der *miR-499*, *miR-708* und *miR-1908* ergab eine signifikante Anreicherung in insgesamt 18 biologischen Signalwegen (Tab. 9).

Die Ergebnisse der GO-Anreicherungsanalyse sind als gerichtete azyklische Graphen für jede der drei miRNAs dargestellt (Abb. 9, A-C). Eine vollständige Übersicht der signifikanten biologischen Signalwege und der involvierten Zielgene sind im Appendix verzeichnet (Tab. 17).

Für *miR-499* (Abb. 8, A) zeigte sich eine allgemeine Anreicherung in den biologischen Prozessen zur Bildung des zentralen Nervensystems ($p = 4,18 \times 10^{-2}$). Im Speziellen werden Signalwege impliziert, die in der Entwicklung des Gehirns ($p = 2,16 \times 10^{-2}$), des Vorderhirns ($p = 2,2 \times 10^{-3}$) und des Telencephalons ($p = 1,03 \times 10^{-2}$) involviert sind. Darüber hinaus zeigte der Signalweg zur Bildung des limbischen Systems ($p = 2,2 \times 10^{-3}$), zu dem auch der Hippocampus gezählt wird, mitunter die stärkste Anreicherung mit Zielgenen. Weiterhin waren die Zielgene signifikant häufiger in dem biologischen Prozess des synaptischen Vesikeltransports vertreten ($p = 3,78 \times 10^{-2}$). Außerdem zeichnet sich eine proteinbindende Funktion der Zielgene ($p = 1,52 \times 10^{-2}$) und eine Lokalisation in neuronalen Zellkörpern ab ($p = 2,88 \times 10^{-2}$). Als einzige KEGG (*Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*) Kategorie zeigte die Regulation des Aktinzytoskeletts eine signifikante Anreicherung von Zielgenen ($p = 3,2 \times 10^{-3}$). Die Zielgene der *miR-708* (Abb. 9, B) waren signifikant häufig in der GO-Kategorie der C-Terminus bindenden Proteine vertreten ($p = 8,4 \times 10^{-3}$). Die *miR-1908* Zielgene (Abb. 9, C) waren angereichert in Signalwegen zur Entwicklung des Nervensystems ($p = 4,5 \times 10^{-3}$). Die signifikanteste Anreicherung mit einem p -Wert von 8×10^{-4} war in dem Prozess der neuronalen Projektion zu beobachten. Darüber hinaus waren Komponenten des Zellkörpers ($p = 2,43 \times 10^{-2}$) insbesondere neuronaler Zellen ($p = 1,89 \times 10^{-2}$) signifikant angereichert für die miRNA Zielgene.

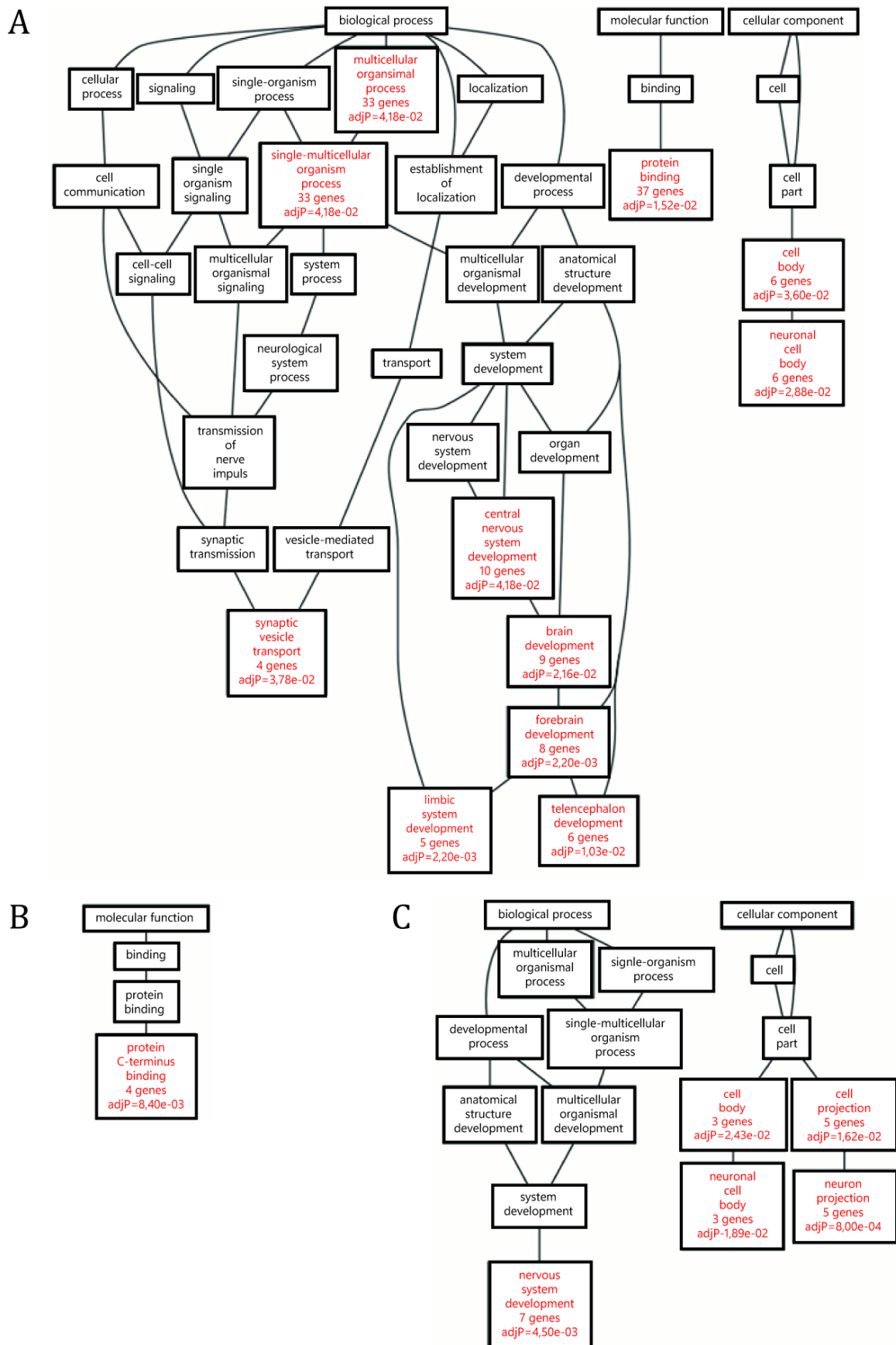


Abb. 9 Gerichtete azyklische Graphen der GO-Kategorien.

Die Zielgene der drei miRNAs **A**) *miR-499*, **B**) *miR-708* und **C**) *miR-1908* wurden in einer *Gene Ontology* (GO)-Analyse untersucht. Die Ergebnisse für jede miRNA sind als gerichtete azyklische Graphen dargestellt. Biologische Signalwege und Prozesse, die signifikant angereichert waren ($p < 0,05$, Bonferroni-korrigiert) und mindestens drei Zielgene enthalten, sind in rot dargestellt. Abbildung modifiziert nach Forstner et al., 2015.

4.1.4 Dual-Luciferase-Reportergen-Assay

Die durch die Arbeitsgruppe von Prof. Schratt durchgeführten Luciferase-Reportergen-Assays konnten eine effiziente Prozessierung der *pri-miR-499*, jedoch nicht der *pri-miR-708* nach Transfektion der hippocampalen Rattenneurone feststellen. Die Überexpression von *miR-499* führte zu einer statistisch nicht signifikanten Vergrößerung des Volumens der Dornfortsätze und deren Dichte wurde nicht beeinflusst (Daten nicht gezeigt). Wie erwartet hatte die Transfektion des *miR-708*-Expressionskonstrukts keinen signifikanten Einfluss auf die morphologischen Parameter der Dornfortsätze.

4.2 Exomsequenzierung kubanischer BD-Familien und Untersuchung des polygenen Risikos

Folgend der Hypothese, dass neben häufigen genetischen Varianten auch seltene höher penetrante Varianten zu der Suszeptibilität der BD beitragen, wurden 15 betroffene Individuen mehrfach betroffener kubanischer Familien mittels WES untersucht. Zudem wurden PRS für die Familienmitglieder erhoben, um den kumulativen Effekt häufiger Varianten zu untersuchen.

4.2.1 Validierung der Verwandtschaftsstruktur

Die in den Stammbäumen dargestellten Verwandtschaftsverhältnisse (Abb. 5) konnten durch Schätzung der Verwandtschaftsgrade basierend auf IBD-Proportionen validiert werden (Abb. 10). Zudem wurde keine kryptische Verwandtschaft (bis zum dritten Verwandtschaftsgrad) zwischen den beiden Familien und den Teilfamilien 2 und 3 festgestellt.

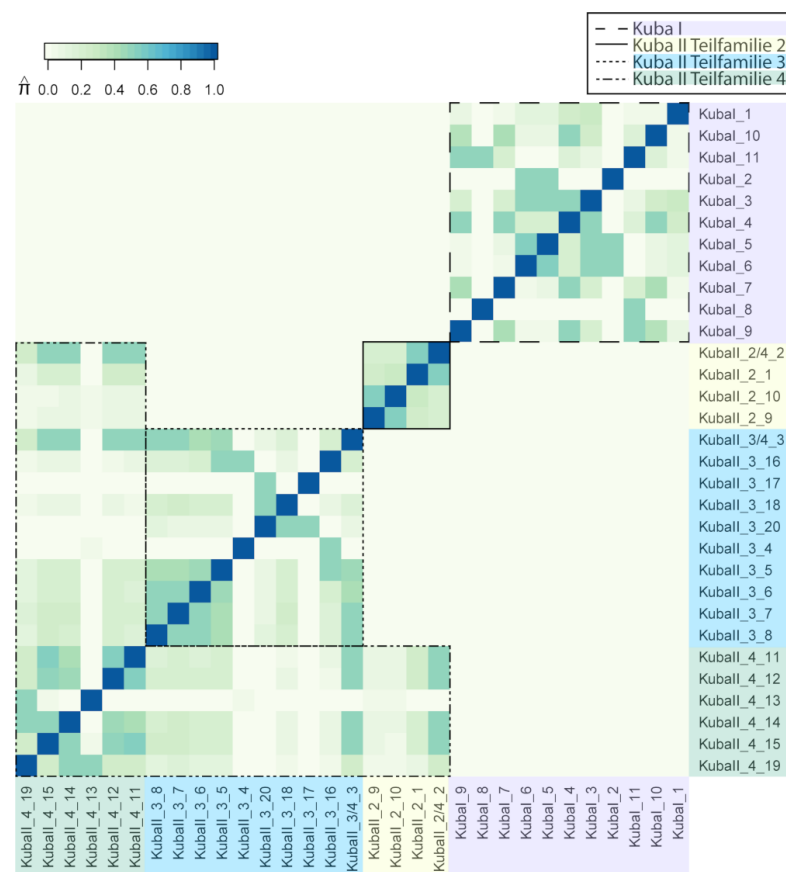


Abb. 10 Heatmap der IBD-Verteilung der kubanischen Individuen.

Dargestellt ist die Verwandtschaftsmatrix der paarweise geschätzten Verwandtschaft einzelner Individuen innerhalb und zwischen den kubanischen Familien. Die IBD-Wahrscheinlichkeit $\hat{\pi}$ skaliert mit der Farbintensität von hellgrün bis dunkelblau.

4.2.2 Analyse der populationsbezogenen Substruktur

Die Familie Kuba I zeigte eine starke genetische Überlappung mit der Population lateinamerikanischer Herkunft (PUR, *Puerto Rican in Puerto Rico*). Allerdings zeigten zwei Individuen auch einen gewissen Grad afrikanischer Abstammung (ACB, *African Caribbean in Barbados* und ASW, *African Ancestry in Southwest USA*). Die Teilfamilien 2, 3 und 4 gruppierten sich sowohl mit Personen europäischer Herkunft (TSI, *Toscani in Italia* und IBS, *Iberian populations in Spain*) als auch mit der Population lateinamerikanischer Herkunft. Eingeherratete Personen befanden sich hauptsächlich in der Gruppe der Population lateinamerikanischer Herkunft, wobei zwei eingeherratete Personen unterschiedliche Anteile afrikanischer Abstammung zeigten (Abb. 11).

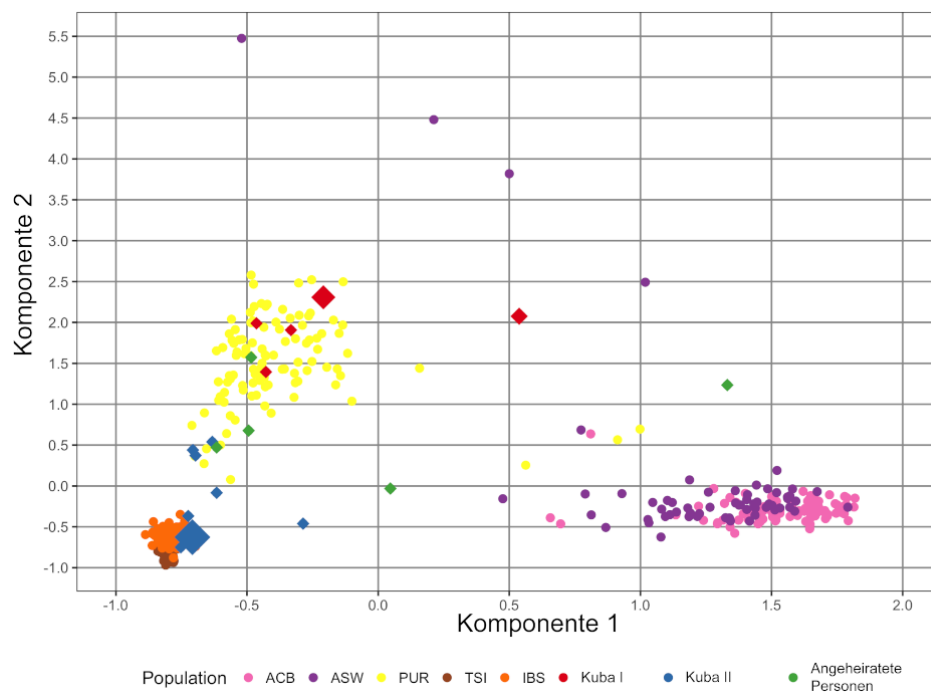


Abb. 11 Populationsbezogene Substruktur.

Dargestellt sind die Komponenten 1 und 2 der multidimensionalen Skalierung (MDS). Rote Rauten stellen Individuen der Familie Kuba I dar. Blaue Rauten stellen Personen der Familie Kuba II dar. Grüne Rauten repräsentieren eingeherratete Personen. Die Größe der Rauten skaliert mit der Anzahl der repräsentierten Personen ($n = 1-9$). 1000 Genomes Project Populationen: ACB, *African Caribbeans in Barbados* (pink); ASW, *Americans of African Ancestry in Southwest USA* (lila); PUR, *Puerto Ricans from Puerto Rico* (gelb); TSI, *Toscani in Italia* (braun); IBS, *Iberian Population in Spain* (orange). Modifiziert nach Maaser et al. (2018).

4.2.3 Ermittlung des polygenen Risikoscores

Der PRS erfasst die Gesamtheit genomweiter Risikovarianten kumulativ gewichtet nach ihrer Effektstärke. In den mehrfach betroffenen Familien wurde ermittelt, ob sich der PRS der Familienmitglieder mit Erkrankung (BD oder ein anderer psychiatrischer Phänotyp) von dem der Familienmitglieder ohne Vorgeschichte von psychiatrischen Erkrankungen signifikant unterscheidet. Diese Analyse sollte das Verständnis der einzigartigen genetischen Architektur der beiden mehrfach betroffenen kubanischen Familien auch auf Ebene der häufigen genetischen Varianten beleuchten.

Nach der Korrektur für multiples Testen, konnten keine signifikant höheren PRS in Patienten mit BD als in Familienmitgliedern ohne Vorgeschichte von psychiatrischen Erkrankungen für die untersuchten p -Wert Schwellen festgestellt werden (Abb. 12, exemplarisch dargestellt sind die p -Wert Schwellen 5×10^{-8} und 0,05). Wurde die PRS-Berechnung auf genetische Varianten beschränkt, die eine genomweit signifikante Assoziation mit BD in der GWAS von Stahl et al. (2019) aufwiesen ($p \leq 5 \times 10^{-8}$), war der zugehörige PRS in Patienten mit BD im Vergleich zu den PRS von Familienmitgliedern ohne psychiatrische Erkrankung, oder einer anderen psychiatrischen Diagnose als BD, nominal signifikant höher ($p = 0,027$) (Abb. 12) (Maaser et al., 2018).

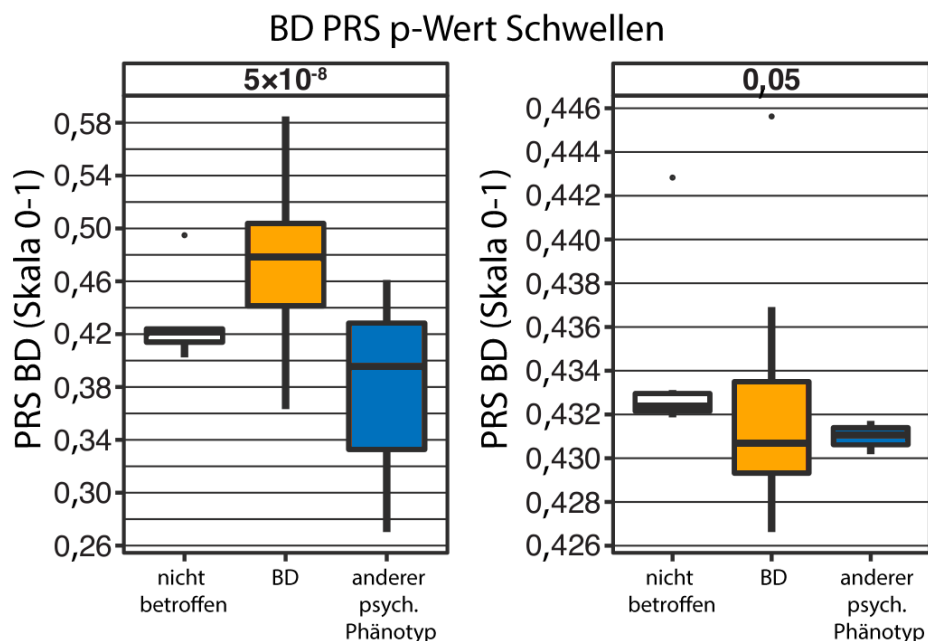


Abb. 12 Skalierte BD PRS.

Dargestellt sind Kastendiagramme der skalierte BD PRS für die beiden p -Wert Schwellen 5×10^{-8} und 0,05. Weiß repräsentiert nicht betroffene Individuen, Orange repräsentiert Patienten mit BD und Blau stellt Individuen mit einer anderen psychiatrischen Diagnose dar. Abkürzungen: BD, bipolare Störung; PRS, polygener Risikoscore; anderer psych. Phänotyp, anderer psychiatrischer Phänotyp. Abbildung modifiziert nach Maaser et al. (2018).

4.2.4 Analyse der WES-Daten und die Identifizierung seltener Kandidatenvarianten

Probenvorbereitung und anschließende Exomsequenzierung

Zur Identifizierung seltener genetischer Varianten mit einem potenziellen Beitrag zur Ätiologie der BD, wurden vier Individuen aus Kuba I und elf Individuen aus Kuba II mit BD I, BD II oder BD NOS Diagnose mittels WES untersucht.

Alle DNA-Proben waren von geeigneter Qualität und zeigten einen geringen Grad an Degradation. Nach der Fragmentierung auf eine mittlere Größe von 150 - 200 bp wurde die DNA-Bibliothek hergestellt und auf dem HiSeq 2500 im *paired-end* Verfahren sequenziert. Eine durchschnittliche Abdeckung von 90,9X pro Individuum wurde erreicht und 91,5 % der Zielregionen waren mindestens 30X mit Sequenzen abgedeckt. Weitere technische Details können Tab. 10 entnommen werden. Die zweite kubanische Familie wurde in die Teilfamilien 2, 3, und 4 gegliedert. Die Datenfilterung und Identifizierung der seltenen genetischen Varianten wurden jeweils separat in diesen Untereinheiten durchgeführt.

Tab. 10 Übersichtsprotokoll des WES-Datensatzes der kubanischen Familien

	Kuba I	Kuba II
Anzahl der untersuchten Gene	21522	
Erfasste Gesamtgröße der Zielregionen	50 Mb	
Durchschnittliche Abdeckung	85,25X	92,90X
Anteil der Zielregionen mit 30X Abdeckung	92,55 %	91,33 %

Abkürzung: Mb, Megabasenpaare. Modifiziert nach Maaser et al. (2018).

Die Datenanalyse unter Verwendung der Varbank-Software ermöglichte eine Identifizierung von durchschnittlich 1019 genetischen Varianten mit einer MAF < 1 % pro Exom. Insgesamt wurden 20, 30 und 126 Varianten von allen untersuchten BD-Patienten in der jeweiligen (Teil-)Familie 1, 2 und 3 geteilt. Um eine Anreicherung von möglicherweise höher penetranten Varianten zu erzielen, konzentrierte sich die vorliegende Untersuchung auf sehr seltene Varianten mit einer MAF von < 0,1 %. Dieser Filterungsschritt reduzierte die Anzahl der geteilten Varianten in den oben erwähnten (Teil-)Familien entsprechend auf 9, 14 und 59. Einhergehend mit der Beobachtung, dass die Teilfamilie 4 aus den unverwandten Teilfamilien 2 und 3 hervorgeht, wurden keine seltenen genetischen Varianten von allen untersuchten BD-Patienten dieser Teilfamilie geteilt.

Weiterhin wurden diese identifizierten Varianten nach ihrem geschätzten funktionellen Effekt priorisiert. Die Anzahl der SNVs, die von mindestens vier der fünf Algorithmen, und InDels, die von mindestens einem von drei Tools als potenziell funktionell eingestuft wurden verringerte die Anzahl der Varianten auf 2, 3 und 12 für die jeweilige (Teil-)Familie. Die auf diese Weise priorisierten 17 Kandidatengene umfassten 14

missense Varianten und 3 kleine Indels, die alle eine Leserasterverschiebung zur Folge hatten (Tab. 11). Eine ausführlichere Übersicht der identifizierten genetischen Varianten mit einer MAF $\leq 5\%$, die von mindestens einem Algorithmus als funktionell eingestuft wurden, ist nachfolgend im Appendix (Tab. 19) aufgeführt.

Tab. 11 Priorisierte seltene Varianten identifiziert in den untersuchen kubanischen BD-Patienten

Kuba I								Geschätzter funktioneller Effekt				
Gen	Chr	Position	Ref	Alt	ExAC MAF	dbSNP141	AS Austausch	SIFT	PPh-2 HumDIV	PPh-2 HumVAR	LRT	Mutation Taster
<i>SERPING1</i>	11	57379205	C	T	4.9E-05	rs141075266	p.L349F	D	P	B	D	D
<i>TMEM220</i>	17	10633149	C	A	NA	NA	p.R7L	D	D	P	N	D
Kuba II Teilfamilie 2								Geschätzter funktioneller Effekt				
Gen	Chr	Position	Ref	Alt	ExAC MAF	dbSNP141	AS Austausch	SIFT	PPh-2 HumDIV	PPh-2 HumVAR	LRT	Mutation Taster
<i>ABCA4</i>	1	94544977	A	T	4.9E-04	rs61748549	p.N380K	D	P	P	D	D
<i>DNAH7</i>	2	196726484	C	T	4.2E-04	rs201185180	p.E2565K	D	D	P	D	D
<i>RCCD1</i>	15	91500673	G	C	NA	NA	p.G166A	D	D	P	N	D
Kuba II Teilfamilie 3												
<i>EPS8L3</i>	1	110293386	C	T	3.1E-04	rs148185176	p.G526R	D	D	D	D	D
<i>OLFML2B</i>	1	161953665	C	A	3.0E-04	rs142349285	p.A685S	D	D	D	NA	D
<i>CAPN2</i>	1	223934845	C	T	6.0E-04	rs140704789	p.S236F	D	D	D	D	D
<i>COL3A1</i>	2	189875383	G	A	2.0E-04	rs140646380	p.G1341S	T	D	D	D	D
<i>ATR</i>	3	142281560	T	TT	NA	NA	p.L229Tfs*13	NA	NA	NA	NA	D
<i>CSNK1G3</i>	5	122926124	C	T	NA	NA	p.R288C	D	P	P	D	D
<i>THYN1</i>	11	134119132	G	A	9.9E-05	rs143669769	p.H137Y	T	P	P	D	D
<i>MYH7</i>	14	23898481	-	TG	NA	NA	p.K405Nfs*17	NA	NA	NA	NA	D
<i>FAM169B</i>	15	98995065	A	G	4.6E-04	rs183490372	p.M120T	D	D	D	D	D
<i>ZNF433</i>	19	12127214	AGAGG	-	NA	NA	p.S155Cfs*5	NA	NA	NA	NA	D
<i>CRX</i>	19	48337728	C	G	4.1E-04	rs139340178	p.H10D	T	D	P	D	D
<i>SELENOO</i>	22	50648648	G	T	2.5E-05	NA	p.Q326H	D	D	D	D	D

Sortierung nach chromosomaler Position. Die fette Formatierung weist auf eine funktionelle Prognose hin. Abkürzungen: Chr, Chromosom; Position, chromosomale Position der Variante (*build* hg19/GRCh37); Ref, Referenzallel; Alt, Alternativallel; ExAC MAF, minore Allelefrequenz basierend auf den Daten des *Exome Aggregation Consortium*; AS, Aminosäure; dbSNP141, *The Single Nucleotide Polymorphism database build* 141; SIFT, *sorting intolerant from tolerant*; PPh-2, PolyPhen-2; HumDIV, *human diversity* Modell; HumVAR, *human variation* Modell; LRT, *likelihood ratio test*; D, *damaging/probably damaging/deleterious/disease-causing*; P, *possibly damaging*; B, *benign*; T, toleriert; N, neutral; NA, nicht verfügbar (*not available*). Modifiziert nach Maaser et al. (2018).

4.2.5 Segregation und Validierung der seltenen genetischen Varianten

Für die Validierung der durch WES identifizierten genetischen Varianten und zur Aufklärung des jeweiligen Segregationsmusters der 17 priorisierten seltenen Varianten mit potenziell funktionellem Effekt wurden alle Individuen der beiden kubanischen Familien mit vorhandener DNA mittels Sanger Sequenzierung untersucht. Eine Zusammenfassung der Ergebnisse sowie weiterführende Details zu den priorisierten Kandidatenvarianten sind im nachfolgenden Paragraphen zu finden und zusätzlich in der Tabelle zusammengefasst (Tab. 12, A-C).

Tab. 12 Übersicht zur Segregationsanalyse, Expression der implizierten Gene im Gehirn und Ergebnisse der NPL-Analysen

A

Kuba I					NPL		
Gen	Basen Austausch	BD <i>n</i> = 5	Andere psych. <i>n</i> = 1	Gesund <i>n</i> = 3	Expression RPKM	exLOD	<i>p</i> -Wert
<i>TMEM220</i>	C > A	5	1	2	0,98	1,08	0,01
<i>SERPING1</i>	C > T	4	0	1	8,11	0,02	0,37

B

Kuba II		Teilfamilie 2		Teilfamilie 4	NPL (Teilfamilie 2)		
Gen	Basen Austausch	BD <i>n</i> = 4	BD <i>n</i> = 5	Expression RPKM	exLOD	<i>p</i> -Wert	
<i>RCCD1</i>	G > C	4	2	3,17	-0,26	0,86	
<i>DNAH7</i>	C > T	4	2	0,42	-0,11	0,76	
<i>ABCA4</i>	A > T	4	2	0,06	-0,18	0,82	

C

Kuba II		Teilfamilie 3	Teilfamilie 4	Teilfamilien 3+4		NPL (Teilfamilie 3)		
Gen	Basen Austausch	BD <i>n</i> = 3	BD <i>n</i> = 5	Andere psych. <i>n</i> = 2	Gesund <i>n</i> = 3	Expression RPKM	exLOD	<i>p</i> -Wert
<i>COL3A1</i>	G > A	3	4	1	2	0,52	0,60	0,05
<i>THYN1</i>	G > A	3	3	1	2	20,93	0,30	0,12
<i>EPS8L3</i>	G > C	3	3	2	3	0,01	0,60	0,05
<i>CAPN2</i>	C > T	3	2	1	1	9,26	0,09	0,26
<i>ATR</i>	T > TT	3	2	1	2	1,49	0,60	0,05
<i>MYH7</i>	- > TG	3	2	2	1	0,92	0,09	0,26
<i>ZNF433</i>	AGAGG > -	3	2	0	2	0,82	0,09	0,26
<i>OLFML2B</i>	C > A	3	2	0	2	0,71	0,09	0,26
<i>FAM169B</i>	A > G	3	2	1	1	0,01	0,09	0,26
<i>CSNK1G3</i>	C > T	3	1	1	1	3,56	0,09	0,26
<i>CRX</i>	C > G	3	1	2	2	0	0,09	0,26
<i>SELENOO</i>	G > T	3	0	2	1	8,47	0,09	0,26

A Ergebnisübersicht der Kandidatenvarianten für die Individuen von Kuba I. **B** Ergebnisübersicht der Kandidatenvarianten für die Individuen der Teilfamilien 2 und 4 von Kuba II. **C** Ergebnisübersicht der Kandidatenvarianten für die Individuen der Teilfamilie 3 und 4 von Kuba II. Die angeheirateten Personen wurden ausgeschlossen. Die Varianten wurden nach absteigender Anzahl in Teilfamilie 4 sortiert. Berichtet ist die Anzahl der Träger der genetischen Variante in der jeweiligen Phänotypgruppe. RPKM $\geq 0,1$ sind fett formatiert. Abkürzungen: NPL, nicht-parametrische Kopplung basierend auf der NPL_{alt} Z-Wert Statistik; BD, bipolare Störung: BD I, BD II, und BD NOS; *n*, Anzahl der untersuchten Personen mit dem jeweiligen Phänotyp; andere psych., andere psychiatrische Störung: wiederkehrende MD, einmalige MD und Alkoholmissbrauch; exLOD, *logarithm of the odds* (exponentielles Modell); *p*-Wert, Wahrscheinlichkeit des exLOD; RPKM, *Reads Per Kilobase Million*. Modifiziert nach Maaser et al. (2018).

In Kuba I (Tab. 12 A) wurde eine Kandidatenvariante in *TMEM220* (p.R7L) identifiziert, welche in den fünf untersuchten Patienten mit BD über vier Generationen hinweg kosegregierte (Abb. 5 A, Personen 4, 5, 7, 9 und 11). Ferner wurde diese Variante auch in zwei gesunden Verwandten (Abb. 5 A, Personen 1 und 3) und in einer Person mit der Diagnose Alkoholmissbrauch (Abb. 5 A, Person 10) nachgewiesen.

Die zweite Kandidatenvariante lag in dem Gen *SERPING1* (p.L349F) und wurde in allen mit WES untersuchten Patienten mit BD identifiziert (Abb. 5 A, Personen 4, 5, 7 und 9). Bei dem Nachkommen mit BD in der fünften Generation wurde die Variante nicht nachgewiesen (Abb. 5 A, Person 11). In einem gesunden Elternteil, einem obligaten Anlageträger, konnte die Variante ebenfalls validiert werden (Abb. 5 A, Person 3).

In Kuba II, Teilfamilie 2 (Tab. 12 B), kosegregierten drei Kandidatenvarianten in den Genen *RCCD1* (p.G166A), *DNAH7* (p.E2565K), und *ABCA4* (p.N380K) mit allen untersuchten Patienten mit BD. Eine nähere Untersuchung der Segregation in dieser Familie war nicht möglich, da kein genetisches Material von weiteren Familienangehörigen zur Verfügung stand.

