

**Assoziationsanalysen zwischen genetischen Varianten im
Bereich der *Trace-Amin-Rezeptor*-Gene *TRAR1*, *TRAR4* und
TRAR5 und bipolar affektiven Störungen**

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

Ishani Sircar
aus Euskirchen

2008

Angefertigt mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: Prof. Dr. med. Peter Propping
2. Gutachter: PD Dr. med. Kai Ernst Wilhelm

Tag der Mündlichen Prüfung: 23.4.2008

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

Diese Dissertation ist auf dem Hochschulschriftenserver der ULB Bonn http://hss.ulb.uni-bonn.de/diss_online
elektronisch publiziert.

Meinen Eltern gewidmet

Inhaltsverzeichnis

	Seite
Abkürzungsverzeichnis	7
1 Einleitung	9
2 Theoretische Grundlagen	10
2.1 Bipolar affektive Störungen – Krankheitsbegriff	10
2.2 Genetik affektiver Störungen	11
2.2.1 Familienstudien	11
2.2.2 Zwillingsuntersuchungen	13
2.2.3 Adoptionsstudien	14
2.3 Bipolar affektive Störungen – Modellvorstellungen zur Vererbung	14
2.3.1 Formalgenetischer Übertragungsmechanismus	14
2.3.2 Unipolare und bipolare Verlaufsformen	15
2.4 Methoden zur Genidentifikation bei genetisch komplexen Erkrankungen	16
2.4.1 Kopplungsuntersuchungen	16
2.4.2 Assoziationsuntersuchungen	16
2.4.3 Genetische Varianten zur Genidentifikation bei genetisch komplexen Erkrankungen	19
2.5 Die Gene <i>TRARI</i> , <i>TRAR4</i> und <i>TRAR5</i> – Kandidatengene für affektive Störungen	19
2.5.1 Trace Amine und affektive Störungen	19
2.5.2 Chromosomale Region 6q23 – Bedeutung für bipolar affektive Störungen	21
3 Zielsetzung und Fragestellung	23
4 Material und Methoden	23
4.1 Patientenkollektiv	23
4.2 Geräte	24
4.3 Chemikalien	25
4.4 Enzyme und Längenstandards	25
4.5 Sonstige Ingredienzien und Materialien	26
4.6 Synthetische Oligonukleotide (Primer)	26
4.7 Isolierung und Aufbereitung humaner genomischer DNA	28
4.7.1 Isolierung und Reinigung der DNA	28

4.7.2	Photometrische Konzentrationsbestimmung und Überprüfung der Reinheit isolierter genomischer DNA	29
4.8	Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	29
4.9	Agarose-Gelelektrophorese	32
4.10	Genotypisierung durch Restriktionsfragment-Längen-Polymorphismus(RFLP)-Analyse	33
4.10.1	Auswahl geeigneter Restriktionsendonukleasen	34
4.10.2	Verdau von PCR-Produkten	34
4.10.3	Vorbereitung nativer 10%iger Polyacrylamidgele für RFLP-Assays	35
4.10.4	Gelelektrophorese	35
4.10.5	Silberfärbung der Polyacrylamidgele	36
4.11	Direktsequenzierung	36
4.11.1	Reinigung von PCR-Produkten mittels Glasfasersäulchen	37
4.11.2	Konzentrationsbestimmung von PCR-Produkten	37
4.11.3	Sequenzierung	37
5	Statistik	38
6	Ergebnisse	39
6.1	Validierung des RFLP-Assays durch Sequenzierung	39
6.2	Darstellung der genetischen Varianten in den Genen <i>TRAR1</i> , <i>TRAR4</i> und <i>TRAR5</i>	40
6.3	Assoziationsanalysen mit genetischen Varianten in den Genen <i>TRAR1</i> , <i>TRAR4</i> und <i>TRAR5</i>	44
6.3.1	Ergebnisse im Initialkollektiv mit bipolar affektiver Störung	44
6.3.2	Ergebnisse im Replikationskollektiv mit bipolar affektiver Störung	47
6.3.3	Ergebnisse im Gesamtkollektiv mit bipolar affektiver Störung	49
7	Diskussion	49
7.1	Aufklärung genetischer Ursachen komplex vererbter Krankheiten	49
7.2	Interpretation der Ergebnisse vorliegender Arbeit	50
7.3	Unabhängig publizierte Assoziationsergebnisse zwischen <i>TRAR4</i> und psychiatrischen Erkrankungen	51
7.4	Zusammenfassende Betrachtung und Ausblick	53
8	Zusammenfassung	55
9	Literaturverzeichnis	57
	Curriculum vitae	

Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
β -PEA	β -Phenylethylamin
bp	Basenpaar(e)
BPAD	bipolar affective disorder
C	Cytosin
<i>CARD15</i>	caspase recruitment domain 15
<i>DISC1</i>	disrupted in schizoprenia 1
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (engl.: desoxyribonucleic acid)
dNTP	Desoxyribonukleosid-5'-Triphosphat
ddNTP	Didesoxyribonukleosid-5'-Triphosphat
DSM	Diagnostisches und statistisches Manual psychischer Störungen
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EZ	Eineiige Zwillinge
G	Guanin
GPCR	G-Protein gekoppelter Rezeptor
5-HAT	5-Hydroxytryptamin (Serotonin)
KI	Koinzidenzintervall
kb	Kilobasenpaar(e)
LD	linkage disequilibrium
LOD-Score	logarithm of odds
MAO-B	Monoaminoxidase B
Mb	Megabasenpaar(e)
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure (engl.: messenger ribonucleic acid)
NIMH	National Institute of Mental Health
NPL	nonparametric linkage
OR	odds ratio
p	Wahrscheinlichkeit
PAA	Polyacrylamid
PCR	Polymerasekettenreaktion (engl.: polymerase chain reaction)
RFLP	Restriktionsfragment-Längen-Polymorphismus
RNA	Ribonukleinsäure (engl.: ribonucleic acid)
rpm	revolutions per minute
RT	Raumtemperatur
SA	Standardabweichung

SCID-I	Structured Clinical Interview for DSM-IV Axis I Disorders
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SNP	single nucleotide polymorphism
STR	short tandem repeat
T	Thymin
Taq-Polymerase	Polymerase von <i>Thermophilus aquaticus</i>
TBE-Puffer	Tris-Borsäure-EDTA-Puffer
TDT	Transmission-Disequilibrium-Test
TEMED	N',N',N',N-Tetramethyldiamin
TRAR	trace amine receptor
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Einheit einer Enzymaktivität (engl.: unit)
UCSC	University of California, Santa Cruz (bzw. UCSC genome browser)
UTR	Untranslatierter Bereich
ZZ	Zweieiige Zwillinge

1 Einleitung

Bipolar affektive Störungen stellen mit einer Prävalenz von etwa 0,5-1,5% ausgesprochen häufige Erkrankungen dar (Craddock und Jones, 1999). Dies trifft auf alle Kulturkreise und Populationen gleichermaßen zu. Es gibt nämlich – soweit bekannt – keine unterschiedlichen Prävalenzraten zwischen einzelnen Bevölkerungsgruppen (Regier et al., 1988). Das mittlere Erstmanifestationsalter bipolar affektiver Störungen liegt zwischen dem zweiten und dritten Lebensjahrzehnt, wenngleich auch Krankheitsausbrüche von der Pubertät bis in das hohe Lebensalter beobachtet werden (Angst, 1980; Smith und Weissman, 1992). Der typischerweise phasische Krankheitsverlauf bringt für die Patienten eine erhebliche Beeinträchtigung ihres Lebens über lange Zeiträume mit sich. Zudem sterben etwa 7-15% der Erkrankten durch Suizid (Guze und Robins, 1970; Huber, 1994).

Bereits der älteren psychiatrischen Forschung war die erhöhte familiäre Belastung von affektiven Störungen bekannt. Auch moderne, nach operationalisierten Kriterien ausgerichtete Studien konnten übereinstimmend die ätiologische Bedeutung genetischer Faktoren zeigen. Da es sich hierbei um den stärksten bislang erkannten prädisponierenden Faktor handelt, verspricht der molekulargenetische Ansatz, die derzeit erfolgreichste Strategie zur Erforschung der Ursachen affektiver Störungen zu sein. Durch die Fortschritte der modernen Molekulargenetik scheinen auch zunehmend die methodischen Möglichkeiten geschaffen, die verantwortlichen Krankheitsgene detektieren zu können. Dies, obwohl es sich um eine genetisch komplexe Krankheit handelt, die die Genetik und mit ihr die Biometrie und Bioinformatik vor weitaus größere Herausforderungen stellt, als es für die Identifizierung von Krankheitsgenen bei monogen erblichen Erkrankungen der Fall ist.

Zurzeit stehen prinzipiell zwei Methoden zur Identifikation von Krankheitsgenen bei genetisch komplexen Krankheiten zur Verfügung: der Kopplungs- und der Assoziationsansatz. Bei *Kopplungsanalysen* geht man davon aus, dass eine variable DNA-Sequenz (genetischer Marker) gemeinsam mit der krankheitsverursachenden Genveränderung innerhalb einer Familie vererbt wird, vorausgesetzt beide befinden sich auf einem Chromosom in nur geringem Abstand zueinander. Man versucht, innerhalb von Familien mit hoher Krankheitsdichte chromosomale Regionen zu identifizieren, in denen Krankheitsgene vermutet werden müssen. Bei *Assoziationsanalysen* wird überprüft, ob in einem Patientenkollektiv eine bestimmte DNA-Sequenzvariante – z.B. in einem Kandidatengen – überzufällig häufiger vorkommt als in einer

Kontrollgruppe. Auf diese Weise versucht man, die genetische Veränderung direkt zu identifizieren.

Die Zielsetzung vorliegender Arbeit lag darin, insgesamt 5 genetische Varianten in den Genen für die Trace-Amin-Rezeptoren 1 (*TRAR1*), 4 (*TRAR4*) und 5 (*TRAR5*) auf Assoziation mit bipolar affektiven Störungen hin zu untersuchen. Das hierfür gewählte Patientenkollektiv wurde von der Psychiatrischen Klinik des Universitätsklinikums Bonn zur Verfügung gestellt. Bei *TRAR1*, *TRAR4* und *TRAR5* handelt es sich um Kandidatengene, für die ein pathophysiologischer Zusammenhang mit der Entstehung affektiver Störungen vermutet werden kann. Die korrespondierenden Proteine sind Rezeptoren für Trace Amine, die bei affektiven Psychosen in ihrer Funktion oder Regulation betroffen sein könnten.

2 Theoretische Grundlagen

2.1 Bipolar affektive Störungen – Krankheitsbegriff

Nosologisch zählt die bipolar affektive Störung zu den endogenen Formen affektiver Psychosen und ist somit abzugrenzen von den exogenen oder auch organischen Psychosen. Letztere sind körperlich begründet und lassen sich einem somatischen Korrelat auf zerebraler oder damit verknüpfter Ebene zuordnen.

Huber (1994) charakterisiert affektive Störungen (Zyklothymien) als „unmotiviert Verstimmungen depressiv-gehemmter oder manisch-erregter Art“, deren Verlauf sich in Phasen gestaltet, d.h. zeitlich abgrenzbar ist, mit gewöhnlich mehrfach im Leben auftretenden Episoden. Im Intervall kommt es zu einer kompletten Remission der Gemütsverfassung. Phasenzahl als auch Phasen- bzw. Zyklusdauer variieren dabei erheblich. Der Symptomenkomplex der Depression ist dabei durch eine Denkhemmung, eine psychomotorische Hemmung (Antriebsstörung), Vitalstörungen, vegetative Symptome (vor allem Schlaf-, Appetit- und Verdauungsstörungen) und durch depressive Wahngedanken gekennzeichnet. Zu den Symptomen der Manie zählen indes eine Denkerregung (sog. Ideenflucht), eine psychomotorische Erregung, Gehobenheit der Vitalgefühle, körperlich-vegetative Auffälligkeiten und manische Wahneinfälle. Affektive Psychosen können sich bezüglich des Krankheitsverlaufs in unterschiedlicher Weise manifestieren: man spricht von *unipolaren Verlaufsformen* mit ausschließlich depressiven Phasen (mit etwa 66% weitaus am häufigsten) oder mit ausschließlich manischen Ereignissen (mit etwa 3-6% eher selten) und von *bipolaren Verläufen* (ca. 28%) mit alternierend depressiver und manischer Symptomatik (wobei meist die depressiven Phasen überwiegen).

Gegenstand der vorliegenden Arbeit ist die bipolar affektive Störung, deren Lebenszeitprävalenz etwa 0,5 bis 1,5% beträgt (Craddock und Jones, 1999). Eine nennenswerte Geschlechtspräferenz ließ sich bislang nicht beobachten. Das Alter bei Ersterkrankung erstreckt sich über die gesamte Erwachsenenperiode, d.h. von der Pubertät bis zum 70. Lebensjahr, das Mittel liegt bei etwa 30-35 Jahren (Angst, 1980). Smith und Weissman (1992) geben allerdings für bipolare Verläufe ein mittleres Erstmanifestationsalter von 21 Jahren an. Die Prognose quoad vitam ist bei affektiven Störungen erheblich durch das Suizidrisiko (v.a. in den depressiven Phasen) eingeschränkt. Die Suizidrate für die bipolaren Verlaufsformen beträgt laut neueren Daten ungefähr 7% (Huber, 1994).

Die Diagnose einer affektiven Störung und die Zuordnung zu dem jeweiligen Verlaufstyp richten sich nach den klinischen Ordnungsvorgaben der heute international verwendeten Klassifikationssysteme, den DSM-IV Kriterien (American Psychiatric Association, 1994) sowie den RDC-Kriterien (Research Diagnostic Criteria; Spitzer et al., 1975).

2.2 Genetik affektiver Störungen

Die Beobachtung, dass Gemütskrankheiten familiär gehäuft auftreten, ist alt. So beschreibt bereits Robert Burton in seinem erstmals 1621 erschienenen Werk „Anatomie der Melancholie“, dass „die Melancholie eine Erbkrankheit darstellt“ und beruft sich hierbei auf verschiedene Gelehrte wie z.B. Paracelsus, Fernelius (Jean Fernel), Crato, Rodericus a Fonsèca. Ab dem späten 18. Jahrhundert kam dann der Gedanke einer genetischen Komponente bei der Genese von Geisteskrankheiten auf. Philippe Pinel (1745-1826) beschreibt die Vererbung als Ursache von Geisteskrankheiten; er unterteilte sie in Manie, Melancholie, Demenz und Idiotie. Auch Jean-Etienne-Dominique Esquirol (1772-1840), ein Schüler Pinels, benannte unter anderem Erbanlagen als ätiologischen Faktor für Geisteskrankheiten; zudem waren sie für ihn Krankheiten des Gehirns.

Mit Beginn der zwanziger Jahre des 20. Jahrhunderts wurden dann eine Vielzahl von Familien, Zwillings- und Adoptionsstudien durchgeführt, deren Resultate den genetischen Stellenwert bei der Entstehung affektiver Störungen letztendlich bewiesen.

2.2.1 Familienstudien

Familienuntersuchungen gründen auf der Tatsache, dass verwandte Personen aufgrund ihrer Abstammung naturgemäß einen Teil ihrer Gene gemeinsam haben. Für viele Krankheiten,

einschließlich psychiatrischer, kann man dabei eine Korrelation des Erkrankungsrisikos einer Person mit der Nähe seiner Verwandtschaft zum Patienten finden. Dies trifft auch auf die affektiven Psychosen zu. So sinkt das empirische Wiederholungsrisiko mit abnehmender verwandtschaftlicher Nähe zu dem Betroffenen (Gershon et al., 1976) und steigt mit der Anzahl betroffener Familienangehöriger (Lieb et al., 2002; Gershon et al., 1982). Beispielsweise haben Kinder, deren Eltern beide von einer affektiven Störung betroffen sind, ein auf über 55% erhöhtes Morbiditätsrisiko (Bertelsen, 1985).

Eine von Craddock und Jones (1999) durchgeführte Meta-Analyse (Tab. 1) zeigt bezüglich bipolar affektiver Störungen, dass das Risiko für Verwandte 1. Grades eines Indexfalls, ebenfalls an einer bipolaren Störung zu erkranken, bei 5-10% liegt und somit gegenüber der Allgemeinbevölkerung um das 7fache erhöht ist. In den entsprechenden Familien wurden jedoch nicht nur die Erkrankungen der Patienten überzufällig häufig beobachtet, auch andere psychiatrische Störungsformen treten vermehrt auf. So beträgt das Risiko erstgradig Verwandter bipolarer Indexfälle für eine unipolare depressive Störung 10-20%. Dass das Risiko, an einer unipolaren Depression zu erkranken, hierbei sogar größer ist als das Risiko für eine bipolare Störung, erklärt sich durch die allgemein höhere Prävalenz unipolarer Störungen gegenüber bipolaren Formen (10% versus 1%) (McGuffin und Katz, 1989). Dementsprechend kommen auch unter den Verwandten unipolarer Indexpatienten relativ seltener bipolar affektive Erkrankungen vor (0,6-4%) (Gershon et al., 1982).

Tab. 1 Abstufung der Lebenszeitriskiken für affektive Störungen (Übersichtsarbeit von Craddock und Jones, 1999)

<i>Verwandtschaftsgrad zum bipolaren Probanden</i>	<i>Risiko für bipolar affektive Störung</i>	<i>Zusätzliches Risiko für unipolare Störung</i>
Eineiiger Ko-Zwilling	40-70%	15-25%
Verwandter 1. Grades	5-10%	10-20%
Allgemeinbevölkerung	0,5-1,5%	5-10%

Insgesamt ist aber das empirische Wiederholungsrisiko, an einer affektiven Psychose zu erkranken, für Verwandte 1. Grades bipolarer Indexfälle sehr viel höher (etwa 18,2%) als für Verwandten 1. Grades unipolar depressiver Probanden (etwa 7,1%) (Gershon et al., 1982).

