

**Kopplungsuntersuchungen mit X-chromosomalen Markern  
bei Familien mit bipolar affektiver Störung**

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

Martina Hürter  
aus Kassel

2007

Angefertigt mit Genehmigung der  
Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: Prof. Dr. P. Propping
2. Gutachter: Prof. Dr. T. Schläpfer

Tag der Mündlichen Prüfung: 28.08.2007

Aus dem Institut für Humangenetik der  
Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn  
Direktor: Prof. Dr. med. P. Propping

Diese Dissertation ist auf dem Hochschulschriftenserver der ULB Bonn [http://hss.ulb.uni-bonn.de/diss\\_online](http://hss.ulb.uni-bonn.de/diss_online) elektronisch publiziert.

## Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung .....	5
2	Zielsetzung .....	6
3	Theoretische Grundlagen.....	8
3.1	Bipolar affektive Störungen .....	8
3.1.1	Diagnose und klinisches Erscheinungsbild.....	8
3.1.2	Empirisch genetische Aspekte der bipolar affektiven Störungen .....	9
3.1.2.1	Familienstudien.....	9
3.1.2.2	Zwillingsstudien.....	9
3.1.2.3	Adoptionsstudien .....	10
3.2	Bipolar affektive Störungen: eine genetisch komplexe Krankheit.....	11
3.2.1	Kennzeichen genetisch komplexer Krankheiten.....	11
3.2.1.1	Unvollständige Penetranz und Phänokopie.....	11
3.2.1.2	Genetische Heterogenität .....	11
3.2.2	Polygene Vererbungsmodelle versus oligogene Vererbungsmodelle.....	12
3.3	Strategien zur Identifizierung von Genen bei genetisch komplexen Erkrankungen...	13
3.3.1	Assoziationsstudien.....	13
3.3.2	Kopplungsanalysen .....	14
3.3.2.1	Parametrische Kopplungsanalyse .....	15
3.3.2.2	Nicht-parametrische Kopplungsanalyse .....	17
3.3.2.3	Bewertung von Kopplungsergebnissen.....	18
3.3.3	Kopplungsstudien bei bipolar affektiven Störungen.....	19
4	Methoden.....	20
4.1	Familienkollektiv .....	20
4.1.1	Erfassung des Familienkollektivs .....	20
4.1.2	Beschreibung des Familienkollektivs .....	21
4.2	Geräte.....	22
4.3	Reagenzien .....	22

4.4	Synthetische Oligonukleotide .....	22
4.5	Isolierung und Aufbereitung der DNS .....	23
4.6	PCR.....	24
4.7	Elektrophorese auf dem automatischen Sequenzier-Gerät.....	26
4.8	Bestimmung der PCR-Fragmentlängen .....	27
4.9	Bestimmung der Genotypen.....	27
4.10	Kopplungsanalyse .....	28
5	Ergebnisse.....	30
5.1	Ergebnisse der parametrischen Zwei-Punkt-Analyse .....	31
5.2	Ergebnisse der nicht-parametrischen Multimarker-Analyse.....	34
6	Diskussion .....	36
6.1	Literaturübersicht .....	36
6.1.1	Xq28.....	39
6.1.2	Xq26-q27 .....	41
6.2	Diskussion der eigenen Ergebnisse.....	44
6.3	Schlussbetrachtung.....	47
7	Ausblick.....	48
8	Zusammenfassung .....	50
9	Anhang .....	52
9.1	Abbildungsverzeichnis.....	52
9.2	Kriterien einer affektiven Störung nach DSM IV.....	52
9.2.1	Kriterien für eine Episode einer Major Depression .....	52
9.2.2	Kriterien einer manischen Episode .....	53
10	Literaturverzeichnis.....	55
11	Danksagung.....	64

# 1 Einleitung

Bei der bipolar affektiven Störung handelt es sich mit einer Lebenszeitprävalenz von 0,5-1,5 % um eine in der Bevölkerung häufige Krankheit. Der Erkrankungsbeginn liegt bei den meisten Patienten zwischen dem 18. und 40. Lebensjahr (Smith und Weissman, 1992). Durch den phasischen Krankheitsverlauf sind die Patienten und deren Angehörige über lange Abschnitte ihres Lebens erheblich beeinträchtigt. Die intensive medizinische Betreuung, wiederholte Krankenhausaufenthalte und eine oft langjährige medikamentöse Versorgung verursachen zudem hohe Kosten für das Gesundheitssystem. Umso wichtiger und dringender erscheint die Aufklärung der Ursachen dieser Erkrankung.

In älteren psychiatrischen Studien zeigte sich bereits eine erhöhte familiäre Belastung bipolar affektiver Störungen. Auch die modernen, auf operationalisierten Kriterien basierenden Forschungsergebnisse zeigen übereinstimmend die ätiologische Bedeutung genetischer Faktoren. Allerdings lässt sich das familiäre Auftreten nicht mit einem Erbgang nach Mendel in Einklang bringen. Viele Versuche in dieser Hinsicht, durch zusätzliche Annahmen einen einfachen Erbgang mit den Familienbefunden und/oder der Phänotypdefinition für die Theoriebildung aufrechtzuerhalten, blieben erfolglos. Aufgrund der genetisch komplexen Vererbung ist es ungleich schwieriger, die verantwortlichen Gene zu identifizieren als bei monogenen Erkrankungen. Die methodischen Fortschritte der modernen Molekulargenetik, die Entschlüsselung des menschlichen Genoms, sowie die Weiterentwicklung der Bioinformatik haben aber in letzter Zeit auch bei genetisch komplexen Erkrankungen zu ersten Gen-Identifizierungen geführt.

Das Verständnis der Funktion der Krankheitsgene ist eine wichtige Voraussetzung, um die molekulare Pathogenese der bipolar affektiven Störung schrittweise aufzuklären. Dabei hofft man, dass in Zukunft spezifisch wirkende Medikamente ohne die bis heute schwer vermeidbaren Nebenwirkungen entwickelt werden. Darüber hinaus erhofft man sich Hinweise auf die Ursache anderer psychiatrischer Krankheiten und eine deutlichere Abgrenzung der verschiedenen Krankheiten untereinander. Dies könnte wiederum die Validität psychiatrischer Diagnosen und Klassifizierungen verbessern.

## 2 Zielsetzung

Die Vorstellung, dass Gene auf dem X-Chromosom für die bipolar affektive Störung verantwortlich sein könnten, reicht zurück bis in die 30-er Jahre des letzten Jahrhunderts (Rosanoff et al., 1935). Damals war ein gehäuftes Auftreten der bipolaren Störung in Familien mit der X-chromosomal vererbten Rot-Grün-Farbenfehlsichtigkeit festgestellt worden. In späteren Familienstudien wurde zudem berichtet, dass die Krankheit selten von Vätern auf deren Söhne übertragen wurde und dass Frauen häufiger von der bipolar affektiven Störung betroffen waren als Männer (Winokur et al., 1969; Mendlewicz und Rainer, 1974). Darin vermutete man Hinweise auf einen X-chromosomal-dominanten Vererbungsmodus. Diese Befunde wurden jedoch in späteren Studien von Gershon et al. (1982) und Rice et al. (1987) nicht bestätigt. Insbesondere scheint die bipolar affektive Störung im Gegensatz zu der unipolaren Störung in ihrer Prävalenz keine Geschlechtsunterschiede zu zeigen. Unter der Annahme einer genetisch komplexen Vererbung ist es jedoch trotzdem möglich, dass ein Gen auf dem X-Chromosom einen signifikanten Beitrag leistet, auch wenn andere Krankheitsgene auf den Autosomen lokalisiert sind.

Nach den frühen Kopplungsstudien mit X-chromosomalen Markern, die keine eindeutigen Resultate lieferten (siehe 6.1), zeigte die Kopplungsstudie von Pekkarinen et al. (1995) einen deutlichen Hinweis auf die Beteiligung X-chromosomaler Gene an der Entstehung der bipolar affektiven Störung. Als Ursache für die widersprüchlich erscheinenden Ergebnisse der einzelnen Studien wird u.a. das Vorliegen von Locus-Heterogenität zwischen den untersuchten Populationen diskutiert. Gegenwärtig kann auch nicht ausgeschlossen werden, dass es sich um einen Fehler 1. Ordnung handelt, d.h. um eine zufällige Co-Segregation der chromosomalen Region mit der Krankheit in den Familien, ohne dass sich in dieser Region tatsächlich ein Krankheitsgen befindet. Zur Klärung der tatsächlichen Bedeutung dieses Locus für die Entstehung der bipolar affektiven Störungen sind zwingend weitere Replikationsstudien in unabhängigen Kollektiven nötig.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es zu untersuchen, ob sich in unserem Kollektiv von 75 größtenteils deutschen Familien mit bipolar affektiven Störungen, das weltweit zu den größten rekrutierten Familienkollektiven gehört, die Hinweise auf einen X-chromosomalen

Krankheitslocus bestätigen lassen können. Zu diesem Zweck wurden Kopplungsanalysen mit 20 hochpolymorphen Mikrosatellitenmarkern auf dem X-Chromosom durchgeführt. Diese Untersuchungen waren Teil einer genomweiten Kopplungsuntersuchung.

## 3 Theoretische Grundlagen

### 3.1 Bipolar affektive Störungen

Die Stimmungen der meisten Menschen sind einem Wechsel unterworfen, beeinflussen aber ihr Leben nur geringfügig. Bei Menschen mit affektiven Störungen können jedoch bestimmte Stimmungslagen Monate oder Jahre anhalten und ein normales Erleben und Verhalten verhindern. Zu den affektiven Störungen zählen die unipolare Depression und die bipolar affektive Störung.

#### 3.1.1 Diagnose und klinisches Erscheinungsbild

Als Kennzeichen der bipolar affektiven Störung gelten "unmotivierte Verstimmungen depressiv-gehemmter oder manisch-erregter Art" (Huber, 1976). Zum depressiven Symptomenkomplex gehören gehemmtes Denken, psychomotorische Hemmung, negative Vitalgefühle sowie depressive Wahnideen. Im Gegensatz dazu zeigen sich manische Verstimmungen durch erregtes Denken (Ideenflucht), psychomotorische Erregung, gehobene Vitalgefühle und manische Größenideen.

Typisch für affektive Störungen ist ihr phasenhaftes Auftreten. Sowohl vor als auch nach einer Phase zeigen sich die Patienten in einer ausgeglichenen Verfassung. Gewöhnlich treten die Krankheitsphasen mehrfach während eines Lebens in Erscheinung.

Treten bei einem Patienten ausschließlich depressive Phasen auf, so spricht man von einer unipolar depressiven Störung. Wechseln sich bei einem Patienten depressive und manische Phasen ab oder treten nur manische Phasen auf, so spricht man von einer bipolar affektiven Störung.

Das Hauptmerkmal der *Bipolar I Störung* ist das Auftreten einer oder mehrerer voll ausgeprägter manischer Episoden (siehe Anhang). Die Mehrzahl der Betroffenen mit Bipolar I Störung erreichen im Intervall wieder ihre volle Leistungsfähigkeit, bei 20-30% bestehen jedoch weiterhin Stimmungsschwankungen und soziale oder berufliche Schwierigkeiten. 15% der Betroffenen sterben durch Suizid (Guze und Robins, 1970).

Das Hauptmerkmal der *Bipolar II Störung* ist das Auftreten einer oder mehrerer Episoden einer majoren Depression zusammen mit mindestens einer hypomanen Episode. Ob die Bipolar II

Störung eine eigenständige Erkrankung darstellt, ist umstritten (Simpson et al., 1993; Spence et al., 1995; Reus und Freimer, 1997; Craddock, 1999).

Die Diagnose einer affektiven Störung wird anhand der Kriterien der heute international verwendeten DSM IV-Kriterien (American Psychiatric Association, 1994; siehe Anhang) gestellt. In den zur Zeit der Rekrutierung des vorliegenden Patientenkollektivs gültigen DSM III-R-Kriterien war die Bipolar II Störung nicht als eigenständige Diagnose enthalten. Daher bediente man sich in diesen Fällen zusätzlich der RDC-Kriterien (Research Diagnostic Criteria; Spitzer et al., 1975).

Die Lebenszeit-Prävalenz der bipolar affektiven Störungen beträgt zwischen 0,5% und 1,5%, ohne dabei geschlechtsspezifische oder ethnische Unterschiede aufzuweisen.

### **3.1.2 Empirisch genetische Aspekte der bipolar affektiven Störungen**

#### **3.1.2.1 Familienstudien**

In älteren Familienuntersuchungen wurden in der Regel die unipolaren nicht von den bipolaren Verlaufsformen der affektiven Störungen unterschieden. Seit den 70er Jahren wurden insgesamt 21 Studien durchgeführt, die diese Einteilung berücksichtigten und sich operationalisierter diagnostischer und epidemiologischer Kriterien bedienten (Übersicht siehe Craddock und Jones, 1999).

Dabei ergab sich für erstgradig Verwandte bipolar affektiver Patienten ein im Vergleich zur Allgemeinbevölkerung etwa siebenfach höheres Risiko ebenfalls an dieser Störung zu erkranken. Das Morbiditätsrisiko von Verwandten 2. Grades liegt darunter, jedoch noch über dem Risiko der Allgemeinbevölkerung (Craddock und Jones, 1999).

Darüber hinaus traten in den Familien von bipolaren Indexpatienten neben schizoaffektiven und schizophrenen Störungen insbesondere unipolare Depressionen überzufällig häufig auf. Da diese allgemein eine höhere Prävalenz aufweisen als die bipolare Störung, ist das absolute Risiko von Verwandten ersten Grades, an der unipolaren Störung zu erkranken, höher als das für eine bipolare Störung. Man schätzt, dass etwa 2/3 bis 3/4 beider Störungsformen auf die gleiche genetische Disposition zurückzuführen sind (Blacker und Tsuang, 1993).

#### **3.1.2.2 Zwillingsstudien**

Craddock und Jones (1999) fassen die Ergebnisse von sechs neueren Zwillingsstudien zusammen (Kringlen, 1967; Allen et al., 1974; Bertelsen et al., 1977; Torgersen et al., 1986; Kendler et al.,

1993 Cardno et al., 1999): Alle Studien zeigen deutlich höhere Konkordanzraten bei eineiigen gegenüber zweieiigen Zwillingspaaren. Bezüglich Fallzahl und Methodik erscheint die dänische Zwillingsstudie von Bertelsen et al. (1977) am aussagekräftigsten. Dabei ergaben sich für eineiige Zwillinge Konkordanzraten von 62 % gegenüber 8% bei zweieiigen Zwillingen.

Der Einfluss von Umweltfaktoren wird jedoch dadurch sichtbar, dass die Konkordanzraten auch bei eineiigen Zwillingspaaren deutlich unter 100% liegen (Propping, 1989). Als umweltbedingte Faktoren kommen für den Patienten unangenehme Lebensereignisse, so genannte „*life events*“, in Frage, die den depressiven Episoden häufig vorangehen (Owen et al., 2000; Thapar und McGuffin, 1996).

<b>Verwandtschaftsgrad zum bipolaren Indexpatienten</b>	<b>Risiko für bipolar affektive Störung</b>	<b>zusätzliches Risiko für unipolare Störung</b>
eineiiger Ko-Zwilling	> 50 %	15-25 %
Verwandter 1. Grades	5-10 %	10-20 %
Allgemeinbevölkerung	0,5-1,5 %	5-10 %

**Tabelle 1:** Abstufung der Lebenszeitrisiken für affektive Störungen (Übersichtsarbeit von Craddock und Jones, 1999)

### **3.1.2.3 Adoptionsstudien**

Erhöhte Morbiditätsraten bei Familienangehörigen betroffener Patienten können auch durch ähnliche Lebensbedingungen sowie Wechselwirkungen mit den betroffenen Familienangehörigen bedingt sein. Daher fällt eine Abgrenzung zwischen genetischen und familiären bzw. sozialpsychiatrischen Faktoren schwer.

Aus diesem Grund wurden Adoptionsstudien durchgeführt, von denen nur die Untersuchung von Mendlewicz und Rainer (1974) eine ausreichende Größe besaß. Darin wurden die leiblichen Eltern sowie die Adoptiveltern von 29 bipolar affektiven Patienten und 22 gesunden Kontrollpersonen untersucht. Die höchsten Morbiditätsraten zeigten sich bei den biologischen Eltern der bipolaren Kinder (31% gegenüber 2% bei gesunden Kontrollen).

Fasst man die Ergebnisse der Familien-, Zwillings- sowie Adoptionsstudien zusammen, so geht man bei der Mehrzahl der bipolar affektiven Störungen von einer ursächlichen Mitbeteiligung genetischer Faktoren unter Zugrundelegung eines genetisch komplexen Erbganges aus.

## **3.2 Bipolar affektive Störungen: eine genetisch komplexe Krankheit**

### **3.2.1 Kennzeichen genetisch komplexer Krankheiten**

Der Begriff „genetisch komplexe Krankheit“ bedeutet, dass die familiäre Häufung der Krankheit keinem klassischen Mendel'schen Erbgang folgt und deshalb nicht in dominanter oder rezessiver Form dem alleinigen Einfluss eines einzelnen Gens zuzuordnen ist. So liegen bei einer Person vermutlich mehrere Genveränderungen bzw. Genvarianten gleichzeitig der Erkrankung zugrunde, wobei das Gewicht der einzelnen Genvarianten unterschiedlich sein dürfte. In unterschiedlicher und individueller Kombination sowie in Wechselwirkung (Epistase) tragen diese zur Krankheitsprädisposition bei. Das klinische Erscheinungsbild dürfte hierbei als Endzustand aufzufassen sein, zu dem überdies auch nicht-genetische Faktoren beigetragen haben (Propping, 1989). Für das Fehlen einer einheitlichen Korrelation zwischen einem isoliert betrachteten Genotyp und dem Krankheitsphänotyp gibt es folgende Gründe:

#### **3.2.1.1 Unvollständige Penetranz und Phänokopie**

Allgemein versteht man unter Penetranz die Wahrscheinlichkeit, mit der Personen, die an einem bestimmten Genort das krankheitsassoziierte Allel besitzen, Krankheitssymptome zeigen. Als unvollständige Penetranz wird bezeichnet, wenn einige Individuen mit dem disponierenden Allel, z.B. aufgrund von protektiven Faktoren, keine Krankheitssymptome entwickeln. Der disponierende Genotyp an einem spezifischen Genort bestimmt nicht zwangsläufig den Ausbruch der Erkrankung, erhöht aber die Anfälligkeit des Allelträgers zu erkranken. Im Gegensatz dazu können andere Individuen ohne das prädisponierende Allel aufgrund von prädisponierenden Allelen in anderen Genen, Umwelteinflüssen oder zufälligen Faktoren erkranken (Phänokopie).

#### **3.2.1.2 Genetische Heterogenität**

Der Begriff genetische Heterogenität (auch Locus-Heterogenität genannt) besagt, dass Mutationen in verschiedenen Genen einen identischen oder ähnlichen Krankheitsphänotyp hervorrufen können. Dieser Umstand ist leicht nachvollziehbar, da die kodierten Genprodukte an einem gemeinsamen biochemischen Reaktionsweg oder einer zellulären Struktur beteiligt sein können. Die Aussagekraft von Kopplungsanalysen kann durch genetische Heterogenität sehr beeinträchtigt werden. Dies ist beispielsweise der Fall, wenn innerhalb eines Familienkollektivs ein einheitlicher Krankheitsphänotyp durch Mutationen in verschiedenen Genen unterschiedlicher

chromosomaler Lokalisation verursacht wird. Die Aussagekraft des einzelnen Befundes wird somit geschwächt.