In Kuba II, Teilfamilie 3 (Tab. 12 C), wurde keine vollständig penetrante Kandidatenvariante in den Betroffenen mit BD-Diagnose identifiziert, da sie jeweils in mindestens einem der drei gesunden Familienangehörigen ebenfalls detektiert wurden (Abb. 5 B, Personen 7, 8 und 20). Interessanterweise waren zwei Familienmitglieder mit der Diagnose Alkoholmissbrauch (Abb. 5 B, Personen 6 und 18) ebenfalls Träger der Kandidatenvarianten in den Genen *EPS8L3* (p.G526R), *MYH7* (p.K405Nfs*17), *CRX* (p.H10D) und *SELENOO* (p.Q326H).

Die Segregation der Kandidatenvarianten, die in den Teilfamilien 2 und 3 identifiziert wurden, wurde in der bilinearen Teilfamilie 4 mit vier untersuchten Patienten mit BD-Diagnose weiterverfolgt. In drei der vier betroffenen Geschwister konnten die *missense* Varianten in den kodierenden Regionen der Gene *COL3A1* (p.G1341S) und *THYN1* (p.H137Y) nachgewiesen werden (Abb. 5 B, Personen 11, 12, 14 und 15). Darüber hinaus hatte Individuum 14 die genetische Variante in *COL3A1* (p.G1341S) an seinen mit BD betroffenen Nachkommen transmittiert (Abb. 5 B, Person 19). Gemäß der Erwartungen nach Mendel, sollten durchschnittlich 50 % der betroffenen Nachkommenschaft Träger der Kandidatenvarianten sein. Eine Ausnahme stellte jedoch die Variante in dem Gen *SELENOO* (p.Q326H) dar, welche an keinen der Nachkommen vererbt wurde.

Alle Kandidatenvarianten wurden zudem in den jeweils anderen beiden kubanischen Familien und den angeheirateten Personen untersucht. Keine der Varianten wurde in der entsprechenden anderen Familie oder in den unverwandten und angeheirateten Personen identifiziert, wodurch keine populationsspezifischen Effekte festgestellt werden konnten.

4.2.6 Expression im humanen Gehirn

Die priorisierten seltenen Kandidatenvarianten, die eine Expression im humanen Gehirn zeigten, waren in 17 unterschiedlichen Genen lokalisiert. Basierend auf den Daten des GTEx Katalogs (Lonsdale et al., 2013) zeigten 13 dieser implizierten Gene (*SERPING1*, *TMEM220*, *MYH7*, *THYN1*, *ATR*, *CSNK1G3*, *ZNF433*, *OLFML2B*, *CAPN2*, *RCCD1*, *DNAH7*, *SELENOO* und *COL3A1*) eine Expression im humanen Gehirn ($> 0,01$ RPKM) (Tab. 12, exprimierte Gene sind fett formatiert).

4.2.7 Replikation in der BipEx Datenbank

Um die Bedeutung der oben genannten 17 seltenen Kandidatenvarianten für die Entstehung der BD weiter nachzuverfolgen, wurde die Einzelvariantenstatistiken dieser Varianten im unabhängigen Datensatz des BipEx Projektes evaluiert und um diese Information bereichert (Palmer et al., 2022) (Tab. 13). Die BipEx Studie stellt dabei die bisher größte Sammlung von WES-Daten für BD auf einer Website frei zur Verfügung.

Auf Ebene der Einzelvarianten waren in der BipEx Datenbank 12 der 17 Kandidatenvarianten vertreten. Für fünf dieser 12 Varianten wurden in der Patienten- und Kontrollkohorte insgesamt weniger als zehn alternative Allele identifiziert und es wurde keine χ^2 Statistik in der Datenbank berichtet. Wie im Methodenteil erläutert, wurde aus diesem Grund stattdessen mit einem Fisher's *exact* Test die Assoziations- p -Werte berechnet (Tab. 13). Für diese 12 seltenen, potenziell funktionellen Varianten gab es keinen signifikanten p -Wert nach Korrektur für multiples Testen nach der Bonferroni Methode. Wobei ein p -Wert für die in *THYN1* (p.H137Y) lokalisierte Varianten nominale Signifikanz vor Korrektur mit Bonferroni erreichte ($p = 0,012$). Von dieser Variante wurde ein Allel in Patienten mit BD und zehn Allele in gesunden Kontrollen identifiziert, was einer zu unserer Studie gegensätzlichen Effektrichtung entspricht. Für die anderen Varianten wurden eine grundsätzlich ähnliche nicht signifikant unterschiedliche Anzahl von Allelen in Patienten und Kontrollen beobachtet. Acht der zwölf Kandidatenvarianten wurden häufiger in Patienten mit BD als in gesunden Kontrollen beobachtet, was der Effektrichtung unserer Studie entspricht. Ein einseitiger Binomialtest auf Anreicherung identischer Effektrichtungen ergab einen p -Wert von $p = 0,194$.

Tab. 13 Kandidatenvarianten der beiden kubanischen Familien im Datensatz des BipEx Projects

Die 17 seltenen, potenziell funktionellen genetischen Varianten wurden im Datensatz des *BipEx Projects* repliziert. Angegeben sind die Einzelvariantentests für 12 der Varianten mit p -Wert und korrigiertem p -Wert (Fisher's *exact*, Bonferroni-Methode, $n=12$). Angaben der Positionen der Varianten in der Version GRCh38/hg38 des humanen Referenzgenoms.

Kuba I			BipEx Einzelavarianten							
Gen	Chr. Position	AS Austausch	Alt. Allele BD Patienten	Anzahl Allele BD Patienten	Alt. Allele Kontrollen	Anzahl Allele Kontrollen	MAF BD Patienten	MAF Kontrollen	p -Wert Fisher's <i>exact</i>	p_{korrr} -Wert Fisher's <i>exact</i>
<i>SERPING1</i>	11-57611732	p.L349F	1	27866	0	28844	3.59E-05	0.0	0.491	>0.99
<i>TMEM220</i>	17-10729832	p.R7L	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Kuba II Teilfamilie 2			BipEx Einzelavarianten							
Gen	Chr. Position	AS Austausch	Alt. Allele BD Patienten	Anzahl Allele BD Patienten	Alt. Allele Kontrollen	Anzahl Allele Kontrollen	MAF BD Patienten	MAF Kontrollen	p -Wert Fisher's <i>exact</i>	p_{korrr} -Wert Fisher's <i>exact</i>
<i>ABCA4</i>	1-94079421	p.N380K	21	27866	17	28844	7.54E-04	5.89E-04	0.517	>0.99
<i>DNAH7</i>	2-195861760	p.E2565K	8	27860	6	28840	2.87E-04	2.08E-04	0.602	>0.99
<i>RCCD1</i>	15-90957443	p.G166A	8	27866	10	28844	2.87E-04	3.47E-04	0.815	>0.99
Kuba II Teilfamilie 3			BipEx Einzelavarianten							
<i>EPS8L3</i>	1-109750764	p.G526R/p.G557R	4	27866	3	28844	1.44E-04	1.04E-04	0.722	>0.99
<i>OLFML2B</i>	1-161983875	p.A685S/p.A686S	13	27866	13	28844	4.67E-04	4.51E-04	1	>0.99
<i>CAPN2</i>	1-223747143	p.S236F	62	27774	60	28742	2.23E-03	2.09E-03	0.718	>0.99
<i>COL3A1</i>	2-189010657	p.G1341S	0	27866	3	28844	0	1.04E-04	0.250	>0.99
<i>ATR</i>	3-142562718	p.L229Tfs*13	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
<i>CSNK1G3</i>	5-123590430	p.R288C	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
<i>THYN1</i>	11-134249238	p.H137Y	1	27866	10	28844	3.59E-05	3.47E-04	0.012	0.142
<i>MYH7</i>	14-23429272	p.K405Nfs*17	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
<i>FAM169B</i>	15-98451836	p.M120T	1	27840	1	28804	3.59E-05	3.47E-05	1	>0.99
<i>ZNF433</i>	19-12016399	p.S155Cfs*5	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
<i>CRX</i>	19-47834471	p.H10D	22	27866	22	28844	7.89E-04	7.63E-04	1	>0.99
<i>SELENOO</i>	22-50210219	p.Q326H	0	27866	2	28844	0	6.93E-05	0.500	>0.99

Abkürzungen: Chr. Position, chromosomale Position; AS Austausch, Aminosäureaustausch; Alt. Allele, Anzahl der beobachteten alternativen Allele; BD, Bipolare Störung; MAF, Frequenz des alternativen Allels; p_{korrr} -Wert, korrigierter p -Wert; NA, nicht verfügbar (*not available*).

4.2.8 Nicht-parametrische Kopplungsanalyse

Die Ergebnisse der nicht-parametrischen Kopplungsanalyse zeigten für keines der angewendeten Modelle (NPL_{pairs} und NPL_{all} Statistik; lineares und exponentielles Wahrscheinlichkeitsmodell) ein Kopplungssignal, welches die Schwelle von $LOD > 2,2$ überstieg (Georgi et al., 2014). Dies ist auch darauf zurückzuführen, dass die maximal erreichbaren LOD-Werte bei 1,47 für Kuba I, 1,75 für die Teilfamilie 2 und 0,60 für die Teilfamilie 3 lagen (NPL_{all} , exponentielles Wahrscheinlichkeitsmodell). Für jede seltene segregierende Kandidatenvariante wird der LOD-Score der NPL_{all} -Statistik unter dem exponentiellen Wahrscheinlichkeitsmodell (exLOD) und der entsprechende p -Wert berichtet (Tab. 12). Darüber hinaus sind im Appendix die exLOD-Werte und zugehörigen p -Werte des jeweils nächsten Markers derjenigen Varianten verzeichnet, die von mindestens einem der fünf Prädiktionstools als potenziell funktionell eingestuft wurden und eine MAF von $\leq 5\%$ haben (Tab. 19).

5 Diskussion

5.1 Häufige Varianten – miRNAs

Die in dieser Arbeit präsentierten Ergebnisse basieren auf den publizierten Originalartikeln mit *Peer-Review* von Forstner et al. (2015) und Maaser et al. (2018). Sie werden im folgenden Abschnitt diskutiert und in den aktuellen Kontext gesetzt.

Die genetischen Assoziationsergebnisse für miR-kodierende Loci liefern weitere Evidenz für einen möglichen Beitrag von miRNAs und ihren Zielgenen zur Krankheitsentwicklung der BD. Die Inflation der p -Werte entlang der Geraden der erwarteten p -Wert Verteilung unter der Nullhypothese deutet auf eine Anreicherung von BD-assoziierten SNPs in miRNA Loci hin. Acht der neun assoziierten miRNAs lagen innerhalb eines proteinkodierenden Gens, in einem sogenannten Wirtsgen. Hierunter befanden sich die im humanen Gehirn exprimierten und in dieser Arbeit näher untersuchten miRNAs *miR-499*, *miR-708* und *miR-1908*. Interessanterweise sind miRNAs signifikant häufiger in intronischen und exonischen Regionen des Genoms lokalisiert als in intergenischen (Rearick et al., 2011). Außerdem konnten Studien zeigen, dass die Expression des Wirtsgens und einer intronisch lokalisierten miRNA hoch korreliert sind (Baskerville & Bartel, 2005; Godnic et al., 2013). Die Studie von Bartel (2004) präsentiert als mögliche Erklärung für diese Beobachtung, dass sowohl die Expression des Wirtsgens als auch die der intronisch gelegenen miRNA durch gemeinsame regulatorische Elemente gesteuert wird. In Übereinstimmung damit argumentieren Lutter et al. (2010) sowie Rearick et al. (2011), dass Wirtsgene und ihre intronischen miRNAs möglicherweise ausgeprägte zusammenwirkende Effekte entfalten, die bedeutende Auswirkungen auf die präzise Modulation der Genexpression im Genom haben könnten. Die Ergebnisse der hier vorgestellten Studie erlauben allerdings keine eindeutige Aussage darüber, ob das detektierte Assoziationssignal durch das Wirtsgen, die miRNA oder beide funktionellen Einheiten zusammen bedingt ist. Daher sind zur Klärung dieser Frage weitere Untersuchungen notwendig. Die Anreicherung BD-assoziiierter SNPs lokalisiert in miRNAs zusammen mit den Erkenntnissen aus unserer Zielgen-Analyse, liefern weitere Hinweise dafür, dass die assoziierten miRNAs auch eine mögliche kausale Rolle in der Krankheitsentstehung der BD spielen. Hierfür sind die bereits oben genannten *miR-499*, *miR-708* und *miR-1908* als vielversprechendste Kandidaten zu nennen.

Die *miR-499* liegt in einem mit BD genomweit signifikant assoziierten Locus auf Chromosom 20q11, einer Region hohen LDs, in der die Gene *GSS*, *MYH7B* und *TRPC4AP* lokalisiert sind (Green et al., 2013). Die *miR-499* stellt einen interessanten Kandidaten dar, es bedarf jedoch weiterer Analysen, um das kausale genetische Element innerhalb des breiten Assoziationssignals zu definieren.

MiR-499 reguliert apoptotische Signalwege über ihr Zielgen Calcineurin, eine Calcium-abhängige Proteinphosphatase (J. X. Wang et al., 2011). Des Weiteren stellte eine Studie eine Hochregulierung der *miR-499* in postmortalem Hirngewebe von Patienten mit Depression im Vergleich zu gesunden Kontrollen fest (Smalheiser et al., 2014). Weiterhin konnte eine differenzielle Expression der *miR-499* isoliert aus exosomalen Vesikeln von postmortalem Hirngewebe in Kontrollen und Patienten mit BD beobachtet werden (Banigan et al., 2013). Eine weiterführende Studie von Banach et al. (2017) untersuchte die Expression der drei miRNA Kandidaten, *miR-499*, *miR-708* und *miR-1908*, in peripherem Blut und deren Rolle als potenzielle Marker zur Stratifizierung affektiver Störungen. Sie beobachteten eine verminderte Expression der miRNAs in Patienten mit BD in einer akut depressiven Phase im Vergleich zum Zeitpunkt einer Remission. Bei der Klärung der Frage eines potenziellen Pathomechanismus könnte ein häufiger SNP (rs3746444) innerhalb der *Seed* Region der reifen *miR-499-3p* Hinweise liefern. Die *Seed* Region spielt eine wichtige Rolle bei der Erkennung und Bindung an das miRNA Zielgen und ist deshalb hoch konserviert (Gong et al., 2012; C. Liu et al., 2014). Zwar war der betreffende SNP nicht in unserer BD-Metaanalyse untersucht worden (Mühleisen et al., 2014), erreichte aber in einer Analyse der sieben MoodS Kohorten (2266 Patienten und 5028 Kontrollen) (Mühleisen et al., 2014) ohne die PGC-Daten (Sklar et al., 2011) mit einem *p*-Wert von 0,0023 nominale Signifikanz. Interessanterweise zeigte eine Studie, dass Patienten mit SCZ und dem Risikoallel rs3746444-G eher unter Halluzinationen und Motivationsverlust leiden (Zou et al., 2012). Dies könnte darauf hindeuten, dass rs3746444 einen Einfluss auf den depressiven und psychotischen Endophänotypen haben könnte, was das Assoziationssignal an diesem Locus aber nicht vollständig erklärt. Die genbasierten Tests deckten vier signifikante Zielgene für die *miR-499* auf. Darunter war *CACNB2* ein bereits beschriebener genomweit signifikanter Risikolocus für unterschiedliche psychiatrische Phänotypen, insbesondere SCZ (Lee et al., 2013; Mullins et al., 2021; Pardiñas et al., 2018; Ripke et al., 2014). Darüber hinaus wurde ein mechanistischer Zusammenhang zwischen der Dysregulation von Neuroplastizität und Calciumhomöostase - häufig beobachtet in Patienten mit BD - und einer erhöhten Expression von *miR-499* festgestellt (Martins et al., 2022). Diese Erhöhung wurde sowohl in peripherem Blut von Patienten mit BD als auch im Hippocampus von Ratten, die sozialer Isolation ausgesetzt waren, festgestellt (Martins et al., 2022). Martins et al. (2022) schlagen vor, dass *miR-499-5p* in BD-Patienten durch Herunterregulierung von *CACNB2* Einfluss auf die Dendritogenese und kognitive Funktion nehmen könnte. Ein weiteres signifikantes Zielgen war *GPC6*, ein Mitglied der Glypican Familie, die in einer Vielzahl von entwicklungsbiologischen Prozessen eine Rolle spielen. In Neuronen regulieren sie die neuronale Konnektivität durch Einflussnahme auf die Formierung und Stabilisierung von synaptischen Verbindungen, welche essenziell für die Bildung des neuronalen Netzwerks und dessen Funktion sind (Kamimura & Maeda, 2021). Zudem wurde das Gen *GPC6* mit

formalen Denkstörungen in Patienten mit SCZ in Verbindung gebracht (K. S. Wang et al., 2012).

Insgesamt war eine Anreicherung der Zielgene von *miR-499* in biologischen Prozessen zur Entwicklung des Gehirns zu beobachten. Die Analyse war auf im Gehirn exprimierte Zielgene konzentriert, was sich zumindest in Teilen in diesem Ergebnis widerspiegelt. Ferner wurde eine Rolle in der Regulation des Aktinzytoskeletts impliziert. Dieser Signalweg wurde bereits in einer Studie, die übereinstimmend differentiell exprimierte Gene für SCZ und BD untersucht hat, identifiziert (Zhao et al., 2015). Wie in zahlreichen wissenschaftlichen Arbeiten dargelegt wurde, bildet der mit zeitlicher und räumlicher Präzision geregelte Umbau des Zytoskeletts einen essenziellen Rahmen für den korrekten Ablauf neuronaler Zellmigration und Reifung, sowie für den Neuritenauswuchs, den Erhalt der synaptischen Dichte und neuronaler Plastizität (Auer et al., 2011; Bellenchi et al., 2007; De Curtis, 2007). Zusammengefasst stützen unsere Daten die Hypothese zur Beteiligung der *miR-499* an der Entwicklung der BD und machen sie zu einem plausiblen Kandidaten.

Die *miR-708* ist im ersten Intron von *ODZ4* lokalisiert (Sklar et al., 2011). Interessanterweise konnte die genomweit signifikante Assoziation des *ODZ4*-Lokus mit BD in zahlreichen GWAS-Metaanalysen repliziert werden (rs12289486, $p = 3,3 \times 10^{-8}$, Mullins et al. (2021)) (Green et al., 2013; Mühleisen et al., 2014; Mullins et al., 2021; Stahl et al., 2019). Studien zur Untersuchung des Expressionsprofils konnten unter anderem eine differentielle Expression von *miR-708* in Monozyten von Patienten mit einer postpartalen Psychose beobachten (Jones & Craddock, 2001). Eine Störung, die zu dem Spektrum der BD gezählt wird und oftmals das bevorstehende Auftreten einer BD ankündigt (Weigelt et al., 2013). In einer weiteren Studie von S. Xu et al. (2012) konnte gezeigt werden, dass oxidativer Stress das *miR-708* Expressionsprofil in primären Hippocampusneuronen der Maus signifikant verändert. Andere Studien konnten einen Zusammenhang zwischen *miR-708* und der Expression von Neuronatin beobachten (Vatsa et al., 2019), ein Membranprotein, das im Endoplasmatischen Retikulum das intrazelluläre Ca^{2+} -Level reguliert. Neuronatin spielt eine wichtige Rolle in zellulären Prozessen wie der Zellmigration, der neuronalen Entwicklung und Regulation der Plastizität hippocampaler Neurone (Oyang et al., 2011; Ryu et al., 2013; Vatsa et al., 2019). Die Zielgenanalyse offenbarte zwei signifikante Gene für die *miR-708*. Eines davon war der Transkriptionsfaktor *CREB1*, welcher eine kritische Rolle im zyklischen Adenosinmonophosphat (cAMP) Signalweg hat und ein bekanntes Risikogen für MD, BD und andere psychiatrische Störungen ist (Carlezon et al., 2005; Li et al., 2014; Maher et al., 2010; Xiao et al., 2018). In Verhaltensstudien am Tier konnten Forscher zeigen, dass *CREB1* auch an der Ausbildung von Angst und MD beteiligt ist (T. L. Wallace et al., 2004). Darüber hinaus ist dieses Gen in der früh-einsetzenden familiären MD (Maher et al., 2010), Wirkung von Antidepressiva (Blendy, 2006), aggressivem Verhalten (Perlis et al.,

2007), neuronaler Plastizität sowie der Gedächtnisbildung involviert (Weeber et al., 2002). Xiao et al. (2018) untersuchten den Einfluss des diagnostischen Status auf die *CREB1* mRNA-Expression anhand von postmortalen Hirngewebebeobachtungen und stellten eine signifikante Herunterregulierung von *CREB1* mRNA bei psychiatrischen Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollen fest. Zudem zeigten Protein-Protein-Interaktionsanalysen, dass das Proteinprodukt von *CREB1* mit mehreren durch GWAS identifizierte Risikogene für psychiatrische Erkrankungen interagiert (Xiao et al., 2018). Unsere Pathwayanalyse hingegen lieferte keine überzeugenden Hinweise für eine Anreicherung von Zielgenen von *miR-708* in biologischen Prozessen, die relevant für einen psychiatrischen Phänotyp sein könnten.

Die dritte miRNA die als interessanter Kandidat in unserer Studie impliziert wurde ist *miR-1908*. Sie ist innerhalb des ersten Introns von *FADS1* auf Chromosom 11 lokalisiert. Bisher sind in der Literatur nur wenige Hinweise auf die funktionale Rolle von *miR-1908* beschrieben. Eine wissenschaftliche Arbeit identifizierte *miR-1908* als einen Krebsbiomarker (Rawlings-Goss et al., 2014). Eine andere Publikation beobachtete, dass *miR-1908* Bestandteil einer miRNA-Clusters ist, der den *MARK1* Signalweg herunterreguliert und damit die Zellproliferation und Differenzierung beeinflusst (Ye et al., 2014). Außerdem validierte eine weiterführende Studie neue *miR-1908* Zielgene und deren Funktion in neuronalen glutamatergen Synapsen (Kim et al., 2016). Darunter waren zwei Gene, *GRIN1* und *GRM4*, die zuvor schon mit einer BD-Suszeptibilität assoziiert wurden (Fallin et al., 2005; Mundo et al., 2003). Zusätzlich stellten Kim et al. (2016) fest, dass die Expression der *miR-1908* nach Langzeitbehandlung mit Valproinsäure, welche auch als Phasenprophylaktikum eingesetzt wird, in neuronalen Vorläuferzellen von Patienten mit BD reduziert war. Die Behandlung von neuronalen Vorläuferzellen gesunder Kontrollen mit Valproinsäure zeigte im Gegenzug adverse Effekte. In einer aktuellen Untersuchung von Toste et al. (2023) wurden genetische Varianten identifiziert, die mit der Expression von 30 miRNAs im sich entwickelnden humanen Gehirn assoziiert waren ($FDR < 0,05$). In dieser Studie wurde ein miRNA-eQTL identifiziert, für den überzeugende Daten vorliegen, die auf eine Assoziation mit BD hinweisen ($rs174561, p < 1.5 \times 10^{-4}$) (Toste et al., 2023). Dieses Ergebnis wird zusätzlich durch das Signal identifiziert in einer der größten GWAS zur BD gestützt ($p = 1,83 \times 10^{-11}$) (Mullins et al., 2021). Der SNP *rs174561* befindet sich innerhalb der pri-miRNA Haarnadelstruktur von *miR-1908*, was sich auf die Sekundärstruktur der miRNA auswirken könnte und möglicherweise zu einer erhöhten Thermostabilität führt. Diese Befunde unterstützen die Hypothese, dass eine erhöhte Expression von *miR-1908-5p* einen plausiblen Mechanismus darstellt, der die genetische Assoziation zwischen diesem Locus und der BD vermittelt. Außerdem konnte eine signifikante Anreicherung von häufigen mit der BD-assoziierten Varianten in den Zielgenen von *miR-1908* beobachtet werden ($p = 0,013$) (Toste et al., 2023). Zusätzlich konnten Toste und Kollegen zeigen,

dass eine erhöhte Expression der Zielgene von *miR-1908-5p*, ebenfalls eine Rolle spielt bei depressiver Symptomatik, Irritabilität, Volumen des äußeren Kleinhirns und der Schlafdauer in der Allgemeinbevölkerung. Diese Befunde unterstützen die Ansicht, dass veränderte miRNA-Expression die Anfälligkeit für die BD, aber auch für andere neuropsychiatrische Erkrankungen wie MD beeinflussen könnte.

Unsere Pathwayanalyse deutet darauf hin, dass durch *miR-1908* regulierte Zielgene eine Rolle in neuronalen Prozessen spielen könnten (GO-Unterkategorien: „*neuron projection*“ und „*nervous system development*“). Zusätzliche Evidenz für die Rolle biologischer Signalwege in der synaptischen Funktion und neuronalen Struktur („*synapse*“, „*neuron part*“, „*regulation of trans synaptic signaling*“, „*synaptic signaling*“) in der BD konnten Mullins et al., (2021) identifizieren. Weitere Untersuchungen des durch die *miR-1908* gesteuerten Netzwerks sind notwendig, um die Hypothese zu untermauern, dass neuronale Synapsen und Prozesse wichtige konvergierende Signalwege für BD-assoziierte Gene darstellen, die durch *miR-1908* reguliert werden.

Eine neuere Studie von Tielke et al. (2022) beobachtete eine signifikante Assoziation für die Gene *MIR499A*, *MIR708*, *MIR1908* und *MIR2113* mit BD in einem genbasierten Test, was die hier präsentierten Ergebnisse für die drei miRNAs, *MIR499A*, *MIR708* und *MIR1908*, weiter unterstützt. Besagte Analyse basierte auf einem größeren Datensatz, der die hier untersuchten Patienten und Kontrollen zum Großteil einschloss (Mullins et al., 2021). Weiter konnte die Arbeit mit einer Gen-Set-Analyse zeigen, dass Gene mit BD-Assoziation signifikant in den vorhergesagten, im Gehirn exprimierten Zielgenen der miRNAs *miR-137* ($p = 0,003$) und *miR-499A* ($p = 0,037$) angereichert sind (Tielke et al., 2022). Diese Untersuchung konnte damit zusätzliche Belege erbringen, dass das Netzwerk reguliert durch *miR-499* an der Entwicklung der BD beteiligt ist, und zwar sowohl durch die miRNA selbst als auch durch ihre Zielgene. Neben den Erkenntnissen basierend auf häufigen Varianten konnte auch eine seltene Variante (rs140486571) lokalisiert im *Stem-loop* von *miR-499* identifiziert werden (Tielke et al., 2022). Diese seltene genetische Variante zeigte eine statistisch nicht signifikante Überrepräsentation in Patienten mit BD im Vergleich mit gesunden Kontrollen. Eine *in-silico* Analyse zu den möglichen Auswirkungen der genetischen Variante sagte vorher, dass sie die Sekundärstruktur von *miR-499a* verändern könnte (Tielke et al., 2022). Gründend auf diesen Befunden wurde eine funktionelle Aufarbeitung von SNP rs140486571 durchgeführt. Es konnte gezeigt werden, dass die Expression und Prozessierung von *miR-499a* signifikant beeinflusst wurde, was wiederum zu einem Deregulieren der Zielgene führen könnte und damit einen Beitrag zur Ätiologie der BD leisten könnte (Tielke et al., 2022). Die Autoren schlagen als möglichen Mechanismus vor, dass SNP rs140486571 durch seine Nähe zur Drosha Spaltstelle, die pri-miRNA Prozessierung beeinträchtigt und zu einer Reduzierung von *miR-499a* führt.

Bisher ist die Regulation der Expression und weiteren Prozessierung von miRNAs, trotz intensiver Bemühungen diese aufzuklären, immer noch teilweise unklar (Gamazon et al., 2012; Gebert & MacRae, 2019; Treiber et al., 2018). Die Länge von pri-miRNAs beträgt 100-1000 bp (Maffioletti et al., 2014b) und die hier vorgestellte Analyse untersuchte häufige Varianten innerhalb der miRNA Loci und deren ± 20 kb flankierenden Bereichen, um die Detektion potenzieller regulatorischer Effekte zu ermöglichen. Weitere Untersuchungen sind jedoch erforderlich, um den Einfluss häufiger genetischer Varianten auf die Regulation der Expression von miRNAs zu klären. Darüber hinaus muss erforscht werden, ob und inwieweit das hier beschriebene Assoziationssignal das Expressionsniveau und die Funktion der untersuchten miRNA beeinflusst.

Die Fokussierung auf im Gehirn exprimierte Gene in unserer Zielgenanalyse stellt eine deutliche Limitation dar, da dies die Ergebnisse in Richtung neuronaler Prozesse verzerrt. Mögliche Effekte auf und durch Zielgene, die nicht im Gehirn exprimiert werden, wurden dadurch vernachlässigt. Zudem gibt es starke Belege für spatiotemporale Unterschiede der Genexpression im Gehirn, beispielsweise während verschiedener Entwicklungsphasen und in unterschiedlichen Hirnregionen (Colantuoni et al., 2011; Hawrylycz et al., 2012). Diese Unterschiede konnten jedoch bei der Auswahl der im Gehirn exprimierten Gene nicht berücksichtigt werden. Weiterführende Untersuchungen zur Validierung der bisherigen Ergebnisse sowie der Effekte der Zielgenregulation in biologisch relevanten Zelltypen und unterschiedlichen Entwicklungsstadien des Gehirns wird zu einem besseren Verständnis der Rolle von miRNAs in BD und anderen psychiatrischen Erkrankungen führen. Unsere Studie war zudem dadurch limitiert, dass die Untersuchung von *trans*-eQTL Effekten auf miRNA Expression – also die Beeinflussung der Genexpression von miRNAs durch Varianten an weit entfernten Stellen im Genom – nicht möglich war. Da jedoch heutige Studien vermuten, dass ein beträchtlicher Anteil der identifizierten miRNA eQTLs *trans*-eQTLs sind (Borel et al., 2011; Mustafa et al., 2024), könnten Untersuchungen zur Assoziation zwischen miRNA-*trans*-eQTLs und BD interessante Einblicke in die Regulation und Krankheitsentstehung geben.

Die Ergebnisse der funktionellen Analyse der *miR-499* und *miR-708* in hippocampalen Rattenneuronen ergaben keinen wesentlichen Beitrag dieser miRNAs zur Morphogenese dendritischer Dornfortsätze, die die Hauptorte synaptischen Kontakts darstellen. Dennoch können nur die Ergebnisse für *miR-499* als ausreichend verlässlich angesehen werden, da die Expression des *miR-708* Konstrukts die *miR-708* in primären Neuronen nicht effektiv erhöhte und daher eine Einschätzung des Effekts einer Überexpression von *miR-708* nicht möglich war. Es müssen also weitere Untersuchungen zur Expression und dem funktionellen Einfluss von *miR-708* vorgenommen werden, um eine robuste Hypothese zu erstellen. Neben der Betrachtung einer Überexpression ist es zudem auch notwendig die Einflüsse eines Funktionsverlust von *miR-499* und *miR-708* zu verstehen,

bevor definitive Schlussfolgerungen bezüglich der Rolle dieser miRNAs bei der Morphogenese dendritischer Dornfortsätze gezogen werden können. Die ersten Einblicke, die erreicht werden konnten, dienen als Grundlage für zukünftige Experimente zur umfassenden Untersuchung der potenziellen Auswirkungen dieser miRNAs auf die synaptische Funktion beispielsweise durch Ergänzung von Immunozytochemie-Analysen von synaptischen Markerproteinen oder elektrophysiologischen Aufzeichnungen. Des Weiteren könnten diese miRNAs auch andere Aspekte der neuronalen Morphologie regulieren, wie beispielsweise die Dendritenverzweigung oder das Axonwachstum. Darüber hinaus könnten Untersuchungen zur Lokalisierung und Expression dieser miRNAs in verschiedenen Gehirnregionen zusätzliche Einblicke in ihre Rolle bei der Regulation neuronaler Prozesse ermöglichen. Diese Methoden und Fragestellungen können dabei helfen, die spezifischen neuronalen Netzwerkveränderungen zu charakterisieren, die mit der Pathophysiologie der BD verbunden sein könnten.

