

**Genetische Variabilität im *dystrobrevin-binding protein 1* (DTNBP1)-Gen:
Bedeutung für den Entstehungsprozess schizophrener Störungen**

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

Andreas Cyrill Joachim Otte
aus Stadtlohn

2008

Angefertigt mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: Prof. Dr. med. P. Propping
2. Gutachter: Prof. Dr. med. W. Maier

Tag der Mündlichen Prüfung: 11.02.2008

Aus dem Institut für Humangenetik der 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 elektronisch publiziert.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	6
1.1	Schizophrene Psychosen	7
1.1.1	Krankheitsbild	7
1.1.2	Epidemiologie, Verlauf und Prognose der Schizophrenie	8
1.1.3	Empirisch-genetische Untersuchung	8
1.1.3.1	Familienstudien	9
1.1.3.2	Familiäre Subtypen	9
1.1.3.3	Familiäre Häufung von schizophrenen und anderen psychiatrischen Störungen	10
1.1.3.4	Zwillingsuntersuchungen	11
1.1.3.5	Adoptionsuntersuchungen	13
1.2	Genidentifizierung bei genetisch komplexen Erkrankungen	13
1.2.1	Genetische Marker und ihre Bedeutung bei der Identifizierung von Suszeptibilitätsgenen	13
1.2.2	Kopplungsuntersuchungen	15
1.2.3	Assoziationsuntersuchungen	16
1.3	Kopplungs- und Assoziationshinweise in der chromosomalen Region 6p21-24 bei schizophrenen Störungen	17
1.3.1	Kopplungsuntersuchungen auf Chromosom 6p21-24 bei schizophrenen Störungen	18
1.3.2	Das Gen dystrobrevin-binding protein 1 (DTNBP1) als Kandidatengen für schizophrene Störungen	22
1.3.2.1	Charakteristika des DTNBP1 Gens	22
1.3.2.2	Charakteristika und Funktion des dystrobrevin-binding protein 1	22
1.3.2.3	Spezielle Funktion des DTNBP1-Gens im ZNS	23
1.3.3	Assoziationsuntersuchungen am DTNBP1-Gen	25
2	Fragestellung	32

3	Material	34
3.1	Untersuchungskollektive	34
3.2	Geräte	35
3.3	Chemikalien	36
3.4	Enzyme und Längenstandards	36
4	Methoden	38
4.1	Isolierung und Aufbereitung humaner DNA	38
4.1.1	Photometrische Konzentrationsbestimmung und Überprüfung der Reinheit isolierter genomischer DNA	39
4.2	Das Prinzip der Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	39
4.2.1	PCR von genomischer DNA für die Pyrosequencing-Reaktion	40
4.3	Agarose-Gelelektrophorese	43
4.4	Genotypisierung der Polymorphismen im DTNBP1-Gen	44
4.4.1	Prinzip der Pyrosequencing-Reaktion	44
4.4.2	Aufbereitung der PCR-Produkte für die Pyrosequencing-Reaktion	45
4.4.3	Genotypisierung durch die Pyrosequencing-Reaktion	45
4.5	Statistische Auswertung	46
5	Ergebnisse	49
5.1	Genotypisierung von Varianten am DTNBP1-Locus	49
5.2	Genotypisierte Varianten am DTNBP1-Locus – Ergebnisse der statistischen Auswertung	49
5.2.1	Auswertung des Inter-Marker-Kopplungsungleichgewichtes	49
5.2.2	Einzelmarker-Analyse der Fall-Kontroll-Kollektive	50
5.2.3	Haplotyp-Analyse der Fall-Kontroll-Kollektive	53
6	Diskussion	56
6.1	Aufklärung genetischer Ursachen für komplex vererbte Krankheiten	56
6.2	Ansatz und Methodik dieser Arbeit	56
6.3	Interpretation der Ergebnisse der statistischen Auswertung	57
6.3.1	DTNBP1-Locus – Populationsspezifische genetische Variabilität	57

6.3.2	DTNBP1-Locus – Dispositionsfaktor für schizophrene Störungen	58
6.3.3	DTNBP1-Locus – Identifikation der krankheitsdisponierenden Veränderung(en)	60
6.3.4	DTNBP1-Protein – Dispositionsfaktor für Schizophrene Störungen	62
6.4	Abschließende Betrachtung	63
7	Zusammenfassung	65
8	Literaturverzeichnis	67

1 Einleitung

Die Schizophrenie ist eine relativ häufige Erkrankung mit weit reichenden psychischen und sozialen Konsequenzen für die Erkrankten und ihr Umfeld. Zwar finden sich erste Beschreibungen des Krankheitsbildes durch Pinel (1801) und Haslam (1809) schon im frühen 19. Jahrhundert, den Grundstein für die modernen Diagnosekriterien einer schizophrenen Störung (nach ICD-10 und DSM-IV) legte aber erst 1911 Eugen Bleuler mit Benennung der charakteristischen Symptome aus den Bereichen des Denkens, Antriebs und der Affektivität. Die Prävalenz der Erkrankung liegt weltweit zwischen 0,2 und 2%, das Risiko, im Laufe des Lebens an einer Schizophrenie zu erkranken, wird allgemein mit ca. 1% beziffert (American Psychiatric Association. Task Force on DSM-IV., 1994). Der Erkrankungsbeginn liegt meistens zwischen der Pubertät und dem 30. Lebensjahr, eine Remission zum prämorbidem Leistungsniveau ohne Residualsymptomatik ist leider selten.

Ätiologisch konnten bisher nur wenige prädisponierende Faktoren identifiziert werden. Dabei scheint es sich bei der familiären Belastung um den stärksten bislang erkannten ätiologischen Faktor zu handeln. Entsprechend konnte die Bedeutung der familiären bzw. genetischen Disposition in zahlreichen Familien-, Zwillings- und Adoptionsstudien nachgewiesen werden. Cardno und Gottesman (2000) beziffern den Einfluss genetischer Faktoren am Entstehungsprozess der Schizophrenie auf 82 bis 84%.

Zur Identifikation von Krankheitsgenen bei genetisch komplexen Erkrankungen haben sich vor allem zwei Methoden bewährt: Zum einen Kopplungsanalysen, die an Familien mit hoher Krankheitsdichte unter Zugrundelegen von genetischen Markern durchgeführt werden. Unter der Annahme, dass die variable DNA-Sequenz und die krankheitsverursachende Variante nahe beieinander liegen und gemeinsam vererbt werden, können Kopplungsanalysen zur Identifikation genomischer Regionen führen, in denen sich disponierende Gen-Varianten befinden. Die zweite Methode zur Identifikation von Krankheitsgenen ist die Assoziationsuntersuchung, die an Fall-Kontroll-Kollektiven von nicht miteinander verwandten Individuen durchgeführt werden. Hierbei wird untersucht, ob die an einem Genlocus untersuchten Varianten häufiger bei Erkrankten im Vergleich zu gesunden Kontrollen vorkommen.

Zu der schizophrenen Störung liegen bereits zahlreiche Ergebnisse aus (genomweiten) Kopplungsanalysen vor, dabei zeigten sich in mehreren chromosomalen Regionen Hinweise auf Kopplung. Im Rahmen einer genomweiten Kopplungsuntersuchung identifizierten Straub et al. (1995) an einem Kollektiv von irischen Familien mit starker Erkrankungsbelastung erstmals die

chromosomale Kopplungsregion 6p22-24. Nachdem die Befunde an 4 unabhängigen Familienkollektiven mit schizophrenen Störungen Bestätigung fanden, gelang es Straub et al. (2002b) in weiterführenden Untersuchungen, Assoziationshinweise zwischen SNP-Markern im Bereich des *dystrobrevin-binding protein 1 (DTNBPI)*-Gens, das in der Kopplungsregion lokalisiert ist, und der Schizophrenie zu finden. Auch diese Befunde konnten in nachfolgenden Studien an unabhängigen Kollektiven bestätigt werden.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit liegt darin, die Bedeutung des *DTNBPI*-Gens am Entstehungsprozess von schizophrenen Störungen in drei ethnisch unterschiedlichen Kollektiven aus Polen, Deutschland und Schweden zu erfassen. Hierfür wurden 5 im *DTNBPI*-Gen befindliche SNPs (P1635, P1325, P1757, P1320, P1578) untersucht, die zuvor positive Assoziationshinweise in anderen Kollektiven gezeigt hatten. Durch die Verwendung von Kollektiven aus Polen, Schweden und Deutschland ist es zudem möglich, eventuell bestehende populationsspezifische Assoziationen am *DTNBPI*-Locus darzustellen. Darüber hinaus ist eine detaillierte Genotyp-Phänotyp-Analyse an unseren Patientenkollektiven unter Stratifikation nach familiärer Belastung möglich. Hierdurch kann untersucht werden, ob dem *DTNBPI*-Gen eine besondere Bedeutung bei Patienten mit positiver Familienanamnese zukommt.

1.1 Schizophrene Psychosen

1.1.1 Krankheitsbild

Das Krankheitsbild der schizophrenen Psychosen ist vielgestaltig, vielfach wird daher auch von einem „Formenkreis der Schizophrenien“ gesprochen. Der Züricher Psychiater Eugen Bleuler (1857-1939) unterschied im Jahr 1911 sog. Grundsymptome (Störungen des Denkens, der Affektivität und des Antriebes) von sog. akzessorischen Symptomen (Wahn, Halluzinationen und katatone Störungen). Nach dem modernen Konzept von Kurt Schneider (1887-1967) unterscheidet man mittlerweile zwischen Symptomen ersten und zweiten Ranges. Entscheidend für die Diagnose einer Schizophrenie sind dabei die Symptome ersten Ranges. Hierzu zählen akustische Halluzinationen (Kommentar-, Dialog-, oder Imperativstimmen), Störungen des Ich-Erlebens (Gedankenbeeinflussung, Verlust der Meinhaftigkeit der Ich-Grenzen und Gefühle) und Veränderungen der Wahrnehmung (Wahnwahrnehmung). Die im deutschsprachigen Raum gebräuchlichen Diagnosekriterien des ICD-10 (World Health Organization, 2004) orientieren sich am Konzept von Kurt Schneider. Das im angloamerikanischen Raum gebräuchliche Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders (DSM), herausgegeben von der American Psychiatric

Association in der 4. Auflage (American Psychiatric Association. Task Force on DSM-IV., 1994), ist dagegen mehr symptomorientiert und basiert auf der Unterteilung in Positivsymptomatik (Wahnphänomene, Halluzinationen, desorganisierte Sprache, grob desorganisiertes oder katatones Verhalten) und Negativsymptomatik (Affektverflachung, Alogie, Willensschwäche).

Zudem werden verschiedene Subtypen schizophrener Störungen unterschieden, die sich am Erscheinungsbild des Patienten orientieren. Hierzu zählen die paranoid-halluzinatorische, die katatone und die hebephrene Ausprägung der schizophrenen Störung.

1.1.2 Epidemiologie, Verlauf und Prognose der Schizophrenie

Das Lebenszeitrisiko, an einer Schizophrenie zu erkranken, liegt bei etwa 1 Prozent. Die Prävalenz wird zwischen 0,2 und 2 Prozent angegeben, wobei die Prävalenzraten weltweit vergleichbar sind (American Psychiatric Association. Task Force on DSM-IV., 1994). Die Erkrankung beginnt i. d. R. zwischen der Pubertät und dem 30. Lebensjahr. Bei Männern zeigt sich eine Häufung zwischen dem 20. und 25. Lebensjahr, und bei Frauen zwischen dem 25. und 30. Lebensjahr. In ungefähr 50 Prozent der Fälle kommt es nach einer oder mehreren Episoden zur Ausbildung einer Residualsymptomatik (Huber, 2005), eine vollständige Remission mit Rückkehr zum prämorbidem Leistungsniveau ist hingegen seltener.

Als Prädiktoren für eine günstige Prognose einer schizophrenen Störung gelten u. a. ein spätes Ersterkrankungsalter, ein akuter Erkrankungsbeginn, eine ausgeprägte Positivsymptomatik, eine gute prämorbidem Anpassung, ein ausgeglichenes emotionales Familienmilieu und eine unkomplizierte Persönlichkeitsstruktur (Huber, 2005).

1.1.3 Empirisch-genetische Untersuchung

Bislang konnten nur wenige ätiologisch relevante Risikofaktoren für die Ausbildung einer schizophrenen Störung identifiziert werden. Marcelis et al. zeigten eine Korrelation zwischen Bevölkerungsdichte und Inzidenz von schizophrenen Psychosen (Marcelis et al., 1998). Torrey et al. diskutierten einen Zusammenhang zwischen erhöhter Geburtenrate von Betroffenen in Winter- und Frühjahrsmonaten und erhöhten Infektionsrisiken der schwangeren Mütter durch Influenza- und Coxsackie B-Viren als mögliche Krankheitsursache (Torrey et al., 1997). Ergebnisse von Verdoux et al. deuten darauf hin, dass Mütter von Schizophrenen 2,7fach häufiger eine positive Anamnese prä- und perinataler Komplikationen aufweisen (Verdoux et al., 1997).

Bei den genannten Risikofaktoren handelt es sich jedoch um schwache und unspezifische Risikofaktoren, die auch für andere psychiatrischen Erkrankungen zutreffen. Demgegenüber handelt es sich bei der genetischen bzw. familiären Belastung um den stärksten bislang erkannten Prädiktor und Risikofaktor für die Ausbildung einer schizophrenen Störung. Die Bedeutung der genetischen Faktoren am Entstehungsprozess schizophrener Störungen konnte dabei durch eine Vielzahl von Familien-, Zwillings- und Adoptionsstudien belegt werden.

1.1.3.1 Familienstudien

In der bisher umfangreichsten Übersichtsarbeit fasste Irving Gottesman die Ergebnisse von über 40 Familienstudien zusammen (siehe Tabelle 1), die zwischen 1921 und 1987 an belasteten Familien vorwiegend europäischer Herkunft erhoben wurden. In späteren Familienstudien, bei denen aktuellere und operationalisierte Diagnosesysteme (u. a. DSM- oder ICD-Kriterien) Verwendung fanden, wurden ähnliche Risikoziffern ermittelt (Cardno und Gottesman, 2000; Kendler und Diehl, 1993; Maier et al., 1993; Parnas et al., 1993).

Bei den Familienstudien konnten zwei Faktoren identifiziert werden, die einen besonderen Einfluss auf das Erkrankungsrisiko haben und belegen, dass genetische Faktoren am Entstehungsprozess von schizophrenen Störungen beteiligt sind: 1) Mit der Zunahme des Verwandtschaftsgrades zu einem Betroffenen steigt das Erkrankungsrisiko. Entsprechend haben monozygote Zwillinge ein Risiko von 48%, an einer Schizophrenie zu erkranken, wenn bereits der andere Zwilling erkrankt ist. Mit Zunahme der Entfernung der Verwandtschaft zu einem Betroffenen sinkt hingegen das Erkrankungsrisiko (siehe Tabelle 1). So haben Verwandte zweiten oder dritten Grades ein niedrigeres, allerdings noch etwas über dem der Allgemeinbevölkerung liegendes Erkrankungsrisiko. 2) Das Morbiditätsrisiko steigt zudem mit der Anzahl erkrankter Familienmitglieder. So liegt das Risiko eines Kindes von einem betroffenen Elternteil bei 13%, ebenfalls zu erkranken. Ist zusätzlich noch ein Geschwister schizophren erkrankt, steigt das Risiko auf 17%. Sind beide Elternteile von einer schizophrenen Störung betroffen, liegt das Erkrankungsrisiko sogar bei 46% (siehe Tabelle 1).

1.1.3.2 Familiäre Subtypen

Ein generelles Problem bei formal- und molekulargenetischen Analysen genetisch komplexer Erkrankungen liegt in der genetischen Heterogenität. So können verschiedene genetische Komponenten zwischen den einzelnen Familien zur Erkrankung beitragen. Auch werden

unterschiedliche genetische Faktoren bei der Ausprägung der einzelnen Verlaufs- und Prägnanztypen schizophrener Störungen von Bedeutung sein.

Vor dem Hintergrund der genetischen Heterogenität war es Ziel vieler bisher durchgeführter Forschungsarbeiten, spezifische Krankheitsfaktoren zu finden, mit denen eine genetische Homogenisierung schizophrener Störungen vorgenommen werden kann. Diesbezüglich scheint dem Erstmanifestationsalter nach einer Studie von Kendler et al. keine große Bedeutung zu zukommen (Kendler et al., 1996). So zeigte sich, dass das Ersterkrankungsalter nicht mit einer hohen familiären Belastung korreliert. In einer weiteren Studie von Kendler und Diehl war auch keine familiäre Häufung von bestimmten Verlaufsformen schizophrener Störungen (paranoid-halluzinatorisch, hebephren, kataton) zu beobachten (Kendler und Diehl, 1993). Die Arbeitsgruppe um Beckmann berichtet hingegen von einer starken intrafamiliären Homogenität mit beinahe autosomal-dominantem Erbgang bei der periodischen Katatonie, einer Verlaufsform schizophrener Störungen unter Verwendung der kaum gebräuchlichen nosologischen Einteilung nach Leonhard (Beckmann et al., 1996; Leonhard, 1957). Diesbezüglich fanden auch Stöber et al. einen starken Hinweis auf das Vorliegen eines Krankheitslocus in der chromosomalen Region 15q15 in 12 Familien mit periodischer Katatonie (Stöber et al., 2000).

Weiterhin wurden auch sog. Endophänotypen untersucht, die mit der Krankheit gehäuft auftretende Merkmale darstellen und auch bei phänotypisch gesunden Familienmitgliedern häufiger als erwartet beobachtet werden. Es wird vermutet, dass Endophänotypen unmittelbarer auf einen umschriebenen genetischen Faktor zurückzuführen sind als das Krankheitsbild selber. So fanden Myles-Worsley et al. Hinweise auf einen Kopplungsbefund in der chromosomalen Region 22q12 unter Verwendung der mangelnden Unterdrückung reflexiver Augenfolgebewegungen als Endophänotyp (Myles-Worsley et al., 1999). Eine Studie von Freedman beobachtete einen Hinweis auf Kopplung in der chromosomalen Region 15q13-q14 mit der eingeschränkten Habituation der akustisch evozierten P50-Welle in Familien schizophrener Patienten (Freedman et al., 1997).

1.1.3.3 Familiäre Häufung von schizophrenen und anderen psychiatrischen Störungen

In Familien Schizophrener zeigen sich auch gehäuft andere psychiatrische Erkrankungen. So wurde eine Häufung der sog. Spektrumerkrankungen beobachtet. Die Symptome dieser Störungen sind denen einer Schizophrenie, wenn auch deutlich abgeschwächt, ähnlich. Die Arbeitsgruppen um Kendler und Maier konnten unabhängig voneinander eine deutliche Häufung

von Spektrumerkrankungen in Familien Schizophrener finden (Kendler et al., 1993; Maier et al., 1994). Auch schizotype Persönlichkeitsstörungen und schizoaffektive Störungen zeigten eine Kosegregation mit schizophrenen Psychosen (Cardno et al., 1999; Kendler et al., 1994). Aufgrund der empirischen Beobachtungen liegt die Vermutung nahe, dass o. g. Störungen zum großen Teil die gleichen genetischen Dispositionsfaktoren zugrundeliegen wie den schizophrenen Störungen.

1.1.3.4 Zwillingsuntersuchungen

Ein weiterer Ansatz zum Nachweis und zur Bewertung des ätiologischen Einflusses genetischer Faktoren liegt in der Durchführung von Zwillingsuntersuchungen. So lässt der Vergleich zwischen den Konkordanzraten monozygoter und dizygoter Zwillingspaare einen Rückschluss auf den genetischen Anteil an der Krankheitsentstehung zu.

Irving Gottesman fasste zahlreiche zwischen 1963 und 1987 durchgeführte Studien an Zwillingspartnern schizophren Erkrankter zusammen (siehe Tabelle 1) und fand Konkordanzraten von 48% bei monozygoten Zwillingen (MZ) und von 17% bei dizygoten Zwillingen (DZ) (Gottesman und Wolfgram, 1991). In jüngerer Zeit wurden fünf weitere Zwillingsuntersuchungen durchgeführt, die auf operationalisierten Diagnosekriterien basierten (v.a. DSM- und ICD-Kriterien). Die Autoren fanden Konkordanzraten unter monozygoten Zwillingspaaren, die zwischen 41% (Cardno et al., 1999) und 48% (Onstad et al., 1991) lagen. Bei den Arbeiten der Gruppe um Franzek und Beckmann erhöhte sich die Konkordanzrate für monozygote Zwillingspaare unter Berücksichtigung von Erkrankungen des schizophrenen Formenkreises sogar auf 65% (Franzek und Beckmann, 1998). Für dizygoten Zwillingspaare zeigten sich bei diesen Untersuchungen Konkordanzraten zwischen 0% (Cardno et al., 1999) und 11% (Klaning et al., 1996). Unter Erweiterung des Phänotyps ergab sich bei Franzek und Beckmann eine Konkordanzrate von 28% bei zweieiigen Zwillingspaaren (Franzek und Beckmann, 1998).

Aus den genannten Arbeiten wurde die erklärbare ätiologische Varianz (Heritabilität) genetischer Faktoren geschätzt. Sie liegt nach Gottesman et al. zwischen 41% und 86% (Gottesman und Wolfgram, 1991), bei Cardno et al. beträgt sie 82-84% (Cardno et al., 1999) und Cannon et al. beziffern sie auf 83% (Cannon et al., 1998). Eine Metaanalyse o. g. Studien durch Cardno und Gottesman kommt auf Konkordanzraten von 50% bei MZ und von 4,1% bei DZ für DSM-III-R-basierte und von 52,4% bei MZ und von 3,9% bei DZ für ICD-basierte Untersuchungen. Die

Zahlen weisen darauf, dass genetischen Faktoren ein Anteil von 82-84% an der Ätiologie der Schizophrenie zukommt (Cardno und Gottesman, 2000).

Interessanterweise zeigten Zwillingsuntersuchungen auch, dass die genetisch disponierenden Faktoren auch über phänotypisch Nicht-Erkrankte übertragen werden. So fanden Gottesman und Bertelsen bei Untersuchungen der Nachkommen diskordant-betroffener Zwillingspaare vergleichbar erhöhte Erkrankungsziffern sowohl bei Nachkommen des erkrankten als auch des nicht-erkrankten Zwillings (Gottesman und Bertelsen, 1989).

Tabelle 1: Ergebnisse von Familien- und Zwillingsstudien bei schizophrenen Störungen, der Übersichtsarbeit von Gottesmann et al. (1991) entnommen

Lebenszeitrisiko, an einer schizophrenen Psychose zu erkranken, für Familienangehörige von schizophrenen Patienten		
Verwandschaftliche Beziehung	Anteil gemeinsamer Gene (%)	Morbiditätsrisiko (%)
Basisrisiko		1%
Drittgradig Verwandte Cousins und Cousine	12,5%	2%
Zweitgradig Verwandte Enkelkinder	25%	5%
Erstgradig Verwandte	50%	
Eltern		6%
Geschwister		9%
Kinder		13%
Geschwister bei einem zusätzlich betroffenen Elternteil		17%
Kind mit zwei betroffenen Elternteilen		46%
Konkordanzraten für mono- und dizygote Zwillinge	Anteil gemeinsamer Gene (%)	Morbiditätsrisiko (%)
Dizygote Zwillinge	50%	17%
Monozygote Zwillinge	100%	48%

1.1.3.5 Adoptionsuntersuchungen

Allgemein ist bei Familien- und Zwillingsstudien erschwert zu unterscheiden, in welchem Ausmaß die beobachtete familiäre Häufung genetischen Faktoren oder Umweltfaktoren zu

zuordnen ist. Hier ermöglichen Adoptionsstudien, den Beitrag genetischer Faktoren unabhängig von peristatischen Faktoren zu beurteilen. So ist es zum einen möglich, das Erkrankungsrisiko wegadoptierter Kinder von betroffenen biologischen Eltern zu ermitteln. Zudem lässt dieser Ansatz zu, den Einfluss von variierenden Umweltfaktoren innerhalb der verschiedenen Adoptivfamilien auf das Erkrankungsrisiko abzuschätzen.