Entsprechend scheint der Beitrag genetischer Faktoren bei bipolar affektiven größer als bei unipolar depressiven Störungen zu sein. Craddock und Forty (2005) beziffern den Erblichkeitsanteil bipolarer Störungen mit 89-93% und den unipolar depressiver Störungen mit 33-42%.

Darüber hinaus kann man einer Vielzahl von Familienstudien entnehmen, dass das Ersterkrankungsalter des Indexpatienten sowohl bei bipolaren als auch bei unipolaren Verläufen Einfluss auf das Wiederholungsrisiko für Familienangehörige hat. Entsprechend haben Verwandte früh erkrankter Patienten ein erhöhtes Morbiditätsrisiko im Vergleich zu Personen, deren Angehörige spät erkrankt sind (Gershon et al., 1976; Baron et al., 1981; Strober, 1992).

2.2.2 Zwillingsuntersuchungen

Erhöhte Morbiditätsraten bei Familienangehörigen erkrankter Patienten können auch auf ähnliche Lebensbedingungen zurückgeführt werden. Eine Differenzierung zwischen genetischen, familiären und sozialpsychiatrischen Faktoren ist durch Zwillingsuntersuchungen möglich. Dabei versucht man durch den Vergleich eineiiger Zwillinge (EZ) mit zweieiigen Zwillingen (ZZ), den genetischen Anteil an der Ausprägung eines Merkmals abzuschätzen.

Eineiige Zwillinge besitzen identische Erbanlagen. Unterschiede im phänotypischen Erscheinungsbild lassen sich folglich auf Umwelteinflüsse zurückführen. Zweieiige Zwillinge haben (wie normale Geschwister) nur die Hälfte ihrer Gene gemeinsam, phänotypische Unterschiede sind hier das Resultat sowohl von genetischen als auch von exogenen Faktoren. Hohe Konkordanzraten bei EZ im Vergleich zu niedrigen Konkordanzraten bei ZZ weisen daher stark auf das Gewicht von genetischen Faktoren hin.

Zwischen 1928 und 1977 sind zehn Zwillingsstudien zu affektiven Psychosen durchgeführt worden, deren wesentliche Ergebnisse einer Übersichtsarbeit von Propping (1989) zu entnehmen sind. Die Untersuchungen lassen folgende Aussagen zu: (1) In allen Untersuchungen liegen die Konkordanzraten für affektive Störungen bei EZ weitaus höher als bei ZZ (EZ/ZZ-Verhältnis: 4,0). Der Einfluss psychosozialer Faktoren wird jedoch auch sichtbar, da die Konkordanzraten auch bei EZ unter 100% liegen. (2) Für bipolare Verlaufsformen liegt die EZ-Konkordanz deutlich höher (EZ/ZZ-Verhältnis: 5,2) als für unipolare Verläufe (EZ/ZZ-Verhältnis: 3,1). Der Einfluss genetischer Faktoren scheint somit bei bipolaren Psychosen stärker ausgeprägt zu sein als bei unipolaren Störungen. (3) Die meisten, aber nicht alle für affektive Störungen

konkordanten EZ-Paare stimmen auch im Verlaufstypus überein. Entsprechend zeigten Craddock und Jones (1999), dass eineiige Zwillingspartner bipolarer Patienten ein Lebenszeitrisko für bipolar affektive Störungen von 40-70% haben und ein zusätzliches Risiko von 15-25%, an einer unipolar depressiven Störung zu erkranken (Tab. 1).

2.2.3 Adoptionsstudien

Eine weitere Methode, genetische und exogene Einflüsse als Ursachenfaktoren zu trennen, stellen Adoptionsstudien dar. Hierbei vergleicht man die Häufigkeit des Auftretens eines Phänotyps bei den biologischen und den Adoptivverwandten. Mendlewicz und Rainer (1977) konnten in ihrer Adoptionsstudie, in die 29 bipolare Adoptivfälle und 22 gesunde Adoptivfälle einbezogen wurden, zeigen, dass sich die höchste Rate psychiatrischer Erkrankungsformen aus dem affektiven Spektrum unter den biologischen Eltern der bipolaren Patienten fanden (31% vs. 2,3% bei den biologischen Eltern gesunder Kontrollen).

2.3 Bipolar affektive Störungen – Modellvorstellungen zur Vererbung

2.3.1 Formalgenetischer Übertragungsmechanismus

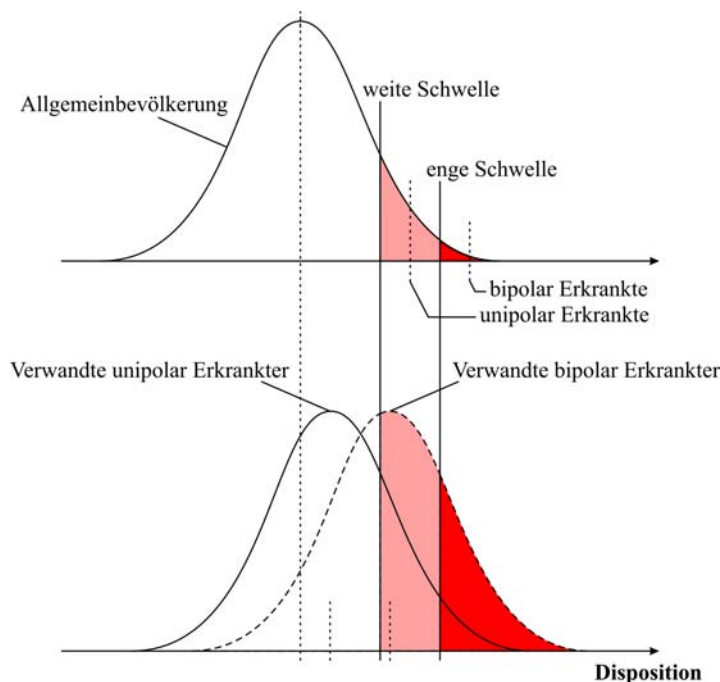
Für die meisten Fälle von affektiven Störungen muss angenommen werden, dass sie genetisch komplex vererbt werden. Man vermutet, dass gleichzeitig mehrere Genveränderungen bzw. Genvarianten bei einer Person für die Erkrankung disponieren, wobei die Effektstärke jeder einzelnen Genvariante unterschiedlich sein dürfte. In unterschiedlichem und individuellem Zusammenspiel sowie in Wechselwirkung miteinander (Epistase) tragen sie zur Krankheitsdisposition bei. Das klinische Erscheinungsbild dürfte hierbei als Endzustand aufzufassen sein, an dem überdies auch nicht-genetische Faktoren beteiligt sind (Propping, 1989).

Ungeklärt ist bislang, ob affektiven Störungen eine relativ geringe Anzahl von Genveränderungen mit jeweils starkem Effekt (oligogenes Modell) zugrunde liegt oder aber eine Vielzahl von Genveränderungen mit jeweils geringem Effekt verursachend ist (polygenes Modell). Einige Arbeitsgruppen favorisieren das polygene Übertragungsmodell, dann müssten die Genvarianten in der Bevölkerung allerdings sehr häufig sein, weil man sonst die empirischen Wiederholungsziffern unter den Verwandten 1. Grades (5-10%) nicht erklären könnte. Andere geben dem oligogenen Modell den Vorzug, da es eher mit dem hohen Erkrankungsrisiko bei erstgradig Verwandten im Vergleich zur Allgemeinbevölkerung in Einklang zu bringen ist.

2.3.2 Unipolare und bipolare Verlaufsformen

Das gehäuft zu beobachtende Nebeneinander von bipolaren und unipolaren Verlaufsformen innerhalb einzelner Familien legt die Vermutung einer gemeinsamen (genetischen) Entstehungsgrundlage nahe. Das Zwei-Schwellen Modell (Gershon et al., 1976) fasst diesen Aspekt auf und gilt derzeit als das am meisten favorisierte Konzept, das intrafamiliär gehäufte Auftreten beider Verlaufsformen auf genetischer Ebene zu erklären. Es geht von einer Normalverteilung der Häufigkeit genetischer Dispositionsfaktoren in der Bevölkerung aus (Abb. 1). Dabei wird vorausgesetzt, dass uni- und bipolaren Verlaufsformen die gleichen genetischen Dispositionsfaktoren zugrunde liegen. Wird nun eine „weite“ Schwelle an Dispositionsfaktoren überschritten, kommt es zur Ausbildung einer unipolar affektiven Störung, beim Überschreiten der „engen“ Schwelle resultieren hingegen bipolare Verlaufsformen. Für Familienangehörige affektiv erkrankter Personen ist die Verteilungskurve nach rechts verschoben, somit liegt ein höherer Dispositionswert vor. Da man annimmt, dass bei bipolaren Verläufen die genetische Disposition stärker ausgeprägt ist, leitet sich folgendes – tatsächlich zu beobachtendes – ab (Gershon et al., 1975): (1) Das Wiederholungsrisiko für affektive Erkrankungen ist unter den Verwandten bipolarer höher als unter den Verwandten unipolarer Patienten. (2) Verwandte bipolarer Patienten sind häufiger an bipolaren Verlaufsformen erkrankt als Verwandte unipolarer Patienten.

Abb. 1. Zwei-Schwellen Modell (nach Gershon et al., 1976)



Die Befunde der meisten Familienstudien lassen sich in das Zwei-Schwellen-Modell integrieren (Gershon et al., 1982). Demnach folgt die Erkrankungsdisposition bei Verwandten erkrankter Personen ebenfalls einer Normalverteilung, jedoch ist die Kurve nach rechts verschoben, also in Richtung stärkerer genetischer Disposition und dies für Verwandte bipolar Erkrankter stärker als für Verwandte unipolarer Probanden.

2.4 Methoden zur Genidentifizierung bei genetisch komplexen Erkrankungen

2.4.1 Kopplungsuntersuchungen

Unter Kopplung versteht man die gemeinsame Vererbung (Kosegregation) eines genetischen Markers, d.h. einer bekannten variablen DNA-Sequenz, mit einem Krankheitsphänotyp innerhalb einer Familie. Es wird davon ausgegangen, dass der genetische Marker (z.B. ein STR-Marker) zusammen mit der krankheitsverursachenden Mutation vererbt wird, sofern er sich in derselben genetischen Region befindet. Je größer die chromosomale Nähe zwischen Markerallel und Defektallel ist, desto geringer ist die Wahrscheinlichkeit, dass beide durch ein Rekombinationsereignis während der Meiose getrennt und unabhängig voneinander weitervererbt wurden. Durch Kopplungsanalysen kann man somit eine Aussage über die chromosomale Lokalisation eines potentiellen Krankheitsgens treffen.

Hinsichtlich der Bewertung der Ergebnisse von genomweiten Kopplungsanalysen bei genetisch komplexen Erkrankungen bezeichnet man einen Kopplungsbefund als *suggestive*, 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, dass man zufällig in 5 von 100 durchgeführten Genom-Scans zu erwarten hätte. Bei parametrischen Analysen kommt dies einem LOD-Score von 3,3 ($p=0,000049$), bei nicht-parametrischen Analysen einem NPL-Score von 3,6 ($p=0,000022$) gleich.

2.4.2 Assoziationsuntersuchungen

Assoziation beschreibt das überzufällig häufige Vorkommen eines Risikofaktors in einem Patientenkollektiv. Bei molekulargenetischen Assoziationsanalysen werden DNA-Varianten – z.B. in ausgewählten Genen (Kandidatengen) – betrachtet. Von den Kandidatengen wird vermutet, dass sie am Erkrankungsprozess beteiligt sind.

Eine Assoziation zwischen einem bestimmten Allel und einer Krankheit kann im Prinzip auf zwei Ursachen zurückgeführt werden: (1) Das Allel selbst ist für die Krankheit verantwortlich, indem die entsprechende Variante eine Veränderung der Aminosäuresequenz oder der Expression des resultierenden Genproduktes zur Folge hat. (2) Das assoziierte Allel ist selbst nicht an der Krankheit beteiligt, befindet sich aber auf genomischer Ebene in enger Nachbarschaft zu der disponierenden Variante, so dass ein Kopplungsungleichgewicht zwischen der untersuchten und der eigentlich krankheitsverursachenden Variante besteht. Kopplungsungleichgewicht entsteht in der Evolution dann, wenn bei einem Individuum eine krankheitsverursachende Mutation auftritt und sich ein Großteil der Erkrankten in folgenden Generationen auf diese Person zurückführen lässt (sog. Gründereffekt). Gemeinsam mit der Mutation wird dann auch der die Mutation flankierende genomische Bereich überzufällig häufig weitergegeben. Varianten in diesem Bereich liegen dann im Kopplungsungleichgewicht zur eigentlich krankheitsdisponierenden Veränderung. Das Kopplungsungleichgewicht und damit die Assoziation bleiben in der Evolution jedoch nur dann bestehen, wenn nicht wiederholt Mutationen bei unabhängigen Personen zu demselben Krankheitsallel geführt haben, wenn der Abstand zwischen den beiden Genloci so gering war, dass im Laufe der Zeit keine Rekombinationsereignisse stattgefunden haben und wenn sich für die Träger des krankheitsverursachenden Allels kein Selektionsnachteil ergab. Kopplungsungleichgewichte zwischen Markern lassen sich als Haplotypen darstellen. Als Haplotyp bezeichnet man zwei oder mehrere nebeneinander liegende Marker bzw. Allele, die gemeinsam als Einheit vererbt werden.

Als Maß für die Assoziation zwischen einem Risikofaktor, hier also die untersuchte Genvariante, und der Krankheit findet das „Relative Risiko“ Anwendung, das auch als „Odds Ratio“ ausgedrückt wird. Das Relative Risiko entspricht dem Verhältnis der Krankheitshäufigkeit bei Exposition gegenüber einem Risikofaktor zu der relativen Krankheitshäufigkeit ohne Exposition. Es wird also angegeben, wieviel mal wahrscheinlicher es ist, dass ein Träger eines bestimmten Allels im Vergleich zu Personen erkrankt, die das Allel nicht tragen. Die Berechnung der Odds Ratio erfolgt anhand einer Vierfeldertafel:

	Allel 1	Allel 2
Patienten	a	b
Kontrollen	c	d

Hierbei stehen a-d für die Häufigkeiten des Vorkommens von Allel 1 oder 2 bei Patienten bzw. Kontrollpersonen. Es gilt:

$$\text{Odds Ratio (OR)} = \frac{a \cdot d}{b \cdot c}$$

Die Odds Ratio gibt in diesem Beispiel die Risikoerhöhung für den Träger von Allel 1 an. Die Schätzung wird mit einem 95%-Konfidenzintervall (95%-KI) versehen, d.h. mit dem Intervall, in dem die Odds Ratio mit einer Wahrscheinlichkeit von 95% liegt.

Grundsätzlich stellen Assoziationsuntersuchungen eine etablierte Methode bei der Erforschung von Krankheiten mit genetisch komplexer Vererbung dar, insbesondere wenn Genveränderungen mit geringem oder schwachem krankheitsverursachenden Effekt vermutet werden.

In Abhängigkeit der Struktur des untersuchten Kollektivs unterscheidet man bei Assoziationsuntersuchungen Fall-Kontroll- und familienbasierte Analysen.

Fall-Kontroll-Assoziationsuntersuchungen: Im einfachsten Fall stellt die Assoziationsstudie eine klassische Fall-Kontroll-Studie dar. In ethnisch übereinstimmenden Patienten- und Kontrollkollektiven untersucht man die Frequenzen des Allels oder des Genotyps einer Variante und versucht, statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Kollektiven darzustellen. Um nicht falsch-positive oder falsch-negative Befunde zu erhalten, ist es dabei entscheidend, dass Patienten und Kontrollpersonen den gleichen genetischen Hintergrund haben. Entstammen die Kollektive nämlich nicht derselben ethnischen Population, können unterschiedliche Allel- und Genotypfrequenzen auf ethnischen Abweichungen zwischen den Bevölkerungsgruppen beruhen (sog. Stratifikationseffekt). *Familienbasierte Assoziationsstudien:* Bei diesem Design werden erkrankte Individuen samt ihren gesunden Eltern analysiert. Eine solche Untersuchungseinheit bezeichnet man als Trio. Sie hat den Vorteil, dass keine Stratifikationseffekte auftreten können, da Parallelisierung besteht. Zur Durchführung findet neben der Haplotype-relative-risk (HRR)-Methode der Transmission-Disequilibrium-Test (TDT) Anwendung. Bei letztgenanntem beobachtet man, wie häufig ein bestimmtes Allel von einem heterozygoten Elternteil an den Indexpatienten weitergegeben wird (Spielman et al., 1993). Es wird die Transmissionsrate eines disponierenden Allels untersucht. Besitzt ein Elternteil beispielsweise die Allele A und B, beträgt die a priori-Wahrscheinlichkeit, dass entweder A oder B an das Kind vererbt wird, jeweils 50%. Ist nun Allel A das krankheitsverursachende oder liegt im Kopplungsungleichgewicht zur

disponierenden Veränderung, erwartet man, dass das Allel A überzufällig häufig an das erkrankte Kind weitergegeben wird.