Zusammenfassend geben die Ergebnisse der hier präsentierten Studie Hinweise darauf, dass die im Gehirn exprimierten miRNAs, *miR-499*, *miR-708* und *miR-1908* eine Rolle bei der Krankheitsentstehung der BD spielen. Wie genau sie regulatorisch über ihre Zielgene biologische Signalwege zur Entwicklung der BD beeinflussen, geht über den Rahmen dieser Arbeit hinaus und wird Gegenstand von zukünftigen Studien sein.

5.2 Mehrfach betroffene kubanische Familien

Ermittlung des Polygenen Risikoscores

In der Untersuchung der mehrfach mit BD betroffenen kubanischen Familien konnte keine signifikante Erhöhung des PRS in Patienten mit BD im Vergleich zu nicht betroffenen Familienmitgliedern festgestellt werden. Dadurch motiviert wurden betroffene Individuen der Familien ausgewählt und mittels WES untersucht. Diese Methode erwies sich als geeignet das allelische Spektrum des Exoms zu erfassen und erlaubte die Identifizierung von seltenen und potenziell funktionellen genetischen Varianten. Unsere Ergebnisse lassen jedoch keine definitive Schlussfolgerung zu und es besteht die Möglichkeit, dass die hohe Prävalenz von BD in diesen Familien durch die gemeinsamen Effekte häufiger genetischer Varianten erklärt werden kann.

Die vorliegende Studie hat die folgenden Limitationen, die bei der Interpretation der Ergebnisse miteinbezogen werden müssen: i) Bisher wurde keine optimale p -Wert Schwelle zur Berechnung eines PRS für BD auf Grundlage der verwendeten Daten etabliert (Mullins et al., 2021; Stahl et al., 2019). Für die Analysen wurden daher zehn verschiedene p -Wert Schwellen für die verwendeten Varianten getestet. Entsprechend bestand auch die Notwendigkeit, die Schwelle für Signifikanz für die zehn durchgeführten Tests zu korrigieren. Bei der Berechnung des PRS unter Verwendung der ausschließlich genomweit signifikanten Risikovarianten konnte ein nominal signifikant höherer PRS in Patienten mit BD festgestellt werden. Ein Signal, das allerdings nicht die Korrektur für multiples Testen überstand. ii) Der Probenumfang für die Analyse des PRS war gering (17 Patienten mit BD und 6 gesunde Individuen) was eine begrenzte statistische *Power* und Aussagekraft zur Folge hat. iii) Ausgehend von der Annahme, dass ein erhöhtes polygenes Risiko in den untersuchten Familien kausal für die Ausbildung einer BD war, wäre zu erwarten, dass auch nicht betroffene verwandte Familienmitglieder einen höheren PRS aufweisen und diese Individuen dann durch Fehlen anderer Risikofaktoren die psychiatrische Störung nicht entwickelt haben. Um diese Fragestellung adäquat untersuchen zu können, müsste beispielsweise ein Vergleich zwischen den gesunden Familienmitgliedern und einer populationsspezifischen Kohorte gesunder Individuen stammend aus der südöstlichen Region Kubas durchgeführt werden wie beispielsweise in der Studie von Andlauer et al. (2021), in der Familien, Patienten und Kontrollen mit andalusischer Abstammung untersucht wurden. Diese Studie von Andlauer et al. (2021) befasste sich mit der Analyse von 395 Patienten aus mehrfach betroffenen Familien mit BD und einer unabhängigen Kohorte von 438 Patienten und Kontrollen. Die Autoren zeigten, dass Mitglieder von mehrfach betroffenen Familien mit BD unabhängig vom Diagnosestatus einen höheren PRS für BD, SCZ und MD hatten. Dieser erhöhte PRS für BD und SCZ war darüber hinaus in den Mitgliedern der mehrfach betroffenen Familien nach

Korrektur für multiples Testen statistisch signifikant (Andlauer et al., 2021). Außerdem hatten diese familiären Patienten mit BD einen signifikant höheren BD PRS als gesunde Familienmitglieder und unverwandte Patienten mit BD (Andlauer et al., 2021). Folglich, so vermuten die Autoren, war die hohe Inzidenz für BD in diesen Familien möglicherweise auf die erhöhte Anzahl häufigen Risikovarianten zurückzuführen. Diese zu unserer Studie gegensätzliche Beobachtung könnte ebenfalls darauf hindeuten, dass die Stichprobengröße von nur zwei Familien in unsere Studie die statistische Aussagekraft erheblich einschränkt, insbesondere auch durch das Fehlen von unabhängigen Patienten und Kontrollen aus der gleichen Population. Zudem ist es möglich, dass die Suszeptibilität für BD in den beiden kubanischen Familien eher durch seltene und höher penetrante genetische Varianten als durch polygene Effekte bedingt ist.

Analyse der WES-Daten und die Identifizierung seltener Kandidatenvarianten

In dieser Arbeit wurden mittels WES 17 nicht-synonyme und potenziell funktionelle, seltene genetische Varianten identifiziert, die eine mögliche Rolle bei der Krankheitsentstehung der BD spielen. Für jede der identifizierten Varianten wurde eine höchstens unvollständige Penetranz festgestellt, was im Hinblick auf die genetische Architektur der BD nicht überraschend ist. Selbst seltene CNVs, welche im Bereich der psychiatrischen Erkrankungen den potenziell größten genetischen Effekt haben, zeigen eine reduzierte Penetranz (Green et al., 2016; Kirov et al., 2014).

Zu den interessantesten Befunden dieser Studie zählt eine seltene genetische Variante, identifiziert in Kuba I, im kodierenden Bereich des Gens *SERPING1*. Dieses im humanen Gehirn exprimierte Gen kodiert für den C1-Esterase-Inhibitor, ein stark glykolisiertes Plasmaprotein, welches in der Regulierung des Komplementsystems involviert ist. Das Protein hemmt C1r und C1s des ersten Komplementfaktors und reguliert auf diese Weise seine Aktivierung (Johnsrud et al., 2015). Bemerkenswerterweise ist *SERPING1* unter den genomweit signifikanten Befunden einer großen GWAS für SCZ (rs9420, $p = 2,24 \times 10^{-9}$) und fand weitere Bestätigung in der zurzeit größten GWAS für SCZ (rs9420, $p = 3,10 \times 10^{-10}$) (Ripke et al., 2014; Trubetskoy et al., 2022). Interessanterweise wurde mit rund 0,68 eine substanzielle genetische Korrelation zwischen BD und SCZ beobachtet (Grotzinger et al., 2022; Lee et al., 2013; Ripke et al., 2014). Eine weitere Studie konnte zeigen, dass mehrere Gene des Komplementsystems, darunter *SERPING1*, eine signifikant differentielle Expression in postmortalem Hirngewebe in einer Subgruppe von Patienten mit SCZ im Vergleich mit gesunden Kontrollen zeigte (Carlström et al., 2021). Die Identifikation der seltenen Variante lokalisiert in *SERPING1* in unserer mehrfach betroffenen Familie könnte demnach auch als weitere Evidenz für die überlappende genetische Ätiologie zwischen psychiatrischen Erkrankungen, insbesondere zwischen BD und SCZ aufgefasst werden. Des Weiteren wurde das Komplementsystem als zentraler

biologischer Signalweg identifiziert, über den seltene CNVs das Risiko für SCZ durch Beeinflussung der Synapseneliminierung erhöhen könnten (Sekar et al., 2016). Die in dieser Arbeit identifizierte genetische Variante führt zu einer Substitution der Aminosäure Leucin mit Phenylalanin (p.L349F), welche innerhalb einer beta-Faltblattstruktur des Proteins liegt (<http://www.uniprot.org>). Dieser Basenaustausch wurde von den verwendeten Prädiktionsalgorithmen als potenziell funktionell eingeschätzt und eine mögliche Veränderung der räumlichen Struktur des Proteins könnte dessen Funktion modifizieren. Darüber hinaus ist *SERPING1* ein bekanntes Risikogen für das hereditäre Angioödem (HAE, *hereditary angioedema*). Die in dieser Studie identifizierte Variante war jedoch nicht als kausale HAE-Mutation in etablierten klinischen Datenbanken gelistet (Blanch et al., 2003). Zusätzlich wurden keine klinischen Merkmale eines HAE in den Familienmitgliedern von Kuba I berichtet. Bemerkenswerterweise wurde in einer Studie von Fouche et al. (2014) ein möglicher Zusammenhang zwischen dem HAE und MD hergestellt. Diese Assoziation könnte womöglich auf die chronischen und lebensbedrohlichen klinischen Charakteristika von HAE zurückzuführen sein. Andererseits könnte es aber auch ein Hinweis auf potenzielle pleiotropische Effekte seltener Varianten in diesem Gen sein.

Die zweite priorisierte genetische Variante, die in Kuba I identifiziert werden konnte, liegt in dem Gen *TMEM220*. Nach bestem Wissen ist bisher keine Studie bekannt, die über eine potenzielle Rolle von *TMEM220* in einer psychiatrischen Erkrankung berichtet. Jabbari et al. (2018) untersuchten jedoch die WES-Daten von 390 Patienten mit einer idiopathischen Epilepsie und 572 gesunden Kontrollen und identifizierten eine assoziierte Deletion (228550 bp), die mehrere Gene *ADPRM*, *MAGOH2P*, *MYH1*, *MYH2*, *MYH3*, *MYHAS*, *SCO1* und *TMEM220* umfasste. Zudem gibt es Hinweise darauf, dass psychiatrische Störungen, wie MD, häufige Komorbiditäten bei Epilepsie darstellen können. Sie können einer Epilepsiediagnose vorausgehen, mit ihr zusammen auftreten oder ihr folgen (Gaitatzis et al., 2004; Kanner et al., 2012). Zusammengenommen bleibt die Evidenz aus der Literatur jedoch schwach und begrenzt.

In Kuba II implizierten seltene und potenziell funktionelle genetische Varianten insgesamt 15 Kandidatengene von denen 11 eine Expression im humanen Gehirn zeigten. Es gab keine Überschneidung der 17 potenziellen Kandidatengene, die in dieser Arbeit identifiziert wurden, mit den bis dahin identifizierten Befunden aus NGS-Studien für BD (Y. C. Chen et al., 2013; Cruceanu et al., 2013; Georgi et al., 2014; Goes et al., 2016; Kataoka et al., 2016; Kerner et al., 2013; Rao et al., 2017; Strauss et al., 2014; Szatkiewicz et al., 2019). Auch in aktuelleren Untersuchungen sind diese potenziell funktionellen genetischen Varianten sowie die implizierten Kandidatengene nicht identifiziert worden (Forstner et al., 2020; Toma et al., 2021). Zum einen könnte dies die ausgeprägte genetische Heterogenität sowie die diversen biologischen Signalwege, die in der Ätiologie der BD eine Rolle spielen, widerspiegeln. Zum anderen sind hier populationsspezifische

Effekte, methodische und technologische Unterschiede zwischen den Studien, insbesondere in Bezug auf die angewandten Filterkriterien und Definition der Kandidatenvarianten, als Gründe zu nennen.

Die heute größte exomweite Analyse für die BD wurde von Palmer et al. (2022) durchgeführt und umfasste 13933 Patienten und 14422 Kontrollen zusammengestellt aus 13 unterschiedlichen Kohorten aus sechs Ländern. Keine der untersuchten Varianten und Gene erreichte exomweite Signifikanz. Es wurde jedoch eine Anreicherung von seltenen PTVs in Genen gefunden, die unter starkem evolutionärem Druck stehen. Außerdem konnte eine Anreicherung dieser sehr seltenen PTVs in Genen beobachtet werden, die durch eine exomweite Metaanalyse für SCZ (SCHEMA; 24248 Patienten und 97322 Kontrollen) impliziert wurden. Diese Beobachtung stützt die Sicht auf psychiatrische Erkrankungen als ein Spektrum mit geteilten und überlappenden Symptomen sowie einer gemeinsamen genetischen Ätiologie, die besonders in der Kategorie der seltenen und protein-trunkierenden Varianten liegen könnte. Die in unserer Studie identifizierten seltenen und potenziell funktionellen Varianten sind nur teilweise in der BipEx-Datenbank vertreten (zwölf von 17), was darauf hinweisen könnte, dass die übrigen Varianten so selten sind, dass die Kohortengröße nicht ausreicht, um sie zu identifizieren. Es ist jedoch auch möglich, dass sie ausschließlich innerhalb der kubanischen Population oder sogar dieser Familie auftreten. Für unsere Kandidatenvarianten, die in der BipEx Kohorte ebenfalls vorhanden waren, sind teilweise zu wenige Allele beobachtet worden (< 10), sodass kein p -Wert der χ^2 Statistik in der BipEx Datenbank berichtet wurde (fünf der zwölf Varianten). Diese Tatsache bestätigt die außerordentliche Seltenheit der genetischen Varianten, lieferte jedoch keine weitere statistische Evidenz für deren potenzielle Rolle in der Entstehung der BD. Aus diesem Grund wurde stattdessen mit einem Fisher's *exact* Test die Assoziations- p -Werte berechnet, die jedoch für keine der zwölf potenziell funktionellen Varianten korrektur stabil war und somit keine Aussage über die Größe oder Richtung des potenziellen Effekts zulässt. Einzig eine Variante lokalisiert in *THYN1* (rs143669769) hatte mit 0,012 einen nominal signifikanten p -Wert, jedoch stimmte die Effektrichtung nicht mit der in unseren Daten überein. Die Effektrichtung von insgesamt acht der zwölf Kandidatenvarianten war identisch mit der beobachteten Richtung in unserer Studie und damit höher als der zu erwartende Anteil. Ein einseitiger Binomialtest ($p = 0,194$), deutete jedoch darauf hin, dass der beobachtete Anteil an übereinstimmenden Effektrichtungen nicht signifikant größer war als der erwartete Anteil ($\alpha = 0,05$). Die in unserer Studie identifizierten seltenen Varianten liefern keine ausreichende statistische Evidenz, dass sie mit hoher Penetranz an der Entstehung der BD in den beiden untersuchten Familien beteiligt sind. Dies unterstreicht die Herausforderung, seltene genetische Varianten und deren Effekte in kleinen Stichproben zu identifizieren. Der Fakt, dass die Ergebnisse von Palmer et al. (2022) zeigten, dass insbesondere PTVs in Genen, die mit SCZ assoziiert sind, angereichert sind, stärkt die

Erkenntnis, dass die Grenzen klinischer Diagnosen für psychiatrische Erkrankungen zu scharf sind und geteilte Symptomatik und Ursachen mehr Berücksichtigung finden sollten (Yamada et al., 2020). Vor allem für die Diagnose und Therapie könnte die Aufklärung der genauen genetischen Ursachen und eine Patientenstratifizierung nach genau eben diesen ein enormes Potential bieten.

Die gezeigten Überschneidungen der BD mit anderen psychiatrischen Erkrankungen legt nahe, dass die heutigen Diagnosedefinitionen die tatsächlichen zugrundeliegenden genetischen Ursachen nicht klar erfasst (Craddock et al., 2005; Craddock & Owen, 2010; Owen et al., 2023). Die Einteilung der Patientenkohorten nach eben diesen Diagnosen in einem bivariaten System aus Patienten und gesunden Kontrollpersonen könnte die Identifizierung der genetischen Faktoren erschweren. Um weitere Hinweise zu den bislang identifizierten Kandidatenvarianten und deren potenzielle Funktion in der Entwicklung der BD zu erlangen, sind zusätzliche und umfassende Familien- und Replikationsstudien, notwendig. Der Zusammenschluss in internationale Konsortien zur Harmonisierung bereits generierter genetischer Daten und erklärtes Ziel z.B. des *Bipolar Sequencing Consortium*, ist eine mögliche Maßnahme (Shinozaki & Potash, 2014). Außerdem könnten detaillierte Untersuchungen von Familien mit spezifischen Subphänotypen eine Reduktion der genetischen Heterogenität bewirken und es ermöglichen weitere Erkenntnisse über die beobachteten Divergenzen klinischer Charakteristika der BD zu erlangen (Benazzi, 2009; Cruceanu et al., 2013).

In der vorliegenden Arbeit wurden die Daten des ExAC (<http://exac.broadinstitute.org>, version 0.3, 2015) dafür genutzt die MAF der identifizierten genetischen Varianten zu bestimmen. Das ExAC harmonisiert die WES-Daten von diversen Projekten und Kohorten und stellt der Wissenschaftsgemeinschaft auf diese Weise genetische Informationen von 60706 unverwandten Individuen zur Verfügung. Zum Zeitpunkt der Analyse im Jahr 2017 der beiden kubanischen Familien stellte diese Sammlung die größte Quelle humaner WES-Daten dar und gewann durch eine Erweiterung und Ergänzung um Gesamtgenomdaten noch größere Bedeutung (gnomAD) (Karczewski et al., 2020). Der Großteil der Individuen in dieser Datenbank ist von europäischer Herkunft (60 %). Zu kleineren Teilen sind Individuen von afrikanischer (9 %) und lateinamerikanischer Abstammung vertreten (10 %). Eine zuvor veröffentlichte Analyse stellte fest, dass in der kubanischen Bevölkerung ein ähnliches Mischverhältnis europäischer (72 %), afrikanischer (20 %) und indianischer (8 %) Abstammung vorliegt (Marcheco-Teruel et al., 2014). Eine zusätzlich durchgeführte Populationsstrukturanalyse konnte diese Befunde bestätigen und zeigte, dass die beiden untersuchten kubanischen Familien hauptsächlich mit Südeuropäern und gemischten amerikanischen Ethnien clusterten. Daher wurde die MAF-Abschätzung der genetischen Varianten aus den beiden kubanischen Familien basierend auf den ExAC-Daten vorgenommen. Gewiss sollte in zukünftigen Studien ein Vergleich der MAF von häufigen und seltenen Varianten in einer

populationsspezifischen Kontrollkohorte durchgeführt werden, was aber den Umfang dieser Studie überschritten hätte und als eine Limitation anzusehen ist.

Alle Kandidatenvarianten, die in einer der kubanischen Familien identifiziert wurden, wurden auch in der jeweils anderen kubanischen Familie und unverwandten angeheirateten Individuen untersucht, um dadurch erste Hinweise auf deren allgemeine Häufigkeit in der kubanischen Population zu erzielen. Keine der seltenen genetischen Varianten wurde auf diese Weise ausgeschlossen, was als Evidenz angesehen werden kann, dass die hier präsentierten Kandidatenvarianten tatsächlich selten sind. Die untersuchte Probengröße ist jedoch sehr klein und Populationsstratifikation kann nicht ausgeschlossen werden.

Die Auswahl der implizierten Kandidatengene beruhte auf einer individuellen Filter- und Priorisierungsstrategie. Auch wenn die verwendeten Prädiktionsalgorithmen im Feld etabliert sind und weitreichend genutzt werden, unterliegen deren Vorhersagen über potenzielle Auswirkungen einer genetischen Variante auf die Proteinstruktur und -funktion gewissen Limitationen und Annahmen der statistischen Modelle. Die verwendeten *Tools* integrieren Informationen wie die populationsspezifische MAF, die phylogenetische Konservierung und/oder spezifische Eigenschaften von Aminosäuren (Adzhubei et al., 2010; Chun & Fay, 2009; P. Kumar et al., 2009; Schwarz et al., 2014). Um aber eine fundierte Schlussfolgerung über den Effekt einer genetischen Variante zu ziehen, muss diese funktionell in einem geeigneten Zell- oder Tiermodell aufgearbeitet werden. Zellmodelle, die auf induzierten pluripotenten Stammzellen (iPSC) basieren, bieten den Vorteil genetische Varianten auf zelltyp- und patientenspezifische Weise untersuchen zu können. Neuere Studien deuten beispielsweise auf Störungen in der neuronalen Differenzierung, Migration und Reifung (Perrottelli et al., 2024) sowie auf spezifische molekulare Veränderungen in Gliazellen bei der BD hin (Amossé et al., 2023). Die Differenzierung in solche relevanten Zelltypen erlaubt es, potenziell krankheitsrelevante Phänotypen auf Ebene spezialisierter Zellfunktionen zu untersuchen und biologische Signalwege, die für die BD impliziert wurden, funktionell aufzuarbeiten, ohne dabei auf postmortales Hirngewebe angewiesen zu sein, was zudem mit weiteren funktionellen Einschränkungen verbunden ist.

Der Fokus dieser Studie lag auf der Identifizierung seltener Varianten (MAF < 0,1 %) mit einer höheren Penetranz. Da seltene Varianten und Varianten mit niedrigerer Frequenz (MAF 0,1-5 %) mit moderatem Effekt ebenfalls zur Entstehung einer BD beitragen könnten, könnte eine Neu-Evaluierung des Datensatzes mit relaxierten Filterkriterien vorgenommen werden. Eine ausführliche Interpretation dieser genetischen Varianten könnte als Basis für zukünftige Studien dienen und weitere Anhaltspunkte zur genetischen Architektur der BD im Allgemeinen und in den beiden kubanischen Familien im Speziellen liefern. Die kontinuierliche Weiterentwicklung der *in-silico* Prognosewerkzeuge und die Vergrößerung der Datensätze, mit denen diese Algorithmen

trainiert werden, könnten zu einer enormen Verbesserung der Schätzung funktioneller Effekte genetischer Varianten führen.

Unsere Untersuchung der beiden mehrfach betroffenen kubanischen Familien konnten seltene und potenziell funktionelle genetische Varianten identifizieren, die 17 unterschiedliche Gene implizierten. Diese Gene sind daher vielversprechende Kandidaten, die eine Rolle in der Ätiologie der BD spielen könnten. Die interessanteste genetische Variante, befand sich im Gen *SERPING1*, welches bereits als genomweit signifikantes Risikogen für SCZ berichtet wurde. Insgesamt präsentieren die vorliegenden Daten neue Kandidatengene für die Suszeptibilität für BD und könnten bei der Entdeckung der krankheitsrelevanten biologischen Signalwege und regulatorischer Netzwerke zukünftig von Bedeutung sein.

Zusammen mit den Erkenntnissen aus späteren Familienstudien zur BD wird die komplexe genetische Architektur der BD sichtbar (Forstner et al., 2020; Toma et al., 2018, 2021). Dies verdeutlicht die Notwendigkeit einer stetigen Erweiterung der Stichproben, Verbesserung des Studiendesigns und der Technologie sowie der Einbeziehung detaillierter phänotypischer Daten und einer gezielten Stratifizierung der Patientenkohorte (O'Connell et al., 2025). Zudem bietet die Erweiterung auf unterschiedliche Arten von genetischen Varianten (CNVs, Varianten niedriger MAF, Varianten in nichtkodierenden Bereichen des Genoms) ein erhebliches Potential den genetischen Beitrag weiter aufzuklären und das Spektrum psychiatrischer Erkrankung besser zu verstehen. In der Zukunft wird es von entscheidender Bedeutung sein, moderne Hochdurchsatztechnologien wie Einzelzellsequenzierung und Multi-Omics-Ansätze in der Erforschung der BD einzubinden. Diese Methoden ermöglichen eine noch präzisere Erfassung der genetischen und molekularen Mechanismen, die neuropsychiatrischen Erkrankungen wie der BD zugrunde liegen. Darüber hinaus wird die Integration von Umweltfaktoren und Epigenetik immer wichtiger, um das Zusammenspiel zwischen Genen und Umwelt bei der Krankheitsentstehung besser zu verstehen. Die Zukunft des Feldes könnte in der Entwicklung personalisierter Ansätze liegen. Die Fortschritte in der genetischen Forschung könnten es ermöglichen spezifische Risikoprofile für einzelne Patienten(-gruppen) zu erstellen, was präzisere Diagnoseverfahren und therapeutische Ansätze fördern würde. Schließlich wird die internationale Zusammenarbeit, die harmonisierte Datensätze und eine gemeinsame Nutzung von Ressourcen ermöglicht, entscheidend sein, um die genetischen Ursachen des Spektrums neuropsychiatrischer Erkrankungen umfassend zu entschlüsseln.

6 Zusammenfassung

Die bipolare Störung (BD) gehört zu den affektiven Störungen und zählt zu den schwerwiegendsten psychiatrischen Erkrankungen weltweit. Die BD ist gekennzeichnet durch extreme Stimmungsschwankungen und Betroffene erleben Phasen von übermäßigem Hochgefühl und Energie, sowie depressive Episoden. Die genauen Ursachen der BD sind noch nicht vollständig geklärt. Sie ist eine multifaktorielle Erkrankung, bei der genetische Faktoren eine wesentliche Rolle in der Krankheitsentstehung spielen. Bisher existiert kein zuverlässiger Diagnosetest und der Phänotyp der BD wird ausschließlich anhand klinischer Merkmale definiert, was sowohl die Diagnose als auch die Behandlung erschwert. Das übergeordnete Ziel der vorliegenden Arbeit war es einen Beitrag zur Aufklärung der genetischen Ätiologie der BD zu leisten, mit besonderem Fokus auf die Rolle von microRNAs (miRNAs) und seltenen genetischen Varianten in mehrfach betroffenen Familien.

Im ersten Teil der Arbeit wurde im Rahmen einer genomweiten Untersuchung die potenzielle Beteiligung von miRNAs an der Entstehung der BD untersucht. Dazu wurden die Einzel-SNP-Teststatistiken unserer BD GWAS (Mühleisen et. al, 2014) auf Basis ihrer genetischen Position in die drei Kategorien i) miRNA, ii) proteinkodierendes Gen und iii) intergenisch eingeteilt und separat auf Anreicherung von Assoziation untersucht. Ein Kategorietest bestätigte eine signifikante Anreicherung für BD-assoziierte SNPs in miRNA-Loci ($p = 0,037$) und in Genloci ($p = 2,39 \times 10^{-7}$), jedoch nicht für die SNPs in intergenischen Bereichen ($p > 0,99$). Eine Locus-basierte VEGAS-Analyse der BD GWAS-Daten identifizierte eine signifikante Assoziation mit BD für neun von 609 getesteten miRNAs. Als vielversprechendste Kandidaten wurden *miR-499*, *miR-708* und *miR-1908* priorisiert, da sie ein miRNA-spezifisches Signal aufwiesen und Expression im humanen Gehirn zeigten. Es konnte keine signifikante Anreicherung von mit BD-assoziierten Genen innerhalb der Zielgene dieser miRs festgestellt werden. Eine Analyse, der im humanen Gehirn exprimierten Zielgene der *miR-499*, *miR-708* und *miR-1908*, ergab hingegen eine signifikante Anreicherung in insgesamt 18 biologischen Signalwegen. Unter anderem waren relevante biologische Signalwege zur Bildung des zentralen Nervensystems ($p = 4,18 \times 10^{-2}$), des limbischen Systems ($p = 2,2 \times 10^{-3}$), des synaptischen Vesikeltransports ($p = 3,78 \times 10^{-2}$), sowie zur Entwicklung des Nervensystems ($p = 4,5 \times 10^{-3}$) vertreten. Eine funktionelle Aufarbeitung durch eine Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Professor Schratt zeigte, dass die Überexpression von *miR-499* hippocampalen Rattenneuronen keinen signifikanten Einfluss auf die Größe oder Dichte der Dornfortsätze hatte. Ausgehend von diesen gewonnenen Erkenntnissen, sind weitere genetische Studien auf der Grundlage umfangreicher Datensätze, sowie funktionelle Analysen in geeigneten Tier- und Zellmodellen notwendig, um präzisere Aussagen über

die genaue Funktion der priorisierten miRNAs und das durch sie regulierte Netzwerk treffen zu können.

Im zweiten Teil dieser Doktorarbeit wurden zwei kubanische, mehrfach betroffene Familien mit BD (Kuba I und Kuba II) auf Ebene häufiger und seltener genetischer Varianten untersucht, um deren Rolle bei der Krankheitsentstehung der BD zu klären. Unter Zuhilfenahme von SNP-Array Daten wurden die Verwandtschaftsverhältnisse innerhalb der beiden mehrfach betroffenen Familien durch Schätzung der Verwandtschaftsgrade basierend auf *identity by descent*-Proportionen validiert, wodurch eine kryptische Verwandtschaft zwischen den Familien ausgeschlossen werden konnte. Eine Populationsstrukturanalyse stellte fest, dass die beiden kubanischen Familien hauptsächlich mit Südeuropäern und gemischten amerikanischen Ethnien clusterten. Daher wurde die minore Allelfrequenz (MAF) der genetischen Varianten der beiden kubanischen Familien anhand der ExAC-Daten geschätzt, die Populationen mit überwiegend europäischer sowie zu geringeren Anteilen afrikanischer und lateinamerikanischer Herkunft repräsentieren. Zur Erfassung der kumulativen Effekte häufiger genetischer Varianten wurde ein polygener Risikoscore (PRS) berechnet. In den kubanischen Familien war der PRS von Patienten mit BD im Vergleich zu Familienmitgliedern ohne psychiatrische Erkrankung, oder einer anderen psychiatrischen Diagnose als BD nominal signifikant höher ($p = 0,027$), wenn die Analyse auf Varianten beschränkt war, die eine genomweit signifikante Assoziation ($p \leq 5 \times 10^{-8}$) in der BD GWAS von Stahl et al. (2019) aufwiesen. Anschließend wurden 15 Individuen mit einer Diagnose der BD aus den Familien Kuba I und II ausgewählt und mittels Exomsequenzierung (WES) auf sehr seltene genetische Varianten mit höherer Penetranz untersucht. Um eine Anreicherung dieser Varianten zu erzielen, konzentrierte sich die vorliegende Untersuchung auf Varianten mit einer MAF von $< 0,1\%$, die von allen Familienmitgliedern bzw. innerhalb der Teilfamilie geteilt wurden. Dieser Filterungsschritt gefolgt von einer Priorisierung nach geschätzt funktionellem Effekt resultierte in 17 Kandidatenvarianten, die 14 *missense* Varianten und 3 kleine InDels, die alle eine Leserasterverschiebung zur Folge hatten, umfassten. Zur Validierung dieser Kandidatenvarianten und zur Aufklärung ihrer Segregation wurden alle Individuen der beiden kubanischen Familien mittels Sanger-Sequenzierung untersucht. Keine der Varianten wurde in der entsprechenden anderen Familie oder in den unverwandten und angeheirateten Personen identifiziert, wodurch keine populationsspezifischen Effekte festgestellt werden konnten. Von den 17 durch die Kandidatenvarianten implizierten Gene zeigten 13 Gene eine Expression im humanen Gehirn. Zu den interessantesten Befunden dieser Studie zählte eine seltene genetische *missense* Variante (p.L349F), die in der Familie Kuba I identifiziert wurde. Diese Variante liegt im kodierenden Bereich des Gens *SERPING1*, welches für den C1-Esterase-Inhibitor kodiert und eine Rolle in der Regulierung des Komplementsystems spielt. Da *SERPING1* auch in einer der größten

GWAS für Schizophrenie (SCZ) ein genomweit signifikanter Befund ist (rs9420, $p = 3,10 \times 10^{-10}$) (Trubetskoy et al., 2022) stärkt dieser Befund die Hypothese einer überlappenden genetischen Ätiologie zwischen BD und SCZ. Um die Bedeutung dieser Kandidatenvarianten für die Entstehung der BD weiter zu untersuchen, wurden die Einzelvariantenstatistiken für 12 der 17 Kandidatenvarianten im unabhängigen Datensatz des BipEx-Projekts herangezogen, um die Assoziations- p -Werte mit einem Fisher's *exact* Test zu berechnen. Kein p -Wert war signifikant nach Korrektur für multiples Testen, jedoch war der p -Wert für die im Gen *THYN1* (p.H137Y) lokalisierte Variante nominal signifikant vor Korrektur mit der Bonferroni Methode ($p = 0,012$). Ferner zeigten die Ergebnisse einer nicht-parametrischen Kopplungsanalyse für keines der angewendeten Modelle (NPL_{pairs} und NPL_{all} Statistik) ein Kopplungssignal, welches die Schwelle von LOD > 2,2 überstieg. Insgesamt konnte keine weitere, überzeugende Evidenz für eine Beteiligung dieser seltenen und potenziell funktionellen Kandidatenvarianten an der Entstehung der BD gefunden werden.