In drei Studien zeigten sich übereinstimmend signifikant erhöhte Erkrankungsrisiken für wegadoptierte Kinder schizophrener Eltern im Vergleich zu einem Kontrollkollektiv (Higgins, 1976; Tienari und Wynne, 1994; Wender et al., 1974). Weiterführende Untersuchungen ergaben, dass das Erkrankungsrisiko wegadoptierter Kinder nicht-betroffener Eltern unabhängig davon ist, ob sie in einer Familie mit oder in einer Familie ohne betroffenem Elternteil aufwachsen (Wender et al., 1974). Higgins konnte zusätzlich zeigen, dass es keinen Einfluss auf das Erkrankungsrisiko hat, wenn Kinder von schizophrenen Eltern in einer gesunden Adoptivfamilie oder bei ihren biologischen Eltern aufwachsen (Higgins, 1976). Ein erkrankter Elternteil scheint somit kein entscheidender Umweltfaktor bei der Krankheitsentstehung zu sein.

Zum anderen kann man das Erkrankungsrisiko der Angehörigen von wegadoptierten Schizophrenen mit dem von Angehörigen nicht-betroffener Adoptivkinder vergleichen. Diesbezüglich analysierten Kety et al. die Ergebnisse zweier zuvor durchgeführter dänischer Adoptionsstudien. Den Untersuchungen wurde die Krankheitsklassifikation von Eugen Bleuler zugrundegelegt, wobei die Diagnose *chronische Schizophrenie* enge Krankheitskriterien erfüllte und die Diagnose *latente Schizophrenie* zudem Erkrankungen mit schizophrenie-ähnlicher Symptomatik einschloss. Es zeigte sich, dass 5,0% der biologischen Angehörigen schizophrener Patienten an einer *chronischen Schizophrenie* erkrankt waren, wohingegen nur 0,4% der Angehörigen des Kontrollkollektivs von einer *chronischen Schizophrenie* betroffen war ($p=0,0013$). Unter Verwendung der Definition *latente Schizophrenie* stieg das Erkrankungsrisiko biologisch Verwandter von Schizophrenen auf 10,8% gegenüber 1,7% bei Angehörigen des Kontrollkollektivs ($p=0,00002$) (Kety et al., 1994).

Auch eine Re-Analyse dieses Datensatzes durch Kendler et al. unter Verwendung von DSM-III-Kriterien zeigte ähnliche Ergebnisse. Zudem bestätigte sich, dass schizoaffektive Störungen und schizotype Persönlichkeitsstörungen signifikant häufiger bei biologischen Familienangehörigen wegadoptierter Schizophrener vorkommen (Kendler et al., 1994).

Zusammenfassend lassen die durchgeführten Adoptionsuntersuchungen folgende Aussagen zu:

- 1) An der Entstehung von Schizophrenien haben genetische Faktoren einen entscheidenden Beitrag.
- 2) Die genetische Disposition lässt sich auch auf schizophrenie-verwandte Störungen erweitern.
- 3) Familiär-spezifische Faktoren scheinen als disponierende Risikofaktoren bei der Krankheitsentstehung keine signifikante Rolle zu spielen; zu diesem Ergebnis kommen auch alle bislang durchgeführten Familienuntersuchungen.

1.2 Genidentifizierung bei genetisch komplexen Erkrankungen

Der Begriff *genetisch komplexe Erkrankung* beschreibt, dass eine Krankheit nicht auf eine einzige genetische Veränderung zurückzuführen ist, sondern dass ein Zusammenspiel mehrerer Veränderungen in unterschiedlichen Genen disponierend ist. Gemeinsam mit Umweltfaktoren tragen diese in unterschiedlicher Weise und Ausmaß zu der Pathogenese der Erkrankung bei. Für die Genidentifizierung bei genetisch komplexen Erkrankungen stehen dabei zwei sich ergänzende Ansätze zur Verfügung: Die Kopplungs- und die Assoziationsuntersuchungen. Gegenstand beider Analysen sind genetische Marker, die im Folgenden kurz dargestellt werden.

1.2.1 Genetische Marker und ihre Bedeutung bei der Identifizierung von Suszeptibilitätsgenen

Zur Identifizierung von Veränderungen, die genetisch komplexen Erkrankungen zugrundeliegen, finden genetische Marker Verwendung. Es handelt sich um polymorphe DNA-Sequenzen, die an einer bestimmten Stelle im Genom lokalisiert sind. Von einem Polymorphismus spricht man, wenn ein Allel eines Markers mit einer Frequenz größer als 1% in der Allgemeinbevölkerung vorkommt.

Bislang wurden bei *Kopplungsuntersuchungen* (siehe unten) sog. Mikrosatellitenmarker eingesetzt. Diese bestehen aus variablen Short Tandem Repeats (STRs), n-Mal wiederholten Motiven aus zwei bis drei Basen (z. B. (CAG)ⁿ, (CG)ⁿ). Die Genotypisierung erfolgt durch die Feststellung der jeweiligen Repeat-Länge z. B. im Rahmen einer Gel-Elektrophorese.

Bei *Assoziationsuntersuchungen* (siehe unten) finden in der Regel sog. SNPs (Single Nucleotide Polymorphisms) als Marker Verwendung. Sie bestehen aus Punktmutationen bzw. einfachen Basensubstitutionen, die durch verschiedene PCR-basierte Methoden genotypisiert werden

können. Mittlerweile finden SNPs aber auch zur Durchführung genomweiter Kopplungsuntersuchungen vermehrt Anwendung.

1.2.1 Kopplungsuntersuchungen

Kopplung bezeichnet die gemeinsame Vererbung eines genetischen Markers mit einem Phänotyp bzw. einer Erkrankung innerhalb einer Familie. Es wird davon ausgegangen, dass der genetische Marker und die krankheitsverursachende Veränderung gemeinsam auf einem chromosomalen Abschnitt in nur so geringem Abstand voneinander liegen, dass sie nicht durch Rekombinationsereignisse (crossing over) voneinander getrennt und unabhängig voneinander vererbt wurden.

Die Häufigkeit, mit der eine Rekombination zwischen zwei Genloci – z. B. zwischen Marker und genetischer Veränderung – in der Meiose stattfindet, nennt man Rekombinationsrate, die mit θ bezeichnet wird. $\theta=0$ bedeutet dabei, dass beide Genloci nicht durch Rekombinationsereignisse getrennt wurden, $\theta=0,5$ bedeutet, dass beide Genloci unabhängig voneinander vererbt werden, z.B. auf zwei verschiedenen Chromosomen lokalisiert sind.

Bei einer genomweiten Kopplungsuntersuchung (Genome-Scan) wird in Familien mit hoher Krankheitsdichte nach gemeinsamer Vererbung (Kosegregation) von genetischen Markern und dem Krankheitsphänotyp gesucht. Hierbei werden bei allen Familienmitgliedern ca. 400 Marker typisiert, die in einem Abstand von ca. 10cM voneinander über das gesamte Genom hinweg verteilt liegen.

Zur Berechnung der Kopplungsanalyse finden zwei Methoden mit dazugehöriger Teststatistik Verwendung, die parametrische und die nicht-parametrische Kopplungsanalyse. Die *parametrische Kopplungsanalyse* wird unter Annahmen zu folgenden Eigenschaften des putativen Krankheitsgenes durchgeführt: Erbgang (dominant/rezessiv), Allelfrequenz in der Allgemeinbevölkerung und Penetranz. Die *nicht-parametrische Kopplungsanalyse* findet ohne Zugrundelegen von Parametern statt und betrachtet die Zahl gleicher Allele an einem Locus, die betroffene Individuen in einer Familie gemeinsam haben. Als Maß für die Wahrscheinlichkeit einer bestehenden Kopplung dient bei parametrischen Analysen der LOD-Score und bei nicht-parametrischen Analysen der NPL-Score. Die Ergebnisse von genomweiten Kopplungsanalysen bei genetisch komplexen Erkrankungen werden nach den Richtlinien von Lander und Kruglyak bewertet (Lander und Kruglyak, 1995). Nach diesen Kriterien wird ein Kopplungsbefund als *suggestive* bezeichnet, der sich der Wahrscheinlichkeit nach einmal in einer genomweiten

Kopplungsanalyse durch Zufall ergeben würde. Dies entspricht bei parametrischen Analysen einem LOD-Score von 1,9 ($p=0,0017$), sowie bei nicht-parametrischen Analysen einem NPL-Score von 2,2 ($p=0,00074$). Kopplung im Bereich von *significant* liegt bei einem Ergebnis vor, das man zufällig in 5 von 100 durchgeführten Genom-Scans zu erwarten hätte. Bei parametrischen Analysen beschreibt ein LOD-Score von 3,3 ($p=0,000049$), bei nicht-parametrischen Analysen ein NPL-Score von 3,6 ($p=0,000022$) das Vorliegen von Kopplung im Bereich von *significant*. Da sich bei komplexen genetischen Krankheiten hohe LOD-, bzw. NPL-Scores ($> 4,0$) kaum jemals erreichen lassen, kommt Replikationsstudien eine besondere Bedeutung zu.

1.2.3 Assoziationsuntersuchungen

Bei Assoziationsanalysen müssen zwei Ansätze unterschieden werden:

- 1) In identifizierten Regionen mit Hinweisen auf Krankheitsgene, i. d. R. handelt es sich um Kopplungsregionen, werden genetische Marker systematisch mit geringen Abständen zueinander typisiert. Ziel ist es dabei, Kopplungsungleichgewichte (LD) zwischen den untersuchten Varianten und der disponierenden Genveränderung aufzudecken (sog. LD-Mapping).
- 2) Die genetischen Varianten werden im Bereich putativer Krankheitsgene typisiert. Dieses sind Gene, denen eine funktionelle Bedeutung am Krankheitsprozess zukommen könnte (z. B. Gene der Dopamin-Rezeptoren bei neuropsychiatrischen Krankheiten) oder für die zuvor positive Assoziationen berichtet wurden (sog. Kandidatengenansatz). Auch hier zielt man auf das Erfassen eines LD ab, oder man versucht, durch Typisierung funktioneller Varianten direkt disponierende Varianten zu identifizieren.

Bei Assoziationsuntersuchungen werden die Genotyp- und Allelfrequenzen eines genetischen Markers in einer bestimmten Anzahl von betroffenen Individuen bestimmt und mit denen von nicht-betroffenen Personen verglichen. Assoziation liegt vor, wenn sich bei diesem Vergleich signifikante Unterschiede ergeben. Im Gegensatz zu Kopplungsanalysen sind dabei keine Familien mit hoher Krankheitsdichte notwendig. Hinsichtlich des Studiendesigns werden vielmehr zwei Ansätze bei der Kollektiv-Auswahl unterschieden, die Fall-Kontroll-Assoziationsuntersuchungen (*case control association studies*) und die familienbasierten Assoziationsuntersuchungen (*family based association studies*).

Bei den Fall-Kontroll-Assoziationsuntersuchungen werden zwei Kollektive (erkrankt vs. nicht erkrankt) miteinander verglichen. Da die untersuchten Personen nicht miteinander verwandt sind,

können solche Kollektive relativ schnell rekrutiert werden. Allerdings müssen Patienten und Kontrollpersonen den gleichen genetischen Hintergrund haben, da Allelfrequenzen in verschiedenen ethnischen Gruppen voneinander abweichen und somit zur Beeinflussung der Ergebnisse führen können (sog. Stratifikationseffekt).

Bei familienbasierten Assoziationsuntersuchungen finden in der Regel sog. Trios Verwendung, wobei ein Trio aus einem erkrankten Indexfall samt beiden Elternteilen besteht. In der Falk-Rubinstein-Methode (*haplotype relative risk test*) werden die Allele des Indexfalles am Markerlocus als Patienten-Allele und die nicht weitergegebenen Allele der Eltern als Kontrollgruppe angesehen. Der TDT (*transmission disequilibrium test*) untersucht hingegen, ob ein bestimmtes Marker-Allel überdurchschnittlich häufig von den Eltern an das erkrankte Kind weitergegeben wurde.

Da die Trio-basierten Methoden durch Populationsstratifikation unbeeinflusst bleiben, kann im Vergleich zur Fall-Kontroll-Studie eine höhere Testzuverlässigkeit erreicht werden. Allerdings müssen 1/3 mehr Genotypen bestimmt werden, und nur beim Vorliegen von Heterozygotie der Eltern sind die Analysen informativ.

Liegt Assoziation zwischen Marker und Krankheitsphänotyp vor, kann es sich um die krankheitsverursachende Variante handeln oder der assoziierte Marker liegt im LD zu dieser. Hierbei liegt die untersuchte Variante derartig eng benachbart zu der disponierenden Veränderung, dass sie in der Evolution nicht durch Rekombinationsereignisse getrennt wurden. Ausgehend von dem an der Erkrankung Erstbetroffenen wurde dann über Generationen hinweg die genetische Veränderung gemeinsam mit der untersuchten Variante vererbt.

Als Marker werden bei Assoziationsstudien i. d. R. SNPs (*single nucleotide polymorphism*) verwendet, die durchschnittlich im Abstand von 1000 Basenpaaren und somit am häufigsten im humanen Genom vorkommen.

Darüber hinaus hat sich herausgestellt, dass das Genom in sog. Haplotyp-Blöcken strukturiert ist (Daly et al., 2001). Bei Haplotypen handelt es sich um chromosomale Segmente, die durch fixierte bzw. konstante Allel-Konstellationen nebeneinander liegender SNPs innerhalb einer Bevölkerung charakterisiert sind. Die Haplotyp-Blöcke werden durch sog. Rekombinations-Hotspots voneinander getrennt. Innerhalb von Populationen und eines jeden Haplotyp-Blocks ist die Anzahl unterschiedlicher Haplotypen dabei geringer als es theoretisch aufgrund der Anzahl vorliegender Varianten möglich wäre. Nach der Identifikation der Haplotyp-Blöcke bzw. der einzelnen Haplotypen können diese durch gezielte Genotypisierung von relativ wenigen *tag*

SNPs, die eine sichere Unterscheidung der Haplotypen ermöglichen, bestimmt werden. Dadurch ist es zu einer erheblichen Vereinfachung speziell bei der systematischen Untersuchung auf LD (*LD-Mapping*) gekommen (Johnson et al., 2001).

1.3 Kopplungs- und Assoziationshinweise in der chromosomalen Region 6p21-24 bei schizophrenen Störungen

Mit der genomischen Kartierung von STR-Markern wurde es zunehmend möglich, systematisch genomweite Kopplungsanalysen (*Genome-Scans*) durchzuführen. Im Bereich der Schizophrenieforschung lagen zum Zeitpunkt der vorliegenden Arbeit die Ergebnisse von 20 abgeschlossenen Genom-Scans vor (Williams et al., 2004), bei denen sich für viele chromosomale Regionen erfolgsversprechende Befunde ergaben. Dass die jeweiligen Kopplungshinweise nicht in allen Genom-Scans repliziert werden konnten, liegt in der Natur komplex genetischer Erkrankungen mit anzunehmender Locus-Heterogenität und unterschiedlichem Beitrag der einzelnen Krankheitsvarianten in unterschiedlichen Populationen bzw. Untersuchungskollektiven. In 12 chromosomalen Regionen zeigten sich jedoch wiederholt positive Kopplungssignale, die Anlass zur Hoffnung geben, in ihnen Dispositionsgene identifizieren zu können. Es handelt sich um die Regionen 1q21-q24, 1q31-q42, 4q31, 5p13-p14, 5q22-q31, 6p21-p24, 6q16-q22, 8p21-p22, 10p11-p15, 13q32-q33, 15q13-q15 und 22q12-q13.

Auf die chromosomale Region 6p21-p24 soll nachfolgend näher eingegangen werden. Hier ergaben sich bei mehreren unabhängigen Untersuchungen positive Kopplungshinweise. Zudem ist das Kandidatengen *dystrobrevin-binding protein1 (DTNBPI)* dort lokalisiert, welches in mehreren Studien positive Assoziationshinweise zu schizophrenen Störungen zeigte.

1.3.1 Kopplungsuntersuchungen auf Chromosom 6p21-24 bei schizophrenen Störungen

Auch schon vor der Einführung von STR-Markern gab es Hinweise auf ein Krankheitsgen für schizophrene Störungen auf dem kurzen Arm vom Chromosom 6. In der Region 6p21 liegen u. a. Gene des Major-Histokompatibilitäts-Komplexes Klasse 1 und 2. In verschiedenen Kollektiven wurde vielfach über die positive Kopplung und Assoziation zwischen dem HLA-A Antigenstatus und schizophrenen Störungen berichtet (McGuffin und Sturt, 1986; Wright et al., 2001). Allerdings müssen die Hinweise insgesamt als schwach gewertet werden unter anderem wegen z. T. geringer Kollektivgrößen, falsch gewählter Kontrollgruppen, unzureichender diagnostischer Charakterisierung und labortechnischer und/oder statistisch-methodischer Mängel.

Erst die Verfügbarkeit der ersten STR-Marker ermöglichte die Durchführung detaillierter Kopplungsanalysen in diesem chromosomalen Abschnitt. Bis zum gegenwärtigen Zeitpunkt ergaben sich bei 5 Untersuchungen Kopplungshinweise zwischen genetischen Markern in diesem Bereich und schizophrenen Störungen (siehe auch Abbildung 1):

1) Zuerst berichtete die Arbeitsgruppe um Straub und Kendler über positive Kopplungshinweise in der Region 6p22-p24. Zugrundegelegt wurden 256 irische Familien mit schizophrenen Störungen, bestehend aus 1408 Individuen (*Irish Study of High Density Schizophrenia Families, ISHDSF*). Die untersuchte Region erstreckte sich über 40 cM, insgesamt wurden 16 STR-Marker analysiert. Unter der Annahme weiter diagnostischer Kriterien und eines dominanten genetischen Modells ergab sich bei Marker D6S296 ein Heterogenitäts-2-Punkt LOD-Score (HLOD) von 3,51. Zudem zeigte sich der STR-Marker D6S274 mit einem HLOD-Score von 2,23 gekoppelt (Straub et al., 1995).

2) Die Arbeitsgruppe um Schwab und Wildenauer untersuchte daraufhin unter Verwendung von z. T. bereits bei Straub et al. (1995) genotypisierten STR-Markern 43 Familien deutscher und 11 Familien sephardisch-jüdischer Herkunft. Das Kollektiv bestand aus an schizophrenen Störungen erkrankten Geschwisterpaaren (*affected-sib-pair-Ansatz*). Die untersuchte Region umfasste etwa 60 cM, insgesamt wurden hier 25 Marker analysiert. In der Multipoint-Analyse zeigten sich positive LOD-Scores über den chromosomalen Bereich zwischen den Markern D6S470 und D6S271 mit einem maximalen LOD von 2,2 zwischen D6S274 und D6S285. In der 2-Point-Analyse gaben die Marker D6S285 und D6S258 LOD-Scores von 2,00 bzw. 1,68. Im Bereich des bei Straub et al. (1995) am stärksten gekoppelten STR-Markers (D6S296) ergab die Multipoint-Analyse allerdings einen negativen LOD-Score von -2,00 (Schwab et al., 1995).

3) Im gleichen Jahr führten Moises et al. eine zweistufige genomweite Kopplungsanalyse bei schizophrenen Störungen durch. In der ersten Stufe wurden 5 isländische Familien untersucht, der Marker D6S274 zeigte hierbei einen positiven Befund ($p=0,04$). Die zweite Stufe umfasste 65 Familien aus Europa, Kanada, USA und Taiwan. Hierbei ergaben sich für die Marker D6S291 und D6S274 mit $p=0,05$ bzw. $p=0,005$ unter einem engen Krankheitsmodell signifikante Kopplungshinweise. (Moises et al., 1995).

6p24.3

6p22.3

6p21.31

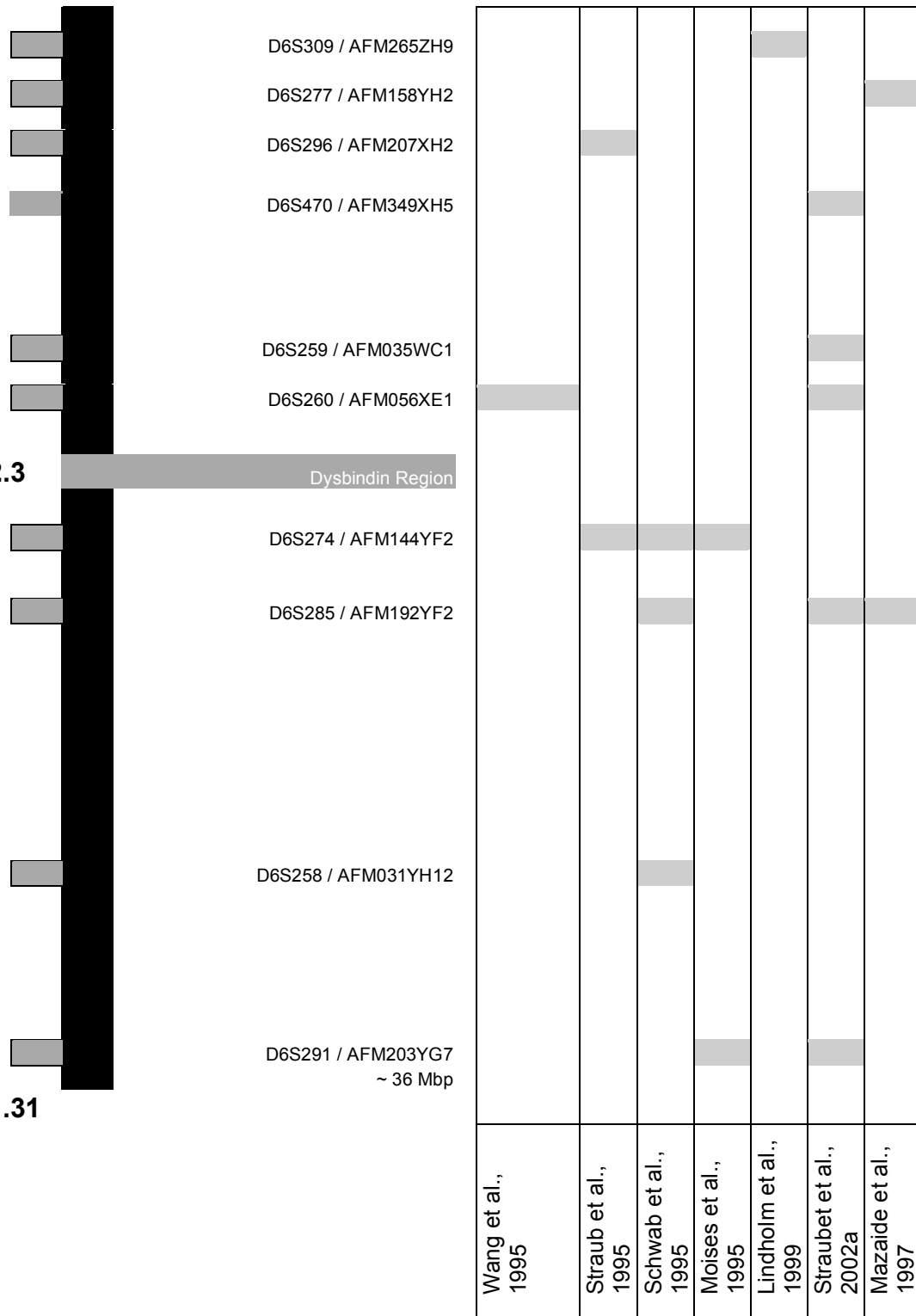


Abbildung 1: Schematische Übersicht über positive Kopplungsbefunde bei schizophrenen Störungen auf Chromosom 6p.