2.4.3 Genetische Varianten zur Genidentifikation bei genetisch komplexen Erkrankungen

Unter anderem werden Assoziationsstudien im Bereich von Genen durchgeführt, denen aufgrund pathophysiologischer Hypothesen eine Rolle bei der Entstehung einer Erkrankung zukommen könnte (Kandidatengene). Dabei wird zunächst sowohl in kodierenden als auch nicht-kodierenden DNA-Regionen der Kandidatengene (in Introns, Exons und das Gen flankierenden Sequenzen) nach Varianten gesucht. Hierbei können theoretisch alle Arten von Varianten bzw. Polymorphismen Assoziationsuntersuchungen zugrunde gelegt werden. Am gängigsten ist jedoch die Analyse von Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs), da sie die häufigsten genetischen Varianten zwischen Individuen und Populationen darstellen. Es handelt sich um biallelische DNA-Varianten, die durch einfache Basensubstitutionen bzw. Punktmutationen gekennzeichnet sind.

2.5 Die Gene *TRAR1*, *TRAR4* und *TRAR5* – Kandidatengene für affektive Störungen

2.5.1 Trace Amine und affektive Störungen

Neben den klassischen biogenen Aminen Noradrenalin, Dopamin und Serotonin, die in ihrer Aufgabe als Neurotransmitter hinsichtlich Funktion und Wirkweise bereits in hohem Maße erforscht sind, gibt es auch eine als Trace Amine bezeichnete Gruppe biogener Amine. Hierzu zählen Tyramin, β -Phenylethylamin (β -PEA), Tryptamin und Octopamin, die in geringer Konzentration (etwa im nanomolaren Bereich) in Geweben von Säugern, darunter auch im ZNS, vorkommen und in ihrer Struktur und ihrem Metabolismus den bekannten Katecholaminen ähneln.

Die Synthese der Trace Amine erfolgt über die L-aromatische Aminosäure-Decarboxylase (Dopa-Decarboxylase) aus den jeweiligen Aminosäure-Vorläufern (L-Tyrosin, L-Phenylalanin und L-Tryptophan) bzw. für Octopamin durch einen zusätzlichen Umwandlungsschritt mittels der Dopamin- β -Hydroxylase. Der Abbau erfolgt für β -PEA vorzugsweise über die Monoaminoxidase B (MAO B), für Tyramin und Octopamin neben MAO B auch über MAO A und für Tyramin maßgeblich über MAO A (Boulton et Dyck, 1974; Tallman et al., 1976). Neben diesem Hauptweg der Metabolisierung können Trace Amine auch über die unspezifische N-

Methyltransferase und die Phenylethanolamin-N-Methyltransferase in die entsprechenden sekundären Amine (z.B. N-Methylphenylethylamin, N-Methyltyramin, Synephrin, N-Methyltryptamin) umgewandelt werden, die ähnliche Wirkungen auf TRAR1 (s.u.) wie ihre Vorläufer haben (Lindemann und Hoener, 2005).

Bislang wurde Trace Aminen eine Rolle als sog. falsche Transmitter zugeschrieben (Mc Geer et al., 1979), die lediglich indirekt über die Entleerung von Speichervesikeln, Hemmung der Wiederaufnahme und erhöhten Ausstrom der klassischen endogenen Amine eine modulatorische Wirkung entfalten. Inzwischen weiß man aber aus pharmakologischen Tests, dass Trace Amine durchaus als echte Transmitter anzusehen sind (Borowsky et al., 2001).

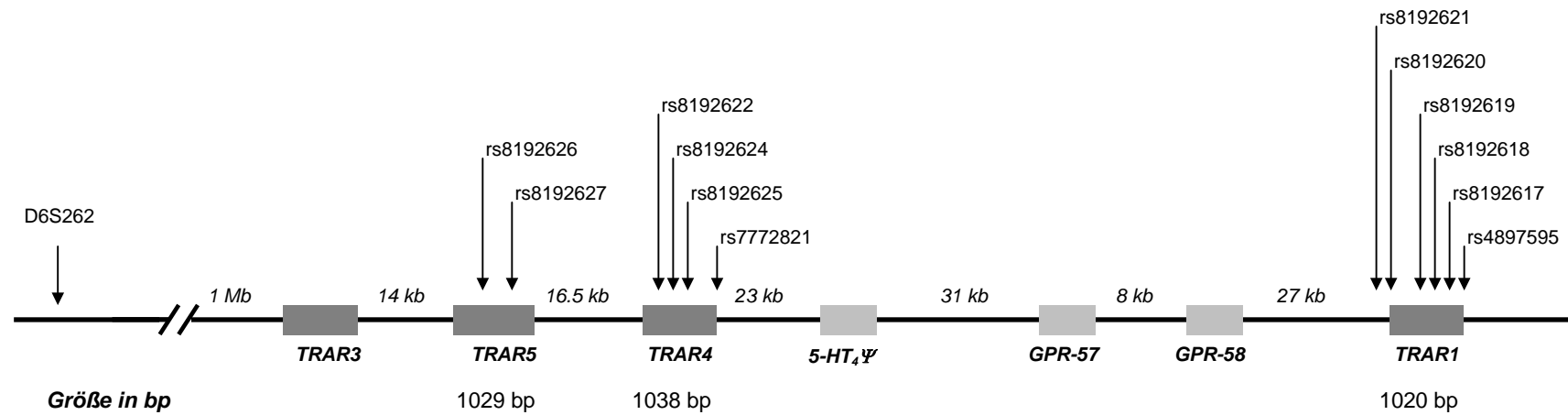
Bei einigen neuropsychiatrischen Erkrankungen wie den affektiven Störungen, der Schizophrenie und dem Aufmerksamkeitsdefizit-/Hyperaktivitäts-Syndrom wurden veränderte Urinspiegel von Trace Aminen gefunden (Usdin et Sandler, 1976; Boulton et al., 1988; Saaverda, 1989; Merikangas et al., 1995; Janssen et al., 1999). Darüber hinaus soll ein funktioneller Mangel an β -PEA zur Ausbildung einer depressiven Symptomatik führen (Sabelli und Mosnaim, 1974). Auf der anderen Seite wurde ein Zusammenhang zwischen erhöhten β -PEA-Werten im Urin und manischen Phasen bei bipolarer affektiver Störung beschrieben (Linnoila et al., 1983). Auch pharmakologische Studien deuten auf eine mögliche Beteiligung von Trace Aminen am Entstehungsprozess von affektiven Störungen hin. So haben Antidepressiva wie Selegilin, die als Inhibitoren der MAO-B agieren, einen beträchtlichen Anstieg des β -PEA-Spiegels aufgrund verzögerten Abbaus zur Folge (Juorio et al., 1988; Berry et al., 1994). Entsprechend zeigen auch MAO-B knock-out-Mäuse einen 8fachen Anstieg der Konzentration von β -PEA sowohl im Urin als auch im Hirn. Verhaltensbiologisch zeigen diese Mäuse eine im Vergleich zu Wildtypmäusen signifikant erhöhte stressinduzierte Hyperaktivität im erzwungenen Schwimmtest, die auch in einem nach Wochen wiederholten Test persistierte (Grimbsy et al., 1995). Auffälligkeiten des Trace Amin-Stoffwechsels wurden auch bei schizophrenen Störungen beobachtet. So wurde ein erhöhter β -PEA-Spiegel im Urin von Patienten gefunden (Davis et al., 1991; O'Reilly et al., 1991). Des Weiteren haben erhöhte zentralnervöse Spiegel von β -PEA bei Affen Effekte mit verstärktem stereotypen Verhalten sowie erhöhter lokomotorischer Aktivität gezeigt, ähnlich den Auswirkungen von psychomotorisch stimulierenden Drogen wie Kokain oder Amphetamin (Bergman et al., 2001).

Borowsky et al. (2001) gelang die Identifikation der humanen Trace-Amin-Rezeptoren TRAR1, TRAR4 und TRAR5, die im hohen Maß homologe Sequenzen aufweisen und einer Unterfamilie von Rhodopsin G-Protein gekoppelten Rezeptoren (GPCR) angehören, die Verwandtschaft zu 5-HT-, Dopamin- und Noradrenalin-Rezeptoren aufweist. Es handelt sich dabei um integrale Membranproteine. Funktionell ergaben pharmakologische Tests mit verschiedenen Bioaminen für TRAR1 die stärkste Aktivierung durch die Agonisten β -PEA und Tyramin, worin sich Vermutungen begründen, dass Trace Amine echte Neurotransmitter sind. Die gewebespezifische Expression der drei Trace-Amin-Rezeptoren wurde mittels quantitativer RT-PCR untersucht. Neben peripheren Geweben ließ sich die mRNA der Trace-Amin-Rezeptoren insbesondere in bestimmten Arealen des ZNS nachweisen, darunter in der Amygdala und dem Hippocampus; Bereiche, die mit kognitiven Funktionen, Emotion und Affekt in Verbindung gebracht werden. Die für TRAR1, TRAR4 und TRAR5 kodierenden Gene, die jeweils aus einem Exon bestehen, befinden sich in einem umschriebenen genomischen Bereich auf Chromosom 6q23.2 (Abb. 2) Innerhalb dieses *TRAR*-Clusters sind zudem *TRAR3*, das nur in der Niere (Borowsky et al., 2001) sowie in der Glandula pituitaria und im Skelettmuskel (Vanti et al., 2003) exprimiert wird, und die zur GPCR-Subfamilie gehörenden Pseudogene *GPR57*, *GPR58*, *5-HT4 Ψ* und *PNR* lokalisiert.

2.5.2 Chromosomale Region 6q23 – Bedeutung für bipolar affektive Störungen

Bei der chromosomalen Region 6q23 handelt es sich um eine Kopplungsregion für bipolare affektive Störungen. Bei einem Genom-Scan (genomweite Kopplungsanalyse) an 75 Familien mit bipolar affektiver Störung zeigten sich starke Kopplungshinweise bei STR-Marker D6S262 mit einem NPL-Score von 3,75 (Cichon et al., 2001). D6S262 ist etwa 1 Mb proximal vom *TRAR*-Cluster auf Chromosom 6q23.2 lokalisiert. Darüber hinaus erhielten Ewald et al. (2002) bei ihrem Genom-Scan an zwei Multiplex-Familien mit bipolar affektiver Störung einen NPL-Score von 2,49 für D6S1009 und Rice et al. (1997) fanden bei demselben STR-Marker einen LOD-Score von 2,08 bei 97 Familien mit bipolar affektiven Störungen. D6S1009 ist etwa 5 Mb distal vom *TRAR*-Cluster kartiert. Interessanterweise ergeben sich auch bei schizophrenen Störungen in unabhängigen Kollektiven Kopplungshinweise in dieser Region. So liegt das *TRAR*-Cluster innerhalb SCZD5 (MIM 603175), ein Suszeptibilitätslocus für schizophrene Störungen, der durch das Humane Gene Nomenclature Committee gelistet wird.

Abb. 2 Genomische Struktur und Lokalisation genetischer Varianten in den humanen *Trace-Amin-Rezeptor-Genen* (*TRARs*) in der chromosomalen Region 6q23.2



3 Zielsetzung und Fragestellung

Bei den Genen *TRAR1*, *TRAR4* und *TRAR5* handelt es sich sowohl unter funktionellen wie auch unter positionellen Aspekten um geeignete Kandidatengene für bipolar affektive Störungen. Sie sind in einer Suszeptibilitätsregion für bipolar affektive Störungen lokalisiert und verschiedene funktionelle Untersuchungen deuten auf eine Beteiligung von Trace Aminen am Entstehungsprozess bipolar affektiver Erkrankung hin. Die vorliegende Arbeit hatte zum Ziel, den möglichen Beitrag dieser Gene an der Ätiologie von bipolar affektiven Störungen zu untersuchen. Hierfür wurden fünf von zwölf zuvor identifizierten Varianten (Freudenberg-Hua et al. 2003) unter funktionellen Gesichtspunkten ausgewählt und einer familienbasierten Assoziationsstudie zugeführt. Insgesamt wurden 118 Trios mit bipolar affektiven Störungen untersucht. Im Einzelnen wurden rs8192620 in *TRAR1*, rs8192624 (V265I), rs8192625 (C291Y) und rs7772821 in *TRAR4* und rs8192627 (D328A) in *TRAR5* analysiert. Um die positiven Ergebnisse, die sich bei den Untersuchungen im Bereich von *TRAR4* im Trio-Kollektiv zeigten, zu replizieren, wurden die drei SNPs in *TRAR4* anschließend in einer unabhängigen Stichprobe analysiert, die 263 Patienten mit bipolar affektiver Störung und 430 Kontrollprobanden umfasste.

4 Material und Methoden

4.1 Patientenkollektiv

Den molekulargenetischen Untersuchungen vorliegender Arbeit wurde insgesamt die DNA von 1047 Personen, allesamt deutscher Abstammung, zugrunde gelegt. Ein initiales Kollektiv für die Assoziationsuntersuchung im Bereich von *TRAR1*, *TRAR4* und *TRAR5* bestand aus 118 Eltern-Kind-Trios (Indexpatient mit bipolar affektiver Störung, durchschnittliches Ersterkrankungsalter 23 Jahre, SA 7 Jahre). Da sich dabei positive Ergebnisse für Varianten im Bereich von *TRAR4* ergaben, wurde anschließend ein Replikationskollektiv untersucht, das 263 Personen mit bipolar affektiver Störung (durchschnittliches Ersterkrankungsalter 27 Jahre, SA 11 Jahre) und 430 Kontrollpersonen umfasste. Die Rekrutierung der unverwandten Patientenkollektive erfolgte durch die Psychiatrische Klinik des Universitätsklinikums Bonn und das Zentralinstitut für Seelische Gesundheit in Mannheim. Die Diagnosestellung nach den DSM-IV Kriterien (American Psychiatric Association, 1994) erfolgte auf der Basis des standardisierten Interviews SCID-I (First et al., 1996), der OPCRIT-Dokumentation (McGuffin et al., 1991) und einer Aufarbeitung der Krankenakten.

Alle untersuchten Patienten und Kontrollprobanden wurden vor der Blutentnahme über die geplanten molekulargenetischen Untersuchungen informiert. Ihre schriftliche Einverständniserklärung liegt vor. Da es sich um Untersuchungen am Menschen handelt, wurde vor Beginn der Studie ein entsprechendes Votum bei der Bonner Ethikkommission eingeholt (Lfd. Nr.: 216/00).

4.2 Geräte

Folgende Geräte fanden bei vorliegender Arbeit Verwendung.

Autoklav	Varioklav Dampfsterilisator Typ 500 EP-Z, H+P Labortechnik, Oberschleißheim
Elektrophoresekammern	JSB-96, Shelton Scientific, Shelton, Connecticut Multigel-Long Typ G 47 (inkl. Glasplatten mit 1mm Spacern, Silikonabdichtungen, Kämmen, Klammern), Biometra, Göttingen
Eissystem	AF-0 ASB 0600, Scotsman Ice Systems, Mailand
Gel-Dokumentations-System	Digit-Store Duo, Intas, Göttingen
Geltrockner	Slab Gel Dryer, Modell SE1160, Hoefer Scientific Instruments, San Francisco, Kalifornien
Magnetrührer	IKA MAG RET-G, Staufen i.Br. IKA big squid (star), Staufen i.Br.
Mehrkanalpipetten	Pre Cision, Biozym, Hess. Olendorf
Einkanalpipetten	Proline, BioHit, Rosbach Pipetman, Gilson, Middleton, Wisconsin Eppendorf Reference, Eppendorf, Hamburg Eppendorf Research, Eppendorf, Hamburg
Photometer	Gene Quant II, Pharmacia Biotech, Cambridge
Thermocycler	PTC-200 Peltier Thermal Cycler, MJ Research, Watertown, Massachusetts PTC-225 Peltier Thermal Cycler, MJ Research, Watertown, Massachusetts GeneAmp PCR-System 9600, PerkinElmer, Boston, Massachusetts
Schüttler	3005, Gesellschaft für Labortechnik, Burgwedel
Spannungsgeräte	Gene Power Supply 200/400, Pharmacia Biotech, Freiburg

	Electrophoresis Power Supply PS 9009, Life Technologies Gibco BRL, Eggenstein Electrophoresis Power Supply ST 606 T, Life Technologies Gibco BRL, Eggenstein
Trockenschrank	T 20, Heraeus, Hanau
Vortexer	Vortex-Genie 2, Scientific Industries, New York
Vakuumpumpe	Membrane-Vakuumpumpe ME2, Vacuubrand, Wertheim
Waage	SBC 52, Scaltec, Heiligenstadt
Wasserbad	1004, Gesellschaft für Labortechnik, Burgwedel
Zentrifugen	Megafuge 1.0, Heraeus, Osterode Megafuge 1.0 R, Heraeus, Osterode Centrifuge 5415 D, Eppendorf, Hamburg

4.3 Chemikalien

Folgende Chemikalien fanden bei vorliegender Arbeit Anwendung.

Tris	ICN Biomedicals, Aurora, Ohio
Agarose	Life Technologies Gibco BRL, Karlsruhe
Ammoniumchlorid, Bromphenolblau, Essigsäure, Ethanol, Extran, Formaldehyd, Formamid, Kaliumhydrogencarbonat, Natriumchlorid, Natrium-EDTA, Natriumhydroxid, Salpetersäure, Salzsäure, Silbernitrat	Merck, Darmstadt
Ficoll 400	Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden
Isopropanol	Riedel de Haen, Seelze
Ethidiumbromid, SDS, Tris	Serva, Heidelberg
Ammoniumpersulfat, Dimethylsulfoxid, TEMED	Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen
40% Acrylamid/Bis Solution, 29:1 (3,3% C)	BioRad Laboratories, Hercules, California
10 x TBE-Puffer	Invitrogen Life Technologies, Karlsruhe
LiChrosolv (Wasser für Chromatographie)	Merck, Darmstadt

4.4 Enzyme und Längenstandards

Folgende Enzyme und Längenstandards fanden bei vorliegender Arbeit Anwendung.