Zusammenfassend leistet die vorliegende Arbeit einen wichtigen Beitrag zum besseren Verständnis der genetischen Ätiologie der BD. Erstmals wurde eine systematische, genomweite Untersuchung der Rolle von miRNAs sowie die Identifizierung sehr seltener und penetranter Varianten in mehrfach betroffenen Familien hinsichtlich ihres Beitrags zur Entstehung der BD durchgeführt. Die Ergebnisse bildeten bereits eine Grundlage für weiterführende Forschungen und trugen zur Weiterentwicklung des wissenschaftlichen Diskurses maßgeblich bei. Um die genetischen Ursachen umfassend aufzuklären, sind jedoch weitere Studien unerlässlich. Neben der Erweiterung der Kollektive in Bezug auf ihre Größe und Diversität der vertretenen Populationen ist eine Fokussierung auf das gesamte allelische Spektrum entlang seltener und häufiger Varianten wichtig. Insbesondere, da sowohl die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit als auch die aktuelle Datenlage neuerer Studien keine Hinweise auf eine signifikante Beteiligung von sehr seltenen und hoch penetranten genetischen Varianten liefern. Zukünftige Studien, die detaillierter phänotypisierte Kollektive unter Einsatz neuer Methoden untersuchen, haben das Potenzial, die komplexe genetische Architektur der BD genauer zu stratifizieren. Neben genetischen Studien sind auch funktionelle Untersuchungen zur Aufklärung der Rolle der identifizierten Risikogene und -varianten in geeigneten Tier- und Zellmodellen von entscheidender Bedeutung für ein tieferes Verständnis. Zusammen bilden diese Studien eine wichtige Grundlage für die Verbesserung und Weiterentwicklung der Diagnose sowie der Behandlung der BD, indem sie tiefere Einblicke in die genetische und phänotypische Komplexität der Erkrankung bieten.

Literaturverzeichnis

- Abecasis, G. R., Cherny, S. S., Cookson, W. O., & Cardon, L. R. (2002). Merlin — Rapid analysis of dense genetic maps using sparse gene flow trees. *Nature Genetics*, 30(1), 97–101. <https://doi.org/10.1038/ng786>
- Adzhubei, I. A., Schmidt, S., Peshkin, L., Ramensky, V. E., Gerasimova, A., Bork, P., Kondrashov, A. S., & Sunyaev, S. R. (2010). A method and server for predicting damaging missense mutations. *Nature Methods*, 7(4), 248–249. <https://doi.org/10.1038/nmeth0410-248>
- Alda, M., Hajek, T., Calkin, C., & O'Donovan, C. (2009). Treatment of bipolar disorder: New perspectives. *Annals of Medicine*, 41(3), 186–196. <https://doi.org/10.1080/07853890802409489>
- Amann, B. L., Radua, J., Wunsch, C., König, B., & Simhandl, C. (2017). Psychiatric and physical comorbidities and their impact on the course of bipolar disorder: A prospective, naturalistic 4-year follow-up study. *Bipolar Disorders*, 19(3), 225–234. <https://doi.org/10.1111/bdi.12495>
- Ament, S. A., Szelinger, S., Glusman, G., Ashworth, J., Hou, L., Akula, N., Shekhtman, T., Badner, J. A., Brunkow, M. E., Mauldin, D. E., Stittrich, A.-B., Rouleau, K., Detera-Wadleigh, S. D., Nurnberger, J. I., Edenberg, H. J., Gershon, E. S., Schork, N., Price, N. D., Gelinas, R., ... Roach, J. C. (2015). Rare variants in neuronal excitability genes influence risk for bipolar disorder. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(11), 3576–3581. <https://doi.org/10.1073/pnas.1424958112>
- American Psychiatric Association - DSM-5 Task Force. (2013). *Diagnostic and statistical manual of mental disorders: DSM-5TM* (5th ed.). American Psychiatric Publishing, Inc.
- Amossé, Q., Tournier, B. B., Badina, A. M., Marchand-Maillet, L., Abjean, L., Lengacher, S., Fancy, N., Smith, A. M., Leung, Y.-Y., Santer, V., Garibotto, V., Owen, D. R., Piguet, C., Ceyzériat, K., Tsartsalis, S., & Millet, P. (2023). Altered astrocytic and microglial homeostasis characterizes a decreased proinflammatory state in bipolar disorder. *BioRxiv*, 2023.10.29.564621. <https://doi.org/10.1101/2023.10.29.564621>
- Andlauer, T. F. M., Guzman-Parra, J., Streit, F., Strohmaier, J., González, M. J., Gil Flores, S., Cabaleiro Fabeiro, F. J., del Río Noriega, F., Perez, F. P., Haro González, J., Orozco Diaz, G., de Diego-Otero, Y., Moreno-Küstner, B., Auburger, G., Degenhardt, F., Heilmann-Heimbach, S., Herms, S., Hoffmann, P., Frank, J., ... Rietschel, M. (2021). Bipolar multiplex families have an increased burden of common risk variants for psychiatric disorders. *Molecular Psychiatry*, 26(4), 1286–1298. <https://doi.org/10.1038/S41380-019-0558-2>
- Auer, M., Hausott, B., & Klimaschewski, L. (2011). Rho GTPases as regulators of morphological neuroplasticity. *Annals of Anatomy*, 193(4), 259–266. <https://doi.org/10.1016/j.aanat.2011.02.015>

- Auton, A., Abecasis, G. R., Altshuler, D. M., Durbin, R. M., Bentley, D. R., Chakravarti, A., Clark, A. G., Donnelly, P., Eichler, E. E., Flicek, P., Gabriel, S. B., Gibbs, R. A., Green, E. D., Hurles, M. E., Knoppers, B. M., Korbel, J. O., Lander, E. S., Lee, C., Lehrach, H., ... Schloss, J. A. (2015). A global reference for human genetic variation. *Nature*, 526(7571), 68–74. <https://doi.org/10.1038/NATURE15393>
- Baca-Garcia, E., Perez-Rodriguez, M. M., Basurte-Villamor, I., López-Castromán, J., Fernandez del Moral, A. L., Jimenez-Arriero, M. A., Gronzalez de Rivera, J. L., Saiz-Ruiz, J., Leiva-Murillo, J. M., de Prado-Cumplido, M., Santiago-Mozos, R., Artés-Rodríguez, A., Oquendo, M. A., & de Leon, J. (2007). Diagnostic stability and evolution of bipolar disorder in clinical practice: a prospective cohort study. *Acta Psychiatrica Scandinavica*, 115(6), 473–480. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0447.2006.00984.x>
- Baldessarini, R., Henk, H., Sklar, A., Chang, J., & Leahy, L. (2008). Psychotropic medications for patients with bipolar disorder in the United States: polytherapy and adherence. *Psychiatric Services (Washington, D.C.)*, 59(10), 1175–1183. <https://doi.org/10.1176/PS.2008.59.10.1175>
- Baldessarini, R. J., Tondo, L., & Vázquez, G. H. (2019). Pharmacological treatment of adult bipolar disorder. *Molecular Psychiatry*, 24(2), 198–217. <https://doi.org/10.1038/S41380-018-0044-2>
- Bamshad, M. J., Ng, S. B., Bigham, A. W., Tabor, H. K., Emond, M. J., Nickerson, D. A., & Shendure, J. (2011). Exome sequencing as a tool for Mendelian disease gene discovery. *Nature Reviews. Genetics*, 12(11), 745–755. <https://doi.org/10.1038/NRG3031>
- Banach, E., Dmistrz-Weglarz, M., Pawlak, J., Kapelski, P., Szczepankiewicz, A., Rajewska-Rager, A., Slopień, A., Skibinska, M., Czerski, P., & Hauser, J. (2017). Dysregulation of miR-499, miR-708 and miR-1908 during a depression episode in bipolar disorders. *Neuroscience Letters*, 654, 117–119. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2017.06.019>
- Banigan, M. G., Kao, P. F., Kozubek, J. A., Winslow, A. R., Medina, J., Costa, J., Schmitt, A., Schneider, A., Cabral, H., Cagsal-Getkin, O., Vanderburg, C. R., & Delalle, I. (2013). Differential Expression of Exosomal microRNAs in Prefrontal Cortices of Schizophrenia and Bipolar Disorder Patients. *PLoS ONE*, 8(1), e48814. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0048814>
- Bartel, D. P. (2004). MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*, 116(2), 281–297. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14744438>
- Bartel, D. P. (2009). MicroRNAs: Target Recognition and Regulatory Functions. *Cell*, 136(2), 215–233. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2009.01.002>
- Baskerville, S., & Bartel, D. P. (2005). Microarray profiling of microRNAs reveals frequent coexpression with neighboring miRNAs and host genes. *RNA (New York, N.Y.)*, 11(3), 241–247. <https://doi.org/10.1261/RNA.7240905>

- Baum, A. E., Akula, N., Cabanero, M., Cardona, I., Corona, W., Klemens, B., Schulze, T. G., Cichon, S., Rietschel, M., Nöthen, M. M., Georgi, A., Schumacher, J., Schwarz, M., Abou Jamra, R., Höfels, S., Propping, P., Satagopan, J., Detera-Wadleigh, S. D., Hardy, J., & McMahon, F. J. (2008). A genome-wide association study implicates diacylglycerol kinase eta (DGKH) and several other genes in the etiology of bipolar disorder. *Molecular Psychiatry*, 13(2), 197–207. <https://doi.org/10.1038/sj.mp.4002012>
- Bavamian, S., Mellios, N., Lalonde, J., Fass, D. M., Wang, J., Sheridan, S. D., Madison, J. M., Zhou, F., Rueckert, E. H., Barker, D., Perlis, R. H., Sur, M., & Haggarty, S. J. (2015). Dysregulation of miR-34a Links Neuronal Development to Genetic Risk Factors for Bipolar Disorder. *Molecular Psychiatry*, 20(5), 573. <https://doi.org/10.1038/MP.2014.176>
- Begley, C. E., Annegers, J. F., Swann, A. C., Lewis, C., Coan, S., Schnapp, W. B., & Bryant-Comstock, L. (2001). The lifetime cost of bipolar disorder in the US: An estimate for new cases in 1998. *PharmacoEconomics*, 19(5), 483–495. <https://doi.org/10.2165/00019053-200119050-00004/METRICS>
- Bellenchi, G. C., Gurniak, C. B., Perlas, E., Middei, S., Ammassari-Teule, M., & Witke, W. (2007). N-cofilin is associated with neuronal migration disorders and cell cycle control in the cerebral cortex. *Genes and Development*, 21(18), 2347–2357. <https://doi.org/10.1101/gad.434307>
- Belmont, J. W., Hardenbol, P., Willis, T. D., Yu, F., Yang, H., Ch'Ang, L. Y., Huang, W., Liu, B., Shen, Y., Tam, P. K. H., Tsui, L. C., Waye, M. M. Y., Wong, J. T. F., Zeng, C., Zhang, Q., Chee, M. S., Galver, L. M., Kruglyak, S., Murray, S. S., ... Tanaka, T. (2003). The international HapMap project. *Nature*, 426(6968), 789–796. <https://doi.org/10.1038/nature02168>
- Benazzi, F. (2009). Classifying mood disorders by age-at-onset instead of polarity. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 33(1), 86–93. <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2008.10.007>
- Bienvenu, O. J., Davydow, D. S., & Kendler, K. S. (2011). Psychiatric diseases versus behavioral disorders and degree of genetic influence. *Psychological Medicine*, 41(1), 33–40. <https://doi.org/10.1017/S003329171000084X>
- Blanch, A., Roche, O., López-Granados, E., Fontán, G., & López-Trascasa, M. (2003). Erratum: Detection of C1 inhibitor (SERPING1/C1NH) mutations in exon 8 in patients with hereditary angioedema: evidence for 10 novel mutations. *Human Mutation*, 21(1), 102–102. <https://doi.org/10.1002/humu.9105>
- Blendy, J. A. (2006). The Role of CREB in Depression and Antidepressant Treatment. *Biological Psychiatry*, 59(12), 1144–1150. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2005.11.003>
- Borel, C., Deutsch, S., Letourneau, A., Migliavacca, E., Montgomery, S. B., Dimas, A. S., Vejnar, C. E., Attar, H., Gagnebin, M., Gehrig, C., Falconnet, E., Dupré, Y., Dermitzakis,

- E. T., & Antonarakis, S. E. (2011). Identification of cis- and trans-regulatory variation modulating microRNA expression levels in human fibroblasts. *Genome Research*, 21(1), 68. <https://doi.org/10.1101/GR.109371.110>
- Budde, M., Forstner, A. J., Adorjan, K., Schaupp, S. K., Nöthen, M. M., & Schulze, T. G. (2017). Genetics of bipolar disorder. *Nervenarzt*, 88(7), 755–759. <https://doi.org/10.1007/s00115-017-0336-9>
- Burton, P. R., Clayton, D. G., Cardon, L. R., Craddock, N., Deloukas, P., Duncanson, A., Kwiatkowski, D. P., McCarthy, M. I., Ouwehand, W. H., Samani, N. J., Todd, J. A., Donnelly, P., Barrett, J. C., Davison, D., Easton, D., Evans, D., Leung, H. T., Marchini, J. L., Morris, A. P., ... Compston, A. (2007). Genome-wide association study of 14,000 cases of seven common diseases and 3,000 shared controls. *Nature*, 447(7145), 661–678. <https://doi.org/10.1038/nature05911>
- Cai, X., Hagedorn, C. H., & Cullen, B. R. (2004). Human microRNAs are processed from capped, polyadenylated transcripts that can also function as mRNAs. *RNA*, 10(12). <https://doi.org/10.1261/rna.7135204>
- Carlezon, W. A., Duman, R. S., & Nestler, E. J. (2005). The many faces of CREB. *Trends in Neurosciences*, 28(8), 436–445. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2005.06.005>
- Carlström, E. L., Niazi, A., Etemadikhah, M., Halvardson, J., Enroth, S., Stockmeier, C. A., Rajkowska, G., Nilsson, B., & Feuk, L. (2021). Transcriptome analysis of post-mortem brain tissue reveals up-regulation of the complement cascade in a subgroup of schizophrenia patients. *Genes*, 12(8), 1242. <https://doi.org/10.3390/GENES12081242/S1>
- Chang, C. C., Chow, C. C., Tellier, L. C. A. M., Vattikuti, S., Purcell, S. M., & Lee, J. J. (2015). Second-generation PLINK: Rising to the challenge of larger and richer datasets. *GigaScience*, 4(1), 7. <https://doi.org/10.1186/s13742-015-0047-8>
- Charney, A. W., Ruderfer, D. M., Stahl, E. A., Moran, J. L., Chambert, K., Belliveau, R. A., Forty, L., Gordon-Smith, K., Di Florio, A., Lee, P. H., Bromet, E. J., Buckley, P. F., Escamilla, M. A., Fanous, A. H., Fochtmann, L. J., Lehrer, D. S., Malaspina, D., Marder, S. R., Morley, C. P., ... Sklar, P. (2017). Evidence for genetic heterogeneity between clinical subtypes of bipolar disorder. *Translational Psychiatry* 2017 7:1, 7(1), e993–e993. <https://doi.org/10.1038/tp.2016.242>
- Chen, D. T., Jiang, X., Akula, N., Shugart, Y. Y., Wendland, J. R., Steele, C. J. M., Kassem, L., Park, J. H., Chatterjee, N., Jamain, S., Cheng, A., Leboyer, M., Muglia, P., Schulze, T. G., Cichon, S., Nöthen, M. M., Rietschel, M., & McMahon, F. J. (2013). Genome-wide association study meta-analysis of European and Asian-ancestry samples identifies three novel loci associated with bipolar disorder. *Molecular Psychiatry*, 18(2), 195–205. <https://doi.org/10.1038/mp.2011.157>
- Chen, Y. C., Carter, H., Parla, J., Kramer, M., Goes, F. S., Pirooznia, M., Zandi, P. P., McCombie, W. R., Potash, J. B., & Karchin, R. (2013). A Hybrid Likelihood Model for Sequence-

- Based Disease Association Studies. *PLoS Genetics*, 9(1), e1003224. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1003224>
- Choi, Y., & Chan, A. P. (2015). PROVEAN web server: a tool to predict the functional effect of amino acid substitutions and indels. *Bioinformatics*, 31(16), 2745–2747. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btv195>
- Chun, S., & Fay, J. C. (2009). Identification of deleterious mutations within three human genomes. *Genome Research*, 19(9), 1553–1561. <https://doi.org/10.1101/gr.092619.109>
- Ciapparelli, A., Dell’Osso, L., Tundo, A., Pini, S., Chiavacci, M. C., di Sacco, I., & Cassano, G. B. (2001). Electroconvulsive therapy in medication-nonresponsive patients with mixed mania and bipolar depression. *The Journal of Clinical Psychiatry*, 62(7), 552–555. <https://doi.org/10.4088/JCP.V62N07A09>
- Clarkin, J. F., Carpenter, D., Hull, J., Wilner, P., & Glick, I. (1998). Effects of Psychoeducational Intervention for Married Patients with Bipolar Disorder and Their Spouses. *Psychiatric Services*, 49(4), 531–533. <https://doi.org/10.1176/ps.49.4.531>
- Claussnitzer, M., Cho, J. H., Collins, R., Cox, N. J., Dermitzakis, E. T., Hurles, M. E., Kathiresan, S., Kenny, E. E., Lindgren, C. M., MacArthur, D. G., North, K. N., Plon, S. E., Rehm, H. L., Risch, N., Rotimi, C. N., Shendure, J., Soranzo, N., & McCarthy, M. I. (2020). A brief history of human disease genetics. *Nature*, 577(7789), 179–189. <https://doi.org/10.1038/S41586-019-1879-7>
- Colantuoni, C., Lipska, B. K., Ye, T., Hyde, T. M., Tao, R., Leek, J. T., Colantuoni, E. A., Elkahloun, A. G., Herman, M. M., Weinberger, D. R., & Kleinman, J. E. (2011). Temporal dynamics and genetic control of transcription in the human prefrontal cortex. *Nature*, 478(7370), 519–523. <https://doi.org/10.1038/NATURE10524>
- Collins, F. S., Green, E. D., Guttmacher, A. E., & Guyer, M. S. (2003). A vision for the future of genomics research. *Nature* 2003 422:6934, 422(6934), 835–847. <https://doi.org/10.1038/nature01626>
- Craddock, N., O’Donovan, M. C., & Owen, M. J. (2005). The genetics of schizophrenia and bipolar disorder: Dissecting psychosis. *Journal of Medical Genetics*, 42(3), 193–204. <https://doi.org/10.1136/jmg.2005.030718>
- Craddock, N., & Owen, M. J. (2010). The Kraepelinian dichotomy - Going, going... but still not gone. *British Journal of Psychiatry*, 196(2), 92–95. <https://doi.org/10.1192/bjp.bp.109.073429>
- Craddock, N., & Sklar, P. (2009). Genetics of bipolar disorder: successful start to a long journey. *Trends in Genetics*, 25(2), 99–105. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2008.12.002>
- Craddock, N., & Sklar, P. (2013). Genetics of bipolar disorder. *The Lancet*, 381(9878), 1654–1662. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(13\)60855-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(13)60855-7)

- Cruceanu, C., Ambalavanan, A., Spiegelman, D., Gauthier, J., Lafrenière, R. G., Dion, P. A., Alda, M., Turecki, G., & Rouleau, G. A. (2013). Family-based exome-sequencing approach identifies rare susceptibility variants for lithium-responsive bipolar disorder. *Genome*, 56(10), 634–640. <https://doi.org/10.1139/gen-2013-0081>
- Cruceanu, C., Schmouth, J.-F., Torres-Platas, S. G., Lopez, J. P., Ambalavanan, A., Darcq, E., Gross, F., Breton, B., Spiegelman, D., Rochefort, D., Hince, P., Petite, J. M., Gauthier, J., Lafrenière, R. G., Dion, P. A., Greenwood, C. M., Kieffer, B. L., Alda, M., Turecki, G., & Rouleau, G. A. (2018). Rare susceptibility variants for bipolar disorder suggest a role for G protein-coupled receptors. *Molecular Psychiatry*, 23(10), 2050–2056. <https://doi.org/10.1038/mp.2017.223>
- De Curtis, I. (2007). Functions of Rac GTPases during neuronal development. *Developmental Neuroscience*, 30(1–3), 47–58. <https://doi.org/10.1159/000109851>
- Deangelis, M. M., Wang, D. G., & Hawkins, T. L. (1995). Solid-phase reversible immobilization for the isolation of PCR products. *Nucleic Acids Research*, 23(22), 4742. <https://doi.org/10.1093/NAR/23.22.4742>
- Del Bosque-Plata, L., Mart Inez-Mart, E., Espinoza-Camacho, M. A., & Gragnoli, C. (2021). *The Role of TCF7L2 in Type 2 Diabetes*. <https://doi.org/10.2337/db20-0573>
- Dell’Osso, B., Grancini, B., Vismara, M., de Cagna, F., Maggi, M., Molle, M., Cremaschi, L., Miller, S., Ketter, T. A., & Altamura, A. C. (2016). Age at onset in patients with bipolar I and II disorder: A comparison of large sample studies. *Journal of Affective Disorders*, 201, 57–63. <https://doi.org/10.1016/j.jad.2016.04.009>
- Dembek, C., Mackie, de M., Modi, K., Zhu, Y., Niu, X., & Grinnell, T. (2023). The economic and humanistic burden of bipolar disorder in adults in the United States. *Annals of General Psychiatry*, 22(1), 1–10. <https://doi.org/10.1186/S12991-023-00440-7/FIGURES/3>
- Denli, A. M., Tops, B. B. J., Plasterk, R. H. A., Ketting, R. F., & Hannon, G. J. (2004). Processing of primary microRNAs by the Microprocessor complex. *Nature* 2004 432:7014, 432(7014), 231–235. <https://doi.org/10.1038/nature03049>
- Devlin, B., & Roeder, K. (1999). Genomic control for association studies. *Biometrics*, 55(4), 997–1004. <https://doi.org/10.1111/J.0006-341X.1999.00997.X>
- DGBS e.V., & DGPPN e.V. (2019). *DGBS e.V. und DGPPN e.V.: S3-Leitlinie zur Diagnostik und Therapie Bipolarer Störungen. Langversion*.
- Diener, C., Keller, A., & Meese, E. (2024). The miRNA–target interactions: An underestimated intricacy. *Nucleic Acids Research*, 52(4), 1544–1557. <https://doi.org/10.1093/NAR/GKAD1142>
- Duan, J., Shi, J., Fiorentino, A., Leites, C., Chen, X., Moy, W., Chen, J., Alexandrov, B. S., Usheva, A., He, D., Freda, J., O’Brien, N. L., McQuillin, A., Sanders, A. R., Gershon, E. S., Delisi, L. E., Bishop, A. R., Gurling, H. M. D., Pato, M. T., ... Gejman, P. V. (2014). A rare functional noncoding variant at the GWAS-Implicated MIR137/MIR2682 locus might confer

- risk to schizophrenia and bipolar disorder. *American Journal of Human Genetics*, 95(6), 744–753. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2014.11.001>
- Duncan, L., Shen, H., Gelaye, B., Meijssen, J., Ressler, K., Feldman, M., Peterson, R., & Domingue, B. (2019). Analysis of polygenic risk score usage and performance in diverse human populations. *Nature Communications* 2019 10:1, 10(1), 1–9. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-11112-0>
- Edwards, A. W. F., Terwilliger, J. D., & Ott, J. (1996). Handbook of Human Genetic Linkage. *Biometrics*, 52(3), 1161. <https://doi.org/10.2307/2533082>
- Ellingford, J. M., Ahn, J. W., Bagnall, R. D., Baralle, D., Barton, S., Campbell, C., Downes, K., Ellard, S., Duff-Farrier, C., FitzPatrick, D. R., Grealley, J. M., Ingles, J., Krishnan, N., Lord, J., Martin, H. C., Newman, W. G., O'Donnell-Luria, A., Ramsden, S. C., Rehm, H. L., ... Whiffin, N. (2022). Recommendations for clinical interpretation of variants found in non-coding regions of the genome. *Genome Medicine*, 14(1), 1–19. <https://doi.org/10.1186/S13073-022-01073-3/FIGURES/3>
- Escaramís, G., Docampo, E., & Rabionet, R. (2015). A decade of structural variants: description, history and methods to detect structural variation. *Briefings in Functional Genomics*, 14(5), 305–314. <https://doi.org/10.1093/BFGP/ELV014>
- Fajutrao, L., Locklear, J., Prialux, J., & Heyes, A. (2009). A systematic review of the evidence of the burden of bipolar disorder in Europe. *Clinical Practice and Epidemiology in Mental Health*, 5(1), 3. <https://doi.org/10.1186/1745-0179-5-3>
- Fallin, M. D., Lasseter, V. K., Avramopoulos, D., Nicodemus, K. K., Wolyniec, P. S., McGrath, J. A., Steel, G., Nestadt, G., Liang, K.-Y., Haganir, R. L., Valle, D., & Pulver, A. E. (2005). Bipolar I Disorder and Schizophrenia: A 440-Single-Nucleotide Polymorphism Screen of 64 Candidate Genes among Ashkenazi Jewish Case-Parent Trios. *The American Journal of Human Genetics*, 77(6), 918–936. <https://doi.org/10.1086/497703>
- Ferrari, A. J., Stockings, E., Khoo, J. P., Erskine, H. E., Degenhardt, L., Vos, T., & Whiteford, H. A. (2016). The prevalence and burden of bipolar disorder: findings from the Global Burden of Disease Study 2013. *Bipolar Disorders*, 18(5), 440–450. <https://doi.org/10.1111/bdi.12423>
- Ferreira, M. A. R., O'Donovan, M. C., Meng, Y. A., Jones, I. R., Ruderfer, D. M., Jones, L., Fan, J., Kirov, G., Perlis, R. H., Green, E. K., Smoller, J. W., Grozeva, D., Stone, J., Nikolov, I., Chambert, K., Hamshere, M. L., Nimgaonkar, V. L., Moskvina, V., Thase, M. E., ... Craddock, N. (2008). Collaborative genome-wide association analysis supports a role for ANK3 and CACNA1C in bipolar disorder. *Nature Genetics*, 40(9), 1056–1058. <https://doi.org/10.1038/ng.209>
- Forstner, A. J., Degenhardt, F., Schrat, G., & Nöthen, M. M. (2013). MicroRNAs as the cause of schizophrenia in 22q11.2 deletion carriers, and possible implications for

- idiopathic disease: a mini-review. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 6, 47. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2013.00047>
- Forstner, A. J., Fischer, S. B., Schenk, L. M., Strohmaier, J., Maaser-Hecker, A., Reinbold, C. S., Sivalingam, S., Hecker, J., Streit, F., Degenhardt, F., Witt, S. H., Schumacher, J., Thiele, H., Nürnberg, P., Guzman-Parra, J., Orozco Diaz, G., Auburger, G., Albus, M., Borrmann-Hassenbach, M., ... Cichon, S. (2020). Whole-exome sequencing of 81 individuals from 27 multiply affected bipolar disorder families. *Translational Psychiatry* 2020 10:1, 10(1), 1–10. <https://doi.org/10.1038/s41398-020-0732-y>
- Forstner, A. J., Hofmann, A., Maaser, A., Sumer, S., Khudayberdiev, S., Mühleisen, T. W., Leber, M., Schulze, T. G., Strohmaier, J., Degenhardt, F., Treutlein, J., Mattheisen, M., Schumacher, J., Breuer, R., Meier, S., Herms, S., Hoffmann, P., Lacour, A., Witt, S. H., ... Nöthen, M. M. (2015). Genome-wide analysis implicates microRNAs and their target genes in the development of bipolar disorder. *Translational Psychiatry*, 5(11), e678–e678. <https://doi.org/10.1038/tp.2015.159>
- Fouche, A. S., Saunders, E. F. H., & Craig, T. (2014). Depression and anxiety in patients with hereditary angioedema. *Annals of Allergy, Asthma and Immunology*, 112(4), 371–375. <https://doi.org/10.1016/j.anai.2013.05.028>
- Fountoulakis, K. N., Kasper, S., Andreassen, O., Blier, P., Okasha, A., Severus, E., Versiani, M., Tandon, R., Möller, H.-J. J., & Vieta, E. (2012). Efficacy of pharmacotherapy in bipolar disorder: A report by the WPA section on pharmacopsychiatry. *European Archives of Psychiatry and Clinical Neuroscience*, 262(1 SUPPL.), 1–48. <https://doi.org/10.1007/s00406-012-0323-x>
- Friedman, R. C., Farh, K. K. H., Burge, C. B., & Bartel, D. P. (2009). Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome Research*, 19(1), 92–105. <https://doi.org/10.1101/gr.082701.108>
- Frye, M. A., Ha, K., Kanba, S., Kato, T., McElroy, S. L., Özerdem, A., Vázquez, G., & Vieta, E. (2011). International Consensus Group on Depression Prevention in Bipolar Disorder. *The Journal of Clinical Psychiatry*, 72(10), 1295–1310. <https://doi.org/10.4088/JCP.10123co1c>
- Gaitatzis, A., Trimble, M. R., & Sander, J. W. (2004). The psychiatric comorbidity of epilepsy. *Acta Neurologica Scandinavica*, 110(4), 207–220. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0404.2004.00324.x>
- Gamazon, E. R., Ziliak, D., Im, H. K., Lacroix, B., Park, D. S., Cox, N. J., & Huang, R. S. (2012). Genetic architecture of microRNA expression: Implications for the transcriptome and complex traits. *American Journal of Human Genetics*, 90(6), 1046–1063. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2012.04.023>
- Gebert, L. F. R., & MacRae, I. J. (2019). Regulation of microRNA function in animals. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 20(1), 21. <https://doi.org/10.1038/S41580-018-0045-7>