### 3.2.2 Polygene Vererbungsmodelle versus oligogene Vererbungsmodelle

Genetisch komplexe Erkrankungen entstehen durch die Kombination verschiedener Mutationen bzw. Varianten an unterschiedlichen Genorten. Nach dem *Modell der multifaktoriellen Vererbung* (Vogel und Motulsky, 1986; Propping, 1989) wird jedes dieser einzelnen Gene nach den Mendel'schen Regeln vererbt. Welche Rolle zufällige Ereignisse oder Umweltfaktoren bei der Entstehung von polygenen Krankheiten spielen, ist unklar. Für die Zahl dieser prädisponierenden Mutationen sind zwei Modelle möglich.

Das *polygene Modell* beschreibt viele Gene mit geringem Krankheitseffekt, was deren Lokalisation erheblich schwieriger gestaltet. In diesem Fall müssten die Genvarianten in der Bevölkerung sehr häufig sein, da man sonst die empirischen Wiederholungsziffern unter Verwandten ersten Grades (5-10%) nicht erklären könnte.

In einem *oligogenen Modell* existieren dagegen nur wenige prädisponierende Gene, von denen jedes einen relativ großen Einfluss auf die Krankheitsentstehung hat (Hauptgene). Hierbei wird vor allem ein dominantes 2-Locus-Modell diskutiert, d.h. das Zustandekommen zweier Genveränderungen mit jeweils dominantem Erbgang. Dieses Modell ist eher mit dem hohen Erkrankungsrisiko bei Verwandten ersten Grades im Vergleich zur Allgemeinbevölkerung vereinbar (Propping, 1989).

Im Fall der bipolar affektiven Störung existieren möglicherweise unterschiedliche Modelle in Abhängigkeit vom Ersterkrankungsalter. Neuere Segregationsanalysen konnten in Familien mit bipolar affektiven Störungen mit frühem Ersterkrankungsalter ( $\leq 25$  Jahre) einen Hauptgeneffekt nachweisen, d.h. eine Genwirkung, die einem autosomal-dominanten Erbgang nahekommt. In Familien mit höherem Ersterkrankungsalter ( $\geq 25$  Jahre) schien eher ein polygenes Vererbungsmodell vorzuliegen (Grigoriu-Serbanescu et al., 2001).

### 3.3 Strategien zur Identifizierung von Genen bei genetisch komplexen Erkrankungen

#### 3.3.1 Assoziationsstudien

Prinzipiell stehen zur Identifizierung von krankheitsverursachenden Genen zwei Methoden zur Verfügung: Assoziations- und Kopplungsuntersuchungen.

Beim Assoziationsansatz vergleicht man Allele von Erkrankten und Gesunden aus ethnisch möglichst ähnlichen Populationen. Bei einer Assoziation tritt ein Allel überzufällig häufig mit einer Erkrankung auf. Der Grad der Assoziation von Allel und Krankheit wird in Form des „*relativen Risikos*“ (*odds ratio*) angegeben. Das relative Risiko sagt aus, wie viel mal wahrscheinlicher eine Krankheit bei Trägern eines bestimmten Allels auftritt als bei Personen, die dieses Allel nicht tragen.

Zur Erklärung einer Assoziation zwischen einem bestimmten Allel und einer Krankheit gibt es im Prinzip zwei Möglichkeiten:

1. Das Allel selbst trägt über eine Veränderung der Aminosäuresequenz bzw. der Expression des dort kodierten Proteins zur Erkrankung bei.
2. Das assoziierte Allel trägt selbst nicht zur Krankheit bei, sondern liegt auf dem Chromosom in enger räumlicher Nähe zu einem direkt am Krankheitsgeschehen beteiligten Gen, und es besteht ein *Kopplungsungleichgewicht* (engl. *linkage disequilibrium, LD*) zwischen den Varianten an den beiden benachbarten Genorten.

Ein solches Kopplungsungleichgewicht entsteht in der Evolution dann, wenn bei einer Person eine Mutation auftritt (*Founder*) und sich zumindest ein großer Teil von Trägern der Mutation in späteren Generationen von dieser Person herleiten lässt. Die auf dem Chromosom in der Nachbarschaft zu der Mutation gelegenen Allele anderer Polymorphismen sind dann mit der Mutation im Kopplungsungleichgewicht. Der Bereich von Kopplungsungleichgewicht um die Mutation herum wird im Laufe der Generationen immer kleiner, da Rekombinationsereignisse während der Meiose (*crossing over*) das Kopplungsungleichgewicht „zerstören“. Im näheren Bereich um die Mutation herum – Untersuchungen heute zeigen, dass dies in der Regel 10-100 kb in „outbred“-Populationen sind (Gabriel et al., 2002) – bleibt ein solches Kopplungsungleichgewicht und damit die Assoziation über lange Zeiträume erhalten. Entscheidend ist, dass nicht wiederholt Mutationen bei unabhängigen Personen zu demselben Krankheitsallel geführt haben, dass keine oder nur wenige Rekombinationen zwischen den beiden Loci im

Kopplungsungleichgewicht stattgefunden haben und dass dem Träger der Mutation kein Selektionsnachteil entstand.

Neben dem relativen Risiko, welches das Erkrankungsrisiko für Träger eines bestimmten Allels im Vergleich zu Nichtträgern angibt, ist die Bedeutung eines Allels für die Erkrankungshäufigkeit in der Allgemeinbevölkerung ebenfalls von Interesse. Daher wurde das Konzept des „*attributable risk*“ entwickelt (Khoury et al., 1993). Dieses gibt den Anteil der Krankheitsfälle in der Bevölkerung an, der auf das Vorhandensein des assoziierten Allels oder Genotyps zurückzuführen ist.

Ein Problem von Assoziationsuntersuchungen zwischen einer Patienten- und Kontrollgruppe sind mögliche falsch-positive Assoziationen eines Allels mit der Erkrankung (d.h., es wird ein signifikanter Unterschied in den Allelfrequenzen zwischen Patienten und Kontrollen beobachtet, der aber nicht mit der Erkrankung zusammenhängt). Eine mögliche Ursache sind *Stratifikationseffekte*, die dann auftreten, wenn Patienten- und Kontrollkollektiv aus unterschiedlichen Bevölkerungsgruppen mit verschiedener Frequenz für das untersuchte Allel stammen. Eine Möglichkeit, diese Gefahr zu umgehen, sind Familien-basierte Assoziationsuntersuchungen, bei denen kleine Familien, bestehend aus einer betroffenen Person und deren Eltern, untersucht werden.

Grundsätzlich stellen Assoziationsuntersuchungen eine gute und aussagekräftige Möglichkeit dar, Risikogene für die bipolar affektive Störung zu identifizieren. Dabei kann man den *Kandidatengen-Ansatz* wählen, bei dem Polymorphismen in Genen, die aufgrund pathophysiologischer Überlegungen eine Rolle in der Krankheitsentstehung spielen könnten, auf Assoziation untersucht werden. Außerdem können Assoziationsuntersuchungen eine systematische Identifikation von Risikogenen in chromosomalen Regionen ermöglichen, die zuvor über Kopplungsanalysen identifiziert wurden. Aufgrund neuester technologischer Entwicklungen, die sich die zunehmende Kenntnis über die genetische Variabilität des Menschen zunütze machen, können jetzt sogar genomweite Assoziationsuntersuchungen durchgeführt werden.

### **3.3.2 Kopplungsanalysen**

Die Kopplungsanalyse prüft, ob bestimmte Allele eines Polymorphismus innerhalb eines Stammbaumes mit einem phänotypischen Merkmal oder einer Erkrankung *kosegregieren*, d.h. gemeinsam vererbt werden (gekoppelt sind), oder ob sie unabhängig voneinander vererbt werden.

Dabei muss ein Allel, das mit der Erkrankung kosegregiert, nicht unbedingt das Krankheitsverursachende sein. Es kann auch auf dem Chromosom in relativ enger räumlicher Nähe zu dem eigentlich ursächlichen Allel liegen und somit als Marker fungieren. Die Kopplung zwischen den beiden chromosomalen Loci wird dann auch über mehrere Generationen nicht durch Rekombinationsereignisse in der Meiose getrennt. Generell kann man sagen: Je näher ein polymorpher Markerlocus und ein krankheitsrelevanter Genort auf einem Chromosom beieinander liegen, desto geringer ist die Wahrscheinlichkeit, dass sie durch Rekombination voneinander getrennt werden. Diese Wahrscheinlichkeit wird als *Rekombinationsfrequenz* bezeichnet und ist ein Maß für den Abstand beider Loci zueinander.

Der Nachweis einer Kopplung in betroffenen Familien ermöglicht also eine Aussage über die chromosomale Lage eines Krankheitsgens. Bei der statistischen Auswertung von Kopplungsdaten unterscheidet man grundsätzlich zwischen *parametrischen* (modellabhängigen) und *nicht-parametrischen* (modellfreien) Methoden.

### 3.3.2.1 Parametrische Kopplungsanalyse

Bei der klassischen, parametrischen Kopplungsanalyse („*LOD-Score*“-Methode) geht man davon aus, dass die betrachtete Eigenschaft bzw. Krankheit nach einem bestimmten Modell vererbt wird. Dieses genetische Modell wird vorab definiert, indem Annahmen über Erbgang, Genfrequenz (d.h. die Wahrscheinlichkeit für das Auftreten eines bestimmten Genotyps), Phänokopie und Penetranz der Krankheit gemacht werden. Für die bipolar affektive Störung ist keiner der Parameter bekannt, sie können jedoch geschätzt werden (Vieland et al., 1992; Durner et al., 1999). Sind die geschätzten Parameter unrealistisch, so nimmt die Aussagekraft der Kopplungsuntersuchung ab (Clerget-Darpoux et al., 1986).

Das Maß der genetischen Kopplung ist die *Rekombinationsfrequenz*  $\theta$ . Die Einheit der Rekombination ist ein *Centimorgan* (1 cM), das eine Rekombinationshäufigkeit zwischen Marker und Genort von 1% aller untersuchten Meiosen angibt. Die Einheit cM ist also eine rechnerische Größe und entspricht durchschnittlich einer physikalischen Distanz von  $10^6$  Basenpaaren.

Die Rekombinationsfrequenz ergibt sich aus dem Quotienten der Anzahl der Meiosen mit beobachteter Rekombination und der Gesamtanzahl aller untersuchten Meiosen. Sie steigt mit zunehmendem Abstand zweier Loci auf maximal 50% (im Fall von unabhängiger Vererbung) an. In diesem Fall spricht man von *freier Rekombination* ( $\theta=0,5$ ).

Je näher die Genorte auf demselben Chromosom liegen (je mehr sich die Rekombinationsfrequenz  $\theta=0$  annähert), desto größer ist der Grad der Kopplung zwischen den Genorten.

Als Maß für eine Kopplung wird der *LOD-Score* verwendet. Man berechnet den Quotienten (*odds ratio*) aus der Wahrscheinlichkeit, dass die beobachteten Daten mit Kopplung vereinbar sind, und der Wahrscheinlichkeit, dass sie nicht gekoppelt sind. Der Logarithmus dieses Quotienten, der *LOD-Score* (*logarithm of the odds*), dient als Maß für die Wahrscheinlichkeit einer Kopplung. Bei monogenen Merkmalen oder Erkrankungen gilt ein *LOD-Score* von 3,0 als Beweis für Kopplung (d.h. die Wahrscheinlichkeit, dass eine Kopplung vorliegt, wäre a priori 1000 mal größer als die Wahrscheinlichkeit, dass keine Kopplung vorliegt). Es muss allerdings die Tatsache des multiplen Testens berücksichtigt werden. Bei genetisch komplexen Erkrankungen ist die Beurteilung von Kopplungsergebnissen schwieriger (siehe 3.3.2.3).

Die Kopplungsanalyse mit zwei Genorten bezeichnet man als *Zweipunktanalyse*. Dabei verwendet man den bekannten Marker als ersten Genort und den putativen Krankheitslocus als zweiten Genort, dessen Kopplung zum Marker getestet wird. Stimmen die Markergenotypen betroffener Personen überein oder ergeben sich Unterschiede zwischen den Markergenotypen betroffener und nicht betroffener Individuen, so spricht dies für eine Kosegregation des Markergenortes und des putativen Krankheitsgenortes.

Bei der *Multipoint-* oder *Multi-Marker-Analyse* geht man von einer Gruppe von bereits bekannten Markern aus. Man prüft, ob der Krankheitslocus oder ein weiterer Markergenort an diese Markergruppe gekoppelt ist bzw. bestimmt dessen wahrscheinlichste genetische Position. Dazu müssen nicht nur die Rekombinationsfrequenzen zwischen den einzelnen Markern der Gruppe möglichst genau bekannt sein, sondern auch die richtige Reihenfolge der Marker. Der große Vorteil der Multipoint-Analyse bei korrekt spezifizierten Markerabständen besteht jedoch darin, dass mangelnde Information über das Vererbungsmuster an einem bestimmten Genort durch benachbarte Marker ausgeglichen werden kann. Dies kann vor allem bei Homozygotie oder fehlender Typisierung eines Markers von großer Bedeutung sein.

Die klassische, parametrische Kopplungsanalyse kann so modifiziert werden, dass ausschließlich erkrankte Individuen berücksichtigt werden („*affecteds-only*“ *analysis*) und bisher nicht erkrankte Familienmitglieder als „Phänotyp unbekannt“ klassifiziert werden (Weeks und Lange, 1988). Dies ist besonders bei Störungen von Bedeutung, die erst später im Leben beginnen. Wird ein Familienmitglied vor Beginn der Erkrankung fälschlicherweise als gesund bezeichnet, führt

dies zu reduzierten LOD-Scores. Dies kann durch die „affecteds-only“-Analyse vermieden werden.

Anhand der LOD-Score-Methode konnten in den letzten Jahren vor allem zahlreiche monogene Erkrankungen mit großem Erfolg kartiert werden. Jedoch erweist sich die Notwendigkeit, ein vollständiges genetisches Modell festzulegen, bei der Anwendung einer parametrischen Kopplungsanalyse auf nur eingeschränkt mendelnde Merkmale als ernsthaftes und grundlegendes Problem (Clerget-Darpoux et al., 1986). Eine Möglichkeit dieses zu umgehen, bieten modellfreie, nicht-parametrische Kopplungsanalysen.

### 3.3.2.2 Nicht-parametrische Kopplungsanalyse

Eine wichtige Modifikation der klassischen Kopplungsanalyse stellt dabei die „*affected-sib-pair*“-Methode (Penrose, 1935; Suarez et al., 1987) dar, die bei der Analyse komplexer Erkrankungen zunehmend Anwendung gefunden hat. Bei diesem Verfahren lässt man nicht erkrankte Personen außer Acht und sucht stattdessen nach chromosomalen Abschnitten, die bei betroffenen Geschwistern übereinstimmen. Dabei ist es wichtig, zwischen Abschnitten zu unterscheiden, die mit Sicherheit aufgrund der gemeinsamen Abstammung übereinstimmen (*identical by descent*, IBD), und solchen, bei denen dies nicht sicher festgestellt werden kann (*identical by state*, IBS). Aus diesem Grunde ist es sinnvoll, auch die Eltern betroffener Geschwisterpaare zu genotypisieren.

Die nicht-parametrische Kopplungsanalyse soll nachweisen, dass das beobachtete Vererbungsmuster eines chromosomalen Abschnitts nicht einer zufälligen Mendel'schen Verteilung folgt, sondern dass betroffene Geschwisterpaare den Abschnitt überzufällig häufig gemeinsam geerbt haben. Betrachtet man einen beliebigen Chromosomenabschnitt, so ist zu erwarten, dass Geschwisterpaare mit einer Häufigkeitsverteilung von 25%, 50% bzw. 25% in Bezug auf keinen, einen bzw. beide elterlichen Haplotypen übereinstimmen. Da beide Geschwister an der gleichen Krankheit leiden, besitzen sie auch überzufällig häufig (>50%) den spezifischen Chromosomenabschnitt gemeinsam, der den Krankheitsgenort enthält.

Nach statistischen Kriterien ist die „*affected-sib-pair*“-Methode zwar weniger aussagekräftig, besitzt also eine geringere statistische „Power“ als eine formale LOD-Score-Analyse, sie erfordert jedoch keine vorherigen Annahmen über das genetische Modell der Erkrankung. Daher wird sie häufig bei der Identifizierung von beteiligten Genen bei genetisch komplexen Krankheiten eingesetzt. So sollten betroffene Geschwisterpaare in krankheitsrelevanten

Chromosomenabschnitten sogar unter dem Einfluss von unvollständiger Penetranz, Phänokopie und genetischer Heterogenität einen Überschuss gemeinsamer Allele besitzen. Die statistische Aussagekraft der „affected-sib-pair“-Methode wird maßgeblich durch die Größe des Kollektivs von Geschwisterpaaren sowie vom Beitrag des einzelnen Krankheitsgens bestimmt.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass beide beschriebenen Methoden der Kopplungsuntersuchung in Bezug auf die Anwendung bei genetisch komplexen Krankheiten Vor- und Nachteile besitzen. Dem Vorteil der grundsätzlich größeren statistischen Aussagekraft von parametrischen Kopplungsanalysen steht der Nachteil gegenüber, ein spekulatives genetisches Modell erstellen zu müssen. Aus dieser Abwägung heraus versucht man in der Regel, beide Kopplungsmethoden anzuwenden.

### 3.3.2.3 Bewertung von Kopplungsergebnissen

Als Maß für die Wahrscheinlichkeit einer bestehenden Kopplung dient bei parametrischen Analysen der LOD-Score sowie bei nicht-parametrischen Multipoint-Untersuchungen der *Non-Parametric-Linkage (NPL)*-Score, wobei positive Scores für das Vorliegen von Kopplung, negative Scores gegen diese sprechen.

Positive LOD- bzw. NPL-Scores können jedoch auch zufällig aufgetreten sein. Postuliert man Kopplung mit einem Marker, die in Wahrheit nicht vorliegt, so begeht man den statistischen Fehler erster Art (falsch positives Ergebnis). Bei der Untersuchung mehrerer Marker wird für jeden Marker eine Kopplungsanalyse mit dem postulierten Krankheitsgenort durchgeführt. So wird allein aufgrund der Zahl der Marker eine zufällige Beobachtung eines signifikanten Ergebnisses wahrscheinlicher. Durch dieses multiple Testen erhöht sich die Wahrscheinlichkeit des Fehlers erster Art. Dieser kann durch die Wahl geeigneter LOD-Score-Grenzen kontrolliert werden.

Zur Beurteilung der Ergebnisse von Kopplungsanalysen bei genetisch komplexen Erkrankungen bieten sich die Richtlinien von Lander und Kruglyak (1995) an. Nach diesen Kriterien wird ein Kopplungsbefund (d. h. LOD- oder NPL-Score) als *suggestive* (frei übersetzt: „wahrscheinlich“) bezeichnet, der sich der Wahrscheinlichkeit nach einmal an einer Stelle in einer genomweiten Kopplungsanalyse durch Zufall ergeben würde. Dies entspricht bei parametrischen Analysen einem LOD-Score von 1,9, sowie bei nicht-parametrischen Analysen einem NPL-Score von 2,2 ( $p=0,00074$ ). Kopplung im Bereich von *significant* liegt bei einem derart signifikanten Ergebnis vor, dass man es nur einmal in 29 durchgeführten Genom-Scans zufällig erwarten würde. Bei

parametrischen Analysen beschreibt ein LOD-Score von 3,3, bei nicht-parametrischen Analysen ein NPL-Score von 3,6 ( $p=0,000022$ ) das Vorliegen von Kopplung im Bereich von *significant*. Vor allem aufgrund der Locus-Heterogenität, der inkompletten Penetranz sowie der Phänokopie, die allesamt bei genetisch komplexen Erkrankungen auftreten können und die das Auffinden von chromosomalen Krankheitsloci erschweren, lassen sich hohe LOD-Scores oft nur mit umfangreichen Stichproben erreichen. Dabei wäre es ein Fehler, strikt anhand der oben genannten Schwellenwerte über das Vorliegen von Kopplung oder deren Fehlen zu entscheiden. Vielmehr kommt Replikationsstudien bei gegebenen Stichprobenumfängen und nur moderaten LOD-, bzw. NPL-Scores eine besondere Bedeutung zu.