Biotherm DNA Polymerase [sowie 10 x Puffer Biotherm ohne MgCl ₂ und mit 15mM MgCl ₂]	Genecraft, Lüdinghausen
---	-------------------------

AluI [sowie Puffer Tango] Bst1107I (SnaI) [sowie Puffer 0 ⁺] Csp6I (RsaI) [sowie Puffer B ⁺] KpnI [sowie Puffer KpnI ⁺] VspI [sowie Puffer 0]	} Konz. 10 U / μ l	MBI Fermentas, St.Leon-Rot
Pronase		Boehringer Mannheim, Mannheim
100 bp DNA-Leiter		Genecraft, Lüdinghausen
1 kb DNA-Leiter		MBI Fermentas, St.Leon-Rot

4.5 Sonstige Ingredienzien und Materialien

An weiteren Ingredienzien und Materialien wurden zur Durchführung vorliegender Arbeit verwendet:

Magnesiumchlorid (25mM)	Genecraft, Lüdinghausen
DNA Polymerisationsmix (dNTPs)	Genecraft, Lüdinghausen
GFX TM PCR DNA and Gel Band Purification Kit	Amersham Biosciences, Buckinghamshire
Reaktionsgefäße Vol. 1,0; 2,0 ml	Eppendorf, Hamburg
Mikrotiterplatten	6509 Thermowell 96 Well Plate, Costar, Niederlande
Folien für Mikrotiterplatten	Adhesive Plate Seals, Peqlab, Erlangen
GB 002 Gel Blotting Papier	Schleicher und Schuell, Dassel

4.6 Synthetische Oligonukleotide (Primer)

Einige der für den Restriktionsfragment-Längen-Polymorphismus verwendeten Primer (s. Tab. 2) wurden jeweils mit einer im Vergleich zur komplementären Zielsequenz modifizierten Base ausgewählt (mismatch), um so im Verlauf der Polymerasenkettenreaktion ein Produkt anzureichern, welches in seiner Basenabfolge Schnittstellen bestimmter Restriktionsenzyme beinhaltet. Alle Primer wurden auf ihre Sequenzspezifität innerhalb des humanen Genoms mit Hilfe des Programms Ensembl Blast Search (http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/blastview) überprüft. Mit der Synthese wurden die Firmen Sigma-ARK (Darmstadt) und Quiagen (Hilden) beauftragt.

Tab. 2 Bezeichnung und chromosomale Lokalisation der Primerpaare zur Fragmentamplifizierung zwecks RFLP-Analyse (X* = Basenaustausch).

Position (bp) auf Chr. 6 ¹⁾	Primerbezeichnung	Primersequenz
132.916.466-132.916.487	rs8192627-F	5' TCCTTGGTTTAGGAAAGCCATA 3'
132.916.673-132.916.694	rs8192627-R	5' CCTGTGACCTTTTTCTGGTTA 3'
132.933.851-132.933.872	rs8192624-F	5' ATACTGGTAGCAAGACAGAATC-3'
132.933.947-132.933.971	rs8192624-R	5' GGTAACCATGAAATCATAAATGG*TA 3'
132.933.851-132.933.872	rs8192625-F	5' ATACTGGTAGCAAGACAGAATC 3'
132.934.026-132.934.049	rs8192625-R	5' CACCAACAGCAAATCTCATAAG*TA 3'
132.934.149-132.934.169	rs7772821-F	5' GAACAGTTCAGCAACCATGAA 3'
132.934.199-132.934.222	rs7772821-R	5' AAGGTATCCTGAACTTCGTG*TAT 3'
133.007.947-133.007.971	rs8192620-F	5' AGTTCAAGTAGCCAAACCAAATT*AA 3'
133.008.142-133.008.163	rs8192620-R	5' AGTGATGCCAATCAGAAGCTCC 3'

¹⁾ Stand: UCSC Mai 2004 (Build 35)

Tab. 3 Bezeichnung und chromosomale Lokalisation der Primerpaare zur Fragmentamplifizierung zwecks Sequenzanalyse.

Position (bp) auf Chr. 6 ¹⁾	Primerbezeichnung	Primersequenz
132.933.037-132.933.058	TRAR4-F	5' -TGGCATCCTGGTGAATATGTGT-3'
132.933.648-132.933.668	TRAR4-FF	5' -TGCTGTGTTCTACACAGGTGT-3'
132.933.709-132.933.730	TRAR4-R	5' -CGGTCTGACAACCTCCTATAACA-3'

132.934.320- 132.934.341	TRAR4-RR	5'-GTGCACATCTTAACAAGACTGA-3'
-----------------------------	----------	------------------------------

¹⁾ Stand: UCSC Mai 2004 (Build 35)

4.7 Isolierung und Aufbereitung humaner genomischer DNA

4.7.1 Isolierung und Reinigung der DNA

Hochmolekulare menschliche DNA wurde aus kernhaltigen Leukozyten von frischem Blut, dem EDTA als Antikoagulans zugesetzt wurde, isoliert. Es wurde die Aussalzmethode nach Miller et al. (1988) angewendet: 10 ml Frischblut wurden mit 30 ml Frischblutlysispuffer versetzt, mehrfach invertiert, 15 min auf Eis lysiert und 15 min bei 4°C und 1500 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert. Das Leukozytenpellet wurde 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. Es wurden 3,2 ml gesättigte NaCl-Lösung (6 M) zugegeben. Die Reaktionsgefäße wurden kräftig geschüttelt, 10 min bei 4000 rpm und RT zentrifugiert, mehrmals invertiert und erneut 10 min bei 4000 rpm und RT zentrifugiert. Das Proteinpellet wurde verworfen. Der Überstand wurde mit 1 Vol 2-Propanol versetzt und leicht geschwenkt, bis die DNA ausfiel. Die präzipitierte DNA wurde mit einem sauberen Glashaken aus der Lösung „gefischt“ und nach Waschen in 70% Ethanol in 400 µl TE⁻⁴ (pH 8,0) gelöst.

Lösungen, die Verwendung fanden:

Frischblutlysispuffer	155 mM NH ₄ Cl 10 mM KHCO ₃ 0,1 mM EDTA (pH 7,0)
Kernlysispuffer	10 mM Tris/HCl (pH 8,0) 400 mM NaCl 2 mM EDTA (pH 8,0)
TE ⁻⁴	10 mM Tris/HCl (pH 8,0) 0,1 mM EDTA (pH 8,0)

4.7.2 Photometrische Konzentrationsbestimmung und Überprüfung der Reinheit isolierter genomischer DNA

Die Bestimmung der Konzentration und Reinheit der isolierten DNA erfolgte durch spektrophotometrische Messung im Bereich von 260 nm und 280 nm. DNA weist bei 260 nm ihr Absorptionsmaximum auf. Proteine, Ethanol sowie in der Lösung verbliebenes NaCl hingegen absorbieren bei 280 nm.

Aus der optischen Dichte bei 260 nm lässt sich mit Hilfe des Lambert-Beerschen-Gesetzes die DNA-Konzentration ermitteln.

Der Quotient der Absorption bei 260 nm / 280 nm liefert Aussagen über die Reinheit der isolierten DNA. Werte zwischen 1,7 und 1,9 zeigen an, dass die DNA in sehr reiner Form vorliegt. Kleinere Quotienten sprechen für verunreinigte DNA, eine erneute Fällung sollte erfolgen. Ein Quotient über 1,9 weist auf RNA-Rückstände hin, so dass die DNA-Konzentration geringer als der ermittelte Wert ist.

4.8 Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Bei der von Mullis und Faloona 1987 etablierten Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction [PCR]) handelt es sich um ein Verfahren, das die enzymatische Vervielfältigung von DNA ermöglicht. Unter Kenntnis der flankierenden DNA-Sequenzen kann ein spezifischer DNA-Abschnitt, der zunächst in Form nur einer oder weniger Kopien vorliegt, selektiv in vitro millionenfach amplifiziert werden.

Die zu amplifizierende Ausgangs-DNA, die zunächst als Doppelstrang vorliegt, wird durch Hitzeeinwirkung denaturiert und somit in einzelsträngige DNA überführt. Diese Einzelstränge dienen als Matrize für die Synthese neuer, komplementärer DNA-Stränge. Als Startmoleküle für die DNA-Synthese werden sog. Primer verwendet. Diese sind synthetische Oligomoleküle, die die zu vervielfältigende DNA-Sequenz flankieren und sich demnach komplementär an die entsprechenden Zielstellen der DNA anlagern. Die eigentliche Elongation der DNA erfolgt dann durch die thermophile DNA-Polymerase von *Thermus aquaticus* (Taq), indem den Oligonukleotiden zur Matrize komplementäre Nukleotidbausteine angehängt werden. Die Synthese läuft hierbei immer in 5' → 3'-Richtung, ausgehend von den 3'-OH-Enden der Primer.

Ablauf der PCR im zyklischen Wechsel von drei Reaktionsschritten:

1. Denaturierung der DNA bei 90 - 95°C

2. Hybridisierung der Primer bei 45 - 68°C (Annealing)
3. Elongation des Komplementärstranges durch Taq bei 72°C

Da mit jedem Durchlauf sowohl die ursprüngliche DNA-Matrize als auch die bereits synthetisierten DNA-Kopien amplifiziert werden, resultiert eine exponentielle Vermehrung des PCR-Produktes. So erzielt man mit einem in der Regel 30-40 Zyklen umfassenden Programm eine Anreicherung um einen Faktor von 10^6 bis 10^7 innerhalb einer Zeitspanne von ca. 2 bis 3 Stunden.

Die Qualität des PCR-Produktes hängt insbesondere von der Spezifität der Primer ab, deren Basensequenz im menschlichen Genom einmalig sein sollte. Außerdem ist die Annealing-Temperatur entscheidend. Je höher diese Temperatur, desto größer ist die Wahrscheinlichkeit, dass der Primer an die exakt komplementäre Basensequenz der Matrize bindet. Unspezifische Bindungen hingegen hat die Amplifikation zusätzlicher unerwünschter DNA-Abschnitte zur Folge. Zu hohe Annealing-Temperaturen wiederum hemmen die Hybridisierung der Primermoleküle mit der DNA-Matrize, das Ausmaß an Amplifikation bleibt unzureichend.

Als Ausgangsmaterial (Template) für die PCR wurde genomische DNA der in die Assoziationsuntersuchungen einbezogenen Personen herangezogen. Die Reaktionsansätze wurden für ein Volumen von 20 μ l berechnet. Als Basiskomponenten wurden folgende Reagenzien verwendet:

H ₂ O	deionisiert und autoklaviert
10 x Puffer	160 mM (NH ₄) ₂ SO ₄ 670 mM Tris-HCl (pH 8,8) 0,1% Tween20 inkl. und exkl. 15 mM MgCl ₂
Nukleotidgemisch	10 mM (= unverdünnt) und 1,25 mM (= verdünnt) je dNTP
Magnesiumchlorid	25 mM
Primer	10 pmol/ μ l
DMSO	
Taq-DNA-Polymerase	5 U/ μ l
Genomische DNA	20 ng/ μ l

Die PCR-Ansätze waren wie folgt zusammengesetzt:

PCR-Ansatz für die Untersuchung der SNPs rs8192624 und rs8192625

	Mengenangaben (für 1x)	Endkonzentrationen
PCR-Mix	2 µl 10 x PCR-Puffer inkl. MgCl ₂ 3,2 µl dNTPs (verdünnt) 0,8 µl Vorwärtsprimer 0,8 µl Rückwärtsprimer 1 µl DMSO 0,032 µl Taq-DNA-Polymerase H ₂ O ad 20 µl	1x 0,2 mM je dNTP 0,4 pmol/µl 0,4 pmol/µl 0,008 U/µl
Genomische DNA	2,0 µl	2 ng/µl
Endvolumen	20,0 µl	

PCR-Ansatz für die Untersuchung der SNPs rs8192620, rs7772821 und rs8192627

	Mengenangaben (für 1x)	Endkonzentrationen
PCR-Mix	2 µl 10 x PCR-Puffer 2 µl dNTPs (verdünnt) 1,2 µl MgCl ₂ 1 µl Vorwärtsprimer 1 µl Rückwärtsprimer 0,13 µl Taq-DNA-Polymerase H ₂ O ad 20 µl	1x 0,125 mM je dNTP 1,5 mM 0,5 pmol/µl 0,5 pmol/µl 0,0325 U/µl
Genomische DNA	2,7 µl	2,7 ng/µl
Endvolumen	20,0 µl	

Alle Komponenten des PCR-Mixes wurden auf Eis zusammenpipettiert und gemischt. Je 2 µl der genomischen DNA wurden in die entsprechenden Reaktionsgefäße vorgelegt und mit jeweils 18 µl des Mixes versetzt sowie bei ca. 800 rpm zentrifugiert. Anschließend wurde die PCR im Thermocycler mit folgenden Programmen, die zuvor im Rahmen einer Optimierung empirisch ermittelt wurden, durchgeführt.

PCR-Programm für die Untersuchung der SNPs rs8192624 und rs8192625

	5 min	94°C	initialer Denaturierungsschritt
40 Zyklen	40 sec	94°C	Denaturierung
	40 sec	58°C	Primer-Annealing
	30 sec	72°C	Primer-Verlängerung
	5 min	72°C	finaler Verlängerungsschritt

PCR-Programm für die Untersuchung der SNPs rs8192620, rs7772821 und rs8192627 –
Touchdown-Programm (in 1°C-Schritten)

	3 min	94°C	initialer Denaturierungsschritt
27 Zyklen	30 sec	94°C	Denaturierung
	30 sec	63°C bis 55°C (je 3 Zyklen pro Stufe)	Primer-Annealing
	30 sec	72°C	Primer-Verlängerung
	10 min	72°C	finaler Verlängerungsschritt

PCR-Ansatz für Templates zwecks Sequenzierung

	Mengenangaben (für 1x)	Endkonzentrationen
PCR-Mix	4 µl 10 x PCR-Puffer 0,2 µl dNTPs (unverdünnt) 2,4 µl MgCl ₂ 1 µl Vorwärtsprimer 1 µl Rückwärtsprimer 0,5 µl Taq-DNA-Polymerase H ₂ O ad 40 µl	1x 0,05 mM je dNTP 1,5 mM 0,25 pmol/µl 0,25 pmol/µl 0,0625 U/µl
Genomische DNA	4 µl	2 ng/µl
Endvolumen	40,0 µl	

PCR-Programm für Templates zwecks Sequenzierung

	5 min	94°C	initialer Denaturierungsschritt
35 Zyklen	30 sec	94°C	Denaturierung
	30 sec	58°C	Primer-Annealing
	90 sec	72°C	Primer-Verlängerung
	5 min	72°C	finaler Verlängerungsschritt

4.9 Agarose-Gelelektrophorese

Die Qualität und Quantität der PCR-Reaktion wurde auf einem 1,5%igen Agarosegel überprüft.
Hierbei fanden folgende Reagenzien Anwendung:

10 x TBE-Puffer	1M Tris 0,9M Borsäure 0,01M EDTA (pH 8,0)
Ethidiumbromid	10 mg/ml in aqua dest.
Gel-Ladepuffer (BPB-Puffer)	10 x TBE

	20% Ficoll 0,1% Bromphenolblau (BPB)
Längenstandard	100 bp DNA-Leiter 1 kb DNA-Leiter

Für ein 1,5%iges Agarosegel wurden 3 g Agarose in 200 ml 1 x TBE-Puffer durch Aufkochen vollständig gelöst, unter Rühren auf 50°C abgekühlt und Ethidiumbromid (1 µg/ml Gel) zugesetzt. Die Gellösung wurde in einen Gelträger gegossen, in den Kämme eingesetzt waren, und bis zum Erstarren horizontal gelagert. Nach Entfernen der Kämme wurde das Gel in die mit 1 x TBE gefüllte Laufkammer (JSB-96, Shelton Scientific) gelegt. Je 5 µl der PCR-Produkte wurden mit der gleichen Menge Probenpuffer gemischt und in die Geltaschen pipettiert. In eine weitere Tasche wurden 600 ng der 100 bp DNA-Leiter als Längenstandard aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte bei 121 V.

Agarose bildet nach dem Erstarren ein Netzwerk, in dem die verschieden großen, aufgrund der Phosphatgruppen negativ geladenen, DNA-Fragmente unterschiedlich schnell durch die Gelporen zur Anode wandern (Molekularsiebeffekt). Die Wanderungsgeschwindigkeit linearer DNA im elektrischen Feld ist von der angelegten Spannung, der Größe der DNA-Fragmente und der Agarosekonzentration abhängig. In der Gelmatrix befindliches Ethidiumbromid, ein unter UV-Bestrahlung fluoreszierender Farbstoff, interkaliert zwischen die Basenpaare und ermöglicht so die Visualisierung des PCR-Produktes. Nach der Elektrophorese wurde das Gel daher mit UV-Licht der Wellenlänge 366 nm durchleuchtet, so dass die DNA-Fragmente als orangefarbig leuchtende spezifische Banden erkennbar wurden. Durch Vergleich der Banden mit dem Längenstandard konnte beurteilt werden, ob das DNA-Fragment der erwarteten Größe entsprach.

4.10 Genotypisierung durch Restriktionsfragment-Längen-Polymorphismus (RFLP)-Analyse

Die beschriebenen DNA-Sequenzvarianten in den *TRAR*-Genen sollten hinsichtlich ihrer Bedeutung für die Entstehung von bipolar affektiven Störungen charakterisiert werden. Zu diesem Zweck wurde ein aussagekräftiges Probandenkollektiv genotypisiert. Als effiziente und robuste Methode zur Genotypisierung bieten sich dabei PCR-basierte RFLP-Assays an. Hierbei wird das Fragment, welches die polymorphe Region enthält, mittels PCR amplifiziert und das Produkt im Anschluss mit einer Restriktionsendonuklease geschnitten, in deren

Erkennungssequenz die variable Stelle liegt. Je nach Vorhandensein der verschiedenen Allele variiert das Restriktionsmuster, d.h. es finden sich Restriktionsfragmente unterschiedlicher Länge, die nach Auftrennung auf einem Agarose- oder Polyacrylamidgel die exakte Bestimmung des Genotyps der betreffenden Person zulassen.