- Geddes, J. R., Burgess, S., Hawton, K., Jamison, K., & Goodwin, G. M. (2004). Long-Term Lithium Therapy for Bipolar Disorder: Systematic Review and Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials. *American Journal of Psychiatry*, 161(2), 217–222. <https://doi.org/10.1176/appi.ajp.161.2.217>
- Geddes, J. R., & Miklowitz, D. J. (2013). Treatment of bipolar disorder. *The Lancet*, 381(9878), 1672–1682. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(13\)60857-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(13)60857-0)
- Georgi, B., Craig, D., Kember, R. L., Liu, W., Lindquist, I., Nasser, S., Brown, C., Egeland, J. A., Paul, S. M., & Bućan, M. (2014). Genomic View of Bipolar Disorder Revealed by Whole Genome Sequencing in a Genetic Isolate. *PLoS Genetics*, 10(3), e1004229. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1004229>
- Ghaemi, S. N., Boiman, E. E., & Goodwin, F. K. (2000). Diagnosing bipolar disorder and the effect of antidepressants: a naturalistic study. *The Journal of Clinical Psychiatry*, 61(10), 804–808; quiz 809. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11078046>
- Ghebranious, N., Giampietro, P. F., Wesbrook, F. P., & Rezkalla, S. H. (2007). A novel microdeletion at 16p11.2 harbors candidate genes for aortic valve development, seizure disorder, and mild mental retardation. *American Journal of Medical Genetics. Part A*, 143A(13), 1462–1471. <https://doi.org/10.1002/AJMG.A.31837>
- Gibson, G. (2010). Hints of hidden heritability in GWAS. *Nature Genetics*, 42(7), 558–560. <https://doi.org/10.1038/ng0710-558>
- Gibson, G. (2011). Rare and Common Variants: Twenty arguments. *Nature Reviews. Genetics*, 13(2), 135. <https://doi.org/10.1038/NRG3118>
- Gitlin, M. J., Swendsen, J., Heller, T. L., & Hammen, C. (1995). Relapse and impairment in bipolar disorder. *The American Journal of Psychiatry*, 152(11), 1635–1640. <https://doi.org/10.1176/AJP.152.11.1635>
- Godnic, I., Zorc, M., Jevsinek Skok, D., Calin, G. A., Horvat, S., Dovc, P., Kovac, M., & Kunej, T. (2013). Genome-wide and species-wide in silico screening for intragenic MicroRNAs in human, mouse and chicken. *PloS One*, 8(6). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0065165>
- Goes, F. S., Pirooznia, M., Parla, J. S., Kramer, M., Ghiban, E., Mavruk, S., Chen, Y. C., Monson, E. T., Willour, V. L., Karchin, R., Flickinger, M., Locke, A. E., Levy, S. E., Scott, L. J., Boehnke, M., Stahl, E., Moran, J. L., Hultman, C. M., Landén, M., ... Potash, J. B. (2016). Exome sequencing of familial bipolar disorder. *JAMA Psychiatry*, 73(6), 590–597. <https://doi.org/10.1001/jamapsychiatry.2016.0251>
- Gong, J., Tong, Y., Zhang, H. M., Wang, K., Hu, T., Shan, G., Sun, J., & Guo, A. Y. (2012). Genome-wide identification of SNPs in MicroRNA genes and the SNP effects on MicroRNA target binding and biogenesis. *Human Mutation*, 33(1), 254–263. <https://doi.org/10.1002/humu.21641>
- Grant, S. F. A., Thorleifsson, G., Reynisdottir, I., Benediktsson, R., Manolescu, A., Sainz, J., Helgason, A., Stefansson, H., Emilsson, V., Helgadóttir, A., Styrkarsdóttir, U.,

- Magnusson, K. P., Walters, G. B., Palsdottir, E., Jonsdottir, T., Gudmundsdottir, T., Gylfason, A., Saemundsdottir, J., Wilensky, R. L., ... Stefansson, K. (2006). Variant of transcription factor 7-like 2 (TCF7L2) gene confers risk of type 2 diabetes. *Nature Genetics* 2006 38:3, 38(3), 320–323. <https://doi.org/10.1038/ng1732>
- Gratten, J., Wray, N. R., Keller, M. C., & Visscher, P. M. (2014). Large-scale genomics unveils the genetic architecture of psychiatric disorders. *Nature Neuroscience*, 17(6), 782–790. <https://doi.org/10.1038/nn.3708>
- Green, E. K., Hamshere, M., Forty, L., Gordon-Smith, K., Fraser, C., Russell, E., Grozeva, D., Kirov, G., Holmans, P., Moran, J. L., Purcell, S., Sklar, P., Owen, M. J., O'donovan, M. C., Jones, L., Jones, I. R., & Craddock, N. (2013). Replication of bipolar disorder susceptibility alleles and identification of two novel genome-wide significant associations in a new bipolar disorder case-control sample. *Molecular Psychiatry*, 18(12), 1302–1307. <https://doi.org/10.1038/MP.2012.142>
- Green, E. K., Rees, E., Walters, J. T. R., Smith, K. G., Forty, L., Grozeva, D., Moran, J. L., Sklar, P., Ripke, S., Chambert, K. D., Genovese, G., McCarroll, S. A., Jones, I., Jones, L., Owen, M. J., O'Donovan, M. C., Craddock, N., & Kirov, G. (2016). Copy number variation in bipolar disorder. *Molecular Psychiatry*, 21(1), 89–93. <https://doi.org/10.1038/mp.2014.174>
- Guipponi, M., Santoni, F. A., Setola, V., Gehrig, C., Rotharmel, M., Cuenca, M., Guillin, O., Dikeos, D., Georgantopoulos, G., Papadimitriou, G., Curtis, L., Méary, A., Schürhoff, F., Jamain, S., Avramopoulos, D., Leboyer, M., Rujescu, D., Pulver, A., Campion, D., ... Antonarakis, S. E. (2014). Exome sequencing in 53 sporadic cases of schizophrenia identifies 18 putative candidate genes. *PloS One*, 9(11). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0112745>
- Gusella, J. F., Wexler, N. S., Conneally, P. M., Naylor, S. L., Anderson, M. A., Tanzi, R. E., Watkins, P. C., Ottina, K., Wallace, M. R., Sakaguchi, A. Y., Young, A. B., Shoulson, I., Bonilla, E., & Martin, J. B. (1983). A polymorphic DNA marker genetically linked to Huntington's disease. *Nature* 1983 306:5940, 306(5940), 234–238. <https://doi.org/10.1038/306234a0>
- Ha, M., & Kim, V. N. (2014). Regulation of microRNA biogenesis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 15(8), 509–524. <https://doi.org/10.1038/nrm3838>
- Hackenberg, M., Rodríguez-Ezpeleta, N., & Aransay, A. M. (2011). miRanalyzer: an update on the detection and analysis of microRNAs in high-throughput sequencing experiments. *Nucleic Acids Research*, 39(Web Server issue). <https://doi.org/10.1093/NAR/GKR247>
- Hara, T., Owada, Y., & Takata, A. (2022). Genetics of bipolar disorder: insights into its complex architecture and biology from common and rare variants. *Journal of Human Genetics* 2022 68:3, 68(3), 183–191. <https://doi.org/10.1038/s10038-022-01046-9>

- Hawi, Z., Tong, J., Dark, C., Yates, H., Johnson, B., & Bellgrove, M. A. (2018). The role of cadherin genes in five major psychiatric disorders: A literature update. *American Journal of Medical Genetics. Part B, Neuropsychiatric Genetics : The Official Publication of the International Society of Psychiatric Genetics*, 177(2), 168–180. <https://doi.org/10.1002/AJMG.B.32592>
- Hawrylycz, M. J., Lein, E. S., Guillozet-Bongaarts, A. L., Shen, E. H., Ng, L., Miller, J. A., van de Lagemaat, L. N., Smith, K. A., Ebbert, A., Riley, Z. L., Abajian, C., Beckmann, C. F., Bernard, A., Bertagnolli, D., Boe, A. F., Cartagena, P. M., Chakravarty, M. M., Chapin, M., Chong, J., ... Jones, A. R. (2012). An anatomically comprehensive atlas of the adult human brain transcriptome. *Nature*, 489(7416), 391–399. <https://doi.org/10.1038/nature11405>
- He, L., & Hannon, G. J. (2004). MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation. *Nature Reviews Genetics* 2004 5:7, 5(7), 522–531. <https://doi.org/10.1038/nrg1379>
- Herculano-Houzel, S. (2009). The human brain in numbers: a linearly scaled-up primate brain. *Frontiers in Human Neuroscience*, 3, 31. <https://doi.org/10.3389/neuro.09.031.2009>
- Hewitt, T., Alural, B., Tilak, M., Wang, J., Becke, N., Chartley, E., Perreault, M., Haggarty, S. J., Sheridan, S. D., Perlis, R. H., Jones, N., Mellios, N., & Lalonde, J. (2023). Bipolar disorder-iPSC derived neural progenitor cells exhibit dysregulation of store-operated Ca²⁺ entry and accelerated differentiation. *Molecular Psychiatry*, 28(12), 5237. <https://doi.org/10.1038/S41380-023-02152-6>
- Hindorff, L. A., Sethupathy, P., Junkins, H. A., Ramos, E. M., Mehta, J. P., Collins, F. S., & Manolio, T. A. (2009). Potential etiologic and functional implications of genome-wide association loci for human diseases and traits. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(23), 9362–9367. <https://doi.org/10.1073/PNAS.0903103106>
- Hirakawa, H., Terao, T., Muronaga, M., & Ishii, N. (2020). Adjunctive bright light therapy for treating bipolar depression: A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Brain and Behavior*, 10(12), e01876. <https://doi.org/10.1002/BRB3.1876>
- Howie, B., Marchini, J., & Stephens, M. (2011). Genotype Imputation with Thousands of Genomes. *G3: Genes/Genomes/Genetics*, 1(6), 457–470. <https://doi.org/10.1534/g3.111.001198>
- Howie, B. N., Donnelly, P., & Marchini, J. (2009). A flexible and accurate genotype imputation method for the next generation of genome-wide association studies. *PLoS Genetics*, 5(6), e1000529. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1000529>
- Jabbari, K., Bobbili, D. R., Lal, D., Reinthaler, E. M., Schubert, J., Wolking, S., Sinha, V., Motameny, S., Thiele, H., Kawalia, A., Altmüller, J., Toliat, M. R., Kraaij, R., van Rooij, J., Uitterlinden, A. G., Arfan Ikram, M., Zara, F., Lehesjoki, A. E., Krause, R., ... Nürnberg,

- P. (2018). Rare gene deletions in genetic generalized and Rolandic epilepsies. *PLoS ONE*, 13(8), e0202022. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0202022>
- Johnsrud, I., Kulseth, M. A., Rødningen, O. K., Landrø, L., Helsing, P., Nielsen, E. W., & Heimdal, K. (2015). A nationwide study of Norwegian patients with hereditary angioedema with C1 inhibitor deficiency identified six novel mutations in SERPING1. *PLoS ONE*, 10(7), e0131637. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0131637>
- Jones, I., & Craddock, N. (2001). Familiality of the Puerperal Trigger in Bipolar Disorder: Results of a Family Study. *American Journal of Psychiatry*, 158(6), 913–917. <https://doi.org/10.1176/appi.ajp.158.6.913>
- Judd, L. L., Akiskal, H. S., Schettler, P. J., Coryell, W., Endicott, J., Maser, J. D., Solomon, D. A., Leon, A. C., & Keller, M. B. (2003). A Prospective Investigation of the Natural History of the Long-term Weekly Symptomatic Status of Bipolar II Disorder. *Archives of General Psychiatry*, 60(3), 261. <https://doi.org/10.1001/archpsyc.60.3.261>
- Judd, L. L., Akiskal, H. S., Schettler, P. J., Endicott, J., Maser, J., Solomon, D. A., Leon, A. C., Rice, J. A., & Keller, M. B. (2002). The Long-term Natural History of the Weekly Symptomatic Status of Bipolar I Disorder. *Archives of General Psychiatry*, 59(6), 530. <https://doi.org/10.1001/archpsyc.59.6.530>
- Kamimura, K., & Maeda, N. (2021). Glypicans and Heparan Sulfate in Synaptic Development, Neural Plasticity, and Neurological Disorders. *Frontiers in Neural Circuits*, 15, 595596. <https://doi.org/10.3389/FNCIR.2021.595596/BIBTEX>
- Kanner, A. M., Schachter, S. C., Barry, J. J., Hersdorffer, D. C., Mula, M., Trimble, M., Hermann, B., Ettinger, A. E., Dunn, D., Caplan, R., Ryvlin, P., & Gilliam, F. (2012). Depression and epilepsy: Epidemiologic and neurobiologic perspectives that may explain their high comorbid occurrence. *Epilepsy and Behavior*, 24(2), 156–168. <https://doi.org/10.1016/j.yebeh.2012.01.007>
- Karczewski, K. J., Francioli, L. C., Tiao, G., Cummings, B. B., Alföldi, J., Wang, Q., Collins, R. L., Laricchia, K. M., Ganna, A., Birnbaum, D. P., Gauthier, L. D., Brand, H., Solomonson, M., Watts, N. A., Rhodes, D., Singer-Berk, M., England, E. M., Seaby, E. G., Kosmicki, J. A., ... Xavier, R. J. (2020). The mutational constraint spectrum quantified from variation in 141,456 humans. *Nature* 2020 581:7809, 581(7809), 434–443. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2308-7>
- Kataoka, M., Matoba, N., Sawada, T., Kazuno, A. A., Ishiwata, M., Fujii, K., Matsuo, K., Takata, A., & Kato, T. (2016). Exome sequencing for bipolar disorder points to roles of de novo loss-of-function and protein-altering mutations. *Molecular Psychiatry*, 21(7), 885–893. <https://doi.org/10.1038/mp.2016.69>
- Kato, T. (2019). Current understanding of bipolar disorder: Toward integration of biological basis and treatment strategies. *Psychiatry and Clinical Neurosciences*, 73(9), 526–540. <https://doi.org/10.1111/PCN.12852>

- Kawamata, T., & Tomari, Y. (2010). Making RISC. *Trends in Biochemical Sciences*, 35(7), 368–376. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2010.03.009>
- Kerner, B., Rao, A. R., Christensen, B., Dandekar, S., Yourshaw, M., & Nelson, S. F. (2013). Rare Genomic Variants Link Bipolar Disorder with Anxiety Disorders to CREB-Regulated Intracellular Signaling Pathways. *Frontiers in Psychiatry*, 4, 154. <https://doi.org/10.3389/fpsy.2013.00154>
- Kim, A. H., Reimers, M., Maher, B., Williamson, V., McMichael, O., McClay, J. L., van den Oord, E. J. C. G., Riley, B. P., Kendler, K. S., & Vladimirov, V. I. (2010). MicroRNA expression profiling in the prefrontal cortex of individuals affected with schizophrenia and bipolar disorders. *Schizophrenia Research*, 124(1–3), 183–191. <https://doi.org/10.1016/j.schres.2010.07.002>
- Kim, Y., Zhang, Y., Pang, K., Kang, H., Park, H., Lee, Y., Lee, B., Lee, H.-J., Kim, W.-K., Geum, D., & Han, K. (2016). Bipolar Disorder Associated microRNA, miR-1908-5p, Regulates the Expression of Genes Functioning in Neuronal Glutamatergic Synapses. *Experimental Neurobiology*, 25(6), 296. <https://doi.org/10.5607/en.2016.25.6.296>
- Kirov, G., Rees, E., Walters, J. T. R., Escott-Price, V., Georgieva, L., Richards, A. L., Chambert, K. D., Davies, G., Legge, S. E., Moran, J. L., McCarroll, S. A., O'Donovan, M. C., & Owen, M. J. (2014). The penetrance of copy number variations for schizophrenia and developmental delay. *Biological Psychiatry*, 75(5), 378–385. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2013.07.022>
- Kong, A., & Cox, N. J. (1997). Allele-Sharing Models: LOD Scores and Accurate Linkage Tests. *Am. J. Hum. Genet*, 61, 1179–1188.
- Kosik, K. S. (2006). The neuronal microRNA system. *Nature Reviews Neuroscience* 2006 7:12, 7(12), 911–920. <https://doi.org/10.1038/nrn2037>
- Kozomara, A., & Griffiths-Jones, S. (2011). MiRBase: Integrating microRNA annotation and deep-sequencing data. *Nucleic Acids Research*, 39(SUPPL. 1). <https://doi.org/10.1093/nar/gkq1027>
- Kozomara, A., & Griffiths-Jones, S. (2014). MiRBase: Annotating high confidence microRNAs using deep sequencing data. *Nucleic Acids Research*, 42(D1), D68–73. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt1181>
- Kruglyak, L., Daly, M. J., Reeve-Daly, M. P., & Lander, E. S. (1996). Parametric and nonparametric linkage analysis: a unified multipoint approach. *American Journal of Human Genetics*, 58(6), 1347–1363.
- Kryukov, G. V., Schmidt, S., & Sunyaev, S. (2005). Small fitness effect of mutations in highly conserved non-coding regions. *Human Molecular Genetics*, 14(15), 2221–2229. <https://doi.org/10.1093/HMG/DDI226>
- Kumar, P., Henikoff, S., & Ng, P. C. (2009). Predicting the effects of coding non-synonymous variants on protein function using the SIFT algorithm. *Nature Protocols*, 4(7), 1073–1082. <https://doi.org/10.1038/nprot.2009.86>

- Kumar, R. A., Karamohamed, S., Sudi, J., Conrad, D. F., Brune, C., Badner, J. A., Gilliam, T. C., Nowak, N. J., Cook, E. H., Dobyns, W. B., & Christian, S. L. (2008). Recurrent 16p11.2 microdeletions in autism. *Human Molecular Genetics*, 17(4), 628–638. <https://doi.org/10.1093/HMG/DDM376>
- Kupka, R. W., Altshuler, L. L., Nolen, W. A., Suppes, T., Luckenbaugh, D. A., Leverich, G. S., Frye, M. A., Keck, P. E., McElroy, S. L., Grunze, H., & Post, R. M. (2007). Three times more days depressed than manic or hypomanic in both bipolar I and bipolar II disorder. *Bipolar Disorders*, 9(5), 531–535. <https://doi.org/10.1111/j.1399-5618.2007.00467.x>
- Lander, E. S., Linton, L. M., Birren, B., Nusbaum, C., Zody, M. C., Baldwin, J., Devon, K., Dewar, K., Doyle, M., Fitzhugh, W., Funke, R., Gage, D., Harris, K., Heaford, A., Howland, J., Kann, L., Lehoczy, J., Levine, R., McEwan, P., ... Morgan, M. J. (2001). Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature*, 409(6822), 860–921. <https://doi.org/10.1038/35057062>
- Le Pecq, J. B., & Paoletti, C. (1966). A new fluorometric method for RNA and DNA determination. *Analytical Biochemistry*, 17(1), 100–107. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(66\)90012-1](https://doi.org/10.1016/0003-2697(66)90012-1)
- Lee, S. H., Ripke, S., Neale, B. M., Faraone, S. V., Purcell, S. M., Perlis, R. H., Mowry, B. J., Thapar, A., Goddard, M. E., Witte, J. S., Absher, D., Agartz, I., Akil, H., Amin, F., Andreassen, O. A., Anjorin, A., Anney, R., Anttila, V., Arking, D. E., ... Wray, N. R. (2013). Genetic relationship between five psychiatric disorders estimated from genome-wide SNPs. *Nature Genetics*, 45(9), 984–994. <https://doi.org/10.1038/ng.2711>
- Lee, S. H., Wray, N. R., Goddard, M. E., & Visscher, P. M. (2011). Estimating Missing Heritability for Disease from Genome-wide Association Studies. *The American Journal of Human Genetics*, 88(3), 294–305. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2011.02.002>
- Lek, M., Karczewski, K. J., Minikel, E. V., Samocha, K. E., Banks, E., Fennell, T., O'Donnell-Luria, A. H., Ware, J. S., Hill, A. J., Cummings, B. B., Tukiainen, T., Birnbaum, D. P., Kosmicki, J. A., Duncan, L. E., Estrada, K., Zhao, F., Zou, J., Pierce-Hoffman, E., Berghout, J., ... Williams, A. L. (2016). Analysis of protein-coding genetic variation in 60,706 humans. *Nature* 2016 536:7616, 536(7616), 285–291. <https://doi.org/10.1038/nature19057>
- Levy, N. A., & Janicak, P. G. (2000). Calcium channel antagonists for the treatment of bipolar disorder. *Bipolar Disorders*, 2(2), 108–119. <https://doi.org/10.1034/J.1399-5618.2000.020204.X>
- Lewis, C. M., & Vassos, E. (2020). Polygenic risk scores: From research tools to clinical instruments. *Genome Medicine*, 12(1), 1–11. <https://doi.org/10.1186/S13073-020-00742-5/TABLES/2>

- Li, M., Luo, X., Rietschel, M., Lewis, C. M., Mattheisen, M., Müller-Myhsok, B., Jamain, S., Leboyer, M., Landén, M., Thompson, P. M., Cichon, S., Nöthen, M. M., Schulze, T. G., Sullivan, P. F., Bergen, S. E., Donohoe, G., Morris, D. W., Hargreaves, A., Gill, M., ... Su, B. (2014). Allelic differences between Europeans and Chinese for CREB1 SNPs and their implications in gene expression regulation, hippocampal structure and function, and bipolar disorder susceptibility. *Molecular Psychiatry*, 19(4), 452–461. <https://doi.org/10.1038/mp.2013.37>
- Lichtenstein, P., Yip, B. H., Björk, C., Pawitan, Y., Cannon, T. D., Sullivan, P. F., & Hultman, C. M. (2009). Common genetic determinants of schizophrenia and bipolar disorder in Swedish families: a population-based study. *The Lancet*, 373(9659), 234–239. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(09\)60072-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(09)60072-6)
- Liu, C., Rennie, W. A., Carmack, C. S., Kanoria, S., Cheng, J., Lu, J., & Ding, Y. (2014). Effects of genetic variations on microRNA: Target interactions. *Nucleic Acids Research*, 42(15), 9543–9552. <https://doi.org/10.1093/nar/gku675>
- Liu, D., Meyer, D., Fennessy, B., Feng, C., Cheng, E., Johnson, J. S., Park, Y. J., Rieder, M. K., Ascolillo, S., de Pins, A., Dobbyn, A., Lebovitch, D., Moya, E., Nguyen, T. H., Wilkins, L., Hassan, A., Aghanwa, H. S., Ansari, M., Asif, A., ... Charney, A. W. (2023). Schizophrenia risk conferred by rare protein-truncating variants is conserved across diverse human populations. *Nature Genetics*, 55(3), 369–376. <https://doi.org/10.1038/s41588-023-01305-1>
- Liu, J. Z., McRae, A. F., Nyholt, D. R., Medland, S. E., Wray, N. R., Brown, K. M., Hayward, N. K., Montgomery, G. W., Visscher, P. M., Martin, N. G., Macgregor, S., Mann, G. J., Kefford, R. F., Hopper, J. L., Aitken, J. F., Giles, G. G., & Armstrong, B. K. (2010). A versatile gene-based test for genome-wide association studies. *American Journal of Human Genetics*, 87(1), 139–145. <https://doi.org/10.1016/J.AJHG.2010.06.009>
- Liu, X., Jian, X., & Boerwinkle, E. (2011). dbNSFP: A lightweight database of human nonsynonymous SNPs and their functional predictions. *Human Mutation*, 32(8), 894–899. <https://doi.org/10.1002/humu.21517>
- Liu, X., Jian, X., & Boerwinkle, E. (2013). dbNSFP v2.0: A database of human non-synonymous SNVs and their functional predictions and annotations. *Human Mutation*, 34(9), E2393-402. <https://doi.org/10.1002/humu.22376>
- Lonsdale, J., Thomas, J., Salvatore, M., Phillips, R., Lo, E., Shad, S., Hasz, R., Walters, G., Garcia, F., Young, N., Foster, B., Moser, M., Karasik, E., Gillard, B., Ramsey, K., Sullivan, S., Bridge, J., Magazine, H., Syron, J., ... Moore, H. F. (2013). The Genotype-Tissue Expression (GTEx) project. *Nature Genetics*, 45(6), 580–585. <https://doi.org/10.1038/NG.2653>
- Luciano, M., Hansell, N. K., Lahti, J., Davies, G., Medland, S. E., Räikkönen, K., Tenesa, A., Widen, E., McGhee, K. A., Palotie, A., Liewald, D., Porteous, D. J., Starr, J. M., Montgomery, G. W., Martin, N. G., Eriksson, J. G., Wright, M. J., & Deary, I. J. (2011).

- Whole genome association scan for genetic polymorphisms influencing information processing speed. *Biological Psychology*, 86(3), 193–202. <https://doi.org/10.1016/J.BIOPSYCHO.2010.11.008>
- Lutter, D., Marr, C., Krumsiek, J., Lang, E. W., & Theis, F. J. (2010). Intronic microRNAs support their host genes by mediating synergistic and antagonistic regulatory effects. *BMC Genomics*, 11(1), 224. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-11-224>
- Maaser, A., Forstner, A. J., Strohmaier, J., Hecker, J., Ludwig, K. U., Sivalingam, S., Streit, F., Degenhardt, F., Witt, S. H., Reinbold, C. S., Koller, A. C., Raff, R., Heilmann-Heimbach, S., Fischer, S. B., Herms, S., Hoffmann, P., Thiele, H., Nürnberg, P., Fier, H. L., ... Nöthen, M. M. (2018). Exome sequencing in large, multiplex bipolar disorder families from Cuba. *PLoS ONE*, 13(10), e0205895. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0205895>
- Maffioletti, E., Tardito, D., Gennarelli, M., & Bocchio-Chiavetto, L. (2014a). Micro spies from the brain to the periphery: new clues from studies on microRNAs in neuropsychiatric disorders. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 8, 75. <https://doi.org/10.3389/fncel.2014.00075>
- Maffioletti, E., Tardito, D., Gennarelli, M., & Bocchio-Chiavetto, L. (2014b). Micro spies from the brain to the periphery: new clues from studies on microRNAs in neuropsychiatric disorders. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 8(MAR). <https://doi.org/10.3389/FNCEL.2014.00075>
- Maher, B. S., Hughes, H. B., Zubenko, W. N., & Zubenko, G. S. (2010). Genetic linkage of region containing the CREB1 gene to depressive disorders in families with recurrent, early-onset, major depression: A re-analysis and confirmation of sex-specific effect. *American Journal of Medical Genetics, Part B: Neuropsychiatric Genetics*, 153(1), 10–16. <https://doi.org/10.1002/ajmg.b.30987>
- Marcheco-Teruel, B., Parra, E. J., Fuentes-Smith, E., Salas, A., Buttenschøn, H. N., Demontis, D., Torres-Español, M., Marín-Padrón, L. C., Gómez-Cabezas, E. J., Álvarez-Iglesias, V., Mosquera-Miguel, A., Martínez-Fuentes, A., Carracedo, Á., Børglum, A. D., & Mors, O. (2014). Cuba: Exploring the History of Admixture and the Genetic Basis of Pigmentation Using Autosomal and Uniparental Markers. *PLoS Genetics*, 10(7), e1004488. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1004488>
- Martin, A. R., Kanai, M., Kamatani, Y., Okada, Y., Neale, B. M., & Daly, M. J. (2019). Clinical use of current polygenic risk scores may exacerbate health disparities. *Nature Genetics* 2019 51:4, 51(4), 584–591. <https://doi.org/10.1038/s41588-019-0379-x>
- Martins, H. C., Gilardi, C., Sungur, A. Ö., Winterer, J., Pelzl, M. A., Bicker, S., Gross, F., Kisko, T. M., Malikowska-Racia, N., Braun, M. D., Brosch, K., Nenadic, I., Stein, F., Meinert, S., Schwarting, R. K. W., Dannlowski, U., Kircher, T., Wöhr, M., & Schratt, G. (2022). Bipolar-associated miR-499-5p controls neuroplasticity by downregulating the Cav1.2 subunit CACNB2. *EMBO Reports*, 23(10). <https://doi.org/10.15252/EMBR.202154420>

- Mason, B., Brown, E., & Croarkin, P. (2016). Historical Underpinnings of Bipolar Disorder Diagnostic Criteria. *Behavioral Sciences*, 6(3), 14. <https://doi.org/10.3390/bs6030014>
- McCarthy, S. E., Makarov, V., Kirov, G., Addington, A. M., McClellan, J., Yoon, S., Perkins, D. O., Dickel, D. E., Kusenda, M., Krastoshevsky, O., Krause, V., Kumar, R. A., Grozeva, D., Malhotra, D., Walsh, T., Zackai, E. H., Kaplan, P., Ganesh, J., Krantz, I. D., ... Sebat, J. (2009). Microduplications of 16p11.2 are Associated with Schizophrenia. *Nature Genetics*, 41(11), 1223. <https://doi.org/10.1038/NG.474>
- McGuffin, P., Rijsdijk, F., Andrew, M., Sham, P., Katz, R., & Cardno, A. (2003). The heritability of bipolar affective disorder and the genetic relationship to unipolar depression. *Archives of General Psychiatry*, 60(5), 497–502. <https://doi.org/10.1001/archpsyc.60.5.497>
- Mendel, G. (1996). *EXPERIMENTS IN PLANT HYBRIDIZATION (1865)*. <http://www.netspace.org/MendelWeb/>
- Merikangas, K. R., Jin, R., He, J. P., Kessler, R. C., Lee, S., Sampson, N. A., Viana, M. C., Andrade, L. H., Hu, C., Karam, E. G., Ladea, M., Medina-Mora, M. E., Ono, Y., Posada-Villa, J., Sagar, R., Wells, J. E., & Zarkov, Z. (2011). Prevalence and correlates of bipolar spectrum disorder in the World Mental Health Survey Initiative. *Archives of General Psychiatry*, 68(3), 241–251. <https://doi.org/10.1001/archgenpsychiatry.2011.12>
- Metzker, M. L. (2010). Sequencing technologies the next generation. *Nature Reviews Genetics*, 11(1), 31–46. <https://doi.org/10.1038/nrg2626>
- Miklowitz, D. J., & Chung, B. (2016). Family-Focused Therapy for Bipolar Disorder: Reflections on 30 Years of Research. *Family Process*, 55(3), 483. <https://doi.org/10.1111/FAMP.12237>
- Miklowitz, D. J., Efthimiou, O., Furukawa, T. A., Scott, J., McLaren, R., Geddes, J. R., & Cipriani, A. (2021). Adjunctive Psychotherapy for Bipolar Disorder: A Systematic Review and Component Network Meta-analysis. *JAMA Psychiatry*, 78(2), 141–150. <https://doi.org/10.1001/JAMAPSYCHIATRY.2020.2993>
- Miklowitz, D. J., & Johnson, B. S. L. (2009). Social and Familial Factors in the Course of Bipolar Disorder: Basic Processes and Relevant Interventions. *Clinical Psychology: Science and Practice*, 16(2), 281–296. <https://doi.org/10.1111/j.1468-2850.2009.01166.x>
- Miklowitz, D. J., Otto, M. W., Frank, E., Reilly-Harrington, N. A., Kogan, J. N., Sachs, G. S., Thase, M. E., Calabrese, J. R., Marangell, L. B., Ostacher, M. J., Patel, J., Thomas, M. R., Araga, M., Gonzalez, J. M., & Wisniewski, S. R. (2007). Intensive psychosocial intervention enhances functioning in patients with bipolar depression: Results from a 9-month randomized controlled trial. *American Journal of Psychiatry*, 164(9), 1340–1347. <https://doi.org/10.1176/appi.ajp.2007.07020311>

- Miller, J. N., & Black, D. W. (2020). Bipolar Disorder and Suicide: a Review. *Current Psychiatry Reports*, 22(2), 1–10. <https://doi.org/10.1007/S11920-020-1130-0/TABLES/2>
- Mistry, S., Harrison, J. R., Smith, D. J., Escott-Price, V., & Zammit, S. (2018). The use of polygenic risk scores to identify phenotypes associated with genetic risk of bipolar disorder and depression: A systematic review. *Journal of Affective Disorders*, 234, 148–155. <https://doi.org/10.1016/J.JAD.2018.02.005>
- Momozawa, Y., & Mizukami, K. (2020). Unique roles of rare variants in the genetics of complex diseases in humans. *Journal of Human Genetics* 2020 66:1, 66(1), 11–23. <https://doi.org/10.1038/s10038-020-00845-2>
- More, R. P., Warrier, V., Brunel, H., Buckingham, C., Smith, P., Allison, C., Holt, R., Bradshaw, C. R., & Baron-Cohen, S. (2023). Identifying rare genetic variants in 21 highly multiplex autism families: the role of diagnosis and autistic traits. *Molecular Psychiatry* 2023 28:5, 28(5), 2148–2157. <https://doi.org/10.1038/s41380-022-01938-4>
- Moreau, M. P., Bruse, S. E., David-Rus, R., Buyske, S., & Brzustowicz, L. M. (2011). Altered MicroRNA expression profiles in postmortem brain samples from individuals with schizophrenia and bipolar disorder. *Biological Psychiatry*, 69(2), 188–193. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2010.09.039>
- Morgan, T. H. (1915). Localization of the Hereditary Material in the Germ Cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1(7), 420–429. <https://doi.org/10.1073/pnas.1.7.420>
- Morsel, A. M., Morrens, M., & Sabbe, B. (2018). An overview of pharmacotherapy for bipolar I disorder. *Expert Opinion on Pharmacotherapy*, 19(3), 203–222. <https://doi.org/10.1080/14656566.2018.1426746>
- Mühleisen, T. W., Leber, M., Schulze, T. G., Strohmaier, J., Degenhardt, F., Treutlein, J., Mattheisen, M., Forstner, A. J., Schumacher, J., Breuer, R., Meier, S., Herms, S., Hoffmann, P., Lacour, A., Witt, S. H., Reif, A., Müller-Myhsok, B., Lucae, S., Maier, W., ... Cichon, S. (2014). Genome-wide association study reveals two new risk loci for bipolar disorder. *Nature Communications*, 5, 3339. <https://doi.org/10.1038/ncomms4339>
- Mullins, N., Forstner, A. J., O'Connell, K. S., Coombes, B., Coleman, J. R. I., Qiao, Z., Als, T. D., Bigdeli, T. B., Børte, S., Bryois, J., Charney, A. W., Drange, O. K., Gandal, M. J., Hagenaars, S. P., Ikeda, M., Kamitaki, N., Kim, M., Krebs, K., Panagiotaropoulou, G., ... Andreassen, O. A. (2021). Genome-wide association study of more than 40,000 bipolar disorder cases provides new insights into the underlying biology. *Nature Genetics*, 53(6). <https://doi.org/10.1038/s41588-021-00857-4>
- Mundo, E., Tharmalingham, S., Neves-Pereira, M., Dalton, E. J., Macciardi, F., Parikh, S. V., Bolonna, A., Kerwin, R. W., Arranz, M. J., Makoff, A. J., & Kennedy, J. L. (2003). Evidence