### **3.3.3 Kopplungsstudien bei bipolar affektiven Störungen**

Um prädisponierende Gene für die bipolar affektiven Störungen zu finden, werden seit 1969 Kopplungsuntersuchungen an bipolar affektiv gestörten Patienten durchgeführt. Nachdem man sich anfangs noch phänotypischer Marker, z.B. der Farbenfehlsichtigkeit, des Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase-Mangels oder des Gerinnungsfaktors IX, bedienen musste, kamen seit Ende der 80-er Jahre genetische Marker in Form von DNS-Polymorphismen zur Anwendung. Mit diesen wurden eine Reihe von systematischen Genomuntersuchungen (*Genome Scans*) durchgeführt.

Zu den derzeit interessanten autosomalen Regionen zählen Chromosom 3p12-p14, 4p16, 8q24, 10q25-q26, 12q23-q24, 13q32-q33, 18p11-q11, 21q21-q22 und 22q12-q13 (Berrettini et al. 1994 und 1997; Blackwood et al., 1996; Cichon et al., 2001, 2001a und b; Detera-Wadleigh et al. 1996 und 1999; Ewald et al. 1998a und b, 1999; Friddle et al. 2000; Goldin et al., 1997; Gurling et al. 1995; Kalsi et al., 1997; Kelsoe et al. 2001; Knowles et al., 1998; Kwok et al. 1999; McInnes et al., 1996; McMahan et al. 1997; Morissette et al. 1999; Nöthen et al. 1998 und 1999; Radhakrishna et al., 2001; Stine et al. 1995; Straub et al. 1994; Turecki et al. 2000). Eines der am häufigsten bei der bipolar affektiven Störung diskutierten Chromosomen ist das X-Chromosom. Die Befunde auf dem X-Chromosom werden in der Literaturübersicht im Rahmen der Diskussion unter 6.1 dargestellt.

## **4 Methoden**

### **4.1 Familienkollektiv**

#### **4.1.1 Erfassung des Familienkollektivs**

Für die Kopplungsuntersuchungen standen insgesamt 451 Personen aus 75 Familien zur Verfügung. Davon stammten 65 Familien aus Deutschland, eine Familie aus Italien und neun Familien aus Israel.

Alle affektiven Indexpatienten wurden von erfahrenen Psychiatern der Universitätskliniken Bonn, Dresden, München-Haar, Mainz und Würzburg sowie der Hadassah Universität Jerusalem auf der Grundlage des „Schedule for Affective Disorders and Schizophrenia – Lifetime Version“ (SADS-L; Endicott und Spitzer, 1978) befragt. Die Diagnosen wurden durch Befragung und Auswertung der Krankenakten nach den DSM-III-R Kriterien (American Psychiatric Association, 1987) gestellt. Die Diagnosestellung von Patienten mit Bipolar II-Erkrankung erfolgte nach den RDC-Kriterien (Research Diagnostic Criteria – Spitzer et al., 1975).

Um eine systematische Erfassung der Familien zu gewährleisten, galten als Einschlusskriterien: (1) Vorliegen eines Indexfalls mit bipolarer I Störung (BPI). (2) Vorliegen eines Geschwister des Indexfalls mit bipolarer I Störung (BPI), bipolarer II Störung (BPII), unipolarer rezidivierender Störung (UPR) oder unipolarer Störung mit einzelnen Episoden (UPS). (3) Die Verfügbarkeit beider Eltern oder - wenn lediglich ein Elternteil rekrutiert werden konnte - mindestens zweier weiterer Geschwister von oben genanntem Geschwisterpaar.

Keine der Familien war zuvor in eine Kopplungsstudie über bipolar affektive Störungen aufgenommen worden. Alle Personen waren vor der Blutentnahme über die geplanten molekulargenetischen Untersuchungen informiert worden und hatten ihr mündliches und schriftliches Einverständnis zur Verwendung der DNS für diese Studie gegeben. Die Teile der Studie, die die Untersuchung am Menschen betreffen, wurden der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Universität Bonn bzw. den Ethikkommissionen der beteiligten klinischen Zentren vorgelegt und von diesen genehmigt.

#### 4.1.2 Beschreibung des Familienkollektivs

Von den 75 untersuchten Familien bestanden 70 aus zwei Generationen und fünf aus drei Generationen. Die durchschnittliche Individuenanzahl pro Stammbaum betrug 5,9. Durchschnittlich waren 2,9 Individuen erkrankt.

Die Diagnosen waren folgendermaßen verteilt:

Bipolar I (BPI):	130	Personen
Bipolar II (BPII):	40	Personen
Schizoauffektiv, Typ bipolar (SA/BP):	16	Personen
Unipolar rezidivierende Störung (UPR):	40	Personen
Geringfügige psychiatrische Diagnose:	51	Personen
Schizophrenie:	2	Personen
Nicht betroffen:	172	Personen
Insgesamt:	451	Personen

Bei 64 Familien des Untersuchungskollektivs handelte es sich um Kernfamilien, bestehend aus mindestens einem betroffenen Geschwisterpaar (affected sib-pair) samt deren Eltern. Bei weiteren 11 Familien zeigte der Stammbaum zwei Seiten mit jeweils einem betroffenen Geschwisterpaar.

Insgesamt konnten der Untersuchung 60 Geschwisterpaare mit zwei betroffenen Geschwistern, 17 Geschwisterpaare mit drei betroffenen Geschwistern, fünf Geschwisterpaare mit vier betroffenen Geschwistern und zwei Geschwisterpaare mit sechs betroffenen Geschwistern zu Grunde gelegt werden.

Abhängig vom verwendeten Krankheitsmodell (siehe 4.10) standen der Untersuchung 83 betroffene Geschwisterpaare (affected sib-pairs) unter der engen (ASM I) sowie 194 betroffene Geschwisterpaare unter der weiten Krankheitsdefinition (ASM II) zur Verfügung.

Abgesehen von zwei Familien - WÜ-49 und WÜ-67 - waren in keiner Familie beide Elternteile von einer psychiatrischen Störung betroffen, die den Kriterien des engen oder weiten Krankheitsmodells entsprachen. Bei Familie WÜ-49 litt der Vater unter einer bipolar I Störung (BPI) und die Mutter unter einer unipolaren rezidivierenden Störung (UPR). Bei Familie WÜ-67 wurde bei dem Vater die Diagnose einer unipolaren rezidivierenden Störung (UPR) und bei der

Mutter einer bipolar I Störung (BPI) gestellt. Nur in diesen beiden Familien zeigte sich abhängig vom Krankheitsmodell eine bilineale Transmission der Erkrankung.

## 4.2 Geräte

Folgende Geräte wurden für die Genotypisierungen eingesetzt:

Automatischer Sequenzierer	Modell Prism 377, Applied Biosystems, Weiterstadt
Pipettierroboter	Modell 877, Applied Biosystems, Weiterstadt
PCR-Geräte	Perkin Elmer, Vaterstetten
	MJ-Research PTC-225 Peltier Thermal Cyclers, Watertown, Massachusetts, USA

## 4.3 Reagenzien

Die eingesetzten Chemikalien stammten von folgenden Firmen:

Taq-Polymerase	Perkin Elmer, Vaterstetten
PCR-Puffer	Perkin Elmer, Vaterstetten
DNA Polymerization Mix	Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, USA
True Allele PCR Premix	Applied Biosystems, Weiterstadt
Kontroll-DNS	Ceph 1347-02
Interne Längenstandards	Genescan-500, Rox und Tamra, Perkin Elmer

## 4.4 Synthetische Oligonukleotide

Es wurden 20 short-tandem-repeat-Marker (STR-Marker) auf dem X-Chromosom untersucht. Ein Teil dieser Marker (DXS 1060, DXS 987, DXS 1226, DXS 1202, DXS1214, DXS 1068, DXS 993, DXS 991, DX S986, DXS 990, DXS 1106, DXS 1001, DXS 1047, DXS 1227) stammt aus dem Mikrosatelliten-Panel Version 1.0 der Firma PE Biosystems, das insgesamt 358 Marker enthält. Die Marker DXS 1055, DXS 1122, DXS 994, DXS 102, DXS 15, und F8 C wurden der Genome Data Base (GDB) Version 5.6 (<http://www.gdb.org/>) entnommen.

Die exakten Positionen sowie die cytogenetische Lokalisation der Marker sind im Ergebnisteil dieser Arbeit angegeben (siehe 5.1). Der durchschnittliche Markerabstand beträgt 12,2 cM. Der größte Abstand liegt zwischen den Markern DXS 1227 und DXS 15 und beträgt 69,32 cM.

## 4.5 Isolierung und Aufbereitung der DNS

Menschliche, hochmolekulare DNS (Desoxyribonukleinsäure) wird aus kernhaltigen Leukozyten gewonnen und kann aus eingefrorenem oder frischem Blut, dem EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure) als Antikoagulans zugesetzt wurde, isoliert werden. Angewendet wurde die *Aussalzmethode nach Miller et al. (1988)*:

10 ml Frischblut werden mit 30 ml Frischblutlysispuffer gemischt, 15 min auf Eis lysiert und 15 min bei 4°C und 1500 rpm zentrifugiert. Das entstandene Kernpellet wird mit 10 ml Kernlysispuffer resuspendiert, mit 0,7 ml 10% SDS und 400 µl Pronase E (20mg/ml) versetzt und über Nacht bei 37° Grad im Wasserbad inkubiert. Nach Zugabe von 3,2 ml gesättigter NaCl-Lösung (6M) wird die Lösung kräftig geschüttelt und zweimal bei 3000 rpm und Raumtemperatur zentrifugiert. Das Proteinpellet wird verworfen; der Überstand wird mit 1 Vol Isopropanol versetzt und leicht geschwenkt, bis die DNS ausfällt. Anschließend kann die DNS mit einer zur Angel geformten Pasteurpipette gefischt und nach Waschen in 70% Ethanol in 200-600 µl TE(pH 8,0) gelöst werden.

Für die Isolierung und Aufbereitung der DNS wurden folgende Reagenzien verwendet:

Frischblutlysispuffer (pH 7,5)	155 mM	NH <sub>4</sub> Cl
	10 mM	KHCO <sub>3</sub>
	0,1 mM	EDTA
Kernlysispuffer (pH 8,2)	10 mM	Tris-HCl
	400 mM	NaCl
	2 mM	EDTA
1x Tris EDTA TE (pH 7,5)	10 mM	Tris
	1 mM	EDTA

## 4.6 PCR

Die Polymerase-Ketten-Reaktion ermöglicht es, in kurzer Zeit selektiv kleine Mengen DNS in vitro zu amplifizieren. In einer Abfolge von sich wiederholenden Zyklen wird ein DNS-Abschnitt exponentiell vermehrt.

Zu Beginn wird der zu vermehrende DNS-Abschnitt in Einzelstränge getrennt (Hitze-Denaturierung), die als Matrizen für die DNS-Synthese dienen. Daran binden synthetische Oligonukleotide als Startermoleküle. Beginnend an den 3'-OH-Enden der beiden Startermoleküle synthetisiert die thermostabile Taq-Polymerase einen komplementären DNS-Strang. Der Synthese-Zyklus besteht aus 3 Schritten und wird 25-40 Mal wiederholt:

1. Hitzedenaturierung der Matrizen DNS bei 95°C
2. Hybridisierung der Startermoleküle an die DNS-Matrize bei 55° -65°C
3. Synthese des Komplementärstranges durch die Taq-Polymerase bei 72°C

Der PCR-Ansatz für eine Reaktion (10 µl) enthält folgende Komponenten:

Menge	Inhaltsstoff	Konzentration
2 µl	genomische DNS	20 ng/µl
6,128 µl	deionisiertes und autoklaviertes H <sub>2</sub> O	
1 µl	10 x PCR-Puffer, autoklaviert	100 mM Tris-HCl, pH 8,3, 500 mM KCl, 1,5 mM MgCl <sub>2</sub>
0,125 µl	Nukleotid-Mix (dATP, dCTP, dGTP, dTTP zu gleichen Teilen)	16 mM
0,66 µl	Forward- und Reverse-Primer, davon einer Fluoreszenz-markiert	je 5 pmol/µl
0,08 µl	Taq-Polymerase	5 U/µl

Alle Komponenten des Reaktionsmixes wurden in einem Gefäß gemischt. Pro Reaktion wurden 8 µl Reaktionsgemisch auf 2 µl DNS gegeben.

Die PCR erfolgte in o.g. Thermocyclern nach folgenden Programmen:

Schritt	Temperatur	Dauer
1.	95°C	5 Min
2.	95°C	15 Sek
3.	55°, 57° oder 61°C	15 Sek
4.	72°C	30 Sek
<i>2. – 4. Schritt 9 mal</i>		
5.	90°C	15 Sek
6.	55°, 57° oder 61°C	15 Sek
7.	72°C	30 Sek
<i>5. – 7. Schritt 22 mal</i>		
8.	72°	10 Min.

Alternativ dazu wurden Reaktionen mit dem *True Allele Premix*<sup>®</sup> durchgeführt. Es handelt sich dabei um einen fertig zusammengesetzten Reaktionsmix, der nur mit Primern versehen werden muss. Er beinhaltet eine besondere Form der Taq-Polymerase, die erst bei 95°C aktiviert wird. Dadurch können unspezifische Reaktionen vermieden werden.

Ein True Allele-Reaktionsansatz besteht aus 2 µl DNS, 6 µl Premix, 1 µl Primer, 1 µl Wasser.

Für die True Allele-Ansätze wurde folgendes Programm verwendet:

Schritt	Temperatur	Dauer
1.	95°C	12 Min
2.	94°C	15 Sek
3.	55°C	15 Sek
4.	72°C	30 Sek
<i>2. – 4. Schritt 10 mal</i>		
5.	89°C	15 Sek
6.	55°C	15 Sek
7.	72°C	30 Sek
<i>5. – 7. Schritt 20 mal</i>		
8.	72°C	10 Min

## 4.7 Elektrophorese auf dem automatischen Sequenzier-Gerät

Die PCR-Produkte der Mikrosatelliten-DNS wurden auf einem 4,25%igem Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt.

### Vorbehandlung der Glasplatten

Die Glasplatten für die Elektrophorese wurden mit einem Detergenz (*Extran*<sup>®</sup>) behandelt, mit Aqua dest. gespült und mit Isopropanol gereinigt. Danach wurden die Abstandshalter (0,2mm) aufgelegt und die Glasplatten in der vorgesehenen Apparatur zusammengesetzt.

### Herstellung des Polyacrylamidgels

Das Polyacrylamidgel wurde aus folgenden Reagenzien hergestellt:

Acrylamid 40%	Acrylamid und Bisacrylamid im Verhältnis 29:1, in Aqua bidest. gelöst und filtriert
Harnstoff (Urea)	
10x TBE-Puffer	500 mM Tris (=Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan) 500 mM Borsäure 20 mM EDTA, pH 8,0
Ammoniumpersulfat-Lösung (10%)	10 g Ammoniumpersulfat 100 ml H <sub>2</sub> O
TEMED	N',N',N',N-Tetramethyldiamin

18g Harnstoff wurden in 24 ml bidest H<sub>2</sub>O gelöst, mit 5,6 ml der 40%igen Acrylamidlösung gemischt, durch einen 0,2 µm Filter filtriert und entgast. Danach wurde die Lösung in ein Becherglas überführt, mit 6ml 10x TBE-Puffer, 250 µl 10%iger Ammoniumpersulfatlösung sowie 35 µl TEMED versetzt und anschließend sofort zwischen die vorbereiteten Glasplatten gegossen. Nach Einsetzen der Kämmen polymerisierte das Gel 1h in horizontaler Lage.

### Elektrophorese

Für die Elektrophorese wurde das Gel vertikal in das ABI 377-Gerät eingespannt und beide Pufferkammern mit 1xTBE gefüllt. Die optimale Lauftemperatur betrug 51°C, so dass das Gel zunächst vorgeheizt werden musste. In einem Kontrolllauf maß der Laser, ob sich Verunreinigungen auf den Glasplatten befanden. Anschließend konnten die PCR-Produkte

aufgetragen werden. Dazu wurden 2,5 µl jedes PCR-Produktes mit 2 µl einer Lösung aus einem DNS-Längenstandard (GS-500) und einem farbigen Ladepuffer versehen und bei 95°C zwei Minuten lang denaturiert. Daraufhin wurden jeweils 2,5 µl in die Geltaschen pipettiert. Die Laufzeit hing von der Fragmentgröße ab, betrug aber in der Regel 2-3h bei 2400 Volt.

#### **4.8 Bestimmung der PCR-Fragmentlängen**

Die Bestimmung der PCR-Fragmentlängen erfolgt mit Hilfe des ABI-Genotyper-Softwareprogramms. Der mit den PCR-Produkten aufgetragene Längenstandard (GS-500) ist Farbstoff-markiert und kann von anders markierten Proben unterschieden werden. Die bekannten Fragmentlängen des Standards dienen zur Erzeugung einer Kalibrierungskurve. Mit Hilfe dieser Kurve können die Längen unbekannter PCR-Produkte durch Extrapolation ermittelt werden.

Zur genaueren Bestimmung der Produktlängen wurde eine DNS-Probe aus dem Pool der CEPH (*Centre d'Etude du Polymorphisme Humain*, <http://www.cephb.fr/bio/ceph-généthon-map.html>) parallel analysiert, deren Fragmentlängen bekannt sind.

#### **4.9 Bestimmung der Genotypen**

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

Die Mendel'sche Vererbung der Markerallele wurde anschließend mit dem Programm *CPC* (Check-Pedigree-Consistency, M. Knapp, Institut für Medizinische Biometrie, Informatik und Epidemiologie) überprüft. Wenn im Einzelfall inkompatible Genotypen auftraten, wurde die DNS der betreffenden Person nochmals durch PCR vervielfältigt und die Genotypen neu bestimmt.

#### 4.10 Kopplungsanalyse

Die Kopplungsanalyse wurde am Institut für Medizinische Biometrie, Informatik und Epidemiologie (IMBIE) des Universitätsklinikums Bonn durchgeführt.

Die Kopplungsuntersuchungen fanden unter zwei Krankheitsmodellen statt:

(1) Das *enge Krankheitsmodell (affection status model I, ASM I)* definierte nur Individuen mit der Diagnose einer Bipolar I Störung (BPI) als betroffen. Der Krankheitsstatus von Individuen mit anderen psychiatrischen Diagnosen wurde als "unbekannt" gewertet (affecteds-only-Analyse).

(2) Beim *weiten Krankheitsmodell (affection status model II, ASM II)* wurden alle Individuen als betroffen gewertet mit der Diagnose einer Bipolar I Störung (BPI), einer Bipolar II Störung (BPII), einer schizoaffektiven Störung vom bipolaren Typ (SA/BP) sowie einer unipolaren rezidivierenden Störung (UPR). Auch hier wurde der Krankheitsstatus von Individuen mit psychiatrischen Diagnosen, die nicht durch das ASM II erfasst wurden, als "unbekannt" gewertet. Die 2-Punkt LOD-Score Analyse erfolgte unter Verwendung des Programms MLINK der LINKAGE package version 5.2 (Lathrop et al., 1984). Unter der jeweiligen Krankheitsdefinition wurde die LOD-Score Analyse unter der Annahme eines dominanten und eines rezessiven Vererbungsmodells berechnet.