4) Bei den Typisierungen von 12 STR-Markern in einer Großfamilie mit schizophrener und bipolar affektiver Störung (18 Großfamilien mit insgesamt 354 Individuen) aus der östlichen Region Quebecs, Kanada, erhielten Maziade et al. bei D6S296 und D6S277 LOD-Scores von 2,49 bzw. 2,15. Hierbei wurde ein dominantes genetisches Model und die Annahme zugrunde gelegt, dass ein gemeinsames Dispositionsgen für schizophrene und bipolare affektive Störungen vorliegt (Maziade et al., 1997).

5) Lindholm et al. analysierten in einer schwedischen Großfamilie mit schizophrenen Störungen eine Region von etwa 40 cM unter Verwendung von 16 Markern. Hierbei zeigten sich Kopplungshinweise mit LOD-Scores von maximal 2,6 (Lindholm et al., 1999).

6) Im Jahre 2002 veröffentlichte die Arbeitsgruppe um Straub et al. eine weitere Kopplungsanalyse, die an einem erweiterten ISHDSF-Kollektiv mit nunmehr 270 irischen Familien mit schizophrenen Störungen (1425 Individuen) durchgeführt wurde (Straub et al., 2002b). Unter der Verwendung von 166 Markern, die in 10 chromosomalen Abschnitten über eine genetische Distanz von insgesamt 472 cM verteilt waren und unter der Annahme von 4 unterschiedlichen genetischen Modellen sowie von 4 Krankheitsdefinitionen fanden sich zahlreiche Loci mit positiven Kopplungshinweisen. Dabei erhielten sie die interessantesten Befunde im Bereich von 6p22-p24: 2-Point-HLOD-Scores von 3,30 bei D6S259 (unter einem dominanten Model und einem sehr weiten diagnostischen Kriterium) und von 3,46 bei Marker D6S291 (unter einem rezessiven Model und sehr weiten diagnostische Kriterien). In der Multipoint-Analyse zeigten sich zwei klare und differenzierbare Kopplungspeaks, einmal im Bereich von 6p24-p25 mit einem maximalen HLOD-Score von 2,13 (8,4 cM distal von D6S470) und im Bereich von 6p23 mit einem maximalen HLOD-Score von 2,42 (17,1 cM distal von D6S260).

Auch in einer Metaanalyse, in der 9 Kopplungsuntersuchungen bei schizophrenen Störungen mit Markern auf Chromosom 6p untersucht wurden, zeigten sich starke Hinweise auf das Vorliegen eines zur Erkrankung disponierenden Genes. Die signifikantesten Kopplungshinweise ergaben sich bei den Markern D6S274 und D6S285 mit p-Werten von $p=0,00003$ bzw. $p=0,00008$ (Turecki et al., 1997).

Zusammengefasst erstrecken sich die erhobenen und dargestellten Befunde auf Chromosom 6 über einen Bereich von etwa 25 Mb zwischen den STR-Markern D6S296 und D6S291. Innerhalb dieses Abschnittes scheinen sich 4 Subregionen abzubilden, in denen sich die positiven Kopplungsbefunde bei schizophrenen Störungen konzentrieren (siehe Abbildung 1):

- 1) 6p24-p25, im Bereich der Marker D6S296 (14,07 cM) und D6S309 (14,07 cM),
- 2) 6p24, im Bereich der Marker D6S940 (16,84 cM) und D6S470 (18,22 cM),
- 3) 6p22-p23, im Bereich von Marker D6S260 (29,93 cM) und
- 4) 6p21, proximal und innerhalb des HLA-Genes.

1.3.2 Das Gen *dystrobrevin-binding protein 1 (DTNBPI)* als Kandidatengen für schizophrene Störungen

Die durch die beschriebenen Kopplungsuntersuchungen eingegrenzte chromosomale Region auf 6p21-24 umfasst circa 25 Mb und ist damit auch im Vergleich zu Kopplungsregionen bei anderen genetisch komplexen Erkrankungen als relativ groß anzusehen. Sie beinhaltet eine Vielzahl von bekannten Genen und ESTs (*expressed sequence tags*), von denen sich ein großer Teil aufgrund der Funktion und/oder Expression im ZNS als mögliche Dispositionsgene für schizophrene Störungen anbietet.

1.3.2.1 Charakteristika des *DTNBPI* Gens

Das *dystrobrevin-binding protein 1 (DTNBPI)* oder kurz *Dysbindin* (OMIM 607145) liegt in der chromosomalen Region 6p22.3 und somit in einer der oben beschriebenen Regionen, für die sich starke Kopplungshinweise bei schizophrenen Störungen ergaben (siehe Abbildung 2). Aufgrund seiner Funktion (s. u.) und Expression im ZNS kommt es als mögliches Kandidatengen für schizophrene Störungen in Frage.

Zwischen den Markern D6S260 (29,93 cM) und D6S1676 (29,93 cM) gelegen, erstreckt sich das Gen über eine physikalische Länge von 140 kb und besteht aus insgesamt 13 Exons mit 4 putativen Promotorregionen (Williams et al., 2004) (siehe Abbildung 3). Die korrespondierende cDNA ist 1349 bp lang (van den Oord et al., 2003), insgesamt sind bisher 12 verschiedene mRNA Transkripte beschrieben worden (Williams et al., 2004).

1.3.2.2 Charakteristika und Funktion des *dystrobrevin-binding protein 1*

Dysbindin ist das humane Ortholog des murinen *Dysbindins*, das erstmals von Benson et al. im Gewebe von Mäusen beschrieben wurde (Benson et al., 2001). Das Protein besteht aus 352 Aminosäuren und hat ein berechnetes Molekulargewicht von ca. 40-50 kDa. Funktionell besitzt es eine *coiled-coil*-Domäne, Leucin-reiche Repeats und mehrere Phosphorylierungsstellen (van den Oord et al., 2003).

Als ubiquitär exprimiertes Protein konnte es bisher verschiedenen zellbiologischen Vorgängen zugeordnet werden. Zum einen bindet es an die Proteine α - und β -*Dystrobrevin*, die wiederum Teile des *dystrophin-associated protein-complex (DPC)* sind (Blake et al., 1998). Im Sarkolemm von Muskelzellen lokalisiert stellt der *DPC* eine transmembranöse Verbindung zwischen Extrazellularraum und Zytoskelett dar. Er besteht aus 3 Untereinheiten, von denen eine Untereinheit, der Dystroglykan-Komplex, an das Protein *Dystrophin* bindet. Dieser ist bei Patienten mit Muskeldystrophie vom Typ Duchenne (*DMD*, OMIM 310200) defizient. Von Bedeutung ist, dass die α -*Dystrobrevin* (OMIM 601239) genannte Isoform im Muskelgewebe vorkommt, wohingegen das β -*Dystrobrevin* ausschließlich in postsynaptischen Bereichen von Neuronen des ZNS lokalisiert ist. Hierdurch konnte gezeigt werden, dass sich der *DPC* im Gehirn- und im Muskelgewebe molekular und funktionell unterscheidet (Blake et al., 1999).

Weiterhin konnte nachgewiesen werden, dass *Dysbindin* am Aufbau des *lysosome-related organelles complex 1 (BLOC1)* beteiligt ist. Dieser beinhaltet u. a. die Proteine *pallidin* (*PLDN*, OMIM 604310), *muted* (*MU*, OMIM 607289) und *cappuccino* (*CNO*, OMIM 605695) und ist am Transport von Vesikeln zu den *lysosome-related organelles* beteiligt (Li et al., 2003). Fehlfunktionen im genannten Komplex spielen in der Entstehung des Hermansky-Pudlak-Syndroms (*HPS*, OMIM 20330) bei Mäusen eine wesentliche Rolle.

1.3.2.3 Spezielle Funktion des *DTNBPI*-Gens im ZNS

Im adulten, humanen Gehirn wurde die Expression von *Dysbindin* auf mRNA-Ebene in den folgenden Geweben beobachtet: frontaler und temporaler Cortex, Hippocampus, Caudatum, Putamen, Nucleus accumbens, Amygdala, Thalamus und Mittelhirn (Weickert et al., 2004). Zusätzlich wies man in Gehirnschnitten von an Schizophrenie erkrankten Personen im dorsolateralen präfrontalen Cortex (*DLPFC*) eine reduzierte Expression von *Dysbindin* nach (Weickert et al., 2004).

In ihrer Studie am Post-mortem-Gehirngewebe von insgesamt 32 schizophrenen Personen und einer gleichen Anzahl von Kontrollen fokussierten sich Talbot et al. auf die Expression von Dysbindin in der Hippocampusformation (*HF*) (Talbot et al., 2004), die nach Scharfman et al. den Hippocampus proper, den Gyrus dentatus und das Subiculum umfasst (Scharfman et al., 2000). Dabei fanden sie *Dysbindin* in den meisten neuronalen Zellarten exprimiert, das Protein war vor allem an terminalen Endigungen von glutamatergen Neuronen lokalisiert, die in der *HF* ihren Ursprung haben. In terminalen Endigungen von Zellen nicht-glutamaterger Neurotransmittersysteme wurde *Dysbindin* nicht gefunden. Bei 73-93% der erkrankten Patienten zeigte sich eine 18-42%ige Abnahme präsynaptischen *Dysbindins* in der *HF* ($p=0,027-0,001$), hier vor allem in der inneren molekularen Schicht des Gyrus dentatus (*DGimL*). Bei den Patienten korrelierte zudem die Abnahme des präsynaptischen *Dysbindins* im *DGimL* invers mit der Konzentration des vesikulären Glutamat-Transporters 1 (*VGluT-1*) (Talbot et al., 2004). Im Hinblick auf den Einfluss von *Dysbindin* auf *BLOC-1*, einem Organellenkomplex, der das Trafficking von lysosomalen Organellen reguliert und u. a. auch *Dysbindin* enthält (Li et al., 2003), postulierten Talbot et al. (2004), dass eine veränderte lysosomale Degradierung des in der *HF* stark exprimierten Glutamat-Transporters *VGluT-1* Einfluss auf den Stoffwechsel von Glutamat im Hippocampus haben könnte, wobei die Bedeutung des Glutamatstoffwechsels in der Genese von schizophrenen Störungen durch klinische und molekulare Forschungsergebnisse zunehmend Bestätigung findet (Moghaddam, 2003).

Durch die Arbeiten an neuronalen Zellkulturen aus murinem cortikalem Gewebe konnten weitere Erkenntnisse zur zellbiologischen Bedeutung von *Dysbindin* im ZNS gewonnen werden. So induzierte die Überexpression von *Dysbindin* eine vermehrte Expression von *synaptosomal-associated protein*, 25 kD (*SNAP25*, OMIM 600322) und *Synapsin I* (*SYN1*, OMIM 313440), beides präsynaptische Proteine, die an der vesikulären Exozytose von Neurotransmittern beteiligt sind. Zusätzlich führte die Überexpression zu einem Anstieg von basalem, extrazellulärem Glutamat und förderte die durch hohe Kalium-Konzentrationen evozierte Glutamat-Freisetzung. Der Einsatz von *small interfering RNA* (*siRNA*) gegen *Dysbindin* mRNA hatte hingegen eine verminderte Expression der Proteine *SNAP25* und *Synapsin I* und eine niedrigere Freisetzung von Glutamat zur Folge (Numakawa et al., 2004). Die Autoren vermuten, dass *Dysbindin* durch Regulation des Exozytose-Apparates Einfluss auf die exozytäre Glutamatfreisetzung hat.

Weiterhin beobachteten die Autoren, dass mit der erhöhten zellulären *Dysbindin*-Konzentration auch der Anteil von phosphoryliertem und somit aktiviertem *Akt* (PKB, OMIM 164730), einer

Proteinkinase, die durch Lipidprodukte der *Phosphatidylinositol-3-Kinase* aktivierbar ist, ansteigt und die Neurone vor durch Serumangel induziertem Stress geschützt werden. Der protektive Effekt ließ sich durch den Zusatz von *LY294002*, einem Inhibitor der *Phosphatidylinositol-3-Kinase* (PI-3-Kinase), hemmen. Unter Verwendung von *Dysbindin* siRNA sank hingegen der Anteil des aktivierten *Akt*, und die neuronale Überlebensfähigkeit bei Serum-Deprivation wurde vermindert (Numakawa et al., 2004). Somit postulieren Numakawa et al., dass *Dysbindin* unter anderem die Überlebenseigenschaften von Neuronen über die *PI-3-Kinase* vermittelte Phosphorylierung von *Akt* beeinflusst.

Die gegenwärtigen Untersuchungsergebnisse deuten zusammengefasst daraufhin, dass *DTNBPI* an der glutamatergen Neurotransmission und an der stressinduzierten Überlebenseigenschaft von Neuronen beteiligt ist. Des Weiteren scheint die Expression von *DTNBPI* in der HF von Patienten vermindert zu sein. Der Hippocampus spielt bei der Verarbeitung von sensorischen Afferenzen eine wesentliche Bedeutung und weist Verbindungen zum Hypothalamus, zu den Septumkernen und dem Gyrus cinguli auf (Kahle, 1991). Somit ist es denkbar, dass eine durch alterierte *Dysbindin*-Expression hervorgerufene Beeinflussung des exzitatorischen, glutamatergen Signalweges in hippocampalen Neuronen Einfluss auf die Verarbeitung von Informationen hat und z. B. zu den an schizophrenen Patienten beobachteten kognitiven Defiziten führt.

1.3.3 Assoziationsuntersuchungen am *DTNBPI*-Gen

Aufgrund der oben beschriebenen Ergebnisse in der Kopplungsregion 6p21-24 untersuchte die Arbeitsgruppe um Straub und Kendler 17 SNPs (*Single Nucleotide Polymorphism*) in einer Region zwischen den Markern D6S260 und D6S1676 (Straub et al., 2002a). In diesem Bereich von 670 kb hatten sich die stärksten Kopplungshinweise mit einem maximalen HLOD-Score von 2,42 gezeigt (Straub et al., 2002b). Als Untersuchungskollektiv fand die oben beschriebene ISHDSF-Stichprobe mit 270 Familien und 1425 Individuen Verwendung. In der familienbasierten Assoziationsstudie zeigten mehrere SNP-Marker innerhalb des *Dysbindin*-Gens signifikante Assoziationshinweise zur schizophrenen Störung (siehe Abbildung 3), wobei die SNPs P1635 ($p=0,00004$) und P1320 ($p=0,0004$) am stärksten assoziiert waren. In der Haplotyp-Analyse waren zahlreiche 3-Marker-Haplotypen signifikant assoziiert ($p=0,008-0,0001$). Für die 3-Marker-Haplotypen bestehend aus den SNPs P1635-P1325-P1765 und P1325-P1765-P1575 ergaben sich hierbei mit $p=0,0006$ und $p=0,0001$ die stärksten Assoziationshinweise (Straub et al., 2002a).

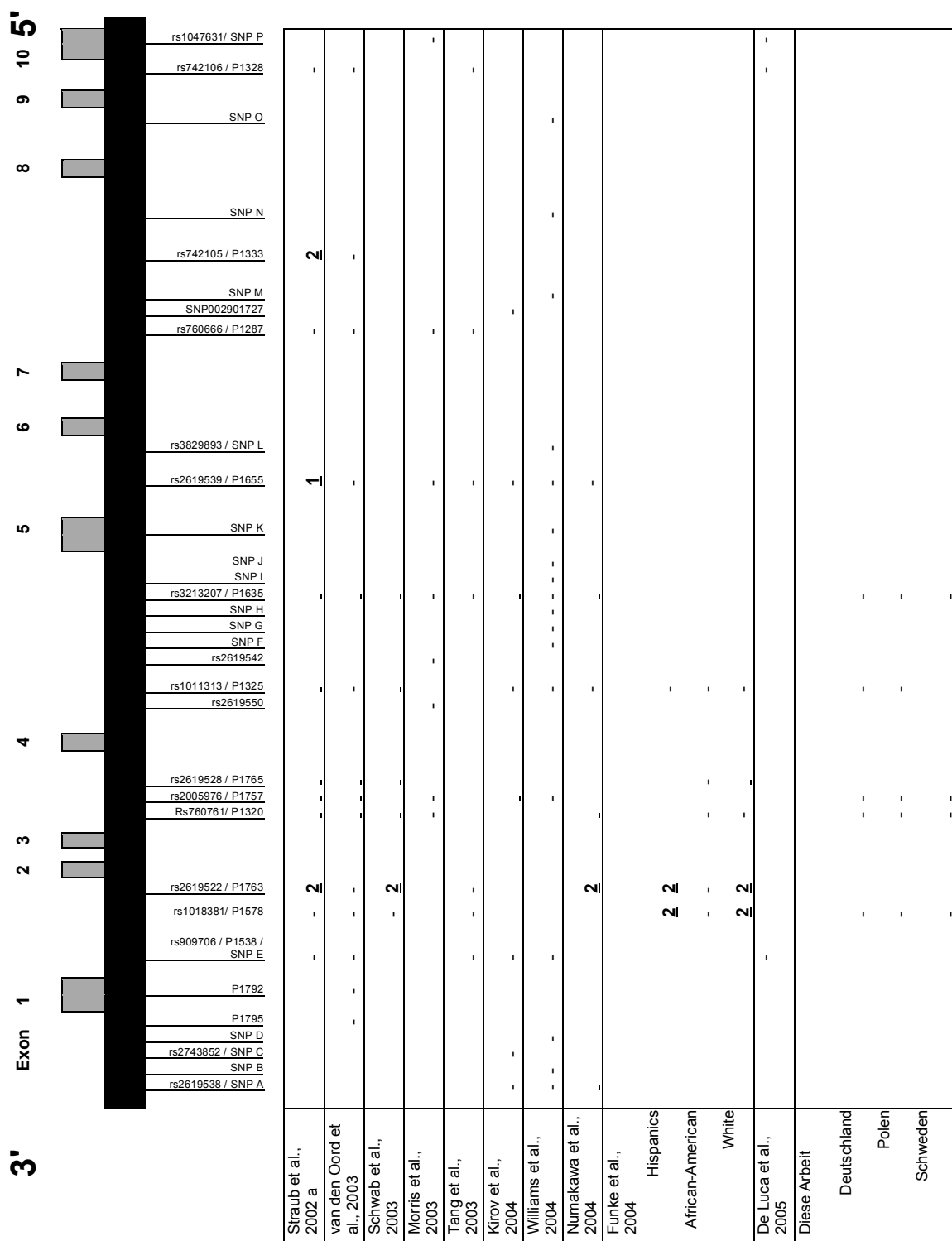


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Exon-Intron-Struktur des *DTNBPI*-Gens auf 6p21-24, Position der genetischen Varianten und Ergebnisse bisheriger Einzelmarkeruntersuchungen. 1=positive Assoziation des häufigeren Allels, 2=positive Assoziation des selteneren Allels, -= keine Assoziation. Die Darstellung der Marker- und Exon-Intron-Abstände orientiert sich an den physikalischen Abständen. Die Informationen sind dem UCSC Genome Browser on Human entnommen (July 2003 Assembly, NM_183040).

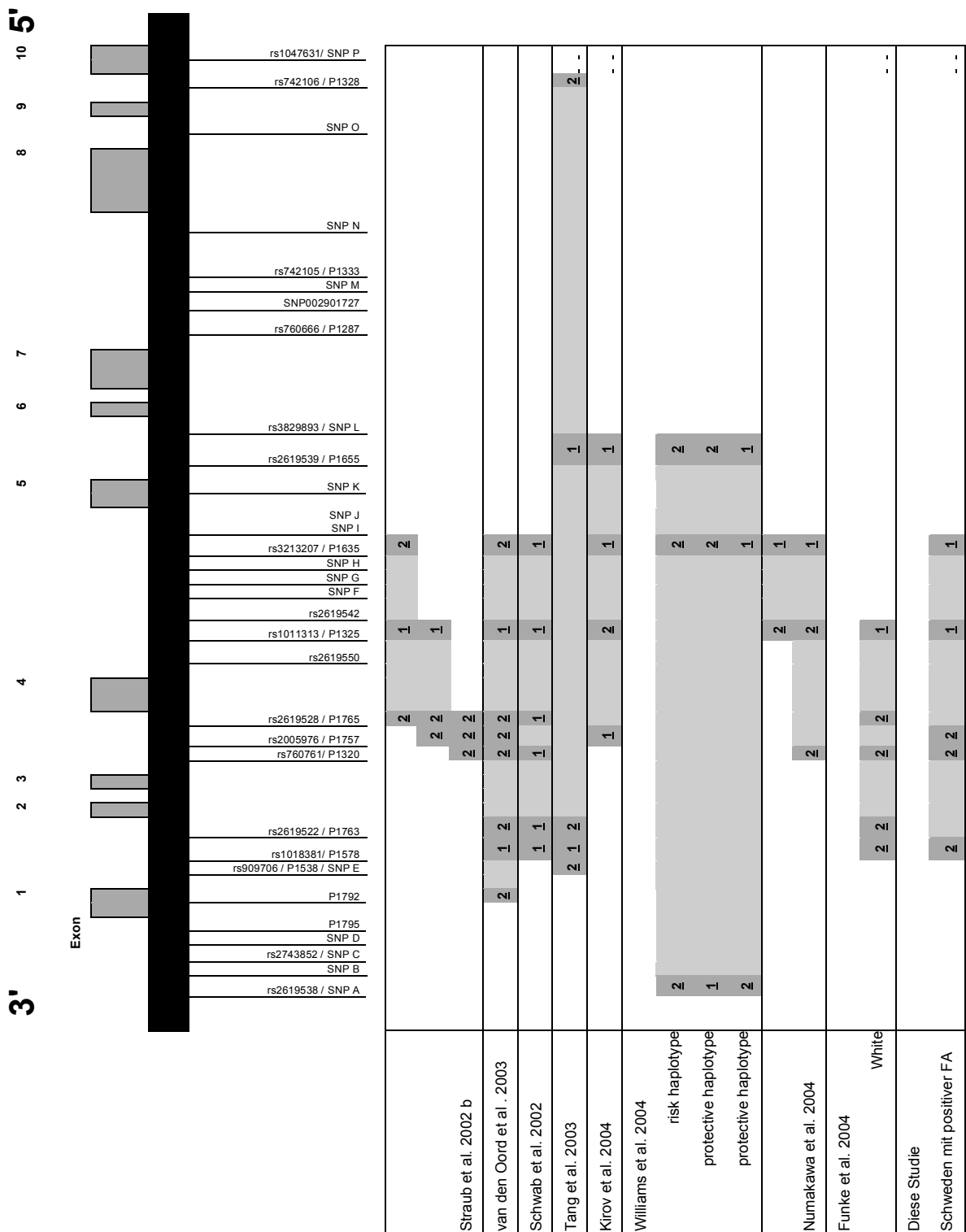


Abbildung 3: Schematische Darstellung der Exon-Intron-Struktur des DTNBP1 Genes auf 6p24-22, Position der genetischen Marker und Ergebnisse bisheriger Haplotypenanalysen. 1= positive Assoziation des häufigeren Allels, 2= positive Assoziation des selteneren Allels, - = fehlende Assoziation. Die Darstellung der Marker- und Exon-Intronabstände orientiert sich an den physikalischen Abständen. Informationen: UCSC Genome Browser on Human, July 2003 Assembly, NM_183040.