4.10.1 Auswahl geeigneter Restriktionsendonukleasen

Zur Auswahl geeigneter Restriktionsenzyme wurde das Programm Restriction Enzyme Analysis (<http://darwin.bio.geneseo.edu/~yin/WebGene/>) verwendet. Für alle fünf Varianten wurden jeweils beide möglichen Allele und ein etwa 20 bp langer flankierender Genabschnitt in den Sequenzeditor eingegeben. Anschließend konnte ein simulierter Restriktionsverdau mit einer großen Anzahl bekannter Restriktionsendonukleasen durchgeführt werden. Hierdurch konnten folgende RFLP-Assays etabliert werden:

rs8192627: Dieser SNP enthält die Erkennungssequenz für das Schnittenzym AluI, $\begin{pmatrix} 5' \text{ AG} \downarrow \text{CT} 3' \\ 3' \text{ TC} \downarrow \text{GA} 5' \end{pmatrix}$

rs8192624: Durch Gebrauch eines modifizierten Rückwärtsprimers wird die Schnittstelle für das Restriktionsenzym KpnI geschaffen, $\begin{pmatrix} 5' \text{ GGTAC} \downarrow \text{C} 3' \\ 3' \text{ C} \downarrow \text{CATGG} 5' \end{pmatrix}$

rs8192625: Ein modifizierter Rückwärtsprimer ermöglicht die Erkennungssequenz für das Enzym Csp6I, $\begin{pmatrix} 5' \text{ G} \downarrow \text{TAC} 3' \\ 3' \text{ CAT} \downarrow \text{G} 5' \end{pmatrix}$

rs7772821: Die Schnittstelle für die Endonuklease Bst1107I ergibt sich durch Einsatz eines modifizierten Rückwärtsprimers, $\begin{pmatrix} 5' \text{ GTA} \downarrow \text{TAC} 3' \\ 3' \text{ CAT} \downarrow \text{ATG} 5' \end{pmatrix}$

rs8192620: Durch Verwendung eines modifizierten Rückwärtsprimers entsteht die Angriffssequenz für das Enzym VspI, $\begin{pmatrix} 5' \text{ AT} \downarrow \text{TAAT} 3' \\ 3' \text{ TAAT} \downarrow \text{TA} 5' \end{pmatrix}$

4.10.2 Verdau von PCR-Produkten

Die Ansätze für den Restriktionsverdau der PCR-Produkte bestanden aus folgenden Komponenten (Eis):

Mix	Tango / KpnI ⁺ / B ⁺ / 0 ⁺ / 0 ⁻ -Puffer	1,5 µl
	Restriktionsendonuklease AluI / KpnI / Csp6I / Bst1107I / VspI	1 / 4 / 1,5 / 5 / 2 U
	deionisiertes und autoklaviertes H ₂ O	ad 15 µl
DNA	ungereinigtes PCR-Produkt	3 µl

Die Ansätze wurden 4 h bei 37°C inkubiert, der Temperatur, bei der die maximale Aktivität der gewählten Enzyme gewährleistet ist.

4.10.3 Vorbereitung nativer 10%iger Polyacrylamidgele für RFLP-Assays

Verwendete Reagenzien:

Gel-Stammlösung (Acrylamid : Bisacrylamid = 29 : 1) in 1 x TBE:	125 ml Acrylamid/Bisacrylamid-Lösung 50 ml 10 x TBE-Puffer 500 µl TEMED ad 500 ml aqua dest.
10%ige APS-Lösung (Ammoniumpersulfat)	200 µl

Für die RFLP-Analyse wurden Polyacrylamidgele der Größe 110 x 120 x 1 mm angefertigt. Die Glasplatten wurden mit Wasser und Extran und anschließend mit 70%igem Ethanol gründlich gereinigt. Nun wurde eine U-förmige Silikonabdichtung um die Spacer einer Platte herum positioniert. Nach Auflegen eines Gegenstücks fixierte man die Platten samt Gummi mit vier Klammern. Etwa 20 ml Gel-Stammlösung wurden mit 200 µl 10%iger APS-Lösung gemischt. APS und TEMED fungieren als Startreagenzien der radikalischen Polymerisation. Die Lösung wurde in den Spalt zwischen den beiden Glasplatten bis zur Oberkante der kleinen Platte gegossen. Danach wurde ein Kamm für 24 Taschen eingesetzt und mit einer Klammer fixiert. Die Polymerisation war innerhalb von 30 min abgeschlossen und das Gel gebrauchsfertig.

4.10.4 Gelelektrophorese

Die Klammern und Gummidichtungen an den Glasplatten wurden entfernt, das Gel in die Elektrophoresekammer (Multigel-Long, Biometra) eingespannt und die obere und untere Pufferkammer mit 1 x TBE gefüllt. Der Kamm wurde vorsichtig entfernt und die Geltaschen mit einer Pipette ausgespült, um evtl. vorhandene Polyacrylamidreste zu beseitigen.

Je 5 µl Restriktionsprodukt der Proben wurde mit 5 µl Probenpuffer gemischt und auf das Polyacrylamidgel aufgetragen, zudem eine 100 bp-DNA-Leiter, die zum einen als Längenstandard diente, zum anderen später eine fehlerfreie Zuordnung der Proben unter simultan gefärbten Gelen sicherstellte.

Die Elektrophorese erfolgte je nach erforderlicher Auftrennung ca. 1,0 bis 1,5 h bei 20 mA.

4.10.5 Silberfärbung der Polyacrylamidgele

Bei der Silberfärbung nach einem Protokoll von Budowle et al. (1991) handelt es sich um ein einfaches, kostengünstiges, sensitives und vor allem schnelles Verfahren zur Sichtbarmachung von DNA-Fragmenten.

Reagenzien, die Verwendung fanden:

Fixierlösung	10% Ethanol
pH-Wert Erniedrigung	1% HNO ₃
Färbelösung	2 g AgNO ₃ ; aqua dest. ad 1000 ml, unmittelbar vor Gebrauch 1 ml Formaldehyd zugeben
Entwickler	30 g Na ₂ CO ₃ ; aqua dest. ad 1000 ml, unmittelbar vor Gebrauch 0,5 ml Formaldehyd zugeben
Fixierlösung	10% CH ₃ COOH

Sämtliche Arbeitsschritte wurden in einer Glasschale durchgeführt, welche mittels eines Schüttlers equilibriert wurde, um eine gleichmäßige Benetzung des Gels mit den Lösungen zu erzielen. Im ersten Schritt wurde das PAA-Gel für 5 min in Ethanol gebadet, um so die DNA in der Gelmatrix zu fixieren. Dann wurde das Gel 3 min lang mit 1%iger Salpetersäure behandelt. Die Säure dient der Einstellung eines pH-Milieus, das die nachfolgende Bindung der Silberionen erleichtert. Die eigentliche Färbereaktion mit Silbernitratlösung dauerte 20 min. Anschließend wurden nicht gebundene Silberionen durch dreimaliges je einminütiges Waschen mit aqua dest. entfernt. Um den Hintergrund der Färbung zu reduzieren, wurde die im folgenden zugesetzte Natriumcarbonatlösung, sobald sich eine Gelbfärbung zeigte, rasch wieder abgegossen, das Gel kurz mit aqua dest. gespült und erneut Entwicklerlösung zugegeben. Das darin enthaltene Formaldehyd dient der Reduktion der an die DNA angelagerten Silberionen. Sobald sich die DNA-Banden deutlich abgrenzen ließen, wurde die Reaktion durch Zugabe von Essigsäure gestoppt (ca.10 min). Die gefärbten Gele wurden auf speziellem Papier geblottet und auf einem Vakuum-Geltrockner 2h bei 80°C getrocknet.

4.11 Direktsequenzierung

Die in der RFLP-Analyse erscheinenden Bandenmuster sind auf die beschriebenen Varianten in den betreffenden PCR-Fragmenten zurückzuführen. Um unseren RFLP-Assay zu validieren, wählten wir vor der Typisierung der kompletten Kollektive für die fünf untersuchten Varianten

heterozygot erscheinende Individuen aus und führten an selbigen Proben eine Sequenzierung durch. Das sich hieraus ergebende Resultat sollte die Ergebnisse der RFLP-Analyse validieren.

4.11.1 Reinigung von PCR-Produkten mittels Glasfasersäulchen

Die PCR-Produkte wurden, wie in Kapitel 4.9 beschrieben, auf Agarosegel getestet. War auf dem UV-Transilluminator die DNA in Form einer distinkten kräftigen Bande der erwarteten Größe zu sehen, so wurden die PCR-Produkte mit dem GFXTMPCR DNA and Gel Band Purification Kit nach dem vom Hersteller Amersham Biosciences empfohlenen Protokoll verarbeitet. Hierfür wurden die sechs 40 µl PCR-Ansätze zunächst gereinigt.

Das Kit benutzt im ersten Schritt ein chaotropes Agenz (500 µl capture buffer mit Acetat), durch welches Proteine denaturiert werden und das Binden doppelsträngiger DNA (100 bp bis 48 kb) an eine aus Glasfasern bestehende Matrixsäule erleichtert wird. Hierauf findet ein mit Alkohol versetzter Tris-EDTA-Puffer (500 µl wash buffer) Anwendung, wobei Proteine, Salze, Primer- und Nukleotidreste entfernt werden und die gebundene DNA präzipitiert, außerdem trocknet die Matrix vor der Elution. Schließlich wird die DNA von der Säule mittels eines Puffers niedriger Ionenstärke (hier 40 µl autoklaviertes aqua dest.) gelöst.

4.11.2 Konzentrationsbestimmung von PCR-Produkten

Die Konzentrationen der gereinigten Produkte wurden photometrisch bestimmt (Kapitel 4.7.2). Die gemessenen DNA-Konzentrationen lagen zwischen 20 und 40 ng/µl.

4.11.3 Sequenzierung

Die Sequenzierungen wurden von Quiagen in Hilden mit automatischen Sequenziergeräten durchgeführt.

Für die Sequenzierungsreaktion, die im Prinzip eine modifizierte PCR darstellt, muss die DNA als einzelsträngige Matrize vorliegen. Nachdem sich dort ein komplementärer Sequenzierungsprimer angelagert hat, synthetisiert eine DNA-Polymerase den neuen DNA-Strang. Zusätzlich zu den normalen Nukleotidbausteinen (dNTPs) enthält der Ansatz basenspezifische Didesoxynukleotide (ddNTPs), deren Einbau zum Abbruch der Kette führt, da wegen der fehlenden 3'-Hydroxylgruppe am 3'-Kohlenstoffatom keine Phosphodiesterbindung zum folgenden Nukleotid ausgebildet werden kann.

Es werden parallel vier basenspezifische Reaktionen durchgeführt, jeweils mit einer geringen Menge einer der vier ddNTPs. Dabei kommt es in statistischer Verteilung an einer der vielen Positionen, an denen das betreffende Nukleotid auftritt, zum Synthesestop, so dass schließlich eine Population von DNA-Fragmenten verschiedener Größe mit variablen 3'-Enden entsteht, die elektrophoretisch auf einem denaturierenden Gel aufgetrennt werden kann. Zur Identifikation der Fragmente bedient man sich fluoreszenzmarkierter ddNTPs unterschiedlicher Farbe, deren Signale beim Vorbeiwandern der DNA durch einen Laser detektiert und in Form von Intensitätsprofilen graphisch dargestellt werden, was die genaue Zuordnung jeder Base zu einer Position im sequenzierten DNA-Abschnitt erlaubt.

5 Statistik

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

Zunächst wurde die Häufigkeitsverteilung der Genotypen innerhalb des Patienten- und des Kontrollkollektivs mittels eines χ^2 -Testes auf eine mögliche Abweichung vom Hardy-Weinberg-Gleichgewicht überprüft. Für die Einzelmarker-Analysen der genotypisierten Varianten wurde der Fisher's exact test für die 2x3-Tafel der Genotypverteilung verwendet. Des Weiteren wurde der Cochran-Armitage trend test verwendet (Armitage, 1955). Die Haplotypverteilung der Fälle und Kontrollen wurde mittels FAMHAP verglichen. Trios wurden mit dem TDT und der haplotypbasierten Assoziationsmethode von Becker und Knapp (2004) untersucht. Wie von Becker und Knapp (2004) und von Becker et al. (2005) vorgeschlagen, wurden alle Markerkombinationen getestet und ein globaler p-Wert (korrigiert für multiples Testen) errechnet.

Zusätzlich wurde für die genotypisierten Polymorphismen im Fall-Kontroll-Kollektiv eine Berechnung des paarweisen Inter-Marker-Kopplungsungleichgewichts durchgeführt. Als Maß für das Kopplungsungleichgewicht zwischen zwei Markern dienen die Koeffizienten D' (Lewontin, 1964) und $\Delta 2$ (Devlin, 1995).

6 Ergebnisse

Im Rahmen vorliegender Arbeit wurde der Beitrag von den drei Genen *TRARI*, *TRAR4* und *TRAR5* am Entstehungsprozess bipolar affektiver Störungen untersucht. In einem Trio-Kollektiv (*Initialsample*) wurden dabei in allen drei Genen genetische Varianten auf das Vorliegen von Assoziation hin getestet, die aufgrund ihrer funktionellen Relevanz (Aminosäureaustausch) oder der Frequenz der seltenen Allele (>10%) interessant erschienen. In *TRARI* wurde die Variante rs8192620, in *TRAR4* zwei funktionelle Polymorphismen (rs8192624, V265I und rs8192625, C291Y) sowie rs7772821 und in *TRAR5* eine funktionelle Variante (rs8192627, D328A) untersucht. Da sich im Initialkollektiv Hinweise auf das Vorliegen von Assoziation zwischen den Genvarianten in *TRAR4* und bipolar affektiven Störungen ergaben, wurden die drei in diesem Bereich lokalisierten SNPs in einer unabhängigen Fall-Kontroll-Stichprobe untersucht.

6.1 Validierung des RFLP-Assays durch Sequenzierung

Mittels Sequenzierung der DNA-Abschnitte von je drei exemplarisch gewählten Kontrollpersonen, die sich bei den RFLP-Analysen jeweils heterozygot für die untersuchten SNPs in *TRARI*, *TRAR4* und *TRAR5* darstellten, ließen sich die RFLP-Analysen verifizieren. Damit stellten die RFLP-Assays ein verlässliches Verfahren für die Typisierung der SNPs in den Kollektiven dar.

Dargestellt werden hier nur die Sequenzierungsdaten für das aufgrund positiver Assoziationsergebnisse relevante Gen *TRAR4* (Abb. 3, 4 und 5).

Abb. 3 Darstellung der Sequenzanalyse der den SNP rs8192624 (gekennzeichnet durch den Pfeil) flankierenden DNA. Das Chromatogramm zeigt den Sinnstrang des *TRAR4*-Gens.

Genotyp G/A

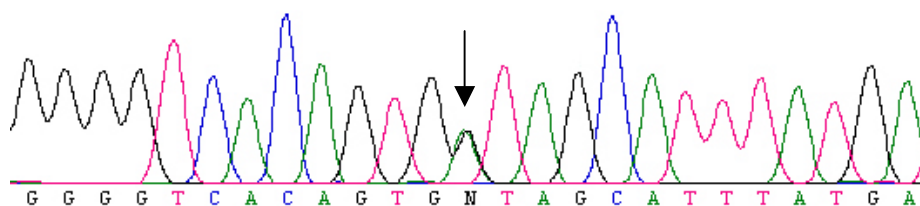


Abb. 4 Darstellung der Sequenzanalyse der den SNP rs8192625 (gekennzeichnet durch den Pfeil) flankierenden DNA. Das Chromatogramm zeigt den Sinnstrang des *TRAR4*-Gens.

Genotyp G/A

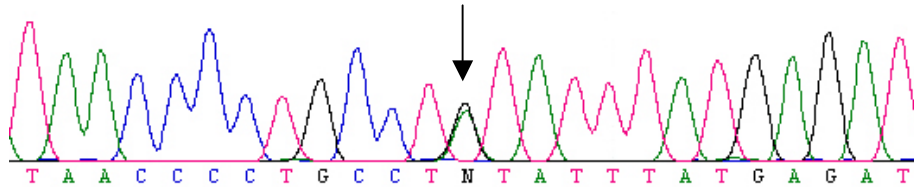
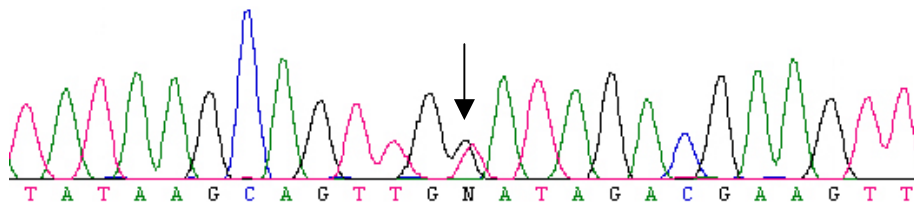


Abb. 5 Darstellung der Sequenzanalyse der den SNP rs7772821 (gekennzeichnet durch den Pfeil) flankierenden DNA. Das Chromatogramm zeigt den Sinnstrang des *TRAR4*-Gens.