Die bei parametrischen Kopplungsanalysen notwendigen Annahmen wurden wie folgt gewählt: Für das *weite Krankheitsmodell* wurden für beide Vererbungsmodelle (dominant und rezessiv) eine Phänokopierate von 3,2% sowie eine Penetranz von 50% zu Grunde gelegt. Die parametrische Kopplungsanalyse wurde unter der Annahme einer Krankheitsallelfrequenz von 3% beim dominanten Modell und von 24,5% beim rezessiven Modell durchgeführt. Beim *engen Krankheitsmodell* lag für beide genetische Modelle die Phänokopierate bei 0,1% und die Penetranz bei 50%. Dem dominanten Vererbungsmodell wurde eine Krankheitsallelfrequenz von 0,9% und dem rezessiven Vererbungsmodell eine von 13,4% zu Grunde gelegt.

Diese Annahmen entsprechen einem Lebenszeitrisiko (lifetime morbid risk) von 6% an einer Störung entsprechend den ASM II-Kriterien zu erkranken, sowie von 1% für eine Bipolar I Störung entsprechend dem ASM I (Weissman et al., 1988).

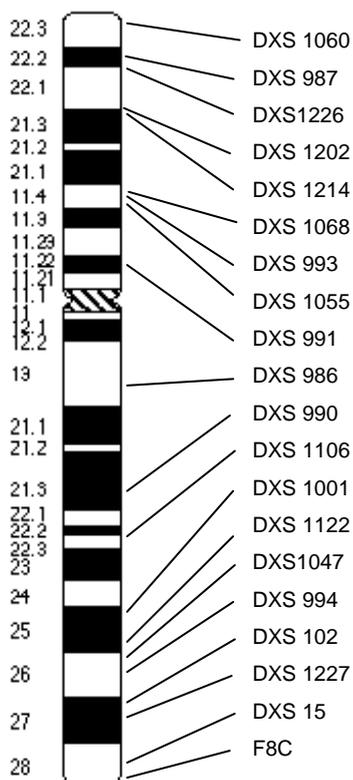
Zusätzlich zu den parametrischen 2-Punkt-Analysen wurden auch nicht-parametrische Multipoint-Analysen durchgeführt. Dazu wurde das Programm GENEHUNTER Version 2.0B (Kruglyak et al., 1996; Kruglyak und Lander, 1998) verwendet. Die nicht-parametrische Multipoint- (NPL-Score-) Analyse berücksichtigte die Allelweitergabe identical by descent (IDB) für alle betroffenen Familienmitglieder mittels der score function.

## 5 Ergebnisse

In der vorliegenden Arbeit stand ein Kollektiv von 75 Familien deutscher, israelischer und italienischer Herkunft zur Verfügung, in denen die bipolar affektive Störung gehäuft auftritt. Es wurden insgesamt 20 hochpolymorphe STR-Marker im durchschnittlichen Abstand von 12,2 cM untersucht.

Den parametrischen wie den nicht-parametrischen Kopplungsanalysen wurden zwei genetische Modelle (dominant und rezessiv) zugrundegelegt. Die parametrischen Analysen wurden zusätzlich unter der Annahme zweier Krankheitsdefinitionen (eng und weit) durchgeführt.

Die Verteilung der Marker ist in der folgenden Abbildung angegeben:



**Abbildung 1:** Lokalisation der Marker auf dem X-Chromosom

## 5.1 Ergebnisse der parametrischen Zwei-Punkt-Analyse

In der nachfolgenden Tabelle 2 sind für jeden Marker die 2-Punkt-LOD-Scores ( $\theta < 0,5$ ) für das dominante und das rezessive Vererbungsmodell sowie für enge und weite Diagnosekriterien aufgeführt. Die Ergebnisse beziehen sich auf die Gesamtzahl der Familien. Die Markerpositionen sind Durchschnittswerte von männlichen und weiblichen Probanden und wurden der *Marshfield Map* ([http://research.marshfieldclinic.org/genetics/Map\\_Markers/maps/IndexMapFrames.html](http://research.marshfieldclinic.org/genetics/Map_Markers/maps/IndexMapFrames.html)) oder der *Genethon Map* ([http://www.genlink.wustl.edu/genethon\\_frame/](http://www.genlink.wustl.edu/genethon_frame/)) entnommen. Positive LOD-Scores sind fett gedruckt. Der jeweilige  $\theta$ -Wert ist hinter dem LOD-Score in Klammern angegeben. Die Abbildungen 1 und 2 stellen die parametrischen 2-Punkt-LOD-Scores unter dem dominanten und dem rezessiven Modell dar.

Positive LOD-Scores unter dem dominant engen Modell liefern die Marker DXS 987, DXS 986, DXS 990, DXS 1101, DXS 1122, DXS 1047, DXS 994, DXS 102 und DXS 1227, unter dem dominant weiten Modell die Marker DXS 1060, DXS 987, DXS 1214, DXS 993 und DXS 991.

Für das rezessive Modell ergeben die Marker DXS 987, DXS 1055, DXS 986, DXS 1106, DXS 1101, DXS 1122, DXS 1047, DXS 994, und DXS 1227 positive Werte für die engen Diagnosekriterien, für die weiten Kriterien die Marker DXS 1060, DXS 987, DXS 993, DXS 1055 DXS 986, DXS 1106 und DXS 994.

Dabei erreicht keiner der Marker einen Wert, der höher ist als +1. Den höchsten parametrischen LOD-Score liefert der Marker DXS 1055 unter einem rezessiv-weiten Modell (LOD-Score 0,77 bei  $\theta=0,1$ ). Die negative LOD-Scores liegen alle im Bereich zwischen 0 und  $-0,23$  (alle unter  $\theta=0,4$ ).

Marker	Rekombinationsrate	Markerposition (cM)	LOD-Score unter dominantem Modell		LOD-Score unter rezessivem Modell	
			enges Modell ( $\theta$ max)	weites Modell ( $\theta$ max)	enges Modell ( $\theta$ max)	weites Modell ( $\theta$ max)
<b>DXS 1060</b>		0	- 0,05 (0,4)	<b>0,04 (0,4)</b>	0,0 (0,4)	<b>0,01 (0,4)</b>
<b>DXS 987</b>	0,22	28,99	<b>0,14 (0,2)</b>	<b>0,17 (0,3)</b>	<b>0,32 (0,2)</b>	<b>0,04 (0,3)</b>
<b>DXS 1226</b>	0,111	41,54	- 0,11 (0,4)	- 0,01 (0,4)	- 0,03 (0,4)	- 0,01 (0,4)
<b>DXS 1202</b>	0,058	47,71	- 0,08 (0,4)	- 0,2 (0,4)	- 0,02 (0,4)	- 0,03 (0,4)
<b>DXS 1214</b>	0,037	51,55	- 0,02 (0,4)	<b>0,07 (0,4)</b>	- 0,05 (0,4)	- 0,02 (0,4)
<b>DXS 1068</b>	0,084	60,75	-0,16 (0,4)	- 0,11 (0,4)	- 0,05 (0,4)	- 0,01 (0,4)
<b>DXS 993</b>	0,055	66,57	- 0,03 (0,4)	<b>0,01 (0,4)</b>	- 0,08 (0,4)	<b>0,05 (0,3)</b>
<b>DXS 1055</b>	0,113	79,38	0,0 (0,4)	- 0,07 (0,4)	<b>0,25 (0,2)</b>	<b>0,77 (0,1)</b>
<b>DXS 991</b>	0,015	80,91	- 0,03 (0,4)	<b>0,3 (0,2)</b>	- 0,04 (0,4)	<b>0,3 (0,2)</b>
<b>DXS 986</b>	0,08	89,62	<b>0,04 (0,4)</b>	- 0,08 (0,4)	<b>0,05 (0,3)</b>	<b>0,18 (0,2)</b>
<b>DXS 990</b>	0,118	103,08	<b>0,06 (0,4)</b>	- 0,02 (0,4)	- 0,05 (0,4)	- 0,02 (0,4)
<b>DXS 1106</b>	0,089	112,88	0,0 (0,4)	- 0,04 (0,4)	<b>0,1 (0,3)</b>	<b>0,05 (0,3)</b>
<b>DXS 1001</b>	0,258	149,17	<b>0,06 (0,4)</b>	- 0,11 (0,4)	<b>0,01 (0,4)</b>	- 0,02 (0,4)
<b>DXS 1122</b>	0,044	153,77	<b>0,24 (0,2)</b>	- 0,04 (0,4)	<b>0,09 (0,2)</b>	- 0,01 (0,4)
<b>DXS 1047</b>	0,023	156,13	<b>0,05 (0,4)</b>	- 0,12 (0,4)	<b>0,25 (0,2)</b>	0,0 (0,4)
<b>DXS 994</b>	0,018	157,96	<b>0,06 (0,4)</b>	- 0,04 (0,4)	<b>0,41 (0,2)</b>	<b>0,15 (0,2)</b>
<b>DXS 102</b>	0,022	160,21	<b>0,07 (0,4)</b>	- 0,07 (0,4)	0,0 (0,4)	- 0,03 (0,4)
<b>DXS 1227</b>	0,11	172,63	<b>0,28 (0,3)</b>	- 0,04 (0,4)	<b>0,02 (0,3)</b>	- 0,02 (0,4)
<b>DXS 15</b>	0,375	241,95	- 0,01 (0,4)	- 0,16 (0,4)	- 0,03 (0,4)	- 0,04 (0,4)
<b>F8C</b>	0,019	243,89	- 0,01 (0,4)	- 0,23 (0,4)	<b>0,1 (0,3)</b>	- 0,03 (0,4)

**Tabelle 2:** Ergebnisse der 2-Punkt LOD-Score Analyse

Abbildung 2: 2-Punkt LOD-Scores unter dominantem Modell

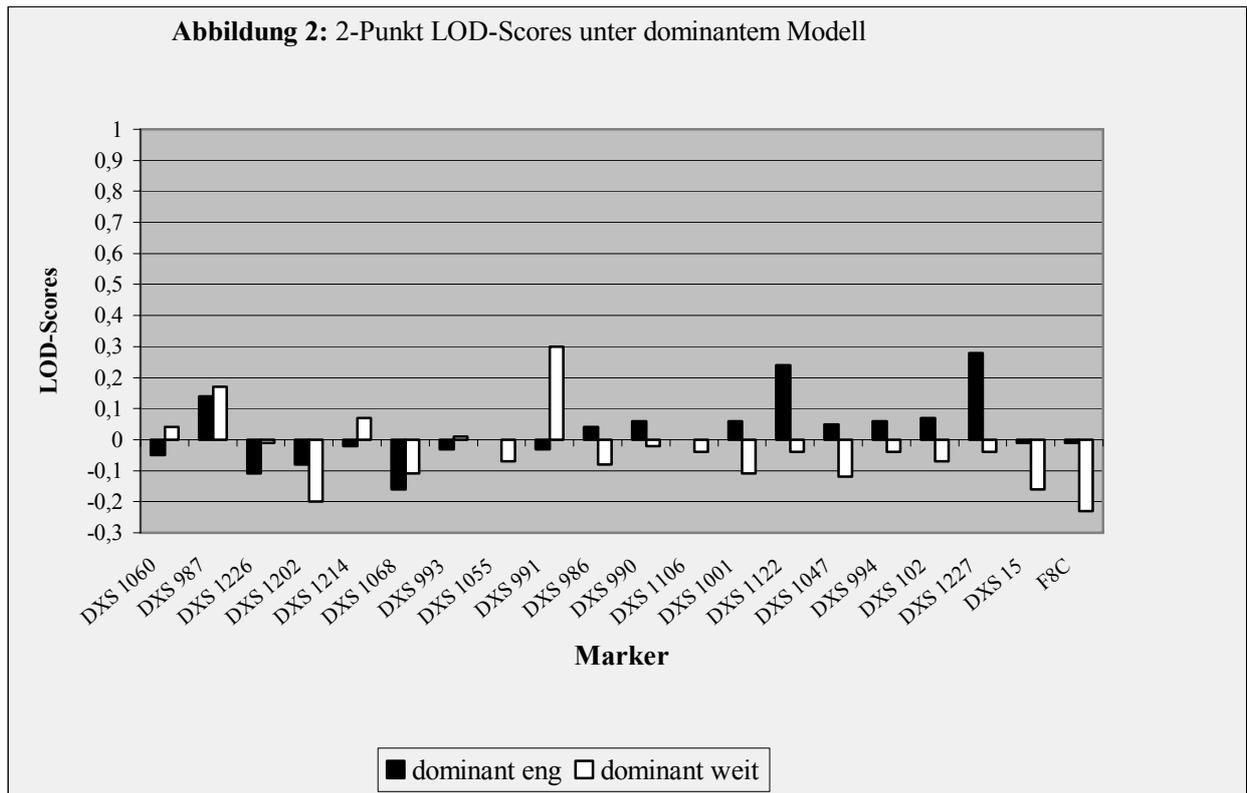
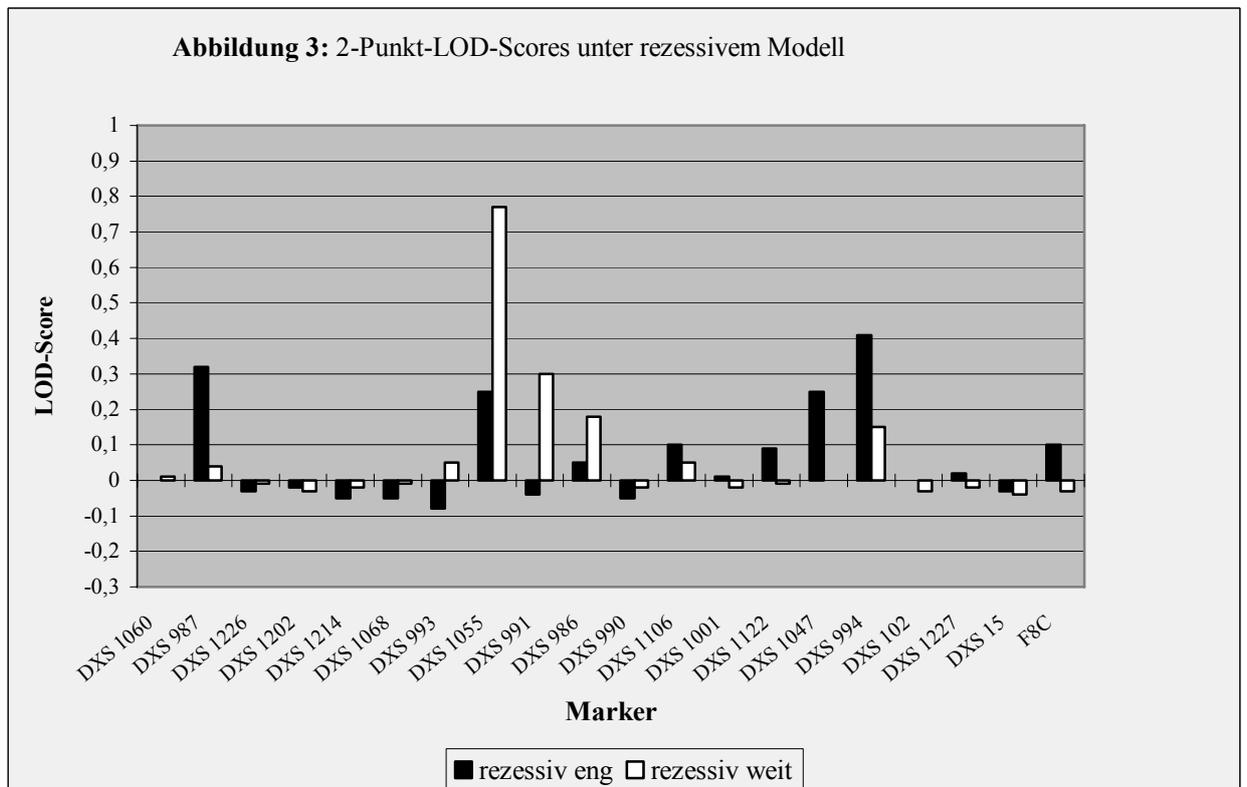


Abbildung 3: 2-Punkt-LOD-Scores unter rezessivem Modell



## 5.2 Ergebnisse der nicht-parametrischen Multimarker-Analyse

Die Werte der nicht parametrischen Kopplungsanalyse sind in Abbildung 4 dargestellt. Die schwarze Linie kennzeichnet die NPL-Scores unter engen Diagnosekriterien, die graue Linie jene unter weiten Kriterien. Die gestrichelte Linie veranschaulicht die *genetische Information* der einzelnen Marker. Darin sind alle informativen Meiosen der in dem vorliegenden Patientenkollektiv enthaltenen Familien zusammengefasst. „Voll informativ“ ist eine Meiose dann, wenn beide Elternteile eines Kindes für einen Marker jeweils unterschiedliche Allele tragen. Die bei den Eltern vorliegenden vier verschiedenen Kopien der untersuchten chromosomalen Region sind eindeutig voneinander unterscheidbar, ihre Vererbung ist somit zweifelsfrei. Die genetische Informativität entspricht dem Wert 1.

Die X-Achse gibt die Länge des X-Chromosoms in Centimorgan wieder, die linke Y-Achse die Werte der NPL-Scores; die rechte Y-Achse zeigt den Informationsgehalt an (von 0-1,0).

Die NPL-Scores sind nicht direkt mit LOD-Scores vergleichbar. Um die Bedeutung eines NPL-Scores beurteilen zu können, muss man daher auch den jeweils zugehörigen P-Wert, der die statistische Signifikanz angibt, berücksichtigen. In Tabelle 3 sind die „Peaks“ der NPL-Kurve mit den zugehörigen P-Werten dargestellt.

Position (cM)	Intervall	enges Modell			weites Modell		
		NPL-Score	P-Wert	genet. Information	NPL-Score	P-Wert	genet. Information
28,99	DXS 1	<b>0.91509</b>	0.092078	0.887748	<b>1.03136</b>	0.151636	0.887748
66.57	DXS 993				<b>0.44421</b>	0.326881	0.914718
87.88	DXS 991 – DXS 986				<b>0.52658</b>	0.297924	0.757073
157,96	DXS 994	<b>0.79901</b>	0.123371	0.931334			
172.63	DXS 1227				<b>0.17456</b>	0.428320	0.776317
243.89	F8C	<b>0.03327</b>	0.478507	0.836871			

**Tabelle 3:** Peaks der NPL-Kurve. Sofern keine NPL-Scores angegeben werden, sind diese negativ.

Wie Tabelle 3 zu entnehmen ist, erreichen die NPL-Scores weder unter engen noch unter weiten Diagnosekriterien Werte, die deutlich über +1 liegen. Keiner der P-Werte ist niedrig genug, um statistische Signifikanz anzuzeigen.