In einer weiterführenden Analyse untersuchte die gleiche Arbeitsgruppe im ISHDSF-Kollektiv 268 Familien (insgesamt 2368 Individuen). Hierbei wurden 12 der bereits im o. g. Kollektiv typisierten und 2 neu identifizierte SNPs im Bereich des *DTNBPI*-Locus genotypisiert (van den Oord et al., 2003). In den *Pedigree Disequilibrium Test* (PDT), *Transmission Disequilibrium Test* (TDT) und *Sibling Disequilibrium Test* (SDT) ergaben sich für die benachbarten SNPs P1320, P1757, und P1635 signifikante Assoziationshinweise zur schizophrenen Störung, wobei die beiden SNPs P1325 und P1765 nicht assoziiert waren (siehe Abbildung 3), (van den Oord et al., 2003). In der anschließenden Analyse zur Haplotyp-Blockstruktur zeigte sich LD zwischen den Markern P1635 und P1792. In diesem aus 8 SNPs bestehenden Haplotypblock (siehe Abbildung 3) fanden sich zahlreiche Haplotypen, wobei sich im Familienkollektiv 96% der Haplotypen durch die sechs häufigsten Haplotypen beschrieben ließen. Bei den daraufhin durchgeführten *PDT*-Analysen konnte ein Haplotyp als Risikohaplotyp identifiziert werden ($p=0,002$), der auf genomischer Ebene einen Bereich von ungefähr 30 kb umfasst (van den Oord et al., 2003). Der Risikohaplotyp hat unter den beobachteten Haplotypen eine relativ geringe Frequenz von 6% und besteht an den meisten Loci aus dem selteneren Allel. Entsprechend fanden sich auch bei den einzelnen SNPs die Allele mit der niedrigeren Frequenz assoziiert (van den Oord et al., 2003).

In einer Replikationsstudie untersuchten Schwab et al. 6 der von Straub et al. untersuchten SNPs an 78 Sib-Pair-Familien und 125 Trios (Schwab et al., 2003). Die *Sib-Pair*-Familien waren deutscher, israelischer (Aschkenazi- und Nicht-Aschkenazi-Juden, Araber) und ungarischer Herkunft, die Trios stammten aus Deutschland und Ungarn. Bei den 6 Polymorphismen handelt es sich um die SNPs P1635, P1325, P1765, P1320, P1768 und P578, die zwischen Exon 1 und Exon 5 des Dysbindin-Gens lokalisiert sind, die Distanz zwischen ihnen beträgt auf genomischer Ebene 36,2 kb (siehe Abbildung 3). Bei der Einzelmarker-Analyse waren alle Marker außer P1578 signifikant bis hochsignifikant mit der schizophrenen Störung assoziiert, SNP 1320 zeigte hierbei den stärksten Assoziationshinweis ($p=0,0007$) (Schwab et al., 2003). Die Haplotyp-Analyse ergab, dass die Haplotypen die stärkste Assoziation zeigten, die den SNP P1325 enthielten. Den signifikantesten p-Wert erhielt die Arbeitsgruppe für den 2-Marker-Haplotyp P1325-P1320 ($p=0,00002$, siehe Tabelle 3). Im Gegensatz zu den Befunden von Straub et al. (2002b) und van den Oord et al. (2003) wurde in den Populationen aus Deutschland, Ungarn und Israel der Haplotyp am häufigsten an die Patienten weitergegeben (Risikohaplotyp), der zum einen die höchste beobachtete Frequenz im Vergleich zu den anderen Haplotypen zeigte und an

den jeweiligen Loci aus dem häufigsten Allel bestand (siehe Abbildung 4) Entsprechend fanden sich in der Einzelmarker-Analyse auch die häufigeren SNPs assoziiert. Den Gegensatz zum irischen Kollektiv, in dem die selteneren Allele Assoziation zeigten, führen die Autoren darauf zurück, dass die unterschiedlichen Risikohaplotypen (und damit auch die disponierenden Varianten) jeweils populationsspezifischen Ursprungs sind (Schwab et al., 2003).

Interessanterweise ergaben sich bei einer unabhängigen Untersuchung, der ebenfalls ein irisches Kollektiv bestehend aus 219 Patienten mit schizophrener Störung und 231 Kontrollen zugrunde gelegt wurde, zunächst keine Assoziationshinweise. Insgesamt wurden 8 Marker genotypisiert, von denen 5 zuvor bei Straub et al. (2002b) untersucht wurden. Für keinen der Marker ließen sich Assoziationshinweise finden, auch die Haplotyp-Analysen (2-, 3- und 4-Marker-Haplotypen) ergaben negative Befunde (Morris et al., 2003). Auch wenn bei dieser Untersuchung keine Assoziation identifiziert wurde, waren die Allelfrequenzen der einzelnen SNPs in diesem Kollektiv vergleichbar mit denen im ISHDSF-Kollektiv von Straub et al. (2002b), der genetische Hintergrund beider irischen Kollektive scheint somit identisch zu sein.

Das beschriebene irische Fall-Kontroll-Kollektiv (219 Patienten mit schizophrener Störung versus 231 Kontrollen, sog. Dublin-Sample) wurde daraufhin von einer anderen Arbeitsgruppe im Rahmen einer erweiterten Assoziationsstudie untersucht. Zusätzlich legte die Gruppe ihren Analysen eine zweite Fall-Kontroll-Stichprobe bestehend aus 708 schizophrenen Patienten und 711 Kontrollen britischer Herkunft zugrunde (sog. Cardiff-Sample). Insgesamt wurden 20 SNP-Marker genotypisiert, hiervon fanden 4 SNPs bereits bei den Untersuchungen von Straub et al. (2002b) Verwendung, die restlichen 16 SNPs waren von der Arbeitsgruppe neu identifiziert worden (7 SNPs) oder aus den öffentlichen Datenbanken (NCBI dbSNP) entnommen (9 SNPs). 11 der untersuchten Varianten liegen in putativen Promoterregionen. Die 2 exonisch lokalisierten SNPs werden nicht translatiert, sie liegen in UTRs (untranslatierte Region). Die von Straub et al. (2002b) untersuchten Marker P1655, P1635, P1325 und P1757 lieferten in keinem der beiden Kollektive signifikante Assoziationshinweise. Auch die Haplotyp-Analyse unter Zugrundelegen dieser Marker ergab negative Befunde (Williams et al., 2004). Allerdings zeigten sich bei 2 SNPs, die in dieser Studie erstmals untersucht wurden, signifikante Assoziationshinweise in beiden Kollektiven (SNP C und J mit jeweils $p=0,03$) und in der anschließend durchgeführten Haplotyp-Analyse waren ein Drittel aller untersuchten Haplotyp-Kombinationen assoziiert ($p<0,05$). Die stärkste Assoziation ergab sich für die Haplotyp-Kombination P1655-P1635-SNP*A. Der Haplotyp bestehend aus den Allelen C-G-T kam im Cardiff-Sample ($p=0,006$) und

der Haplotyp bestehend aus den Allelen C-A-A kam im Cardiff- ($p < 0,001$) sowie im Dublin-Sample ($p = 0,006$) signifikant häufiger bei den Kontrollen vor ("Protektive Haplotypen"). Der Haplotyp mit den Allelen C-A-T kam hingegen signifikant häufiger bei den Patienten vor (Cardiff-Sample $p = 0,01$, Dublin-Sample $p = 0,02$) und wurde als Risikohaplotyp identifiziert (siehe Abbildung 3) (Williams et al., 2004).

Eine weitere Assoziationsuntersuchung an einem Kollektiv europäischer Herkunft wurde von Kirov et al. durchgeführt. Sie untersuchten 488 bulgarische Trio-Konstellationen mit einem erkrankten Indexpatienten und 8 SNP-Marker, 4 davon waren bereits von Straub et al. (2002b) untersucht worden (Kirov et al., 2004). In der Einzelmarker-Analyse zeigten sich die Marker P1635 und P1757 signifikant mit der schizophrenen Störung assoziiert ($p = 0,009$ bzw. $p = 0,013$). Bei der Haplotyp-Analyse zeigten zahlreiche Haplotypen positive Assoziation zum Erkrankungsstatus, 6 Haplotyp-Kombinationen ergaben einen p -Wert $< 0,001$. Der 2-Marker-Haplotyp P1655-P1635 zeigte hierbei die stärkste Assoziation ($p = 0,00027$), wobei der 4-Marker-Haplotyp P1655-P1635-P1325-P1757 mit $p = 0,0007$ ebenfalls hochsignifikant assoziiert war (siehe Abbildung 3) (Kirov et al., 2004).

Dass dem DNTBP1-Locus auch am Entstehungsprozess schizophrener Störungen in asiatischen Populationen eine Bedeutung zukommt, konnten zwei unabhängige Untersuchungen zeigen. In einer familienbasierten Assoziationsuntersuchung wurden 7 SNPs, die auch von Straub et al. (2002b) untersucht wurden und einen Bereich von 140 kb umfassen, an 233 chinesischen Trio-Kollektiven mit schizophrener Störung (173 aus Shanghai, 60 aus Xi'an) genotypisiert (Tang et al., 2003). Hierbei zeigten die Haplotyp-Kombinationen P1328-P1655-P1763-P1578-P1583 und P1655-P1763-P1578-P1583 signifikante bis hochsignifikante Assoziationen ($p = 0,01$ bzw. $p = 0,00091$, siehe auch Abbildung 3) (Tang et al., 2003). Bei dem identifizierten Risikohaplotyp in der chinesischen Population handelt es sich um einen Haplotyp, der in keiner bislang untersuchten europäischen Population beobachtet wurde, was auf die verschiedenen genetischen Hintergründe in den jeweiligen Populationen zurückzuführen ist. In einer weiteren Studie an einer asiatischen Population genotypisierten Numakawa et al. 6 zuvor von anderen Gruppen untersuchte SNPs (P1655, P1635, P1325, P1320, P1763, SNP*A). Das Kollektiv umfasste 670 schizophrene Patienten und 588 Kontrollen aus Japan. Die Marker SNP*A, P1635, P1320 und P1763 zeigten signifikante Assoziation, P1635 lieferte hierbei den stärksten Hinweis ($p = 0,0013$) (Numakawa et al., 2004). Alle Haplotyp-Kombinationen außer dem 2-Marker-Haplotypen 1320-P1763 waren signifikant assoziiert. Der Haplotyp P1635-P1325, bestehend aus den Allelen G-G,

ergab eine hochsignifikante Assoziation mit einem p-Wert von $p=0,0042$ und stellt den Risikohaplotypen dar (Numakawa et al., 2004).

Eine weitere Arbeit (Funke et al., 2004) untersuchte 7 SNPs von Straub et al. (2002b) an insgesamt 3 Kollektiven kaukasischer (258 Fälle, 467 Kontrollen), afro-amerikanischer (215 Fälle, 74 Kontrollen) und hispanischer Herkunft (51 Fälle, 32 Kontrollen). In der kaukasischen Gruppe waren 4 SNPs (P1578, P1763, P1765, P1320) mit Schizophrenie bzw. schizophrenieformer Störung assoziiert. P1578 zeigte mit einem p-Wert von 0,0026 die stärksten Ergebnisse. Im hispanischen Kollektiv waren die gleichen SNPs assoziiert, allerdings ergaben sich hier für P1765 die niedrigsten p-Werte. In der afro-amerikanischen Gruppe zeigte keiner der untersuchten Marker eine signifikante Assoziation. In der Haplotypanalyse fand sich nur im kaukasischen Kollektiv ein assoziierter Haplotyp bestehend aus den Markern P1583-P1578-P1763-P1320-P1765-P1325. Hier war die Allelkombination C-T-C-T-A-C signifikant überrepräsentiert ($p=0,005$).

Da sich bei den dargestellten Analysen keine positiven Assoziationshinweise mit Varianten ergaben, die von ersichtlicher funktioneller Relevanz sind, führten Bray et al. (2005) mit der Hypothese, dass die *DTNBPI*-Genregulation bei schizophrenen Patienten verändert ist, allelspezifische Expressionsanalysen durch. Dabei untersuchten sie die zerebrale Expression des in der 5'-UTR gelegenen SNP rs1047631 an post-mortem-Gehirngewebe. Ein Kollektiv umfasste 149 Personen kaukasischer Herkunft (London, UK; Bethesda, USA; Stockholm, Schweden; 86 Männer, 63 Frauen). Von diesen Personen hatten 86 keine psychiatrische Erkrankung, 22 Patienten waren an Morbus Alzheimer, 14 an einer bipolar affektiven Störung, 12 an einer Schizophrenie und 15 an einer unipolaren Depression erkrankt. Ein weiteres Kollektiv bestand aus 60 Personen mit verschiedenen neuropsychiatrischen Erkrankungen und unterschiedlicher ethnischer Herkunft (Bray et al., 2005). Im ersten Kollektiv zeigten sich 39 Personen heterozygot für den untersuchten SNP. Im Gewebe dieser Individuen fand sich eine im Durchschnitt um 14% verminderte Expression des A-Allels ($p=0,0005$). Diese Befunde konnten im zweiten Sample an den für rs1047631 informativen Personen mit einer Reduktion der Expression des A-Allels um durchschnittlich 12% bzw. 11% (Region BA10 bzw. BA20) bestätigt werden (Bray et al., 2005). In einer Zusatzanalyse unter Zugrundelegen von Haplotypen zeigte das Transkript des 3-Marker-Haplotyps SNP A-P1635-rs1047631 mit den Allelen T-A-A (Risikohaplotyp) eine durchschnittliche Reduktion der Expression des A-Allels von rs1047631 um 21% (range: 0,64-0,98) vs. einer durchschnittlichen Reduktion von 8% (range: 0,73-1,07) bei Nichtträgern des

Risikohaplotypen. (Bray et al., 2005). Die Ergebnisse deuten auf disponierende Genveränderungen in *cis-acting* Elementen des *DTNBPI*-Gens, die Einfluss auf die allelspezifische Expression von Dysbindin haben.

Unter Betrachtung des putativen regulatorischen *DTNBPI*-Bereichs führte De Luca et al. (2005) daraufhin eine Assoziationsuntersuchung mit 3 im UTR gelegenen Markern des *DTNBPI*-Genes durch. In den 117 Familien kaukasischer (n=106), afrikanischer (n=2) und asiatischer (n=9) Herkunft fanden sich weder für den in der 5'-UTR (untranslatierte Region) lokalisierten SNP rs909706 noch für die in der 3'-UTR liegenden SNPs rs1047631 und rs742106 Assoziationshinweise zur Schizophrenie (De Luca et al., 2005). Bei SNP rs1047631 handelt es sich um die Variante, die zuvor von Bray et al. (2005) im Rahmen ihrer allelspezifischen Expressionsanalyse untersucht wurde.

Zusammenfassend ergaben sich – unabhängig von den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit – bis zum gegenwärtigen Zeitpunkt in 8 unabhängigen Kollektiven signifikante Assoziationshinweise zwischen genetischen Varianten am *DTNBPI*-Locus und schizophrenen Störungen. Es muss davon ausgegangen werden, dass dem *DTNBPI*-Locus eine Bedeutung am Entstehungsprozess schizophrener Störungen zukommt und es sich nicht um falsch-positive Ergebnisse handelt, wie sie auf dem Gebiet der genetisch-komplexen Erkrankungen in der Vergangenheit häufig beschrieben wurden. Die disponierende Variante am DTNBP-Locus ist allerdings bislang nicht identifiziert worden. Der Nachweis, dass es sich bei dem DTNBP-Gen um ein Suszeptibilitätsgen für schizophrene Störungen handelt, steht somit auf funktioneller Ebene noch aus. So besteht weiterhin die Möglichkeit, dass nicht das *DTNBPI*-Gen selbst, sondern (eine) Variante(n) in einem benachbarten Gen und/oder (eine) Variante(n) in einem regulatorischen Element, das für ein weiter entfernt liegendes Gen verantwortlich ist, für die dargestellten Befunde verantwortlich ist (sind). Die assoziierten Varianten müssten dann in LD zu der disponierenden Variante in anderen Genen bzw. regulatorischen Bereichen liegen. Der Effekt auf den Krankheitsphänotyp, der von der Risikovariante am *DTNBPI*-Locus ausgeht, scheint dabei eher moderat zu sein. So berichten Schwab et al. (2003) für P1325 einen *relative risk ratio* von 2,25. Bei den Untersuchungen von Williams et al. (2004) ergab sich im Dublin-Sample für den Haplotypen P1655-P1635-SNP A eine OR von 1,4. Und Funke et al. (2005) bezifferten die OR für P1578 im gesamten Kollektiv auf 1,76.

2 Fragestellung

Das *DTNBPI*-Gen in der chromosomalen Region 6p22.3 stellt aufgrund seiner positionellen, funktionellen Bedeutung und der initialen Assoziationsbefunde von Straub et al. (2002b) und van den Oord et al. (2003) ein geeignetes Kandidatengen für die Entstehung von schizophrenen Störungen dar. Replikationsuntersuchungen kommt dabei eine besondere Bedeutung zu, um die bei Assoziationsanalysen bestehende Möglichkeit eines falsch-positiven Ergebnisses auszuschließen. Darüberhinaus ermöglichen sie, den möglichen Krankheitsbeitrag in anderen ethnischen Bevölkerungsgruppen zu erfassen, tragen ggf. zur Identifikation der disponierenden genetischen Veränderung bei und lassen detaillierte Aussagen zur Genotyp-Phänotyp-Korrelation zu.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden 5 im *DTNBPI*-Gen lokalisierte SNPs (P1635, P1325, P1757, P1320, P1578) untersucht, durch die der von van den Oord (2003) zuvor identifizierte Risikohaplotyp im *DTNBPI*-Gen erfasst wird. Unser Untersuchungskollektiv bestand aus drei Fall-Kontroll-Stichproben mit unterschiedlicher ethnischer Herkunft (Deutschland, Polen, Schweden). Da die von Straub et al. (2002b) und van den Oord et al. (2003) beobachteten Assoziationshinweise an Kollektiven erhoben wurden, die sich aus Familien mit zuvor identifizierten Kopplungshinweisen auf 6p23 zusammensetzten, sollte bei unserer Analyse zudem untersucht werden, ob dem *DTNBPI*-Locus bei schizophrenen Störungen mit positiver Familiengeschichte eine besondere Bedeutung zukommt. Hierfür sollte eine detaillierte Analyse einzelner Sub-Kollektive durchgeführt werden, die hinsichtlich positiver Familienanamnese für schizophrene Störungen stratifiziert werden konnten.

Somit liegt der Beitrag der vorliegenden Arbeit darin, die Bedeutung des *DTNBPI*-Locus am Entstehungsprozess schizophrener Störungen zu erfassen.

3 Material

3.1 Untersuchungskollektive

Das Untersuchungskollektiv dieser Studie umfasste insgesamt 854 Patienten, die an Störungen aus dem schizophrenen Formenkreis erkrankt waren, und 670 gesunde Personen. Die Probanden stammten der Herkunft nach aus Deutschland, Schweden und Polen (drei unterschiedliche ethnische Populationen).

Das deutsche Kollektiv umfasste insgesamt 703 Personen, die an der Klinik für Psychiatrie des Universitätsklinikums Bonn rekrutiert wurden. Die Patienten waren an einer schizophrenen (n=336), schizophrenieformen (n=7) oder schizoaffektiven (n=75) Störung erkrankt. 219 Patienten (52,4%) waren weiblichen, 199 Patienten (47,6%) männlichen Geschlechts. Die Kontrollgruppe bestand aus insgesamt 285 Personen, davon waren 113 Frauen (39,7%) und 172 Männer (60,3%) (siehe Tabelle 2). Es handelte sich um gesunde Blutspender und Studenten aus der Region Bonn.

Die Diagnosen wurden durch erfahrene Psychiater unter Berücksichtigung der DSM-IV Kriterien (American Psychiatric Association. Task Force on DSM-IV., 1994) gestellt und basierten zudem auf dem *Structured Clinical Interview for DSM-IV* (SCID-I) (American Psychiatric Association. Task Force on DSM-IV., 1994; First MB, 1997), der Krankengeschichte und der Familienanamnese (siehe Tabelle 2).

Das polnische Kollektiv bestand aus 407 Personen, hiervon waren 294 Patienten an einer schizophrenen (n=291) und schizoaffektiven (n=3) Störung erkrankt. 113 Personen waren gesund (Kontrollgruppe). Die Patientengruppe bestand aus 120 Frauen (40,8%) und 174 Männern (59,2%), die Kontrollgruppe aus 71 Frauen (62,8%) und 42 Männern (37,2%) (siehe Tabelle 2). Alle Personen stammten aus Poznan, Polen, (Abteilung für Psychiatrie, Universität Poznan, Polen). Die Diagnosen wurden gemäß der für das deutsche Kollektiv beschriebenen Kriterien gestellt.

Das schwedische Kollektiv umfasste 414 Individuen. Die Patienten waren an einer schizophrenen (n=130), schizophrenieformen (n=5) oder schizoaffektiven (n=7) Störung erkrankt. In der Patientengruppe fanden sich 54 Frauen (38,0%) und 88 Männer (62,0%). Die Kontrollen (n=272) setzten sich aus 123 Frauen (n=45,2%) und 149 Männern (54,8%) zusammen (siehe Tabelle 2). Das Kollektiv wurde durch die Abteilung für Psychiatrie am Karolinska Institut und Krankenhaus, Stockholm, Schweden, gesammelt. Die Diagnosen in der schwedischen Gruppe

basierten auf den DSM-III-R-Kriterien (American Psychiatric Association. Work Group to Revise DSM-III., 1987).