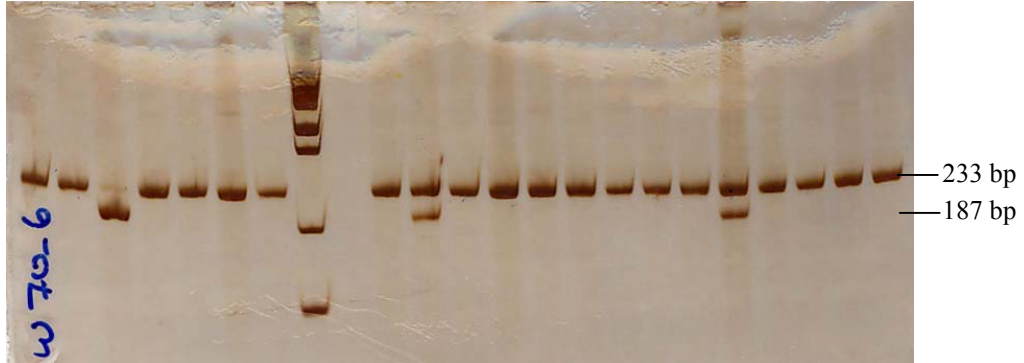
Genotyp T/G



6.2 Darstellung der Varianten in den Genen *TRAR1*, *TRAR4* und *TRAR5*

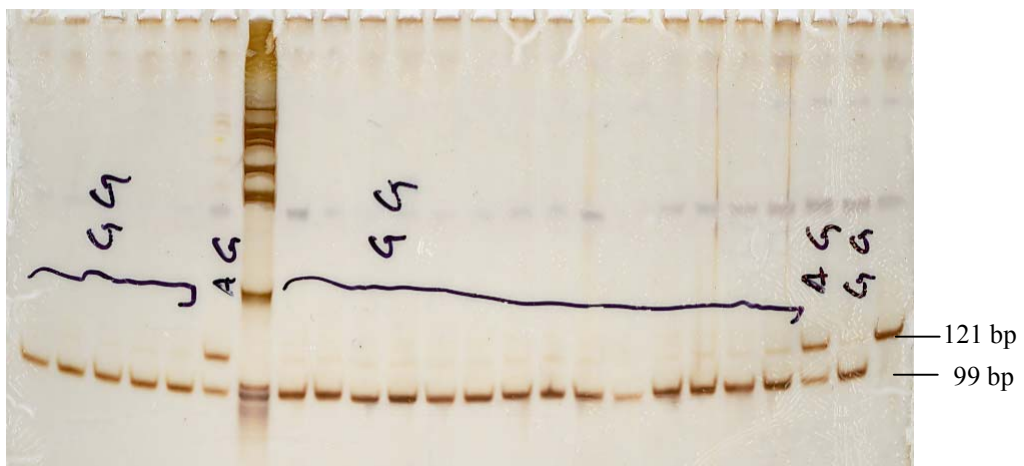
Variante *rs8192627*: Nach Inkubation des die Variante beinhaltenden DNA-Abschnitts (233 bp) mit *AluI* ließen sich drei Banden der Längen 233 bp, 187 bp und 46 bp darstellen. DNA-Proben mit homozygotem A-Allel stellten keine Schnittstelle für das Enzym dar, es ergaben sich somit nur Fragmente der Ursprungslänge 233 bp. War das genetische Material homozygot für das Allel C, entstanden durch Restriktion zwei DNA-Stücke der Größe 187 bp und 46 bp. Heterozygote Individuen (AC) ließen sich folglich durch Fragmente mit 233 bp, 187 bp und 46 bp einordnen.

Abb. 6 Darstellung der RFLP-Bandenmuster für rs8192627 nach Auftrennung auf einem 10%igen Polyacrylamidgel. An dritter Stelle von links eine für das C-Allel homozygote Person.



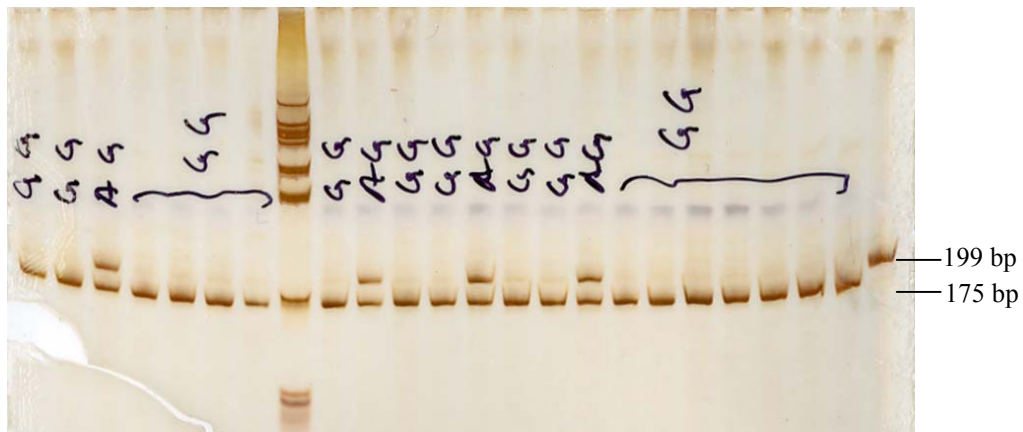
Variante *rs8192624*: Nach Verdau des entsprechenden 121 bp langen DNA-Fragments mit KpnI ergaben sich drei verschiedene Restriktionsfragmente der Längen 121 bp, 99 bp und 22 bp. DNA von Personen, die homozygot für das A-Allel sind, wurde vom Enzym nicht geschnitten, entsprechend lag nach wie vor ein Fragment von 121 bp Länge vor. Bei Individuen mit Homozygotie für Allel G schnitt KpnI die DNA in zwei Fragmente von 99 bp und 22 bp. Bei heterozygoten Personen (GA) ließen sich somit drei Banden, nämlich bei 121 bp, 99 bp und 22 bp, ablesen.

Abb. 7 Darstellung der RFLP-Bandenmuster für rs8192624 nach Auftrennung auf einem 10%igen Polyacrylamidgel. Rechts außen eine für das A-Allel homozygote Kontrollperson.



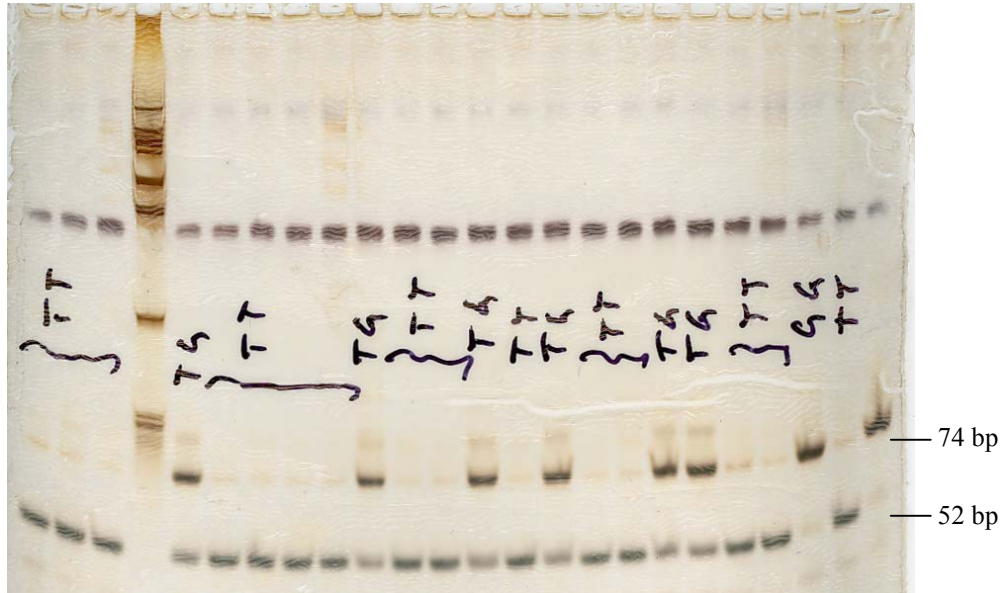
Variante *rs8192625*: Nach Verdau des zugehörigen Fragments (199 bp) mit dem Restriktionsenzym *Csp6I* fanden sich drei unterschiedlich große DNA-Abschnitte von 199 bp, 175 bp und 24 bp. Individuen mit für das Allel A homozygoter DNA zeigten ein ungeschnittenes Fragment der Länge 199 bp. DNA mit homozygotem G-Allel bot eine Schnittstelle für das Enzym, es entstanden zwei Banden zu 175 bp und 24 bp. Heterozygote Proben (GA) wurden entsprechend in 199 bp, 175 bp und 24 bp große Fragmente aufgetrennt.

Abb. 8 Darstellung der RFLP-Bandenmuster für *rs8192625* nach Auftrennung auf einem 10%igen Polyacrylamidgel. Rechts außen eine für das A-Allel homozygote Kontrollperson.



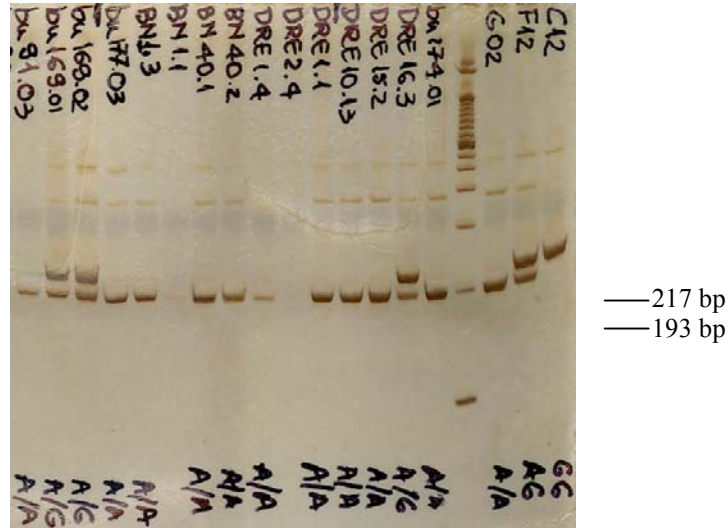
Variante *rs7772821*: Durch Verdau des betreffenden DNA-Stücks (74 bp) mit *Bst1107I* erhielt man drei Fragmente mit den Längen 74 bp, 52 bp und 22 bp. Proben, bei denen ein homozygotes Allel G vorlag, verblieben ungeschnitten in Form eines 74 bp Fragments. Personen mit Homozygotie für das T-Allel boten ein in die Fragmente 52 bp und 22 bp aufgespaltenes Muster. Für DNA heterozygoter Individuen (TG) resultierten somit drei Abschnitte von 74 bp, 52 bp und 22 bp.

Abb. 9 Darstellung der RFLP-Bandenmuster für rs7772821 nach Auftrennung auf einem 10%igen Polyacrylamidgel. Rechts außen eine für das G-Allel homozygote Kontrollperson.



Variante *rs8192620*: Der Verdau der entsprechenden Sequenz (217 bp) mit *VspI* brachte Fragmente der Länge 217 bp, 193 bp und 24 bp hervor. Personen mit Homozygotie für Allel G lieferten ein ungeschnittenes DNA-Stück von 217 bp. Enthielt die DNA ein homozygotes A-Allel, schnitt das Enzym in zwei Teile von 193 bp und 24 bp. Bei Individuen, deren DNA heterozygot (GA) war, ließen sich demnach Banden der Länge 217 bp, 193 bp und 24 bp nachweisen.

Abb. 10 Darstellung der RFLP-Bandenmuster für rs8192620 nach Auftrennung auf einem 10%igen Polyacrylamidgel. Rechts außen eine für das G-Allel homozygote Kontrollperson.



6.3 Assoziationsanalysen mit genetischen Varianten in den Genen *TRAR1*, *TRAR4* und *TRAR5*

6.3.1 Ergebnisse im Initialkollektiv mit bipolar affektiver Störung

In der sich anschließenden statistischen Auswertung der Ergebnisse der RFLP-Assays wurde für das Triokollektiv die Transmissionsrate der jeweiligen Allele der fünf untersuchten SNPs in Form des TDT berechnet.

Für *TRAR1* (SNP rs8192620) und *TRAR5* (SNP rs8192627) ergeben sich keine signifikanten Ergebnisse bei den TDT-Analysen (s. Tab. 4 bzw. Tab. 8). Für *TRAR4* zeigte sich eine bevorzugte Weitergabe des Allels G von SNP rs8192624 ($p=0,014$) an das betroffene Kind (s. Tab. 5) sowie ein Trend zur bevorzugten Vererbung des Allels G von SNP rs8192625 mit $p=0,063$ (s. Tab. 6). SNP rs7772821 erbrachte keinen signifikanten Assoziationshinweis (s. Tab. 7). Eine durchgeführte Haplotypanalyse mit den drei SNPs im Bereich von *TRAR4* trug nicht zur Bekräftigung der Ergebnisse bei (s. Tab. 9).

Tab. 4 Absolute Transmissionsrate der Allele für SNP rs8192620 im *TRARI*-Gen nach Restriktionsverdau mit VspI.

<i>TRARI</i>		
rs8192620	Allele	
	A	G
Transmittiert	45	37
Nicht transmittiert	37	45
p-Wert	0,380	

Tab. 5 Absolute Transmissionsrate der Allele für SNP rs8192624 im *TRAR4*-Gen nach Restriktionsverdau mit KpnI.

<i>TRAR4</i>		
rs8192624	Allele	
	G (Valin)	A (Isoleucin)
Transmittiert	29	13
Nicht transmittiert	13	29
p-Wert	0,014	

Tab. 6 Absolute Transmissionsrate der Allele für SNP rs8192625 im *TRAR4*-Gen nach Restriktionsverdau mit Csp6I.

<i>TRAR4</i>		
rs8192625	Allele	
	G (Cystein)	A (Tyrosin)
Transmittiert	23	12
Nicht transmittiert	12	23
p-Wert	0,063	

Tab. 7 Absolute Transmissionsrate der Allele für SNP rs7772821 im *TRAR4*-Gen nach Restriktionsverdau mit Bst1107I.

<i>TRAR4</i>		
rs7772821	Allele	
	T	G
Transmittiert	34	31
Nicht transmittiert	31	34
p-Wert	0,710	

Tab. 8 Absolute Transmissionsrate der Allele für SNP rs8192627 im *TRAR5*-Gen nach Restriktionsverdau mit AluI.

<i>TRAR5</i>		
rs8192627	Allele	
	A (Asparaginsäure)	G (Alanin)
Transmittiert	6	5
Nicht transmittiert	5	6
p-Wert	0,760	

Tab. 9 Haplotypanalyse mit den drei im *TRAR4*-Gen lokalisierten SNPs rs8192624, rs8192625 und rs7772821.

<i>TRAR4</i>		
rs8192624-rs8192625-rs7772821	Transmittiert	Nicht transmittiert
T-G-G	41,24	32,94
G-G-G	23,76	22,06
T-A-G	6,30	8,00
G-A-A	5,00	10,94
T-G-A	4,46	4,01
G-A-G	2,70	2,01

T-A-A	1,00	6,06
G-G-A	1,54	0
Korrigierter globaler p-Wert	0,091	

6.3.2 Ergebnisse im Replikationskollektiv mit bipolar affektiver Störung

Für das Replikationskollektiv wurden die Allel- und Genotyphäufigkeiten der drei untersuchten Polymorphismen im *TRAR4*-Gen bei Patienten und Kontrollpersonen verglichen. Zur Signifikanzanalyse wurde hier der Armitage-Trend-Test (Armitage 1955) herangezogen, die Haplotypanalyse wurde mittels FAMHAP durchgeführt (Becker et Knapp 2004). Allel G des SNPs rs8192624 zeigte Assoziation mit bipolar affektiven Störungen ($p=0,024$, OR 1,63), wohingegen sich für die beiden anderen SNPs keine positiven Assoziationsergebnisse ergaben (rs8192625 $p=0,250$, rs7772821 $p=0,604$). Die Haplotypanalyse mit den drei SNPs im Bereich von *TRAR4* trug wiederum nicht zur Bekräftigung der Ergebnisse bei (s. Tab. 13).

Tab. 10 Relative Allel- und Genotyphäufigkeiten für SNP rs8192624 im *TRAR4*-Gen nach Restriktionsverdau mit KpnI.

<i>TRAR4</i>			
rs8192624	Allele		
	A (Isoleucin)	G (Valin)	
BPAD-Patienten (n= 263)	0,07	0,93	
Kontrollpersonen (n=430)	0,11	0,89	
	Genotypen		
	A/A	A/G	G/G
BPAD-Patienten (n= 263)	0,00	0,13	0,87
Kontrollpersonen (n=430)	0,01	0,19	0,80
p-Wert (OR; 95%-KI)	0,024 (1,63; 1,03-2,55)		

Tab. 11 Relative Allel- und Genotyphäufigkeiten für SNP rs8192625 im *TRAR4*-Gen nach Restriktionsverdau mit Csp6I.

<i>TRAR4</i>			
rs8192625	Allele		
	A (Tyrosin)	G (Cystein)	
BPAD-Patienten (n= 263)	0,07	0,93	
Kontrollpersonen (n=430)	0,09	0,91	
	Genotypen		
	A/A	A/G	G/G
BPAD-Patienten (n= 263)	0,01	0,13	0,86
Kontrollpersonen (n=430)	0,01	0,17	0,82
p-Wert (OR; 95%-KI)	0,250(1,36; 0,87-2,15)		

Tab. 12 Relative Allel- und Genotyphäufigkeiten für SNP rs7772821 im *TRAR4*-Gen nach Restriktionsverdau mit Bst11071.

<i>TRAR4</i>			
rs7772821	Allele		
	G	T	
BPAD-Patienten (n= 263)	0,15	0,85	
Kontrollpersonen (n=430)	0,60	0,84	
	Genotypen		
	G/G	G/T	T/T
BPAD-Patienten (n= 263)	0,02	0,26	0,72

Kontrollpersonen (n=430)	0,02	0,27	0,71
p-Wert (OR; 95%-KI)	0,604(1,06; 0,75-1,52)		

Tab. 13 Haplotypanalyse mit den drei im *TRAR4*-Gen lokalisierten SNPs rs8192624, rs8192625 und rs7772821.