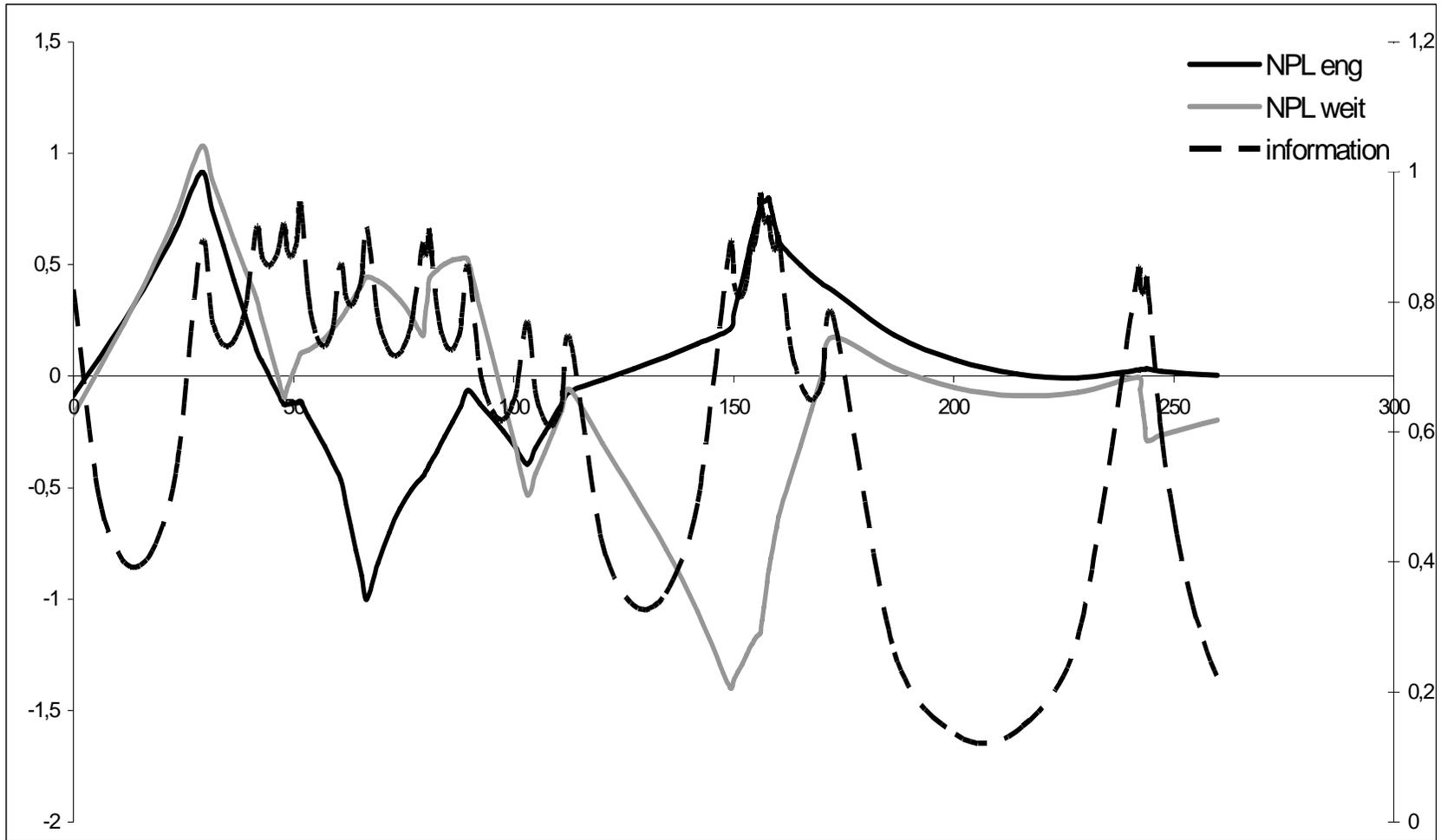


Abbildung 4: Ergebnisse der nicht-parametrischen Analyse

## 6 Diskussion

### 6.1 Literaturübersicht

Rosanoff et al. (1935) schlugen erstmals eine Beteiligung des X-Chromosoms an bipolar affektiven Störungen vor, mit der sie die bei Frauen beobachtete, gegenüber Männern erhöhte Inzidenz der Krankheit zu erklären versuchten. Unterstützende Befunde kamen in den 60-er Jahren hinzu: Winokur et al. (1969) berichteten Familien mit bipolar affektiven Störungen, in denen die Erkrankung gemeinsam mit der nachgewiesenen X-chromosomal vererbten Rot-Grün-Blindheit auftrat. Daraus folgerten sie, dass es einen mit dem Rot-Grün-Locus gekoppelten Genort für bipolar affektive Störungen auf dem X-Chromosom geben müsse. Aufgrund der formalgenetischen Beobachtung, dass es keine erhöhte Zahl betroffener Männer gab, schien ein X-chromosomal-rezessiver Erbgang unwahrscheinlich. Stattdessen vermutete man eine X-chromosomal-dominante Vererbung (Winokur et al., 1969).

In den nachfolgenden Jahren wurden mehrere Kopplungsuntersuchungen zwischen zunächst phänotypischen, später genetischen Markern auf dem X-Chromosom und bipolar affektiven Störungen durchgeführt. Eine Übersicht über diese Studien gibt Tabelle 4 (s.u.). Es wurden vor allem drei Regionen diskutiert: Xq22, Xq26-q27 und Xq28. In jeder der drei Regionen ergeben die Studien ein uneinheitliches Bild:

Die Region Xq22, die u.a. das Gen für das Xg-Blutgruppenantigen einschließt, hat nach anfänglich viel versprechenden Befunden (Winokur et al., 1969; Winokur und Tanna, 1969; Fieve et al., 1973; Mendlewicz und Fleiss, 1974; Mendlewicz et al., 1975) inzwischen an Bedeutung verloren. Aufgrund der großen genetischen Distanz zwischen dem Locus für das Xg-Blutgruppen-Antigen und dem Locus für Farbenfehlsichtigkeit kann die ursprünglich angenommene Kopplung zwischen diesen Loci ausgeschlossen werden (Leckman et al., 1979; Gershon und Bunney, 1976; Kidd et al., 1984).

In der Region Xq26-q27 liegen der Locus für die Hypoxanthin-Phosphoribyl-Transferase (HPRT), deren Mangel vor allem die Funktion der Basalganglien und des dopaminergen Systems beeinflusst, und der Locus für den Blutgerinnungsfaktor IX (F9), dessen Fehlen die Hämophilie B bedingt.

Die Region Xq28 beinhaltet die Loci für Farbenfehlsichtigkeit (CB), den Blutgerinnungsfaktor VIII (F8) und die Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase (G6PD), deren Mangel zu einer Schädigung der Erythrozyten mit schwerer Hämolyse führt.

Im Weiteren werden die Befunde zu den Regionen Xq26-q27 und Xq28 im Detail dargestellt. Da die chromosomale Region Xq26-q27 erst später in den Mittelpunkt des Interesses rückte, wird zunächst die Region Xq28 besprochen.

<b>Autoren</b>	<b>Jahr</b>	<b>Kollektiv</b>	<b>Marker</b>	<b>Lokalisation</b>	<b>LOD-Score</b>
Reich et al.	1969	2 Familien (USA)	CB	Xq28	3,3
Mendlewicz und Fleiss	1974	17 Familien (USA) 23 Familien (USA)	CB Xg	Xq28 Xq22	8,1 2,9
Baron	1977	1 Familie (USA)	CB	Xq28	2,3
Gershon et al.	1979	6 Familien (USA)	CB	Xq28	< -2,0
Leckman et al.	1979	6 Familien (USA)	Xg	Xq22	< -2,0
Mendlewicz et al.	1979	8 Familien (Belgien)	CB	Xq28	1,6
Mendlewicz et al.	1980	1 Familie (Iran)	G6PD	Xq28	4,0
Gershon	1980	16 Familien (Belgien, USA, Schweiz, Dänemark)	CB	Xq28	< 1,0
Del Zompo et al.	1984	2 Familien (Italien)	CB G6PD	Xq28	1,5
Kidd et al.	1984	1 Familie (USA)	CB	Xq28	< 0
Baron et al.	1987	5 Familien (Israel)	CB G6PD	Xq28	4,75
Mendlewicz et al.	1987	10 Familien (Belgien)	F9	Xq27	3,1
Berrettini et al.	1990	7 Familien (USA)	F8 DXS 52, DXS 15	Xq28	< 2,0
Gejman et al.	1990	7 Familien (USA)	F9 DXS 98, DXS 105	Xq27	< 2,0
Gill et al.	1992	1 Familie (England)	F9	Xq27	0,9
Lucotte et al.	1992	1 Familien (Frankreich)	F9 (DXS 98)	Xq27	3,91
Jeffries et al.	1993	1 Familie (USA)	F9	Xq27	2,2
De Bruyn et al.	1994	2 Familien (Belgien)	F9	Xq27	1,12
Pekkarinen et al.	1995	1 Familie (Finnland)	DXS 994	Xq26	3,54
Smyth et al.	1997	23 Familien (U.K., Island)	DXS 102 F8C	Xq27 Xq28	< 0
Stine et al.	1997	97 Familien (USA)	DXS 1047	Xq26	1,34 (NPL)
Vallada et al.	1998	43 Familien (England, Wales, Brasilien)	DXS 1062 DXS 1227	Xq26 Xq27	< 0

**Tabelle 4:** Kopplungsbefunde mit X-chromosomalen Markern bei bipolar affektiven Störungen (in chronologischer Reihenfolge)

### 6.1.1 Xq28

Nachdem eine Reihe von Arbeitsgruppen (Winokur und Tanna, 1969; Reich et al., 1969; Mendlewicz et al., 1972) auf einen Zusammenhang zwischen Farbenfehlsichtigkeit und bipolar affektiven Störungen hingewiesen hatten, untersuchten Mendlewicz und Fleiss (1974) 60 unipolare und 125 bipolare Patienten aus 39 Familien, in denen die Rot-Grün-Schwäche gehäuft auftrat. Dabei konnten sie in 17 Stammbäumen eine enge Kopplung mit der Farbenfehlsichtigkeit nachweisen, während sie diese in elf unipolaren Familien nicht fanden. Jedoch wurde in neun (der 17) Familien dieses Kollektivs die Krankheit von den Vätern auf die Söhne übertragen, was – unter Annahme monogener Vererbung - mit X-chromosomaler Kopplung nicht vereinbar ist. Bestätigt wurden die Kopplungshinweise von Baron (1977), der in einer Familie mit Rot-Grün-Schwäche einen Z-Score von 2,3 berichtete.

Von acht weiteren Familien mit Rot-Grün-Schwäche, die Mendlewicz und Mitarbeiter 1979 veröffentlichten, ergab nur eine einen starken Hinweis auf Kopplung, was die Autoren mit Heterogenität erklären. Dies ist zwar theoretisch möglich, allerdings stammten die Patienten von beiden Studien aus derselben Klinik und kamen nachweislich aus der gleichen geographischen Region (Gershon, 1980).

Auch die Bedeutung des von Mendlewicz et al. (1980) veröffentlichten Kopplungsbefundes in einer persischen Familie mit gehäuften Auftreten des G6PD-Mangels wird kontrovers diskutiert. Gershon et al. (1980) weisen auf methodische Fehler bei der Diagnose und Erfassung der Patienten hin. Sie selbst konnten durch Untersuchungen an sechs Familien ähnlicher Herkunft eine Kopplung zwischen dem Locus für Farbenfehlsichtigkeit und bipolar affektiven Störungen ausschließen (Gershon et al., 1979).

Untersuchungen an einer Familie der Amish-Sekte in Pennsylvania, die ein genetisches Isolat bildet, ergaben ähnliche Befunde (Kidd et al., 1984). Auch die Ergebnisse der Studie der Weltgesundheitsorganisation (WHO), in der 16 Familien untersucht wurden, deuten nur schwach auf Kopplung der bipolar affektiven Störungen mit der Farbenfehlsichtigkeit hin (Gershon et al., 1980).

Del Zompo et al. untersuchten 1984 beide phänotypischen Marker in zwei Stammbäumen aus Sardinien und erhielten positive Kopplungsbefunde (LOD-Score 1,5), die durch eine erneute Analyse mit genetischen Markern (Del Zompo et al., 1991) abgeschwächt wurden. Zwar konnten sie ebenfalls in dem sardischen Kollektiv eine Assoziation zwischen dem G6PD-Mangel und

bipolaren Patienten entdecken (Bocchetta et al., 1993), jedoch wurde dabei weder das Problem des multiplen Testens ausreichend berücksichtigt noch der Phänotyp der Bipolar I Störung klar genug abgegrenzt (Baron, 1994).

Der zunächst viel versprechende Befund von Baron et al. (1987) zeigte in zwei der fünf untersuchten Stammbäume für den Farbenfehlsichtigkeit-Locus einen parametrischen LOD-Score von 4,75 ( $\theta=0,04$ ) und in einem weiteren Stammbaum einen positiven LOD-Score für den G6PD-Mangel. Bei dieser wie auch in der darauf folgenden Studie (s. 6.1.1.2) wurden ein weites Krankheitsmodell und fast vollständige Penetranz angenommen.

Der Befund von Baron et al. (1987) ließ sich in Kopplungsuntersuchungen mit STR-Markern in den um 25 Personen erweiterten Stammbäumen nicht bestätigen (Baron et al., 1993). Das starke Abfallen der LOD-Scores in dieser Studie hing vor allem mit der Revidierung einzelner Diagnosen sowie mit Rekombinationen bei Personen zusammen, die in der ersten Studie (Baron et al., 1987) nicht informativ gewesen waren. Wenn es sich in der ersten Studie um eine „echte“ Kopplung gehandelt hätte, hätte man durch die Erweiterung der Stammbäume eine Erhöhung der LOD-Scores feststellen müssen. Diese Studie macht auch deutlich, wie kritisch die hypothetische Annahme einer beinahe monogenen Vererbung für Kopplungsuntersuchungen bei genetisch komplexen Erkrankungen sein kann. Bereits geringfügige Veränderungen des Krankheitsstatus weniger Betroffener und/oder Gesunder im Stammbaum oder eine Änderung weniger Genotypen können zu dramatischen Veränderungen der Ergebnisse führen.

1990 schlossen Berrettini et al. eine Kopplung mit der Region Xq28 aus, jedoch muß auch diese klare Konklusio kritisch gesehen werden, da die Ergebnisse durch die sehr inhomogene Zusammensetzung des Patientenkollektivs mit einer geringen Zahl an bipolaren Patienten in ihrer Aussagekraft begrenzt sind. In einem Teil der Familien waren beide Eltern von bipolar affektiven Störungen betroffen (was eine für Kopplungsuntersuchungen unbrauchbare Situation darstellt), in anderen wurde die Krankheit von den Vätern auf die Söhne übertragen (Mendlewicz, 1992).

Keine der molekulargenetischen Studien, die die mit phänotypischen Markern erhobenen positiven Befunde replizieren sollten, konnte signifikante Hinweise auf Kopplung mit der Region Xq27-q28 liefern (Berrettini, 1998, Berrettini et al., 1990; Baron et al., 1993; Vallada et al., 1998). Aufgrund der Schwierigkeit Familien zu finden, in denen sowohl bipolar affektive Störungen als auch Farbenfehlsichtigkeit, G6PD-Mangel oder Hämophilie auftreten, waren die Patientenkollektive der ersten Kopplungsstudien klein. Ihre Befunde erscheinen nicht nur

aufgrund der geringen Kollektivgröße, sondern auch aufgrund der statistischen Methoden wenig aussagekräftig. Hinzu kommt, dass eine formalgenetische Re-Analyse der Stammbäume nicht mit dem ursprünglich angenommenen X-chromosomal-dominanten Erbgang vereinbar ist (Hebebrand, 1992).

### **6.1.2 Xq26-q27**

Die Region Xq26-q27 geriet erst später in den Mittelpunkt des Interesses. Mendlewicz et al. (1987) berichteten an zehn belgischen Familien einen Hinweis auf Kopplung zwischen bipolar affektiven Störungen und dem Locus für den Blutgerinnungsfaktor IX (LOD-Score 3,10 bei  $\theta=0,11$ ). Zwar zeigte sich später, dass eine der Familien bezüglich der psychiatrischen Diagnose fehlklassifiziert worden war, aber dies hätte den Autoren zufolge nur eine geringe Senkung des LOD-Scores zur Folge gehabt (Vassart und Simon, 1991). Diese Ergebnisse scheinen statistisch nicht robust, da unipolare und bipolare Störungen derselben Diagnosekategorie zugeordnet worden waren, was zu falsch positiven Werten führen kann (Baron, 1994). Ein weiteres Problem könnte sein, dass der Phänotyp gesunder Personen als „nicht betroffen“ gewertet wurde und nicht als „unbekannt“, wodurch eine Änderung einzelner Diagnosen die Höhe des LOD-Scores erheblich beeinflusst haben könnte (Suarez et al., 1987). Der genannte LOD-Score ergab sich nur unter der Annahme vollständiger Penetranz von 100%, sank jedoch deutlich unter der realistischeren Annahme einer Penetranz von 80 bzw. 90% (Baron, 1993).

Die einzige Studie, die mit phänotypischen Markern durchgeführt wurde, stammte von Gill et al. (1992), der in einer Familie eine Kosegregation der Hämophilie und affektiven Störungen beobachtete. Dabei wurde jedoch lediglich eine kleine Familie untersucht und die Bipolar I Störung nicht streng abgegrenzt von depressiven Störungen, sodass dieser positive Kopplungshinweis ebenfalls kritisch gesehen werden muss (Baron, 1994; Craddock und Owen, 1992).

1990 untersuchten Gejman et al. an sieben Stammbäumen die Region Xq26-28 mit genetischen Markern, deren Lokalisation sich 10cM centromerisch vom Faktor IX-Locus bis zum Locus für Farbenfehlsichtigkeit erstreckte. Dabei verwendeten sie die gleichen Parameter wie Mendlewicz et al. (1987), erhielten jedoch keine Hinweise auf Kopplung. In ihrem Patientenkollektiv befand sich ein großer Anteil von Familien, in denen die Krankheit vom Vater auf den Sohn übertragen wurde. Auch durch deren Ausschluss veränderte sich das Resultat nicht.

Nach Mendlewicz et al. (1987) erhielten Lucotte et al. (1992) den zweiten starken Hinweis auf Kopplung, in diesem Fall in einer französischen Familie (parametrischer LOD-Score 3,91). Diese stellte ein Subkollektiv von zehn Familien dar, von denen neun Familien keine Hinweise auf Kopplung ergaben. Auch hier wurde vollständige Penetranz angenommen. Das mögliche Auftreten von Phänokopien sowie ein unterschiedliches Erstmanifestationsalter wurden nicht berücksichtigt. Dadurch können phänotypische Fehlklassifikationen den LOD-Score erheblich senken, wie später auch Hodge und Greenberg (1992) zeigten. Diese Ergebnisse können ebenfalls nicht als statistisch robust angesehen werden (Baron, 1994).

Jeffries et al. (1993) untersuchten eine Familie, in der das Fragile-X-Syndrom gehäuft mit bipolar affektiven Störungen auftrat. Von vier Personen mit bipolar affektiven Störungen kann jedoch nur eine einzige unter strengen Kriterien als bipolar eingestuft werden. Ein Großteil der Familienangehörigen wurde zudem nicht direkt befragt. Daher ist die Aussagekraft dieses Kopplungsbefundes (parametrischer LOD-Score des F9-Locus 2,20) begrenzt (Baron, 1994).

Im Rahmen eines sehr umfangreichen Genome Scans (97 Familien) untersuchten Stine et al. (1997) elf Marker auf dem X-Chromosom. Der höchste nicht-parametrische Multipoint-LOD-Score ergab 1,34 in der Region Xq26-q28, allerdings nur unter dem weiten Krankheitsmodell. Im engen Modell waren die LOD-Scores deutlich geringer. Die systematische Analyse der autosomalen Regionen erbrachte hingegen Hinweise auf Kopplung.

Smyth et al. (1997) erhalten in der Region Xq26-q28 in 23 Familien in beiden Modellen unter allen Rekombinationsfrequenzen vollständig negative LOD-Scores. Es scheint unwahrscheinlich, dass hierfür die Annahme eines falschen Modells verantwortlich ist.

Den wichtigsten X-chromosomalen Kopplungsbefund zu den bipolar affektiven Störungen lieferten Pekkarinen et al. (1995) in ihrem Genome Scan an einer Familie aus einem Isolat in Ostfinnland, deren Stammbaum sich über fünf Generationen erstreckt. Die finnische Bevölkerung war über mehrere Jahrtausende aufgrund ihrer geographischen Lage und ihrer Sprache isoliert und eignet sich besonders gut für genetische Untersuchungen, da die Zahl der „Founder“-Individuen und damit die mögliche Anzahl prädisponierender Mutationen begrenzt ist. Dabei erhielten sie für den Marker DXS 994, der in der Region Xq26 liegt, einen LOD-Score von 3,54 bei  $\theta=0,0$ . Interessanterweise ergaben sich die höchsten Werte unter der Annahme eines einzigen Hauptlocus nur in der engen Diagnosekategorie, die Patienten mit Bipolar I-, II-Störung und schizoaffektiver Störung vom manischen Typ einschließt. Unter weiten Kriterien, die zusätzlich

die unipolar rezidivierende Depression beinhalten, sanken die LOD-Scores. Unter dem „affecteds-only-Modell“ wies auch der Marker DXS 994 die höchsten Werte (enge Kategorie) auf. Im Rahmen einer Feinkartierung ergab eine Haplotypenanalyse zwischen Xq24-q27.1, dass alle Patienten mit engen Diagnosekriterien den gleichen Haplotyp besaßen. Dies kann als unterstützendes Argument für die Glaubwürdigkeit dieses Befundes gesehen werden.