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

Tabelle 2: Patientenkollektive der vorliegenden Arbeit

	Patienten						Kontrollen									
	gesamt		männlich		weiblich		schizophrene Störung	Schizophrenie- forme Störung		schizoaffektive Störung		gesamt	männlich		weiblich	
	n	N	%	n	%	n		%	N	%	n		%	n	%	n
Deutsche	418	199	47,6	219	52,4	336	80,4	7	1,7	75	17,9	285	172	60,4	113	39,6
Polen	294	174	59,2	120	40,8	291	99,0	3	1,0	0	0,0	113	42	37,2	71	62,8
Schweden	142	88	62,0	54	38,0	130	91,5	5	3,5	7	4,9	272	123	45,2	149	54,8

3.2 Geräte

Autoklav	Varioklav Dampfsterilisator Typ 500 EP-Z, H+P Labortechnik, Oberschleißheim
Elektrophoresekammern	GNA 200, Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden Multigel-Long, Biometra, Göttingen
Gel-Dokumentations-Systeme	Digit-Store Duo, Intas, Göttingen
Magnetrührer	IKA RH 464995, Staufen i. Br.
Multipipetten	PreCision, Biozym, Hess. Oldendorf
PCR-Geräte	PTC-200, MJ Research, Watertown, Massachusetts, USA
Photometer	Genequant II, Pharmacia Biotech, Cambridge
Pyrosequencing-Gerät	PSQ96, Pyrosequencing AB, Uppsala, Schweden
Pyrosequencing Reagentien-Behälter	PSQ 96 Reagent Cartridge, Pyrosequencing AB, Uppsala, Schweden
Schüttler	IKA MTS 2/4 multiwell plate shaker Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München

Spannungsgeräte	Gene Power Supply 200/400, Pharmacia Biotech, Freiburg
Trockenschrank	T 20, Heraeus, Hanau
Unterdruckfilter	Multi Screen Resist manifold, Millipore, Eschborn
Vortex-Mixer	REAX 1 DR, Heidolph, München
Waage	SBC 52, Scaltec, Heiligenstadt
Zentrifugen	Centrifuge 5415 D, Eppendorf, Hamburg Megafuge 1.0 R, Heraeus, Osterode

3.3 Chemikalien

Amersham Biosciences, Eschborn	Streptavidin-coated sepharose beads
ICN Biomedicals, Aurora, Ohio	Tris
Life Technologies Gibco BRL, Karlsruhe	Agarose, 10x TBE
Merck, Darmstadt	Borsäure, Bromphenolblau, Ethanol, Natrium-EDTA
Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden	Ficoll 400
Pyrosequencing AB, Uppsala, Schweden	Pyro Gold Reagents
Riedel de Haen, Seelze	Isopropanol
Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen	Agarose, Desoxy-Nukleosidtriphosphate (dNTPs), DMSO

3.4 Enzyme und Längenstandards

Life Technologies Gibco BRL, Eggenstein	100 bp DNA-Leiter, Taq-Polymerase
Pyrosequencing AB, Uppsala, Schweden	PSQ 96 SNP Reagent Kit

3.5 Sonstiges

Filterplatten	Millipore Ultracell YM, Multiscreen Plate, Millipore, Eschborn
PCR-Platten	Thermowell 96 Well Plate, Corning Costar, Bodenheim

	PSQ 96 Plate, Pyrosequencing AB, Uppsala, Schweden
Reaktionsgefäße	Eppendorf, Hamburg
Pyrosequencing-Software	PSQ 96MA System SNP/SQA, PSQ 96MA SNP Software v2.1, Pyrosequencing AB, Uppsala, Schweden

4 Methoden

4.1 Isolierung und Aufbereitung humaner DNA

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

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

Reagenzien:

Frischblutlysispuffer:	155 mM NH ₄ Cl
	10 mM KHCO ₃
	0,1 mM EDTA
Kernlysispuffer (pH 8,2):	10 mM Tris-HCl (pH 8,0)
	400 mM NaCl
	2 mM EDTA (pH 8,0)
1x Tris-EDTA (TE):	10 mM Tris
	1mM EDTA

4.1.1 Photometrische Konzentrationsbestimmung und Überprüfung der Reinheit isolierter genomischer DNA

Die Reinheitsbestimmung der isolierten DNA erfolgt durch spektrophotometrische Messung bei 260 und 280 nm. Die DNA weist bei 260 nm ihr Absorptionsmaximum auf. Proteine, Ethanol sowie in der Lösung verbliebenes NaCl absorbieren maximal bei 280 nm. Mit Hilfe des Lambert-Beerschen-Gesetzes lässt sich aus der optischen Dichte bei 260 nm die DNA-Konzentration errechnen. Der Quotient der Absorption bei 260 nm und 280 nm lässt Aussagen über die Reinheit der isolierten DNA zu. Werte zwischen 1,7 und 1,9 zeigen an, dass die DNA in sehr reiner Form vorliegt. Bei kleinerem Quotienten ist die DNA verunreinigt und sollte nochmals gefällt werden. Ein Quotient über 1,9 weist auf RNA-Rückstände hin, so dass die DNA-Konzentration geringer als der ermittelte Wert ist.

4.2 Das Prinzip der Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

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

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

Die PCR läuft in drei Schritten ab:

1. Hitze-Denaturierung der Matrizen-DNA bei 95° C,
2. Hybridisierung der Primer an die DNA-Matrize bei 45-72°C (*annealing*),
3. Synthese des Komplementärstranges durch die thermostabile Taq-Polymerase bei 72°C (Elongation).

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

Die Qualität des PCR-Produktes ist vor allem von der Spezifität der verwendeten Primer abhängig. Ihre Basensequenzen sollten im menschlichen Genom einmalig sein. Mit steigender Annealing-Temperatur steigt die Wahrscheinlichkeit, dass der Primer sich an die exakt komplementäre Basensequenz der DNA-Matrize bindet. Unspezifische Bindung resultiert in der Amplifikation zusätzlicher, unerwünschter DNA-Abschnitte, mit verminderter Qualität der PCR-Produkte. Bei zu hohen Annealing-Temperaturen hingegen hybridisieren die Primermoleküle unzureichend mit der DNA-Matrize und es resultiert eine verminderte Amplifikation.

Ein PCR-Reaktionansatz enthält grundsätzlich die folgenden Komponenten:

1. die Matrizen-DNA,
2. ein Paar gegenläufig orientierter Primer (Oligonukleotide),
3. PCR-Puffer,
4. $MgCl_2$,
5. ein Gemisch der vier Desoxy-Nukleosidtriphosphate (dNTPs),
6. thermostabile DNA-Polymerase.

4.2.1 PCR von genomischer DNA für die Pyrosequencing-Reaktion

Die PCR-Ansätze haben ein Volumen von 50 μ l. Als Basiskomponenten werden folgende Reagenzien verwendet:

Genomische DNA	20 ng/ μ l
10x PCR-Puffer	200 mM Tris/HCl (pH 8,4) 500 mM KCl

Magnesiumchlorid	50 mM
Nukleotidgemisch	1,25 mM dATP 1,25 mM dCTP 1,25 mM dGTP 1,25 mM dTTP
Taq-DNA-Polymerase	5 U/ μ l
Primer	10 pmol/ μ l, Vorwärts- bzw. Rückwärtsprimer am 5'-Ende biotinyliert
H ₂ O	deionisiert und autoklaviert

Die PCR-Ansätze sind wie folgend zusammengesetzt:

	Mengenangaben	Endkonzentration
PCR-Mix	5,0 μ l 10x PCR-Puffer	1 x
	1,5 μ l MgCl ₂	1,5 mM
	8,0 μ l Nukleotidgemisch	0,2 mM je dNTP
	0,5 μ l Taq-DNA-Polymerase	1 U/25 μ l
	2,5 μ l Vorwärtsprimer	0,5 pmol/ μ l
	2,5 μ l Rückwärtsprimer	0,5 pmol/ μ l
	2,5 μ l DMSO	5%
	17,5 μ l H ₂ O	
Genomische DNA	10,0 μ l	4,0 ng/ μ l
Endvolumen	50,0 μ l	

Alle Komponenten des PCR-Mixes werden in ein gemeinsames Gefäß pipettiert und zur homogenen Verteilung der einzelnen Komponenten mit dem Vortex-Mixer gemischt. Jeweils 16 μ l dieses Mixes werden in die Reaktionsgefäße pipettiert, und anschließend wird 4 μ l der genomischen DNA zugegeben. Die PCR-Reaktion erfolgt nach folgendem Programm im Thermocycler:

	5 min	95°C	Initialer Denaturierungsschritt
	60 sec	95°C	Denaturierung
34 Zyklen	60 sec	55°C-63°C	Primer-Annealing
	90 sec	72°C	Primer-Verlängerung
1 Zyklus	10 min	72°C	Finaler Verlängerungsschritt

Zur Gewinnung von PCR-Produkten hoher Qualität werden für alle untersuchten Polymorphismen sog. Gradienten-PCR-Reaktionen durchgeführt und anschließend die Qualität und die Ausbeute der Reaktionen mit Hilfe der Gelelektrophorese auf einem 1%igem Agarosegel überprüft. Somit wird für jedes Fragment die optimale Annealing-Temperatur ermittelt.

Eine weitere Methode zur Qualitätssteigerung ist die Verwendung von Substanzen wie Glycerin oder DMSO (Dimethylsulfoxid). DMSO verbessert sowohl die Qualität als auch die Quantität der PCR-Produkte (Filichkin und Gelvin, 1992) und wird daher grundsätzlich zu allen PCR-Ansätzen in einer Konzentration von 5% hinzugefügt.

Die Tabelle 3 gibt eine Übersicht über die SNPs, die zur dsDNA-Herstellung und Primer-Extensionsmethode benutzt wurden. Zudem sind ihr Informationen über die Primersequenzen und PCR-Bedingungen zu entnehmen, die im Rahmen der molekulargenetischen Untersuchungen Verwendung fanden..

Tabelle 3: Primer zur Genotypisierung der untersuchten Marker am DTNBP1-Locus

SNP	Poly-morphismus	Primerbezeichnung	Primersequenz 5' - 3'	Fragmentlänge	annealing T
P1635/ rs3213207	G/A	P1635F	gccagtttctcaaaattcc	253 bp	58°C
		P1635R_biotin	ccctgtttaagcagaccatgt		
		P1635Extension_F	Ccttcgtaaagcca		
P1325/ rs1011313	A/G	P1325F_biotin	agtcatgaatgtgtgatgg	250 bp	55°C
		P1325R	gacgccaagtactgcacac		
		P1325Extension_R	Tgtttcatgcccaact		
P1757/ rs2005976	A/G	P1757F	caaccccatgaagaaataggc	224 bp	57°C
		P1757R_biotin	ggctggctcaaaactcctga		
		P1757Extension_F	Acaatgaggccggt		
P1320/ rs760761	C/T	P1320F	tgcatctttccaatcca	240 bp	57°C
		P1320R_biotin	ttctggatacatgtgttctca		
		P1320Extension_F	atataacatcaaaagcacia		
P1578/ rs1018381	C/T	P1578F_biotin	gattggatgtgccttatgaaa	192 bp	58°C
		P1578R	ttgagtactacaatgactgctgaga		
		P1578Extension_R	Gccggtgattcaaca		

4.3 Agarose-Gelelektrophorese

Reagenzien:

10x TBE-Puffer:	500 mM Tris 500 mM Borsäure 20 mM EDTA, pH 8,0
Ethidiumbromid:	10 mg/l in Aqua dest.
Probenpuffer:	2,5x TBE 20% Fixcoll 0,1% Bromphenolblau
Längenstandard:	100 bp DNA-Leiter (Gibco BRL)

Für ein 1%iges Agarosegel werden 3 g Agarose in 300 ml 1x TBE gelöst und bis zur vollständigen Lösung aufgeköcht. Nach Abkühlung auf 50°C wird Ethidiumbromid (1 µg/ml Gel) zugesetzt. Die Gellösung wird anschließend luftblasenfrei in einen mit mehreren Kämmen besetzten Gelträger gegossen. Bis zum Erstarren wird das Gel nun horizontal und erschütterungsfrei gelagert. Nach dem Entfernen der Kämmen wird das Gel in eine mit 1x TBE gefüllte Elektrophoreseapparatur (GNA 200, Pharmacia Biotech) gelegt, so dass das Gel gerade vollständig mit Puffer bedeckt ist.

Es werden 5 µl der PCR-Produkte mit der gleichen Menge Probenpuffer gemischt und in die Geltaschen gegeben. In eine weitere Tasche wird 350 ng der 100 bp DNA-Leiter als Längenstandard pipettiert. Die Elektrophorese erfolgt bei einer Spannung von 100 V.

Das Prinzip der Elektrophorese beruht auf der Bewegung geladener Moleküle innerhalb eines elektrischen Feldes. Das Agarosegel bildet nach der Polymerisation eine netzartige Struktur aus, in der die negativ geladenen DNA-Fragmente zur Anode wandern. Da die elektrische Ladung von der DNA hauptsächlich von negativen Phosphatgruppen abhängig ist, verhalten sich Molekulargewicht und Gesamtladung proportional zueinander. Das Molekulargewicht wiederum ist bei den untersuchten DNA-Fragmenten von ihrer Länge abhängig.

Aufgrund des Molekularsiebeffektes ist die Wanderungsgeschwindigkeit der DNA-Fragmente nahezu umgekehrt proportional zum Molekulargewicht bzw. zur Fragmentlänge. Weitere Faktoren bezüglich der Wanderungsgeschwindigkeit sind die angelegte elektrische Spannung und die Agarosekonzentration. Das hier verwendete 1%ige Agarosegel eignet sich gut zum Auftrennen 200-500 bp großer DNA-Fragmente. Das in der Gelmatrix befindliche

Ethidiumbromid wandert den DNA-Fragmenten entgegengesetzt von der Anode zu Kathode und interkaliert in die DNA-Doppelhelix. Ethidiumbromid fluoresziert unter UV-Licht, weshalb das Gel an die Elektrophorese anschließend mit UV-Licht der Wellenlänge 366 nm durchleuchtet wird. Die DNA-Fragmente werden als leuchtende Banden sichtbar, und ihre Länge kann im Vergleich mit dem ebenfalls aufgetragenen Längenstandard überprüft werden. Die Klarheit der Banden und das Vorhandensein zusätzlicher Banden von unspezifisch vervielfältigten Produkten lassen Rückschlüsse auf die Qualität des amplifizierten Produktes zu.

4.4 Genotypisierung der Polymorphismen im *DTNBPI*-Gen

4.4.1 Prinzip der Pyrosequencing-Reaktion

Das Prinzip der Pyrosequencing-Reaktion beruht auf der Detektion von in Echt-Zeit-DNA-Synthese freigesetztem Pyrophosphat. Seine Verwendung zur Sequenzierung wurde von Ronaghi et al. erstmalig veröffentlicht (Ronaghi et al., 1996; Ronaghi et al., 1998). Der Anwendungsbereich ist inzwischen u. a. auf die SNP-Detektion, Resequenzierung und mikrobiologische Typisierung erweitert worden.

In einem Schritt werden Nukleotide vorzugsweise einer Art durch eine DNA-Polymerase an das 3'-Ende eines Primers hybridisiert, wodurch anorganisches Pyrophosphat (PPi) freigesetzt wird (siehe Abbildung 4). Das freie PPi wird anschließend durch die ATP-Sulfurylase zu ATP umgewandelt. Dieses liefert die Energie zur Oxidation von Luciferin durch das Enzym Luciferase (siehe Abbildung 4). Die Detektion der freiwerdenden Lichtquanten der Wellenlänge 560 nm erfolgt durch eine Photodiode, Photomultiplier-Röhren oder eine CCD-Kamera (*charge-coupled-camera*) (Ronaghi, 2001). Die gemessene Lichtstärke wird in einem sog. Pyrogramm graphisch dargestellt, welches in der Auswertung Rückschluss auf die eingebauten Nukleotide gibt.

Bei der DNA-Polymerase handelt es sich um das Klenow-Fragment der *E. coli* DNA-Polymerase I (Benkovic und Cameron, 1995). Die ATP-Sulfurylase ist eine rekombinante Version aus der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* (Karamohamed et al., 1999). Die Luciferase stammt von dem amerikanischen Glühwürmchen *Photinus pyralis*.

Die Zugabe von Apyrase, einem nukleotid-degradierendem Enzym der Kartoffel, zwischen der Addition der einzelnen Nukleotidsorten ermöglicht ein Flüssig-Phase System ohne Waschschrift.

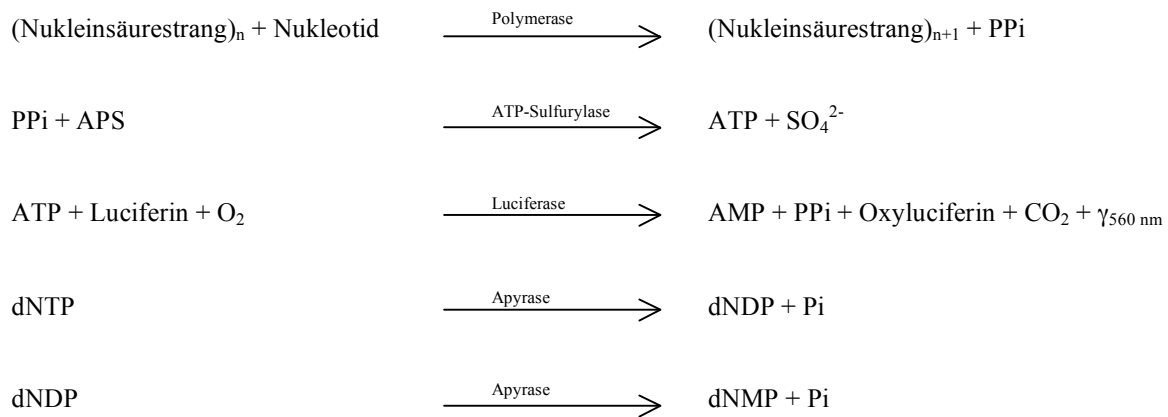


Abbildung 4: Reaktionsschritte der Pyrosequencing-Reaktion

4.4.2 Aufbereitung der PCR-Produkte für die Pyrosequencing-Reaktion

Reagenzien:

Denaturierungspuffer	10 mM Tris-Acetat, pH 7,6
Waschpuffer	0,5 M NaOH

Die biotinylierten PCR-Produkte werden mit Streptavidin beschichteten Sepharose-Strängen für 5 Minuten in einem Schüttler inkubiert. Im Anschluss werden 50 µl Denaturierungspuffer in jedes Aliquot gegeben für 30 Sekunden inkubiert. Durch Abfiltration des Überstandes mit Hilfe von Millipore Filterplatten und Unterdruckfilter wird die ssDNA gewonnen. Diese wird zweimal mit jeweils 50 µl Waschpuffer gewaschen. Im Anschluss erfolgt die Anlagerung des Sequenzierprimers durch eine 2 minütige Inkubation bei 80°C und 5 Minuten bei Raumtemperatur.

4.4.3 Genotypisierung durch die Pyrosequencing-Reaktion

Nach Reinigung der PCR-Produkte, der anschließenden Isolierung von gleichsinnigen Einzelsträngen und der Anlagerung des spezifischen Sequenzierprimers (siehe Tabelle 3) werden die Proben in ein geeignetes Behältnis transferiert (PSQ 96 Plate, Pyrosequencing AB, Uppsala, Schweden).

Dann werden die o. g. Schritte der Pyrosequencing-Reaktion unter optimalen Bedingungen in einem speziellen Gerät (Pyrosequencing System PSQ96) durchgeführt. Die einzelnen Substanzen wie Enzyme und Substrate werden den Reaktionsschritten entsprechend den einzelnen Behältnissen bzw. Proben automatisiert zugeführt. Anhand der Messung der in der chemischen

Reaktion entstehender Lichtquanten wird für jede Probe computergestützt ein Pyrogramm erstellt. Dieses ist Grundlage für die anschließende Genotypbestimmung, welche der Stärke des gemessenen Lichtes entsprechend den einzelnen Proben Genotypen zuordnet. Diese werden im Anschluss noch einmal einzeln visuell überprüft. Bei unklaren Pyrogrammen oder unplausiblen Ergebnissen wird das Pyrogramm verworfen, und die Genotypisierung ggf. wiederholt.

Zur automatisierten Genotypisierung sind die folgenden vom Hersteller in einem Kit vorbereiteten Chemikalien notwendig:

- 1) Enzym-Mix (DNA-Polymerase, ATP-Sulfurylase, Luciferase, Apyrase),
- 2) Substrat-Mixture (Luciferin, Adenosin-5'-phosphosulfat),
- 3) Nucleotide (dATP α S, dCTP, dGTP, dTTP).

Die gefriergetrockneten Enzyme und Substrate werden in 620 μ l hochgereinigtem Wasser aufgelöst und im Anschluss vorsichtig geschüttelt. Nach einer Inkubationszeit von 5-10 min bei Zimmertemperatur geschieht die Umfüllung in die Dispersionskartusche, aus welcher im Reaktionsschritt den einzelnen DNA-Proben die zur Reaktion notwendigen Enzyme, Substrate und Nucleotide automatisiert zugeführt werden. An Enzym und Substrat werden jeweils insgesamt 50 μ l + 5,5 μ l pro Probe und von den Nucleotiden 50 μ l + 0,22 μ l pro Probe und Typisierungsschritt benötigt.

4.5 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der Untersuchungen wurde von Dr. med. Thomas G. Schulze (Abteilung für genetische Epidemiologie in der Psychiatrie, Zentralinstitut für seelische Gesundheit, Mannheim, Leiterin Prof. Dr. med. M. Rietschel) durchgeführt.

Als Parameter für das Kopplungsungleichgewicht (LD) zwischen zwei Loci gelten die Koeffizienten D' und Δ^2 . Diese beiden Parameter lassen eine Darstellung der genomischen Struktur und einen Vergleich dieser zwischen Populationen verschieden ethnischer Herkunft zu. Weiterhin gibt das Kopplungsungleichgewicht Auskunft darüber, inwieweit potentiell krankheitsdisponierende genetische Veränderungen über das Typisieren vorliegender Marker zu erfassen sind.

D' ist definiert als:

$$D' = D / D_{\text{Max}}$$

D ist ein Parameter für das Kopplungsungleichgewicht zwischen zwei Markern. Sie ist die Differenz aus der beobachteten, tatsächlichen Haplotypfrequenz P_{AB} und der statistischen Wahrscheinlichkeit $p_A * p_B$ (p_A, p_B = Allelfrequenzen für A bzw. B) für das Auftreten des Haplotypen bei Unabhängigkeit der Loci und Allele voneinander:

$$D = P_{AB} - (p_A * p_B)$$

D_{Max} ist unter den gegebenen Allelfrequenzen der größtmögliche Wert von D.

Als zusätzliches Maß für das Kopplungsungleichgewicht zwischen zwei Markern wurde der Koeffizient Δ^2 berechnet. Bei relativ geringen physikalischen Distanzen zwischen zwei Markern zeigt dieser Wert eine geringere stochastische Streuung als D' (Pritchard und Przeworski, 2001). Die Definition eines Grenzwertes für D' und Δ^2 für ein Vorliegen eines Kopplungsungleichgewichtes zwischen zwei Loci erweist sich als problematisch. Der Vergleich der Absolutwerte von D' und Δ^2 bei Markerpaaren an Loci mit unterschiedlicher Allelfrequenz ist problematisch (Devlin und Risch, 1995), da diese in die Berechnung von D' und Δ^2 eingehen. Kruglyak stellte 1999 zum Kopplungsungleichgewicht zwischen zwei Varianten fest, dass, wenn zur Detektion einer Assoziation zwischen Variante und Erkrankung ein Kollektiv des Umfangs S notwendig ist und wenn das Ausmaß des Kopplungsungleichgewichtes durch den Koeffizienten d^2 beschrieben ist, dann zur Detektierung einer Assoziation zwischen Marker und Krankheit ein Kollektiv des Umfangs S/d^2 notwendig ist. Bei $d^2=0,1$ bedeutet dieses ein 10-fach größeres Untersuchungskollektiv zur Detektierung einer Assoziation von Marker und Erkrankung als zur Detektion einer Assoziation von Marker und Krankheit. Kruglyak setzte als willkürliche Grenze für ein „useful linkage disequilibrium“ einen d^2 -Wert $> 0,1$ vor. Unter bestimmten Bedingungen lässt sich der Koeffizient d^2 in den Koeffizienten D' gemäß $D'=\sqrt{d^2}$ und in den Koeffizienten Δ^2 gemäß $d^2\approx\Delta^2$ umwandeln (Schulze et al., 2002). Aus diesem Grund wird für D' ein Wert $>0,3$ und für Δ^2 ein Wert $>0,1$ als Grenzwert für ein „useful linkage disequilibrium“ diskutiert (Schulze et al., 2002).

Im Rahmen der statistischen Auswertung der Genotypisierungsdaten der drei Fall-Kontroll-Kollektive wurde zunächst die Häufigkeitsverteilung der Genotypen innerhalb der Patienten- und der Kontrollpersonenkollektive mittels eines χ^2 -Tests mit 1 Freiheitsgrad auf eine mögliche Abweichung vom Hardy-Weinberg-Gleichgewicht geprüft. Die Genotyp- und Allelfrequenzen

der einzelnen Marker des Patienten- und der Kontrollpersonenkollektive wurden mittels χ^2 -Test und Fisher's Exact Test verglichen. Weiterhin wurde der Cochran-Armitage-Trend-Test angewandt, da dieses Verfahren sich bei der Detektion eines Trends zur Assoziation als sensitiver erwiesen hat. Mittels Bonferroni-Korrektur wurde für multiples Testen korrigiert.