- that the N-methyl-D-aspartate subunit 1 receptor gene (GRIN1) confers susceptibility to bipolar disorder. *Molecular Psychiatry*, 8(2), 241–245. <https://doi.org/10.1038/sj.mp.4001218>
- Munk, K., Jahn, D., Jahn, M., Kronberg, I., & Langer, T. (2017). *Taschenlehrbuch Biologie: Genetik*. Thieme. <https://books.google.de/books?id=TDouDwAAQBAJ>
- Myers, S., Bottolo, L., Freeman, C., McVean, G., & Donnelly, P. (2005). Genetics: A fine-scale map of recombination rates and hotspots across the human genome. *Science*, 310(5746), 321–324. https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1117196/SUPPL_FILE/MYERS.SOM.PDF
- Ng, S. B., Buckingham, K. J., Lee, C., Bigham, A. W., Tabor, H. K., Dent, K. M., Huff, C. D., Shannon, P. T., Jabs, E. W., Nickerson, D. A., Shendure, J., & Bamshad, M. J. (2010). Exome sequencing identifies the cause of a mendelian disorder. *Nature Genetics*, 42(1), 30–35. <https://doi.org/10.1038/NG.499>
- Nivoli, A. M. A., Pacchiarotti, I., Rosa, A. R., Popovic, D., Murru, A., Valenti, M., Bonnin, C. M., Grande, I., Sanchez-Moreno, J., Vieta, E., & Colom, F. (2011). Gender differences in a cohort study of 604 bipolar patients: The role of predominant polarity. *Journal of Affective Disorders*, 133(3), 443–449. <https://doi.org/10.1016/j.jad.2011.04.055>
- Noor, A., Lionel, A. C., Cohen-Woods, S., Moghimi, N., Rucker, J., Fennell, A., Thiruvahindrapuram, B., Kaufman, L., Degagne, B., Wei, J., Parikh, S. V., Muglia, P., Forte, J., Scherer, S. W., Kennedy, J. L., Xu, W., McGuffin, P., Farmer, A., Strauss, J., & Vincent, J. B. (2014). Copy number variant study of bipolar disorder in Canadian and UK populations implicates synaptic genes. *American Journal of Medical Genetics Part B: Neuropsychiatric Genetics*, 165(4), 303–313. <https://doi.org/10.1002/AJMG.B.32232>
- Norcross, J. C., & Lambert, M. J. (2018). Psychotherapy relationships that work III. *Psychotherapy (Chicago, Ill.)*, 55(4), 303–315. <https://doi.org/10.1037/PST0000193>
- Nöthen, M. M., Degenhardt, F., & Forstner, A. J. (2019). Breakthrough in understanding the molecular causes of psychiatric disorders. *Nervenarzt*, 90(2), 99–106. <https://doi.org/10.1007/s00115-018-0670-6>
- Nöthen, M. M., Nieratschker, V., Cichon, S., & Rietschel, M. (2010). New findings in the genetics of major psychoses. *Dialogues in Clinical Neuroscience*, 12(1), 85–93. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20373670>
- Nurk, S., Koren, S., Rhie, A., Rautiainen, M., Bzikadze, A. V., Mikheenko, A., Vollger, M. R., Altemose, N., Uralsky, L., Gershman, A., Aganezov, S., Hoyt, S. J., Diekhans, M., Logsdon, G. A., Alonge, M., Antonarakis, S. E., Borchers, M., Bouffard, G. G., Brooks, S. Y., ... Phillippy, A. M. (2022). The complete sequence of a human genome. *Science (New York, N.Y.)*, 376(6588), 44–53. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.ABJ6987>

- O'Carroll, D., & Schaefer, A. (2013). General Principals of miRNA Biogenesis and Regulation in the Brain. *Neuropsychopharmacology*, 38(1), 39–54. <https://doi.org/10.1038/npp.2012.87>
- O'Connell, K. S., & Coombes, B. J. (2021). Genetic contributions to bipolar disorder: current status and future directions. *Psychological Medicine*, 51(13), 2156. <https://doi.org/10.1017/S0033291721001252>
- O'Connell, K. S., Koromina, M., van der Veen, T., Boltz, T., David, F. S., Yang, J. M. K., Lin, K.-H., Wang, X., Coleman, J. R. I., Mitchell, B. L., McGrouther, C. C., Rangan, A. V., Lind, P. A., Koch, E., Harder, A., Parker, N., Bendl, J., Adorjan, K., Agerbo, E., ... Bipolar Disorder Working Group of the Psychiatric Genomics Consortium. (2025). Genomics yields biological and phenotypic insights into bipolar disorder. *Nature* 2025, 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41586-024-08468-9>
- Ostrom, R. S., Bogard, A. S., Gros, R., & Feldman, R. D. (2012). Choreographing the adenylyl cyclase signalosome: sorting out the partners and the steps. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 385(1), 5–12. <https://doi.org/10.1007/S00210-011-0696-9>
- Owen, M. J., Legge, S. E., Rees, E., Walters, J. T. R., & O'Donovan, M. C. (2023). Genomic findings in schizophrenia and their implications. *Molecular Psychiatry* 2023 28:9, 28(9), 3638–3647. <https://doi.org/10.1038/s41380-023-02293-8>
- Oyang, E. L., Davidson, B. C., Lee, W., & Poon, M. M. (2011). Functional characterization of the dendritically localized mRNA neuronatin in hippocampal neurons. *PLoS ONE*, 6(9), e24879. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0024879>
- Palmer, D. S., Howrigan, D. P., Chapman, S. B., Adolfsson, R., Bass, N., Blackwood, D., Boks, M. P. M., Chen, C. Y., Churchhouse, C., Corvin, A. P., Craddock, N., Curtis, D., Di Florio, A., Dickerson, F., Freimer, N. B., Goes, F. S., Jia, X., Jones, I., Jones, L., ... Neale, B. M. (2022). Exome sequencing in bipolar disorder identifies AKAP11 as a risk gene shared with schizophrenia. *Nature Genetics*, 54(5), 541–547. <https://doi.org/10.1038/s41588-022-01034-x>
- Pardiñas, A. F., Holmans, P., Pocklington, A. J., Escott-Price, V., Ripke, S., Carrera, N., Legge, S. E., Bishop, S., Cameron, D., Hamshere, M. L., Han, J., Hubbard, L., Lynham, A., Mantripragada, K., Rees, E., MacCabe, J. H., McCarroll, S. A., Baune, B. T., Breen, G., ... Walters, J. T. R. (2018). Common schizophrenia alleles are enriched in mutation-intolerant genes and in regions under strong background selection. *Nature Genetics*, 50(3), 381–389. <https://doi.org/10.1038/s41588-018-0059-2>
- Peet, M. (1994). Induction of mania with selective serotonin re-uptake inhibitors and tricyclic antidepressants. *The British Journal of Psychiatry: The Journal of Mental Science*, 164(4), 549–550. <https://doi.org/10.1192/BJP.164.4.549>
- Perlis, R. H., Purcell, S., Fagerness, J., Cusin, C., Yamaki, L., Fava, M., & Smoller, J. W. (2007). Clinical and Genetic Dissection of Anger Expression and CREB1 Polymorphisms in

- Major Depressive Disorder. *Biological Psychiatry*, 62(5), 536–540. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2006.10.034>
- Perrottelli, A., Marzocchi, F. F., Caporusso, E., Giordano, G. M., Giuliani, L., Melillo, A., Pezzella, P., Bucci, P., Mucci, A., & Galderisi, S. (2024). Advances in the understanding of the pathophysiology of schizophrenia and bipolar disorder through induced pluripotent stem cell models. *Journal of Psychiatry & Neuroscience : JPN*, 49(2), E109–E125. <https://doi.org/10.1503/JPN.230112>
- Pruim, R. J., Welch, R. P., Sanna, S., Teslovich, T. M., Chines, P. S., Gliedt, T. P., Boehnke, M., Abecasis, G. R., Willer, C. J., & Frishman, D. (2011). LocusZoom: Regional visualization of genome-wide association scan results. *Bioinformatics*, 27(13), 2336–2337. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btq419>
- Purcell, S., Neale, B., Todd-Brown, K., Thomas, L., Ferreira, M. A. R., Bender, D., Maller, J., Sklar, P., de Bakker, P. I. W., Daly, M. J., & Sham, P. C. (2007). PLINK: A Tool Set for Whole-Genome Association and Population-Based Linkage Analyses. *The American Journal of Human Genetics*, 81(3), 559–575. <https://doi.org/10.1086/519795>
- Rabbani, B., Tekin, M., & Mahdieh, N. (2013). The promise of whole-exome sequencing in medical genetics. *Journal of Human Genetics* 2014 59:1, 59(1), 5–15. <https://doi.org/10.1038/jhg.2013.114>
- Rao, A. R., Yourshaw, M., Christensen, B., Nelson, S. F., & Kerner, B. (2017). Rare deleterious mutations are associated with disease in bipolar disorder families. *Molecular Psychiatry*, 22(7), 1009. <https://doi.org/10.1038/MP.2016.181>
- Rawlings-Goss, R. A., Campbell, M. C., & Tishkoff, S. A. (2014). Global population-specific variation in miRNA associated with cancer risk and clinical biomarkers. *BMC Medical Genomics*, 7(1), 1–14. <https://doi.org/10.1186/1755-8794-7-53/FIGURES/6>
- Rearick, D., Prakash, A., McSweeney, A., Shepard, S. S., Fedorova, L., & Fedorov, A. (2011). Critical association of ncRNA with introns. *Nucleic Acids Research*, 39(6), 2357–2366. <https://doi.org/10.1093/nar/gkq1080>
- Reynisdottir, I., Thorleifsson, G., Benediktsson, R., Sigurdsson, G., Emilsson, V., Einarsdottir, A. S., Hjorleifsdottir, E. E., Orlygsdottir, G. T., Bjornsdottir, G. T., Saemundsdottir, J., Halldorsson, S., Hrafnkelsdottir, S., Sigurjonsdottir, S. B., Steinsdottir, S., Martin, M., Kochan, J. P., Rhees, B. K., Grant, S. F. A., Frigge, M. L., ... Gulcher, J. R. (2003). Localization of a Susceptibility Gene for Type 2 Diabetes to Chromosome 5q34-q35.2. *Am. J. Hum. Genet*, 73, 323–335.
- Ripke, S., Neale, B. M., Corvin, A., Walters, J. T. R., Farh, K. H., Holmans, P. A., Lee, P., Bulik-Sullivan, B., Collier, D. A., Huang, H., Pers, T. H., Agartz, I., Agerbo, E., Albus, M., Alexander, M., Amin, F., Bacanu, S. A., Begemann, M., Belliveau, R. A., ... O'Donovan, M. C. (2014). Biological insights from 108 schizophrenia-associated genetic loci. *Nature*, 511(7510), 421–427. <https://doi.org/10.1038/nature13595>

- Rodriguez, R., & Krishnan, Y. (2023). Genesis of next-generation sequencing. *Nature Biotechnology*, 41(12), 1709. <https://doi.org/10.1038/S41587-023-01986-3>
- Rommens, J. M., Iannuzzi, M. C., Kerem, B. S., Drumm, M. L., Melmer, G., Dean, M., Rozmahel, R., Cole, J. L., Kennedy, D., Hidaka, N., Zsiga, M., Buchwald, M., Riordan, J. R., Tsui, L. C., & Collins, F. S. (1989). Identification of the cystic fibrosis gene: chromosome walking and jumping. *Science (New York, N.Y.)*, 245(4922), 1059–1065. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.2772657>
- Ryu, S., McDonnell, K., Choi, H., Gao, D., Hahn, M., Joshi, N., Park, S. M., Catena, R., Do, Y., Brazin, J., Vahdat, L. T., Silver, R. B., & Mittal, V. (2013). Suppression of miRNA-708 by Polycomb Group Promotes Metastases by Calcium-Induced Cell Migration. *Cancer Cell*, 23(1), 63–76. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2012.11.019>
- Sanger, F., Nicklen, S., & Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 74(12), 5463–5467. <https://doi.org/10.1073/pnas.74.12.5463>
- Schoeyen, H. K., Kessler, U., Andreassen, O. A., Auestad, B. H., Bergsholm, P., Malt, U. F., Morken, G., Oedegaard, K. J., & Vaaler, A. (2015). Treatment-resistant bipolar depression: a randomized controlled trial of electroconvulsive therapy versus algorithm-based pharmacological treatment. *The American Journal of Psychiatry*, 172(1), 41–51. <https://doi.org/10.1176/APPI.AJP.2014.13111517>
- Schratt, G. (2009). MicroRNAs at the synapse. *Nature Reviews Neuroscience*, 10(12), 842–849. <https://doi.org/10.1038/nrn2763>
- Schulze, T. G., Detera-Wadleigh, S. D., Akula, N., Gupta, A., Kassem, L., Steele, J., Pearl, J., Strohmaier, J., Breuer, R., Schwarz, M., Propping, P., Nöthen, M. M., Cichon, S., Schumacher, J., Rietschel, M., & McMahon, F. J. (2009). Two variants in Ankyrin 3 (ANK3) are independent genetic risk factors for bipolar disorder. *Molecular Psychiatry*, 14(5), 487–491. <https://doi.org/10.1038/mp.2008.134>
- Schwarz, J. M., Cooper, D. N., Schuelke, M., & Seelow, D. (2014). Mutationtaster2: Mutation prediction for the deep-sequencing age. *Nature Methods*, 11(4), 361–362. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2890>
- Sekar, A., Bialas, A. R., De Rivera, H., Davis, A., Hammond, T. R., Kamitaki, N., Tooley, K., Presumey, J., Baum, M., Van Doren, V., Genovese, G., Rose, S. A., Handsaker, R. E., Daly, M. J., Carroll, M. C., Stevens, B., & McCarroll, S. A. (2016). Schizophrenia risk from complex variation of complement component 4. *Nature*, 530(7589), 177–183. <https://doi.org/10.1038/nature16549>
- Shinozaki, G., & Potash, J. B. (2014). New Developments in the Genetics of Bipolar Disorder. *Current Psychiatry Reports*, 16(11), 493. <https://doi.org/10.1007/s11920-014-0493-5>
- Siegel, G., Obernosterer, G., Fiore, R., Oehmen, M., Bicker, S., Christensen, M., Khudayberdiev, S., Leuschner, P. F., Busch, C. J. L., Kane, C., Hübel, K., Dekker, F.,

- Hedberg, C., Rengarajan, B., Drepper, C., Waldmann, H., Kauppinen, S., Greenberg, M. E., Draguhn, A., ... Schratt, G. M. (2009). A functional screen implicates microRNA-138-dependent regulation of the depalmitoylation enzyme APT1 in dendritic spine morphogenesis. *Nature Cell Biology*, 11(6), 705–716. <https://doi.org/10.1038/NCB1876>
- Singh, T., Kurki, M. I., Curtis, D., Purcell, S. M., Crooks, L., McRae, J., Suvisaari, J., Chheda, H., Blackwood, D., Breen, G., Pietilinen, O., Gerety, S. S., Ayub, M., Blyth, M., Cole, T., Collier, D., Coomber, E. L., Craddock, N., Daly, M. J., ... Barrett, J. C. (2016). Rare loss-of-function variants in SETD1A are associated with schizophrenia and developmental disorders. *Nature Neuroscience*, 19(4), 571–577. <https://doi.org/10.1038/nn.4267>
- Singh, T., Poterba, T., Curtis, D., Akil, H., Al Eissa, M., Barchas, J. D., Bass, N., Bigdeli, T. B., Breen, G., Bromet, E. J., Buckley, P. F., Bunney, W. E., Bybjerg-Grauholm, J., Byerley, W. F., Chapman, S. B., Chen, W. J., Churchhouse, C., Craddock, N., Cusick, C. M., ... Daly, M. J. (2022). Rare coding variants in ten genes confer substantial risk for schizophrenia. *Nature* 2022 604:7906, 604(7906), 509–516. <https://doi.org/10.1038/s41586-022-04556-w>
- Sklar, P., Ripke, S., Scott, L. J., Andreassen, O. A., Cichon, S., Craddock, N., Edenberg, H. J., Nurnberger, J. I., Rietschel, M., Blackwood, D., Corvin, A., Flickinger, M., Guan, W., Mattingsdal, M., McQuillin, A., Kwan, P., Wienker, T. F., Daly, M., Dudbridge, F., ... Purcell, S. M. (2011). Large-scale genome-wide association analysis of bipolar disorder identifies a new susceptibility locus near ODZ4. *Nature Genetics*, 43(10), 977–985. <https://doi.org/10.1038/ng.943>
- Sklar, P., Smoller, J. W., Fan, J., Ferreira, M. A. R., Perlis, R. H., Chambert, K., Nimgaonkar, V. L., McQueen, M. B., Faraone, S. V., Kirby, A., De Bakker, P. I. W., Ogdie, M. N., Thase, M. E., Sachs, G. S., Todd-Brown, K., Gabriel, S. B., Sougnez, C., Gates, C., Blumenstiel, B., ... Purcell, S. M. (2008). Whole-genome association study of bipolar disorder. *Molecular Psychiatry*, 13(6), 558–569. <https://doi.org/10.1038/sj.mp.4002151>
- Smalheiser, N. R., Lugli, G., Zhang, H., Rizavi, H., Cook, E. H., & Dwivedi, Y. (2014). Expression of microRNAs and Other Small RNAs in Prefrontal Cortex in Schizophrenia, Bipolar Disorder and Depressed Subjects. *PLOS ONE*, 9(1), e86469. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0086469>
- Smoller, J. W., & Finn, C. T. (2003). Family, twin, and adoption studies of bipolar disorder. *American Journal of Medical Genetics. Part C, Seminars in Medical Genetics*, 123C(1), 48–58. <https://doi.org/10.1002/AJMG.C.20013>
- Smoller, J. W. S., Kendler, K. K., Craddock, N., Lee, P. H., Neale, B. N. M., Nurnberger, J. N., Ripke, S., Santangelo, S., Sullivan, P. S., Neale, B. N. M., Purcell, S., Anney, R., Buitelaar, J., Fanous, A., Faraone, S. F., Hoogendijk, W., Lesch, K. P., Levinson, D. L., Perlis, R. P., ... O'Donovan, M. M. (2013). Identification of risk loci with shared effects on five

- major psychiatric disorders: A genome-wide analysis. *The Lancet*, 381(9875), 1371–1379. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(12\)62129-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(12)62129-1)
- Snow, B. E., Hall, R. A., Krumins, A. M., Brothers, G. M., Bouchard, D., Brothers, C. A., Chung, S., Mangion, J., Gilman, A. G., Lefkowitz, R. J., & Siderovski, D. P. (1998). GTPase activating specificity of RGS12 and binding specificity of an alternatively spliced PDZ (PSD-95/Dlg/ZO-1) domain. *The Journal of Biological Chemistry*, 273(28), 17749–17755. <https://doi.org/10.1074/JBC.273.28.17749>
- Song, J., Bergen, S. E., Kuja-Halkola, R., Larsson, H., Landén, M., & Lichtenstein, P. (2015). Bipolar disorder and its relation to major psychiatric disorders: a family-based study in the Swedish population. *Bipolar Disorders*, 17(2), 184–193. <https://doi.org/10.1111/BDI.12242>
- Stahl, E. A., Breen, G., Forstner, A. J., McQuillin, A., Ripke, S., Trubetskoy, V., Mattheisen, M., Wang, Y., Coleman, J. R. I., Gaspar, H. A., de Leeuw, C. A., Steinberg, S., Pavlides, J. M. W., Trzaskowski, M., Byrne, E. M., Pers, T. H., Holmans, P. A., Richards, A. L., Abbott, L., ... Sklar, P. (2019). Genome-wide association study identifies 30 loci associated with bipolar disorder. *Nature Genetics*, 51(5), 793–803. <https://doi.org/10.1038/s41588-019-0397-8>
- Stengel, D., Parma, J., Gannagé, M. H., Roeckel, N., Mattei, M. G., Barouki, R., & Hanoune, J. (1992). Different chromosomal localization of two adenylyl cyclase genes expressed in human brain. *Human Genetics*, 90(1–2), 126–130. <https://doi.org/10.1007/BF00210755/METRICS>
- Stimmel, G. L. (2004). The Economic Burden of Bipolar Disorder. *Psychiatric Services*, 55(2), 117–118. <https://doi.org/10.1176/appi.ps.55.2.117>
- Strauch, K., Fimmers, R., Kurz, T., Deichmann, K. A., Wienker, T. F., & Baur, M. P. (2002). Parametric and Nonparametric Multipoint Linkage Analysis with Imprinting and Two-Locus–Trait Models: Application to Mite Sensitization. *The American Journal of Human Genetics*, 66(6), 1945–1957. <https://doi.org/10.1086/302911>
- Strauss, K. A., Markx, S., Georgi, B., Paul, S. M., Jinks, R. N., Hoshi, T., McDonald, A., First, M. B., Liu, W., Benkert, A. R., Heaps, A. D., Tian, Y., Chakravarti, A., Bucan, M., & Puffenberger, E. G. (2014). A population-based study of KCNH7 p.Arg394His and bipolar spectrum disorder. *Human Molecular Genetics*, 23(23), 6395–6406. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddu335>
- Strömberg, E. (1967). Psychiatrische Genetik. In *Grundlagenforschung zur Psychiatrie Teil A* (pp. 1–69). Springer Berlin Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-662-00162-2_1
- Sudmant, P. H., Rausch, T., Gardner, E. J., Handsaker, R. E., Abyzov, A., Huddleston, J., Zhang, Y., Ye, K., Jun, G., Fritz, M. H. Y., Konkelt, M. K., Malhotra, A., Stütz, A. M., Shi, X., Casale, F. P., Chen, J., Hormozdiari, F., Dayama, G., Chen, K., ... Korbel, J. O. (2015). An

- integrated map of structural variation in 2,504 human genomes. *Nature*, 526(7571), 75–81. <https://doi.org/10.1038/nature15394>
- Sullivan, P. F., Daly, M. J., & O'Donovan, M. (2012). Genetic architectures of psychiatric disorders: the emerging picture and its implications. *Nature Reviews. Genetics*, 13(8), 537–551. <https://doi.org/10.1038/NRG3240>
- Szatkiewicz, J., Crowley, J. J., Adolfsson, A. N., Åberg, K. A., Alaerts, M., Genovese, G., McCarroll, S., Del-Favero, J., Adolfsson, R., & Sullivan, P. F. (2019). The genomics of major psychiatric disorders in a large pedigree from Northern Sweden. *Translational Psychiatry*, 9(1), 60. <https://doi.org/10.1038/s41398-019-0414-9>
- Tam, V., Patel, N., Turcotte, M., Bossé, Y., Paré, G., & Meyre, D. (2019). Benefits and limitations of genome-wide association studies. *Nature Reviews Genetics*, 20(8), 467–484. <https://doi.org/10.1038/s41576-019-0127-1>
- Taylor, L., Faraone, S. V., & Tsuang, M. T. (2002). Family, twin, and adoption studies of bipolar disease. *Current Psychiatry Reports*, 4(2), 130–133.
- Teare, M. D., & Barrett, J. H. (2005). Genetic Epidemiology 2: Genetic linkage studies. *Lancet*, 366(9490), 1036–1044. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(05\)67382-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(05)67382-5)
- Tielke, A., Martins, H., Pelzl, M. A., Maaser-Hecker, A., David, F. S., Reinbold, C. S., Streit, F., Sirignano, L., Schwarz, M., Vedder, H., Kammerer-Ciernioch, J., Albus, M., Borrmann-Hassenbach, M., Hautzinger, M., Hüntel, K., Degenhardt, F., Fischer, S. B., Beins, E. C., Herms, S., ... Forstner, A. J. (2022). Genetic and functional analyses implicate microRNA 499A in bipolar disorder development. *Translational Psychiatry* 2022 12:1, 12(1), 1–10. <https://doi.org/10.1038/s41398-022-02176-6>
- Timpson, N. J., Greenwood, C. M. T. T., Soranzo, N., Lawson, D. J., & Richards, J. B. (2018). Genetic architecture: The shape of the genetic contribution to human traits and disease. *Nature Reviews Genetics*, 19(2), 110–124. <https://doi.org/10.1038/nrg.2017.101>
- Tjio, J. H., & Levan, A. (1956). The Chromosome Number of Man. *Hereditas*, 42(1–2), 1–6. <https://doi.org/10.1111/J.1601-5223.1956.TB03010.X>
- Toma, C., Shaw, A. D., Allcock, R. J. N., Heath, A., Pierce, K. D., Mitchell, P. B., Schofield, P. R., & Fullerton, J. M. (2018). An examination of multiple classes of rare variants in extended families with bipolar disorder. *Translational Psychiatry* 2018 8:1, 8(1), 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41398-018-0113-y>
- Toma, C., Shaw, A. D., Heath, A., Pierce, K. D., Mitchell, P. B., Schofield, P. R., & Fullerton, J. M. (2021). A linkage and exome study of multiplex families with bipolar disorder implicates rare coding variants of ANK3 and additional rare alleles at 10q11-q21. *Journal of Psychiatry & Neuroscience: JPN*, 46(2), E247–E257. <https://doi.org/10.1503/JPN.200083>

- Toma, C., Shaw, A. D., Overs, B. J., Mitchell, P. B., Schofield, P. R., Cooper, A. A., & Fullerton, J. M. (2020). De Novo Gene Variants and Familial Bipolar Disorder. *JAMA Network Open*, 3(5), E203382. <https://doi.org/10.1001/JAMANETWORKOPEN.2020.3382>
- Tondo, L., Isacsson, G., & Baldessarini, R. J. (2003). Suicidal behaviour in bipolar disorder: Risk and prevention. In *CNS Drugs* (Vol. 17, Issue 7, pp. 491–511). Springer International Publishing. <https://doi.org/10.2165/00023210-200317070-00003>
- Torkamani, A., Wineinger, N. E., & Topol, E. J. (2018). The personal and clinical utility of polygenic risk scores. *Nature Reviews. Genetics*, 19(9), 581–590. <https://doi.org/10.1038/S41576-018-0018-X>
- Toste, C. C., O'Donovan, M. C., & Bray, N. J. (2023). Mapping microRNA expression quantitative trait loci in the prenatal human brain implicates miR-1908-5p expression in bipolar disorder and other brain-related traits. *Human Molecular Genetics*, 32(20), 2941–2949. <https://doi.org/10.1093/HMG/DDAD118>
- Treiber, T., Treiber, N., & Meister, G. (2018). Regulation of microRNA biogenesis and its crosstalk with other cellular pathways. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2018 20:1, 20(1), 5–20. <https://doi.org/10.1038/s41580-018-0059-1>
- Trubetskoy, V., Pardiñas, A. F., Qi, T., Panagiotaropoulou, G., Awasthi, S., Bigdeli, T. B., Bryois, J., Chen, C. Y., Dennison, C. A., Hall, L. S., Lam, M., Watanabe, K., Frei, O., Ge, T., Harwood, J. C., Koopmans, F., Magnusson, S., Richards, A. L., Sidorenko, J., ... van Os, J. (2022). Mapping genomic loci implicates genes and synaptic biology in schizophrenia. *Nature* 2022 604:7906, 604(7906), 502–508. <https://doi.org/10.1038/s41586-022-04434-5>
- Vatsa, N., Kumar, V., Singh, B. K., Kumar, S. S., Sharma, A., & Jana, N. R. (2019). Down-Regulation of miRNA-708 Promotes Aberrant Calcium Signaling by Targeting Neuronatin in a Mouse Model of Angelman Syndrome. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 12, 35. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2019.00035>
- Verlouw, J. A. M., Clemens, E., de Vries, J. H., Zolk, O., Verkerk, A. J. M. H., am Zehnhoff-Dinnesen, A., Medina-Gomez, C., Lanvers-Kaminsky, C., Rivadeneira, F., Langer, T., van Meurs, J. B. J., van den Heuvel-Eibrink, M. M., Uitterlinden, A. G., & Broer, L. (2021). A comparison of genotyping arrays. *European Journal of Human Genetics* 2021 29:11, 29(11), 1611–1624. <https://doi.org/10.1038/s41431-021-00917-7>
- Vieta, E., & Valentí, M. (2013). Pharmacological Management of Bipolar Depression: Acute Treatment, Maintenance, and Prophylaxis. *CNS Drugs*, 27(7), 515–529. <https://doi.org/10.1007/s40263-013-0073-y>
- Visser, P. M., Wray, N. R., Zhang, Q., Sklar, P., McCarthy, M. I., Brown, M. A., & Yang, J. (2017). 10 Years of GWAS Discovery: Biology, Function, and Translation. *American Journal of Human Genetics*, 101(1), 5–22. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2017.06.005>

- Vos, T., Abajobir, A. A., Abbafati, C., Abbas, K. M., Abate, K. H., Abd-Allah, F., Abdulle, A. M., Abebo, T. A., Abera, S. F., Aboyans, V., Abu-Raddad, L. J., Ackerman, I. N., Adamu, A. A., Adetokunboh, O., Afarideh, M., Afshin, A., Agarwal, S. K., Aggarwal, R., Agrawal, A., ... Murray, C. J. L. (2017). Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 328 diseases and injuries for 195 countries, 1990-2016: A systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. *The Lancet*, 390(10100), 1211–1259. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(17\)32154-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(17)32154-2)
- Wallace, Dobson, R. J., Munroe, P. B., & Caulfield, M. J. (2007). Information capture using SNPs from HapMap and whole-genome chips differs in a sample of inflammatory and cardiovascular gene-centric regions from genome-wide estimates. *Genome Research*, 17(11), 1596. <https://doi.org/10.1101/GR.5996407>
- Wallace, T. L., Stellitano, K. E., Neve, R. L., & Duman, R. S. (2004). Effects of cyclic adenosine monophosphate response element binding protein overexpression in the basolateral amygdala on behavioral models of depression and anxiety. *Biological Psychiatry*, 56(3), 151–160. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2004.04.010>
- Wang, J. X., Jiao, J. Q., Li, Q., Long, B., Wang, K., Liu, J. P., Li, Y. R., & Li, P. F. (2011). MiR-499 regulates mitochondrial dynamics by targeting calcineurin and dynamin-related protein-1. *Nature Medicine*, 17(1), 71–78. <https://doi.org/10.1038/nm.2282>
- Wang, K. S., Liu, X. F., & Aragam, N. (2010). A genome-wide meta-analysis identifies novel loci associated with schizophrenia and bipolar disorder. *Schizophrenia Research*, 124(1–3), 192–199. <https://doi.org/10.1016/J.SCHRES.2010.09.002>
- Wang, K. S., Zhang, Q., Liu, X., Wu, L., & Zeng, M. (2012). PKN0X2 is associated with formal thought disorder in schizophrenia: A meta-analysis of two genome-wide association studies. *Journal of Molecular Neuroscience*, 48(1), 265–272. <https://doi.org/10.1007/S12031-012-9787-4/METRICS>
- Watson, J. D., & Crick, F. H. C. (2016). Molecular structure of nucleic acids: A Structure for deoxyribose nucleic acid. *50 Years of DNA*, 171(4356), 83–84. <https://doi.org/10.1038/nature01396>
- Weeber, E. J., Levenson, J. M., & Sweatt, J. D. (2002). Molecular genetics of human cognition. *Molecular Interventions*, 2(6), 376–391, 339. <https://doi.org/10.1124/mi.2.6.376>
- Weigelt, K., Bergink, V., Burgerhout, K. M., Pescatori, M., Wijkhuijs, A., & Drexhage, H. A. (2013). Down-regulation of inflammation-protective microRNAs 146a and 212 in monocytes of patients with postpartum psychosis. *Brain, Behavior, and Immunity*, 29, 147–155. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2012.12.018>
- Weiss, L. A., Shen, Y., Korn, J. M., Arking, D. E., Miller, D. T., Fossdal, R., Saemundsen, E., Stefansson, H., Ferreira, M. A. R., Green, T., Platt, O. S., Ruderfer, D. M., Walsh, C. A., Altshuler, D., Chakravarti, A., Tanzi, R. E., Stefansson, K., Santangelo, S. L., Gusella, J. F., ... Daly, M. J. (2008). Association between microdeletion and microduplication at