Eine mögliche Vater-Sohn-Übertragung konnte nicht sicher ausgeschlossen werden, da in den ersten drei Generationen des untersuchten Stammbaums betroffene Frauen deutlich in der Überzahl waren (Pekkarinen et al., 1995; Baron 1997). Zudem waren die Angaben über die betroffenen männlichen Familienmitglieder unvollständig, da sie entweder früh Suizid begingen oder Kinder haben, die noch zu jung sind, um zuverlässig als nicht betroffen eingestuft zu werden.

Nach den Kriterien von Lander und Kruglyak (1996) kann der Befund als „highly suggestive“ gewertet werden. Der LOD-Score weist im engen Krankheitsmodell einen höheren Wert auf als im weiten Krankheitsmodell, das auch die unipolaren Patienten mit einschließt. Die Marker außerhalb der Region Xq24-q26 ergaben deutlich negative Werte. Alle diese Punkte zusammengenommen zeigen, dass die Wahrscheinlichkeit für einen falsch-positiven Befund relativ klein ist.

Pekkarinen et al. (1995) führten in der Region Xq26-q27 eine Re-Analyse der zuvor veröffentlichten Daten aus sechs Studien unabhängig von deren Ergebnissen durch (Mendlewicz et al., 1987, Lucotte et al., 1992; Jeffries et al., 1993; Gejman et al., 1990; Baron et al., 1993 s.u.; De bruyn et al., 1994). Dabei erhielten sie einen Hinweis auf Kopplung (DXS 51: 2,78; F9a: 1,51; F9b:1,77) in der Gesamtstichprobe. Hierzu muss man allerdings anfügen, dass Einzelstudien bestimmter chromosomaler Loci vor allem dann veröffentlicht werden, wenn die Ergebnisse positiv sind. Negativstudien sind demgegenüber schwieriger zu publizieren und in der Literatur häufig unterrepräsentiert. Vor diesem Hintergrund sollte auch die von Pekkarinen et al. berichtete Re-Analyse gesehen werden. Dies wird auch unterstützt durch eine Arbeit von Vallada et al. (1998), die die Befunde von Pekkarinen et al. (1995) zu replizieren versuchte. Der Marker DXS 1062, der 3,8 cM telomerisch des von Pekkarinen verwendeten Markers DXS 994 liegt, wurde in 43 Familien aus England, Wales und Brasilien genotypisiert. Diese Familien stammten im Gegensatz zum Pekkarinen-Sample nicht aus einer Isolatbevölkerung. Weder in der parametrischen noch in der nicht parametrischen Analyse ergaben sich Hinweise auf Kopplung mit dem X-Chromosom.

Bislang wurden insgesamt drei Meta-Analysen bei bipolaren Störungen durchgeführt, in denen eine größere Anzahl publizierter Genome Scans untersucht wurden (Badner und Gershon, 2002; Segurado et al., 2003; McQueen et al., 2005). Diese können den Publikationsbias hinsichtlich positiver Studien auf ein Minimum reduzieren und sind dadurch wesentlich aussagekräftiger. Jedoch entstehen Probleme durch die heterogenen Daten verschiedener Einzelstudien, da unterschiedliche Marker oder unterschiedliche Krankheitsmodelle verwendet werden. Diese können nur eingeschränkt – d.h. unter Verlust an Information - miteinander verglichen werden. Bei den o.g. Studien wurde das X-Chromosom nicht analysiert, da es nicht in allen eingeschlossenen Genome Scans untersucht worden war.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die einzigen positiven Befunde in der Region Xq26-q27 aus älteren Studien mit kleinen Kollektiven stammen. Die neueren Studien, die nicht nur mit größeren Zahlen von Familien arbeiten, sondern auch nicht-parametrische Analysen anwenden und somit generell besser für die Analyse genetisch komplexer Erkrankungen geeignet sind, haben keine überzeugenden Hinweise auf Kopplung von bipolar affektiven Störungen mit dem X-Chromosom geliefert. Eine Ausnahme bildet die Studie von Pekkarinen et al. (1995). Hier ergaben sich starke Hinweise auf Kopplung in einer finnischen Isolatpopulation. Diese weist im Gegensatz zu Mischpopulationen ein höheres Maß an Homogenität und unterschiedliche Krankheitsallelfrequenzen auf. Daher scheint es möglich, dass ein Gen in dieser speziellen Population einen stärkeren Einfluss auf die Entstehung bipolar affektiver Störungen besitzt als in Mischpopulationen (z.B. Mitteleuropa oder Nordamerika).

## **6.2 Diskussion der eigenen Ergebnisse**

Trotz der eher negativen Resultate neuerer Kopplungsstudien zwischen dem X-Chromosom und bipolar affektiven Störungen lässt sich eine mögliche Beteiligung X-chromosomaler Gene an der Entstehung der Krankheit nicht ausschließen. Aus diesem Grund ist es wichtig, Kopplungsuntersuchungen in weiteren, unabhängigen Familienstichproben unterschiedlicher Ethnizitäten durchzuführen.

Im Rahmen unseres eigenen, systematischen Genome Scans wurde ein 75 Familien umfassendes Kollektiv größtenteils deutscher Herkunft untersucht. Auf dem X-Chromosom wurden insgesamt 20 Marker im durchschnittlichen Abstand von 12,2 cM analysiert. Dabei ergaben sich weder bei

der parametrischen noch bei der nicht-parametrischen Methode signifikante Hinweise auf eine Kopplung X-chromosomaler Marker mit den bipolar affektiven Störungen.

In der Region *Xq24-q27* wurden insgesamt sechs Marker untersucht (DXS 1001, DXS 1122, DXS 1047, DXS 994, DXS 102, DXS 1227). Die genetische Informativität in dieser Region lag über 90%. Der Marker DXS 102 liegt 2,2 cM centromerisch vom F9-Locus, der in früheren Studien deutliche Hinweise auf Kopplung ergeben hatte (Mendlewicz et al., 1987; Lucotte et al., 1992; Jeffries et al., 1993). Der Marker DXS 1122 hatte bei den Analysen von Pekkarinen et al. (1995) einen „suggestive“, der Marker DXS 994 einen signifikanten Hinweis auf Kopplung geliefert.

In der vorliegenden Untersuchung ergeben sämtliche Marker in der Region *Xq24-q26* negative Werte und können somit den Befund von Pekkarinen nicht replizieren.

In der Region *Xq28* wurden die Marker DXS 15 und F8C analysiert, die einen Abstand von 1,94 cM aufweisen. Der Marker DXS 15 liegt weniger als ein cM centromerisch vom Locus für Farbenfehlsichtigkeit, der in den früheren Studien Hinweise auf Kopplung erbrachte (Mendlewicz und Fleiss et al., 1974). Die parametrische sowie die nicht-parametrische Analyse lieferten negative Werte. Die GENEHUNTER-Analyse zeigt, dass die genetische Informativität in diesem Bereich über 80 % lag, so dass die Ergebnisse als sehr aussagekräftig betrachtet werden können. Ebenso wie bei allen anderen Arbeitsgruppen, die mit modernen molekulargenetischen Methoden Kopplungsanalysen in der Region *Xq28* durchgeführt haben (Berrettini et al. 1990; Baron et al., 1993; Smyth et al., 1997; Vallada et al., 1998), ergaben somit auch unsere Untersuchungen keine Hinweise auf Kopplung. Daher scheint ein für bipolar affektive Störungen prädisponierendes Gen in dieser Region unwahrscheinlich.

In der vorliegenden Untersuchung befindet sich jedoch in der Region *Xq27-q28* zwischen den Markern DXS 1227 und DXS 15 ein Bereich von 69,32 cM, in dem kein Marker untersucht wurde. Wie aus der Informativitätskurve zu erkennen ist, ist die Analyse an diesen Punkten aussagekräftig. So beträgt die genetische Information 0,78 bei Marker DXS 1227 und 0,85 bei Marker DXS 15. Somit kann X-Kopplung in diesem Bereich nicht ausgeschlossen werden.

Die vorliegende Arbeit ist Teil einer systematischen Analyse des gesamten Genoms. Zunächst wurden Marker untersucht, die einen durchschnittlichen Abstand von 10 cM zueinander hatten. Dabei ergaben sich in autosomalen Regionen z.T. signifikant positive Befunde, z.B. auf Chromosom 3p12-p14 (nicht parametrischer LOD-Score 3,70), 8q24 (parametrischer LOD-Score 3,62) oder 10q25-q26 (nicht-parametrischer LOD-Score 3,12), die auch von anderen

Arbeitsgruppen bestätigt werden. Wenn sich in diesem Kollektiv ein Suszeptibilitätslocus auf dem X-Chromosom befände, so wäre er sehr wahrscheinlich durch die angewandten Methoden aufgedeckt worden, da das Kollektiv mit 75 Familien ausreichend aussagekräftig ist. Diese Größe reicht aus, um Gene zu finden, die einen großen bis mittleren Einfluss auf die Entstehung der bipolar affektiven Störungen haben, vorausgesetzt, es liegt begrenzte Heterogenität vor (Baron et al., 1994; Lander und Botstein, 1986; Martinez et al., 1990; Risch, 1990; Goldin, 1992). Um die genetische Heterogenität in unserem Kollektiv gering zu halten, wurden Familien mit ähnlicher ethnischer Herkunft gesammelt (66 der 75 Familien stammen aus Deutschland, 1 Familie aus Italien und 8 Familien aus Israel).

Im Gegensatz zu den älteren Ergebnissen (z.B. Mendlewicz et al., 1987; Baron et al., 1987) wurden die Daten dieser Studie auch mit nicht-parametrischen Kopplungsmethoden untersucht, die weitgehend unabhängig sind von der Annahme eines genetischen Modells. Zwar ist die Wahrscheinlichkeit, ein krankheitsverursachendes Gen zu finden, aufgrund der geringeren Information kleiner, jedoch besitzt die nicht-parametrische Analyse eine höhere Power. Gerade die hohe Anzahl kleiner Familien in diesem Sample macht die nicht-parametrische Analyse besonders aussagekräftig (Badner et al., 1998).

Für den Fall, dass es auf dem X-Chromosom ein oder mehrere Genvarianten mit relativ geringem Einfluss gibt, könnten diese mit Hilfe von Kopplungsuntersuchungen schwer zu finden sein. Dabei könnte es sich einerseits um häufige Krankheitsgene mit geringem relativen Risiko handeln, für deren Detektion dann ein sehr viel größeres Sample nötig wäre, um die für den Nachweis wichtige statistische Power zu erreichen (Risch und Merikangas, 1996).

Andererseits könnte es auf dem X-Chromosom ein bzw. mehrere in der Bevölkerung relativ seltene Gene mit hoher Penetranz geben. In diesem Fall ist deren Detektion bei Kopplungsuntersuchungen wiederum erschwert, da die Heterogenität innerhalb eines Samples wahrscheinlich groß ist, d.h. der Anteil der an diesem Locus gekoppelten Familien in der Population ist sehr gering. Dieses Problem haben Pekkarinen und Mitarbeiter möglicherweise durch die Untersuchung einer Isolatbevölkerung, also eines in der betreffenden Genvariante sehr homogenen Kollektivs, erfolgreich umgangen.

Es lässt sich also nicht ausschließen, dass es auf dem X-Chromosom prädisponierende Gene für die bipolar affektiven Störungen gibt. In beiden oben genannten Fällen wären Assoziationsstudien besser geeignet, um Gene mit geringerem Effekt zu detektieren.

### 6.3 Schlussbetrachtung

Inzwischen sind eine Reihe von systematischen Genomuntersuchungen bei bipolar affektiven Störungen abgeschlossen worden (Prathikanti und McMahon, 2001). In ihrer Aussagekraft sind sie den frühen Kopplungsuntersuchungen der 70-er und 80-er Jahre nicht nur durch die Kollektivgröße und die streng operationalisierte Erfassung der Patienten überlegen. Es kommen auch weiterentwickelte statistische Methoden zur Anwendung, die wesentlich besser für die Untersuchung genetisch komplexer Erbgänge geeignet sind als die ursprünglich für monogene Erkrankungen eingesetzten Kopplungsmethoden.

Im Gegensatz zu Befunden auf den Autosomen (siehe 3.3.3) wurde keiner der frühen X-chromosomalen Kopplungsbefunde bei bipolar affektiven Störungen unabhängig repliziert. Daher ist es relativ unwahrscheinlich, dass es tatsächlich Genorte für bipolar affektive Störungen, die für einen bedeutenden Teil der Krankheitsfälle in der Bevölkerung verantwortlich sind, auf dem X-Chromosom existieren. Zu diesem Ergebnis kommen letztlich auch die im Rahmen dieser Arbeit an einer größeren Zahl von Familien durchgeführten Untersuchungen.

Die frühen formalgenetischen Befunde, die stark auf X-chromosomale Vererbung schließen ließen, könnten ebenfalls fehlinterpretiert sein. So lässt sich die Überrepräsentation an weiblichen Betroffenen sowie die fehlende Vater-Sohn-Übertragung auch durch mitochondriale Vererbung oder Imprinting-Mechanismen erklären.

Allerdings lässt sich auch nicht ausschließen, dass es nicht doch Krankheitsgene mit geringem relativen Risiko oder populationsspezifische Risikogene auf dem X-Chromosom gibt. Um einen solchen populationsspezifischen Effekt könnte es sich evtl. bei dem Befund von Pekkarinen et al. (1995) handeln, der in der finnischen Isolatpopulation erhoben wurde. Diese Gene dürften aber für die allgemeine Bevölkerung in anderen europäischen Ländern keine bedeutende Rolle spielen. Eine Zusammenschau der zu diesem Zeitpunkt veröffentlichten Befunde (inklusive unserer eigenen Studie und ca. 20 mittlerweile durchgeführte Genom-Scans bei bipolaren Störungen) lässt darauf schließen, dass es zumindest kein X-chromosomales Dispositionsgen für bipolare Störungen gibt, welches für einen substantiellen Anteil der Erkrankungsfälle in verschiedenen Populationen verantwortlich ist.

## 7 Ausblick

Wie in der vorliegenden Arbeit dargestellt wurde, liegen auf dem X-Chromosom vermutlich keine bedeutsamen Krankheitsgene für die bipolar affektiven Störungen. Allerdings lässt sich die Existenz von Genen mit relativ kleinem Effekt nicht ausschließen. Um diese Gene nachweisen zu können, muss die statistische Aussagekraft der Studien erhöht werden.

Eine Möglichkeit besteht in Metaanalysen (z.B. Segurado et al., 2003), die die Genotyp-Ergebnisse einzelner Kopplungsstudien verschiedener Gruppen zusammenfassen und anschließend gemeinsam analysieren. Trotz des Problems der Heterogenität zwischen den Studien (Unterschiede in Familienstruktur, Herkunft, Definition des Phänotyps) kann der Mangel an Power in einzelnen Studien ausgeglichen werden.

Eine andere Alternative sind Assoziationsuntersuchungen, z.B. systematische Kopplungsungleichgewichts-Studien (LD-Studien, siehe 3.3.1), die gerade für die Detektion von Genen mit geringem Einfluss besser geeignet sind (Risch und Merikangas, 1996). Diese LD-Studien sind durch die Kompletsequenzierung des menschlichen Genoms durch das Humangenomprojekt, die Identifizierung zahlreicher SNPs (single nucleotide polymorphism) und neue technische Entwicklungen heute möglich. Für eine systematische LD-Studie über das X-Chromosom in einem großen familien-basierten oder Case-Control-Sample mit bipolar affektiven Störungen wäre es hilfreich, die LD-Struktur des X-Chromosoms in der untersuchten Bevölkerung zu kennen. So könnten gezielt die SNPs verwendet werden, die die in der Bevölkerung vorkommende Haplotypstruktur des Chromosoms am besten charakterisieren. Diese Information wird zukünftig durch das „HapMap“-Programm (Haplotype-Map) erhältlich sein. Diese Karte stellt die Verteilung der bisher analysierten Haplotypen-Blöcke dar. Durch die Analyse der Haplotypen-Blöcke wird die Analyse der SNPs in hoher Dichte überflüssig werden. So wird man zukünftig große Kollektive systematisch auch auf kleine Geneffekte hin untersuchen können.

Mittlerweile gibt es auch „whole-genome association“ Chips, die es erlauben, mehrere hunderttausend SNPs, die das gesamte Genom in hoher Dichte abdecken und unter Verwendung der HapMap-Information ausgewählt wurden, innerhalb kurzer Zeit in einer großen Zahl von Personen zu genotypisieren. Die Verwendung dieser Chips wird eine sehr viel genauere

Erfassung aller chromosomalen Bereiche und auch die Detektion von Genen mit geringerem Effekt zulassen als das bisher durch Kopplungsuntersuchungen möglich ist.

Nach der Identifikation von Krankheitsgenen bei psychiatrischen Erkrankungen werden funktionelle Untersuchungen klären müssen, wie und auf welchem Wege die gefundenen Genvarianten zu einer veränderten Proteinstruktur, Expression oder Funktion führen, und wie sie zur Entstehung der bipolar affektiven Störungen beitragen. Dies wird ein sehr viel besseres Verständnis der molekularen Prozesse ermöglichen, die an der Entstehung bipolar affektiver Störungen beteiligt sind. Dieses Wissen wird letztlich völlig neue Möglichkeiten hinsichtlich der medikamentösen Behandlung, Früherkennung und Prävention eröffnen.

## 8 Zusammenfassung

Die bipolar affektive Störung ist durch das phasische Auftreten von Verstimmungen depressiv-gehemmter oder manisch-erregter Art gekennzeichnet. Sie stellt mit einer Lebenszeitprävalenz von 0,5-1,5% eine ausgesprochen häufige Krankheit dar. Dass familiär-genetischen Faktoren bei der Entstehung bipolar affektiver Störungen eine starke Bedeutung zukommt, konnten Familien-, Zwillings- und Adoptionsstudien übereinstimmend zeigen. Hierbei muss von einer genetisch komplexen Erkrankung ausgegangen werden, d. h. die zu Grunde liegenden Krankheitsgene müssen an verschiedenen chromosomalen Loci vermutet werden und tragen mit variablem Gewicht sowie in unterschiedlicher Kombination zu der Erkrankungs-Prädisposition bei.

In der vorliegenden Arbeit wurden 20 hochpolymorphe STR-Marker (durchschnittlicher Markerabstand von 12,2cM) an einem Kollektiv von 75 bipolar affektiven Familien deutscher, israelischer und italienischer Herkunft typisiert. Die Untersuchung wurde als Teil eines Genome Scans durchgeführt, dessen Ziel die Identifikation von chromosomalen Regionen war, in denen Dispositionsgene, die der bipolar affektiven Störung zu Grunde liegen, vermutet werden können. Dabei wurden ein enges sowie ein weites Krankheitsmodell angewendet. Die parametrischen (LOD-Score) Analysen wurden zudem unter einem dominanten und einem rezessiven Modell gerechnet.

Verschiedene frühe Untersuchungen haben mit phänotypischen Markern zum Teil starke Hinweise auf die Existenz prädisponierender Gene auf dem X-Chromosom geliefert. Diese konnten jedoch in Untersuchungen mit genetischen Markern nicht konsistent bestätigt werden. Eine Ausnahme stellt hierbei die Studie von Pekkarinen et al. (1995) dar.