<i>TRAR4</i>		
rs8192624-rs8192625-rs7772821	Haplotypfrequenz bei Patienten	Haplotypfrequenz bei Kontrollen
T-G-G	0,78	0,77
G-G-G	0,12	0,09
T-A-G	0,01	0,02
G-A-A	0,03	0,05
T-G-A	0,03	0,03
G-A-G	0,01	0,01
T-A-A	0,01	0,01
Korrigierter globaler p-Wert	0,089	

6.3.3 Ergebnisse im Gesamtkollektiv mit bipolar affektiver Störung

Die gemeinsame Betrachtung der Daten aus dem initialen Triokollektiv und dem Fall-Kontroll-Kollektiv hinsichtlich rs8192624 im *TRAR4*-Gen schien wegen der positiven Ergebnisse in beiden Kollektiven angebracht (Methode nach Fisher, 1925). Auch im Gesamtkollektiv war die Variante signifikant assoziiert. ($p=0,004$). Berücksichtigt man die Tatsache, dass fünf Marker in der initialen Studie getestet wurden und führt eine Bonferroni-Korrektur für multiples Testen durch, sind die Assoziationshinweise für diesen Marker weiterhin signifikant ($p=0,02$).

7 Diskussion

7.1 Aufklärung genetischer Ursachen komplex vererbter Krankheiten

Seit Einführung der PCR als grundlegende Methode für die Molekulargenetik hat sich das Spektrum der Verfahren auf diesem Gebiet in raschem Tempo erweitert. Dadurch wurden die Möglichkeiten, genetisch bedingte Krankheiten zu erforschen, stetig verbessert. So sind die

Ursachen für die meisten der monogenen Erkrankungen, denen Veränderungen an einem einzigen Genlocus zugrunde liegen, bereits bekannt. Schwieriger hingegen erweist sich die Identifikation der Ursachen genetisch komplexer Krankheiten, bei denen mehrere genetische Veränderungen an der Erkrankungsdisposition teilhaben. Hier sind erst in jüngster Zeit Erfolge abgeschlossener Assoziationsstudien mit Benennung von Krankheitsgenen vorzuweisen.

Bei monogenen als auch genetisch komplexen Erkrankungen besteht der erste Schritt bei der Genidentifikation in Kopplungsuntersuchungen an hochbelasteten Familienkollektiven zur Eingrenzung der entsprechenden chromosomalen Bereiche. Bei genetisch komplexen Erkrankungen werden daraufhin Assoziationsuntersuchungen in Kopplungsregionen an großen Stichproben von Patienten und Kontrollpersonen durchgeführt. Dabei muss zwischen systematischen Untersuchungen auf Kopplungsungleichgewicht und Assoziationsuntersuchungen an ausgewählten Kandidatengen in den zuvor identifizierten Kopplungsregionen unterschieden werden. Erstgenannte Untersuchungen zielen dabei auf die systematische Abdeckung der Kopplungsregionen mit genetischen Varianten mit geringen Zwischen-Marker-Abständen ab. Auf diese Weise versucht man hypothesenfrei Assoziationshinweise bzw. Kopplungsungleichgewichte zwischen einer Variante und dem Krankheitsstatus zu identifizieren. Demgegenüber versucht man bei dem Kandidatengenansatz durch die gezielte Auswahl von funktionell interessanten Genen in diesen Bereichen gezielt Assoziationen zur Erkrankung aufzudecken. Hierdurch lässt sich der Genotypisierungsaufwand erheblich verringern. Nach Auffinden positiver Assoziationshinweise müssen anschließend Replikationsuntersuchungen durchgeführt werden. Hierdurch soll ausgeschlossen werden, dass die gefundenen Assoziationen durch Stratifikationseffekte oder zufällig zustande gekommen sind. Replikationsstudien an unabhängigen Kollektiven kommt somit eine wesentliche Bedeutung bei der Erforschung genetisch komplexer Erkrankungen zu.

7.2 Interpretation der Ergebnisse vorliegender Arbeit

Bei bipolar affektiven Störungen wurden bereits zahlreiche genomweite Kopplungsanalysen durchgeführt, bei denen genomische Regionen identifiziert wurden, in denen Krankheitsgene vermutet werden. Hierzu zählt auch der Bereich 6q23 auf dem langen Arm von Chromosom 6 (s. 2.7.2), in dem die Gene *TRARI*, *TRAR4* und *TRAR5* liegen. Vorliegende Arbeit verfolgte das Ziel, den Stellenwert dieser Gene an der Ätiologie der bipolar affektiven Störungen zu analysieren. Zum Zeitpunkt der Untersuchungen lagen noch keine anderen Assoziationsbefunde

zu bipolar affektiven Störungen mit genetischen Varianten im Bereich dieser Gene vor. Bei den von uns durchgeführten Assoziationsanalysen wurden 5 SNPs an einem Eltern-Kind-Kollektiv untersucht. Für die SNPs in *TRARI* (rs8192620) und in *TRAR5* (rs8192627) ergaben sich dabei keine Assoziationshinweise in unserem Trio-Kollektiv mit bipolar affektiver Störung. Beiden Genen scheint daher keine Bedeutung an der Entstehung bipolar affektiver Störungen in der europäischen Bevölkerung zuzukommen. In *TRAR4* ließ sich die bevorzugte Weitergabe des Allels G von rs8192624 an betroffene Kinder ($p=0,014$) sowie ein Trend zur Assoziation für rs8192625 ($p=0,063$) feststellen. In einem Replikationsschritt schlossen wir eine weitere Assoziationsstudie mit einem Fall-Kontroll-Kollektiv an, in der die drei *TRAR4*-Varianten nochmals analysiert wurden. Für Allel G des SNPs rs8192624 ergab sich erneut ein signifikanter Assoziationshinweis zur bipolar affektiven Störung ($p=0,024$), nicht jedoch für die beiden anderen SNPs. In der gemeinsamen Analyse beider bipolar affektiver Kollektive war rs8192624 hochsignifikant assoziiert ($p=0,004$). Unser Ergebnis hielt auch einer Bonferroni-Korrektur auf multiples Testen stand (rs8192624 $p=0,02$). Dabei wird berücksichtigt, dass insgesamt fünf Marker in unserem Initialkollektiv getestet wurden.

Die Variante rs8192624 ist für einen Aminosäureaustausch (Valin gegen Isoleucin in Position 265 des Proteins) in der sechsten transmembranären Domäne des Trace-Amin-Rezeptors 4 verantwortlich. Allerdings sind mit dieser Variante offenbar keine funktionellen Konsequenzen verknüpft. Valin und Isoleucin sind unpolare neutrale Aminosäuren und Valin in Position 265 ist in anderen Spezies nicht konserviert.

Aus diesen Überlegungen heraus muss vermutet werden, dass das assoziierte Allel von rs8192624 am *TRAR4*-Locus zwar selbst nicht unmittelbar an der Entstehung von bipolar affektiven Störungen beteiligt ist, sich jedoch in engster Nachbarschaft zu einer bislang noch nicht identifizierten oder hinreichend untersuchten krankheitsdisponierenden Variante befindet.

7.3 Unabhängig publizierte Assoziationsergebnisse zwischen *TRAR4* und psychiatrischen Erkrankungen

Mittlerweile liegen die Ergebnisse von vier Assoziationsuntersuchungen unter Zugrundelegen von genetischen Varianten am *TRAR4*-Locus und Kollektiven schizophrener Störungen vor. Demgegenüber sind bislang keine von uns unabhängigen Assoziationsanalysen mit bipolar affektiven Störungen publiziert, bei denen die genetische Variabilität am *TRAR4*-Locus auf Assoziation hin untersucht wurde. Obwohl schizophrene Störungen gegenüber bipolar affektiven

Erkrankungen eine andere psychiatrische Krankheitsentität darstellen, kommt oben genannten Befunden eine Bedeutung bei der Interpretation vorliegender Ergebnisse zu. So erscheinen zwei mittlerweile identifizierte Krankheitsgene bei bipolar affektiven Störungen ebenfalls am Entstehungsprozess schizophrener Störungen beteiligt zu sein. Es handelt sich um die Gene *G72* mit positiven Assoziationsbefunden bei bipolar affektiven, unipolar affektiven, schizophrenen Störungen sowie Panik-Störungen (Abou Jamra et al., 2006) und um *DISC1* mit positiven Assoziationshinweisen bei bipolar affektiven und schizophrenen Störungen (Hennah et al., 2006). Aufgrund dieser Befunde mit überschneidender Assoziationsevidenz wird zunehmend angenommen, dass sich die klassische Unterteilung von bipolar affektiven Störungen und schizophrenen Störungen auf molekularer Ebene nicht abbildet.

Von den genannten Untersuchungen an Kollektiven mit schizophrenen Störungen konnten zunächst Duan et al. (2004) Assoziation mit rs4305745 ($p=0,0014$), einem das Stopcodon von *TRAR4* flankierenden SNP finden (1214 bp stromabwärts im 3'UTR-Bereich). Zudem waren zwei mit o.g. Variante in Kopplungsungleichgewicht befindliche Polymorphismen (ss28447873 und rs7452939) und zwei weitere SNPs am *TRAR4*-Locus, rs6903874 ($p=0,0026$) und rs6937506 ($p=0,0052$), zu schizophrenen Störungen assoziiert. Die Variante rs8192624, die in unserer Untersuchung zur bipolar affektiven Störung starke Assoziationshinweise zeigte, war bei dieser Studie nicht assoziiert, sie liegt jedoch nach den Daten des HapMap Projekts (<http://www.hapmap.org/index.html.en>) im gleichen Haplotypblock wie o.g. assoziierte Varianten. Das von Duan et al. (2004) analysierte Kollektiv bestand aus 827 Individuen mit schizophrenen Störungen, die 192 Familien entnommen wurden und maßgeblich europäischer Herkunft waren. Insgesamt wurden 23 SNP-Marker im Bereich des *TRAR*-Clusters untersucht. Weiterhin sind die Ergebnisse von Vladimirov et al. (2005) in Zusammenschau mit unseren Ergebnissen von Interesse. Sie untersuchten 15 SNP-Marker am *TRAR4*-Locus in 270 Familien mit schizophrenen Störungen europäischer Herkunft. Es zeigte sich ein signifikanter Assoziationshinweis bei rs12189813 ($p=0,0084$), der 35 kb entfernt im 3'UTR-Bereich von *TRAR4* lokalisiert ist. Des Weiteren waren rs8192624 ($p=0,0676$) und rs7772821 ($p=0,0729$) tendenziell zum Erkrankungsstatus assoziiert. Die Haplotypanalyse mit der Markerkombination rs8192622-rs8192624-rs8192625-rs7772821 zeigte mit $p=0,006$ ein signifikantes Ergebnis. Bei dem Marker rs8192624 handelt es sich um den gleichen Marker, der auch bei unseren Untersuchungen signifikant assoziiert war ($p=0,004$ im Gesamtkollektiv). Wie auch bei den Einzelmarker-Analysen erhielt die Gruppe bei den Haplotypanalysen ihre stärksten

Assoziationshinweise im 3'UTR-Bereich von *TRAR4*. Der in diesem Bereich liegende Haplotyp rs7772821-rs4305745-rs6903874-rs7765655 war mit $p=0,0000529$ am signifikantesten assoziiert.

Unsere und die Untersuchungen von Duan et al. (2004) und Vladimirov et al. (2005) deuten darauf hin, dass *TRAR4* in der europäischen Population am Entstehungsprozess sowohl bipolar affektiver als auch schizophrener Störungen beteiligt ist. Die ursächliche Dispositionsvariante wird dabei vermutlich im 3'UTR von *TRAR4* lokalisiert sein und im Kopplungsungleichgewicht zu den Varianten liegen, die im Rahmen unserer und der Untersuchungen von Duan et al. (2004) und Vladimirov et al. (2005) analysiert wurden.

Bei Assoziationsanalysen zwischen genetischen Varianten am *TRAR4*-Locus und Kollektiven schizophrener Störungen ergaben sich aber auch negative Assoziationshinweise. Allerdings handelt es sich dabei um Stichproben, die nicht europäischer Herkunft sind. Ikeda et al. (2005) untersuchten 5 genetische Varianten in *TRAR4* bei japanischen Patienten, wobei sie ein zweistufiges Studiendesign wählten. In ihrer ersten Stichprobe (401 Patienten, 405 Kontrollen) ergaben sich für rs6907909 zwar signifikante Assoziationshinweise ($p=0,0122$), die sich jedoch im zweiten Sample (503 Patienten, 440 Kontrollen) nicht replizieren ließen. Amann et al. (2005) konnten in ihrer Studie mit 53 Familien arabisch-israelischen Ursprungs (85 Schizophrenie-Patienten) für 15 verschiedene SNPs (u. a. auch rs8192624, rs8192625 und rs7772821) ebenfalls keine positiven Assoziationsergebnisse finden, obwohl zuvor in der gleichen Population über signifikante Kopplung zwischen schizophrenen Störungen und Markern im Bereich von Chromosom 6q23 berichtet wurde (NPL-Score von 4,6 bei 136,3 Mb) (Lerer et al., 2003).

7.4 Zusammenfassende Betrachtung und Ausblick

Die Ergebnisse unserer und unabhängiger Arbeitsgruppen deuten darauf hin, dass die genetische Variabilität im Bereich des *TRAR4*-Locus sowohl für bipolar affektive als auch für schizophrene Störungen in der europäischen Population von Bedeutung ist. Hierfür sprechen die positiven Assoziationshinweise vorliegender Untersuchung an zwei unabhängigen Kollektiven mit bipolar affektiven Störungen und die signifikanten Befunde an zwei unabhängigen Kollektiven mit schizophrenen Störungen (Duan et al., 2004; Vladimirov et al., 2005). Dabei kann vermutet werden, dass *TRAR4* diagnoseübergreifend zu bipolar affektiven und schizophrenen Störungen beiträgt. Dass sich das auf den deutschen Psychiater Emil Kraepelin (1856-1926) zurückgehende nosologische Konzept mit der Unterteilung beider Krankheitsentitäten auf molekularer Ebene nicht abbildet, konnte bereits für die beiden Krankheitsgene *G72* und *DISC1* gezeigt werden

(Abou Jamra et al., 2006; Hennah et al., 2006). Beide sind sowohl zu bipolar affektiven wie auch schizophrenen Störungen assoziiert. Zukünftige Untersuchungen werden klären, inwieweit auch die gleichen Genvarianten zu den jeweiligen Störungsformen beitragen. Zudem müssen detaillierte Genotyp-Phänotyp-Analysen der Frage nachgehen, welcher phänotypische Aspekt am stärksten bzw. unmittelbarsten durch die genetische Variabilität am *TRAR4*-Locus beeinflusst wird.

Demgegenüber liegen bislang keine Hinweise dafür vor, dass *TRAR4* von Bedeutung am Entstehungsprozess bipolarer oder schizophrener Störungen in nicht-europäischen Bevölkerungsgruppen ist. Diesbezüglich ergaben sich keine replizierbaren Assoziationshinweise in Kollektiven mit japanischer Herkunft (Ikeda et al., 2005). Auch Amann et al. (2005) fanden keine Assoziation am *TRAR4*-Locus in einem Schizophrenie-Kollektiv mit arabischer Herkunft. Das Vorliegen solcher populationsspezifischer Effekte konnte bereits für eine Vielzahl von genetisch komplexen Krankheiten gezeigt werden. So ist z. B. das *CARD15*-Gen von großer Bedeutung für die Entwicklung eines Morbus Crohn in der europäischen Population, jedoch ohne Relevanz für die Manifestation eines Morbus Crohn in der koreanischen Bevölkerung (Croucher et al., 2003).

In zukünftigen Untersuchungen wird es u. a. darum gehen, die krankheitsverursachenden Veränderungen am *TRAR4*-Locus zu identifizieren. Aufgrund der bisherigen Daten scheint dabei dem 3'UTR-Bereich von *TRAR4* die größte Bedeutung zuzukommen. Allerdings sind weiterführende Untersuchungen mit Resequenzierungen des *TRAR4*-Locus und anschließenden Assoziationsanalysen an großen Patientenkollektiven notwendig, um die Bedeutung von *TRAR4* an der Entstehung psychiatrischer Krankheitsbilder abschließend zu klären. Durch die Typisierung einer ausreichenden Anzahl genetischer Varianten am *TRAR4*-Locus sollte dabei die Identifikation der krankheitsverursachenden Variante(n) auch gelingen. Detaillierte Erkenntnisse über die Funktion bzw. Dysfunktion des TRAR4-Rezeptors sollten zudem Aufschluss über die zellbiologischen Mechanismen an der Pathogenese von bipolar affektiven Störungen geben und zudem als Ausgangspunkt für pharmakologische Studien dienen. Letztlich wird auch der Einsatz von Tiermodellen kontrollierte Voraussetzungen für Funktionsanalysen schaffen.

8 Zusammenfassung

Bipolar affektive Störungen gehören zu den in der Allgemeinbevölkerung häufigen Erkrankungen. Von einer Beteiligung genetischer Faktoren an der Ätiologie bipolar affektiver Störungen ist aufgrund der Ergebnisse von Familien-, Adoptions- und Zwillingsstudien auszugehen. Im Gegensatz zu monogen erblichen Krankheiten ist das Vererbungsmuster jedoch komplex.

Ein methodischer Ansatz für die Identifikation eines Dispositionsgens bei genetisch komplexen Erkrankungen ist das Erfassen von Assoziation zwischen genetischen Varianten und dem Erkrankungsstatus. Herangezogen werden Kandidatengene, die aufgrund funktioneller Vorbefunde und ihrer Lokalisation in zuvor identifizierten Kopplungsregionen für die jeweilige Krankheit interessant erscheinen.