- 16p11.2 and autism. *The New England Journal of Medicine*, 358(7), 667–675. <https://doi.org/10.1056/NEJMOA075974>
- Whiteford, H., Ferrari, A., & Degenhardt, L. (2016). Global burden of disease studies: Implications for mental and substance use disorders. *Health Affairs*, 35(6), 1114–1120. <https://doi.org/10.1377/hlthaff.2016.0082>
- Whittemore, A. S., & Halpern, J. (1994). A Class of Tests for Linkage Using Affected Pedigree Members. *Biometrics*, 50(1), 118. <https://doi.org/10.2307/2533202>
- Wishart, D. S., Feunang, Y. D., Guo, A. C., Lo, E. J., Marcu, A., Grant, J. R., Sajed, T., Johnson, D., Li, C., Sayeeda, Z., Assempour, N., Iynkkaran, I., Liu, Y., Maclejewski, A., Gale, N., Wilson, A., Chin, L., Cummings, R., Le, Di., ... Wilson, M. (2018). DrugBank 5.0: a major update to the DrugBank database for 2018. *Nucleic Acids Research*, 46(D1), D1074–D1082. <https://doi.org/10.1093/NAR/GKX1037>
- Wray, N. (2012). Using summary data from the Danish National Registers to estimate heritabilities for schizophrenia, bipolar disorder, and major depressive disorder. *Frontiers in Genetics*, 3(JUL), 118. <https://doi.org/10.3389/fgene.2012.00118>
- Wray, N. R., Lee, S. H., Mehta, D., Vinkhuyzen, A. A. E., Dudbridge, F., & Middeldorp, C. M. (2014). Research Review: Polygenic methods and their application to psychiatric traits. *Journal of Child Psychology and Psychiatry and Allied Disciplines*, 55(10), 1068–1087. <https://doi.org/10.1111/JCPP.12295>
- Wu, T., Liu, Z., Mak, T. S. H., & Sham, P. C. (2022). Polygenic power calculator: Statistical power and polygenic prediction accuracy of genome-wide association studies of complex traits. *Frontiers in Genetics*, 13, 989639. <https://doi.org/10.3389/FGENE.2022.989639/BIBTEX>
- Xiao, X., Zhang, C., Grigoriu-Serbanescu, M., Wang, L., Li, L., Zhou, D., Yuan, T. F., Wang, C., Chang, H., Wu, Y., Li, Y., Wu, D. D., Yao, Y. G., & Li, M. (2018). The cAMP responsive element-binding (CREB)-1 gene increases risk of major psychiatric disorders. *Molecular Psychiatry*, 23(9), 1–11. <https://doi.org/10.1038/mp.2017.243>
- Xu, B., Roos, J. L., Dexheimer, P., Boone, B., Plummer, B., Levy, S., Gogos, J. A., & Karayiorgou, M. (2011). Exome sequencing supports a de novo mutational paradigm for schizophrenia. *Nature Genetics*, 43(9), 864–868. <https://doi.org/10.1038/NG.902>
- Xu, S., Zhang, R., Niu, J., Cui, D., Xie, B., Zhang, B., Lu, K., Yu, W., Wang, X., & Zhang, Q. (2012). Oxidative stress mediated-alterations of the microRNA expression profile in mouse hippocampal neurons. *International Journal of Molecular Sciences*, 13(12), 16945–16960. <https://doi.org/10.3390/ijms131216945>
- Yamada, Y., Matsumoto, M., Iijima, K., & Sumiyoshi, T. (2020). Specificity and Continuity of Schizophrenia and Bipolar Disorder: Relation to Biomarkers. *Current Pharmaceutical Design*, 26(2), 191. <https://doi.org/10.2174/1381612825666191216153508>

- Yde Ohki, C. M., McNeill, R. V., Vernon, A. C., Smedler, E., Michel, T. M., Peitz, M., Potier, M. C., Kittel-Schneider, S., & Grünblatt, E. (2024). Correspondence to “Bipolar disorder-iPSC derived neural progenitor cells exhibit dysregulation of store-operated Ca²⁺ entry and accelerated differentiation” by Hewitt et al. (PMID: 37402854). *Molecular Psychiatry* 2024 29:12, 29(12), 3932–3934. <https://doi.org/10.1038/s41380-024-02602-9>
- Ye, S. B., Li, Z. L., Luo, D. H., Huang, B. J., Chen, Y. S., Zhang, X. S., Cui, J., Zeng, Y. X., & Li, J. (2014). Tumor-derived exosomes promote tumor progression and T-cell dysfunction through the regulation of enriched exosomal microRNAs in human nasopharyngeal carcinoma. *Oncotarget*, 5(14), 5439–5452. <https://doi.org/10.18632/ONCOTARGET.2118>
- Yengo, L., Vedantam, S., Marouli, E., Sidorenko, J., Bartell, E., Sakaue, S., Graff, M., Eliassen, A. U., Jiang, Y., Raghavan, S., Miao, J., Arias, J. D., Graham, S. E., Mukamel, R. E., Spracklen, C. N., Yin, X., Chen, S. H., Ferreira, T., Highland, H. H., ... Hirschhorn, J. N. (2022). A saturated map of common genetic variants associated with human height. *Nature* 2022 610:7933, 610(7933), 704–712. <https://doi.org/10.1038/s41586-022-05275-y>
- Zhao, Z., Xu, J., Chen, J., Kim, S., Reimers, M., Bacanu, S. A., Yu, H., Liu, C., Sun, J., Wang, Q., Jia, P., Xu, F., Zhang, Y., Kendler, K. S., Peng, Z., & Chen, X. (2015). Transcriptome sequencing and genome-wide association analyses reveal lysosomal function and actin cytoskeleton remodeling in schizophrenia and bipolar disorder. *Molecular Psychiatry*, 20(5), 563–572. <https://doi.org/10.1038/mp.2014.82>
- Ziats, M. N., & Rennert, O. M. (2013). Identification of differentially expressed microRNAs across the developing human brain. *Molecular Psychiatry* 2013 19:7, 19(7), 848–852. <https://doi.org/10.1038/mp.2013.93>
- Zou, M., Li, D., Lv, R., Zhou, Y., Wang, T., Liu, J., Tao, C., Ying, B., & Wang, L. (2012). Association between two single nucleotide polymorphisms at corresponding microRNA and schizophrenia in a Chinese population. *Molecular Biology Reports*, 39(4), 3385–3391. <https://doi.org/10.1007/s11033-011-1109-3>

Appendix

Tab. 14 Die 64 genomweit signifikanten Loci für BD aus der aktuell größten GWAS für BD.

Die Befunde beziehen sich auf genomweit signifikante SNP-Assoziationen in dem Locus. Bereits bekannte Befunde mit Angabe der Publikation PGC1 (PMID:21926972); PGC2 (PMID:31043756); Hou 2016 (PMID:27329760); Ikeda 2017 (PMID:28115744); Green 2013 (PMID:22565781); Charney 2017 (PMID:28072414). Neue Loci sind nach dem nächsten Gen zum Index-SNP benannt und fett markiert. *P*-Werte sind zweiseitig und basieren auf einer nach inverser Varianz gewichteten metaanalytischen Festeffekte-Schätzung. Tabelle modifiziert aus Mullins et al. (2021).

CHR	Position	SNP	<i>p</i>	OR	s.e.	A1/A2	A1 Frequenz in Kontrollen	Befunde für BD (Publikation)
1	61105668	rs2126180	1,6E-09	1,058	0,009	A/G	0,457	LINC01748
1	163745389	rs10737496	7,2E-09	1,056	0,009	C/T	0,444	NUF2
2	97416153	rs4619651	4,8E-11	1,068	0,01	G/A	0,67	LMAN2L (PGC2)
2	166152389	rs17183814	2,7E-08	1,108	0,019	G/A	0,924	SCN2A (PGC2)
2	169481837	rs13417268	2,1E-08	1,064	0,011	C/G	0,758	CERS6
2	193738336	rs2011302	4,3E-08	1,055	0,01	A/T	0,377	PCGEM1
2	194437889	rs2719164	4,9E-08	1,053	0,01	A/G	0,564	<i>intergenisch (PGC2)</i>
3	36856030	rs9834970	6,6E-19	1,087	0,009	C/T	0,481	TRANK1 (PGC2)
3	52626443	rs2336147	3,6E-13	1,07	0,009	T/C	0,498	ITIH1 (PGC2)
3	70488788	rs115694474	2,4E-08	1,068	0,012	T/A	0,799	MDFC2
3	107757060	rs696366	4,5E-08	1,053	0,009	C/A	0,55	CD47 (PGC2)
4	123076007	rs112481526	1,9E-09	1,065	0,011	G/A	0,256	KIAA1109
5	7542911	rs28565152	2E-09	1,07	0,011	A/G	0,238	ADCY2 (PGC2)
5	78849505	rs6865469	1,7E-08	1,06	0,01	T/G	0,274	HOMER1
5	80961069	rs6887473	8,8E-09	1,062	0,011	G/A	0,739	SSBP2 (PGC2)
5	137712121	rs10043984	3,7E-08	1,062	0,011	T/C	0,236	KDM3B
5	169289206	rs10866641	2,8E-11	1,065	0,009	T/C	0,575	DOCK2
6	26463575	rs13195402	5,8E-15	1,146	0,018	G/T	0,919	MHC
6	98565211	rs1487445	1,5E-15	1,078	0,009	T/C	0,487	POU3F2 (PGC2)
6	152793572	rs4331993	2E-08	1,056	0,01	A/T	0,382	<i>SYNE1 (Green 2013)</i>
6	166995260	rs10455979	4,2E-09	1,057	0,01	G/C	0,5	RPS6KA2 (PGC2)
7	2020995	rs12668848	1,9E-09	1,059	0,01	G/A	0,575	MAD1L1 (Hou 2016, Ikeda 2017)
7	11871787	rs113779084	1,4E-13	1,079	0,01	A/G	0,299	THSD7A (PGC2)
7	21492589	rs6954854	5,9E-10	1,06	0,009	G/A	0,425	SP4
7	24647222	rs12672003	2,7E-09	1,096	0,016	G/A	0,113	MPP6
7	105043229	rs11764361	3,5E-09	1,063	0,01	A/G	0,668	SRPK2 (PGC2)
7	131870597	rs6946056	3,7E-08	1,055	0,01	C/A	0,623	PLXNA4
7	140676153	rs10255167	1,6E-08	1,068	0,012	A/G	0,778	MRPS33 (PGC2)
8	9763581	rs62489493	2,6E-11	1,094	0,014	G/C	0,128	miR124-1
8	10226355	rs3088186	2,1E-08	1,058	0,01	T/C	0,287	MSRA
8	34152492	rs2953928	6,3E-09	1,124	0,02	A/G	0,067	RP1-84015.2 (lincRNA)
8	144993377	rs6992333	1,6E-09	1,062	0,01	G/A	0,41	PLEC
9	37090538	rs10973201	2,5E-08	1,101	0,017	C/T	0,11	ZCCHC7
9	141066490	rs62581014	2,8E-08	1,067	0,012	T/C	0,366	TUBBP5
10	18751103	rs1998820	4,1E-08	1,087	0,015	T/A	0,886	CACNB2
10	62322034	rs10994415	1,1E-11	1,125	0,017	C/T	0,082	ANK3 (PGC2)
10	64525135	rs10761661	4,7E-08	1,053	0,009	T/C	0,472	ADO
10	111648659	rs2273738	1,6E-11	1,096	0,014	T/C	0,135	ADD3 (Charney 2017, PGC2)
11	61618608	rs174592	9,9E-14	1,074	0,01	G/A	0,395	FADS2 (PGC2)
11	64009879	rs4672	3,4E-09	1,107	0,017	A/G	0,083	FKBP2
11	65848738	rs475805	2E-09	1,07	0,011	A/G	0,767	PAC31 (PGC2)
11	66324583	rs678397	5,5E-09	1,056	0,009	T/C	0,457	PC (PGC1, PGC2)
11	70517927	rs12575685	1,2E-10	1,067	0,01	A/G	0,327	SHANK2 (PGC2)
11	79092527	rs12289486	3,3E-08	1,086	0,015	T/C	0,115	ODZ4 (PGC1)
12	2348844	rs11062170	1,9E-15	1,081	0,01	C/G	0,333	CACNA1C (PGC2)
13	113869045	rs35306827	3,6E-09	1,068	0,011	G/A	0,775	CUL4A
14	99719219	rs2693698	2E-08	1,055	0,009	G/A	0,551	BCL11B
15	38973793	rs35958438	3,8E-08	1,066	0,012	G/A	0,772	C15orf53
15	42904904	rs4447398	2,6E-09	1,086	0,014	A/C	0,131	STARD9 (PGC2)
15	83531774	rs62011709	1,4E-08	1,064	0,011	T/A	0,747	HOMER2
15	85149575	rs748455	5E-11	1,07	0,01	T/C	0,719	ZNF592 (PGC2)
15	91426560	rs4702	3,5E-09	1,059	0,01	G/A	0,446	FURIN
16	9230816	rs28455634	2,6E-10	1,065	0,01	G/A	0,62	C16orf72
16	9926348	rs7199910	1,7E-08	1,057	0,01	G/T	0,312	GRIN2A (PGC2)
16	89632725	rs12932628	6,7E-09	1,058	0,01	T/G	0,487	RPL13
17	1835482	rs4790841	3,1E-08	1,075	0,013	T/C	0,151	RTN4RL1
17	38129841	rs11870683	2,8E-08	1,059	0,01	T/A	0,65	ERBB2 (Hou 2016)
17	38220432	rs61554907	1,6E-08	1,091	0,015	T/G	0,124	ERBB2 (Hou 2016)
17	42191893	rs228768	2,8E-10	1,067	0,01	G/T	0,294	HDAC5 (PGC2)
20	43682551	rs67712855	4,2E-11	1,07	0,01	T/G	0,687	STK4 (PGC2)
20	43944323	rs6032110	1E-09	1,059	0,009	A/G	0,512	WFDC12 (PGC2)
20	48033127	rs237460	4,3E-09	1,057	0,009	T/C	0,412	KCNB1
20	60865815	rs13044225	8,5E-09	1,056	0,01	G/A	0,44	OSBPL2
22	41153879	rs5758064	2E-08	1,054	0,009	T/C	0,523	SLC25A17

Abkürzungen: BD, bipolare Störung; GWAS, Genomweite Assoziationsanalyse; CHR, Chromosom; Position, GRCh37 Basenpaarposition; SNP, Einzelnukleotidpolymorphismus; OR, Chancenverhältnis; s.e., Standardfehler; A1, getestetes Allel; A2, anderes Allele.

Tab. 15 GWAS für die BD

Eine Übersicht der durchgeführten GWAS für BD mit Angaben zu den untersuchten Kohorten und der Anzahl der identifizierten genomweit signifikanten Risikoloci. Sortiert ist die Tabelle nach Anzahl der untersuchten Patienten.

<i>Studie</i>	<i>Jahr der Veröffentlichung</i>	<i>Patienten</i>	<i>Kontrollen</i>	<i>Genomweit signifikante Loci</i>
Mullins et al.	2021	41917	371549	64
Stahl et al.	2019	29764	169118	30
Charney et al.	2017	20349	31918	8
Sklar et al.	2011	11974	51792	4
Ikeda et al.	2018	10445	71137	5
Hou et al.	2016	9784	30471	6
Mühleisen et al.	2014	9427	14278	5
Green et al.	2013	9008	10829	1
Green et al.	2013	8699	12163	4
Cichon et al.	2011	8441	35362	1
Chen et al.	2013	7773	9883	5
Ferreira et al.	2008	4387	6209	1
Scott et al.	2009	3683	14507	0
Sklar et al.	2008	2235	2768	0
Burton et al.	2007	1868	2938	0
Smith et al.	2009	1346	1703	0
Baum et al.	2008	1233	1439	1
Kerner et al.	2011	1000	1034	2

Abkürzungen: GWAS, genomweite Assoziationsstudie; BD, bipolare Störung.

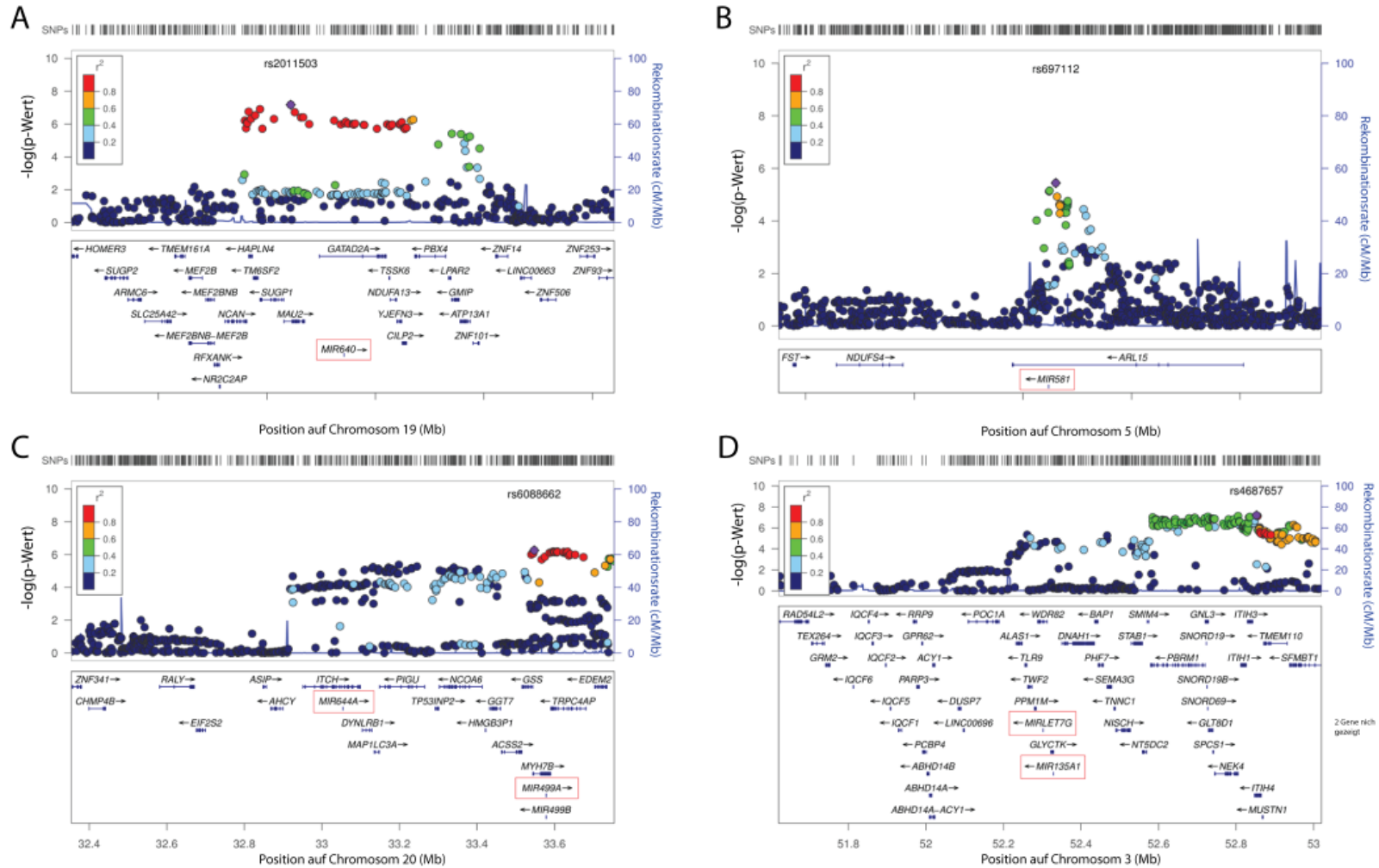


Abb. 13 Regionale Assoziationsplots für die miRNAs mit nominal signifikanten p -Werten, die nicht priorisiert wurden. Regionale Assoziationsplots für **A)** *miR-640* (miR-spezifisches Signal), **B)** *miR-581* (miR-spezifisches Signal), **C)** *miR-644* (Signal nicht miR-spezifisch), **D)** *mirR-Let-7g* und *miR-135a-1* (Signal nicht miR-spezifisch) und ± 500 kb flankierende Region. Die Assoziationsergebnisse genotypisierter und imputierter SNPs sind als $-\log_{10}(p\text{-Wert})$ angegeben. Der am stärksten assoziierte SNP ist unter Angabe der entsprechenden rs ID als Raute in violett dargestellt. Die Farbe der anderen SNPs ist entsprechend ihres r^2 zu dem am stärksten assoziierten SNP kodiert. Die Rekombinationsrate mit ihrer Skalierung auf der zweiten y-Achse wird als blaue Linie dargestellt.

Tab. 16 Übersicht der 107 im Gehirn exprimierten miRNA Zielgene assoziiert mit BD mit einem genbasierten $p < 0,05$

miR-499-5p	GPC6, C16orf72, WDR82, CACNB2, BCL11B, HNRNPC, EFHC1, ILF3, SLC8A3, QKI, ANKRD40, MARCKS, DYNLT1, AAK1, PTCH1, PRKAR1A, EPHA5, TANC1, VAV3, SOX5, MTX3, CPSF6, FKBP5, LHFPL2, RIMS1, RBMS3, TMEM2, RRP1B, RSN1, UHRF1BP1, EEA1, HOOK3, AP3S1, CHD9, UTP18, KCNQ5, C20orf112, MAST4, ETS1, RNF114, TOP1, CNTNAP2, ENAH, ZEB2, ACBD5, MAMDC2, JPH1, PURB, VPS13A, SPAST, TBC1D15, PTPN14, PIM1, LMX1A, KCNN3, PFN2, H2AFZ, C1orf151/MINOS1, ROD1/PTBP3
miR-708-5p	NRAS, CREB1, HNRNPC, PSMF1, RPGRIP1L, ATXN1, ALG9, RFT1, PFKM, QKI, GRIP2, AAK1, FOXN3, SLC44A5, STK4, LIF, MDGA1, AS3MT, FAM135B, BSN, ETF1, CDC42SE1, SHANK3, C20orf112, INTS7, GLG1, RORA, SSH2, ITPKB, SLC39A14, KPNA4, RNF165, HS2ST1, KCNN3, GOLT1A, C1orf144/SZRD1
miR-1908-5p	KLC2, NCDN, MDGA1, SLC12A5, HPD, NRGN, MINK1, PCDHA1, GDF11, OTX1, EEF1A2, SLC17A7

Tab. 17 Signifikante Anreicherung von miRNA Zielgenen in biologischen Signalwegen

miR	DB	Signalweg/Funktion	Gene in Kategorie	Zielgene	p korr.	Genname
miR-499	KEGG	Regulation of actin cytoskeleton	213	3	0,0032	ENAH, VAV3, PFN2
	GO	Forebrain development	281	8	0,0022	LMX1A, BCL11B, EPHA5, CNTNAP2, SLC8A3, ETS1, HOOK3, ZEB2
	GO	Limbic system development	73	5	0,0022	LMX1A, EPHA5, CNTNAP2, ETS1, ZEB2
	GO	Telencephalon development	168	6	0,0103	LMX1A, BCL11B, EPHA5, CNTNAP2, SLC8A3, ZEB2
	GO	Protein binding	7337	37	0,0152	AAK1, H2AFZ, ENAH, CNTNAP2, VPS13A, PFN2, ETS1, AP3S1, EEA1, RIMS1, CACNB2, QKI, PIM1, MARCKS, TBC1D15, CPSF6, TOP1, VAV3, CHD9, SLC8A3, DYNLT1, HOOK3, HNRNPC, ILF3, PTCH1, EFHC1, WDR82, UHRF1BP1, GPC6, KCNN3, PURB, FKBP5, SOX5, PTPN14, SPAST, PRKAR1A, ZEB2
	GO	Brain development	502	9	0,0216	BCL11B, SLC8A3, HOOK3, PTCH1, LMX1A, EPHA5, CNTNAP2, ETS1, ZEB2
	GO	Neuronal cell body	291	6	0,0288	EPHA5, EFHC1, CNTNAP2, TANC1, SLC8A3, TOP1
	GO	Cell body	312	6	0,036	SLC8A3, TOP1
	GO	Synaptic vesicle transport	68	4	0,0378	RIMS1, AP3S1, PFN2, EEA1
	GO	Central nervous system development	688	10	0,0418	BCL11B, SLC8A3, HOOK3, PTCH1, LMX1A, EPHA5, CNTNAP2, ETS1, SOX5, ZEB2
miR-708	GO	Multicellular organismal process	5644	33	0,0418	BCL11B, ENAH, CNTNAP2, VPS13A, PFN2, ETS1, KCNQ5, AP3S1, EEA1, RIMS1, CACNB2, QKI, PIM1, TOP1, VAV3, SLC8A3, TMEM2, DYNLT1, JPH1, HOOK3, PTCH1, EPHA5, TANC1, KCNN3, LMX1A, PURB, PTPN14, SPAST, SOX5, ZEB2, PRKAR1A, RNF114, ROD1/PTBP3
	GO	Protein C-terminus binding	158	4	0,0084	ATXN1, SHANK3, PFKM, FOXN3
	GO	Neuron projection	651	5	0,0008	MINK1, SLC12A5, SLC17A7, NCDN, KLC2
	GO	Nervous system development	1724	7	0,0045	MINK1, PCDHA1, MDGA1, OTX1, GDF11, NRGN, NCDN
	GO	Cell projection	1230	5	0,0162	MINK1, SLC12A5, SLC17A7, NCDN, KLC2
	GO	Neuronal cell body	291	3	0,0189	SLC12A5, NCDN, EEF1A2
miR-1908	GO	Cell body	312	3	0,0243	

Abkürzungen: miR, microRNA; DB, Datenbank; p korr., Bonferroni korrigierter p-Wert; Zielgene, Anzahl der Zielgene in betreffendem biologischen Signalweg; KEGG, Kyoto Encyclopaedia of Genes and Genomes; GO, Gene Ontology.

Tab. 18 Primersequenzen für PCR und Sanger Sequenzierung.

Dargestellt sind die Informationen der Primer, die im Rahmen der Validierung der ausgewählten Kandidatenvarianten für die Amplifikation und die anschließende Sequenzierung mittels Sanger verwendet wurden. Benannt sind die Primer nach dem Projekt „KUB“ (Kuba), dem durch die genetische Variante implizierten Gen und der jeweiligen Primerkombination mit F für den For und R für den Rev Primer. Die Größe gibt die jeweilige Produktgröße in Basenpaaren (bp) an. Die Position gibt Anfang und Ende des PCR-Produktes an (GRCh37).

Name	Sequenz (5' - 3')	Größe [bp]	Position
Kuba I			
KUB_SERPING1_F1 KUB_SERPING1_R1	CTCATGCTCCTTCCTCTACC GAGTAACCCTAAGCTGCCAG	469	chr11:57378968-57379436
KUB_TM220_F1 KUB_TM220_R1	TGCCCCGCTAGTCAGTTACAC TTCAAATTCGACTTCCGTCC	476	chr17:10633011-10633486
Kuba II – Teilfamilie 2			
KUB_ABCA4_F1 KUB_ABCA4_R1	TCCAGGGTACACAAGGCAAG TGTTATTGGTGGGGTACAGCC	331	chr1:94544841-94545171
KUB_DNAH7_F1 KUB_DNAH7_R1	CAATGTGCCCATATGAGAAG GAGGAAATACGAGATGGCTG	361	chr2:196726247-196726607
KUB_RCCD1_F1 KUB_RCCD1_R1	GAGGCGTTACTGCAGGTCTG GACCGTCGTCAGCTACAGTC	369	chr15:91500453-91500821
Kuba II – Teilfamilie 3			
KUB_EPS8L3_F1 KUB_EPS8L3_R1	AGCACGAGACACTCCCAATG AGCCAGAAGATTCTCTCCAG	400	chr1:110293235-110293634
KUB_OLFML2B_F1 KUB_OLFML2B_R1	CCATTGTCCCAGGCATAGAG CTTCAGCCAGGAGGTCATTG	297	chr1:161953502-161953798
KUB_CAPN2_F1 KUB_CAPN2_R1	AGGCCAAGGAGAATGTGAGC CCTCTGTATCCCAATGCGTG	571	chr1:223934570-223935140
KUB_COL3A1_F1 KUB_COL3A1_R1	TACTGAAAGTGATGGCATGC CTGATCCATGTATGCAATGC	297	chr2:189875209-189875505
KUB_ATR_F1 KUB_ATR_R1	AGCTGGTTGTGCTGGTAGTC GTCAATTAGATGAACACATGGG	260	chr3:142281446-142281705
KUB_CSNK1G3_F1 KUB_CSNK1G3_R1	TTGTGTCTCTATTCCCTTCC TCACCAACTGTTTACCAATC	346	chr5:122925911-122926256
KUB_THYN1_F1 KUB_THYN1_R1	TCATCTGAGTAAGTGCTGGG GATGGGTAAAGAATGTGCAG	312	chr11:134118953-134119264
KUB_MYH7_F2 KUB_MYH7_R1	TGGAGGAGAGACCCATATTG TACCAACTTTGCTACTTGCC	267	chr14:23898322-23898588
KUB_FAM169B_F1 KUB_FAM169B_R1	GAAGTCTTGGTTTCTGCTGC CTACCTGCTGCCTGTCTTTG	346	chr15:98994863-98995208
KUB_ZNF433_F1 KUB_ZNF433_R1	TATAAGGTCCATCTCCACGG AAAGAAGGTCATCAGCATGG	367	chr19:12127087-12127453
KUB_CRX_F2 KUB_CRX_R1	TTGCAGAGTCTCAAGAAAGC GACATACATTTTCAGATGAACCC	483	chr19:48337465-48337947
KUB_SELO_F1 KUB_SELO_R2	GGTGACAGGACATCAGGAAG GATTGCCCTGGACTCTCTAC	436	chr22:50648459-50648894

Tab. 19 Potenziell funktionelle Varianten mit MAF $\leq 5\%$ identifiziert in den kubanischen Familien.

Genetische Varianten mit einer MAF von $\leq 5\%$, die von mindestens einem der fünf verwendeten Prädiktionsalgorithmen als potenziell funktionell eingeschätzt wurden. Die gelisteten Varianten wurden von allen mittels WES untersichten Mitgliedern der jeweiligen Familie **A)** Kuba I, **B)** Teilfamilie 2 und **C)** Teilfamilie 3 geteilt.