Auch die vorliegende Arbeit, die eine große Zahl von Familien untersuchte, erbringt keine Hinweise auf X-Kopplung der bipolar affektiven Störungen. Weder die parametrische noch die nicht-parametrische Analyse ergaben deutlich positive Scores. Als Teil eines Genome Scans, der zum Teil starke Hinweise auf Kopplung mit autosomalen Loci lieferte, besitzt diese Untersuchung die nötige Aussagekraft, um eventuell existierende Loci zu detektieren. Trotzdem

lässt sich die Anwesenheit von Genen, die einen geringen Beitrag zur Krankheitsentstehung leisten oder aber spezifisch für einzelne Populationen sind, nicht ausschließen.

Um diese Gene aufzudecken, sind in Zukunft systematische LD-Studien in großem Umfang nötig. Dafür sind durch die Weiterentwicklungen der jüngsten Zeit, z.B. die Komplettssequenzierung des menschlichen Genoms, das humane HapMap-Projekt und die Entwicklung von Chips für genom-weite Assoziationsuntersuchungen die Voraussetzungen gegeben.

Im Folgenden sind alle Publikationen aufgelistet, in die die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit Eingang gefunden haben:

1. Cichon S, Schumacher J, Muller DJ, Hurter M, Windemuth C, Strauch K, Hemmer S, Schulze TG, Schmidt-Wolf G, Albus M, Borrmann-Hassenbach M, Franzek E, Lanczik M, Fritze J, Kreiner R, Reuner U, Weigelt B, Minges J, Lichtermann D, Lerer B, Kanyas K, Baur MP, Wienker TF, Maier W, Rietschel M, Propping P, Nothen MM. A genome screen for genes predisposing to bipolar affective disorder detects a new susceptibility locus on 8q. *Hum Mol Genet* 2001; 10: 2933-2944.
2. Cichon S, Schmidt-Wolf G, Schumacher J, Muller DJ, Hurter M, Schulze TG, Albus M, Borrmann-Hassenbach M, Franzek E, Lanczik M, Fritze J, Kreiner R, Weigelt B, Minges J, Lichtermann D, Lerer B, Kanyas K, Strauch K, Windemuth C, Baur MP, Wienker TF, Maier W, Rietschel M, Propping P, Nothen MM. A possible susceptibility locus for bipolar affective disorder in chromosomal region 10q25--q26. *Mol Psychiatry* 2001; 6: 342-349.

## 9 Anhang

### 9.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Lokalisation der Marker auf dem X-Chromosom

Abbildung 2: 2-Punkt LOD-Scores unter dominantem Modell

Abbildung 3: 2-Punkt LOD-Scores unter rezessivem Modell

Abbildung 4: NPL-Scores

Tabelle 1: Abstufung der Lebenszeitriskiken für affektive Störungen

Tabelle 2: Ergebnisse der 2-Punkt LOD-Score Analyse

Tabelle 3: Peaks der NPL-Kurve

Tabelle 4: Kopplungsbefunde mit X-chromosomalen Markern bei bipolar affektiven Störungen

### 9.2 Kriterien einer affektiven Störung nach DSM IV

Die affektive Störung ist schwer genug, um eine deutliche Beeinträchtigung der beruflichen Leistungsfähigkeit oder der üblichen sozialen Aktivitäten oder Beziehungen zu verursachen oder eine Hospitalisierung zur Abwendung von Selbst- oder Fremdgefährdung erforderlich zu machen. Für alle Kriterien gilt, dass die Symptome nicht auf die direkte körperliche Wirkung einer Substanz (Droge oder Medikament) oder eines medizinischen Krankheitsfaktors (z.B. Hypothyreose) zurückgehen. Ebenso können die Symptome nicht den Kriterien einer gemischten Episode zugeordnet werden.

#### 9.2.1 Kriterien für eine Episode einer Major Depression

Mindestens fünf der folgenden Symptome bestehen während derselben Zwei-Wochen-Periode zu fast allen Zeiten des Tages und stellen eine Änderung gegenüber der vorher bestehenden Leistungsfähigkeit dar:

1. Depressive Verstimmung an fast allen Tagen, von Betroffenen selbst berichtet oder von anderen beobachtet. Bei Kindern oder Jugendlichen kann auch eine reizbare Verstimmung vorliegen.
2. Deutlich vermindertes Interesse oder Freude an allem oder fast allen Aktivitäten, an fast allen Tagen.

3. Deutlicher Gewichtsverlust ohne Diät; oder Gewichtszunahme (mehr als 5% des Körpergewichts pro Monat); oder verminderter oder gesteigerter Appetit.
4. Schlaflosigkeit oder vermehrter Schlaf an fast allen Tagen.
5. Psychomotorische Unruhe oder Verlangsamung an fast allen Tagen (durch andere beobachtet).
6. Müdigkeit oder Energieverlust an fast allen Tagen.
7. Gefühle von Wertlosigkeit oder übermäßige oder unangemessene Schuldgefühle (die auch wahnhaftes Ausmaß annehmen können) an fast allen Tagen.
8. Verminderte Fähigkeit zu denken oder sich zu konzentrieren oder verringerte Entscheidungsfähigkeit.
9. Wiederkehrende Gedanken an den Tod (nicht nur Angst vor dem Sterben), wiederkehrende Suizidvorstellungen ohne genauen Plan, tatsächlicher Suizidversuch oder genaue Planung eines Suizids.

### **9.2.2 Kriterien einer manischen Episode**

Die manische Episode entspricht einer mindestens einwöchigen (bei Hospitalisierung auch kürzeren), abgegrenzten Periode mit abnorm und anhaltend gehobener, expansiver oder reizbarer Stimmung.

Während der Periode der Stimmungsveränderung bestehen mindestens drei (bei nur reizbarer Verstimmung mindestens vier) der folgenden Symptome in einem deutlichen Ausmaß:

1. Übersteigertes Selbstwertgefühl oder Größenideen.
2. Vermindertes Schlafbedürfnis.
3. Vermehrte Gesprächigkeit oder Rededrang.
4. Ideenflucht oder subjektives Gefühl des Gedankenrasens.
5. Erhöhte Ablenkbarkeit (Aufmerksamkeit wird zu leicht auf irrelevante äußere Reize gelenkt).
6. Gesteigerte Betriebsamkeit (im sozialen, beruflichen, schulischen oder sexuellen Bereich) oder psychomotorische Unruhe.
7. Übermäßige Beschäftigung mit angenehmen Aktivitäten, die mit hoher Wahrscheinlichkeit unangenehme Konsequenzen nach sich ziehen.

Im Gegensatz zur manischen Episode ist die hypomane Episode nicht schwer genug, um deutliche soziale oder berufliche Funktionsbeeinträchtigungen zu verursachen oder eine Hospitalisierung erforderlich werden zu lassen. Es bestehen keine psychotischen Symptome.

## 10            Literaturverzeichnis

1. Akiskal HS, Bourgeois ML, Angst J, Post R, Moller H, Hirschfeld R. Re-evaluating the prevalence of and diagnostic composition within the broad clinical spectrum of bipolar disorders. *J Affect Disord.* 2000; 59: 5-30
2. Allen MG, Cohen S, Pollin W, Greenspan SI. Affective illness in veteran twins: a diagnostic review. *Am J Psychiatry* 1974; 131: 1234-1230
3. American Psychiatric Association, Committee on Nomenclature and Statistics. *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders*, 3<sup>rd</sup> edn revised 1987; American Psychiatric Press, Washington DC
4. Angst J. Zur Ätiologie und Nosologie endogener depressiver Psychosen. Monograph Gesamtgeb Neurol Psychiat 1966, Heft 112. Springer, Berlin Heidelberg New York
5. Badner JA, Gershon ES, Goldin LR. Optimal ascertainment strategies to detect linkage to common disease alleles. *Am J Hum Genet* 1998; 63: 880-888
6. Badner JA und Gershon ES. Meta-analysis of whole-genome linkage scans of bipolar disorder and schizophrenia. *Mol Psych* 2002; 7: 405-411
7. Baron M. Linkage between an X-chromosome marker (deutan color blindness) and bipolar affective illness. Occurrence in the family of a lithium carbonate-responsive schizo-affective proband. *Arch Gen Psychiatry* 1977; 34: 721-725
8. Baron M, Risch N, Hamburger R, Mandel B, Kushner St, Newman M, Drumer D, Belmaker RH. Genetic linkage between X-chromosome markers and bipolar affective illness. *Nature* 1987; 325: 289-292
9. Baron, M. X-linkage and manic-depressive illness: a reassessment. *Soc Biol* 1991; 38: 179-188
10. Baron M. Manic-depression linkage to factor IX reconsidered. *Ann Genet* 1993; 36: 187-188
11. Baron M. Is There a Gene for Manic-Depressive Illness on the Long Arm of the X Chromosome?, 1994
12. Baron M, Endicott J, Lerer B, Loth JE, Alexander JR, Simon R, Sharpe L, Gibbon M, Hasin D, Lilliston B, et al. A pedigree series for mapping disease genes in bipolar affective disorder: sampling, assessment, and analytic considerations. *Psychiatr Genet* 1994; 4: 43-55
13. Baron M, Straub RE. Bipolar disorder and linkage to Xq28. *Nat Genet* 1994; 7: 461-462
14. Baron M. Genetic linkage and bipolar affective disorder: progress and pitfalls. *Mol Psychiatry* 1997; 2: 200-210
15. Berrettini WH, Goldin LR, Gelernter J, Gejman PV, Gershon ES, Detera-Wadleigh S. X-chromosome markers and manic-depressive illness: rejection of close linkage and of substantial heterogeneity. *Arch Gen Psychiat* 1990; 47: 366-373
16. Berrettini WH, Ferraro TN, Goldin LR, Weeks DE, Detera-Wadleigh S, Nurnberger JI, Jr., Gershon ES. Chromosome 18 DNA markers and manic-depressive illness: evidence for a susceptibility gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994; 91: 5918-5921

17. Berrettini W. Diagnostic and genetic issues of depression and bipolar illness. *Pharmacotherapy* 1995; 15: 69S-75S
18. Berrettini WH. Progress and pitfalls: bipolar molecular linkage studies. *J Affect Disord* 1998; 50: 287-297.
19. Berrettini WH. The human genome: susceptibility loci. *Am J Psychiatry* 2001; 158: 865
20. Bertelsen A, Harvald B, Hauge M. A Danish twin study of manic depressive disorders. *British Journal of Psychiatry* 1977; 130: 330-351
21. Blacker D, Tsuang MT. Unipolar relatives in bipolar pedigrees: are they bipolar? *Psychiatr Genet* 1993; 3: 5-16
22. Blackwood DH, He L, Morris SW, McLean A, Whitton C, Thomson M, Walker MT, Woodburn K, Sharp CM, Wright AF, Shibasaki Y, St Clair DM, Porteous DJ, Muir WJ. A locus for bipolar affective disorder on chromosome 4p. *Nat Genet* 1996; 12: 427-430
23. Bocchetta A, Severino G, Bernardi F, DelZompo M. *Italian J Psychiatr behav Sci* 1993; 3: 107-110
24. Bocchetta A, Piccardi MP, Martinelli V, Quesada G, Del Zompo M. Maternal inheritance of manic depression in hemizygotes for the G6PD- Mediterranean mutation. Indirect evidence for Xq28 transmission in Sardinia. *Psychiatr Genet* 1999; 9: 63-68
25. Cardno AG, Marshall EJ, Coid B, Macdonald AM, Ribchester TR, Davies NJ, Venturi P, Jones LA, Lewis SW, Sham PC, Gottesman II, Farmer AE, McGuffin P, Reveley AM, Murray RM. Heritability estimates for psychotic disorders: the Maudsley twin psychosis series. *Arch Gen Psychiatry* 1999; 56: 162-168
26. Cichon S, Nothen MM, Stober G, Schroers R, Albus M, Maier W, Rietschel M, Korner J, Weigelt B, Franzek E, Wildenauer D, Fimmers R, Propping P. Systematic screening for mutations in the 5'-regulatory region of the human dopamine D1 receptor (DRD1) gene in patients with schizophrenia and bipolar affective disorder. *Am J Med Genet* 1996; 67: 424-428
27. Cichon S, Schumacher J, Muller DJ, Hurter M, Windemuth C, Strauch K, Hemmer S, Schulze TG, Schmidt-Wolf G, Albus M, Borrmann-Hassenbach M, Franzek E, Lanczik M, Fritze J, Kreiner R, Reuner U, Weigelt B, Minges J, Lichtermann D, Lerer B, Kanyas K, Baur MP, Wienker TF, Maier W, Rietschel M, Propping P, Nothen MM. A genome screen for genes predisposing to bipolar affective disorder detects a new susceptibility locus on 8q. *Hum Mol Genet* 2001 a; 10: 2933-2944
28. Cichon S, Schmidt-Wolf G, Schumacher J, Muller DJ, Hurter M, Schulze TG, Albus M, Borrmann-Hassenbach M, Franzek E, Lanczik M, Fritze J, Kreiner R, Weigelt B, Minges J, Lichtermann D, Lerer B, Kanyas K, Strauch K, Windemuth C, Baur MP, Wienker TF, Maier W, Rietschel M, Propping P, Nothen MM. A possible susceptibility locus for bipolar affective disorder in chromosomal region 10q25--q26. *Mol Psychiatry* 2001 b; 6: 342-349
29. Clerget-Darpoux F, Bonaiti-Pellié C, Hochez J. Effects of misspecifying genetic parameters in lod score analysis. *Biometrics* 1986; 42: 393-399
30. Craddock N, Owen M. Christmas disease and major affective disorder. *Br J Psychiatry* 1992; 160: 715
31. Craddock N, Jones I. Molecular genetics of bipolar disorder. *Br J Psychiatry* 2001; 178: S128-33

32. Crow TJ. Sex chromosomes and psychosis. The case for a pseudoautosomal locus. *Br J Psychiatry* 1988; 153: 675-683
33. Del Zompo M, Bocchetta A, Goldin LR, Corsini GU. Linkage between X-chromosome markers and manic-depressive illness. *Acta Psychiatr Scand* 1984; 70: 282-287
34. Del Zompo M, Bocchetta A, Ruiu S, et al. Association and linkage studies of affective disorders. Abstracts of the 5<sup>th</sup> World Congress of Biological Psychiatry Florence. *Biol Psychiatry* 1991. 29: 115
35. Detera-Wadleigh SD. Chromosomes 12 and 16 workshop. *Am J Med Genet* 1999; 88: 255-259
36. Dib C, Faure S, Fizames C, Samson D, Drouot N, Vignal A, Millasseau P, Marc S, Hazan J, Seboun E, Lathrop M, Gyapay G, Morissette J, Weissenbach J. A comprehensive genetic map of the human genome based on 5,264 microsatellites. *Nature* 1996; 380: 152-154
37. Durner M, Vieland VJ, Greenberg DA. Further evidence for the increased power of LOD scores compared with nonparametric methods. *Am J Hum Genet* 1999; 64: 281-289
38. Endicott J, Spitzer RL. A diagnostic interview: the schedule for affective disorders and schizophrenia. *Arch Gen Psychiatry* 1978; 35: 837-844
39. Ewald H, Degn B, Mors O, Kruse TA. Support for the possible locus on chromosome 4p16 for bipolar affective disorder. *Mol Psychiatry* 1998 a; 3: 442-448
40. Ewald H, Degn B, Mors O, Kruse TA. Significant linkage between bipolar affective disorder and chromosome 12q24. *Psychiatr Genet* 1998 b; 8: 131-40
41. Friddle C, Koskela R, Ranade K, Hebert J, Cargill M, Clark CD, McInnis M, Simpson S, McMahon F, Stine OC, Meyers D, Xu J, MacKinnon D, Swift-Scanlan T, Jamison K, Folstein S, Daly M, Kruglyak L, Marr T, DePaulo JR, Botstein D. Full-genome scan for linkage in 50 families segregating the bipolar affective disease phenotype. *Am J Hum Genet* 2000; 66: 205-215
42. Gabriel SB, Schaffner SF, Nguyen H, Moore JM, Roy J, Blumenstiel B, Higgins J, DeFelice M, Lochner A, Faggart M, Liu-Cordero SN, Rotimi C, Adeyemo A, Cooper R, Ward R, Lander ES, Daly MJ, Altshuler D. The structure of haplotype blocks in the human genome. *Science*. 2002; 296: 2225-2229
43. Gejman PV, Detera-Wadleigh S, Martinez MM, Berrettini WH, Goldin LR, Gelernter J, Hsieh WT, Gershon ES. Manic depressive illness not linked to factor IX region in an independent series of pedigrees. *Genomics* 1990; 8: 648-655
44. Gershon ES, Bunney WE, Jr., Leckman JF, Eerdewegh M, DeBauche BA. The inheritance of affective disorders: a review of data and of hypotheses. *Behav Genet* 1976; 6: 227-261
45. Gershon ES. Genetic studies of manic-depressive illness. *Pharmakopsychiatr Neuropsychopharmakol* 1980; 13: 55-61
46. Gershon ES. Recent developments in genetics of manic-depressive illness. *J Clin Psychiatry* 1989; 50 Suppl: 4-7; discussion 45-47
47. Gershon ES, Badner JA, Detera-Wadleigh SD, Ferraro TN, Berrettini WH. Maternal inheritance and chromosome 18 allele sharing in unilineal bipolar illness pedigrees. *Am J Med Genet* 1996; 67: 202-207

48. Gershon ES, Badner JA, Goldin LR, Sanders AR, Cravchik A, Detera-Wadleigh SD. Closing in on genes for manic-depressive illness and schizophrenia. *Neuropsychopharmacology* 1998; 18: 233-242
49. Gill M, Castle D, Duggan C. Cosegregation of Christmas disease and major affective disorder in a pedigree. *Br J Psychiatry* 1992; 160: 112-114
50. Ginns EI, St Jean P, Philibert RA, Galdzicka M, Damschroder-Williams P, Thiel B, Long RT, Ingraham LJ, Dalwalidi H, Murray MA, Ehlert M, Paul S, Remortel BG, Patel AP, Anderson MC, Shaio C, Lau E, Dymarskaia I, Martin BM, Stubblefield B, Falls KM, Carulli JP, Keith TP, Fann CS, Paul SM, et al. A genome-wide search for chromosomal loci linked to mental health wellness in relatives at high risk for bipolar affective disorder among the Old Order Amish. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95: 15531-15536
51. Goldin LR, Gershon ES, Targum SD, Sparkes RS, McGinniss M. Segregation and linkage analyses in families of patients with bipolar, unipolar, and schizoaffective mood disorders. *Am J Hum Genet* 1983; 35: 274-287
52. Goldin LR, Gershon ES, Berrettini WH, Stine OC, DePaulo R, McMahon F, Meyers D, Nothen M, Propping P, Cichon S, Fimmers R, Baur M, Albus M, Franzek E, Kreiner R, Maier W, Rietschel M, Baron M, Knowles J, Gilliam C, Endicott J, Gurling H, Curtis D, Smyth C, Kelsoe J. Description of the Genetic Analysis Workshop 10 bipolar disorder linkage data sets. *Genet Epidemiol* 1997; 14: 563-568
53. Grigoriou-Serbanescu M, Martinez M, Nöthen MM, Grimber M, Sima D, Propping P, Marinescu E, Hrestic M. Different Familial Transmission Patterns in Bipolar I Disorder with Onset Before and After Age 25. *Am J Med Genet* 2001; 105: 765-773
54. Guze SB, Robins E. Suicide and primary affective disorders. *Br J Psychiatry* 1970; 117: 111-129
55. Gyapay G, Morissette J, Vignal A, Dib C, Fizames C, Millasseau P, Marc S, Bernardi G, Lathrop M, Weissenbach J. The 1993-94 Genethon human genetic linkage map. *Nat Genet* 1994; 7: 246-339
56. Hebebrand J. A critical appraisal of X-linked bipolar illness. Evidence for the assumed mode of inheritance is lacking. *Br J Psychiatry* 1992; 160: 7-11
57. Hebebrand J, Hennighausen K. A critical analysis of data presented in eight studies favouring X- linkage of bipolar illness with special emphasis on formal genetic aspects. *Hum Genet* 1992; 90: 289-293
58. Huber G. *Psychiatrie. Systematischer Lehrtext für Studenten und Ärzte. Zweite, überarbeitete Auflage.* F. K. Stuttgart: Schattauer Verlag, 1976
59. Hugot JP, Chamaillard M, Zouali H, Lesage S, Cezard JP, Belaiche J, Almer S, Tysk C, O'Morain CA, Gassull M, Binder V, Finkel Y, Cortot A, Modigliani R, Laurent-Puig P, Gower-Rousseau C, Macry J, Colombel JF, Sahbatou M, Thomas G. Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* 2001; 411: 599-603
60. Jeffries FM, Reiss AL, Brown WT, Meyers DA, Glicksman AC, Bandyopadhyay S. Bipolar spectrum disorder and fragile X syndrome: a family study. *Biol Psychiatry* 1993; 33: 213-216
61. Kalsi G, Smyth C, Brynjolfsson J, Sherrington RS, O'Neill J, Curtis D, Rifkin L, Murphy P, Petursson H, Gurling HM. Linkage analysis of manic depression (bipolar affective disorder) in Icelandic and British kindreds using markers on the short arm of chromosome 18. *Hum Hered* 1997; 47: 268-278