Kandidatengene für bipolar affektive Störungen sind u. a. die *Trace-Amin-Rezeptor*-Gene *TRAR1*, *TRAR4* und *TRAR5*. Sie kodieren für Rezeptoren, deren Liganden sogenannte Trace Amine sind. Diese biogenen Amine sind von Interesse bei der Erforschung neuropsychiatrischer Störungen, da sie vor allem im ZNS vorkommen und man veränderte Spiegel im Urin von Patienten mit schizophrenen, bipolar affektiven und Angststörungen beobachtet hat. Die Gene *TRAR1*, *TRAR4* und *TRAR5* liegen zudem in der chromosomalen Region 6q23, für die zuvor positive Kopplungsbefunde mit bipolar affektiven Störungen gefunden wurden.

In vorliegender Studie wurden insgesamt fünf SNPs in den Genen *TRAR1*, *TRAR4* und *TRAR5* durch RFLP-Analyse in einem aus 118 Trios bestehenden Initialkollektiv mit bipolar affektiver Störung auf Assoziation hin untersucht. Für die untersuchten Varianten in *TRAR1* und *TRAR5* fanden sich keine signifikanten Assoziationshinweise, sie scheinen nicht an der Ätiologie von bipolar affektiven Störungen in der europäischen Population beteiligt zu sein. Von den drei SNPs in *TRAR4* ergab sich für Allel G bei rs8192624 eine signifikante Assoziation ($p=0,014$) und für einen weiteren SNP ein Trend zur Assoziation. Bei einem zweiten RFLP-Assay für die drei *TRAR4*-Varianten in einem Fall-Kontroll-Replikationskollektiv (263 Patienten mit bipolar affektiver Störung, 430 Kontrollen) zeigte sich beim Vergleich der Allel- und Genotyphäufigkeiten, dass Allel G von rs8192624 ebenfalls signifikant häufiger bei den Patienten mit bipolar affektiven Störungen als bei den gesunden Kontrollen vorkommt ($p=0,024$). Die kombinierte Auswertung ergab einen hochsignifikanten Assoziationshinweis ($p=0,004$), der auch einer Bonferroni-Korrektur auf multiples Testen standhielt ($p=0,02$).

Die erhobenen Befunde weisen in Zusammenschau mit zwei positiven Assoziationsanalysen am *TRAR4*-Locus bei schizophrenen Störungen darauf hin, dass genetische Varianten in diesem Bereich erkrankungsübergreifend an der Entstehung bipolar affektiver und schizophrener Störungen in europäischen Populationen beteiligt sind. Die krankheitsdisponierende(n) Variante(n) ist (sind) jedoch noch nicht identifiziert. Die bisherigen Daten lassen vermuten, dass sie im 3'UTR-Bereich von *TRAR4* lokalisiert ist (sind). Durch weiterführende Untersuchungen mit Resequenzierungen des *TRAR4*-Locus und anschließende Assoziationsanalysen unter Zugrundelegen einer ausreichend großen Anzahl von Patienten und Varianten in diesem Bereich sollte die Identifikation der Dispositonsvariante(n) gelingen. Anschließend werden Genotyp-Phänotyp-Analysen zeigen, welche phänotypische Dimension der Erkrankungen am unmittelbarsten durch *TRAR4* beeinflusst werden. Zudem werden funktionelle Analysen vertiefte Einblicke in den zellbiologischen Pathomechanismus beider Erkrankungen bieten.

9 Literaturverzeichnis

1. Abou Jamra R, Schmael C, Cichon S, Rietschel M, Schumacher J, Nöthen MM. The G72/G30 gene locus in psychiatric disorders: a challenge to diagnostic boundaries? *Schizophr Bull.* 2006; 32: 599-608.
2. American Psychiatric Association. DSM-IV, Diagnostic and statistical manual of mental disorders, fourth edition. Washington, D.C., 1994.
3. Amann D, Avidan N, Kanyas K, Kohn Y, Hamdan A, Ben-Asher E, Macciardi F, Beckmann JS, Lancet D, Lerer B. The trace amine receptor 4 gene is not associated with schizophrenia in a sample linked to chromosome 6q23. *Mol Psychiatry.* 2006; 11:119-121.
4. Angst J. Verlauf unipolarer depressiver, bipolar manisch-depressiver und schizoaffektiver Erkrankungen und Psychosen. Ergebnisse einer prospektiven Studie. *Fortschr Neurol Psychiatr* 1980; 48: 3-30.
5. Armitage P. Tests for linear trend in proportions and frequencies. *Biometrics.* 1955; 11: 375-386.
6. Baron M, Mendlewicz J, Klotz J. Age-of-onset and genetic transmission in affective disorders. *Acta Psychiat Scand* 1981; 64: 373-380.
7. Becker T, Cichon S, Jonson E, Knapp M. Multiple testing in the context of haplotype analysis revisited: application to case-control data. *Ann Hum Genet* 2005; 69: 747-756.
8. Becker T, Knapp M. Maximum-likelihood estimation of haplotype frequencies in nuclear families. *Genet Epidemiol.* 2004; 27: 21-32.
9. Becker T, Knapp M. A powerful strategy to account for multiple testing in the context of haplotype analysis. *Am J Hum Genet* 2004; 75: 561-570
10. Bergman J, Yasar S, Winger G. Psychomotor stimulant effects of β -phenylethylamine in monkeys treated with MAOB-inhibitors. *Psychopharmacology* 2001; 159: 21-30
11. Bertelsen A. Controversies and consistencies in psychiatric genetics. *Acta Psychiat Scand (Suppl 319)* 1985; 71: 61-65.
12. Borowski B, Adham N, Jones KA, Raddatz R, Artymyshyn R, Ogozalek KL, Durkin MM, Lakhiani PP, Bonini JA, Pathirana S, Boyle N, Pu X, Kouranova E, Lichtblau H, Ochoa FY, Branchek TA, Gerald C. Trace amines: identification of a family of mammalian G protein-coupled receptors. *Proc Natl Acad* 2001; 98: 8966-8971.

13. Boulton AA. The properties and functions of some brain trace amines. *Prog Clin Biol Res* 1989; 39: 291-302.
14. Boulton AA, Dyck LE. Biosynthesis and excretion of meta and para tyramine in the rat. *Life Sci* 1974; 14: 2497-2506.
15. Boulton AA, Juorio AV, Downer RGH, eds. *Comparative and clinical neurobiology (experimental and clinical neuroscience)*. Totowa NJ: Humana, 1988.
16. Budowle B, Chakraborty R, Giusti AM, Eisenberg AJ, Allen RC. Analysis of the VNTR Locus DIS80 by the PCR followed by High-Resolution PAGE. *Am J Hum Genet* 1991; 48: 137-144.
17. Burton R. *Anatomie der Melancholie*. Übersetzung durch Ulrich Horstmann. 2. Auflage. Zürich und München: Artemis Verlag, 1988.
18. Cichon S, Schumacher J, Müller DJ, Hürter M, Windemuth C, Strauch K, Hemmer S, Schulze TG, Schmidt-Wolf G, Albus M, Borrmann-Hassenbach M, Franzek E, Lanczik M, Fritze J, Kreiner R, Reuner U, Weigelt B, Minges J, Lichtermann D, Lerer B, Kanyas K, Baur MP, Wienker TF, Maier W, Rietschel M, Propping P, Nöthen MM. A genome screen for genes predisposing to bipolar affective disorder detects a new susceptibility locus on 8q. *Hum Mol Genet* 2001; 10: 2933-2944.
19. Craddock N, Forty L. Genetics of affective (mood) disorders. *Eur J Hum Genet*. 2006; 14: 660-668.
20. Craddock N, Jones I. Genetics of bipolar disorder. *J Med Genet* 1999; 36: 585-594.
21. Croucher PJ, Mascheretti S, Hampe J, Huse K, Frenzel H, Stoll M, Lu T, Nikolaus S, Yang SK, Krawczak M, Kim WH, Schreiber S. Haplotype structure and association to Crohn's disease of CARD15 mutations in two ethnically divergent populations. *Eur J Hum Genet*. 2003; 11: 6-16.
22. Davis BA, Shrikande S, Paralakar VP, Hirsch SR, Durden DA, Boulton AA. Phenylacetic acid in CSF and serum in Indian schizophrenic patients. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 1991; 15: 41-47.
23. Duan J, Martinez M, Sanders AR, Hou C, Saitou N, Kitano T, Mowry BJ, Crowe RR, Silverman JM, Levinson DF, Gejman PV. Polymorphisms in the trace amine receptor 4 (TRAR4) gene on chromosome 6q23.2 are associated with susceptibility to schizophrenia. *Am J Hum Genet* 2004; 75: 624-638.

24. Ewald H, Flint T, Kruse TA, Mors O. A genome-wide scan shows significant linkage between bipolar disorder and chromosome 12q24.3 and suggestive linkage to chromosomes 1p22-21, 4p16, 6q14-22, 10q26 and 16p13.3. *Mol Psychiatry* 2002; 7: 734-744.
25. First MB, Gibbon M, Spitzer RL, Williams JBW. User's guide for the SCID-I structured clinical Interview for DSM-IV. Biometrics Research Department, New York State Psychiatric Institute, 1996.
26. Fisher R. In: Combination of probabilities from tests of significance. London: Oliver & Loyd, 1925: 99.
27. Freudenberg-Hua Y, Freudenberg J, Kluck N, Cichon S, Propping P, Nöthen MM. Single nucleotide variation analysis in 65 candidate genes for CNS disorders in a representative sample of the European population. *Genome Res* 2003; 13: 2271-2276.
28. Gershon ES, Baron M, Leckman JF. Genetic models of the transmission of affective disorders. *J Psychiat Res* 1975; 12: 301-317.
29. Gershon ES, Bunney WE, Leckman JF, van Eerdewegh M, DeBauche BA. The inheritance of affective disorders: a review of data and hypotheses. *Behav Genet* 1976; 6: 227-261.
30. Gershon ES, Hamovit JH, Guroff JJ, Dibble E, Leckman JF, Sceery W, Targum StD, Nurnberger JI, Goldin LR, Bunney WE. A family study of schizoaffective, bipolar I, bipolar II, unipolar, and normal control probands. *Arch Gen Psychiat* 1982; 39: 1157-1167.
31. Grimsby J, Toth M, Chen K, Kumazawa T, Klaidman L, Adams JD, Karoum F, Gal J, Shih JC. Increased stress response and β -phenylethylamine in MAOB-deficient mice. *Nat Genet* 1997; 17: 206-210
32. Guze SB, Robins E. Suicide and primary affective disorders. *Br J Psychiatry* 1970; 117: 111-129.
33. Hennah W, Thomson P, Peltonen L, Porteous D. Genes and schizophrenia: beyond schizophrenia: the role of DISC1 in major mental illness. *Schizophr Bull.* 2006; 32: 409-416.
34. Huber G. *Psychiatrie: Lehrbuch für Studierende und Ärzte*, 5. Auflage. Stuttgart-New York: Schattauer, 1994; 165-216.

35. Ikeda M, Iwata N, Suzuki T, Kitajima T, Yamanouchi Y, Kinoshita Y, Inada T, Ozaki N. No association of haplotype-tagging SNPs in TRAR4 with schizophrenia in Japanese patients. *Schizophr Res* 2005; 78: 127-130.
36. Janssen PA, Leysen JE, Megens AA, Awouters FH. Does phenylethylamine act as an endogenous amphetamine in some patients. *Int J Neuropsychopharmacol* 1999; 2: 229-240.
37. Khoury MJ, Beaty TH, Cohen BH. *Fundamentals of genetic epidemiology*. New York Oxford: Oxford University Press, 1993.
38. Lerer B, Segman RH, Hamdan A, Kanyas K, Karni O, Kohn Y, Korner M, Lanktree M, Kaadan M, Turetsky N, Yakir A, Kerem B, Macciardi F. Genome scan of Arab Israeli families maps a schizophrenia susceptibility gene to chromosome 6q23 and supports a locus at chromosome 10q24. *Mol Psychiatry* 2003; 8: 488-498.
39. Lieb R, Isensee B, Hofler M, Pfister H, Wittchen HU. Parental major depression and the risk of depression and other mental disorders in offspring: a prospective-longitudinal community study. *Arch Gen Psych* 2002; 4: 365-374.
40. Lindeman L, Hoener MC. A renaissance in trace amines inspired by a novel GPCR family. *Trends Pharmacol Sci*. 2005; 26: 274-281.
41. Linnoila M, Karoum F, Cutler NR, Potter WZ. Temporal association between depression-dependent dyskinesias and high urinary phenylethylamine output. *Biol Psychiatry* 1983; 18: 513-516
42. Mc Geer PL, Eccles Sir JC, McGeer EG, eds. *Molecular neurobiology of the mammalian brain*. New York: Plenum, 1979: 362.
43. McGuffin P, Farmer A, Harvey I. A polydiagnostic application of operational criteria in studies of psychotic illness. Development and reliability of the OPCRIT system. *Arch Gen Psychiatry* 1991; 48: 764-770.
44. Mc Guffin P, Katz R. The genetics of depression and manic-depressive disorder. *Br J Psychiatry* 1989; 155: 294-304.
45. Mendlewicz J, Rainer JD. Adoption study supporting genetic transmission in manic-depressive illness. *Nature* 1977; 268: 327-329.
46. Merikangas KR, Stevens DE, Merikangas JR, Katz CBS, Glover V, Cooper T, Sandler M. Tyramine conjugation deficits in migraine, tension-type headache and depression. *Biol Psychiatry* 1995; 38: 730-736.

47. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* 1988; 16: 1215.
48. Mullis KB, Faloona FA. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol.* 1987; 155: 335-350.
49. O'Reilly R, Davis BA, Durden DA, Thorpe L, Machnee H, Boulton AA. Plasma phenylethylamine in schizophrenic patients. *Biol Psychiatry* 1991; 30: 145-150.
50. Propping P. *Psychiatrische Genetik. Befunde und Konzepte.* Heidelberg: Springer Verlag, 1989.
51. Regier DA, Boyd JH, Burke JD Jr, Rae DS, Myers JK, Kramer M, Robins LN, George LK, Karno M, Locke BZ. One-month prevalence of mental disorders in the United States. Based on five Epidemiologic Catchment Area sites. *Arch Gen Psychiatry* 1988; 11: 977-986.
52. Rice JP, Goate A, Williams JT, Bierut L, Dorr D, Wu W, Shears S, Gopalakrishnan G, Edenberg HJ, Foroud T, Nurnberger J Jr, Gershon ES, Detera-Wadleigh SD, Goldin LR, Guroff JJ, McMahon FJ, Simpson S, MacKinnon D, McInnis M, Stine OC, DePaulo JR, Blehar MC, Reich T. Initial genome scan of the NIMH genetics initiative bipolar pedigrees: chromosomes 1, 6, 8, 10 and 12. *Am J Med Genet* 1997; 74: 247-253.
53. Saaverda JM. In: Trendelenburg U, Weiner N, eds. *Catecholamines II.* Berlin: Springer, 1989: 181-201.
54. Sabelli HC, Mosnaim AD. Phenylethylamine hypothesis of affective behaviour. *Am J Psychiatr* 1974; 131: 695-699.
55. Smith AL, Weissman MM. Epidemiology. In: Paykel ES, ed. *Handbook of affective disorders.* Edinburgh: Churchill Livingstone 1992; 111-129.
56. Spielman RS, McGinnis RE, Ewens WJ. The insulin gene region and insulin-dependent diabetes mellitus (IDDM). *Am J Hum Genet* 1993; 52: 506-516.
57. Strober M. Relevance of early age-of-onset in genetic studies of bipolar affective disorder. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* 1992; 31: 606-610.
58. Tallman JF, Saavedra JM, Axelrod J. Bioynthesis and metabolism of endogenous tyramine and its normal presence in sympathetic nerves. *J Pharmacol Exp Ther* 1976; 199: 216-221.
59. Usdin E, Sandler M. *Trace amines and the brain.* New York: Dekker, 1976: 21-40.

60. Vanti WB, Muglia P, Nguyen T, Cheng R, Kennedy JL, George SR, O'Dowd BF. Discovery of a null mutation in a trace amine receptor gene. *Genomics* 2003; 82: 531-536.
61. Vladimirov VI, Thiselton TL, Kuo P, Wormley B, Vittum J, Ribble R, O'Neill FA, Walsh D, Kendler K, Riley B. Trace amine receptor 4 (TRAR4) is associated with schizophrenia in the Irish study of density schizophrenia families. *Am J Med Genet* 2005; 138: 139

Die Befunde vorliegender Arbeit sind in folgende Publikation eingegangen:

Abou Jamra R, **Sircar I**, Becker T, Freudenberg-Hua Y, Ohlraun S, Freudenberg J, Brockschmidt F, Schulze TG, Gross M, Spira F, Deschner M, Schmal C, Maier W, Propping P, Rietschel M, Cichon S, Nöthen MM, Schumacher J. A family-based and case-control association study of trace amine receptor genes on chromosome 6q23 in bipolar affective disorder. *Mol Psychiatry* 2005; 10: 618-620.

Danksagung

Herrn Professor Dr. med. Peter Propping danke ich für die Überlassung des Themas und die Möglichkeit der Durchführung dieser Arbeit am Institut für Humangenetik.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. med. Johannes Schumacher für die engagierte Betreuung in allen Phasen der Dissertation und für das konstruktiv-kritische Korrekturlesen meiner Arbeit.

Allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Psychiatrische Genetik danke ich für ihre stetige Hilfsbereitschaft und für eine schöne Zeit im Labor.