A

Chromosom	Position Start	Position Ende	Größe [bp]	Ref	Alt	An	Typ	HGNC	ExAC MAF	SIFT	Polyphen2 HDIV	Polyphen2 HVAR	LRT	MutationTaster	Σ Prädiktion	Provean/Sift// MutationTaster	Kuba	exLID	p-Wert	Nächster Marker
1	86622060	86622060	1	C	T	1	SNP	COL24A1	1.65E-02	T	D;D	D;D	N	D	3		I	1.079	0.01291	rs6576807
1	100154643	100154643	1	C	T	1	SNP	PALMD	1.94E-03	T	P;P	B;B	N	N	1		I	0.627	0.04466	rs6689789
1	100349983	100349983	1	C	T	1	SNP	AGL	2.87E-03	D	B;B;B	B;B;B	D	D	3		I	0.452	0.07458	rs11166342
1	248112521	248112521	1	G	A	1	SNP	OR2L8	5.11E-04	D	B	B	N	D	2		I	0.493	0.06594	rs3811445
2	25057670	25057670	1	C	T	1	SNP	ADCY3	4.98E-05	T	P;P;P	B;B;B	N	D	2		I	0.122	0.2264	rs59644324
2	27721143	27721143	1	G	A	1	SNP	GCKR	2.28E-03	D	D;D	D;D	D	D	5		I	0.122	0.2264	rs4665987
2	97527138	97527138	1	G	C	1	SNP	SEMA4C	6.01E-04	T	D;D;D	D;D;D	D	D	4		I	0.022	0.3739	rs55666658
2	105708941	105708941	1	G	A	1	SNP	MRPS9	4.07E-03	T	D	D	D	D	4		I	0.024	0.3708	rs4549111
2	130738031	130738031	1	A	G	1	SNP	RAB6C	6.17E-03	T	B	B	NA	D	1		I	0.023	0.3728	rs4575668
3	24231635	24231635	1	G	T	1	SNP	THRB	1.65E-04	T	B	B	NA	D	1		I	1.078	0.01292	rs1505283
3	25638076	25638076	1	G	C	1	SNP	RARB	1.47E-03	T	B;B	B;B	NA	D	1		I	1.078	0.01292	rs900656
3	97806299	97806299	1	T	-	1	DEL	OR5AC2	NA	NA	NA	NA	NA	D	1	NA/NA//D	I	0.122	0.2264	rs4318589
7	99453258	99453258	1	G	T	1	SNP	CYP3A43	NA	T	P;B;B;B	B;B;B;B	N	N	1		I	1.134	0.01116	rs651430
10	115959005	115959005	1	G	C	1	SNP	TDRD1	NA	D	B;B;B;B	B;B;B;B	N	N	1		I	0.122	0.2266	rs10787516
11	5444040	5444040	1	C	T	1	SNP	OR51Q1	2.31E-02	D	D	D	N	N	3		I	-0.012	0.593	rs77410929
11	57379205	57379205	1	C	T	1	SNP	SERPING1	4.94E-05	D	P;P	B;B	D	D	4		I	0.022	0.3739	
11	64795010	64795010	1	A	C	1	SNP	SNX15	NA	D	B	B	D	D	3		I	0.022	0.3739	rs2282499
11	65386523	65386523	1	G	A	1	SNP	PCNXL3	6.17E-04	T	P	B	N	D	2		I	0.022	0.3739	rs2009453
12	27066530	27066530	1	T	A	1	SNP	ASUN	1.36E-03	T	B;B	B;B	D	D	2		I	1.472	0.00461	rs7304834
12	27234184	27234184	1	C	A	1	SNP	C12orf71	5.99E-03	D	B	B	U	N	1		I	1.472	0.00461	rs12229528
12	121618257	121618257	1	C	G	1	SNP	P2RX7	1.46E-02	T	P;P;P;B	B;B;B;B	N	P	1		I	0.013	0.4045	12-121606063
17	10633149	10633149	1	C	A	1	SNP	TMEM220	NA	D	D;D	P;P	N	D	4		I	1.078	0.01293	
19	42221434	42221434	1	C	A	1	SNP	CEACAM5	1.45E-02	T	P;B	P;P	NA	P	2		I	0.004	0.4446	rs10416824
19	47569842	47569842	1	G	C	1	SNP	ZC3H4	3.82E-02	T	P	P	N	P	2		I	0.002	0.4603	rs2032809
19	49658424	49658424	1	G	A	1	SNP	HRC	1.03E-02	D	D	P	NA	D	4		I	0.002	0.4603	rs78438280

B

Nächster Marker	p-Wert	exlOD	Kuba-Teilfamilie	Provean/Sift// MutationTaster	Σ Prädiktion	MutationTaster	LRT	Polyphe2 HVAR	Polyphe2 HDIV	SIFT	ExAC MAF	HGNC	Typ	An	Alt	Ref	Größe [bp]	Position Ende	Position Start	Chromosom
rs3795542	0.9644	-0.707	II-2		2	N	U	P	P	T	4.17E-03	<i>GBP2</i>	SNP	1	T	C	1	89579827	89579827	1
	0.8207	-0.183	II-2		5	D	D	P;B	P;B	D	4.94E-04	<i>ABCA4</i>	SNP	1	T	A	1	94544977	94544977	1
rs11344413	0.8199	-0.182	II-2		2	N	N	D;D	D;D	T	1.83E-03	<i>F3</i>	SNP	1	C	T	1	95001655	95001655	1
rs11315680	0.6503	-0.032	II-2		2	D	D	B;B	B;B	T	1.81E-03	<i>RGS8</i>	SNP	1	A	G	1	182617348	182617348	1
rs4085435	0.8674	-0.27	II-2		1	D	N	B;B;B;B	B;B;B;B	T	8.25E-06	<i>PPP1R12B</i>	SNP	1	G	A	1	202399920	202399920	1
	0.7603	-0.109	II-2		5	D	D	D	D	D	4.17E-04	<i>DNAH7</i>	SNP	1	T	C	1	196726484	196726484	2
rs56278864	0.7619	-0.11	II-2		1	D	N	B	B	T	3.21E-04	<i>DNAH7</i>	SNP	1	T	C	1	196753037	196753037	2
rs6436125	0.8056	-0.161	II-2		1	D	N	B	B	T	6.81E-05	<i>ATG9A</i>	SNP	1	T	C	1	220087021	220087021	2
rs4835355	0.5952	-0.013	II-2		4	D	D	D	D	T	9.69E-03	<i>POU4F2</i>	SNP	1	A	C	1	147561147	147561147	4
rs1350027	0.591	-0.011	II-2		1	D	N	B;B;B;B;B	B;B;B;B;B	T	7.48E-05	<i>RFXFP1</i>	SNP	1	A	G	1	159520547	159520547	4
rs1423536	0.108	0.332	II-2		1	D	N	B;B	B;B	T	4.95E-05	<i>ADAMTS12</i>	SNP	1	G	A	1	33535048	33535048	5
rs151589	0.8714	-0.279	II-2		2	D	D	B;B;B	B;B;B	T	4.95E-05	<i>SLC30A5</i>	SNP	1	G	A	1	68414357	68414357	5
rs585219	0.8597	-0.253	II-2		5	D	D	D;D	D;D	D	3.67E-03	<i>CLK4</i>	SNP	1	A	T	1	178035455	178035455	5
rs549676	0.713	-0.069	II-2		4	P	D	P;D;D;D;D;D	D;D;D;D;D;D	D	2.25E-02	<i>PITRM1</i>	SNP	1	A	G	1	3181107	3181107	10
rs10873171	0.5734	-0.007	II-2		2	D	N	B;B	P;P	T	2.17E-03	<i>SYNE2</i>	SNP	1	G	C	1	64457747	64457747	14
rs7155830	0.5913	-0.012	II-2		1	D	N	B	B	T	2.11E-03	<i>PLEKHH1</i>	SNP	1	C	G	1	68044060	68044060	14
rs17782775	0.594	-0.012	II-2		3	D	D	B;B	P;P	T	3.54E-03	<i>VTG1B</i>	SNP	1	T	C	1	68123146	68123146	14
rs8024617	0.764	-0.112	II-2		4	D	NA	D	D	D	2.60E-03	<i>UNC13C</i>	SNP	1	A	G	1	54305612	54305612	15
	0.8617	-0.257	II-2		4	D	N	P;P	D;D	D	NA	<i>RCCD1</i>	SNP	1	C	G	1	91500673	91500673	15
rs6504086	0.7065	-0.064	II-2		3	D	D	B	P	T	1.66E-05	<i>MED13</i>	SNP	1	C	T	1	60088532	60088532	17
rs6504086	0.7065	-0.064	II-2	NA/NA//D	1	D	NA	NA	NA	NA	6.91E-03	<i>EFCAB3</i>	SNP	1	T	C	1	60469326	60469326	17
rs7239195	0.9925	-1.283	II-2		3	D	N	P;B;B;B	P;B;P;P	T	3.67E-03	<i>RIOK3</i>	SNP	1	T	C	1	21057228	21057228	18
rs12957036	0.8725	-0.281	II-2		2	N	N	P;P	D;D	T	8.26E-06	<i>CCDC102B</i>	SNP	1	T	C	1	66564579	66564579	18
rs208226	0.8211	-0.184	II-2		2	D	N	B;B	B;B	D	1.08E-04	<i>PTPRT</i>	SNP	1	C	T	1	41514512	41514512	20
rs6070254	0.7415	-0.091	II-2		1	N	NA	B	B	D	2.43E-03	<i>ZBP1</i>	SNP	1	T	C	1	56188195	56188195	20

117

	Nächster Marker	p-Wert	exLOD	Kuba-Teilfamilie	Provean/Sift// MutationTaster	Σ Prädiktion	MutationTaster	LRT	Polyphen2 HVAR	Polyphen2 HDIV	SIFT	ExAC MAF	HCNC	Typ	An	Alt	Ref	Größe [bp]	Position Ende	Position Start	Chromosom
1		0.0481	0.601	II-3		5	D	D	D;D;D	D;D;D	D	3.06E-04	EPS8L3	SNP	1	T	C	1	110293386	110293386	1
1	rs6682611	0.2663	0.085	II-3		1	D	N	B	B	T	6.48E-03	DCST2	SNP	1	T	C	1	154995909	154995909	1
1	rs6682611	0.2663	0.085	II-3		3	D	D	B;B;B	P;P;P	T	8.24E-06	DCST1	SNP	1	T	G	1	155018407	155018407	1
1	rs2974937	0.2663	0.085	II-3		1	D	N	B;B;B	B;B;B	T	7.80E-03	SCAMP3	SNP	1	T	C	1	155231927	155231927	1
1		0.2572	0.092	II-3		4	D	NA	D;D	D;D	D	2.97E-04	OLFML2B	SNP	1	A	C	1	161953665	161953665	1
1	rs10797752	0.2567	0.093	II-3		1	D	NA	B	B	T	1.05E-03	ZNF648	SNP	1	A	G	1	182026278	182026278	1
1	rs10922096	0.2573	0.092	II-3		2	D	D	B;B;B;B	B;B;B;B	T	2.24E-03	KCNT2	SNP	1	G	C	1	196295914	196295914	1
1		0.2572	0.092	II-3		5	D	D	D;D	D;D	D	6.02E-04	CAPN2	SNP	1	T	C	1	223934845	223934845	1
2	rs74181299	0.04806	0.601	II-3		1	N	N	B;B;B;B	P;P;P;P;P	T	2.46E-03	CEP68	SNP	1	T	G	1	65296745	65296745	2
2	rs2421097	0.04806	0.601	II-3		3	D	N	P;B;B	D;B;P	T	2.30E-03	SFXN5	SNP	1	A	G	1	73195646	73195646	2
2	rs7608434	0.2179	0.132	II-3		5	D	D	D	D	D	5.42E-03	MFSD9	SNP	1	A	C	1	103340233	103340233	2
2	rs11291906	0.2717	0.08	II-3		4	D	U	P	D	D	3.18E-02	SFT2D3	SNP	1	A	C	1	128459473	128459473	2
2	rs4575668	0.1129	0.319	II-3		1	N	N	B	B	D	7.20E-03	MZT2B	SNP	1	T	C	1	130948087	130948087	2
2		0.04806	0.601	II-3		4	D	D	D	D	T	1.98E-04	COL3A1	SNP	1	A	G	1	189875383	189875383	2
2	rs13015324	0.04808	0.601	II-3		3	D	N	B	P	D	3.74E-03	SDPR	SNP	1	C	T	1	192701265	192701265	2
2	rs13411096	0.261	0.089	II-3		3	D	D	B;B;B;B;B	B;B;P;B;B	T	1.30E-03	ATG4B	SNP	1	A	C	1	242608080	242608080	2
3	rs333356	0.2572	0.092	II-3		4	D	N	P;D;B	D;D;B	D	NA	KALRN	SNP	1	A	C	1	124351360	124351360	3
3		0.04828	0.6	II-3	NA/NA//D	1	D	NA	NA	NA	NA	NA	ATR	INDEL	(T)2	(T)2	T	1	142281560	142281560	3
3	rs4854945	0.2572	0.092	II-3		5	D	D	D;D	D;D	D	2.11E-03	USP13	SNP	1	T	C	1	179460042	179460042	3
4	rs10022307	0.04806	0.601	II-3		2	N	D	B	P	D	4.35E-03	EVC2	SNP	1	C	T	1	5642327	5642327	4
4	rs6825510	0.2574	0.092	II-3		3	D	NA	P;B;B	D;B;B	T	NA	SORBS2	SNP	1	C	T	1	186599647	186599647	4
4	rs7663253	0.2572	0.092	II-3		5	D	D	D	D	D	4.55E-03	FAT1	SNP	1	A	G	1	187542899	187542899	4
5	rs11951144	0.2572	0.092	II-3		2	N	N	B;B	P;B	D	2.94E-03	CCDC152	SNP	1	A	G	1	42799870	42799870	5
5	rs245099	0.2572	0.092	II-3		1	D	N	B	B	T	5.35E-03	ANKRD34B	SNP	1	C	T	1	79854935	79854935	5
5	rs12519370	0.9519	-0.601	II-3		1	D	N	B	B	T	6.37E-03	GPR98	SNP	1	A	G	1	89923101	89923101	5
5		0.2572	0.092	II-3		5	D	D	B;P;B;B;P;B	P;P;P;B;P;B	D	NA	CSNK1G3	SNP	1	T	C	1	122926124	122926124	5
5	rs72795121	0.2576	0.092	II-3		4	D	D	D	D	T	1.65E-03	RAD50	SNP	1	A	G	1	131915022	131915022	5
5	rs1860991	0.2572	0.092	II-3		2	D	N	B;B;B;B	B;B;B;B	T	4.42E-03	FGF1	SNP	1	T	C	1	141993631	141993631	5
6	rs7753212	0.04809	0.601	II-3		3	D	N	P	D	T	3.07E-03	DDO	SNP	1	T	C	1	110726101	110726101	6
6	rs9490112	0.04805	0.601	II-3		2	N	N	B	P	D	2.77E-03	C6orf170	SNP	1	A	G	1	121402024	121402024	6
6	rs4386829	0.2573	0.092	II-3		2	N	N	B;B	P;B	D	3.45E-03	ECT2L	SNP	1	C	T	1	139164210	139164210	6
6	rs35553005	0.2572	0.092	II-3		2	D	D	B;B;B	B;B	T	NA	SHPRH	SNP	1	G	C	1	146245967	146245967	6
6	rs9322101	0.04806	0.601	II-3		1	D	N	B	B	T	1.82E-03	SAMD5	SNP	1	T	C	1	147830303	147830303	6
7	rs7780888	0.04806	0.601	II-3		2	D	NA	B	P	T	NA	ABCB5	SNP	1	G	C	1	20683239	20683239	7
7	rs4720288	0.2572	0.092	II-3		5	D	D	D;D	D;D	T	1.16E-03	AMPH	SNP	1	A	G	1	38574539	38574539	7
7	rs651430	0.2572	0.092	II-3		2	N	N	B;P	P;P	T	3.86E-04	ZNF394	SNP	1	G	C	1	99097613	99097613	7
7	rs35166397	0.2572	0.092	II-3	NF//D	1	D	NA	NA	NA	NA	4.69E-04	MOGAT3	SNP	1	A	C	1	100841467	100841467	7
7	rs35166397	0.2572	0.092	II-3		2	D	D	B	B	T	5.87E-04	PLOD3	SNP	1	T	C	1	100855568	100855568	7
7	rs11294756	0.2572	0.092	II-3		3	D	N	P	D	T	8.76E-03	TMEM176B	SNP	1	C	T	1	150491156	150491156	7
8	rs12681264	0.2572	0.092	II-3		1	N	N	B	B	T	6.64E-05	RP1	SNP	1	A	G	1	55542309	55542309	8
8	rs3885968	0.2572	0.092	II-3		1	N	D	B;B	B;B	T	1.79E-03	OTUD6B	SNP	1	A	G	1	92092926	92092926	8

9	73479427	73479427	1	C	T	1	SNP	TRPM3	1.44E-04	T	B;B;P;B	B;B;P;B	D	D	4		II-3	0.092	0.2572	rs7350298
9	74315589	74315589	1	C	T	1	SNP	TMEM2	1.91E-04	T	B;B	B;B	N	D	1		II-3	0.092	0.2572	rs11143049
9	84609162	84609162	1	G	C	1	SNP	FAM75D1	3.84E-03	T	D	P	NA	N	2		II-3	0.457	0.07333	rs2209725
9	86474252	86474252	1	C	T	1	SNP	KIF27	1.34E-03	D	D;D;D	D;D;D	D	D	5		II-3	0.601	0.04805	rs28832874
9	96052324	96052324	1	T	C	1	SNP	WNK2	1.75E-04	T	B;B;B;P	B;B;B;B	N	N	1		II-3	0.092	0.2572	rs10992662
9	136302010	136302010	1	C	T	1	SNP	ADAMTS13	3.68E-03	T	D;D;D	D;D;D	NA	D	3		II-3	0.092	0.2572	rs7860182
10	79397367	79397367	1	T	C	1	SNP	KCNMA1	1.37E-03	NA	B;B;B;B;B;B	B;B;B;B;B;B	NA	D	1		II-3	0.092	0.2573	rs2619627
10	79566684	79566684	1	G	A	1	SNP	DLG5	3.37E-03	T	B;P	B;P	N	D	3		II-3	0.092	0.2573	rs2619627
10	79769647	79769647	1	C	T	2	SNP	POLR3A	2.19E-03	NA	B	B	N	D	1		II-3	0.092	0.2572	rs1678632
10	117228756	117228756	1	T	A	1	SNP	ATRNL1	3.40E-05	T	B;B	B;B	D	D	2		II-3	0.092	0.2572	rs75138962
10	117228762	117228762	1	A	G	1	SNP	ATRNL1	3.39E-05	T	P;P	B;B	D	D	3		II-3	0.092	0.2572	rs75138962
10	123845535	123845535	1	A	T	1	SNP	TACC2	NA	D	B;B;B	B;B;B	N	N	1		II-3	0.468	0.07095	rs7900585
10	129874929	129874929	1	G	C	1	SNP	PTPRE	2.72E-04	T	P;P;P;P	B;B;B;B	D	D	3		II-3	0.023	0.3716	rs7894368
11	615121	615121	1	G	T	1	SNP	IRF7	2.99E-05	T	P;P;P	B;P;B	N	N	2		II-3	0.6	0.04827	rs11246226
11	1316889	1316889	1	T	C	1	SNP	TOLLIP	5.37E-04	T	B;B	B;B	N	D	1		II-3	0.601	0.04806	rs12365382
11	1887763	1887763	1	C	G	1	SNP	LSP1	1.95E-02	D	B	B	NA	P	1		II-3	0.601	0.04808	rs4980378
11	5080077	5080077	1	T	C	1	SNP	ORS2E2	5.13E-03	D	P	B	N	N	2		II-3	0.601	0.04806	rs36034960
11	134119132	134119132	1	G	A	1	SNP	THYN1	9.88E-05	T	B;P	B;P	D	D	4		II-3	0.303	0.1189	
12	21733338	21733338	1	A	T	1	SNP	GYS2	1.65E-05	T	B	B	D	D	2		II-3	0.601	0.04806	rs7957415
12	51773152	51773152	1	C	G	1	SNP	GALNT6	5.94E-03	T	B	B	D	N	1		II-3	0.601	0.04806	rs7965476
12	52942001	52942001	1	G	A	1	SNP	KRT71	2.66E-03	D	D	D	D	N	4		II-3	0.601	0.04805	rs393352
12	52960917	52960917	1	G	A	1	SNP	KRT74	1.14E-03	T	D	P	N	N	2		II-3	0.601	0.04806	rs2232559
12	52965240	52965240	1	T	C	1	SNP	KRT74	1.00E-03	NA	NA	NA	NA	D	1		II-3	0.601	0.04806	rs2232559
13	60545105	60545105	1	G	T	1	SNP	DIAPH3	3.67E-03	T	P;D;P	P;P;B	D	D	4		II-3	0	0.5173	rs66948092
13	61103041	61103041	1	G	T	1	SNP	TDRD3	3.07E-03	NA	B;B;B	B;B;B	N	D	1		II-3	-0.005	0.5578	rs9538679
13	99337112	99337112	1	T	C	1	SNP	SLC15A1	4.83E-03	T	B	B	D	D	2		II-3	0.092	0.2572	rs4772139
13	113536257	113536257	1	T	C	1	SNP	ATP11A	5.60E-04	D	P	B	N	N	2		II-3	0.092	0.2573	rs4907759
14	21555481	21555481	1	G	A	1	SNP	ARHGEF40	4.16E-03	T	D	D	D	D	4		II-3	0.092	0.2573	rs1952151
14	23898481	23898480	2	-	TG	1	INS	MYH7	NA	NA	NA	NA	NA	NA	1	NA/NA//D	II-3	0.092	0.257	
14	24791834	24791834	1	C	T	1	SNP	ADCY4	5.86E-05	D	D	P	N	D	4		II-3	0.092	0.2572	rs145045308
15	98995065	98995065	1	A	G	1	SNP	FAM169B	4.56E-04	D	D	D	D	D	5		II-3	0.092	0.2571	
16	15815335	15815335	1	T	C	1	SNP	MYH11	1.43E-03	D	B;B;B;B;B	B;B;B;B;B	D	D	3		II-3	0.092	0.2575	rs215565
16	15818780	15818780	1	C	T	1	SNP	MYH11	7.01E-04	T	P;P;P;P;P	B;B;B;B;B	D	D	3		II-3	0.092	0.2575	rs215565
16	16302637	16302637	1	G	A	1	SNP	ABCC6	7.04E-04	D	D;D	D;P	U	D	4		II-3	0.092	0.2575	rs129081
16	69905721	69905721	1	C	T	1	SNP	WWP2	1.03E-03	NA	B	B	N	D	1		II-3	0.601	0.04805	rs71385636
16	84056442	84056442	1	G	C	1	SNP	SLC38A8	1.02E-02	D	D	P	N	D	4		II-3	0.601	0.04808	rs4782862
16	86565832	86565832	1	G	C	1	SNP	MTHFSD	1.22E-03	D	P;P;P;P	P;P;P;B	D	D	5		II-3	0.601	0.04806	rs4843956
16	89293525	89293525	1	G	A	1	SNP	ZNF778	3.92E-02	D	B;B	B;B	NA	P	1		II-3	0.601	0.04807	rs114014001
17	3101141	3101141	1	C	A	1	SNP	OR1A2	8.46E-03	D	B	B	D	N	2		II-3	0.601	0.04806	rs200215972
17	3101542	3101542	1	C	T	1	SNP	OR1A2	8.30E-03	D	P	P	D	N	4		II-3	0.601	0.04806	rs200215972
17	7760158	7760158	1	G	T	1	SNP	LSMD1	3.91E-04	D	D;D	D;P	D	D	5		II-3	0.601	0.04811	rs4791443
17	17124804	17124804	1	C	T	1	SNP	FLCN	4.06E-04	NA	NA	NA	NA	D	1	NA/NA//D	II-3	0.601	0.04805	rs9910857
17	39022440	39022440	1	T	C	1	SNP	KRT12	2.35E-03	D	D	D	D	D	5		II-3	0.596	0.04886	rs58305258
17	39593734	39593734	1	C	T	1	SNP	KRT38	1.93E-04	T	P	B	N	N	1		II-3	0.596	0.04877	rs3760524
17	42254298	42254298	1	C	T	1	SNP	C17orf65	2.78E-02	D	B	B	NA	D	2		II-3	0.557	0.05463	rs11428285
19	1482902	1482902	1	G	T	1	SNP	PCSK4	3.71E-04	T	P	B	U	N	1		II-3	0.093	0.2569	19-1817134
19	1487614	1487614	1	C	T	1	SNP	PCSK4	2.67E-04	D	P	B	N	D	3		II-3	0.093	0.2569	19-1817134
19	1828319	1828319	1	C	T	1	SNP	REXO1	2.61E-03	T	P;B	B;B	N	N	1		II-3	0.093	0.2569	19-1817134
19	8182446	8182446	1	C	A	1	SNP	FBN3	2.62E-02	T	B	B	U	D	1		II-3	0.092	0.257	rs4433922
19	12127214	12127218	5	AGAGG	-	1	DEL	ZNF433	NA	NA	NA	NA	NA	D	1	NA/NA//D	II-3	0.092	0.2571	

19	12996500	12996500	1	A	G	1	SNP	<i>KLF1</i>	3.57E-02	T	P	B	N	P	1		II-3	0.092	0.2573	19-12968820
19	14752395	14752395	1	C	T	1	SNP	<i>EMR3</i>	3.11E-03	T	P;P;D	P;B;P	NA	N	2		II-3	0.092	0.2572	rs8101649
19	36297671	36297671	1	G	A	1	SNP	<i>PRODH2</i>	1.84E-03	D	D	P	NA	D	4		II-3	0.092	0.2572	rs3216453
19	38896204	38896204	1	T	G	1	SNP	<i>FAM98C</i>	9.49E-03	T	P;B	B;B	N	D	2		II-3	0.092	0.2572	rs2368520
19	40317643	40317643	1	T	G	1	SNP	<i>DYRK1B</i>	NA	NA	NA	NA	NA	D	1	NF//D	II-3	0.092	0.2572	rs2005894
19	44273625	44273625	1	G	T	1	SNP	<i>KCNN4</i>	1.39E-03	D	D	D	D	D	5		II-3	0.092	0.2572	rs346531
19	48337728	48337728	1	C	G	1	SNP	<i>CRX</i>	4.12E-04	T	D	P	D	D	4		II-3	0.092	0.2573	
19	53740407	53740407	1	T	(T)2	1	INDEL	<i>ZNF677</i>	3.83E-03	NA	NA	NA	NA	D	1	NA/NA//D	II-3	0.092	0.2577	rs5025886
19	54755918	54755918	1	C	G	1	SNP	<i>LILRB5</i>	2.01E-02	T	P;P;B;B	B;P;B;B	NA	P	2		II-3	0.351	0.1018	rs431001
19	54974754	54974754	1	C	G	1	SNP	<i>LENG9</i>	2.89E-02	D	B	B	NA	N	1		II-3	0.351	0.1018	rs431001
19	55993436	55993436	1	G	T	1	SNP	<i>ZNF628</i>	1.44E-02	D	B	B	U	N	1		II-3	0.601	0.04811	rs10414827
20	23667811	23667811	1	C	T	1	SNP	<i>CST4</i>	9.06E-05	T	P	P	U	N	2		II-3	0.092	0.2572	rs76675555
21	43867290	43867290	1	A	G	1	SNP	<i>UBASH3A</i>	4.22E-03	D	B;B	B;B	N	D	2		II-3	0.092	0.2573	rs11318096
22	19467510	19467510	1	C	G	1	SNP	<i>CDC45</i>	1.46E-03	D	P;P;P;P	P;P;B;P;B	D	D	5		II-3	0.601	0.04811	rs35547204
22	46449889	46449889	1	T	G	1	SNP	<i>C22orf26</i>	1.99E-02	D	B	B	NA	N	1		II-3	-0.148	0.7953	rs62228388
22	50648648	50648648	1	G	T	1	SNP	<i>SELEN00</i>	2.54E-05	D	D;D	D;D	D	D	5		II-3	0.092	0.2572	
X	103495090	103495090	1	G	C	1	SNP	<i>ESX1</i>	1.67E-03	T	D	D	NA	N	2		II-3	NA	NA	NA

Abkürzungen: Position Start/Ende, Chromosomale Start- bzw. Endposition der jeweiligen Variante nach (GRCh37); Größe [bp], Größe der genetischen Variante in Basenpaaren; Ref, Referenzallel; Alt, Alternativallel; An, Anzahl der beobachteten Alternativallele; Typ, Art der Variante; HGNC, HUGO *Gene Nomenclature Committee*; ExAC MAF, Frequenz des alternativen Allels; Allelfrequenz basierend auf den Daten des *Exome Aggregation Consortium*; SIFT, *Sorting Intolerant from tolerant*; Polyphen2 HDIV/HAVR, *Polymorphism Phenotyping v2*; LRT, *likelihood ratio test*; Σ Pädiktion, Anzahl der *Tools*, die einen pathogenen Effekt schätzen; Provean/Sift/MutationTaster, Effektschätzung für InDels und Varianten, die nicht mittels dbNSFP abgefragt werden konnten; D, *damaging/probably damaging/deleterious/disease-causing*; P, *possibly damaging*/Polymorphismus (MutationTaster); B, *benign*; T, toleriert; N, neutral; NA, nicht verfügbar (*not available*); exLOD, *logarithm of the odds* (exponentielles Modell), *p*-Wert, Wahrscheinlichkeit des exLOD.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich meinem Doktorvater, Professor Dr. med. Markus Nöthen und meinem Mentor Professor Dr. med. Andreas Forstner, für die wertvolle Anleitung, das Vertrauen und die fachliche Unterstützung danken, die wesentlich zur Qualität dieser Arbeit beigetragen haben.

Ich danke Dr. Andrea Hofmann für die Durchführung der statistischen Analysen im Rahmen des microRNA-Projekts. Ebenso gilt mein Dank den Kooperationspartnern unter der Leitung von Professor Gerhard Schratt für die Durchführung der funktionellen miR-Analysen. Des Weiteren gilt mein Dank allen nationalen und internationalen Kooperationspartnern, die an der Organisation der untersuchten Kollektive und Familien oder anderweitig zum Erfolg dieser Studien beigetragen haben.

Ein besonderer Dank gilt meinen ehemaligen Kollegen und Kolleginnen des Instituts für Humangenetik der Universität Bonn für die Zusammenarbeit und den fachlichen Austausch, die den Forschungsprozess bereichert haben. Besonders schätze ich die angenehme Arbeitsatmosphäre, aufmunternden Worte und die vielen Liter koffeinhaltiger Getränke. Insbesondere danke ich den Doktorandinnen und Doktoranden, die sich gemeinsam mit mir auf diese Reise begeben haben und zu guten Freunden geworden sind.

Mein tiefster Dank gilt meiner Familie und meinen Freunden für ihre Geduld, ihr Verständnis und ihre beständige Ermutigung während der herausfordernden Phasen dieses (sehr, sehr langen) Wegs. Ihre Unterstützung hat mir Kraft gegeben und mir geholfen, die Herausforderungen zu meistern.

Mein ganz besonderer Dank gilt meinem Mann Julian, der niemals das Vertrauen in mich verloren hat und stets an meiner Seite steht. Du inspirierst mich, mich auf das Wesentliche und Wichtige zu fokussieren und hast mir mit unserer Tochter Romy das größte Geschenk gemacht. Du hast mich ermutigt, Kapitel abzuschließen, um neue zu beginnen.

Zudem möchte ich den Familien und Teilnehmern meiner Studie danken, ohne deren Bereitschaft zur Mitwirkung diese Forschung nicht möglich gewesen wäre.

-Meiner Tochter Romy gewidmet-