62. Kelsoe, J. R., M. A. Spence, et al. A genome survey indicates a possible susceptibility locus for bipolar disorder on chromosome 22. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; 98(2): 585-590
63. Kendler KS, Gruenberg AM, Tsuang MT. A DSM-III family study of the nonschizophrenic psychotic disorders. *Am J Psychiatry* 1986; 143: 1098-1105
64. Khoury MJ, Beaty TH, Cohen BH. *Fundamentals of genetic epidemiology*. Oxford University Press 1993, New York Oxford
65. Kidd KK, Egeland JA, Molthan L, Pauls DL, Kruger SD, Messner KH. Amish study, IV: Genetic linkage study of pedigrees of bipolar probands. *Am J Psychiatry* 1984; 141: 1042-1048
66. Knowles JA, Rao PA, Cox-Matise T, Loth JE, de Jesus GM, Levine L, Das K, Penchaszadeh GK, Alexander JR, Lerer B, Endicott J, Ott J, Gilliam TC, Baron M. No evidence for significant linkage between bipolar affective disorder and chromosome 18 pericentromeric markers in a large series of multiplex extended pedigrees. *Am J Hum Genet* 1998; 62: 916-924
67. Kringlen E. *Heredity and environment in the functional psychoses*. London: Heinemann, 1967
68. Kruglyak L, Daly MF, Reeve-Daly MP, Lander E Parametric and nonparametric linkage analysis: a unified mutipoint approach. *Am J Hum Genet* 1996; 58: 1347-1363
69. Kwok JB, Adams LJ, Salmon JA, Donald JA, Mitchell PB, Schofield PR. Nonparametric simulation-based statistical analyses for bipolar affective disorder locus on chromosome 21q22.3. *Am J Med Genet* 1999; 88: 99-102
70. Lander ES und Schork NJ. Genetic dissection of complex traits. *Science* 1994; 265: 2037-2048
71. Lander E, Kruglyak L Genetic dissection of complex traits: guidelines for interpreting and reporting linkage results. *Nature Genet* 1995; 11: 241-247
72. Lathrop GM, Lalouel JM, Julier C, Ott J Strategies for multilocus linkage analysis in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1984; 81: 3443-3446
73. Leckman JF, Gershon ES, Mc Ginniss MH, Targum SD, Dibble ED. New data do not suggest linkage between the Xg blood group and bipolar illness. *Arch Gen Psychiatry* 1979; 36: 1435-1442
74. Leonhard K, Korff I, Schulz H Die Temperamente in den Familien der monopolaren und bipolaren phasischen Psychosen. *Psychiat Neurol Med Psychol* 1962; 143: 416-434
75. Lucotte G, Landoulsi A, Berriche S, David F, Babron MC. Manic depressive illness is linked to factor IX in a French pedigree. *Ann Genet* 1992; 35: 93-95
76. Lyon MF. X-chromosome inactivation and development patterns in mammals. *Biological Reviews* 1972; 47: 1-35
77. McInnis MG, McMahon FJ, Chase GA, Simpson SG, Ross CA, DePaulo JR Jr. Anticipation in bipolar affective disorder. *Am J Hum Genet* 1993; 53: 385-390
78. McInnes MG, Escamilla MA, et al. A complete genome screen for genes predisposing to severe bipolar disorder in two Costa Rican pedigrees. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996; 93: 13060-13065

79. McMahon FJ, Stine OC, Meyers DA, Simpson SG, DePaulo JR. Patterns of maternal transmission in bipolar affective disorder. *Am J Hum Genet* 1995; 56: 1277-1286
80. McMahon FJ, Stine OC, Meyers DA, Simpson SG, DePaulo JR. Patterns of maternal transmission in bipolar affective disorder. *Am J Hum Genet* 1995; 56: 1277-1286
81. McMahon FJ, Hopkins PJ, Xu J, McInnis MG, Shaw S, Cardon L, Simpson SG, MacKinnon DF, Stine OC, Sherrington R, Meyers DA, DePaulo JR. Linkage of bipolar affective disorder to chromosome 18 markers in a new pedigree series. *Am J Hum Genet* 1997; 61: 1397-1404
82. McQueen MB, Devlin B, Faraone SV, Nimgaonkar VL, Sklar P, Smoller JW, Abou Jamra R, Albus M, Bacanu SA, Baron M, Barrett TB, Berrettini W, Blacker D, Byerley W, Cichon S, Coryell W, Craddock N, Daly MJ, DePaulo JR, Edenberg JH, Foroud T, Gill M, Gilliam TC, Hamshere M, Jones I, Jones L, Juo SH, Kelsoe JR, Lambert D, Lange C, Lerer B, Liu J, Maier W, MacKinnon JD, McInnis MG, McMahon FJ, Murphy DL, Nöthen MM, Nurnberger Jr. JL, Pato CN, Pato MT, Potash JB, Propping P, Pulver AE, Rice JP, Rietschel M, Scheftner W, Schumacher J, Segurado R, Van Stehen K, Xie W, Zandi PP, Laird NM. Combined Analysis from Eleven Linkage Studies of Bipolar Disorder Provides Strong Evidence of Susceptibility Loci on Chromosomes 6q and 8q. *Am J Hum Genet* 2005; 77
83. Mendlewicz J, Fleiss JL, Fieve RR. Evidence for X-linkage in the transmission of manic-depressive illness. *Jama* 1972; 222: 1624-1627
84. Mendlewicz J, Rainer JD. X-linkage in manic-depressive illness. *Br Med J*. 1973; 3: 290
85. Mendlewicz J, Rainer JD. Morbidity risk and genetic transmission in manic-depressive illness. *Am J Hum Genet* 1974; 26: 692-701
86. Mendlewicz J, Fleiss JL, Fieve RR. Linkage studies in affective disorders: the Xg blood group and manic-depressive illness. *Proc Annu Meet Am Psychopathol Assoc*. 1975; 63: 220-232
87. Mendlewicz J, Linkowski P, Guroff JJ, Van Praag HM. Color blindness linkage to bipolar manic-depressive illness. New evidence. *Arch Gen Psychiatry* 1979; 36: 1442-1447
88. Mendlewicz J, Linkowski P, Wilmotte J. Linkage between glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency and manic-depressive psychosis. *Br J Psychiatry* 1980; 137: 337-342
89. Mendlewicz J, Sandkuil LA, De Bruyn A, Van Broeckhoven C. X-linkage in bipolar illness. *Biol Psychiatry* 1991; 29: 730-731
90. Mendlewicz J. New molecular genetic studies in the affective disorders. *Pharmacopsychiatry* 1992; 25: 29-32
91. Mendlewicz J, Sevy S, Mendelbaum K. Minireview: Molecular genetics in affective illness. *Life Sci* 1993; 52: 231-242
92. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* 1988; 16: 1215
93. Morissette J, Villeneuve A, Bordeleau L, Rochette D, Laberge C, Gagne B, Laprise C, Bouchard G, Plante M, Gobeil L, Shink E, Weissenbach J, Barden N. Genome-wide search for linkage of bipolar affective disorders in

a very large pedigree derived from a homogeneous population in quebec points to a locus of major effect on chromosome 12q23-q24. *Am J Med Genet* 1999; 88: 567-587

94. Nothen MM, Cichon S, Rohleder H, Hemmer S, Franzek E, Fritze J, Albus M, Borrmann-Hassenbach M, Kreiner R, Weigelt B, Minges J, Lichtermann D, Maier W, Craddock N, Fimmers R, Holler T, Baur MP, Rietschel M, Propping P. Evaluation of linkage of bipolar affective disorder to chromosome 18 in a sample of 57 German families. *Mol Psychiatry* 1999; 4: 76-84
95. Nurnberger J, Jr., Guroff JJ, Hamovit J, Berrettini W, Gershon E. A family study of rapid-cycling bipolar illness. *J Affect Disord* 1988; 15: 87-91
96. Ogura Y, Bonen DK, Inohara N, Nicolae DL, Chen FF, Ramos R, Britton H, Moran T, Karaliuskas R, Duerr RH, Achkar JP, Brant SR, Bayless TM, Kirschner BS, Hanauer SB, Nunez G, Cho JH. A frameshift mutation in NOD2 associated with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* 2001; 411: 603-606
97. Owen MJ, Cardno AG, O'Donovan MC. Psychiatric genetics: back to the future. *Mol Psychiatry* 200; 5: 22-31
98. Paterson AD. X-chromosome workshop. *Psychiatr Genet* 1998; 8: 121-126
99. Paterson AD. Sixth World Congress of Psychiatric Genetics X Chromosome Workshop. *Am J Med Genet* 1999; 88: 279-286
100. Pekkarinen P, Terwilliger J, Bredbacka PE, Lonnqvist J, Peltonen L. Evidence of a predisposing locus to bipolar disorder on Xq24-q27.1 in an extended Finnish pedigree. *Genome Res* 1995; 5: 105-115
101. Penrose LS. The detection of autosomal linkage in data wich consist of pairs of brothers and sisters of unspecified parentage. *Ann Eugen* 1935; 6: 133-138
102. Prathikanti S, McMahon FJ. Genome scans for susceptibility genes in bipolar affective disorder. *Ann Med* 2001; 33: 257-262
103. Propping P. *Psychiatrische Genetik. Befunde und Konzepte*. Heidelberg: Springer Verlag, 1989
104. Radhakrishna U, Senol S, Herken H, Gucuyener K, Gehrig C, Blouin J, Akarsu NA, Antonarakis SE. An apparently dominant bipolar affective disorder (BPAD) locus on chromosome 20p11.2-q11.2 in a large Turkish pedigree. *Eur J Hum Genet* 2001; 9: 39-44
105. Risch N, Baron M, Mendlewicz J. Assessing the role of X-linked inheritance in bipolar-related major affective disorder. *J Psychiatr Res* 1986; 20: 275-288
106. Risch N, Merikangas K. The future of genetic studies of complex human diseases. *Science* 1996; 273: 1516-1517
107. Rosanoff AJ, Handy LM, Plesset IR. The etiology of manic-depressive syndromes with special reference to their occurrence in twins. *Am J Psychiatry* 1935; 91: 725-762
108. Saito T, Parsia S, Papolos DF, Lachman HM. Analysis of the pseudoautosomal X-linked gene SYBL1 in bipolar affective disorder: description of a new candidate allele for psychiatric disorders. *Am J Med Genet* 2000; 96: 317-323
109. Ricardo Segurado R, Detera-Wadleigh SD, Levinson DF, Lewis CM, Gill M, Nurnberger JI, Craddock N, DePaulo JR, Baron M, Gershon ES, Ekholm J, Cichon S, Turecki G, Claes S, Kelsoe JR, Schofield PR,

- Badenhop RF, Morissette J, Coon H, Blackwood D, McInnes LA, Foroud T, Edenberg HJ, Reich T, Rice JP, Goate A, McInnis MG, McMahon FJ, Badner JA, Goldin LR, Bennett P, Willour VL, Zandi PP, Liu J, Gilliam C, Joo SH, Berrettini WH, Yoshikawa T, Peltonen L, Lönnqvist J, Nöthen MM, Schumacher J, Windemuth C, Rietschel M, Propping P, Maier W, Alda M, Grof P, Rouleau GA, Del-Favero J, Van Broeckhoven C, Mendlewicz J, Adolfsson R, Spence MA, Luebbert H, Adams LJ, Donald LA, Mitchell PB, Barden N, Shink E, Byerley W, Muir W, Visscher PM, Macgregor S, Gurling H, Kalsi G, McQuillin A, Escamilla MA, Reus VI, Leon P, Freimer NB, Ewald H, Kruse TA, Mors O, Radhakrishna U, Blouin JL, Antonarakis SE, Akarsu N. Genome Scan Meta-Analysis of Schizophrenia and Bipolar Disorder, Part III: Bipolar Disorder. *Am J Hum Genet* 2003; 73: 49-62
110. Simpson SG, Folstein SE, Meyers DA, McMahon FJ, Brusco DM, DePaulo JR, Jr. Bipolar II: the most common bipolar phenotype? *Am J Psychiatry* 1993; 150: 901-903
111. Smith AL, Weissman MM. Epidemiology. In: Paykel ES. *Handbook of affective disorders*. Edinburgh: Churchill Livingstone 1992: 111-129
112. Smyth C, Kalsi G, Brynjolfsson J, O'Neill J, Curtis D, Rifkin L, Moloney E, Murphy P, Petursson H, Gurling H. Test of Xq26.3-28 linkage in bipolar and unipolar affective disorder in families selected for absence of male to male transmission. *Br J Psychiatry* 1997; 171: 578-581
113. Spence MA, Flodman PL, Sadovnick AD, Bailey-Wilson JE, Ameli H, Remick RA. Bipolar disorder: evidence for a major locus. *Am J Med Genet* 1995; 60: 370-376
114. Spitzer RL, Endicott J, Robins E. *Research Diagnostic Criteria for a selective group of functional disorders*. New York: Biometrics Research 1975
115. Stine OC, Xu J, Koskela R, McMahon FJ, Gschwend M, Friddle C, Clark CD, McInnis MG, Simpson SG, Breschel TS, et al. Evidence for linkage of bipolar disorder to chromosome 18 with a parent-of-origin effect. *Am J Hum Genet* 1995; 57: 1384-1394
116. Stine OC, McMahon FJ, Chen L, Xu J, Meyers DA, MacKinnon DF, Simpson S, McInnis MG, Rice JP, Goate A, Reich T, Edenberg HJ, Foroud T, Nurnberger JL, Jr., Detera-Wadleigh SD, Goldin LR, Guroff J, Gershon ES, Blehar MC, DePaulo JR. Initial genome screen for bipolar disorder in the NIMH genetics initiative pedigrees: chromosomes 2, 11, 13, 14, and X. *Am J Med Genet* 1997; 74: 263-269
117. Straub RE, Lehner T, Luo Y, Loth JE, Shao W, Sharpe L, Alexander JR, Das K, Simon R, Fieve RR, et al. A possible vulnerability locus for bipolar affective disorder on chromosome 21q22.3. *Nat Genet* 1994; 8: 291-296
118. Suarez BK, Hampe CL, Wright AF. Linkage analysis in manic-depressive illness. *Lancet* 1987; 2: 345-346
119. Thapar A, McGuffin P. Genetic influences on life events in childhood. *Psychol Med* 1996; 26: 813-820
120. Torgersen S. Genetic factors in moderately severe and mild affective disorders. *Arch Gen Psychiatry* 1986; 43: 222-226
121. Vallada HP, Vasques L, Curtis D, Zatz M, Kirov G, Lauriano V, Gentil V, Murray RM, McGuffin P, Owen M, Gill M, Craddock N, Collier DA. Linkage analysis between bipolar affective disorder and markers on chromosome X. *Psychiatr Genet* 1998; 8: 183-186

122. Vassart G, Simon P. Manic-depression locus on X chromosome. *Lancet* 1991; 338: 821
123. Vieland V, Greenberg DA, Hodge SE, Ott J. Linkage analysis of two-locus diseases under single-locus and two-locus analysis models. *Cytogenet Cell Genet* 1992; 59: 145-146
124. Vogel F, Motulsky, AG. Genetic polymorphisms. In: *Human Genetics*. Berlin: Springer-Verlag, 1986
125. Weeks DE and Lange K. The affected-pedigree-member method of linkage analysis. *Am J Hum Genet* 1988; 42: 315-326
126. Weissman MM, Leaf PJ, Tischler GL, Blazer DG, Karno M, Bruce ML, Florio LP. Affective disorders in five United States Communities. *Psychol Med* 1988; 18: 141-153
127. Wender PH, Kety SS, Rosenthal D. Psychiatric disorders in the biological and adoptive individuals with affective disorders. *Archives of General Psychiatry* 1986; 43: 923-929
128. Winokur G, Clayton PJ, Reich T. *Manic-depressive illness*. Mosby, St. Louis, 1969
129. Winokur G und Tanna VL. Possible role of X-linked dominant factor in manic depressive disease. *Diseases of the Nervous system* 1969; 30, 89-93

## 11 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Peter Propping, der mir die Möglichkeit gegeben hat, als Kollegiatin des Graduiertenkollegs „Pathogenese von Krankheiten des zentralen Nervensystems“ die vorliegende Arbeit am Institut für Humangenetik durchzuführen. Ihm danke ich für die kontinuierliche Unterstützung meiner Dissertation und für die Möglichkeit, bei der Koordination des Graduiertenkollegs mitarbeiten zu können.

Ebenso möchte ich mich bei PD Dr. Sven Cichon und bei Prof. Dr. Markus Nöthen bedanken, die am Gelingen vorliegender Arbeit wesentlichen Anteil hatten.

Mein Dank gilt auch Dr. Johannes Schumacher, Dr. Daniel Müller und Susanne Hemmer, die an der praktischen Durchführung des Genom-Scans maßgeblich beteiligt waren.

Allen Mitarbeitern des Instituts für Humangenetik danke ich für ihre Hilfsbereitschaft. Ein besonders herzlicher Dank gilt den Mitarbeitern unserer Arbeitsgruppe, unter ihnen Dr. Regina Betz, Dipl. Biol. Uwe Heyn, Dr. Axel Hillmer, Dr. Yun Hua, Dr. Guido Kukuk, Helge Neidt und Lucie Seeliger, die durch ihre Hilfsbereitschaft und ihren Humor zu einem außergewöhnlich guten Arbeitsklima beigetragen haben.

Allen an vorliegender Arbeit beteiligten Mitarbeitern des Instituts für Medizinische Biometrie, Informatik und Epidemiologie des Universitätsklinikums Bonn - insbesondere Herrn Prof. Dr. T. F. Wienker, Frau Dr. C. Windemuth-Kieselbach und Herrn Prof. Dr. K. Strauch - danke ich für die statistischen Berechnungen.

Frau Prof. Dr. M. Rietschel möchte ich stellvertretend für die aufwendige Rekrutierung des der vorliegenden Untersuchung zu Grunde liegenden Familienkollektivs danken, die an den Psychiatrischen Kliniken der Universitäten Bonn, Dresden, München-Haar, Mainz, Würzburg sowie der Hadassah Universität durchgeführt wurde.

Mein besonderer Dank richtet sich an meine Familie, die mich während meines Studiums und meiner Doktorarbeit uneingeschränkt unterstützt hat.