In der Haplotypenanalyse wurden alle möglichen 2-, 3-, und 4-Markerhaplotypen von nebeneinanderliegenden SNPs mittels der etablierten Software COCAPHASE (<http://www.mrc-bsu.cam.ac.uk/personal/frank/software/unphased/>; (Dudbridge, 2003)) analysiert. Hierbei werden für Fälle und Kontrollen Haplotypfrequenzen durch einen Expectation-Maximization-(EM) Algorithmus geschätzt und diese dann mittels eines Likelihood Ratio Tests miteinander verglichen. Mittels einer Permutation wird für multiples Testen korrigiert.

5 Ergebnisse

5.1 Genotypisierung von Varianten am *DTNBPI*-Locus

2003 identifizierten van den Oord et al. (2003) in einem Kollektiv aus 268 Irischen Familien mit hoher familiärer Belastung von schizophrenen Störungen im *dystrobrevin-binding protein 1* (*DTNBPI*) kodierenden Gen in der chromosomalen Region 6p22.3 einen aus 8 SNPs bestehenden Haplotyp, der signifikant mit schizophrenen Störungen assoziiert war. Unter Zugrundelegen von 5 SNP-Markern ließen sich die 6 häufigsten Haplotypkombinationen bestimmen, die bei 96% aller Individuen vorliegen (van den Oord et al., 2003). Bei diesen sog. haplotype-tagging SNPs (*ht SNPs*) handelt es sich um folgende 5 Marker:

- 1) P1635/ rs3213207,
- 2) P1325/ rs1011313,
- 3) P1757/ rs2005976,
- 4) P1320/ rs760761,
- 5) P1578/ rs1018381.

Mit dem Ziel der Replikation wurden diese Marker in der vorliegenden Arbeit mittels Pyrosequencing genotypisiert. Untersucht wurden die drei oben beschriebenen Fall-Kontroll-Kollektive aus Deutschland (418 Erkrankte, 285 Kontrollen), Polen (294 Erkrankte, 113 Kontrollen) und Schweden (142 Erkrankte, 272 Kontrollen).

5.2 Genotypisierte Varianten am *DTNBPI*-Locus – Ergebnisse der statistischen Auswertung

5.2.1 Auswertung des Inter-Marker-Kopplungsungleichgewichtes

In allen Fall-Kontroll-Kollektiven wurden zunächst die Koeffizienten D' und Δ^2 berechnet. Beide Parameter gelten als Maß für das Kopplungsungleichgewicht (LD) zwischen zwei Polymorphismen. Ziel war das Erfassen der genomischen Struktur am *DTNBPI*-Locus und deren Vergleich zwischen den drei Kollektiven unterschiedlicher ethnischer Herkunft (Deutschland, Polen, Schweden). Das LD gab zudem Auskunft darüber, inwieweit potentiell krankheitsdisponierende genetische Veränderungen über das Typisieren vorliegender Marker zu erfassen sind. Dabei gilt allgemein ein D' -Wert von $>0,3$ bzw. ein Δ^2 -Wert von $>0,1$ als Grenzwert für ein „useful linkage disequilibrium“ (LD) (Schulze et al., 2002).

Die statistischen Auswertungen zur Abschätzung der D' - und Δ^2 -Werte zwischen den in der vorliegenden Arbeit genotypisierten Markern bzw. aller sich ergebender Marker-Kombinationen

sind in Tabelle 4 dargestellt. Es zeigte sich, dass fast alle 10 Markerkombinationen D' -Werte $> 0,3$ aufwiesen. Damit und mit den von Van den Oord et al. (2003) beschriebenen Vorbefunden sollte das Erfassen der genomischen Variabilität und eines LD zu disponierenden genetischen Veränderungen am *DTNBPI*-Locus möglich sein. Nur das mit 23kb am weitesten entfernte Markerpaar P1635-P1578 wies in allen drei Kollektiven weder für D' noch für Δ^2 ausreichend hohe LD-Werte auf. Darüberhinaus zeigten alle drei Kollektive unterschiedlicher Ethnizität ähnliche LD-Muster bei der Bestimmung der jeweiligen Parameter D' und Δ^2 , d. h. die genomische bzw. Haplotyp-Block-Struktur am *DTNBPI*-Locus ist in allen Stichproben vergleichbar.

Tabelle 4: Ergebnisse der Berechnung der Koeffizienten D' und Δ^2 als Maß für das paarweise Inter-Marker-Kopplungsungleichgewicht

Marker 1	Marker 2	Bonn		Poznan		Stockholm	
		Δ^2	D'	Δ^2	D'	Δ^2	D'
1635	1325	0,006	0,614	0,004	0,482	0,008	0,998
1635	1757	0,449	0,917	0,615	0,886	0,488	0,932
1635	1320	0,486	0,981	0,639	1,000	0,502	0,975
1635	1578	0,000	0,176	0,005	0,153	0,000	0,227
1325	1757	0,027	1,000	0,022	1,000	0,016	1,000
1325	1320	0,016	0,722	0,004	0,403	0,017	0,999
1325	1578	0,008	1,000	0,001	0,480	0,000	0,006
1757	1320	0,907	0,978	0,801	0,954	0,907	0,959
1757	1578	0,285	1,000	0,170	1,000	0,131	0,663
1320	1578	0,241	0,963	0,153	1,000	0,152	0,755

5.2.2 Einzelmarker-Analyse der Fall-Kontroll-Kollektive

Die Einzelmarker-Analyse der erhobenen Genotypen erfolgte wie in Kapitel 3.3 beschrieben separat für alle drei Fall-Kontroll-Kollektive. Zunächst wurde die Häufigkeitsverteilung der jeweiligen Genotypen aller untersuchten Varianten innerhalb der einzelnen Kollektive mittels χ^2 -Test auf Abweichung vom Hardy-Weinberg-Gleichgewicht überprüft. Die Tabelle 5 gibt eine Übersicht über die Allel- und Genotyp-Frequenzen in den Patienten- und Kontrollkollektiven und den Vergleich im Cochran-Armitage-Trend-Test und im χ^2 -Test.

Der Marker P1325 zeigte im schwedischen Kollektiv mit einer Minor-Allel-Frequenz von 10,3% in der Fallgruppe versus 6,8% in der Kontrollgruppe einen p-Wert von $p=0,032$ (siehe Tabelle 5). Im deutschen Kollektiv ergaben sich mit einer Minor-Allel-Frequenz von 10,5% in der Fallgruppe versus 8,6% in der Kontrollgruppe genauso wie im polnischen Kollektiv mit einer

Minor-Allelfrequenz von 12,0% im Fallkollektiv versus 10,6% in der Kontrollgruppe $p=0,271$) keine signifikanten Assoziationshinweise ($p=0,271$ bzw. $p=0,624$) (siehe Tabelle 5). Für die anderen vier SNP-Marker fanden sich in allen drei Kollektiven mit p -Werten von $p>0,05$ keine weiteren signifikanten Assoziationshinweise (siehe Tabelle 5).

Da es zahlreiche Hinweise darauf gibt, dass es sich bei schizophrenen Störungen mit einer Familienbelastung (familiäre Formen) gegenüber den sporadischen Fällen um eine genetisch homogenere Subgruppe handelt, führten wir anschließend die Einzelmarker-Analysen unter Stratifikation nach positiver Familienanamnese in den drei Kollektiven durch. Als Kriterium für positive Familiarität wurde dabei das anamnestisch erfasste Vorkommen von einer schizophrenen Störung bei Verwandten 1. oder 2. Grades gewählt. Dieses Kriterium erfüllten 56 Patienten im deutschen Kollektiv (14%), 38 Patienten in der polnischen Stichprobe (13%) und 32 Patienten im schwedischen Kollektiv (12%). Trotz der sich verringernden Kollektivgröße ergaben sich wiederum in der schwedischen Gruppe signifikante Assoziationshinweise. Bei Marker P1757 zeigte sich das Allel A mit einer Frequenz von 29,7% in der Fallgruppe versus 16,9% in der Kontrollgruppe assoziiert ($p=0,018$, siehe Tabelle 6). Bei SNP-Marker P1578 ergaben sich ebenfalls mit $p=0,013$ signifikant unterschiedliche Allel- und Genotypverteilungen (Allel G: 15,6% im Patienten- und 6,1% im Kontroll-Kollektiv). Dieser Marker zeigte auch im polnischen stratifizierten Kollektiv mit einem p -Wert von 0,063 eine Tendenz zur Assoziation (siehe Tabelle 6). Weiterhin ergab sich in der schwedischen Patientengruppe nach Stratifikation bei SNP 1320 eine Tendenz zur Assoziation ($p=0,11$, siehe Tabelle 6). Allerdings erhielten wir unter Stratifikation für die beiden Marker P1757 und P1578 keine Assoziationshinweise in den Kollektiven deutscher und polnischer Herkunft (siehe Tabelle 6). Auch der Marker P1320 wies in diesen Stichproben keine Assoziationen auf (siehe Tabelle 5).

Auch beim Vergleich der Allel- und Genotyp-Häufigkeiten zwischen den drei Kontrollkollektiven ergaben sich signifikante Unterschiede. Für den Marker P1757 ergaben sich signifikante Unterschiede zwischen den deutschen (24,0% für das seltenere A-Allel) und den schwedischen Kontrollen (16,9% für das A-Allel), sowie zwischen den deutschen (24,0% für das A-Allel) und den polnischen Kontrollprobanden (13,7% für das A-Allel) ($p=0,025$ bzw. $p=0,002$). Beim SNP P1578 ließen sich zwischen dem polnischen (2,7% für das seltenere T-Allel) und dem deutschen Kontrollkollektiv (7,8% für das T-Allel), sowie zwischen dem polnischen (2,7% für das T-Allel) und dem schwedischen Kontrollen (6,1% für das T-Allel) signifikante Unterschiede nachweisen ($p=0,009$ bzw. $p=0,046$). Beim Marker P1320 fanden sich

signifikant unterschiedliche Allelfrequenzen ($p=0,003$) zwischen der polnischen (24,9% für das seltenere T-Allel) und der deutschen Kontrollgruppe (2,7% für das T-Allel) (siehe Tabelle 7).

Tabelle 5: Einzelmarker-Analysen in den Fall-Kontroll-Kollektiven mit genetischen Varianten am DTNBP1-Locus

			Allelverteilung		P-Wert	Genotypenverteilung						χ^2
			A	G		AA	AG	GG				
P1635												
	Deutschland	Patienten	0,891	0,109	0,130	331	(0,80)	79	(0,19)	6	(0,01)	0,214
		Kontrollpersonen	0,863	0,137		205	(0,74)	68	(0,25)	4	(0,01)	
	Polen	Patienten	0,889	0,111	1,000	229	(0,79)	54	(0,19)	5	(0,02)	0,997
		Kontrollpersonen	0,890	0,110		91	(0,80)	21	(0,18)	2	(0,02)	
	Schweden	Patienten	0,885	0,115	0,915	121	(0,78)	30	(0,19)	4	(0,03)	0,479
		Kontrollpersonen	0,887	0,113		221	(0,79)	57	(0,20)	3	(0,01)	
P1325			C	T		CC	CT	TT				
	Deutschland	Patienten	0,895	0,105	0,271	332	(0,80)	77	(0,19)	5	(0,01)	0,443
		Kontrollpersonen	0,914	0,086		231	(0,84)	41	(0,15)	3	(0,01)	
	Polen	Patienten	0,880	0,120	0,624	220	(0,78)	60	(0,21)	4	(0,01)	0,305
		Kontrollpersonen	0,894	0,106		85	(0,82)	16	(0,15)	3	(0,03)	
	Schweden	Patienten	0,880	0,110	0,032	122	(0,81)	27	(0,18)	2	(0,01)	0,238
		Kontrollpersonen	0,932	0,068		197	(0,87)	29	(0,13)	1	(0,00)	
P1757			G	A		GG	GA	AA				
	Deutschland	Patienten	0,798	0,202	0,122	260	(0,64)	131	(0,32)	17	(0,04)	0,203
		Kontrollpersonen	0,760	0,240		151	(0,59)	87	(0,34)	18	(0,07)	
	Polen	Patienten	0,823	0,177	0,261	148	(0,69)	58	(0,27)	9	(0,04)	0,461
		Kontrollpersonen	0,863	0,137		72	(0,76)	20	(0,21)	3	(0,03)	
	Schweden	Patienten	0,792	0,208	0,178	101	(0,64)	47	(0,30)	9	(0,06)	0,482
		Kontrollpersonen	0,831	0,169		179	(0,66)	84	(0,31)	9	(0,03)	
P1320			C	T		CC	CT	TT				
	Deutschland	Patienten	0,786	0,214	0,141	258	(0,62)	132	(0,32)	22	(0,05)	0,325
		Kontrollpersonen	0,751	0,249		157	(0,57)	96	(0,35)	20	(0,07)	
	Polen	Patienten	0,810	0,190	0,235	187	(0,67)	81	(0,29)	13	(0,05)	0,438
		Kontrollpersonen	0,848	0,152		82	(0,73)	26	(0,23)	4	(0,00)	
	Schweden	Patienten	0,780	0,220	0,512	91	(0,62)	47	(0,32)	9	(0,06)	0,634
		Kontrollpersonen	0,801	0,199		159	(0,64)	79	(0,32)	10	(0,04)	
P1578			C	T		CC	CT	TT				
	Deutschland	Patienten	0,928	0,072	0,678	355	(0,86)	53	(0,13)	3	(0,01)	0,616
		Kontrollpersonen	0,922	0,078		238	(0,85)	42	(0,15)	1	(0,00)	
	Polen	Patienten	0,947	0,053	0,124	261	(0,89)	31	(0,11)	0	-	0,106
		Kontrollpersonen	0,973	0,027		105	(0,95)	6	(0,05)	0	-	
	Schweden	Patienten	0,915	0,085	0,213	134	(0,85)	23	(0,15)	1	(0,00)	0,337
		Kontrollpersonen	0,939	0,061		240	(0,88)	34	(0,12)	0	-	

Tabelle 6: Einzelmarker-Analysen in den Fall-Kontroll-Kollektiven unter Stratifikation nach positiver Familienanamnese mit genetischen Varianten am DTNBP1-Locus

				Allelverteilung		P-Wert
P1635	rs3213207			A	G	
		Deutschland	Patienten	0,819	0,181	0,242
			Kontrollpersonen	0,863	0,137	
		Polen	Patienten	0,895	0,105	0,915
			Kontrollpersonen	0,890	0,110	
		Schweden	Patienten	0,875	0,125	0,771
			Kontrollpersonen	0,887	0,113	
P1325	rs1011313			C	T	
		Deutschland	Patienten	0,100	0,90	0,853
			Kontrollpersonen	0,914	0,086	
		Polen	Patienten	0,842	0,158	0,243
			Kontrollpersonen	0,894	0,106	
		Schweden	Patienten	0,935	0,065	0,987
			Kontrollpersonen	0,936	0,064	
P1757	rs2005976			G	A	
		Deutschland	Patienten	0,731	0,259	0,677
			Kontrollpersonen	0,760	0,240	
		Polen	Patienten	0,803	0,197	0,226
			Kontrollpersonen	0,863	0,137	
		Schweden	Patienten	0,703	0,297	0,018
			Kontrollpersonen	0,831	0,169	
P1320	rs760761			C	T	
		Deutschland	Patienten	0,745	0,255	0,904
			Kontrollpersonen	0,751	0,249	
		Polen	Patienten	0,792	0,208	0,271
			Kontrollpersonen	0,848	0,152	
		Schweden	Patienten	0,707	0,293	0,110
			Kontrollpersonen	0,801	0,199	
P1578	rs1018381			C	T	
		Deutschland	Patienten	0,946	0,054	0,343
			Kontrollpersonen	0,922	0,078	
		Polen	Patienten	0,921	0,079	0,063
			Kontrollpersonen	0,973	0,027	
		Schweden	Patienten	0,844	0,156	0,013
			Kontrollpersonen	0,939	0,061	

5.2.3 Haplotyp-Analyse der Fall-Kontroll-Kollektive

Die Tabelle 8 gibt eine Übersicht zu den Ergebnissen der Haplotyp-Analyse. In der Analyse der einzelnen Kollektive zeigten sich wiederum im schwedischen Kollektiv hochsignifikante Assoziationshinweise zwischen dem Erkrankungsstatus und einzelnen Haplotyp-Kombinationen. Insgesamt waren vier Haplotypen signifikant assoziiert. Den signifikantesten Wert zeigte der aus

allen SNPs bestehende 5-Markerhaplotyp 1_2_3_4_5 (P1635-P1325-P1757-P1320-P1578) mit einem globalen p-Wert von $p=0,0098$. Der 2-Marker-Haplotyp 2_3 (P1325-P1757) ergab mit einem globalen p-Wert von $p=0,014$ die zweitsignifikanteste Assoziation (siehe Tabelle 8), der allerdings der Korrektur für multiples Testen nicht standhielt ($p=0,038$). Weitere im schwedischen Kollektiv signifikant assoziierte Markerkombinationen waren 1_2_3 (P1635-P1325-P1757, globaler p-Wert von $p=0,021$, korrigiert für multiples Testen $p=0,033$) und 2_3_4_5 (P1325-P1757-P1320-P1578, globaler p-Wert von $p=0,033$).

In der deutschen und polnischen Gruppe zeigte keine Haplotypkombination signifikante p-Werte. Tendenziell assoziiert zeigte sich der Haplotyp 2_3_4 (P1325-P1757-P1320) im deutschen Kollektiv (globaler p-Wert von $p=0,096$). Im polnischen Kollektiv war der Haplotyp 4_5 (P1320-P1578) mit einem globalen p-Wert von $p=0,276$ tendenziell assoziiert (siehe Tabelle 8).

Durch Stratifikation unserer Kollektive nach einer positiven Familienanamnese für schizophrene Störungen verstärkten sich die Assoziationshinweise (siehe Tabelle 8). Wie auch bei den Einzelmarker-Analysen konnten wir im schwedischen Kollektiv positiv assoziierte Haplotypen identifizieren. Bis auf den 2-Marker-Haplotyp 1_2 (P1635-P1325) zeigten sämtliche Haplotyp-Kombinationen globale P-Werte von $p<0,05$. Hervorzuheben ist der 3-Markerhaplotyp bei 3_4_5 (P1757-P1320-P1578), der mit einem globalen P-Wert von $p=0,0004$ hochsignifikant häufiger bei Patienten als bei gesunden Kontrollen vorkam. Nach der Korrektur für multiples Testen blieb das Ergebnis mit $p=0,001$ weiterhin signifikant. Hierbei war der Haplotyp A_T_T mit einer Frequenz von 17,2% in der Patientengruppe und 4,8% in der Kontrollgruppe am stärksten assoziiert ($p=0,002$). Der zweitstärksten Assoziationshinweise erhielten wir mit einem globalen P-Wert von jeweils $p=0,0009$ bei den Markerkombinationen 2_3_4_5 (P1325-P1757-P1320-P1578) und 1_2_3_4_5 (P1635-P1325-P1757-P1320-P1578). Hier waren die Haplotypen 3_4_5 und 2_3_4_5 am stärksten assoziiert ($p=0,001$ für 3_4_5 und $p=0,0016$ für 2_3_4_5). Für den Haplotypen 2_3_4_5 fand sich auch nach der Korrektur für multiples Testen ein p-Wert von $p=0,0016$.

Im deutschen Kollektiv stellte sich nach der Stratifizierung des Kollektivs keine Haplotypkombination als signifikant assoziiert dar. Einzig der Haplotyp 3_4_5 (P1757-P1320-P1578) erreichte mit $p=0,398$ einen p-Wert unter 0,4. Hierbei handelt es sich um den Haplotypen, der auch im nicht-stratifizierten deutschen Kollektiv mit $p=0,248$ den niedrigsten p-Wert zeigte. Im schwedischen Kollektiv mit positiver Familienanamnese zeigte dieser Haplotyp die drittstärkste Assoziation (siehe Tabelle 8).

Im stratifizierten polnischen Kollektiv zeigte ebenso wie im deutschen Kollektiv keine der Haplotypkombinationen Assoziation. Mit $p=0,305$ ergab sich für den Haplotyp 4_5 (P1320-P1578) der niedrigste globale p-Wert. Auch im nicht-stratifizierten polnischen Kollektiv zeigte dieser Haplotyp mit einem globalen p-Wert von 0,276 die stärkste Assoziation, im stratifizierten schwedischen Kollektiv war dieser Haplotyp mit einem globalen p-Wert von $p=0,003$ deutlich assoziiert (siehe Tabelle 8).

Tabelle 7: Vergleich der Allelfrequenzen für SNPs am DTNBP1-Locus in den Kontrollkollektiven

SNP	Kollektiv 1	Kollektiv 2	P-Wert
P1757	Deutsche	Schweden	0,025
P1757	Deutsche	Polen	0,002
P1320	Deutsche	Polen	0,003
P1578	Deutsche	Polen	0,009
P1578	Polen	Schweden	0,046

Tabelle 8: Haplotypanalyse in den Gesamtkollektiven und unter Stratifikation nach positiver Familienanamnese für schizophrene Störungen (FH+). 1=P1635, 2=P1325, 3=1757, 4=1320, 5=1578

Marker-haplotyp	Deutsche		Polen		Schweden	
	Gesamtes Kollektiv	FH+	Gesamtes Kollektiv	FH+	Gesamtes Kollektiv	FH+
	N=418	n=56	n=294	n=38	n=142	n=32
1 2	0,198	0,408	0,761	0,512	0,068	0,780
2 3	0,149	0,870	0,526	0,897	0,014	0,012
3 4	0,197	0,798	0,608	0,523	0,427	0,020
4 5	0,202	0,584	0,276	0,305	0,154	0,003
1 2 3	0,225	0,421	0,295	0,385	0,021	0,009
2 3 4	0,096	0,887	0,845	0,928	0,064	0,023
3 4 5	0,248	0,398	0,368	0,432	0,092	0,0004
1 2 3 4	0,168	0,448	0,683	0,948	0,083	0,006
2 3 4 5	0,113	0,506	0,656	0,933	0,033	0,0009
1 2 3 4 5	0,178	0,543	0,342	0,833	0,0098	0,0009

6 Diskussion

6.1 Aufklärung genetischer Ursachen für komplex vererbte Krankheiten

Seit Beginn der molekulargenetischen Ära und Einführung der PCR als Verfahren zur sequenzspezifischen DNA-Amplifikation hat sich das Methodenspektrum auf diesem Gebiet rasant weiterentwickelt. Dadurch haben sich die Möglichkeiten zur Aufklärung der genetischen Ursachen von erblichen Krankheiten stetig verbessert. So sind die Ursachen für die Mehrheit aller monogenen Erkrankungen, denen genetische Veränderungen an einem Genlocus zugrunde liegen, bereits identifiziert. Anders verhält es sich hingegen bei den genetisch komplexen Krankheiten, bei denen mehrere genetische Veränderungen zur Erkrankungsdisposition beitragen. Hier wird erst seit jüngster Zeit über erfolgreich abgeschlossene Untersuchungen mit der Identifikation von Krankheitsgenen berichtet. Als Beispiele sind das Asthma bronchiale mit der Identifikation des ADAM33-Gens (Van Eerdewegh et al., 2002) und der Morbus Crohn mit der Identifikation einer krankheitsverursachenden Variante im NOD2-Gen (Hugot et al., 2001) zu nennen. Wie auch bei den monogenen Erkrankungen führten bei diesen Analysen zunächst Kopplungsuntersuchungen an hochbelasteten Familienkollektiven zur Identifikation der jeweiligen chromosomalen Regionen. In den Kopplungsabschnitten wurden anschließend Assoziationsuntersuchungen an großen Stichproben von Patienten und Kontrollen durchgeführt, die zur Identifikation der Krankheitsgene führten. Dass die dabei erfassten Assoziationen nicht auf Stratifikationseffekte zurückzuführen oder als Zufallsbefund zu werten sind, wurde anschließend durch Replikationsuntersuchungen gezeigt. Replikationsstudien an unabhängigen Kollektiven sind daher bei der Erforschung genetisch komplexer Krankheiten von großer Bedeutung. Sofern sie an Stichproben durchgeführt werden, die einen im Vergleich zum initialen Assoziationskollektiv anderen ethnischen Hintergrund haben, kann dabei auch ein populationsübergreifender Beitrag der identifizierten Genvarianten erfasst werden.

6.2 Ansatz und Methodik dieser Arbeit

Bei schizophrenen Störungen wurden bereits zahlreiche genomweite Kopplungsanalysen durchgeführt, die zur Identifikation genomischer Regionen führten, in denen Krankheitsgene vermutet werden. Auf dem kurzen Arm von Chromosom 6 erhielten Straub et al. (1995) als erste Gruppe positive Kopplungshinweise. Mit einem LOD-Score von 3,51 bei Marker D6S296 waren diese Befunde auch nach den Kriterien von Lander und Kruglyak (2005) signifikant. Anschließend berichteten vier unabhängige Gruppen in dieser Region über positive

Kopplungsbefunde bei schizophrenen Störungen, die stärksten Hinweise ergaben sich dabei für den Abschnitt 6p22-24. Aufgrund dieser Befunde führten Straub et al. systematische Assoziationsuntersuchungen in dieser chromosomalen Region unter der Zugrundelegung von 270 Familien mit schizophrener Störung (insgesamt 1425 Individuen) und 17 genetischen Varianten durch. Hierdurch gelang ihnen die Identifikation von SNPs, die in den Einzelmarker- und Haplotyp-Analysen eine hochsignifikante Assoziation zum Erkrankungsstatus aufwiesen (Straub et al. 2002b). Die Varianten liegen im *DTNBPI*-Gen, das 13 Exons umfasst und sich über eine genomische Länge von 140 kb erstreckt. Die gleiche Arbeitsgruppe untersuchte daraufhin ein weiteres Kollektiv (268 Familien mit schizophrener Störung, insgesamt 2368 Individuen) und fand dort ebenfalls bei den Einzelmarker- und Haplotyp-Analysen einen positiven Assoziationshinweis mit Varianten am *DTNBPI*-Locus (van den Oord et al., 2003). Die vorliegende Arbeit hatte zum Ziel, den möglichen Beitrag des *DTNBPI*-Gens am Entstehungsprozess schizophrener Störungen zu untersuchen und stellt somit eine Replikationsanalyse der von Straub et al. (2002b) und Van den Oord et al. (2003) berichteten Assoziationsbefunde dar. Insgesamt wurden drei Fall-Kontroll-Kollektive mit unterschiedlicher ethnischer Herkunft (Deutschland, Schweden und Polen) analysiert und die 5 in der Untersuchung von van den Oord (2003) am stärksten assoziierten SNP-Marker (P1635, P1325, P1757, P1320, P1578) typisiert. Zum Zeitpunkt unserer Untersuchungen lagen keine unabhängigen Assoziationsbefunde mit genetischen Varianten am *DTNBPI*-Locus und schizophrenen Störungen vor. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit sind bereits publiziert (Van Den Bogaert et al., 2003) und werden nachfolgend in Zusammenschau mit den zuvor (Morris et al., 2003; Schwab et al., 2003; Straub et al., 2002a) und später (De Luca et al., 2005; Funke et al., 2004; Kirov et al., 2004; Numakawa et al., 2004; Tang et al., 2003; Williams et al., 2004) veröffentlichten Assoziationsdaten bei schizophrenen Störungen diskutiert.

6.3 Interpretation der Ergebnisse der statistischen Auswertung

6.3.1 *DTNBPI*-Locus – Populationsspezifische genetische Variabilität

Zur Klärung, ob zwischen den von uns untersuchten Varianten am *DTNBPI*-Locus ein Kopplungsungleichgewicht besteht und damit Haplotyp-Analysen möglich sind, wurden die Genotypisierungsergebnisse zunächst LD-Analysen zugeführt. Die entsprechenden Koeffizienten D' und Δ^2 zeigten, dass alle der untersuchten Marker bis auf Marker P1635 in allen drei Kollektiven in starkem LD zu einander liegen (siehe Tabelle 4). Aufgrund dieser Daten waren die

Haplotyp-Analysen unter Zugrundelegung der genetischen Marker bei der statistischen Bearbeitung durchführbar. Die erhobenen LD-Daten entsprechen auch den Daten, die bei den jeweiligen unabhängigen Assoziationsanalysen in unabhängigen Kollektiven mit anderer ethnischer Herkunft beschrieben wurden. Auch hier ergaben sich starke LD-Beziehungen zwischen den untersuchten *DTNBPI*-Varianten. Somit scheint die Haplotyp-Block-Struktur bzw. die genomische Organisation des von uns untersuchten *DTNBPI*-Locus populationsübergreifend einheitlich zu sein. Allerdings ergaben sich beim Vergleich der Allel- und Genotyp-Frequenzen der einzelnen SNP-Marker Unterschiede zwischen den von uns untersuchten Stichproben (Tabelle 7). Dies spiegelt die unterschiedliche ethnische Herkunft der jeweiligen Kollektive wieder und zeigt sich auch beim Vergleich der jeweiligen Allel- und Genotyp-Frequenzen mit den anderen Assoziationsuntersuchungen, die mit genetischen Varianten am *DTNBPI*-Locus durchgeführt wurden. Sofern dabei Stichproben unterschiedlicher Ethnizität verwendet wurden, waren die Allel- sowie Genotyp-Frequenzen ebenfalls stark unterschiedlich.

6.3.2 *DTNBPI*-Locus – Dispositionsfaktor für schizophrene Störungen

In der Einzelmarker-Analyse der vorliegenden Untersuchung zeigte der SNP-Marker P1325 im schwedischen Fall-Kontroll-Kollektiv eine signifikante Assoziation zu schizophrenen Störungen ($p=0,032$, Tabelle 5). Dieser Befund erfuhr Bestätigung durch die Haplotyp-Analysen. Im schwedischen Kollektiv ergaben sich zahlreiche positiv assoziierte Markerkombinationen. Das deutlichste Ergebnis wies dabei der aus allen untersuchten Varianten bestehende 5-Marker-Haplotyp mit einem globalen p-Wert von $p=0,0098$ auf (Tabelle 8). Damit konnten im schwedischen Kollektiv die von van den Oord et al. (2003) erhobenen Befunde bestätigt werden. In Zusammenschau mit den auch mittlerweile veröffentlichten weiteren positiven Assoziationsergebnissen mit *DTNBPI*-Varianten, die an 6 unabhängigen Schizophrenie-Kollektiven erhoben wurden (Funke et al., 2004; Kirov et al., 2004; Numakawa et al., 2004; Schwab et al., 2003; Tang et al., 2003; Williams et al., 2004), ist daher davon auszugehen, dass genetische Veränderungen am *DTNBPI*-Locus zur Disposition schizophrener Störungen beitragen.

Die Tatsache, dass sich bei den Einzelmarker- und Haplotyp-Analysen in den deutschen und polnischen Kollektiven keine Assoziationshinweise zwischen Varianten im *DTNBPI*-Gen und schizophrenen Störungen (Tabellen 5 und 6) finden ließen, widerspricht auch den positiven Befunden des schwedischen Kollektivs und der unabhängigen Untersuchungen der anderen

Arbeitsgruppen nicht. Vielmehr können die negativen Ergebnisse in diesen Kollektiven darauf zurückgeführt werden, dass der Krankheitseffekt am *DTNBPI*-Locus bei Patienten mit hoher Familienbelastung besonders ausgeprägt ist und der Anteil dieser Individuen in genannten Kollektiv gering war. Da sich die starken Assoziationshinweise zwischen Varianten am *DTNBPI*-Locus und schizophrenen Störungen der anderen Arbeitsgruppen unter Verwendung von Patienten-Kollektiven ergaben, die hinsichtlich hoher familiärer Belastung selektiert waren, führten wir Re-Analysen unserer Daten unter Auftrennung der Patienten-Kollektive in Betroffene mit und ohne positive Familienanamnese für Schizophrenie durch. Auch wenn sich hierdurch die statistische Aussagekraft (Power) mit abnehmender Stichprobengröße erheblich verkleinerte, erhielten wir im schwedischen Kollektiv nun auch für die Marker P1757 und P1578 signifikante Assoziationshinweise ($p=0,018$ bzw. $p=0,013$, Tabelle 6). Bestätigung fanden diese Befunde durch die Haplotyp-Analysen. Hierbei waren mehrere Haplotyp-Kombinationen signifikant assoziiert (Tabelle 8). Innerhalb des 5-Marker-Haplotypen P1635-P1325-P1757-P1320-P1578, der zwar in der Gesamtanalyse nicht den deutlichsten Assoziationshinweis zeigte, konnte für den Genotyp A-C-A-T-T mit $p=0,00009$ der signifikanteste p -Wert und der stärkste Krankheitseffekt (OR 6,75) nachgewiesen worden. Der Assoziationshinweis hielt sogar der sehr konservativen Korrektur auf multiples Testen nach Bonferroni stand ($p=0,00153$). Dass die Stratifikation des deutschen und polnischen Patienten-Kollektivs nach positiver Familienanamnese für Schizophrenie keine Assoziationshinweise zeigte (Tabellen 6 und 8), ist dabei auf die mit der Stichproben-Verkleinerung einhergehende Reduzierung der statistischen Power zurückzuführen. Zur exakten Darstellung der verringerten statistischen Aussagekraft unter Kollektiv-Stratifikation nach positiver Familienanamnese führten wir Power-Analysen durch. Ausgehend von dem von Schwab et al. (2003) berichteten Ergebnissen bei Marker P1325, betrug die statistische Power, die Vorbefunde zu replizieren, im stratifizierten deutschen Kollektiv 35% ($n=35$ Patienten), im stratifizierten polnischen Sample 29% ($n=38$ Patienten) und im stratifizierten schwedischen Kollektiv 19% ($n=32$ Patienten). Dass die Krankheitseffekte am *DTNBPI*-Locus am stärksten bei schizophrenen Patienten mit positiver Familienanamnese sind, untermauern auch die Assoziationsbefunde von Straub et al. (2002b), Schwab et al. (2003) und Van den Oord et al. (2003), die ihre starken Assoziationen unter Verwendung von Patienten-Kollektiven erhielten, in deren Familien eine hohe Krankheitsdichte vorlag. Interessanterweise lassen sich ähnliche Effekte auch bei einem weiteren stark replizierten Krankheitsgen für schizophrene Störungen finden. So verstärkten sich die Assoziationsbefunde am Neuregulin-1-Gen in dem untersuchten

Fall-Kontroll-Kollektiv einer britischen Arbeitsgruppe unter einer Stratifikations-Analyse nach positiver Familienanamnese erheblich (Williams et al., 2004). Für einen Neuregulin-1-Marker ergaben sich im Gesamtkollektiv (573 Patienten versus 618 Kontrollen) mit $p=0,04$ schwach signifikante Assoziationshinweise, die sich nach entsprechender Stratifikation deutlich verstärkten ($p=0,01$).

Bislang wurde nur in einem weiteren Fall-Kontroll-Kollektiv mit schizophrenen Störungen, für das sich signifikante Assoziationshinweise zwischen genetischen Varianten am *DTNBPI*-Locus und schizophrenen Störungen ergaben, eine Stratifikations-Analyse hinsichtlich familiärer Krankheitshäufung durchgeführt. Funke et al. (2004) berichten, dass nach der Selektion für positive Familienanamnese keine Assoziation mehr beobachtet wurde. Dieses Ergebnis kann am ehesten auf die in diesem Kollektiv verringerte statistische Power zurückgeführt werden. Neben stochastischen Effekten, könnten in dieser Stichprobe auch populationspezifische Effekte vorliegen, die zu den zunächst widersprüchlich erscheinenden Ergebnissen beigetragen haben.

6.3.3 *DTNBPI*-Locus – Identifikation der krankheitsdisponierenden Veränderung(en)

Zwei weiteren Befunden muss bei Zusammenschau der bislang publizierten Untersuchungen Aufmerksamkeit geschenkt werden. Exemplarisch stehen sie auch für die Probleme und die Komplexität replizierter Assoziationsbefunde bei anderen genetisch komplexen Krankheiten:

1) Den in den bisherigen und in der vorliegenden Arbeit untersuchten Varianten am *DTNBPI*-Locus kommt höchstwahrscheinlich keine krankheitsverursachende Wirkung zu, sie scheinen im LD zur disponierenden Krankheitsvariante zu liegen. Aufgrund ihrer Lokalisation innerhalb des *DTNBPI*-Gens und der zur Verfügung stehenden Prädiktions-Programme ist jedenfalls nicht davon auszugehen, dass sie das Splice-Muster oder die Aminosäure-Abfolge des *DTNBPI*-Proteins verändern. Derartige genetische Varianten wurden auch bei den mittlerweile umfangreich durchgeführten Re-Sequenzierungen des *DTNBPI*-Locus nicht gefunden. Es ist daher davon auszugehen, dass die disponierende(n) Veränderung(en) in z. B. gen-regulatorischen Bereichen lokalisiert ist (sind) und die *DTNBPI*-Expression betreffen. Erste Vorbefunde, die diese Hypothese untermauern, liefert auch die Untersuchung von Bray et al. (2003, 2005). Sie untersuchten die allelspezifische Expression des *DTNBPI*-Gens in zwei Kollektiven von Patienten mit psychiatrischen Erkrankungen. Hierbei fand sich eine durchschnittliche Reduktion der Expression des A-Allels um 11-14% (Bray et al., 2005). Weiterhin zeigte sich für den Haplotypen T-A-A bei SNP A-P1635-rs1047631, der signifikant häufiger bei den erkrankten als

bei den gesunden Individuen auftrat, eine durchschnittliche Reduktion der Expression von 21%. Die Daten deuten darauf, dass genetische Varianten, die an der *cis-acting* Regulation der Genexpression beteiligt sind, dem Krankheitsprozess zugrunde liegen. Der Versuch der Autoren, ihre Ergebnisse mit denen bisheriger Studien (Funke et al., 2004; Kirov et al., 2004; Schwab et al., 2003; Van Den Bogaert et al., 2003; van den Oord et al., 2003) in Einklang zu bringen, war nur teilweise möglich. In einem Teil der Fälle lagen keine Informationen zum Risikohaplotyp bzw. zum *tag* SNP rs1047631 vor. In den anderen Fällen waren die berichteten Risikoallele/-haplotypen mit dem G-Allel des *tag* SNP assoziiert. Dieses hatte jedoch bei der Analyse eine verstärkte Expression gezeigt (Bray et al., 2003; Bray et al., 2005). Nur der bei Schwab et al. (2003) gefundene Risikohaplotyp P1325-P1320 und der bei Kirov et al. (2004) signifikant assoziierte Marker P1635 waren in ihren Kollektiven mit dem A-Allel des *tag* SNP assoziiert (Bray et al., 2005). Die widersprüchlich erscheinenden Befunde sind auf den bereits angesprochenen populationsspezifischen genetischen Hintergrund zurückzuführen (siehe auch unten), der sich in unserer und in anderen Untersuchungen zeigt.

2) Insgesamt wurden bislang 11 Assoziationsanalysen zwischen genetischen Varianten am *DTNBPI*-Locus und schizophrenen Störungen durchgeführt (De Luca et al., 2005; Funke et al., 2004; Kirov et al., 2004; Numakawa et al., 2004; Schwab et al., 2003; Straub et al., 2002a; Tang et al., 2003; Van Den Bogaert et al., 2003; van den Oord et al., 2003; Williams et al., 2004), 9 Untersuchungen berichten dabei über positive Assoziationshinweise in ihren Patientenkollektiven. Trotz dieser überaus überzeugenden Replikationsbefunde sind es unterschiedliche und populationsspezifische Haplotypen, die sich mit dem Erkrankungsstatus assoziiert zeigen (Abbildungen 2 und 3). Dies ist mit der sog. *common variant/common risk* Hypothese genetisch komplexer Krankheiten nur schwierig in Einklang zu bringen, einer theoretischen Überlegung, die von Humangenetikern und Epidemiologen (bislang) favorisiert wurde. Um die Häufigkeit genetisch-komplexer Krankheiten in der Bevölkerung zu beschreiben, sind hiernach die disponierenden Veränderungen ebenfalls recht frequent und sollten entsprechend früh in der Menschheitsgeschichte aufgetreten sein. Sollte es sich um eine einzige genetische Dispositions-Variante am *DTNBPI*-Locus handeln, ist anzunehmen, dass sie z. B. vor der Auftrennung in die schwedische, polnische oder deutsche Population auf einem Haplotyp erstmals aufgetreten ist. Dann sollte man aber vermuten, dass populationsübergreifend derselbe Haplotyp oder mit diesem nah verwandte Haplotypen in den unterschiedlichen Bevölkerungsgruppen Assoziationshinweise zeigen und nicht – wie im vorliegenden Fall – völlig

unverwandte Haplotypen populationsspezifisch assoziiert sind. Die Beobachtungen lassen daher die Hypothese zu, dass es sich am *DTNBPI*-Locus um populationsspezifische Risiko-Varianten handelt, die dann auch nicht älter als die jeweilige Bevölkerungsgruppe sind. Entsprechend würde es sich aber nicht um eine einzige Risiko-Variante handeln, sondern um mehrere unabhängig voneinander aufgetretene Dispositions-Varianten. Ohne Zweifel sind derartige Überlegungen zum jetzigen Zeitpunkt noch recht spekulativ. Die Klärung der sich darstellenden Komplexität wird sicher erst durch das Auffinden der Dispositionsvariante(n) und durch das Zugrundelegen weitaus größerer Assoziationskollektive mit unterschiedlichen genetischen Hintergründen möglich sein.

6.3.4 *DTNBPI*-Protein – Dispositionsfaktor für Schizophrene Störungen

Neben den bereits dargestellten Befunden von Bray et al. (2003, 2005) sind es Untersuchungen von Weickert et al. (2004) und Talbot et al. (2004), die darauf hindeuten, dass Veränderungen der Expression des *DTNBPI*-Gens krankheitsdisponierend sein könnten. *DTNBPI* wird neben seiner Funktion in der quergestreiften Muskulatur vor allem im adulten *ZNS* und dort in zahlreichen Hirnarealen exprimiert (Weickert et al., 2004), u. a. auch in der Hippocampusformation (*HF*) und den terminalen Endigungen von glutamatergen Neuronen mit Ursprung in der *HF*. Beide Arbeitsgruppen konnten an post-mortem Gewebe von schizophrenen Patienten eine reduzierte Expression des *DTNBPI*-Proteins im dorsolateralen und präfrontalen Cortex (*DLPFC*) bzw. in der *HF* nachweisen.

Funktionell handelt es sich beim *DTNBPI* um ein Bestandteil des Komplexes *BLOC-1*, der an der Regulation des *Cell-Trafficking* von lysosomalen Organellen beteiligt ist. Talbot et al. (2004) postulierten, dass *DTNBPI* über einen verminderten lysosomalen Abbau durch den in der *HF* besonders stark exprimierten Transporter *VGLUT-1* Einfluss auf den Glutamatstoffwechsel in dieser Region haben könnte. Andere Gruppen favorisieren aufgrund ihrer Untersuchungsergebnisse an murinem neuronalem Gewebe eher die Hypothese, dass *DTNBPI* über die Proteine *SNAP25* und *Synapsin 1* die exozytäre Glutamatfreisetzung reguliert und hierin das pathogene Korrelat schizophrener Störungen liegt (Numakawa et al., 2004). Die gleiche Studie zeigte auch, dass *DTNBPI* mit einer reduzierten Aktivierung des Proteins *Akt* in Zusammenhang steht. Zellen mit vermindert aktiviertem *Akt* zeigen eine reduzierte neuronale Überlebensfähigkeit gegenüber induziertem Stress (Numakawa et al., 2004), so dass apoptotische

Veränderungen in entsprechenden Hirnarealen von Bedeutung bei der Krankheitsentstehung sein könnten.

6.4 Abschließende Betrachtung

Ergebnisse bisheriger Studien deuten auf einen entscheidenden Einfluss der Region 6p21-24 auf die Krankheitsentstehung schizophrener Störungen hin. Die zahlreichen positiven Assoziationsbefunde konzentrieren sich auf im *DTNBPI*-Gen gelegene Varianten, wodurch vermutet werden muss, dass es sich hierbei um ein Krankheitsgen für schizophrene Störungen handelt. Allerdings scheint den assoziierten SNPs im *DTNBPI*-Gen keine funktionelle Bedeutung zu zukommen, die z. B. eine Veränderung der Aminosäuresequenz im Protein bewirken. Vielmehr werden die assoziierten SNPs in dem LD zu der bislang nicht identifizierten krankheitsverursachenden Variante liegen. Dabei scheint es sich um SNPs zu handeln, die die Expression oder Funktion des *DTNBPI*-Gens betreffen.

Die Bedeutung des *DNTBPI*-Locus an der Ätiologie und Pathogenese schizophrener Störungen wird sich durch weiterführende molekulargenetische, biostatistische und funktionelle Untersuchungen aufklären. Dabei sollte die vollständige Identifizierung und Typisierung aller genetischen Varianten am *DTNBPI*-Locus gemeinsam mit funktionellen Untersuchungen zur Identifizierung der prädisponierenden Variante führen. Mit Benennung der Dispositionsvariante wäre die Voraussetzung für zahlreiche weitere Untersuchungen geschaffen. So könnte geklärt werden, ob eine Interaktion zwischen *DTNBPI* und anderen bereits bei schizophrenen Störungen identifizierten Genen besteht (Gen-Gen-Interaktion). Zudem wäre die Identifikation von phänotypischen Dimensionen möglich, die im besonderen Maße durch den *DTNBPI*-Locus beeinflusst werden (Gen-Phänotyp-Analysen). Solche Untersuchungen könnten zu einer mehr ätiologisch geprägten Krankheitsklassifikation psychiatrischer Erkrankungen führen. Die Durchführung gezielter Gen-Umwelt-Analysen könnte zur Identifikation von spezifischen Umweltfaktoren führen, die Risikofaktoren für die Entwicklung einer schizophrenen Störung darstellen. Auf zellbiologischer Ebene werden Untersuchungen zur Funktion bzw. Dysfunktion des *dystrobrevin binding proteins 1* weitere Einsichten in den Pathomechanismus schizophrener Störungen bringen. So sind Analysen zur Identifikation der zellulären und subzellulären Lokalisation des Wildtyp- und aberanten Proteins notwendig. Des Weiteren wird es darum gehen, Protein-Protein-Interaktionen zu untersuchen, um den zellulären Pathway zu identifizieren, der schizophrenen Störungen zugrunde liegt. Bei den schon bekannten und durch weitere

Untersuchungen identifizierten zellulären Interaktionspartnern wird es sich um Proteine handeln, deren korrespondierende Gene geeignete Kandidaten für weitere Assoziationsuntersuchungen darstellen. Zudem wird das Generieren von Tiermodellen weitere Erkenntnisse bringen, sie werden kontrollierte Bedingungen schaffen für funktionelle, pharmokologische und standardisierte Phänotypanalysen.

Zusammenfassend gibt die Identifikation des Krankheitsgens *DTNBPI* bei schizophrenen Störungen Grund zur Hoffnung, dass hierdurch zukünftig weitere genetische und nicht-genetische Risikomarker detektiert und eine mehr biologisch begründete Diagnostik möglich werden. Zudem könnten zellbiologische Untersuchungen dazu führen, dass Pharmazeutika entwickelt werden, die eine effektivere und gezieltere Behandlung schizophrener Störungen ermöglichen. Aufbauend auf der Identifikation von *DTNBPI* und den sich ableitenden zukünftigen Erkenntnissen könnte das Auftreten und der Verlauf dieser Erkrankung positiv beeinflusst werden. Die Ergebnisse in der vorliegenden Arbeit könnten hierzu beigetragen haben.

7 Zusammenfassung

Obwohl das Krankheitsbild der Schizophrenie schon lange bekannt ist, sind die Ursachen, Risikofaktoren und Pathogenese der Erkrankung noch weitestgehend unbekannt. Dieses ist jedoch von zentraler Bedeutung, da die zumeist chronisch verlaufenden schizophrenen Störungen weitreichende psychosoziale Konsequenzen für Betroffene und ihr Umfeld haben. Als bisher größter Risikofaktor konnte die genetische bzw. familiäre Belastung identifiziert werden. So wird angenommen, dass der Anteil genetischer Faktoren am Entstehungsprozess der Erkrankung bei 82 bis 84% liegt (Cardno und Gottesman, 2000).

Durch zahlreiche genomweite Kopplungsuntersuchungen konnten bereits mehrere chromosomale Regionen identifiziert werden, in denen Krankheitsgene für die schizophrene Störung vermutet werden. Bei einer der Kopplungsregionen handelt es sich Chromosom 6p21-24, in ihr führten systematische Untersuchungen auf ein Kopplungsungleichgewicht (LD) zur Identifikation des putativen Krankheitsgens *dysbindin-binding-protein-1* (DTNBP1) (Straub et al., 2002a; van den Oord et al., 2003). Dass es sich hierbei tatsächlich um ein Dispositionsgen für schizophrene Störungen handelt, ist durch die positiven Assoziationsergebnisse anzunehmen, die an 11 unabhängigen Kollektiven mit schizophrener Störung unterschiedlicher Ethnizität erhoben wurden (De Luca et al., 2005; Funke et al., 2004; Kirov et al., 2004; Morris et al., 2003; Numakawa et al., 2004; Schwab et al., 2003; Straub et al., 2002a; Tang et al., 2003; Van Den Bogaert et al., 2003; van den Oord et al., 2003; Williams et al., 2004).

Zum Zeitpunkt unserer Untersuchungen lagen noch keine unabhängigen Assoziationsbefunde mit genetischen Varianten am *DTNBP1*-Locus und schizophrenen Störungen vor. Im Rahmen einer Replikationsanalyse untersuchten wir 5 SNP-Marker, die bei der initialen Studie die deutlichsten Assoziationsbefunde gezeigt hatten. Insgesamt wurden 3 unabhängige Fall-Kontroll-Kollektive aus Polen (174 Patienten mit schizophrener Störung, 120 Kontrollen), aus Schweden (88 Patienten, 54 Kontrollen) und aus Deutschland (199 Patienten, 219 Kontrollen) untersucht.

In der Einzelmarkeranalyse fanden sich nur im schwedischen Kollektiv für einen Marker signifikante Assoziationshinweise. In diesem Kollektiv waren darüber hinaus zahlreiche Haplotypen zum Erkrankungsstatus assoziiert. Da die positiven Ergebnisse anderer Arbeitsgruppen an Kollektiven mit hoher Krankheitsdichte erhoben wurden, führten wir eine Zusatzanalyse durch, in der wir unsere Kollektive nach Vorliegen einer positiven Familienanamnese stratifizierten. Trotz erheblicher Verringerung der Fallzahlen in den Kollektiven erhielten wir in der Einzelmarkeranalyse im schwedischen Kollektiv für zwei weitere

Marker positive Assoziationshinweise. Ebenso verstärkten sich die Befunde der Haplotypanalyse im schwedischen Kollektiv. Dass sich bei den Stratifikationsanalysen keine positiven Befunde in dem deutschen und dem polnischen Kollektiv ergaben, muss auf den Verlust an statistischer Aussagekraft (Power) zurückgeführt werden, der sich durch die Verringerung der Fallzahlen in diesen Stichproben ergab.

Aufgrund unserer Befunde und der Ergebnisse anderer Arbeitsgruppen ist davon auszugehen, dass das *DTNBPI* ein Dispositionsgen für schizophrene Störungen ist. Unsere Untersuchung deutet zudem darauf hin, dass der Effekt des *DTNBPI*-Gens bei Vorliegen einer positiven Familiarität am stärksten ist. Allerdings konnten die krankheitsverursachenden Varianten innerhalb des *DTNBPI*-Locus bislang nicht identifiziert werden. Die bisherigen Daten deuten darauf hin, dass es sich um populationspezifische genetische Veränderungen handelt, da unterschiedliche Allele- und Haplotypen in den untersuchten Populationen krankheitsassoziiert waren. Zudem wird es sich bei den krankheitsdisponierenden Veränderungen um Varianten handeln, die die Genexpression oder Genregulation betreffen. Trotz umfangreicher Resequenzierungen der kodierenden *DTNBPI*-Genabschnitte in unterschiedlichen Patientenkollektiven konnte bislang keine funktionelle Variante identifiziert werden. Zudem liegen Ergebnisse zur allelspezifischen *DTNBPI*-Expression vor, wonach das risikoassoziierte Transkript eine signifikant verminderte Expression zeigte.

Zusammenfassend gibt die Identifikation des Krankheitsgens *DTNBPI* bei schizophrenen Störungen Anlass zur Hoffnung, dass hierdurch zukünftig weitere genetische und nicht-genetische Risikomarker detektiert werden können (Gen-Gen- und Gen-Umwelt-Interaktionen). Durch detaillierte Genotyp-Phänotyp-Analysen wird ggf. auch eine mehr biologisch begründete Diagnostik schizophrener Störungen möglich werden. Zudem könnten zellbiologische Untersuchungen dazu führen, dass Pharmazeutika entwickelt werden, die eine effektivere und gezieltere Behandlung schizophrener Störungen ermöglichen. Somit könnte mit der Identifikation vom *DTNBPI* als Dispositionsfaktor für schizophrene Störungen das Auftreten und der Verlauf dieser Erkrankung positiv beeinflusst werden. Die Ergebnisse vorliegender Arbeit können hierzu einen Beitrag leisten.

Die Ergebnisse dieser Arbeit haben Eingang gefunden in die folgende Publikation:

Van Den Bogaert A, Schumacher J, Schulze TG, Otte AC, Ohlraun S, Kovalenko S, Becker T, Freudenberg J, Jonsson EG, Mattila-Evenden M, Sedvall GC, Czerski PM, Kapelski P, Hauser J,

Maier W, Rietschel M, Propping P, Nothen MM, Cichon S. The DTNBP1 (dysbindin) gene contributes to schizophrenia, depending on family history of the disease. *Am J Hum Genet* 2003; 73:1438-1443.

8 Literaturverzeichnis

American Psychiatric Association. Task Force on DSM-IV. Diagnostic and statistical manual of mental disorders : DSM-IV. 4th ed. Washington, DC: American Psychiatric Association; 1994.

American Psychiatric Association. Work Group to Revise DSM-III. Diagnostic and statistical manual of mental disorders : DSM-III-R. 3rd ed. Washington, DC: American Psychiatric Association; 1987.

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

Benkovic SJ, Cameron CE. Kinetic analysis of nucleotide incorporation and misincorporation by Klenow fragment of *Escherichia coli* DNA polymerase I. *Methods Enzymol* 1995; 262:257-269.

Benson MA, Newey SE, Martin-Rendon E, Hawkes R, Blake DJ. Dysbindin, a novel coiled-coil-containing protein that interacts with the dystrobrevins in muscle and brain. *J Biol Chem* 2001; 276: 24232-24241.

Blake DJ, Hawkes R, Benson MA, Beesley PW. Different dystrophin-like complexes are expressed in neurons and glia. *J Cell Biol* 1999; 147: 645-658.

Blake DJ, Nawrotzki R, Loh NY, Gorecki DC, Davies KE. beta-dystrobrevin, a member of the dystrophin-related protein family. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95:241-246.

Bray NJ, Buckland PR, Owen MJ, O'Donovan MC. Cis-acting variation in the expression of a high proportion of genes in human brain. *Hum Genet* 2003; 113:149-153.

Bray NJ, Preece A, Williams NM, Moskvina V, Buckland PR, Owen MJ, O'Donovan MC. Haplotypes at the dystrobrevin binding protein 1 (DTNBP1) gene locus mediate risk for schizophrenia through reduced DTNBP1 expression. *Hum Mol Genet* 2005; 14:1947-1954.

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

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

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

Daly MJ, Rioux JD, Schaffner SF, Hudson TJ, Lander ES. High-resolution haplotype structure in the human genome. *Nat Genet* 2001; 29:229-232.

De Luca V, Voineskos D, Shinkai T, Wong G, Kennedy JL. Untranslated region haplotype in dysbindin gene: analysis in schizophrenia. *J Neural Transm* 2005; 112:1263-1267.

Devlin B, Risch N. A comparison of linkage disequilibrium measures for fine-scale mapping. *Genomics* 1995; 29:311-322.

Dudbridge F. Pedigree disequilibrium tests for multilocus haplotypes. *Genet Epidemiol* 2003; 25:115-121.

Filichkin SA, Gelvin SB. Effect of dimethyl sulfoxide concentration on specificity of primer matching in PCR. *Biotechniques* 1992; 12:828-830.

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

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

Freedman R, Coon H, Myles-Worsley M, Orr-Urtreger A, Olincy A, Davis A, Polymeropoulos M, Holik J, Hopkins J, Hoff M, Rosenthal J, Waldo MC, Reimherr F, Wender P, Yaw J, Young DA, Breese CR, Adams C, Patterson D, Adler LE, Kruglyak L, Leonard S, Byerley W. Linkage of a neurophysiological deficit in schizophrenia to a chromosome 15 locus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997; 94:587-592.

Funke B, Finn CT, Plocik AM, Lake S, DeRosse P, Kane JM, Kucherlapati R, Malhotra AK. Association of the DTNBP1 locus with schizophrenia in a U.S. population. *Am J Hum Genet* 2004; 75:891-898.

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

Gottesman II, Wolfgram DL. *Schizophrenia genesis : the origins of madness*. New York: Freeman; 1991.

Higgins J. Effects of child rearing by schizophrenic mothers: a follow-up. *J Psychiatr Res* 1976; 13:1-9.

Huber G. *Psychiatrie Lehrbuch für Studium und Weiterbildung ; 44 Tabellen*. Stuttgart [u.a.]: Schattauer; 2005.

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.

Johnson GC, Esposito L, Barratt BJ, Smith AN, Heward J, Di Genova G, Ueda H, Cordell HJ, Eaves IA, Dudbridge F, Twells RC, Payne F, Hughes W, Nutland S, Stevens H, Carr P, Tuomilehto-Wolf E, Tuomilehto J, Gough SC, Clayton DG, Todd JA. Haplotype tagging for the identification of common disease genes. *Nat Genet* 2001; 29:233-237.

Kahle WL, Helmut ; Platzer, Werner. Taschenatlas der Anatomie für Studium und Praxis : [in 3 Bänden]. 6., überarb. Aufl. ed: Stuttgart ; New York : Thieme; München : Dt. Taschenbuch-Verl.; 1991.

Karamohamed S, Nilsson J, Nourizad K, Ronaghi M, Pettersson B, Nyren P. Production, purification, and luminometric analysis of recombinant *Saccharomyces cerevisiae* MET3 adenosine triphosphate sulfurylase expressed in *Escherichia coli*. *Protein Expr Purif* 1999; 15:381-388.

Kendler KS, Diehl SR. The genetics of schizophrenia: a current, genetic-epidemiologic perspective. *Schizophr Bull* 1993; 19:261-285.

Kendler KS, Gruenberg AM, Kinney DK. Independent diagnoses of adoptees and relatives as defined by DSM-III in the provincial and national samples of the Danish Adoption Study of Schizophrenia. *Arch Gen Psychiatry* 1994; 51:456-468.

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

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

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

Kirov G, Ivanov D, Williams NM, Preece A, Nikolov I, Milev R, Koleva S, Dimitrova A, Toncheva D, O'Donovan MC, Owen MJ. Strong evidence for association between the dystrobrevin binding protein 1 gene (DTNBP1) and schizophrenia in 488 parent-offspring trios from Bulgaria. *Biol Psychiatry* 2004; 55:971-975.

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

Lander E, Kruglyak L. Genetic dissection of complex traits: guidelines for interpreting and reporting linkage results. *Nat Genet* 1995; 11:241-247.

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

Li W, Zhang Q, Oiso N, Novak EK, Gautam R, O'Brien EP, Tinsley CL, Blake DJ, Spritz RA, Copeland NG, Jenkins NA, Amato D, Roe BA, Starcevic M, Dell'Angelica EC, Elliott RW, Mishra V, Kingsmore SF, Paylor RE, Swank RT. Hermansky-Pudlak syndrome type 7 (HPS-7) results from mutant dysbindin, a member of the biogenesis of lysosome-related organelles complex 1 (BLOC-1). *Nat Genet* 2003; 35:84-89.

Lindholm E, Ekholm B, Balciuniene J, Johansson G, Castensson A, Koisti M, Nylander PO, Pettersson U, Adolfsson R, Jazin E. Linkage analysis of a large Swedish kindred provides further support for a susceptibility locus for schizophrenia on chromosome 6p23. *Am J Med Genet* 1999; 88:369-377.

Maier W, Lichtermann D, Mingos J, Hallmayer J, Heun R, Benkert O, Levinson DF. Continuity and discontinuity of affective disorders and schizophrenia. Results of a controlled family study. *Arch Gen Psychiatry* 1993; 50:871-883.

Maier W, Lichtermann D, Mingos J, Heun R. Personality disorders among the relatives of schizophrenia patients. *Schizophr Bull* 1994; 20:481-493.

Marcelis M, Navarro-Mateu F, Murray R, Selten JP, Van Os J. Urbanization and psychosis: a study of 1942-1978 birth cohorts in The Netherlands. *Psychol Med* 1998; 28:871-879.

Maziade M, Bissonnette L, Rouillard E, Martinez M, Turgeon M, Charron L, Pouliot V, Boutin P, Cliche D, Dion C, Fournier JP, Garneau Y, Lavallee JC, Montgrain N, Nicole L, Pires A, Ponton AM, Potvin A, Wallot H, Roy MA, Merette C. 6p24-22 region and major psychoses in the Eastern Quebec population. *Le Groupe IREP. Am J Med Genet* 1997; 74:311-318.

McGuffin P, Sturt E. Genetic markers in schizophrenia. *Hum Hered* 1986; 36:65-88.

Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* 1988; 16:1215.

Moghaddam B. Bringing order to the glutamate chaos in schizophrenia. *Neuron* 2003; 40:881-884.

Moises HW, Yang L, Kristbjarnarson H, Wiese C, Byerley W, Macciardi F, Arolt V, Blackwood D, Liu X, Sjogren B, et al. An international two-stage genome-wide search for schizophrenia susceptibility genes. *Nat Genet* 1995; 11:321-324.

Morris DW, McGhee KA, Schwaiger S, Scully P, Quinn J, Meagher D, Waddington JL, Gill M, Corvin AP. No evidence for association of the dysbindin gene [DTNBP1] with schizophrenia in an Irish population-based study. *Schizophr Res* 2003; 60:167-172.

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

Myles-Worsley M, Coon H, McDowell J, Brenner C, Hoff M, Lind B, Bennett P, Freedman R, Clementz B, Byerley W. Linkage of a composite inhibitory phenotype to a chromosome 22q locus in eight Utah families. *Am J Med Genet* 1999; 88:544-550.

Numakawa T, Yagasaki Y, Ishimoto T, Okada T, Suzuki T, Iwata N, Ozaki N, Taguchi T, Tatsumi M, Kamijima K, Straub RE, Weinberger DR, Kunugi H, Hashimoto R. Evidence of novel neuronal functions of dysbindin, a susceptibility gene for schizophrenia. *Hum Mol Genet* 2004; 13:2699-2708.

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

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

Pritchard JK, Przeworski M. Linkage disequilibrium in humans: models and data. *Am J Hum Genet* 2001; 69:1-14.

Ronaghi M. Pyrosequencing sheds light on DNA sequencing. *Genome Res* 2001; 11:3-11.

Ronaghi M, Karamohamed S, Pettersson B, Uhlen M, Nyren P. Real-time DNA sequencing using detection of pyrophosphate release. *Anal Biochem* 1996; 242:84-89.

Ronaghi M, Uhlen M, Nyren P. A sequencing method based on real-time pyrophosphate. *Science* 1998; 281:363, 365.

Scharfman HE, Witter MP, Schwarcz R. The parahippocampal region. Implications for neurological and psychiatric diseases. Introduction. *Ann N Y Acad Sci* 2000; 911:ix-xiii.

Schulze TG, Chen YS, Akula N, Hennessy K, Badner JA, McInnis MG, DePaulo JR, Schumacher J, Cichon S, Propping P, Maier W, Rietschel M, Nothen MM, McMahon FJ. Can long-range microsatellite data be used to predict short-range linkage disequilibrium? *Hum Mol Genet* 2002; 11:1363-1372.

Schwab SG, Albus M, Hallmayer J, Honig S, Borrmann M, Lichtermann D, Ebstein RP, Ackenheil M, Lerer B, Risch N, et al. Evaluation of a susceptibility gene for schizophrenia on chromosome 6p by multipoint affected sib-pair linkage analysis. *Nat Genet* 1995; 11:325-327.

Schwab SG, Knapp M, Mondabon S, Hallmayer J, Borrmann-Hassenbach M, Albus M, Lerer B, Rietschel M, Trixler M, Maier W, Wildenauer DB. Support for association of schizophrenia with genetic variation in the 6p22.3 gene, dysbindin, in sib-pair families with linkage and in an additional sample of triad families. *Am J Hum Genet* 2003; 72:185-190.

Stober G, Saar K, Ruschendorf F, Meyer J, Nurnberg G, Jatzke S, Franzek E, Reis A, Lesch KP, Wienker TF, Beckmann H. Splitting schizophrenia: periodic catatonia-susceptibility locus on chromosome 15q15. *Am J Hum Genet* 2000; 67:1201-1207.

Straub RE, Jiang Y, MacLean CJ, Ma Y, Webb BT, Myakishev MV, Harris-Kerr C, Wormley B, Sadek H, Kadambi B, Cesare AJ, Gibberman A, Wang X, O'Neill FA, Walsh D, Kendler KS. Genetic variation in the 6p22.3 gene DTNBP1, the human ortholog of the mouse dysbindin gene, is associated with schizophrenia. *Am J Hum Genet* 2002a; 71:337-348.

Straub RE, MacLean CJ, Ma Y, Webb BT, Myakishev MV, Harris-Kerr C, Wormley B, Sadek H, Kadambi B, O'Neill FA, Walsh D, Kendler KS. Genome-wide scans of three independent sets of 90 Irish multiplex schizophrenia families and follow-up of selected regions in all families provides evidence for multiple susceptibility genes. *Mol Psychiatry* 2002b; 7:542-559.

Straub RE, MacLean CJ, O'Neill FA, Burke J, Murphy B, Duke F, Shinkwin R, Webb BT, Zhang J, Walsh D, et al. A potential vulnerability locus for schizophrenia on chromosome 6p24-22: evidence for genetic heterogeneity. *Nat Genet* 1995; 11:287-293.

Talbot K, Eidem WL, Tinsley CL, Benson MA, Thompson EW, Smith RJ, Hahn CG, Siegel SJ, Trojanowski JQ, Gur RE, Blake DJ, Arnold SE. Dysbindin-1 is reduced in intrinsic, glutamatergic terminals of the hippocampal formation in schizophrenia. *J Clin Invest* 2004; 113:1353-1363.

Tang JX, Zhou J, Fan JB, Li XW, Shi YY, Gu NF, Feng GY, Xing YL, Shi JG, He L. Family-based association study of DTNBP1 in 6p22.3 and schizophrenia. *Mol Psychiatry* 2003; 8:717-718.

Tienari PJ, Wynne LC. Adoption studies of schizophrenia. *Ann Med* 1994; 26:233-237.

Torrey EF, Bowler AE, Clark K. Urban birth and residence as risk factors for psychoses: an analysis of 1880 data. *Schizophr Res* 1997; 25:169-176.

Turecki G, Rouleau GA, Joober R, Mari J, Morgan K. Schizophrenia and chromosome 6p. *Am J Med Genet* 1997; 74:195-198.

Van Den Bogaert A, Schumacher J, Schulze TG, Otte AC, Ohlraun S, Kovalenko S, Becker T, Freudenberg J, Jonsson EG, Mattila-Evenden M, Sedvall GC, Czerski PM, Kapelski P, Hauser J, Maier W, Rietschel M, Propping P, Nothen MM, Cichon S. The DTNBP1 (dysbindin) gene contributes to schizophrenia, depending on family history of the disease. *Am J Hum Genet* 2003; 73:1438-1443.

van den Oord EJ, Sullivan PF, Jiang Y, Walsh D, O'Neill FA, Kendler KS, Riley BP. Identification of a high-risk haplotype for the dystrobrevin binding protein 1 (DTNBP1) gene in the Irish study of high-density schizophrenia families. *Mol Psychiatry* 2003; 8:499-510.

Van Eerdewegh P, Little RD, Dupuis J, Del Mastro RG, Falls K, Simon J, Torrey D, Pandit S, McKenny J, Braunschweiger K, Walsh A, Liu Z, Hayward B, Folz C, Manning SP, Bawa A, Saracino L, Thackston M, Benckekroun Y, Capparell N, Wang M, Adair R, Feng Y, Dubois J, FitzGerald MG, Huang H, Gibson R, Allen KM, Pedan A, Danzig MR, Umland SP, Egan RW, Cuss FM, Rorke S, Clough JB, Holloway JW, Holgate ST, Keith TP. Association of the ADAM33 gene with asthma and bronchial hyperresponsiveness. *Nature* 2002; 418:426-430.

Verdoux H, Takei N, Cassou de Saint-Mathurin R, Murray RM, Bourgeois ML. Seasonality of birth in schizophrenia: the effect of regional population density. *Schizophr Res* 1997; 23:175-180.

Weickert CS, Straub RE, McClintock BW, Matsumoto M, Hashimoto R, Hyde TM, Herman MM, Weinberger DR, Kleinman JE. Human dysbindin (DTNBP1) gene expression in normal brain and in schizophrenic prefrontal cortex and midbrain. *Arch Gen Psychiatry* 2004; 61:544-555.

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

Williams NM, Preece A, Morris DW, Spurlock G, Bray NJ, Stephens M, Norton N, Williams H, Clement M, Dwyer S, Curran C, Wilkinson J, Moskvina V, Waddington JL, Gill M, Corvin AP, Zammit S, Kirov G, Owen MJ, O'Donovan MC. Identification in 2 independent samples of a novel schizophrenia risk haplotype of the dystrobrevin binding protein gene (DTNBP1). *Arch Gen Psychiatry* 2004; 61:336-344.

World Health Organization. ICD-10 : international statistical classification of diseases and related health problems : tenth revision. 2nd ed. Geneva: World Health Organization; 2004.

Wright P, Nimgaonkar VL, Donaldson PT, Murray RM. Schizophrenia and HLA: a review. *Schizophr Res* 2001; 47:1-12.

Datenbanken:

http://research.marshfieldclinic.org/genetics/Map_Markers/mapmaker/SearchFormFrames.html

<http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgGateway?org=human>

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi>