

**Dem D-Serin-Pathway zugrunde liegende Gene und deren Bedeutung für die Bipolar
affektive Störung**

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

vorgelegt von Angela Wolf Villela, geb. Wolf
aus Bergisch-Gladbach

2008

Angefertigt mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

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

Tag der Mündlichen Prüfung: 09. September 2008

Aus dem Institut für Humangenetik des Universitätsklinikums Bonn
Direktor: Prof. Dr. med. P. Propping

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

Im Gedenken an meine Großeltern Else und Ludwig Wolf

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	8
2	THEORETISCHE GRUNDLAGEN	9
2.1	Bipolar affektive Störungen	9
2.1.1	Klinisches Erscheinungsbild, Einteilung und Epidemiologie.....	9
2.1.2	Empirisch-genetische Untersuchungen.....	10
2.1.3	Formalgenetischer Übertragungsmechanismus	13
2.2	Methoden zur Identifizierung von Krankheitsgenen.....	15
2.2.1	Kopplungsuntersuchungen.....	15
2.2.2	Assoziationsuntersuchungen.....	15
2.3	Molekulargenetische Befunde bei bipolar affektiven Störungen.....	18
2.3.1	Kopplungsbefunde	18
2.3.2	Assoziationsbefunde	19
2.4	Der D-Serin-/NMDA-Rezeptor-Pathway und dessen Bedeutung für psychiatrische Störungen	21
2.4.1	Identifizierung des Krankheitsgens DAOA bei schizophrenen Störungen.....	21
2.4.2	Identifizierung des Krankheitsgens DAOA bei bipolar affektiven Störungen	22
2.4.3	Der Zusammenhang von schizophrenen und bipolar affektiven Störungen	24
2.5	Pathophysiologische Konzepte bei bipolar affektiven Störungen	25
2.5.1	Zellbiologische Funktion der NMDA-Rezeptoren und des D-Serin-Stoffwechsels..	25
2.6	Kandidatengene für die bipolar affektive Störung.....	26
2.6.1	N-Methyl-D-Aspartate-Receptor Channel, Subunit 1 (GRIN1).....	27
2.6.2	N-Methyl-D-Aspartate-Receptor Channel, Subunit 2A (GRIN2A)	28
2.6.3	N-Methyl-D-Aspartate-Receptor Channel, Subunit 2B (GRIN2B).....	28
2.6.4	Phosphoserine Phosphatase (PSPH)	29
2.6.5	Glutamate/Neutral Amino Acid Transporter, Member 4 (SLC1A4/ASCT1).....	30
2.6.6	Neurotransmitter/Glycine Transporter, Member 5 (SLC6A5/GLYT2).....	30
2.6.7	Neurotransmitter/Glycine Transporter, Member 9 (SLC6A9/GLYT1).....	31
3	ZIELSETZUNG VORLIEGENDER ARBEIT	32
4	MATERIAL UND METHODEN.....	33
4.1	Untersuchungskollektiv.....	33

4.1.1	Personenerfassung.....	33
4.1.2	Beschreibung der Kollektive.....	33
4.2	Isolierung und Aufbereitung der humanen genomischen DNA.....	34
4.3	Synthetische Oligonukleotide	35
4.4	Untersuchungsgeräte	39
4.5	Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR).....	40
4.6	Elektrophorese auf dem Automatischen Sequencer.....	42
4.6.1	Prinzip	42
4.6.2	Herstellung des 4,25%igen Polyacrylamid-Gels.....	42
4.6.3	Elektrophorese.....	43
4.7	Bestimmung der Fragmentlängen	44
4.8	Analyse der Genotypen	44
4.9	Assoziationsanalyse	45
5	ERGEBNISSE	46
5.1	GRIN1	46
5.2	GRIN2A	47
5.3	GRIN2B	49
5.4	PSPH	51
5.5	SLC1A4.....	52
5.6	SLC6A5.....	53
5.7	SLC6A9.....	55
6	DISKUSSION	56
6.1	Assoziationsanalysen der einzelnen Kandidatengene.....	57
6.1.1	GRIN1	57
6.1.2	GRIN2A	57
6.1.3	GRIN2B	58
6.1.4	PSPH	59
6.1.5	SLC1A4.....	60
6.1.6	SLC6A5.....	61
6.1.7	SLC6A9.....	62
6.2	Zusammenfassende Beurteilung	62
6.3	Perspektiven	63

7	ZUSAMMENFASSUNG.....	65
8	LITERATURVERZEICHNIS.....	68
	DANKSAGUNG.....	89
	CURRICULUM VITAE	90

1 Einleitung

Bei der bipolar affektiven Störung handelt es sich um eine der am frühesten beschriebenen psychischen Erkrankungen. So schilderte schon Hippokrates 400 v. Chr. bei Patienten das gemeinsame Auftreten von Manie und Melancholie, die er aber noch als zwei verschiedene Erkrankungen betrachtete. Der Terminus „manisch-depressive Erkrankung“ wurde erst 1921 von dem deutschen Psychiater Emil Kraepelin eingeführt, der auch die schizophrenen und bipolar affektiven Störungen in zwei unterschiedliche Erkrankungen einteilte (Begriff der „Dichotomie“). Auch wenn sich die Definition und diagnostischen Kriterien der bipolar affektiven Störung weiterentwickelt haben, wird in jüngerer Zeit wieder diskutiert, ob bipolar affektive und schizophrene Störungen tatsächlich zwei unterschiedliche Krankheitsentitäten darstellen oder ob es sich um ein kontinuierliches Spektrum handelt, das sich von der unipolar affektiven Störung über die bipolare und schizoaffektive Störungen bis hin zu schizophrenen Störungen erstreckt (Möller 2003).

Die familiäre Belastung bipolar affektiver Störungen ist seit langem bekannt. Sie ist auf das Vorliegen von genetischen Dispositionsfaktoren zurückzuführen, bei denen es sich auch um die stärksten bislang erkannten prädisponierenden Faktoren handelt. Somit könnte die psychiatrische Genetik einen entscheidenden Beitrag zur Erforschung der Ursachen bipolar affektiver Störungen leisten. Da es sich um eine genetisch komplexe Erkrankung handelt, stellt sie die genetische Forschung allerdings vor eine große Herausforderung. Mit den Fortschritten der modernen Molekulargenetik ergeben sich jedoch immer mehr methodische Möglichkeiten zur Identifizierung der prädisponierenden Krankheitsgene.

2 Theoretische Grundlagen

2.1 Bipolar affektive Störungen

2.1.1 Klinisches Erscheinungsbild, Einteilung und Epidemiologie

Die bipolar affektiven Störungen zählen zu den affektiven Erkrankungen und sind durch das Alternieren von depressiven und (hypo-)manischen Episoden mit Intervallen ausgeglichener, normaler Stimmungslage gekennzeichnet (Laux 2003). Aufgrund des psychopathologischen Erscheinungsbildes sind bipolar affektive von unipolaren Störungen abzugrenzen, bei denen entweder nur depressive oder nur manische Phasen auftreten. In seltenen Fällen können depressive und manische Symptome gleichzeitig vorhanden sein (sog. gemischte Episode).

Typisch für eine depressive Episode sind die depressive Stimmung (gekennzeichnet durch Trauer und Verzweiflung) einhergehend mit Verlust von Interesse und Freude, Antriebshemmung oder ängstlicher Agitiertheit, ein reduziertes Energieniveau, außerdem Schlaf- und Konzentrationsstörungen, Appetitlosigkeit, Gefühle von Wertlosigkeit oder Schuld und Suizidgedanken. Charakteristika der Manie sind eine inadäquat gehobene Stimmung, Antriebssteigerung, psychomotorische Erregung, beschleunigtes Denken (Ideenflucht) und Selbstüberschätzung bis hin zu wahnhaften Größenideen.

Die klinische Einteilung der bipolar affektiven Störungen erfolgt nach den DSM-IV-Kriterien der American Psychiatric Association (1994). Nach diesen ergibt sich eine Unterteilung in

- *Bipolare I Störungen* (voll ausgebildete wechselnde Episoden von Depressionen und Manien)
- *Bipolare II Störungen* (depressive Störungen und lediglich hypomanische Episoden (milderer Verlauf))
- *Zyklothyme Störungen* (andauernde Instabilität der Stimmung mit zahlreich wechselnden Perioden leichtgradiger Depression und leicht gehobener Stimmung über mindestens zwei Jahre)
- *Nicht näher bezeichnete Störungen* (NNB, weisen keine Charakteristika der oben genannten Unterformen auf)

Epidemiologisch zählen die bipolar affektiven Störungen mit einem von Geschlecht, Kulturkreis und ethnischer Zugehörigkeit unabhängigen Lebenszeitrisiko von 0,5-1,5% zu den häufigen psychiatrischen Erkrankungen. Das Erstmanifestationsalter liegt typischerweise zwischen dem 15. und 30. Lebensjahr und im Mittel im 21. Lebensjahr (Weissman *et al* 1988).

Die medizinische und soziale Bedeutung bipolar affektiver Störungen ist in der hohen Rezidiv- und Mortalitätsrate begründet. So betrug die Rezidivrate in einer Studie 75% innerhalb von 5 Jahren (Faedda *et al* 1993). Angst *et al* (1998) konnten in einer Langzeitstudie eine deutlich erhöhte Mortalität bipolarer Patienten durch Suizid, Unfälle und kardiovaskuläre Erkrankungen nachweisen.

2.1.2 Empirisch-genetische Untersuchungen

Bei der Beurteilung, ob genetische Faktoren am Entstehungsprozess einer Erkrankung beteiligt sind, kommt Familienuntersuchungen eine besondere Bedeutung zu. Speziell durch Zwillingsuntersuchungen lassen sich hierbei die Erblichkeitsanteile abschätzen, wohingegen Adoptionsuntersuchungen den Ausschluss von Umweltfaktoren ermöglichen. Im Folgenden sind die Ergebnisse dieser formalgenetischen Untersuchungen kurz dargestellt.

2.1.2.1 Familienstudien

Schon der älteren psychiatrischen Forschung war eine familiäre Belastung bipolar affektiver Störungen bekannt (Tsuang und Faraone 1990). In den letzten 30 Jahren wurden dann insgesamt 21 Familienstudien unter Verwendung moderner Konzepte der Diagnostik und Epidemiologie durchgeführt. Die überwiegende Mehrheit der Familienstudien zeigte eine deutliche Erhöhung der Lebenszeitprävalenz für bipolare Störungen bei Angehörigen ersten Grades von Patienten mit bipolar affektiver Erkrankung (3-10%). Eine Meta-Analyse von Craddock und Jones (1999) ergab für Verwandte ersten Grades eines an einer bipolar affektiven Störung erkrankten Patienten ein relatives Risiko von 7 gegenüber der Allgemeinbevölkerung. Für die Morbiditätsrisiken von Verwandten zweiten Grades bipolar erkrankter Patienten liegen bisher keine zuverlässigen Daten vor. Das Risiko dürfte sich aber zwischen denen von Verwandten ersten Grades und denen der Allgemeinbevölkerung bewegen (Tabelle 1).

Den Familienstudien ließ sich zudem entnehmen, dass auch andere affektive Störungsformen gehäuft in den Familien der Indexfälle auftreten. So haben Verwandte ersten Grades von Patienten mit einer bipolaren Störung ein relatives Risiko von 2 im Vergleich zur

Allgemeinbevölkerung, an einer *unipolaren Depression* zu erkranken (Andrew *et al* 1998). Dabei ist das absolute Risiko, an einer unipolaren Störung zu erkranken, sogar höher als für eine bipolare Störung. Allerdings lässt sich dies auf die höhere Prävalenz unipolarer Depressionen gegenüber bipolaren Erkrankungen in der Allgemeinbevölkerung zurückführen (10% versus 1%). Dennoch schätzt man, dass zwei Drittel bis drei Viertel beider Störungsformen auf die gleichen genetischen Dispositionsfaktoren zurückzuführen sind (Blacker *et al* 1993).

Tabelle 1: Abstufung der Lebenszeitriskien für affektive Störungen (aus Craddock und Jones, 1999)

<i>Grad der Verwandtschaft zum bipolaren Probanden</i>	<i>Risiko für bipolar affektive Störung in %</i>	<i>Risiko für unipolare Depression in %</i>
Eineiiger Zwilling	40-70%	15-25%
Verwandter 1. Grades	5-10%	10-20%
Allgemeinbevölkerung	0,5-1,5%	5-10%

Auch für *schizoaffektive Störungen* kann eine Koaggregation mit der bipolar affektiven Störung als gesichert angesehen werden (Gershon *et al* 1982, Kendler *et al* 1986, Maier *et al* 1993). Entsprechend beobachteten Maier *et al* (1993) für einen Verwandten ersten Grades eines an einer schizoaffektiven Störung erkrankten Indexfalles auch eine Erhöhung des Risikos (8-23%), an einer bipolar affektiven Störung zu erkranken.

Doch nicht nur für affektive Störungsformen, sondern auch für andere psychiatrische Krankheiten gibt es Hinweise auf ein überzufällig häufiges Auftreten in Familien bipolar affektiv Erkrankter. Zudem wurden bipolar affektive Störungen gehäuft in Familien beobachtet, in denen der Indexpatient an einer anderen nicht-affektiven psychiatrischen Erkrankung litt. Im Einzelnen handelt es sich um:

- *Schizophrene Störungen:* Bisher liegen zwar keine überzeugenden Ergebnisse vor, die auf ein erhöhtes Vorkommen schizophrener Erkrankungen bei Angehörigen mit bipolar affektiven Störungen hinweisen, jedoch ergaben sich Anhalte für eine Kosegregation (gemeinsame Vererbung) zwischen unipolar depressiven und schizophrenen Störungen. Hierbei zeigten Verwandte von schizophrenen Probanden ein höheres Risiko, an

affektiven Störungen zu erkranken, als Verwandte von Kontrollen aus der Allgemeinbevölkerung (Erlenmeyer-Kimling *et al* 1997, Gershon *et al* 1988, Maier *et al* 1993, Taylor 1992). Da ein solcher Zusammenhang für bipolar affektive Erkrankungen aufgrund der geringeren Prävalenz im Vergleich zu unipolaren Störungen statistisch erschwert nachweisbar ist, werden deutlich größere Datensätze zur Klärung dieser Frage notwendig sein. Weitere Studien zeigen ein erhöhtes Vorkommen von affektiven Störungen bei so genannten obligaten Carriern (Verwandte von Schizophrenen, die aufgrund ihrer Position im Stammbaum zwischen zwei Erkrankten vermutlich einen genetischen Risikofaktor für schizophrene Störungen tragen), was auf gemeinsame genetische Risikofaktoren für schizophrene und affektive Störungen bei Verwandten von Schizophrenen hinweist (Maier *et al* 1999).

- *Panik-Störungen*: Es gibt Hinweise darauf, dass in Familien mit hoher Belastung an Panik-Störungen unipolar depressive und bipolar affektive Störungen häufiger vorkommen als in der Allgemeinbevölkerung (Birmaher *et al* 2002, Hudson *et al* 2003).

2.1.2.2 Zwillingsstudien

Auch Zwillingsstudien belegen, dass die Entstehung bipolar affektiver Störungen von genetischen Faktoren mitbestimmt wird (Propping 1989). Insgesamt zeigten sich in acht Zwillingsuntersuchungen, die unter Differenzierung bipolarer und unipolarer Verlaufsformen durchgeführt wurden, deutlich höhere Konkordanzraten für die bipolar affektive Störung bei monozygoten im Vergleich zu dizygoten Zwillingen (Allen *et al* 1974, Bertelsen *et al* 1977, Cardno *et al* 1999, Kendler *et al* 1993, Kieseppa *et al* 2004, Kringlen 1967, McGuffin *et al* 2003, Torgersen 1986). Die von Craddock und Jones (1999) ermittelten Lebenszeitriskien eineiiger Zwillinge, die auf den ersten sechs der genannten Zwillingsstudien basieren, sind in Tabelle 1 dargestellt. In der dänischen Studie von Bertelsen *et al* (1977), die hinsichtlich Fallzahl und Methodik sehr aussagekräftig ist, erwiesen sich 62% der eineiigen Zwillingspaare als konkordant betroffen gegenüber 8% bei zweieiigen Zwillingspaaren. Darüber hinaus konnten die Autoren belegen, dass sich durch Einbeziehen unipolar depressiver Verlaufsformen in den Betroffenenstatus die Beteiligung genetischer Komponenten ebenfalls erfassen ließ (Konkordanz von 79% bei monozygoten und 19% bei dizygoten Zwillingspaaren). Durch die bislang größte Zwillingsuntersuchung (McGuffin *et al* 2003) konnten diese Ergebnisse bestätigt werden. Hierbei ergaben sich Konkordanzraten von 40% bei monozygoten Zwillingspaaren gegenüber 5,4% bei

dizygoten Zwillingspaaren, während die Konkordanzraten unter Einbeziehen von unipolaren Verlaufsformen in den Betroffenenstatus 67% bei monozygoten und 19% bei dizygoten Zwillingen betragen.

Die neueste Zwillingsstudie (Kieseppa *et al* 2004) an einem finnischen Kollektiv mit Patienten, die an einer Bipolaren I Störung erkrankt waren, ergab übereinstimmende Ergebnisse. Die Autoren erhielten Konkordanzraten von 43% bei monozygoten und 6% bei dizygoten Zwillingspaaren. Unipolare Verlaufsformen wurden in diese Studie nicht miteinbezogen.

Bei allen Untersuchungen zeigte sich jedoch auch, dass nichtgenetischen Faktoren eine große Bedeutung bei der Entstehung von bipolar affektiven Störungen zukommt; dies belegt die unvollständige Konkordanz eineiiger Zwillingspaare.

2.1.2.3 Adoptionsstudien

In den letzten Jahrzehnten wurden nur zwei Adoptionsstudien durchgeführt, von denen keine besonders groß war (Mendlewicz und Rainer 1977, Wender *et al* 1986). Beide Studien zeigten, dass das Erkrankungsrisiko für bipolar affektive Störungen bei biologischen Verwandten von Probanden mit bipolarer Störung größer ist als bei Adoptiv-Verwandten, und wiesen damit ebenfalls auf eine Beteiligung genetischer Faktoren bei der bipolar affektiven Störung hin. Die größere Studie von Mendlewicz und Rainer (1977) untersuchte die biologischen und die Adoptiv-Eltern von 29 bipolar affektiv Erkrankten und 22 gesunden Probanden; außerdem die biologischen Eltern von 32 nicht-adoptierten bipolaren Patienten. Es ergab sich ein signifikant höheres Risiko für eine affektive Störung bei den biologischen Eltern der bipolar affektiv Erkrankten (18% gegenüber 7% bei den Adoptiv-Eltern).

2.1.3 Formalgenetischer Übertragungsmechanismus

Es muss angenommen werden, dass bipolar affektive Störungen einem genetisch komplexen Erbgang unterliegen. Dabei wird von mehreren Genvarianten bzw. Genveränderungen ausgegangen, die der Erkrankung zu Grunde liegen, wobei das Gewicht der einzelnen Genvarianten unterschiedlich sein dürfte. In unterschiedlicher und individueller Kombination sowie in Wechselwirkung (Epistase) tragen sie zur Krankheitsdisposition bei (Craddock *et al* 1995). Das klinische Erscheinungsbild dürfte hierbei als Endzustand aufzufassen sein, zu dem auch nicht-genetische Faktoren beigetragen haben (multifaktorielles Übertragungsmodell) (Propping 1989).

Ausgehend von einem komplex genetischen Übertragungsmodus werden hinsichtlich der disponierenden genetischen Faktoren gegenwärtig zwei Modelle diskutiert: Beim oligogenen Modell geht man von einer relativ geringen Anzahl an Dispositionsgenen mit jeweils starkem Krankheitseffekt aus, während beim polygenen Modell eine Vielzahl von Genveränderungen mit jeweils geringem Einfluss angenommen wird. Bei letztgenanntem Modell müssten die jeweiligen Genvarianten in der Bevölkerung sehr häufig sein, sonst könnte man die empirischen Wiederholungsziffern unter den Verwandten ersten Grades (5-10%) nicht erklären. Das oligogene Modell wird im Allgemeinen deshalb favorisiert, weil es eher mit dem hohen Erkrankungsrisiko bei Verwandten ersten Grades im Vergleich zur Allgemeinbevölkerung vereinbar ist.

Zudem wird vermutet, dass die einzelnen Dispositionsgene in verschiedenen Populationen einen unterschiedlich starken Einfluss haben (populations-spezifischer Effekt). Außerdem könnten den verschiedenen phänotypischen Dimensionen bipolar affektiver Störungen unterschiedliche Gene zu Grunde liegen. Die Segregationsanalysen aus jüngster Zeit weisen auch auf unterschiedliche Krankheitsmechanismen in Abhängigkeit vom Ersterkrankungsalter hin. Unter anderem ließ sich in einer Studie von Grigoriou-Serbanescu *et al* (2001) bei Familien mit frühem Erstmanifestationsalter (≤ 25 Jahre) ein Hauptgeneffekt nachweisen, d.h. eine Genwirkung, die an einen beinahe autosomal-dominanten Erbgang denken lässt. Bei höherem Erkrankungsalter (≥ 25 Jahre) war die Familiarität hingegen eher mit einem polygenen Modell vereinbar. Zusätzlich konnte in dieser wie auch in anderen Studien gezeigt werden, dass Verwandte von Probanden mit *early-onset* ein höheres Risiko für affektive Störungen tragen (Rice *et al* 1987, Strober *et al* 1988, Weissman *et al* 1988). Theoretisch ist es auch denkbar, dass das Risiko für eine bipolar affektive Störung vom Geschlecht des übertragenden Elternteils abhängt. So konnten zwei Studien eine Abhängigkeit des Ausmaßes familiärer Häufung affektiver Störungen vom Geschlecht des übertragenden Elternteils nachweisen (Gershon *et al* 1996, McMahon *et al* 1995). Die Autoren vermuten, dass in ihren untersuchten Kollektiven eine maternale Transmission vorliegt.

Abschließend muss festgehalten werden, dass – abgesehen davon, dass den meisten bipolar affektiven Störungen ein genetisch komplexer Erbgang zu Grunde liegt – die genauen genetischen Übertragungsmechanismen noch unklar sind. Erst wenn das Segregationsmuster identifizierter Krankheitsvarianten in Familien beobachtbar sein wird, können oben genannte Hypothesen überprüft werden.

2.2 Methoden zur Identifizierung von Krankheitsgenen

Derzeit werden zwei molekulargenetische Methoden favorisiert, um Dispositionsgene bei genetisch komplexen Erkrankungen zu identifizieren. Es handelt sich um Kopplungs- und Assoziationsuntersuchungen.

2.2.1 Kopplungsuntersuchungen

Kopplungsanalysen ermöglichen die Identifikation von Genorten, in denen Dispositionsgene vermutet werden müssen. Sofern sie genomweit durchgeführt werden, bezeichnet man sie als Genome-Scans. Bei diesen Untersuchungen ist es nicht notwendig, Hypothesen über die Pathophysiologie einer Erkrankung zu Grunde zu legen.

Ziel ist es, innerhalb von Familienstammbäumen die gemeinsame Vererbung (Kosegregation) zwischen einem polymorphen genetischen Marker, dessen genomische Lokalisation bekannt ist, und einem bestimmten Krankheitsphänotyp nachzuweisen. Werden der Marker und der Phänotyp überzufällig häufig gemeinsam vererbt, so liegt Kopplung vor. Das Prinzip der Kopplungsuntersuchungen beruht auf Rekombinationsereignissen (*crossing over*) in der Meiose. Je geringer die genetische Distanz zwischen Marker und Krankheitsgen ist, desto größer ist die Wahrscheinlichkeit, dass sie gemeinsam vererbt und nicht durch ein Rekombinationsereignis getrennt werden. Positive Kopplungsbefunde geben also Hinweise auf die chromosomale Lage eines potentiellen Krankheitsgens. Eine Aussage über das Krankheitsgen selbst ist jedoch nicht möglich.

2.2.2 Assoziationsuntersuchungen

2.2.2.1 Prinzip von Assoziationsuntersuchungen

Unter Assoziation versteht man allgemein das überzufällig häufige Vorkommen eines Risikofaktors in einem Patientenkollektiv.

Ziel ist es, das überzufällig häufige Auftreten eines Risikofaktors, wie zum Beispiel einer bestimmten DNA-Sequenzvariante, in einem Patientenkollektiv durch Vergleich mit einem Kollektiv gesunder Kontrollpersonen nachzuweisen. Bei molekulargenetischen Assoziationsuntersuchungen finden als Varianten vor allem *Single Nucleotide Polymorphisms* (SNPs) Verwendung. Es handelt sich hierbei um durch einfache Basenpaarsubstitutionen

gekennzeichnete biallelische Polymorphismen, die im menschlichen Genom sehr häufig vertreten sind. Sie können sowohl in kodierenden als auch in nicht-kodierenden Bereichen vorkommen. Aber auch Mikrosatelliten- bzw. *Short-Tandem-Repeat-* (STR-) Marker – dies sind kurze, repetitive Nukleotidsequenzen – werden für Assoziationsanalysen verwendet.

Der Grad der Assoziation zwischen einem Allel und einer Krankheit wird als „relatives Risiko“ (RR) ausgedrückt. Es trifft eine Aussage darüber, wie viel mal wahrscheinlicher eine bestimmte Krankheit bei Trägern des Risikoallels auftritt als bei Personen, die das Risikoallel nicht tragen. Unter bestimmten Voraussetzungen (geringe Frequenz der Krankheit in der Allgemeinbevölkerung) lässt sich das relative Risiko mittels Berechnung der „*odds ratio*“ (OR) abschätzen:

$$OR = a \cdot b / c \cdot d$$

a = Anzahl erkrankter Allelträger

b = Anzahl gesunder Allelnichtträger

c = Anzahl erkrankter Allelnichtträger

d = Anzahl gesunder Allelträger

Um die Bedeutung eines Allels für die Krankheitshäufigkeit in der Allgemeinbevölkerung abzuschätzen, wurde die „ätiologische Fraktion“ eingeführt (Khoury *et al* 1993). Sie gibt den Anteil der Krankheitsfälle in der Bevölkerung an, den es ohne das assoziierte Allel nicht gäbe. Eine Formel zur Berechnung der ätiologischen Fraktion lautet:

$$\text{ÄF} = f(OR-1) / [1+f(OR-1)]$$

Dabei entspricht f der Häufigkeit des Allels in der Population insgesamt.

Liegt eine Assoziation zwischen einem Allel und einer Erkrankung vor, so können prinzipiell drei Mechanismen dazu geführt haben:

(1) Die Variante selbst trägt funktionell zum Beispiel durch eine Veränderung der Aminosäuresequenz des Genproduktes oder eine veränderte Genexpression zum Krankheitsgeschehen bei.

(2) Die Variante ist nicht selbst funktionell wirksam, liegt aber genomisch in so großer Nähe zu einer an der Erkrankung beteiligten Variante, dass beide in der Evolution nicht durch Rekombinationsereignisse getrennt wurden. Es liegt dann ein so genanntes Kopplungsungleichgewicht vor. Dieses entsteht, wenn eine Mutation, die bei einer

erstbetroffenen Person entsteht, über Generationen hinweg zusammen mit der in der Nähe liegenden Variante vererbt wird (so genannter „Gründereffekt“). Es bleibt in der Evolution jedoch nur erhalten, wenn keine häufigen Rekombinationen zwischen den beiden Genorten stattgefunden haben, nicht wiederholt die gleiche Mutation bei unabhängigen Personen aufgetreten und den Trägern der Mutation kein Selektionsnachteil entstanden ist. In den letzten Jahren wurden in Untersuchungen zum Organisationsprinzip des Kopplungsungleichgewichts im menschlichen Genom Hinweise auf eine Blockstruktur gefunden. Hierbei liegen ausgedehntere genomische Bereiche hintereinander vor, in denen nahezu keine Rekombinationsereignisse stattgefunden haben, und werden durch so genannte Hotspots von Rekombinationen getrennt (Freudenberg *et al* 2002). Zwischen den genomischen Regionen variiert dabei der Ausprägungsgrad des Kopplungsungleichgewichts und damit die Distanz, über die sie sich erstrecken. In der europäischen Population fanden Ardlie *et al* (2002) eine durchschnittliche Distanz eines Kopplungsungleichgewichtes von durchschnittlich 10-30 kb. Je nach genomischer Region kann sich aber ein Kopplungsungleichgewicht auch über sehr viel größere Distanzen erstrecken (Abecasis *et al* 2001, Reich *et al* 2001).

(3) Die Assoziation zwischen einem Allel und einer Erkrankung kann auch durch zufällige Unterschiede in der Allelfrequenz zwischen der Patienten- und der Kontrollstichprobe zustande gekommen sein. Man spricht dann von einem Fehler 1. Art bzw. von einem falsch positiven Befund. Hierin liegt die Ursache, weshalb Replikationsuntersuchungen an unabhängigen Kollektiven bei molekulargenetischen Assoziationsuntersuchungen eine große Bedeutung zukommt.

2.2.2.2 Positionelle und funktionelle Assoziationsuntersuchungen

Bei molekularen Assoziationsuntersuchungen kann man einen positionellen und einen funktionellen Ansatz unterscheiden. Bei positionellen Assoziationsanalysen untersucht man systematisch in zuvor identifizierten chromosomalen Kopplungsregionen nach Assoziation. Hypothesen zur zellulären Funktion von möglichen Krankheitsgenen sind hierbei nicht Voraussetzung. Im Gegensatz dazu werden bei funktionellen Assoziationsanalysen Hypothesen zur zellulären Funktion des putativen Kandidatengens beziehungsweise zur Pathophysiologie der Erkrankung zu Grunde gelegt. Dabei werden Kandidatengene untersucht, von denen man annimmt, dass sie pathophysiologisch einen Beitrag zur Krankheitsentstehung leisten könnten. Beide Ansätze können aber auch kombiniert werden, indem man unter funktionellen

Gesichtspunkten bestimmte Kandidatengene in zuvor identifizierten Kopplungsregionen untersucht.

2.2.2.3 Fall-Kontroll- und Familienbasierte Assoziationsuntersuchungen

Alternativ zu den klassischen Fall-Kontroll-Assoziationsanalysen können Familienbasierte Assoziationsanalysen durchgeführt werden. Dabei werden nicht Kollektive nicht-verwandter Patienten und gesunder Kontrollen, sondern Erkrankte und deren Eltern (so genannte „Trios“) untersucht. Hierbei betrachtet man, ob bei Vorliegen von Heterozygotie bei einem Elternteil ein bestimmtes Allel einer genetischen Variante häufiger als nach zufälliger Mendelscher Vererbung zu erwarten an erkrankte Kinder weitergegeben wird. In einem solchen Fall liegt eine Assoziation zwischen einem Markerallel und der Erkrankung vor. Dabei spielt der Phänotyp der Eltern keine Rolle. Ein diesbezüglich häufig angewendeter statistischer Test ist der *Transmission Disequilibrium Test (TDT)*, Spielman *et al* 1993). Ein entscheidender Vorteil der Familienbasierten gegenüber den Fall-Kontroll-Assoziationsuntersuchung ist das Vermeiden falsch-positiver Assoziationsergebnisse auf Grund von genetischen Unterschieden zwischen dem Patienten- und dem Kontroll-Kollektiv, die zum Beispiel durch ethnische Unterschiede der Kollektive entstehen können. Vorteile der Fall-Kontroll-Assoziationsstudien sind demgegenüber die einfachere Rekrutierung der Probanden und die kostengünstigere Genotypisierung.

2.3 Molekulargenetische Befunde bei bipolar affektiven Störungen

2.3.1 Kopplungsbefunde

In den letzten Jahren wurde eine Vielzahl von Kopplungsanalysen durchgeführt. Insgesamt sind zum gegenwärtigen Zeitpunkt mehr als 20 genomweite Kopplungsuntersuchungen an Familienkollektiven mit bipolar affektiver Störung abgeschlossen. Weitere Arbeitsgruppen haben Teile ihrer noch nicht abgeschlossenen Studien publiziert. Für folgende chromosomale Regionen wurden dabei stark replizierte Kopplungsbefunde bei bipolar affektiven Störungen erhoben und bei unabhängigen Untersuchungen bestätigt: 4p16, 6q23-q24, 8p21, 10q25-q26, 12q23-q24, 13q32-q33, 18p11-q11 und 22q12-q13. Hier ist die Wahrscheinlichkeit groß, krankheitsprädisponierende Gene identifizieren zu können (u. a. Badner und Gershon 2002, Craddock *et al* 2005).

2.3.2 Assoziationsbefunde

In den letzten Jahren wurde eine große Anzahl an Assoziationsanalysen bei bipolar affektiven Störungen durchgeführt, die zumeist keine positiven Ergebnisse erbrachten. Zum Teil fanden sich jedoch positive Assoziationsbefunde (Übersicht in Craddock *et al* 2005, Maier *et al* 2003), die nachfolgend kurz dargestellt werden sollen:

(1) *Serotonin-Transporter-Gen (5-HTT oder SLC6A4)*: Dieses auf Chromosom 17q11-q12 liegende Gen kodiert für den Serotonin-Transporter, der von Interesse ist, da er der pharmakologische Angriffspunkt selektiver Serotonin-Reuptake-Hemmer (SSRI) ist. Bisher wurden zwei funktionelle Genvarianten beschrieben, ein Mikrosatellitenmarker (*5-HTTVNTR*) im Intron 2 und ein SNP im Promotor des Gens (*5-HTTLPR*). Für beide Varianten wurden sowohl positive als auch negative Assoziationen gefunden. Eine Metaanalyse von 11 durchgeführten Assoziationsanalysen (1288 bipolar affektive Patienten versus 2163 Kontrollprobanden) ergab für beide Varianten keine signifikante Assoziation (Craddock *et al* 2001). Jedoch zeigten sich in dem britischen Subkollektiv (685 bipolar affektive Patienten versus 936 Kontrollprobanden) Hinweise auf eine Assoziation. Die Befunde könnten darauf hin deuten, dass das *5-HTT*-Gen nur einen geringen Krankheitseffekt besitzt und nur in bestimmten ethnischen Populationen von Bedeutung ist. In einer Fall-Kontroll-Studie an 96 Frauen mit bipolar affektiver Störung, deren Krankheitsverlauf durch eine puerperale Psychose gekennzeichnet war, zeigten sich zudem signifikante Assoziationsergebnisse für den *5-HTTVNTR*. Dies könnte den Schluss zulassen, dass diese Variante speziellen Subgruppen bipolar affektiver Störungen zu Grunde liegt (Coyle *et al* 2000). Die neueste Metaanalyse von Lasky-Su *et al* (2005), die für den *5-HTTVNTR* 11 Studien (2713 bipolar affektive Patienten versus 4578 Kontrollprobanden) und für den *5-HTTLPR* 15 Studien (5540 bipolar affektive Patienten versus 7260 Kontrollprobanden) analysierten, ergab für den *5-HTTVNTR*-Polymorphismus keine signifikante Assoziation, während die *5-HTTLPR*-Variante eine zwar geringe, aber positive Assoziation zur bipolar affektiven Störung zeigte. Das könnte bedeuten, dass diese Variante mit relativ geringer Effektstärke zur Disposition der bipolar affektiven Störung beiträgt. Insgesamt sind die Ergebnisse jedoch uneinheitlich, so dass derzeit keine definitive Aussage darüber gemacht werden kann, ob dem *5-HTT*-Gen eine Bedeutung an der Krankheitsentstehung zukommt.

(2) *Catechol-O-Methyl-Transferase-Gen (COMT)*: Das *COMT*-Gen liegt auf der chromosomalen Region 22q11, einer Region, die durch das Velokardiofaziale Syndrom für psychiatrische

Erkrankungen und durch Kopplungsbefunde für affektive und schizophrene Erkrankungen von Bedeutung ist. Beim Velokardiofazialen Syndrom handelt es sich um ein Mikrodeletionssyndrom, das den chromosomalen Abschnitt 22q11 betrifft. Neben einer Vielzahl von Symptomen ist bekannt, dass Betroffene mit einem Velokardiofazialen Syndrom gehäuft an psychiatrischen Krankheiten leiden. Funktionell ist *COMT* an der enzymatischen Metabolisierung von Neurotransmittern wie Dopamin, Adrenalin und Epinephrin beteiligt, wobei verschiedene genetische Varianten die Enzymaktivität unterschiedlich beeinflussen. Hierbei konnte ein funktioneller SNP beschrieben werden, für den sich in einer Metaanalyse (916 bipolar affektive Patienten versus 1069 Kontrollprobanden) eine schwache, aber signifikante Assoziation zur bipolar affektiven Erkrankung ergab (Jones und Craddock 2001). Das assoziierte Allel bewirkt eine verminderte Enzymaktivität. Jedoch muss man auch hier davon ausgehen, dass von *COMT* ein nur geringer Krankheitseffekt ausgeht. Dabei scheint die Assoziation beim *rapid cycling*, einer Subgruppe bipolar affektiver Störungen, offenbar stärker ausgeprägt zu sein.

(3) *Monoaminoxidase-A-Gen (MAO-A)*: Auch dieses Gen kodiert für ein Dopamin und Serotonin abbauendes Enzym, das auch pharmakologischer Angriffsort der *MAO*-Hemmer ist. Es liegt auf der chromosomalen Region Xp11. Für eine nichtexprimierte Variante des *MAO-A*-Gens liegen mehrere Replikationen, aber auch Nicht-Replikationen vor. Eine Studie und Metaanalyse von Preisig *et al* (2000) an einem französisch-schweizerischen Kollektiv ergab eine Assoziation für den Mikrosatellitenmarker *MAOA-CA* mit weiblichen bipolar affektiven Patientinnen. Ebenso wie beim *5-HTT*- und beim *COMT*-Gen müssen auch hier weiterführende Untersuchungen klären, inwieweit tatsächlich von einem Beitrag des *MAO-A*-Gens am Entstehungsprozess bipolar affektiver Störungen auszugehen ist.

(4) *Brain-Derived-Neurotropic-Factor-Gen (BDNF)*: *BDNF* gehört zur Familie der Neurotrophine und spielt eine wichtige Rolle beim Wachstum, der Entwicklung und dem Überleben von neuronalen Populationen. Außerdem ist *BDNF* von Bedeutung bei der Aktivitäts-abhängigen neuronalen Formbarkeit. Es liegt in der chromosomalen Region 11p14. Bisher wurde maßgeblich ein SNP (Val66Met) untersucht, dem allerdings eine funktionell relevante Bedeutung zukommen könnte. Drei Familienbasierte Assoziationsstudien berichteten über positive Ergebnisse mit dem Val66Met-SNP, wobei eine an einem kleinen Kollektiv bipolar affektiver Patienten mit frühem Ersterkrankungsalter durchgeführt wurde (Geller *et al* 2004, Neves-Pereira *et al* 2002, Sklar *et al* 2002). Weiterhin gibt es bisher vier Fall-Kontroll-Assoziationsstudien, die

keine signifikante Assoziation dieses SNPs mit der bipolar affektiven Störung nachweisen konnten (Hong *et al* 2003, Nakata *et al* 2003, Oswald *et al* 2004, Skibinska *et al* 2004). Die Ergebnisse sind gegenwärtig noch uneinheitlich. Um die Bedeutung von *BDNF* als prädisponierenden Faktor für die bipolar affektive Störung zu erfassen, müssen noch weitere Studien mit mehr Polymorphismen an unabhängigen Kollektiven durchgeführt werden (Craddock *et al* 2005).

(5) *D-Amino-Acid-Oxidase-Activator-Gen (DAOA, früher G72/G30)*: Die Untersuchungen zu diesem Gen sind im anschließenden Abschnitt ausführlich dargestellt; sie bilden die Grundlage für die in vorliegender Arbeit durchgeführten Assoziationsuntersuchungen an ausgewählten Kandidatengen, deren Genprodukte innerhalb des *DAOA/DAAO*-Pathways wirksam sind.

2.4 Der D-Serin-/NMDA-Rezeptor-Pathway und dessen Bedeutung für psychiatrische Störungen

2.4.1 Identifizierung des Krankheitsgens DAOA bei schizophrenen Störungen

In 2002 fanden Chumakov *et al* (2002) ein Kandidatengen für die schizophrene Störung, es handelt sich um das *DAOA*-Gen. Von Kopplungsbefunden ausgehend, die durch mehrere Studien beschrieben waren, untersuchten sie 191 SNPs in der Kopplungsregion 13q33. Dabei wurde ein französisch-kanadisches Kollektiv mit 213 schizophrenen Patienten und 241 Kontroll-Probanden den Untersuchungen zugrunde gelegt. In zwei Regionen, Bin A und Bin B, erhielten sie positive Assoziationshinweise. Zwei Varianten in der Region Bin A zeigten auch in einem russischen Kollektiv mit 183 Fällen und 183 Kontrollen Assoziation zu schizophrenen Störungen. Anschließend wurde Bin A mittels bioinformatischer Methoden auf potentielle Gene hin untersucht. Es fanden sich Hinweise auf zwei überlappende Gene, *DAOA* und *G30*, wobei *DAOA* komplett innerhalb von *G30* liegt. Mittels *yeast-two-hybrid-system* konnten Chumakov *et al* (2002) daraufhin nachweisen, dass das Protein, für das *DAOA* kodiert, mit dem Enzym *D-Amino-Acid-Oxidase (DAAO)* interagiert. *DAAO* spielt im Stoffwechsel von D-Serin eine wichtige Rolle, indem es D-Serin durch Oxidation abbaut. D-Serin ist ein Agonist an der Glyzin-bindenden Untereinheit von NMDA-Rezeptoren, die im ZNS an der glutamatergen Neurotransmission beteiligt sind. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass das *DAOA*-Protein die *D-Amino-Acid-*

Oxidase aktiviert. Die Ergebnisse weisen somit auf eine Beteiligung von *DAOA* an der Regulation von NMDA-Rezeptoren bzw. an der glutamatergen Neurotransmission hin. Die Untersuchungen legen Vermutungen nahe, wonach eine *DAOA*-Überproduktion zu einer verminderten NMDA-Rezeptor-Aktivität führen könnte, was als Entstehungsmechanismus von schizophrenen Störungen zuvor bereits diskutiert wurde. Chumakov *et al* (2002) untersuchten auch das *DAAO*-Gen, das auf Chromosom 12q24 liegt, auf Assoziation mit schizophrenen Störungen. Sie genotypisierten acht SNPs in dieser Region im französisch-kanadischen Kollektiv. Vier davon zeigten eine signifikante Assoziation. Die Ergebnisse wurden durch unabhängige Untersuchungen repliziert. Unter anderem sind hier vier Studien zu nennen, die alle die Assoziation von *DAOA* mit schizophrenen Störungen bestätigen konnten. Addington *et al* (2004) untersuchten in ihrer Studie bei 98 Probanden, von denen 71 an schizophrenen Störungen und 27 an einer nicht-spezifisierten Psychose litten, genetische Varianten in *DAOA* und *G30* und konnten eine signifikante Assoziation zum Krankheitsstatus finden. Die Assoziationsuntersuchungen von SNPs im *DAAO*-Gen erbrachten jedoch keine signifikanten Ergebnisse. Wang *et al* (2004) untersuchten in einem chinesischen Kollektiv von 537 schizophrenen Patienten und 538 Kontrollen sechs SNPs am *DAOA*-/*G30*-Locus auf Assoziation. Auch sie konnten die Ergebnisse von Chumakov *et al* (2002) signifikant bestätigen. Zudem replizierten Korostishevsky *et al* (2004) die Assoziation am *DAOA*-/*G30*-Locus mit schizophrenen Störungen an 60 Patienten und 130 Kontrollen. Die Ergebnisse der Studie von Schumacher *et al* (2004) werden in Kapitel 2.4.2 ausführlich dargestellt.

Zusammengefasst weisen diese Studien einheitlich darauf hin, dass *DAOA* am Entstehungsprozess der schizophrenen Störungen beteiligt ist.

2.4.2 Identifizierung des Krankheitsgens *DAOA* bei bipolar affektiven Störungen

Unter der Hypothese einer überlappenden genetischen Disposition zwischen schizophrenen und bipolar affektiven Störungen wurden nach Identifikation der *DAOA*- und *DAAO*-Gene bei schizophrenen Störungen (siehe Kapitel 2.4.1) Assoziationsuntersuchungen an beiden Loci bei bipolar affektiven Störungen durchgeführt. Beide von Chumakov *et al* (2002) beschriebenen Schizophrenie-relevanten Gene liegen auch in Regionen, für die zuvor Kopplung mit der bipolar affektiven Störung beschrieben wurde: 13q32-q33 (Badner und Gershon 2002, Detera-Wadleigh

et al 1999, Kelsoe *et al* 2001, Stine *et al* 1997) und 12q24 (Dawson *et al* 1995, Ewald *et al* 1998, Morissette *et al* 1999). Im Einzelnen handelt es sich um folgende Untersuchungen:

Hattori *et al* (2003) führten eine Familienbasierte Assoziationsstudie an zwei verschiedenen Kollektiven durch (CNG: 83 Individuen aus 22 Familien, NIMH: 474 Individuen aus 152 Familien), wobei ein Kollektiv (CNG) zuvor starke Kopplungshinweise auf Chromosom 13q32-q33 gezeigt hatte. Im CNG-Kollektiv wurden insgesamt 16 SNPs am *DAOA*-Lokus untersucht, wovon fünf eine signifikante Assoziation zeigten. Die im NIMH-Kollektiv untersuchten SNPs ergaben keine signifikanten Assoziationen, allerdings wurde der Risikoassoziierte Haplotyp des CNG-Kollektivs auch in diesem Kollektiv signifikant häufiger an erkrankte Indexfälle weitergegeben.

In einer Fall-Kontroll-Studie mit 139 bipolaren Patienten und 113 Kontroll-Probanden konnten Chen *et al* (2004) die Ergebnisse replizieren. Zwei von sechs untersuchten SNPs im Bereich des *DAOA*-Lokus zeigten signifikante Assoziationshinweise mit der bipolar affektiven Störung. Auch die Haplotyp-Analyse unterstützte die positiven Assoziationsergebnisse.

Green *et al* (2004) führten eine Fall-Kontroll-Studie mit 675 bipolaren Patienten und 1349 Kontrollen durch. Sie replizierten die Assoziationsergebnisse. Drei von 10 SNPs am *DAOA*-Lokus und acht SNPs im *DAAO*-Lokus waren signifikant assoziiert. Auch die Haplotyp-Analysen ergaben signifikante Assoziationshinweise.

Schumacher *et al* (2004) untersuchten sieben SNPs am *DAOA*-Lokus und drei SNPs am *DAAO*-Lokus an 300 bipolaren, 299 schizophrenen Patienten und 300 Kontroll-Probanden. Vier SNPs am *DAOA*-Lokus ergaben signifikante Assoziationshinweise zu schizophrenen Störungen und ein SNP zu bipolar affektiven Störungen. Am *DAAO*-Lokus waren drei SNPs zu schizophrenen Störungen und keiner zur bipolar affektiven Störung assoziiert. Durch die Haplotyp-Analysen verstärkten sich die jeweiligen Ergebnisse der Einzelmarker-Analysen.

Zusammenfassend deuten die Ergebnisse darauf hin, dass die genetische Variabilität am *DAOA*-Lokus zur Entstehung bipolar affektiver Störungen beiträgt. Zudem scheint *DAOA* wahrscheinlich über den gleichen pathophysiologischen Pathway zum Risiko schizophrener Störungen beizutragen. Auch eine Meta-Analyse (Detera-Wadleigh und McMahon 2006), der drei der oben genannten Studien zu Grunde liegen, bestätigt die Annahme, dass Marker im Bereich des *DAOA*-Lokus eine signifikante Assoziation zur bipolar affektiven Störung aufweisen.

2.4.3 Der Zusammenhang von schizophrenen und bipolar affektiven Störungen

Obwohl schizophrene und bipolar affektive Störungen nosologisch zwei getrennte Erkrankungsentitäten sind, gibt es Konzepte, die ein psychiatrisches Kontinuum von unipolaren über bipolar affektive und schizoaffektive Störungen bis hin zu schizophrenen Psychosen postulieren. Die Gründe, Gemeinsamkeiten zwischen bipolar affektiven und schizophrenen Störungen zu vermuten, sind vielfältig und werden nachfolgend kurz dargestellt (Übersicht in Berrettini 2000, Maier *et al* 1999):

(1) *Formalgenetische Untersuchungsbefunde*: Wie bereits erwähnt, gibt es zahlreiche Hinweise auf eine familiäre (genetische) Koaggregation von unipolar affektiven und schizophrenen Störungen (Erlenmeyer-Kimling *et al* 1997, Gershon *et al* 1988, Maier *et al* 1993, Taylor 1992). Auf der anderen Seite scheinen genetische Dispositionsformen gleichzeitig an der Entstehung von unipolar und bipolar affektiven Störungen beteiligt zu sein. Daher wird vermutet, dass auch bipolar affektive und schizophrene Störungen gehäuft gemeinsam in belasteten Familien auftreten bzw. dass gleiche genetische Dispositionsfaktoren existieren. Dabei scheinen aber die Prävalenzraten von bipolaren Störungen zu gering zu sein, um die familiäre Koaggregation mit schizophrenen Störungen in entsprechenden formalgenetischen Studien sicher darzustellen (Maier *et al* 1993).

(2) *Molekulargenetische Untersuchungsbefunde*: Bei genomweiten Kopplungsuntersuchungen ergaben sich in den drei Kopplungsregionen 13q32-q33, 18p11 und 22q11-q13 für beide Störungsformen positive Kopplungshinweise. Auch diese Befunde sprechen für das Vorliegen gemeinsamer genetischer Faktoren. Auch auf der Ebene von Assoziationsuntersuchungen gibt es Hinweise auf gemeinsame genetische Loci, die zu einer Prädisposition sowohl für bipolar affektive als auch für schizophrene Störungen führen könnten. Neben den dargestellten Befunden am *DAOA*-Lokus betrifft dies auch das *COMT*-Gen (Craddock *et al* 2005, Maier *et al* 2005).

(3) *Pathophysiologische Untersuchungsbefunde*: Vor allem weisen pharmakologische Befunde darauf hin, dass die gleichen Neurotransmittersysteme bei bipolar affektiven und schizophrenen Störungen betroffen sind. Hier sind vor allem das dopaminerge, das serotoninerge und das glutamaterge System zu nennen (u. a. Abi-Dargham *et al* 1998, Clinton und Meador-Woodruff 2004, Gold *et al* 1988, Laruelle *et al* 1993, Laruelle *et al* 1999, López-Figueroa *et al* 2004, Meltzer 1989, Nemeroff 1998, Scarr *et al* 2001). So finden einige Medikamente, die zur Therapie

der schizophrenen Störungen eingesetzt werden, auch bei der bipolar affektiven Störung in der manischen Phase Verwendung (zum Beispiel Olanzapin und Risperidon) (Übersicht in Masan 2004). Einschränkend muss allerdings gesagt werden, dass diese Medikamente auch relativ unspezifisch im Sinne sedierender Effekte wirken könnten.

2.5 Pathophysiologische Konzepte bei bipolar affektiven Störungen

Aufgrund von pharmakologischen Befunden nimmt man an, dass bipolar affektiven Erkrankungen Störungen des Neurotransmitter-Stoffwechsels zu Grunde liegen. Vor allem sind hier die katecholaminergen, dopaminergen, glutamatergen und GABAergen Neurotransmittersysteme zu nennen, die (zumindest als Folge anderer Ursachen) während der symptomatischen Episoden an der Pathophysiologie der bipolar affektiven Störung beteiligt sind (Übersicht in Clinton und Meador-Woodruff 2004, Manji und Lenox 2000).

2.5.1 Zellbiologische Funktion der NMDA-Rezeptoren und des D-Serin-Stoffwechsels

Auf Grund der replizierten Assoziationshinweise zwischen genetischen Varianten am *DAOA*-Lokus und der bipolar affektiven Störung und der funktionellen Bedeutung des *DAOA/DAAO*-Pathways am glutamatergen Neurotransmittersystem sind die NMDA-Rezeptoren bei der Erforschung der bipolar affektiven Störungen von besonderem Interesse. Der NMDA-Rezeptor ist ein zentraler Rezeptor für die exzitatorische, synaptische Neurotransmission im zentralen Nervensystem und soll dort unter anderem an Funktionsprozessen des Gedächtnisses und des Lernens beteiligt sein. Er besteht aus mehreren Untereinheiten, NR1 als nicht-variable Untereinheit und NR2A–D als variable Untereinheiten, die zusammen in unterschiedlicher Kombination ein Tetramer bilden, verschiedene physiologische sowie pharmakologische Eigenschaften haben und in unterschiedlicher Zusammensetzung im ZNS vorliegen. Außerdem wurden zwei weitere Untereinheiten beschrieben, NR3A und B, die hauptsächlich postnatal auftreten und von denen angenommen wird, dass sie an der Ausbildung synaptischer Elemente durch Modulation von NMDA-Rezeptoren beteiligt sind (Danysz und Parsons 1998). Der NMDA-Rezeptor lässt im aktivierten Zustand Kalzium und Natrium in die Synapse eintreten, wenn vier Transmitter gleichzeitig an ihn binden. Dafür müssen zwei NR2-Untereinheiten durch Glutamat und zwei NR1-Untereinheiten durch Glyzin aktiviert werden, die jeweils eine

deren Proteine in unterschiedlicher Weise am D-Serin-/NMDA-Rezeptor-Pathway beteiligt sind, in vorliegender Arbeit als Kandidatengene für die bipolar affektive Störung von Interesse (siehe Abbildung 1 und folgend).

2.6.1 N-Methyl-D-Aspartate-Rezeptor Channel, Subunit 1 (GRIN1)

2.6.1.1 Genomische Lokalisation, Struktur und Funktion

GRIN1 (OMIM 138249) kodiert für die Glyzin-bindende Untereinheit des NMDA-Rezeptors (NMDAR1). Die Untereinheit NMDAR1 wurde 1993 erstmals von Karp *et al* (1993) kloniert, ihr Produkt ist ein 938-Aminosäuren-langes Protein.

GRIN1 besteht aus 21 Exons, die in einem genomischen Bereich von 30 kb lokalisiert sind, und liegt auf Chromosom 9q34 (Brett *et al* 1994, Collins *et al* 1993, Takano *et al* 1993, Zimmer *et al* 1995). Bislang wurden acht alternative Splice-Varianten beschrieben (Danysz und Parsons 1998), so dass von einer Diversität dieser Untereinheit auf zellulärer Ebene auszugehen ist.

Nong *et al* (2003) fanden heraus, dass die Stimulation der NMDAR1-Untereinheit eine Signalkaskade durch den NMDAR-Komplex auslöst, die zur Endozytose der Rezeptoren führt. Allerdings ist die Glyzin-Bindung allein noch nicht ausreichend für die Endozytose; auch Glutamat muss seine Untereinheit (NMDAR2) aktivieren.

2.6.1.2 Molekulargenetische Assoziationsbefunde

In 2003 konnten Mundo *et al* (2003) in einer Familienbasierten Assoziationsstudie mit 288 Probanden eine Assoziation zweier Polymorphismen des *GRIN1*-Gens mit der bipolar affektiven Störung nachweisen. Für den einen der beiden Polymorphismen hatten die gleichen Autoren schon zuvor Assoziation in einem unabhängigen Kollektiv mit bipolar affektiver Störung finden können (Mundo *et al* 2000).

Außerdem liegen mehrere Assoziationsbefunde vor (u. a. Begni *et al* 2003), die *GRIN1* als interessantes Kandidatengen bei schizophrenen Störungen erscheinen lassen. Andere Studien konnten hingegen keine signifikanten Assoziationshinweise zu schizophrenen Störungen finden (Williams *et al* 2002).

2.6.2 N-Methyl-D-Aspartate-Receptor Channel, Subunit 2A (GRIN2A)

2.6.2.1 Genomische Lokalisation sowie Struktur und Funktion

GRIN2A (OMIM 138253) kodiert für die Glutamat-bindende Untereinheit des NMDA-Rezeptors (NMDAR2A). Hess *et al* (1996) konnten NMDAR2A als Erste klonieren, das korrespondierende Protein besteht aus 1464 Aminosäuren.

GRIN2A besteht aus 11 Exons, umfasst auf genomischer Ebene 450 kb und liegt in der chromosomalen Region 16p13 (Kalsi *et al* 1998).

Liu *et al* (2004) konnten zeigen, dass die Blockade NR2A enthaltender NMDA-Rezeptoren die Induktion einer Langzeit-Potenzierung unterdrückt, ohne die Entstehung einer Langzeit-*depression* zu beeinflussen.

2.6.2.2 Molekulargenetische Assoziationsbefunde

Itokawa *et al* (2003) führten Assoziationsuntersuchungen mit genetischen Varianten am *GRIN2A*-Lokus durch. In einem Familienbasierten Kollektiv bipolar affektiver Patienten fanden sie hierbei Assoziation zwischen einem STR-Marker und der Erkrankung.

In einer Assoziationsstudie mit schizophrenen Patienten konnte hingegen kein signifikanter Assoziationshinweis gefunden werden (Williams *et al* 2002).

2.6.3 N-Methyl-D-Aspartate-Receptor Channel, Subunit 2B (GRIN2B)

2.6.3.1 Genomische Lokalisation, Struktur und Funktion

GRIN2B (OMIM 138252) kodiert für die Glutamat-bindende Untereinheit des NMDA-Rezeptors (NMDAR2B). Hess *et al* (1996) isolierten eine für NMDAR2B kodierende cDNA aus humanem fetalem Gehirn, das Produkt bestand aus 1484 Aminosäuren.

GRIN2B besteht aus 11 Exons, umfasst auf genomischer Ebene 419 kb und liegt in der chromosomalen Region 12p13 (Mandich *et al* 1994).

Liu *et al* (2004) konnten in ihrer Studie zeigen, dass die Blockade NR2B enthaltender NMDA-Rezeptoren die Induktion einer Langzeit-*depression* aufhebt, aber nicht einer Langzeit-Potenzierung.

2.6.3.2 Molekulargenetische Assoziationsbefunde

Nishiguchi *et al* (2000) führten Assoziationsuntersuchungen durch, in denen sie einen Polymorphismus in *GRIN2B* auf Assoziation mit schizophrenen Psychosen testeten. Die Ergebnisse waren negativ. Auch andere Studien konnten keinen positiven Assoziationshinweis zwischen genetischen Varianten im *GRIN2B*-Lokus und schizophrenen Störungen finden (Williams *et al* 2002).

Eine Assoziationsuntersuchung mit Polymorphismen am *GRIN2B*-Lokus und bipolar affektiven Störungen wurde bisher nicht durchgeführt.

2.6.4 Phosphoserine Phosphatase (PSPH)

2.6.4.1 Genomische Lokalisation, Struktur und Funktion

PSPH (OMIM 172480) kodiert für das Enzym Phosphoserin-Phosphatase, das eine wichtige Rolle bei der Synthese von L-Serin spielt, indem es den letzten Schritt, die Hydrolyse von O-Phosphoserin zu L-Serin, katalysiert. Collet *et al* (1997) klonierten als Erste das humane *PSPH*-Gen, dessen Produkt ein Polypeptid aus 225 Aminosäuren ist.

PSPH besteht aus fünf Exons und umfasst auf genomischer Ebene 105 kb. Seine Lokalisation ist in der chromosomalen Region 7p11 (Veiga da Cunha *et al* 2004).

Jaeken *et al* (1997) beschrieben einen Patienten mit *PSPH*-Mangel; der betroffene Junge litt an prä- und postnataler Wachstumsretardierung, moderater psychomotorischer Retardierung und Gesichts-Dysmorphien. Bei diesem Jungen war die *PSPH*-Aktivität in Lymphoblasten und Fibroblasten auf 25% des normalen Wertes reduziert. Obwohl bei dem Patienten im Folgenden durch den Nachweis einer Mutation im Elastin-Gen (7q11) ein Williams-Syndrom diagnostiziert wurde und es unklar ist, inwieweit oben genannte Symptomatik überhaupt auf den *PSPH*-Mangel zurückzuführen ist, verbesserte sich unter der oralen Therapie mit Serin das Wachstum des Kopfumfangs.

2.6.4.2 Molekulargenetische Assoziationsbefunde

Bei oben beschriebenem Patienten konnten Veiga da Cunha *et al* (2004) eine Compound-Heterozygotie für Mutationen im *PSPH*-Gen feststellen. Die Eltern des Jungen waren für beide Mutationen heterozygot, so dass man von einem autosomal rezessiven Erbgang ausgehen kann.

Sie zeigten weiterhin, dass das *PSPH*-Gen und das Elastin-Gen genomisch soweit auseinander liegen, dass zwischen beiden kein Zusammenhang besteht.

Bislang wurden keine molekulargenetischen Assoziationsuntersuchungen mit genetischen Varianten am *PSPH*-Lokus und bipolar affektiven Störungen durchgeführt.

2.6.5 Glutamate/Neutral Amino Acid Transporter, Member 4 (SLC1A4/ASCT1)

2.6.5.1 Genomische Lokalisation, Struktur und Funktion

SLC1A4 (OMIM 600229) kodiert für den Aminosäuren-Transporter ASCT1, der Alanin, Serin, Cystein und Threonin transmembranös vom extra- in den intrazellulären Raum transportiert. Hofmann *et al* (1994) klonierten *SLC1A4*, das Protein ASCT1 besteht aus 524 Aminosäuren.

SLC1A4 besteht aus acht Exons und erstreckt sich über einen Bereich von 34 kb genomischer DNA. *SLC1A4* ist in der chromosomalen Region 2p14 lokalisiert (Hofmann *et al* 1994).

2.6.5.2 Molekulargenetische Assoziationsbefunde

Bislang wurden keine molekulargenetischen Assoziationsuntersuchungen mit genetischen Varianten am *SLC1A4*-Lokus und bipolar affektiven Störungen durchgeführt.

2.6.6 Neurotransmitter/Glycine Transporter, Member 5 (SLC6A5/GLYT2)

2.6.6.1 Genomische Lokalisation, Struktur und Funktion

SLC6A5 (OMIM 604159) kodiert für den Glyzin-Transporter Typ 2 (*GLYT2*), der verantwortlich für die Beendigung der Neurotransmission an Strychnin-sensitiven glyzinerger Synapsen ist. Als Erste fanden Liu *et al* (1993) eine cDNA bei Ratten, die für einen neuen Glyzin-Transporter kodierte, den sie *GLYT2* nannten. Morrow *et al* (1998) isolierten die entsprechende humane cDNA, die für ein 797 Aminosäuren langes Protein kodiert.

SLC6A5 besteht aus 16 Exons und erstreckt sich über einen genomischen Bereich von 56 kb. *SLC6A5* ist auf der chromosomalen Region 11p15 lokalisiert (Morrow *et al* 1998). Gallagher *et al* (1999) isolierten die cDNA dreier Isoformen von *GLYT2*.

2.6.6.2 Molekulargenetische Assoziationsbefunde

Bislang wurden keine molekulargenetischen Assoziationsuntersuchungen mit genetischen Varianten am *SLC6A5*-Lokus und bipolar affektiven Störungen durchgeführt.

2.6.7 Neurotransmitter/Glycine Transporter, Member 9 (SLC6A9/GLYT1)

2.6.7.1 Genomische Lokalisation, Struktur und Funktion

SLC6A9 (OMIM 601019) kodiert für den Glyzin-Transporter Typ 1 (*GLYT1*), dem eine Bedeutung bei der Regulation von Glyzin-Spiegeln im Bereich der NMDA-Rezeptor-vermittelten Neurotransmission zukommen soll. Borowsky *et al* (1993) isolierten zwei Glyzin-Transporter-Varianten mit unterschiedlicher Lokalisation im ZNS und im peripheren Gewebe, die von einem gemeinsamen Gen kodiert werden. *GLYT1a* wurde sowohl in der grauen Substanz des ZNS als auch in Makrophagen und Mastzellen im peripheren Gewebe gefunden, während *GLYT1b* nur in der weißen Substanz des ZNS vorkam. Die Ergebnisse weisen auf ein Gewebe-spezifisches alternatives Splicing oder alternative Promoter-Nutzung hin, die in zwei mRNA-Produkten resultiert.

SLC6A9 besteht aus 15 Exons (Borowsky und Hoffman 1998), erstreckt sich über einen genomischen Bereich von 20 kb und liegt in der chromosomalen Region 1p34.

2.6.7.2 Molekulargenetische Assoziationsbefunde

Bislang wurden keine molekulargenetischen Assoziationsuntersuchungen mit genetischen Varianten am *SLC6A9*-Lokus und bipolar affektiven Störungen durchgeführt.

3 Zielsetzung vorliegender Arbeit

Gegenstand der vorliegenden Arbeit ist eine Assoziationsstudie an einem Fall-Kontroll-Kollektiv, bestehend aus 325 bipolar affektiven Patienten und 325 Kontrollpersonen. Ziel ist die Identifizierung von Dispositionsgenen für die bipolar affektive Störung. Es wurden die Kandidatengene *GRIN1*, *GRIN2A*, *GRIN2B*, *PSPH*, *SLC1A4*, *SLC6A5* und *SLC6A9* auf ihre mögliche Bedeutung am Entstehungsprozess der bipolar affektiven Störungen untersucht. Dabei handelt es sich um funktionelle Kandidatengene, deren Produkte in unterschiedlicher Weise am D-Serin-/NMDA-Rezeptor-Pathway im ZNS beteiligt sind. Für die untersuchten Varianten (19 STR-Marker und 32 SNPs) liegen mit einer Ausnahme (*GRIN2A_104140*, Itokawa *et al* 2003) bisher noch keine Assoziationsstudien bei bipolar affektiven Störungen vor.

Die im Rahmen vorliegender Studie durchgeführten Arbeiten waren nur durch das Zusammenwirken unterschiedlicher Einrichtungen möglich. Der Aufbau des Untersuchungskollektivs erfolgte durch Mitarbeiter der Psychiatrischen Universitätsklinik Bonn und des Zentralinstituts für Seelische Gesundheit Mannheim. Die molekulargenetischen Arbeiten zur Durchführung der Assoziationsstudien erfolgten am Institut für Humangenetik des Universitätsklinikums Bonn (19 STR-Marker, hierin liegt der Beitrag vorliegender Doktorarbeit), und am Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit (GSF) in Neuherberg (32 SNP-Marker). Die statistische Auswertung der erhobenen Untersuchungsdaten wurde am Institut für Medizinische Biometrie, Informatik und Epidemiologie (IMBIE) des Universitätsklinikums Bonn durchgeführt.

4 Material und Methoden

4.1 Untersuchungskollektiv

Die im Rahmen vorliegender Untersuchung analysierte Patienten-DNA stammt von Personen, die an einer bipolar affektiven Störung erkrankt sind. Es wurde ein deutsches Fall-Kontroll-Kollektiv genotypisiert, bestehend aus 325 bipolar affektiven Patienten und 325 gesunden Kontroll-Personen. Alle Personen sind deutscher Herkunft.

Alle Individuen waren vor der Blutentnahme über die geplanten molekulargenetischen Untersuchungen informiert und hatten ihr mündliches und schriftliches Einverständnis zur Durchführung dieser Studie gegeben. Da den Untersuchungen der Umgang mit humaner DNA zu Grunde lag, wurden sie der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Universität Bonn bzw. den Ethikkommissionen der beteiligten klinischen Zentren vorgelegt. Es wurden keine Einwände erhoben.

4.1.1 Personenerfassung

Die Rekrutierung der Patienten und Kontrollen erfolgte durch die Psychiatrische Klinik des Universitätsklinikums Bonn und durch das Zentralinstitut für Seelische Gesundheit in Mannheim. Die der Erfassung zu Grunde gelegten Standarddiagnosen entsprechen den DSM-IV-Kriterien. Es wurden nur Patienten mit einer bipolar affektiven Störung vom Typ I in die Untersuchungen eingeschlossen. Sämtliche in die Studie einbezogenen Individuen wurden von erfahrenen Psychiatern der oben genannten klinischen Einrichtungen auf Grundlage des SADS-L (schedule for affective disorders- and schizophrenia-lifetime version (Endicott und Spitzner 1987)) interviewt. Die Diagnosen basieren auf Interviews, klinischen Befunden und Informationen über die Familiengeschichte.

4.1.2 Beschreibung der Kollektive

Unser Kollektiv bestand aus 325 Individuen mit bipolar affektiver Störung, wovon 173 Personen weiblich und 152 Personen männlich waren. Das Durchschnittsalter betrug 43 ± 11 Jahre. Im Kontroll-Kollektiv befanden sich 325 Personen, davon 185 Frauen und 140 Männer. Hier betrug das Durchschnittsalter 48 ± 13 Jahre.

4.2 Isolierung und Aufbereitung der humanen genomischen DNA

Aus eingefrorenem oder frischem Blut, dem Ethyldiamintetraessigsäure (EDTA) als Antikoagulans zugesetzt wurde, wurde die DNA aus kernhaltigen Leukozyten gewonnen.

Dabei fand die Aussalzmethode nach Miller *et al* (1988) Anwendung. 10 ml Frischblut wurden mit 30 ml Frischblutlysispuffer versetzt, geschüttelt, 15 min auf Eis lysiert und 15 min bei 4°C und 1500 rpm zentrifugiert. Das entstandene Kernpellet wurde mit 10 ml Kernlysispuffer resuspendiert, mit 660 µl 10% SDS und 200 µl Proteinase K (20mg/ml) versetzt und über Nacht bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Nach Zugabe von 3,2 ml gesättigter NaCl-Lösung (6 M) wurde die Lösung kräftig geschüttelt und zweimal bei 4000 rpm und Raumtemperatur zentrifugiert. Das Proteinpellet wurde verworfen; der Überstand wurde mit 7,5 ml Isopropanol versetzt und leicht geschwenkt, bis die DNA ausfiel. Anschließend konnte die DNA mit einer zur Angel geformten Pasteurpipette gefischt und nach Waschen in 70%igem Ethanol in 400-600 µl TE-4 (pH 8,0) gelöst werden.

Dabei wurden folgende Reagenzien verwendet:

- Frischblutlysispuffer (pH 7,5):
 - 155 mM NH₄Cl
 - 10 mM KHCO₃
 - 0,1 mM EDTA (Ethylendiamintetraacetat)
- Kernlysispuffer (pH 8,2):
 - 10 mM Tris-HCl
 - 400 mM NaCl
 - 2 mM EDTA
- 1x Tris-EDTA (TE-4) (pH 7,5)
 - 10 mM Tris
 - 1 mM EDTA

4.3 Synthetische Oligonukleotide

Insgesamt wurden in den oben beschriebenen Kandidatengenomen 19 Short-Tandem-Repeat-Marker und 32 SNPs untersucht. Die Sequenzen der in vorliegender Arbeit verwendeten STR-Marker wurden der UCSC-Datenbank (NCBI Build 31) entnommen. Die Suche nach *Short-Tandem-Repeats* wurde mit Hilfe des Programms TRF (*Tandem Repeats Finder*, Version 2.02) durchgeführt (Benson 1999). Die Bezeichnungen der STR-Marker richten sich nach ihrer Position im jeweiligen Gen. Die SNPs wurden am GSF-Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit in Neuherberg unter Verwendung des *MassARRAY-Systems* (Sequenom, San Diego, USA) auf einem modifizierten *BrukerBiflex MALDI-TOF* Massenspektrometer (Sequenom) genotypisiert (Ding und Cantor 2003). Für die Einzelaufzählung siehe Tabellen 2-9.

Die Oligonukleotide, die als Primer für die Amplifizierungen der STR-Marker benutzt wurden, waren zwischen 21 bp und 23 bp lang. Der Forward-Primer war mit einem fluoreszierenden Farbstoff markiert. Folgende zwei Farbstoffe wurden verwendet: *Fam* (*f*) und *Hex* (*h*). Die Primer wurden von der Firma Qiagen GmbH in Hilden synthetisiert.

Nachfolgend sind die untersuchten Polymorphismen in den jeweiligen Kandidatengenomen samt ihrer Positionen und Primer-Sequenzen wiedergegeben:

Tabelle 2: STR-Marker und SNPs am *GRIN1*-Lokus in der chromosomalen Region 9q34

<i>Marker</i>	Position (NCBI Build 31)	Inter-Marker-Abstand	Forward-Primer 5' - 3'	Reverse-Primer 5' - 3'	Repeat/Poly-morphismus
<i>GRIN1_131719</i>	bp 131719000	3664 bp	(f)GGAGAATTG CATGAACGGT GAG	GGACCTTATA GAATGGGTCG GAA	AAAT _n
<i>rs4880213</i>	bp 131722664	2083 bp			C/T
<i>rs243_1001</i>	bp 131724747	16847 bp			C/G
<i>rs6293</i>	bp 131741594	4639 bp			A/G
<i>rsIVS11_6608</i>	bp 131746233				A/G

Tabelle 3: STR-Marker und SNPs am *GRIN2A*-Lokus in der chromosomalen Region 16p13

Marker	Position (NCBI Build 31)	Inter-Marker-Abstand	Forward-Primer 5' - 3'	Reverse-Primer 5' - 3'	Repeat/Poly-morphismus
<i>rs1014531</i>	bp 9991642	286 bp			A/G
<i>rs5765</i>	bp 9991928	27572 bp			C/T
<i>GRIN2A_100195</i>	bp 10019500	7306 bp	(f)GCCTGAATT CCTGTCTGAGT TT	CAAACCTGGAT CGAGCTCCTA CT	AC _n
<i>rs2267792</i>	bp 10026806	23194 bp			A/C
<i>GRIN2A_100500</i>	bp 10050000	12000 bp	(f)CCACAACAC CAACCTACCA CTT	GACAACCATG GTGGGGATTT GA	GT
<i>GRIN2A_100620</i>	bp 10062000	17736 bp	(h)CTCACTGCA ACCTAAACCT CCT	CAGTGGCTCA TACTTGTGATG T	TTTA _n
<i>rs1430</i>	bp 10079736	85264 bp			A/G
<i>GRIN2A_101650</i>	bp 10165000	98819 bp	(h)GAGTTCCTT CCTGATATCTG GA	CAGTCAACAA ACCATGTTGGT T	CA _n
<i>rs3743833</i>	bp 10263819	63181 bp			A/C
<i>GRIN2A_103270</i>	bp 10327000	72500 bp	(f)CCCAGACCT ACTGAATCTG ACA	GGAAATGAGA CCACCAGCAA GA	AC _n
<i>GRIN2A_103995</i>	bp 10399500	14500 bp	(f)GGCGACAAG AGCAAACTC TGT	CTGGGGACAG ACATAAGAGT GA	AAT _n
<i>GRIN2A_104140</i>	bp 10414000		(h)AGATCTCTG CTACCGCTTCC T	ACAGGGAGAA GCATTGGAGC A	AC _n

Tabelle 4: STR-Marker und SNPs am *GRIN2B*-Lokus in der chromosomalen Region 12p13

<i>Marker</i>	Position (NCBI Build 31)	Inter-Marker-Abstand	Forward-Primer 5' - 3'	Reverse-Primer 5' - 3'	Repeat/Poly-morphismus
<i>GRIN2B_139030</i>	bp 13903000	3438 bp	(h)CATTGGCCA ATGAGACTGC AGA	CCTCCATACCG TGTCATTATG T	TC _n + AC _n
<i>rs1805522</i>	bp 13906438	3033 bp			A/G
<i>rs1805482</i>	bp 13909471	26554 bp			A/G
<i>rs1805552</i>	bp 13936025	31475 bp			C/T
<i>rs741360</i>	bp 13967500	10500 bp			C/T
<i>GRIN2B_139780</i>	bp 13978000	67 bp	(f)GGCAGCCAA ATGCAGAAGT TCT	GAGGCAGACC ATCTGGTTTCT T	TG _n
<i>rs2192971</i>	bp 13978067	102933 bp			G/T
<i>GRIN2B_140810</i>	bp 14081000	42000 bp	(h)CCGCTTATA GGCAACAGGA TT	CTAACTCTGCC TATTGCTTGGA	GTTTT _n
<i>GRIN2B_141230</i>	bp 14123000	43000 bp	(h)GGTCATTG GTCAAGCTGG T	CACTCTAGCCT GGGCTACAAG A	TG _n
<i>GRIN2B_141660</i>	bp 14166000	94000 bp	(h)CCTCCTCCC AGAACTTAAA GGA	CATCAAAGTG GGAGAGTGGA GT	AC _n
<i>GRIN2B_142600</i>	bp 14260000	18029 bp	(f)GAACCACCT GAGCAGCATT TCA	CCAGATGCAG CTGGAAGAAG AA	AC _n
<i>rs3764030</i>	bp 14278029				C/T

Tabelle 5: STR-Marker und SNPs am *PSPH*-Lokus in der chromosomalen Region 7p11

<i>Marker</i>	Position (NCBI Build 31)	Inter-Marker- Abstand	Forward-Primer 5' - 3'	Reverse-Primer 5' - 3'	Repeat/Poly- morphismus
<i>PSPH_555080</i>	bp 55508000	38862 bp	(f)GTTGCAGTC AGCTGAAATG GT	CCTTCTGAACT ATCTGAACAA TT	GT _n
<i>rs4255091</i>	bp 55546862	5009 bp			C/G
<i>rs4496923</i>	bp 55551871				A/G

Tabelle 6: STR-Marker und SNPs am *SLCIA4*-Lokus in der chromosomalen Region 2p14

<i>Marker</i>	Position (NCBI Build 31)	Inter-Marker- Abstand	Forward-Primer 5' - 3'	Reverse-Primer 5' - 3'	Repeat/Poly- morphismus
<i>rs1064512</i>	bp 65403058	11350 bp			C/G
<i>rs3732062</i>	bp 65414408	17129 bp			C/T
<i>rs759458</i>	bp 65431537	758 bp			A/G
<i>rs2075209</i>	bp 65432295	44705 bp			A/G
<i>SLCIA4_654770</i>	bp 65477000		(h)CCCTGCAGA TGATTCTGATA CC	CCGTAATCCC AGTTACTCAG GA	TATT _n

Tabelle 7: STR-Marker und SNPs am *SLC6A5*-Lokus in der chromosomalen Region 11p15

<i>Marker</i>	Position (NCBI Build 31)	Inter-Marker- Abstand	Forward-Primer 5' - 3'	Reverse-Primer 5' - 3'	Repeat/Poly- morphismus
<i>SLC6A5_214235</i>	bp 21423500	382 bp	(f)GAAGCCGTG AAAGATAACA CGA	CACAACCTCGT ATCACTTCCA GA	AAG _n
<i>rs2241940</i>	bp 21423882	692 bp			A/G
<i>rs1443548</i>	bp 21424574	13369 bp			C/T
<i>rs2289683</i>	bp 21437943	4057 bp			C/T
<i>SLC6A5_214420</i>	bp 21442000	7912 bp	(h)ACTTCAGAG TGACAGGGTG ACA	CATGCAAATA CCTCCTGGCGT A	AC _n
<i>rs3740871</i>	bp 21449912	10299 bp			A/G
<i>rs2000950</i>	bp 21460211	15221 bp			A/C
<i>rs2276433</i>	bp 21475432				A/G

Tabelle 8: STR-Marker und SNPs am *SLC6A9*-Lokus in der chromosomalen Region 1p34

<i>Marker</i>	Position (NCBI Build 31)	Inter-Marker- Abstand	Forward-Primer 5' - 3'	Reverse-Primer 5' - 3'	Repeat/Poly- morphismus
<i>rs2248632</i>	bp 43467029	13487 bp			A/G
<i>rs3791129</i>	bp 43480516	2984 bp			A/G
<i>SLC6A9_434835</i>	bp 43483500		(f)CTCATTAC ACCTCTGCCA GCT	GTCACATCA GACACCCAAC T	AC _n

4.4 Untersuchungsgeräte

Folgende Geräte fanden bei der Fragmentlängenanalyse der STR-Marker Einsatz:

- PCR-Geräte:
 - MJ-Research PTC-200, Watertown, Massachusetts, USA
 - MJ-Research PTC-225, Watertown, Massachusetts, USA

- Automatischer Sequenzierer:
 - Modell ABI PrismTM377 (96er lane upgrade), Applied Biosystems, Weiterstadt
- PCs samt Spezialsoftware:
 - ABI Prism GeneScan Analysis Software (Version 3.7, Applied Biosystems, Darmstadt)
 - ABI Prism Genotyper (Version 3.7 NT Software, Applied Biosystems, Darmstadt)

4.5 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Das Durchführen der Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) war Voraussetzung für die sich anschließende Fragmentlängenanalyse. Die PCR ermöglicht hierbei, in kurzer Zeit selektiv kleine Mengen DNA in vitro zu amplifizieren. Dabei wird ein DNA-Abschnitt von 100 bis 3000 Basen Länge in einer Abfolge von sich wiederholenden Zyklen exponentiell vermehrt.

Ein Synthese-Zyklus besteht aus drei Schritten: (1) *Hitzenaturierung*: Bei 90-95°C wird der zu vermehrende DNA-Abschnitt zuerst in Einzelstränge aufgetrennt, die als Matrizen für die DNA-Synthese dienen. (2) *Hybridisierung*: Bei 45-65°C binden synthetische Oligonukleotide, die als Startermoleküle dienen (sog. Primer), an die DNA-Matrize. (3) *Synthese*: Bei 72°C synthetisiert die thermostabile Taq-Polymerase, beginnend an den 3'-OH-Enden der beiden Startermoleküle, einen komplementären DNA-Strang.

Dieser Synthese-Zyklus wird 30-40-mal wiederholt, so dass von dem amplifizierten DNA-Abschnitt nach erfolgter PCR in exponentieller Anzahl Kopien vorliegen.

Die Reaktionsvolumina betragen in der vorliegenden Arbeit 10 µl im 96er Well-Plattenformat. Der PCR-Ansatz für eine Reaktion enthielt folgende Komponenten:

<i>Reagens</i>	<i>Volumen in μl</i>	<i>Konzentration/Inhalt</i>
DNA	2,0 μ l	20 ng/ μ l
Q-Solution	2,0 μ l	
Premix	5,0 μ l	Taq-Polymerase Puffer MgCl ₂
H ₂ O	2,4-2,7 μ l, abhängig von Primermenge	
Primer	0,3-0,6 μ l, je nach Anzahl der verwendeten Primer	Forward- und Reverse-Primer

Alle Komponenten wurden in einem Reaktionsgefäß gemischt und anschließend in die Mikrotiterplatten pipettiert.

Die PCR erfolgte in so genannten Thermocyclern. Hierzu wurde ein Touchdown-Programm verwendet, bei dem die Hybridisierungstemperatur jeden vierten bzw. dritten Zyklus um ein Grad sinkt, bis sie 55°C erreicht:

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

8

60°C

30 min

Folgende Materialien wurden bei der Amplifikation der STR-Marker verwendet:

- Multiplex PCR Master Mix Qiagen GmbH, Hilden
- Q-Solution Qiagen GmbH, Hilden
- Amplifikationsprimer Qiagen GmbH, Hilden

4.6 Elektrophorese auf dem Automatischen Sequencer

Anschließend wurden die PCR-Produkte auf einem 4,25%igen Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt.

4.6.1 Prinzip

Bei dem Sequenziergerät handelt es sich um ein Mikroprozessor-gesteuertes Elektrophorese- und Fluoreszenz-Detektionssystem. Durch ein elektrisches Feld werden die DNA-Fragmente durch eine visköse Gelmatrix getrieben. Da kleine Fragmente schneller laufen als größere, werden sie dadurch aufgetrennt und kommen mit zeitlicher Verschiebung am Ende der Gelmatrix an. Dort, an einer fixen Stelle des Gels, erfasst eine Spezialkamera die durch einen Laserstrahl induzierte Fluoreszenzstrahlung der DNA-Fragmente. Diese wird mittels eines Photomultipliers in ein elektrisches, digitales Signal umgewandelt, welches auf einen Computer übertragen wird und dort ein Gelbild generiert. Fragmente gleicher Länge werden durch unterschiedliche Fluoreszenzmarkierungen unterschieden.

4.6.2 Herstellung des 4,25%igen Polyacrylamid-Gels

Die 40%ige Acrylamid-Lösung (Acrylamid : Bisacrylamid = 29 : 1) wurde in Aqua bidest. gelöst, durch einen 0,2 µm Filter abfiltriert und bei 4°C aufbewahrt. Zur Herstellung der Gelstocklösung wurden 18 g Harnstoff (Urea) in 24,9 ml H₂O dest. und 6 ml 10x TBE-Puffer gelöst, mit 5,6 ml der 40%igen Acrylamid-Lösung gemischt und durch einen 0,2 µm Filter filtriert und entgast.

Zur Herstellung des Gels wurde die vorbereitete Gelstocklösung in einem Becherglas mit 250 ml 10%iger Ammoniumpersulfatlösung sowie 35 µl TEMED versetzt und anschließend sofort zwischen die für die Elektrophorese vorbereiteten Glasplatten gegossen. In horizontaler Lage polymerisierte das Gel innerhalb einer Stunde.

Folgende Reagenzien wurden hierbei verwendet:

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

4.6.3 Elektrophorese

Nach erfolgter Polymerisation wurde das 0,2 mm dicke Gel vertikal in den ABI-Sequencer eingespannt und eine obere und untere Pufferkammer mit 1x TBE gefüllt. Die optimale Lauftemperatur beträgt 51°C, so dass das Gel zunächst vorgeheizt werden musste. In einem Kontrolllauf (*Pre-Run*) maß der Laser, ob sich Verunreinigungen auf den Glasplatten oder im Gel befanden. Anschließend wurden die PCR-Produkte aufgetragen. Dazu wurden 2,5 µl jedes PCR-Produktes, die vorher mit 2 µl ROX-Standardlösung, bestehend aus einem internen DNA-Längenstandard (GS-500-Rox) und einem farbigen Ladepuffer, versehen wurden, bei 95°C zwei Minuten lang denaturiert. Von diesem Gemisch wurden mit einer manuellen Pipettierhilfe (Gele-Mate, Word Precision Instrument, Berlin) 2 µl in die Geltaschen des 96-lane-Gels pipettiert. Die

Laufzeit hängt von der Fragmentlänge der PCR-Produkte ab und betrug in der Regel zwischen zwei und drei Stunden bei einer angelegten Spannung von 2400 Volt.

Die verwendeten Reagenzien waren:

- 1x TBE
- ROX-Standardlösung
 - 250 µl Formamid
 - 80 µl blauer Puffer
 - 35 µl ROX (GeneScan-500-Rox, Applied Biosystems, Darmstadt)

4.7 Bestimmung der Fragmentlängen

Die Bestimmung der PCR-Fragmentlängen erfolgte mit Hilfe des ABI-Genotyper-Software-Programms. Der mit den PCR-Produkten aufgetragene interne Längenstandard ist fluoreszenzmarkiert, kann jedoch anhand seiner Farbe von den anders markierten Proben unterschieden werden. Die bekannten Fragmentlängen des Standards dienen der Erzeugung einer Kalibrierungskurve, mit deren Hilfe die exakten Längen der PCR-Produkte durch Extrapolation ermittelt werden können. Zur genaueren Bestimmung der Produktlängen wurde zudem eine Kontroll-DNA parallel analysiert, deren Fragmentlänge bekannt ist.

4.8 Analyse der Genotypen

Anhand des internen Längenstandards und der Kontroll-DNA fand eine automatische Bestimmung der Genotypen durch das Softwareprogramm Genotyper Version 3.7 (Applied Biosystems, Darmstadt) statt. Die so ermittelten Genotypen wurden daraufhin von zwei Personen, die keine Kenntnis über den Erkrankungsstatus der untersuchten Probanden hatte, unabhängig ausgewertet. Bei unklaren Ergebnissen wurde die Analyse vollständig wiederholt.

4.9 Assoziationsanalyse

Die statistische Auswertung der Untersuchungen wurde von Herrn Dr. 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 Kontrollpersonenkollektivs mittels eine χ^2 -Testes auf eine mögliche Abweichung vom Hardy-Weinberg-Gleichgewicht überprüft. Für die Assoziationsuntersuchung 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 Haplotyp-Verteilung der Fälle und Kontrollen wurde mittels FAMHAP verglichen (Becker und Knapp 2004). Wie von Becker *et al* (2005) vorgeschlagen wurden alle Marker-Kombinationen getestet und ein globaler P-Wert (korrigiert für Multiples Testen) errechnet.

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

5 Ergebnisse

Ziel dieser Arbeit ist die Untersuchung von Varianten im Bereich von sieben Genen des D-Serin-/NMDA-Rezeptor-Pathways auf Assoziation mit der bipolar affektiven Störung. Bei den Genen handelt es sich um *GRIN1*, *GRIN2A*, *GRIN2B*, *PSPH*, *SLC1A4*, *SLC6A5* und *SLC6A9* (siehe auch Theoretische Grundlagen und Material und Methoden). Das Untersuchungskollektiv bestand aus einer deutschen Fall-Kontroll-Stichprobe (n = 325 bipolar affektive Patienten und n = 325 Kontrollpersonen).

Die im Rahmen der Studie ausgewählten Varianten im Bereich der oben beschriebenen Gene entstammen der UCSC-Datenbank und wurden bis auf einen STR-Marker in *GRIN2A* (Itokawa *et al* 2003) noch nicht an Kollektiven bipolar affektiver Patienten untersucht.

Im Folgenden werden die Ergebnisse dargestellt. Zunächst werden – für jedes Gen einzeln – die Ergebnisse der Einzelmarkeranalyse dargestellt. Dabei wurde auch die Verteilung der Genotypen der untersuchten Varianten innerhalb des Patienten- und des Kontrollpersonenkollektivs mittels eines χ^2 -Tests auf eine mögliche Abweichung vom Hardy-Weinberg-Gleichgewicht überprüft. Anschließend werden die Ergebnisse der Haplotypanalysen dargestellt. Unter einem „Haplotyp“ versteht man den von den Eltern vererbten Komplex gekoppelter Allele eines chromosomalen Bereichs.

5.1 GRIN1

Es wurden ein STR-Marker und vier SNPs auf Assoziation hin untersucht. Für den STR-Marker wurden insgesamt sechs Allele detektiert. Für die genaue Beschreibung der Marker siehe Kapitel 4.3.1.

Tabelle 9: Ergebnisse der Einzelmarkeranalyse der STR-Marker und SNPs in *GRIN1*

Marker	Allele	Allelverteilung			Genotypenverteilung						
		Kontrollen	BPAD	p-Wert	Kontrollen			BPAD			p-Wert
					11	12	22	11	12	22	
<i>rs4880213</i>	C/T	0,581 (C)	0,584 (C)	0,918	0,368	0,427	0,205	0,346	0,476	0,178	0,782
<i>rs243_1001</i>	C/G	0,930 (G)	0,933 (G)	0,842	0,000	0,139	0,861	0,010	0,114	0,876	0,182
<i>rs6293</i>	A/G	0,647 (A)	0,636 (A)	0,691	0,420	0,455	0,125	0,421	0,431	0,148	0,822
<i>rsIVS11_6608</i>	A/G	0,947 (A)	0,960 (A)	0,295	0,901	0,093	0,006	0,927	0,066	0,007	0,477
<i>GRIN1_131719</i>	6			0,670							
9											

Die Einzelmarkeranalyse für *GRIN1* ergab keine signifikanten Unterschiede zwischen dem Patienten- und dem Kontrollkollektiv.

Tabelle 10: Ergebnisse der Haplotypanalyse der STR-Marker und SNPs in *GRIN1*

Haplotyp/Markerkombination	globaler p-Wert
<i>GRIN1_131719-rs4880213-rs243_1001</i>	0,985
<i>rs4880213-rs243_1001-rs6293</i>	0,610
<i>rs243_1001-rs6293-rsIVS11_6608</i>	0,925

Diese 3-Marker-Haplotypen erwiesen sich nicht als signifikant mit der bipolar affektiven Störung assoziiert.

5.2 GRIN2A

Es wurden am *GRIN2A*-Lokus sieben STR-Marker und fünf SNPs auf Assoziation hin untersucht. Für den STR-Marker *GRIN2A_100195* wurden neun, für *GRIN2A_101650* 16, für *GRIN2A_100500* 13, für *GRIN2A_103995* sieben, für *GRIN2A_100620* sieben, für

GRIN2A_104140 18 und für GRIN2A_103270 insgesamt 16 verschiedene Allele detektiert. Für die genaue Beschreibung der Marker siehe Kapitel 4.3.2.

Tabelle 11: Ergebnisse der Einzelmarkeranalyse der STR-Marker und SNPs in *GRIN2A*

Marker	Allele	Allelverteilung			Genotypenverteilung						
		Kon- trollen	BPAD	p-Wert	Kontrollen			BPAD			p-Wert
					11	12	22	11	12	22	
<i>rs1014531</i>	A/G	0,573 (G)	0,580 (G)	0,811	0,196	0,461	0,343	0,179	0,483	0,339	1,000
<i>rs5765</i>	C/T	0,572 (C)	0,585 (C)	0,641	0,343	0,458	0,199	0,353	0,465	0,183	1,000
<i>rs2267792</i>	A/C	0,728 (C)	0,671 (C)	0,029	0,065	0,413	0,522	0,099	0,460	0,441	0,276
<i>rs1430</i>	A/G	0,737 (G)	0,702 (G)	0,163	0,080	0,366	0,554	0,077	0,441	0,481	0,130
<i>rs3743833</i>	A/C	0,844 (C)	0,830 (C)	0,493	0,019	0,273	0,708	0,035	0,270	0,695	0,438
<i>GRIN2A_100195</i>	9			0,045							
<i>GRIN2A_100500</i>	13			0,763							
<i>GRIN2A_100620</i>	7			0,961							
<i>GRIN2A_101650</i>	16			0,907							
<i>GRIN2A_103270</i>	16			0,851							
<i>GRIN2A_103995</i>	7			0,690							
<i>GRIN2A_104140</i>	18			0,912							

Die Einzelmarkeranalyse für *GRIN2A* ergab für den STR-Marker *GRIN2A_100195* einen signifikanten p-Wert ($p=0,045$). Für die anderen Marker ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen dem Patienten- und dem Kontrollkollektiv.

Tabelle 12: Ergebnisse der Haplotypanalyse der STR-Marker und SNPs in *GRIN2A*

Haplotyp/Markerkombination	globaler p-Wert
<i>rs1014531-rs5765-GRIN2A_100195</i>	0,038
<i>rs5765-GRIN2A_100195-rs2267792</i>	0,253

Haplotypanalysen zu weiteren Markerkombinationen wurden nicht durchgeführt, da das Kopplungsungleichgewicht zwischen den Markern zu gering war, um eine aussagekräftige Analyse durchzuführen. Die Haplotypanalyse der Markerkombination *rs1014531-rs5765-GRIN2A_100195* ergab einen signifikanten p-Wert von $p=0,038$. Der andere analysierte 3-Marker-Haplotyp erwies sich nicht als signifikant mit der bipolar affektiven Störung assoziiert.

5.3 GRIN2B

Es wurden sechs STR-Marker und sechs SNPs im Bereich von *GRIN2B* untersucht. Für den STR-Marker *GRIN2B_139030* wurden 22, für *GRIN2B_139780* 17, für *GRIN2B_141230* elf, für *GRIN2B_141660* zehn, für *GRIN2B_142600* 18 und für *GRIN2B_140810* insgesamt sieben verschiedene Allele detektiert. Für eine genaue Beschreibung der Marker siehe Kapitel 4.3.3.

Tabelle 13: Ergebnisse der Einzelmarkeranalyse der STR-Marker und SNPs in *GRIN2B*

Marker	Allele	Allelverteilung			Genotypenverteilung						
		Kon- trollen	BPAD	p-Wert	Kontrollen			BPAD			p-Wert
					11	12	22	11	12	22	
<i>rs1805522</i>	A/G	0,952 (G)	0,948 (G)	0,695	0,000	0,095	0,905	0,000	0,104	0,896	1,000
<i>rs1805482</i>	A/G	0,682 (G)	0,695 (G)	0,629	0,097	0,442	0,461	0,097	0,417	0,486	1,000
<i>rs1805552</i>	C/T	0,783 (C)	0,814 (C)	0,159	0,615	0,335	0,050	0,667	0,296	0,038	0,920
<i>rs741360</i>	C/T	0,799 (T)	0,823 (T)	0,279	0,057	0,289	0,654	0,025	0,304	0,671	0,089
<i>rs2192971</i>	G/T	0,829 (T)	0,837 (T)	0,711	0,037	0,268	0,695	0,029	0,268	0,703	1,000
<i>rs3764030</i>	C/T	0,811 (C)	0,834 (C)	0,258	0,658	0,304	0,037	0,688	0,294	0,019	0,311
<i>GRIN2B_139030</i>	22			0,011							
<i>GRIN2B_139780</i>	17			0,326							
<i>GRIN2B_140810</i>	7			0,247							
<i>GRIN2B_141230</i>	11			0,623							
<i>GRIN2B_141660</i>	10			0,129							
<i>GRIN2B_142600</i>	18			0,069							

Die Einzelmarkeranalyse für *GRIN2B* ergab für den STR-Marker *GRIN2B_139030* einen signifikanten p-Wert ($p=0,011$). Für die anderen Marker ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen dem Patienten- und dem Kontrollkollektiv.

Tabelle 14: Ergebnisse der Haplotypanalyse der STR-Marker und SNPs in *GRIN2B*

Haplotyp/Markerkombination	globaler p-Wert
<i>GRIN2B_139030-rs1805522-rs1805482</i>	0,120
<i>rs1805522-rs1805482-rs1805552</i>	0,279
<i>rs1805482-rs1805552-rs741360</i>	0,390
<i>rs1805552-rs741360-GRIN2B_139780</i>	0,550
<i>rs741360-GRIN2B_139780-rs2192971</i>	0,130

Eine Haplotypanalyse wurde nur für die ersten sieben Marker durchgeführt. Aufgrund des bei den anderen Markern fehlenden Kopplungsungleichgewichtes zueinander schien eine Haplotypanalyse nicht sinnvoll. Keiner der 3-Marker-Haplotypen erwiesen sich als signifikant mit der bipolar affektiven Störung assoziiert.

5.4 PSPH

Es wurden ein STR-Marker und zwei SNPs im Bereich von *PSPH* untersucht. Für den STR-Marker wurden insgesamt acht verschiedene Allele detektiert. Für eine genaue Beschreibung der Marker siehe Kapitel 4.3.5.

Tabelle 15: Ergebnisse der Einzelmarkeranalyse der STR-Marker und SNPs in *PSPH*

Marker	Allele	Allelverteilung			Genotypenverteilung						
		Kon- trollen	BPAD	p-Wert	Kontrollen			BPAD			p-Wert
					11	12	22	11	12	22	
<i>rs4255091</i>	C/G	0,693 (C)	0,679 (C)	0,576	0,482	0,423	0,095	0,456	0,446	0,098	1,000
<i>rs4496923</i>	A/G	0,695 (G)	0,681 (G)	0,600	0,097	0,417	0,487	0,099	0,439	0,462	1,000
<i>PSPH_555080</i>	8			0,215							

Die Einzelmarkeranalyse für *PSPH* ergab keine signifikanten Unterschiede zwischen dem Patienten- und dem Kontrollkollektiv.

Tabelle 16: Ergebnisse der Haplotypanalyse der STR-Marker und SNPs in *PSPH*

Haplotyp/Markerkombination	globaler p-Wert
<i>PSPH_555080-rs4255091-rs4496923</i>	0,291

Dieser 3-Marker-Haplotyp erwies sich als nicht signifikant mit der bipolar affektiven Störung assoziiert.

5.5 SLC1A4

Es wurden ein STR-Marker und vier SNPs in *SLC1A4* untersucht. Für den STR-Marker wurden insgesamt neun verschiedene Allele detektiert. Für eine genaue Beschreibung der Marker siehe Kapitel 4.3.6.

Tabelle 17: Ergebnisse der Einzelmarkeranalyse der STR-Marker und SNPs in *SLC1A4*

Marker	Allelverteilung				Genotypenverteilung						
	Allele			p-Wert	Kontrollen			BPAD			p-Wert
		Kontrollen	BPAD		11	12	22	11	12	22	
<i>rs1064512</i>	C/G	0,927 (G)	0,917 (G)	0,484	0,009	0,126	0,864	0,009	0,148	0,843	0,884
<i>rs3732062</i>	C/T	0,827 (T)	0,842 (T)	0,467	0,022	0,302	0,676	0,035	0,246	0,719	0,651
<i>rs759458</i>	A/G	0,748 (G)	0,733 (G)	0,563	0,063	0,378	0,559	0,080	0,373	0,557	0,826
<i>rs2075209</i>	A/G	0,812 (G)	0,824 (G)	0,588	0,041	0,295	0,665	0,052	0,248	0,700	1,000
<i>SLC1A4_654770</i>	9			0,126							

Die Einzelmarkeranalyse für *SLC1A4* ergab keine signifikanten Unterschiede zwischen dem Patienten- und dem Kontrollkollektiv.

Tabelle 18: Ergebnisse der Haplotypanalyse der STR-Marker und SNPs in *SLC1A4*

Haplotyp/Markerkombination	globaler p-Wert
<i>SLC1A4 -11-rs2075209</i>	0,165
<i>rs2075209-rs759458</i>	0,847
<i>rs759458-rs3732062</i>	0,809
<i>rs3732062-rs1064512</i>	0,704

Die 2-Marker-Haplotypen erwiesen sich als nicht signifikant mit der bipolar affektiven Störung assoziiert.

5.6 SLC6A5

Es wurden zwei STR-Marker und sechs SNPs in *SLC6A5* untersucht. Für *SLC6A5_214420* wurden 13, für *SLC6A5_214235* insgesamt 19 verschiedene Allele detektiert. Für eine genaue Beschreibung der Marker siehe Kapitel 4.3.7.

Tabelle 19: Ergebnisse der Einzelmarkeranalyse der STR-Marker und SNPs in *SLC6A5*

Marker	Allele	Allelverteilung			Genotypenverteilung						
		Kon- trollen	BPAD	p-Wert	Kontrollen			BPAD			p-Wert
					11	12	22	11	12	22	
<i>rs2241940</i>	A/G	0,672 (G)	0,634 (G)	0,154	0,118	0,419	0,463	0,125	0,481	0,394	0,155
<i>rs1443548</i>	C/T	0,746 (C)	0,779 (C)	0,162	0,536	0,421	0,043	0,613	0,331	0,056	0,093
<i>rs2289683</i>	C/T	0,994 (C)	0,998 (C)	0,172	0,987	0,013	0,000	0,997	0,003	0,000	0,347
<i>rs3740871</i>	A/G	0,710 (G)	0,726 (G)	0,543	0,085	0,410	0,505	0,073	0,404	0,524	1,000
<i>rs2000950</i>	A/C	0,676 (C)	0,674 (C)	0,949	0,100	0,448	0,452	0,102	0,447	0,450	1,000
<i>rs2276433</i>	A/G	0,623 (G)	0,613 (G)	0,714	0,142	0,470	0,388	0,124	0,525	0,351	0,663
<i>SLC6A5_21 4235</i>	19			*							
<i>SLC6A5_21 4420</i>	13			0,083							

* Berechnung nicht sinnvoll wegen fehlenden Hardy-Weinberg-Gleichgewichts

Die Einzelmarkeranalyse für *SLC6A5* ergab keine signifikanten Unterschiede zwischen dem Patienten- und dem Kontrollkollektiv.

Tabelle 20: Ergebnisse der Haplotypanalyse der STR-Marker und SNPs in *SLC6A5*

Haplotyp/Markerkombination	globaler p-Wert
<i>rs2241940-rs1443548-rs2289683-rs3740871-rs2000950- rs2276433-SLC6A5_214420</i>	0,407

Dieser 7-Marker-Haplotyp erwies sich als nicht signifikant mit der bipolar affektiven Störung assoziiert. Der STR-Marker *SLC6A5_214235* wurde wegen fehlenden Hardy-Weinberg-Gleichgewichts aus der Haplotypanalyse ausgeschlossen.

5.7 SLC6A9

Es wurden ein STR-Marker und zwei SNPs in *SLC6A9* untersucht. Für den STR-Marker wurden insgesamt neun verschiedene Allele detektiert. Für eine genaue Beschreibung der Marker siehe Kapitel 4.3.8.

Tabelle 21: Ergebnisse der Einzelmarkeranalyse der STR-Marker und SNPs in *SLC6A9*

Marker	Allelverteilung				Genotypenverteilung						
	Allele	p-Wert		p-Wert	Kontrollen			BPAD			p-Wert
		Kon-trollen	BPAD		11	12	22	11	12	22	
<i>rs2248632</i>	A/G	0,939 (G)	0,944 (G)	0,763	0,012	0,097	0,891	0,016	0,082	0,903	1,000
<i>rs3791129</i>	A/G	0,731 (A)	0,723 (A)	0,747	0,534	0,394	0,071	0,544	0,358	0,098	0,452
<i>SLC6A9_434835</i>	9			0,205							

Die Einzelmarkeranalyse für *SLC6A9* ergab keine signifikanten Unterschiede zwischen dem Patienten- und dem Kontrollkollektiv.

Tabelle 22: Ergebnisse der Haplotypanalyse der STR-Marker und SNPs in *SLC6A9*

Haplotyp/Markerkombination	globaler p-Wert
<i>SLC6A9_434835-rs3791129-rs2248632</i>	0,682

Dieser 3-Marker-Haplotyp erwies sich als nicht signifikant mit der bipolar affektiven Störung assoziiert.

6 Diskussion

Zur Aufklärung der Ursachen von erblichen Erkrankungen stellt die molekulare Genetik mit den sich ständig weiterentwickelnden Methoden einen sehr aussichtsreichen Ansatz dar. Wichtige Voraussetzungen zur Erforschung dieser Erkrankungen sind mit der Sequenzierung des humanen Genoms (Lander *et al* 2001, Venter *et al* 2001) und mit dem internationalen HapMap-Projekt (The International HapMap Consortium 2003 und 2005) geschaffen worden. Bei der Erforschung genetisch komplexer Krankheiten kommt vor allem Assoziations- und Kopplungsuntersuchungen eine große Bedeutung zu. Dabei haben sich Assoziationsanalysen insbesondere zur Identifizierung prädisponierender Gene mit moderatem Beitrag zur Krankheitsentstehung als erfolgreiche Strategie bewährt (Risch und Merikangas 1996). Sie führten in der Vergangenheit bereits mehrfach zur Identifikation Krankheitsprädisponierender Gene, wie zum Beispiel des Apolipoprotein E-Gens bei Morbus Alzheimer (Poirier *et al* 1993) und des Glukagonrezeptor-Gens bei den *late-onset*-Formen des nicht-insulinabhängigen Diabetes mellitus (NIDDM) (Hager *et al* 1995).

Gegenstand der vorliegenden Arbeit ist eine Assoziationsstudie an einem Fall-Kontroll-Kollektiv, bestehend aus 325 bipolar affektiven Patienten und 325 Kontrollpersonen. Ziel ist die Identifizierung von Dispositionsgenen für die bipolar affektive Störung. Den Untersuchungen wurden dabei sieben Gene zu Grunde gelegt, die in verschiedenster Weise am D-Serin-/NMDA-Rezeptor-Pathway im ZNS beteiligt sind. Aufgrund jüngster Forschungsergebnisse mit Identifikation der Krankheitsgene *DAOA* und *DAAO* bei bipolar affektiven Störungen muss von einer Beteiligung dieses Pathways am Entstehungsprozess der Erkrankung ausgegangen werden. Für die untersuchten Gene liegen mit einer Ausnahme für *GRIN2A* (Itokawa *et al* 2003) bisher noch keine Assoziationsstudien bei bipolar affektiven Störungen vor. Die Ergebnisse vorliegender Arbeit werden im Folgenden zu jedem Kandidatengen einzeln diskutiert. Abschließend werden die Ergebnisse in einer zusammenfassenden Beurteilung betrachtet.

6.1 Assoziationsanalysen der einzelnen Kandidatengene

6.1.1 GRIN1

GRIN1 kodiert für die Glyzin-bindende Untereinheit des NMDA-Rezeptors (NMDAR1), ist auf Chromosom 9q34 lokalisiert und umfasst einen genomischen Bereich von 30 kb.

Am *GRIN1*-Lokus wurden vier SNPs und ein STR-Marker auf Assoziation mit der bipolar affektiven Störung hin untersucht. Es ergaben sich keine signifikanten Unterschiede in der Allel- und Genotypenverteilung zwischen dem Patienten- und dem Kontrollkollektiv (niedrigster p-Wert $p=0,295$ bei SNP rsIVS11_6608). Auch in der Haplotypanalyse ergaben sich keine signifikanten Unterschiede in der Haplotyp-Verteilung (bester p-Wert $p=0,610$ bei der Marker-Kombination rs4880213-rs243_1001-rs6293) (siehe Tabellen 9 und 10, Kapitel 5).

Basierend auf den Daten des internationalen HapMap-Projektes liegt *GRIN1* in einem HaplotypBlock, so dass zwischen den einzelnen Markern Kopplungsungleichgewicht besteht. Bei einem durchschnittlichen Zwischen-Marker-Abstand von 6,8 kb muss von einer ausreichenden Marker-Abdeckung ausgegangen werden, die das Erfassen eines Kopplungsungleichgewichtes zwischen den genotypisierten Markern und der Krankheit ermöglicht hätte. Das Vorhandensein seltener Mutationen im *GRIN1*-Gen, die nur bei einer kleinen Anzahl von Patienten mit bipolar affektiver Störung von Relevanz ist, können wir jedoch nicht ausschließen. Kopplung zur bipolar affektiven Störung wurde in der chromosomalen Region 9q34 allerdings bisher nicht beschrieben, was gegen das Vorliegen von seltenen Mutationen mit starkem Krankheitseffekt in wenigen Familien spricht.

6.1.2 GRIN2A

GRIN2A kodiert für die Glutamat-bindende Untereinheit des NMDA-Rezeptors (NMDAR2A), liegt in der chromosomalen Region 16p13 und umfasst auf genomischer Ebene 450 kb.

Am *GRIN2A*-Lokus wurden fünf SNPs und sieben STR-Marker auf Assoziation mit der bipolar affektiven Störung hin untersucht. Für den STR-Marker GRIN2A_100195 ergab sich ein signifikanter p-Wert von $p=0,045$. Das Ergebnis hält jedoch einer Korrektur auf multiples Testen nach Bonferroni nicht stand und muss daher sehr vorsichtig interpretiert werden. Für die anderen Marker ergaben sich keine signifikanten Unterschiede in der Allel- und Genotypenverteilung zwischen dem Patienten- und dem Kontrollkollektiv. Deshalb ist ein Krankheitsdisponierender

Effekt der genannten Varianten für die bipolar affektive Störung eher unwahrscheinlich. In der Haplotyp-Analyse zeigte sich ein Haplotyp (rs1014531-rs5765-GRIN2A_100195) mit einem p-Wert von $p=0,038$ signifikant assoziiert, der jedoch ebenfalls einer Korrektur auf multiples Testen nach Bonferroni nicht standhält. Zudem ist die unterschiedliche Haplotyp-Verteilung zwischen beiden Kollektiven unter anderem auf sehr seltene Haplotypen zurückzuführen. Die Frequenzen von seltenen Haplotypen sind jedoch nur in sehr großen Kollektiven sicher zu schätzen und auch wesentlich anfälliger gegenüber Genotypisierungsfehlern (siehe Tabellen 11 und 12, Kapitel 5).

Aufgrund der relativ großen Zwischen-Marker-Abstände im Bereich dieses sehr großen Genlokus (450 kb) war die Marker-Abdeckung nur mäßig ausreichend, um sicher ein Kopplungsungleichgewicht zwischen den genotypisierten Markern und einer der bipolar affektiven Störung zu Grunde liegenden Variante detektieren zu können. Auch können wir das Vorliegen seltener Mutationen im *GRIN2A*-Gen, die nur bei einer kleinen Anzahl von Patienten mit bipolar affektiver Störung von Relevanz ist, nicht ausschließen. Eine Kopplung wurde in der chromosomalen Region 16p13 allerdings bisher nicht beschrieben. Da es sich um ein funktionell interessantes Gen handelt, sind weiterführende Untersuchungen unter Verwendung der mittlerweile vorliegenden Daten des internationalen HapMap-Projektes erforderlich, um – mit besserer Haplotypauflösung – eine sichere Aussage über den Beitrag von *GRIN2A* am Entstehungsprozess der bipolar affektiven Störung treffen zu können. Die vorliegenden Daten deuten aber darauf hin, dass *GRIN2A* keine Bedeutung als Krankheitsgen bei bipolar affektiven Störungen zukommt.

6.1.3 GRIN2B

GRIN2B kodiert für die Glutamat-bindende Untereinheit des NMDA-Rezeptors (NMDAR2B), liegt in der chromosomalen Region 12p13 und umfasst auf genomischer Ebene 419 kb.

Am *GRIN2B*-Lokus wurden sechs SNPs und sechs STR-Marker auf Assoziation mit der bipolar affektiven Störung hin untersucht. Für den STR-Marker GRIN2B 44 ergab sich ein signifikanter p-Wert von $p=0,011$. Dieser Wert hält jedoch einer Korrektur auf multiples Testen nach Bonferroni nicht stand und muss daher sehr vorsichtig interpretiert werden. Für die anderen Marker ergaben sich in der Einzelmarkeranalyse keine signifikanten Unterschiede in der Allel- und Genotypenverteilung zwischen dem Patienten- und dem Kontrollkollektiv. Ein Krankheitsprädisponierender Effekt der genannten Varianten für die bipolar affektive Störung ist

daher unwahrscheinlich. Die durchgeführten Haplotypanalysen ergaben ebenfalls keinen signifikanten Unterschied in der Haplotypverteilung (für alle Ergebnisse siehe Tabellen 13 und 14, Kapitel 5).

Aufgrund der teilweise relativ großen Zwischen-Marker-Abstände in dem vergleichsweise großen Gen (419 kb) ist die Abdeckung nur über einen Bereich von 75 kb (erste sieben Marker) ausreichend, um ein Kopplungsungleichgewicht zwischen den genotypisierten Markern und einer die Krankheit verursachenden Variante sicher zu detektieren. Wie auch bei den anderen Kandidatengen können wir das Vorhandensein seltener Mutationen im *GRIN2B*-Gen, die nur bei einer kleinen Anzahl von Patienten mit bipolar affektiver Störung von Relevanz sind, nicht sicher ausschließen. Dass von solchen Veränderungen ein starker Krankheitseffekt ausgeht, ist unwahrscheinlich; eine Kopplung zur chromosomalen Region 12p13 wurde bei bipolar affektiven Störungen bisher nicht beschrieben. Da es sich bei *GRIN2B* – ebenso wie bei *GRIN2A* – um ein funktionell sehr interessantes Gen handelt, sind weiterführende Untersuchungen mit HapMap-basierten Markern, die mittlerweile verfügbar sind, sinnvoll. Hierdurch wären definitivere Aussagen über den Beitrag von *GRIN2B* am Krankheitsprozess der bipolar affektiven Störungen möglich.

6.1.4 PSPH

PSPH kodiert für das Enzym Phosphoserin-Phosphatase, ist in der chromosomalen Region 7p11 lokalisiert und umfasst auf genomischer Ebene 105 kb.

Am *PSPH*-Lokus wurden zwei SNPs und ein STR-Marker auf Assoziation mit der bipolar affektiven Störung hin untersucht. Es ergaben sich in der Einzelmarkeranalyse keine signifikanten Unterschiede in der Allel- und Genotypenverteilung zwischen dem Patienten- und dem Kontrollkollektiv (niedrigster p-Wert $p=0,576$ bei dem SNP rs4255091). Auch in der Haplotypanalyse ergaben sich keine signifikanten Unterschiede in der Verteilung (p-Wert $p=0,291$ für den Haplotyp PSPH_555080-rs4255091-rs4496923) (siehe Tabellen 15 und 16, Kapitel 5).

Basierend auf den Daten des internationalen HapMap-Projektes liegt das komplette Gen in einem Haplotyp-Block. Entsprechend liegt zwischen den einzelnen Markern Kopplungsungleichgewicht vor. Bei einem durchschnittlichen Marker-Abstand von rund 22 kb zwischen den benachbarten Markern in vorliegender Studie können wir von einer Marker-Abdeckung ausgehen, die

ausreicht, um ein Kopplungsungleichgewicht zwischen den genotypisierten Markern und einer der Krankheit zu Grunde liegenden Variante zu erfassen. Auf Grund unserer Ergebnisse können wir jedenfalls das Vorliegen von Krankheitsvarianten mit moderatem Effekt im *PSPH*-Gen in der deutschen Bevölkerung ausschließen. Demgegenüber können wir seltene Mutationen, die nur bei einer kleinen Anzahl von Patienten mit bipolar affektiver Störung von Relevanz sind, im *PSPH*-Gen nicht ausschließen.

6.1.5 SLC1A4

SLC1A4 kodiert für den Aminosäuren-Transporter ASCT1, ist in der chromosomalen Region 2p14 lokalisiert und erstreckt sich über einen Bereich von 34 kb genomischer DNA.

Am *SLC1A4*-Lokus wurden vier SNPs und ein STR-Marker auf Assoziation mit der bipolar affektiven Störung hin untersucht. In der Allel- und Genotypenverteilung ergaben sich in der Einzelmarkeranalyse keine signifikanten Unterschiede zwischen dem Patienten- und dem Kontrollkollektiv (niedrigster p-Wert $p=0,467$ bei dem SNP rs3732062). Auch in der Haplotypanalyse ergaben sich keine signifikanten Unterschiede in der Verteilung (niedrigster p-Wert $p=0,165$ bei dem Haplotypen SLC1A4_654770-rs2075209) (siehe Tabellen 17 und 18, Kapitel 5).

Wie auch beim *PSPH*-Gen liegt das *SLC1A4*-Gen nach den Daten des internationalen HapMap-Projektes in einem Haplotyp-Block, so dass Kopplungsungleichgewicht zwischen den einzelnen Markern vorliegt. Bei einem durchschnittlichen Zwischen-Marker-Abstand von 18 kb sollte die Marker-Abdeckung des Gens ausreichend sein, um Kopplungsungleichgewicht zu einer disponierenden Variante detektieren zu können. Unsere Ergebnisse sprechen dafür, dass dem *SLC1A4*-Gen kein Beitrag an der Krankheitsentstehung bipolar affektiver Störungen in der deutschen Bevölkerung zukommt, wobei das Vorhandensein seltener Mutationen im *SLC1A4*-Gen nicht auszuschließen ist, die dann nur bei wenigen Patienten von Relevanz sind. Auch ist denkbar, dass die statistische Power unserer Studie nicht ausreichend war, um Dispositionsvarianten mit sehr geringem Beitrag am Entstehungsprozess der Erkrankung zu identifizieren. Solche Varianten würden aber die erhobenen Kopplungsbefunde in dieser Region nicht erklären (u. a. Dick *et al* 2003, Liu *et al* 2003, McInnis *et al* 2003, Middleton *et al* 2004, Pato *et al* 2004). Somit ist es wahrscheinlicher, dass ein anderes Risiko-Gen für bipolar affektive Störungen in der chromosomalen Region 2p14 lokalisiert ist.

6.1.6 SLC6A5

SLC6A5 kodiert für den Glyzin-Transporter Typ 2 (*GLYT2*), ist auf der chromosomalen Region 11p15 lokalisiert und erstreckt sich über einen genomischen Bereich von 56 kb.

Im *SLC6A5*-Gen wurden sechs SNPs und zwei STR-Marker auf Assoziation mit der bipolar affektiven Störung untersucht. Zwischen dem Patienten- und dem Kontrollkollektiv ergaben sich in der Einzelmarkeranalyse keine signifikanten Unterschiede in der Allel- und Genotypenverteilung (niedrigster p-Wert $p=0,154$ bei dem SNP rs2241940). Auch in der Haplotypanalyse ergaben sich keine signifikanten Unterschiede in der Verteilung (niedrigster p-Wert $p=0,407$ bei dem Haplotypen rs2241940-rs1443548-rs2289683-rs3740871-rs2000950-rs2276433-*SLC6A5*_214420) (siehe Tabellen 19 und 20, Kapitel 5).

Basierend auf den Daten des internationalen HapMap-Projektes liegt *SLC6A5* in einem Haplotyp-Block. Entsprechend liegt zwischen den einzelnen Markern Kopplungsungleichgewicht vor. Bei einem durchschnittlichen Zwischen-Marker-Abstand von 7 kb ist davon auszugehen, dass ein mögliches Kopplungsungleichgewicht zwischen den genotypisierten Markern und einer putativen Krankheitsvariante erfassbar ist. Aufgrund unserer Ergebnisse scheint es somit unwahrscheinlich, dass dem *SLC6A5*-Gen eine starke Bedeutung an der Krankheitsentstehung der bipolar affektiven Störung in der deutschen Population zukommt. Dabei kann das Vorliegen seltener Mutationen im *SLC6A5*-Gen, die nur bei wenigen Patienten mit bipolar affektiver Störung von Relevanz sind, nicht ausgeschlossen werden. Dies scheint jedoch eher unwahrscheinlich, da sie die Kopplungsbefunde in dieser Region nicht erklären würden (u. a. Craddock und Lendon 1999, McInnis *et al* 2003, Zandi *et al* 2003). Es ist daher davon auszugehen, dass ein anderes Risiko-Gen in der chromosomalen Region 11p15 an der Krankheitsentstehung beteiligt ist. Möglicherweise handelt es sich hierbei um *BDNF*, das in einer großen Familienbasierten Assoziationsstudie (Sklar *et al* 2002) als Risiko-Gen für die bipolar affektive Störung identifiziert wurde. Mittlerweile liegen auch positive Assoziationsbefunde von acht unabhängigen Gruppen vor, die auf einen Beitrag von *BDNF* am Entstehungsprozess bipolar affektiver Störungen hindeuten (Geller *et al* 2004, Green *et al* 2006, Kremeyer *et al* 2006, Lohoff *et al* 2005, Müller *et al* 2006, Neves-Pereira *et al* 2002, Okada *et al* 2006, Schumacher *et al* 2005).

6.1.7 SLC6A9

SLC6A9 kodiert für den Glyzin-Transporter Typ 1 (*GLYT1*), liegt in der chromosomalen Region 1p34 und erstreckt sich über einen genomischen Bereich von 20 kb.

Am *SLC6A9*-Lokus wurden zwei SNPs und ein STR-Marker auf Assoziation mit der bipolar affektiven Störung hin untersucht. In der Einzelmarkeranalyse ergaben sich keine signifikanten Unterschiede in der Allel- und Genotypenverteilung zwischen dem Patienten- und dem Kontrollkollektiv (niedrigster p-Wert $p=0,747$ bei dem SNP rs3791129). Auch in der Haplotypanalyse ergaben sich keine signifikanten Unterschiede in der Verteilung ($p=0,682$ bei dem Haplotypen SLC6A9_434835-rs3791129-rs2248632) (siehe Tabellen 21 und 22, Kapitel 5).

Nach den Daten des internationalen HapMap-Projektes liegt das *SLC6A9*-Gen in einem Haplotyp-Block, so dass zwischen den einzelnen Markern Kopplungsungleichgewicht besteht. Bei einem durchschnittlichen Zwischen-Marker-Abstand von 8 kb scheint die Marker-Abdeckung daher ausreichend, um ein Kopplungsungleichgewicht zwischen den genotypisierten Markern und einer Krankheitsvariante aufdecken zu können. *SLC6A9* liegt in der chromosomalen Region 1p34, in der zuvor Kopplungshinweise bei bipolar affektiven Störungen gefunden wurden (u. a. Curtis *et al* 2003, Schumacher *et al* 2005, Zubenko *et al* 2003). Auf Grund unserer Ergebnisse ist davon auszugehen, dass ein anderes Krankheitsgen in dieser Region am Entstehungsprozess der Erkrankung beteiligt ist.

6.2 Zusammenfassende Beurteilung

Bei der vorliegenden Arbeit handelt es sich um die bislang einzige Studie, bei der funktionell relevante Gene untersucht wurden, deren korrespondierende Proteine am D-Serin-/NMDA-Rezeptor-Pathway beteiligt sind. Auf Grund der in unserer Studie ermittelten Ergebnisse ist eine Beteiligung genetischer Varianten in den von uns untersuchten Kandidatengenen an der Entstehung bipolar affektiver Störungen jedoch eher unwahrscheinlich. Letztendlich können wir aber nicht ausschließen, dass in den untersuchten Genen seltene Krankheitsvarianten vorliegen, die nur bei wenigen Patienten von Bedeutung sind. Zudem könnten die analysierten Gene am Entstehungsprozess der bipolar affektiven Störung in anderen Populationen beteiligt sein. Für einzelne der untersuchten Varianten konnte zwar eine signifikante Assoziation nachgewiesen werden (GRIN2B_139030 mit $p=0,011$, GRIN2A_100195 mit $p=0,045$), die jedoch einer

Korrektur auf multiples Testen nach Bonferroni nicht standhält. Für andere Varianten im *GRIN2A*- und *GRIN2B*-Gen ergaben sich allerdings keine Assoziationshinweise. Somit wird es sich bei den positiven Befunden wohl eher um falsch-positive Ergebnisse handeln, auch wenn wir letztendlich nicht ausschließen können, dass es sich hierbei um schwache Hinweise auf eine bestehende Assoziation zur bipolar affektiven Störung handelt. Beide Gen-Varianten sollten daher in weiterführenden Untersuchungen an unabhängigen Kollektiven getestet werden, eventuell lassen sich unsere moderaten Assoziationshinweise an unabhängigen Patientenkollektiven replizieren. Weiterführende Untersuchungen an beiden Gen-Loki scheinen ohnehin notwendig, da die Zwischen-Marker-Abstände in vorliegender Untersuchung nicht ausreichend waren, um das Vorliegen von Kopplungsungleichgewichten zu disponierenden Varianten sicher zu erfassen. Mittlerweile liegen die Daten aus dem 2006 abgeschlossenen HapMap-Projekt vor. Damit können nun auch in zukünftigen Untersuchungen ausreichend valide Varianten im Bereich der sehr großen Gene *GRIN2A* (450 kb) und *GRIN2B* (419 kb) benannt und untersucht werden.

Ein weiterer Grund für das Nicht-Auffinden von Assoziation könnte darin liegen, dass der genetische Effekt von disponierenden Varianten in den untersuchten Genen zu gering war, so dass die Kollektivgröße unserer Patienten- und Kontrollstichproben keine ausreichende statistische Power hatte. Dann wäre jedoch die Effektstärke von Krankheitsvarianten im Bereich der von uns untersuchten Gene wahrscheinlich sehr gering.

Weiterhin könnten Mutationen in den untersuchten Genen vorliegen, die nur für wenige Patienten von Bedeutung sind. Allerdings widerspricht dies der so genannten „common-disease – common-variant“-Hypothese, wonach die häufigen komplex genetischen Krankheiten auf jeweils auch häufig vorkommende Krankheitsvarianten zurückzuführen sind.

6.3 Perspektiven

Mit der Identifizierung des Krankheitsgens *DAOA* bei bipolar affektiven Störungen scheint ein molekularer Pathway identifiziert worden zu sein, dem eine entscheidende Bedeutung bei der Entstehung der Erkrankung zukommt. Dabei scheint das neuromodulierend wirkende D-Serin über die Bindung an NMDA-Rezeptoren eine zentrale Stellung einzunehmen. Aufbauend auf diesen Befunden haben wir die Hypothese abgeleitet, dass Kandidatengene, deren

korrespondierende Proteine im Bereich des D-Serin-/NMDA-Rezeptor-Pathways beteiligt sind, ebenfalls am Krankheitsprozess der bipolar affektiven Störung mitwirken. Unsere Ergebnisse deuten darauf, dass fünf Gene, die am D-Serin-/NMDA-Rezeptor-Pathway beteiligt sind, nicht von pathophysiologischer Relevanz bei bipolar affektiven Patienten in der deutschen Bevölkerung sind. Bei zwei untersuchten Genen (*GRIN2A* und *GRIN2B*) ergaben sich schwache Assoziationshinweise, denen in weiterführenden Untersuchungen nachgegangen werden muss. Des Weiteren wird zu klären sein, inwieweit weitere Kandidatengene, deren Produkte innerhalb des identifizierten Pathways liegen, von Bedeutung für die bipolar affektive Störung sind. Abschließend sollten auch Gen-Gen-Interaktionsanalysen durchgeführt werden, um mögliche epistatische Effekte zwischen diesen Genen nachweisen zu können. Gerade das Berücksichtigen von epistatischen Effekten könnte die Identifikation von Krankheitsgenen vereinfachen.

Allgemein ist das Gebiet der Molekulargenetik wie kaum ein anderer wissenschaftlicher Bereich durch die stetige Entwicklung neuer analytischer Methoden einem so kontinuierlichen und tief greifenden Wandel unterworfen. Gerade die Analyse genetisch komplexer Krankheiten wird gegenwärtig durch Innovationen beeinflusst, die sich aus der Zusammenarbeit von Genetik, Biometrie, Bioinformatik und der Klinik ergeben. Derzeit von besonderer Bedeutung ist das Zusammenwirken technischer Weiterentwicklungen mit Hochdurchsatz-Typisierungsmöglichkeiten und der Fortschritte des HapMap-Projekts mit Erfassen der humanen genetischen Variabilität. Hierdurch sind schon gegenwärtig systematische und genomweite Assoziationsuntersuchungen unter Zugrundelegen von bis zu 500.000 SNP-Markern möglich, die das genomweite Erfassen von Kopplungsungleichgewichten ermöglichen. Sofern ausreichend große Stichproben mit Patienten und Kontrollen vorliegen, die auch das Erfassen disponierender Varianten mit geringeren Effekten ermöglichen, werden höchstwahrscheinlich in relativ naher Zukunft weitere Krankheitsgene bei der bipolar affektiven Störung identifiziert werden. Des Weiteren werden biostatistische Verfahren dann das Aufdecken von Gen-Gen- und Gen-Umwelt-Interaktionen ermöglichen. Nach Identifikation von Dispositionsgenen werden funktionelle Untersuchungen klären müssen, wie und auf welchem Wege die gefundenen Genvarianten zu einer veränderten Proteinstruktur, Expression oder Funktion führen. Unter anderem wird der Einsatz transgener Tiermodelle von Bedeutung sein, da hierbei die pathophysiologisch zu Grunde liegenden Prozesse *in vivo* betrachtet werden können.

7 Zusammenfassung

Die bipolar affektive Störung gehört mit einer Lebenszeitprävalenz von ca. 1% zu den häufigen psychiatrischen Erkrankungen des mittleren Erwachsenenalters und ist durch das alternierende Auftreten von manischen und depressiven Episoden gekennzeichnet. Befunde von Familien-, Adoptions- und Zwillingsuntersuchungen zeigen übereinstimmend eine Beteiligung genetischer Faktoren an der Pathogenese bipolar affektiver Erkrankungen. Dabei geht man von einer genetisch komplexen Erkrankung aus, das heißt, die Vererbung folgt nicht einem monogenen Erbgang. Vielmehr ist von mehreren zu Grunde liegenden Krankheitsgenen auszugehen, die in verschiedenen chromosomalen Bereichen liegen und in unterschiedlicher Kombination und mit variablem Gewicht zur Krankheitsprädisposition beitragen. Zudem werden auch Umwelteinflüsse eine wichtige Rolle bei der Krankheitsmanifestation spielen.

Eine Möglichkeit, Krankheitsgene bei genetisch komplexen Erkrankungen zu identifizieren, liegt in der Untersuchung eines Kandidatengens auf Assoziation mit der jeweiligen Störungsform. Unter anderem werden dabei Kandidatengene untersucht, von deren Produkten man eine Beteiligung an der Pathophysiologie der Erkrankung vermutet.

Gegenstand der vorliegenden Arbeit ist eine Assoziationsstudie an einem Fall-Kontroll-Kollektiv mit 325 bipolar affektiven Patienten und 325 Kontrollpersonen. Ziel war die Identifizierung von Dispositionsgenen für die bipolar affektive Störung. Dabei wurden sieben Kandidatengene untersucht, deren korrespondierende Proteine in unterschiedlicher Weise am D-Serin-/NMDA-Rezeptor-Pathway im ZNS beteiligt sind. Hintergrund für die Auswahl dieser Gene waren Studien, die auf eine Beteiligung des D-Serin-/NMDA-Rezeptor-Pathways am Entstehungsprozess bipolar affektiver Störungen hindeuten. Die statistische Auswertung ergab im Bereich von zwei Genen (*GRIN2A* und *GRIN2B*) für einzelne der untersuchten Varianten schwache Assoziationshinweise (*GRIN2B*_139030 $p=0,011$, *GRIN2A*_100195 $p=0,045$). Allerdings halten diese Befunde nicht einer Korrektur auf Multiples Testen stand. Zudem ergaben sich für andere Varianten innerhalb dieser Gene keine Assoziationshinweise, so dass die positiven Ergebnisse sehr vorsichtig bewertet werden müssen. An unabhängigen Stichproben mit bipolar affektiver Störung muss in zukünftigen Studien untersucht werden, ob die erhobenen positiven Befunde replizierbar sind. Für die untersuchten Varianten in den fünf anderen Genen (*GRIN1*, *PSPH*, *SLC1A4*, *SLC6A5*, *SLC6A9*) konnte keine signifikante Assoziation mit der

bipolar affektiven Störung nachgewiesen werden. Somit ist deren Beteiligung an der Pathogenese der Erkrankung in der deutschen Bevölkerung eher unwahrscheinlich.

Die vorliegende Arbeit leistet einen Beitrag bei der Identifizierung der genetischen Ursachen von bipolar affektiven Störungen. Aufgrund der sich fortentwickelnden technischen Möglichkeiten mit Hochdurchsatztypisierungen und der mittlerweile vorliegenden Informationen des HapMap-Projekts ist davon auszugehen, dass in naher Zukunft Krankheitsgene identifiziert werden, die der bipolar affektiven Störung zugrunde liegen.

Teile der vorliegenden Arbeit sind bereits in Publikationen eingeflossen (siehe unten) und werden in weiteren Veröffentlichungen Berücksichtigung finden.

1. Abou Jamra R, Wolf Vilella A, Klein K, Becker T, Schulze TG, Schmael C, Deschner M, Klopp N, Illig T, Propping P, Cichon S, Rietschel M, Nöthen MM, Schumacher J. No association between genetic variants at the *GLYT2* gene and bipolar affective disorder and schizophrenia. *Psychiatr Genet* 2006; 16: 91.
2. Abou Jamra R, Klein K, Wolf Vilella A, Becker T, Schulze TG, Schmael C, Deschner M, Klopp N, Illig T, Propping P, Cichon S, Rietschel M, Nöthen MM, Schumacher J. Association study between genetic variants at the *PIP5K2A* gene locus and schizophrenia and bipolar affective disorder. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 2006; 141: 663-665.
3. Georgi A, Abou Jamra R, Klein K, Wolf Vilella A, Schumacher J, Becker T, Paul T, Schmael C, Höfels S, Klopp N, Illig T, Propping P, Cichon S, Nöthen MM, Schulze TG, Rietschel M. Possible association between genetic variants at the *GRIN1* gene and schizophrenia with lifetime history of depressive symptoms in a German sample. *Psychiatr Genet* 2007; 17: 308-310.
4. Georgi A, Schumacher J, Abboud Leon C, Wolf Vilella A, Klein K, Bößhenz KV, Schirmbeck F, Strohmaier J, Propping P, Schulze T G, Rietschel M, Nöthen MM, Cichon S, Abou Jamra R. No association between genetic variants at the *DGCR2* gene and schizophrenia in a German sample. *Psychiatr Genet* 2008; *in press*

5. Abou Jamra R, Georgi A, Klein K, Wolf Vilella A, Suleiman H, Schulze TG, Propping P, Cichon S, Rietschel M, Nöthen MM, Schumacher J. No association between the D-aspartate oxidase locus and schizophrenia. *Psychiatr Genet* 2008; *in press*

8 Literaturverzeichnis

- Abecasis GR, Noguchi E, Heinzmann A, Traherne JA, Bhattacharyya S, Leaves NI, Anderson GG, Zhang Y, Lench NJ, Carey A, Cardon LR, Moffatt MF, Cookson WO. Extent and distribution of linkage disequilibrium in three genomic regions. *Am J Hum Genet* 2001; 68: 191-197.
- Abi-Dargham A, Gil R, Krystal J, Baldwin RM, Seibyl JP, Bowers M, van Dyck CH, Charney DS, Innis RB, Laruelle M. Increased striatal dopamine transmission in schizophrenia: confirmation in a second cohort. *Am J Psychiatry* 1998; 155: 761-767.
- Addington AM, Gornick M, Sporn AL, Gogtay N, Greenstein D, Lenane M, Gochman P, Baker N, Balkissoon R, Vakkalanka RK, Weinberger DR, Straub RE, Rapoport J. Polymorphisms in the 13q22.2 Gene G72/G30 Are Associated with Childhood-Onset Schizophrenia and Psychosis Not Otherwise Specified. *Biol Psychiatry* 2004; 55: 976-980.
- Allen MG, Cohen S, Pollin W, Greenspan SI. Affective illness in veteran twins: a diagnostic review. *Am J Psychiatry* 1974; 131: 1234-1239.
- American Psychiatric Association. *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders*. Fourth Edition. (DSM-IV). fourth ed. Washington, DC: American Psychiatric Press, 1994.
- Andrew M, McGuffin P, Katz R. Genetic and non-genetic subtypes of major depressive disorder. *Br J Psychiatry* 1998; 173: 523-526.
- Angst J, Sellaro R, Angst F. Long-term outcome and mortality of treated versus untreated bipolar and depressed patients: a preliminary report. *Int J Clin Pract* 1998; 2: 115-119.
- Ardlie KG, Kruglyak L, Seielstad M. Patterns of linkage disequilibrium in the human genome. *Nature Rev Genet* 2002; 3: 299-309.
- Armitage P. Tests for linear trends in proportions and frequencies. *Biometrics* 1955; 11: 375-386.

- Badner JA, Gershon ES. Meta-analysis of whole-genome linkage scans of bipolar disorder and schizophrenia. *Mol Psychiatry* 2002; 7: 405-411.
- Becker T, Knapp M. Maximum-likelihood estimation of haplotype frequencies in nuclear families. *Genet Epidemiol* 2004; 27: 21-32.
- 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.
- Begni S, Moraschi S, Bignotti S, Fumagalli F, Rillosi L, Perez J, Gennarelli M. Association between the G1001C polymorphism in the GRIN1 gene promoter region and schizophrenia. *Biol Psychiatry* 2003; 53: 617-619.
- Benson G. Tandem repeats finder: a program to analyze DNA sequences. *Nucleic Acids Res* 1999; 27: 573-580.
- Berrettini WH. Are Schizophrenic and Bipolar Disorders Related? A Review of Family and Molecular Studies. *Biol Psychiatry* 2000; 48: 531-538.
- Bertelsen A, Harvald B, Hauge M. A Danish twin study of manic-depressive disorders. *Br J Psychiatry* 1977; 130: 330-351.
- Birmaher B, Kennah A, Brent D, Ehmman M, Bridge J, Axelson D. Is bipolar disorder specifically associated with panic disorder in youths? *J Clin Psychiatry* 2002; 63: 414-419.
- Blacker D, Lavori PW, Faraone SV, Tsuang MT. Unipolar relatives in bipolar pedigrees: a search for indicators of underlying bipolarity. *Am J Med Genet* 1993; 48: 192-199.
- Borowsky B, Mezey E, Hoffman BJ. Two glycine transporter variants with distinct localization in the CNS and peripheral tissues are encoded by a common gene. *Neuron* 1993; 10: 851-863.

- Borowsky B, Hoffman BJ. Analysis of a gene encoding two glycine transporter variants reveals alternative promoter usage and a novel gene structure. *J Biol Chem* 1998; 273: 29077-29085.
- Brett PM, Le Bourdelles B, See CG, Whiting PJ, Attwood J, Woodward K, Robertson MM, Kalsi G, Povey S, Gurling HM. Genomic cloning and localization by FISH and linkage analysis of the human gene encoding the primary subunit NMDAR1 (GRIN1) of the NMDA receptor channel. *Ann Hum Genet* 1994; 58: 95-100.
- Cardno A, Marshall EJ, Coid B, Macdonald AM, Ribchester TR, Davies NJ, Venturi P, Jones LA, Lewis SW, Sham PC, Gottesman II, Farmer AE, McGuffin P, Reveley AM, Murray RM. Heritability estimates for psychotic disorders: the Maudsley twin psychosis series. *Arch Gen Psychiatry* 1999; 56: 162-168.
- Chen Y-S, Akula N, Detera-Wadleigh SD, Schulze TG, Thomas J, Potash JB, DePaulo JR, McInnis MG, Cox NJ, McMahon FJ. Findings in an independent sample support an association between bipolar affective disorder and the G72/G30 locus on chromosome 13q33. *Mol Psychiatry* 2004; 9: 87-92.
- Chumakov I, Blumenfeld M, Guerassimenko O, Cavarec L, Palicio M, Abderrahim H, Bougueleret L, Barry C, Tanaka H, La Rosa P, Puech A, Tahri N, Cohen-Akenine A, Delabrosse S, Lisarrague S, Picard F-P, Maurice K, Essioux L, Millasseau P, Grel P, Debailleul V, Simon A-M, Caterina D, Dufaure I, Malekzadeh K, Belova M, Luan J-J, Bouillot M, Sambucy J-L, Primas G, Saumier M, Boubkiri N, Martin-Saumier S, Nasroune M, Peixoto H, Delaye A, Pinchot V, Bastucci M, Guillou S, Chevillon M, Sainz-Fuertes R, Meguenni S, Aurich-Costa J, Cherif D, Gimalac A, Van Duijn C, Gauvreau D, Ouelette G, Fortier I, Realson J, Sherbatich T, Riazanskaia N, Rogaev E, Raeymaekers P, Aerssens J, Konings F, Luyten W, Macciardi F, Sham P, Straub RE, Weinberger DR, Cohen N, Cohen D. Genetic and physiological data implicating the new human gene G72 and the gene for D-amino acid oxidase in schizophrenia. *PNAS* 2002; 99: 13675-13680.

- Clinton SM, Meador-Woodruff JH. Abnormalities of the NMDA Receptor and Associated Intracellular Molecules in the Thalamus in Schizophrenia and Bipolar Disorder. *Neuropsychopharmacology* 2004; 29: 1353-1362.
- Collet JF, Gerin I, Rider MH, Veiga da Cunha M, Van Schaftingen E. Human L-3-phosphoserine phosphatase: sequence, expression and evidence for a phosphoenzyme intermediate. *FEBS Lett* 1997; 408: 281-284.
- Collins C, Duff C, Duncan AM, Planells-Cases R, Sun W, Norremolle A, Michaelis E, Montal M, Worton R, Hayden MR. Mapping of the human NMDA receptor subunit (NMDAR1) and the proposed NMDA receptor glutamate-binding subunit (NMDARA1) to chromosomes 9q34.3 and chromosome 8, respectively. *Genomics* 1993; 17: 237-239.
- Coyle N, Jones I, Robertson E, Lendon C, Craddock N. Variation at the serotonin transporter gene influences susceptibility to bipolar affective puerperal psychosis. *Lancet* 2000; 356: 1490-1491.
- Craddock N, Khodel V, Van Eerdewegh P, Reich T. Mathematical limits of multilocus models: the genetic transmission of bipolar disorder. *Am J Hum Genet* 1995; 57: 690-702.
- Craddock N, Jones I. Genetics of bipolar disorder. *J Med Genet* 1999; 36: 585-594.
- Craddock N, Lendon C. Chromosome Workshop: chromosomes 11, 14, and 15. *Am J Med Genet* 1999; 88: 244-254.
- Craddock N, Dave S, Greening J. Association studies of bipolar disorder. *Bipolar Disord* 2001; 3: 284-298.
- Craddock N, O'Donovan MC, Owen MJ. The genetics of schizophrenia and bipolar disorder: dissecting psychosis. *J Med Genet* 2005; 42: 193-204.
- Curtis D, Kalsi G, Brynjolfsson J, McInnis M, O'Neill J, Smyth C, Moloney E, Murphy P, McQuilin A, Petursson H, Gurling H. Genome scan of pedigrees multiply affected with

bipolar disorder provides further support for the presence of a susceptibility locus on chromosome 12q23-q24, and suggests the presence of additional loci on 1p and 1q. *Psychiatr Genet* 2003; 13: 77-84.

Danysz W, Parsons CG. Glycine and N-Methyl-D-Aspartate Receptors: Physiological Significance and Possible Therapeutic Applications. *Pharmacological Reviews* 1998; 50: 597-664.

Dawson E, Parfitt E, Roberts Q, Daniels J, Lim L, Sham P, Nöthen MM, Propping P, Lanczik M, Maier W, et al. Linkage studies of bipolar disorder in the region of the Darier's disease gene on chromosome 12q23-24.1. *Am J Med Genet* 1995; 60: 94-102.

Detera-Wadleigh SD, Badner JA, Berrettini WH, Yoshikawa T, Goldin LR, Turner G, Rollins DY, Moses T, Sanders AR, Karkera JD, Esterling LE, Zeng J, Ferraro TN, Guroff JJ, Kazuba D, Maxwell ME, Nurnberger JIJ, Gershon ES. A high-density genome scan detects evidence for a bipolar-disorder susceptibility locus on 13q32 and other potential loci on 1q32 and 18p11.2. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96: 5604-5609.

Detera-Wadleigh SD, McMahon FJ. G72/G30 in Schizophrenia and Bipolar Disorder: Review and Meta-analysis. *Biol Psychiatry* 2006; 60: 106-114.

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

Dick DM, Foroud T, Flury L, Bowman ES, Miller MJ, Rau NL, Moe PR, Samavedy N, El-Mallakh R, Manji H, Glitz DA, Meyer ET, Smiley C, Hahn R, Widmark C, McKinney R, Sutton L, Ballas C, Grice D, Berrettini W, Byerley W, Coryell W, DePaulo R, MacKinnon DF, Gershon ES, Kelsoe JR, McMahon FJ, McInnis M, Murphy DL, Reich T, Scheftner W, Nurnberger JIJ. Genomewide linkage analysis of bipolar disorder: a new sample of 250 pedigrees from the National Institute of Mental Health Genetics Initiative. *Am J Hum Genet* 2003; 73: 107-114.

- Ding C, Cantor CR. A high-throughput gene expression analysis technique using competitive PCR and matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight MS. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100: 3059-3064.
- Endicott J, Spitzner RL. A diagnostic interview: the schedule for affective disorders and schizophrenia. *Arch Gen Psychiatry* 1987; 35: 837-844.
- Erlenmeyer-Kimling L, Adamo UH, Rock D, Roberts SA, Bassett AS, Squires-Wheeler E, Cornblatt BA, Endicott J, Pape S, Gottesman II. The New York High-Risk Project. Prevalence and comorbidity of axis I disorders in offspring of schizophrenic parents at 25-year follow-up. *Arch Gen Psychiatry* 1997; 54: 1096-1102.
- Ewald H, Degn B, Mors O, Kruse TA. Significant linkage between bipolar affective disorder and chromosome 12q24. *Psychiatr Genet* 1998; 8: 131-140.
- Faedda GL, Tondo L, Baldessarini RJ, Suppes T, Tohen M. Outcome after rapid vs gradual discontinuation of lithium treatment in bipolar disorders. *Arch Gen Psychiatry* 1993; 50: 448-455.
- Freudenberg J, Cichon S, Nöthen MM, Propping P. Blockstruktur des menschlichen Genoms. Ein Organisationsprinzip der genetischen Variabilität. *Dtsch Arztebl* 2002; 99: 3190-3195.
- Gallagher MJ, Burgess LH, Brunden KR. Characterization of multiple forms of the human glycine transporter type-2. *Brain Res Mol Brain Res* 1999; 70: 101-115.
- Geller B, Badner JA, Tillman R, Christian SL, Bolhofner K, Cook EHJ. Linkage disequilibrium of the brain-derived neurotrophic factor Val66Met polymorphism in children with a prepubertal and early adolescent bipolar disorder phenotype. *Am J Psychiatry* 2004; 161: 1698-1700.
- Gershon ES, Hamovit J, Guroff JJ, Dibble E, Leckman JF, Sceery W, Targum SD, Nurnberger JIJ, Goldin LR, Bunney WEJ. A family study of schizoaffective, bipolar I, bipolar II, unipolar, and normal control probands. *Arch Gen Psychiatry* 1982; 39: 1157-1167.

- Gershon ES, DeLisi LE, Hamovit J, Nurnberger JIJ, Maxwell ME, Schreiber J, Dauphinais D, Dingman CW 2nd, Guroff JJ. A controlled family study of chronic psychoses. Schizophrenia and schizoaffective disorder. *Arch Gen Psychiatry* 1988; 45: 328-336.
- Gershon ES, Badner JA, Detera-Wadleigh SD, Ferraro TN, Berrettini WH. Maternal inheritance and chromosome 18 allele sharing in unilineal bipolar illness pedigrees. *Am J Med Genet* 1996; 67: 202-207.
- Gold PW, Goodwin FK, Chrousos GP. Clinical and biochemical manifestations of depression. Relation to the neurobiology of stress. *N Eng J Med* 1988; 319: 413-420.
- Green EK, Dimitrova A, Grozeva D, McGregor S, Nikolov I, Dwyer S, Preece A, Norton N, Williams H, Williams NM, Jones L, Jones I, O'Donovan MC, Owen MJ, Kirov G, Craddock N. Evidence for linkage disequilibrium at both G72/G30 and D-Amino Acid Oxidase with genetic risk for bipolar disorder (abstract). *Am J Med Genet* 2004; 130B: 26.
- Green EK, Raybould R, Macgregor S, Hyde S, Young AH, O'Donovan MC, Owen MJ, Kirov G, Jones L, Jones I, Craddock N. Genetic variation of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in bipolar disorder: case-control study of over 3000 individuals from the UK. *Br J Psychiatry* 2006; 188: 21-25.
- Grigoriu-Serbanescu M, Martinez M, Nöthen MM, Grinberg M, Sima D, Propping P, Marinescu E, Hrestic M. Different Familial Transmission Patterns in Bipolar I Disorder With Onset Before and After Age 25. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 2001; 105: 765-773.
- Hager J, Hansen L, Vaisse C, Vionnet N, Philippi A, Poller W, Velho G, Carcassi C, Contu L, Julier C, et al. A missense mutation in the glucagon receptor gene is associated with non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Nat Genet* 1995; 9: 299-304.
- Hattori E, Liu C, Badner JA, Bonner TI, Christian SL, Maheshwari M, Detera-Wadleigh SD, Gibbs RA, Gershon ES. Polymorphisms at the G72/G30 Gene Locus, on 13q33, Are

Associated with Bipolar Disorder in Two Independent Pedigree Series. *Am J Hum Genet* 2003; 72: 1131-1140.

Hess SD, Daggett LP, Crona J, Deal C, Lu CC, Urrutia A, Chavez-Noriega L, Ellis SB, Johnson EC, Velicelebi G. Cloning and functional characterization of human heteromeric N-methyl-D-aspartate receptors. *J Pharmacol Exp Ther* 1996; 278: 808-816.

Hofmann K, Duker M, Fink TM, Lichter P, Stoffel W. Human neutral amino acid transporter ASCT1: structure of the gene (SLC1A4) and localization to chromosome 2p13-p15. *Genomics* 1994; 24: 20-26.

Hong CJ, Huo SJ, Yen FC, Tung CL, Pan GM, Tsai SJ. Association study of a brain-derived neurotrophic-factor genetic polymorphism and mood disorders, age of onset and suicidal behavior. *Neuropsychobiology* 2003; 48: 186-189.

Hudson JI, Mangweth B, Pope HGJ, De Col C, Hausmann A, Gutweniger S, Laird NM, Biebl W, Tsuang MT. Family study of affective spectrum disorder. *Arch Gen Psychiatry* 2003; 60: 170-177.

Itokawa M, Yamada K, Iwayama-Shigeno Y, Ishitsuka Y, Detera-Wadleigh SD, Yoshikawa T. Genetic analysis of a functional GRIN2A promoter (GT)_n repeat in bipolar disorder pedigrees in humans. *Neurosci Lett* 2003; 345: 53-56.

Jaeken J, Detheux M, Fryns JP, Collet JF, Alliet P, Van Schaftingen E. Phosphoserine phosphatase deficiency in a patient with Williams syndrome. *J Med Genet* 1997; 34: 594-596.

Jones I, Craddock N. Candidate gene studies of bipolar disorder. *Ann Med* 2001; 33: 248-256.

Kalsi G, Whiting PJ, Bourdelles BL, Callen D, Barnard EA, Gurling HM. Localization of the human NMDAR2D receptor subunit gene (GRIN2D) to 19q13.1-qter, the NMDAR2A subunit gene to 16p13.2 (GRIN2A), and the NMDAR2C subunit gene (GRIN2C) to

17q24-25 using somatic cell hybrid and radiation hybrid mapping panels. *Genomics* 1998; 47: 423-425.

Karp SJ, Masu M, Eki T, Ozawa K, Nakanishi S. Molecular cloning and chromosomal localization of the key subunit of the human N-methyl-D-aspartate receptor. *J Biol Chem* 1993; 268: 3728-3733.

Kelsoe JR, Spence MA, Loetscher E, Foguet M, Sadnovick AD, Remick RA, Flodman P, Khristich J, Mroczkowski-Parker Z, Brown JL, Masser D, Ungerleider S, Rapaport MH, Wishart WL, Luebbert H. A genome survey indicates a possible susceptibility locus for bipolar disorder on chromosome 22. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98: 585-590.

Kendler KS, Gruenberg AM, Tsuang MT. A DSM-III family study of the nonschizophrenic psychotic disorders. *Am J Psychiatry* 1986; 143: 1098-1105.

Kendler KS, Pedersen N, Johnson L, Neale MC, Mathe AA. A pilot Swedish twin study of affective illness, including hospital- and population-ascertained subsamples. *Arch Gen Psychiatry* 1993; 50: 699-700.

Khoury MI, Beaty T, Cohen B. *Fundamentals of genetic epidemiology*. New York, Oxford: Oxford University Press, 1993.

Kieseppa T, Partonen T, Haukka J, Kaprio J, Lonnqvist J. High concordance of bipolar I disorder in a nationwide sample of twins. *Am J Psychiatry* 2004; 161: 1814-1821.

Korostishevsky M, Kaganovich M, Cholostoy A, Ashkenazi M, Ratner Y, Dahary D, Bernstein J, Bening-Abu-Shach U, Ben-Asher E, Lancet D, Ritsner M, Navon R. Is the G72/G30 Locus Associated with Schizophrenia? Single Nucleotide Polymorphisms, Haplotypes, and Gene Expression Analysis. *Biol Psychiatry* 2004; 56: 169-176.

Kremeyer B, Herzberg I, Garcia J, Kerr E, Duque C, Parra V, Vega J, Lopez C, Palacio C, Bedoya G, Ospina J, Ruiz-Linares A. Transmission distortion of BDNF variants to bipolar

disorder type I patients from a South American population isolate. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 2006; 141: 435-439.

Kringlen E. *Heredity and Environment in the Functional Psychoses*. London: Heinemann, 1967.

Lander ES, Linton LM, Birren B, Nusbaum C, Zody MC, Baldwin J, Devon K, Dewar K, Doyle M, FitzHugh W, Funke R, Gage D, Harris K, Heaford A, Howland J, Kann L, Lehoczky J, LeVine R, McEwan P, McKernan K, Meldrim J, Mesirov JP, Miranda C, Morris W, Naylor J, Raymond C, Rosetti M, Santos R, Sheridan A, Sougnez C, Stange-Thomann N, Stojanovic N, Subramanian A, Wyman D, Rogers J, Sulston J, Ainscough R, Beck S, Bentley D, Burton J, Clee C, Carter N, Coulson A, Deadman R, Deloukas P, Dunham A, Dunham I, Durbin R, French L, Grafham D, Gregory S, Hubbard T, Humphray S, Hunt A, Jones M, Lloyd C, McMurray A, Matthews L, Mercer S, Milne S, Mullikin JC, Mungall A, Plumb R, Ross M, Shownkeen R, Sims S, Waterston RH, Wilson RK, Hillier LW, McPershon JD, Marra MA, Mardis ER, Fulton LA, Chinwalla AT, Pepin KH, Gish WR, Chissole SL, Wendl MC, Delehaunty KD, Miner TL, Delehaunty A, Kramer JB, Cook LL, Fulton RS, Johnson DL, Minx PJ, Clifton SW, Hawkins T, Branscomb E, Predki P, Richardson P, Wenning S, Slezak T, Doggett N, Cheng JF, Olson A, Lucas S, Elkin C, Uberbacher E, Frazier M, Gibbs RA, Muzny DM, Scherer SE, Bouck JB, Sodergren EJ, Worley KC, Rives CM, Gorrell JH, Metzker ML, Naylor SL, Kucherlapati RS, Nelson DL, Weinstock GM, Sakaki Y, Fujiyama A, Hattori M, Yada T, Toyoda A, Itoh T, Kawagoe C, Watanabe H, Totoki Y, Taylor T, Weissenbach J, Heilig R, Saurin W, Artiguenave F, Brottier P, Bruls T, Pelletier E, Robert C, Wincker P, Smith DR, Doucette-Stamm L, Rubenfield M, Weinstock K, Lee HM, Dubois J, Rosenthal A, Platzer M, Nyakatura G, Taudien S, Rump A, Yang H, Yu J, Wang J, Huang G, Gu J, Hood L, Rowen L, Madan A, Qin S, Davis RW, Federspiel NA, Abola AP, Proctor MJ, Myers RM, Schmutz J, Dickson M, Grimwood J, Cox DR, Olson MV, Kaul R, Raymond C, Shimizu N, Kawasaki K, Minoshima S, Evans GA, Athanasiou M, Schultz R, Roe BA, Chen F, Pan H, Ramser J, Lehrach H, Reinhardt R, McCombie WR, de la Bastide M, Dedhia N, Blocker H, Hornischer K, Nordsiek G, Agarwala R, Aravind L, Bailey JA, Bateman A, Batzoglu S, Birney E, Bork P, Brown DJ, Burge CB, Cerutti L, Chen HC, Church D, Clamp M, Copley RR, Doerks T, Eddy D, Hermjakob H, Hokamp K, Jang W,

- Johnson LS, Jones TA, Kasif S, Kasprzyk A, Kennedy S, Kent WJ, Kitts P, Koonin EV, Korf I, Kulp D, Lancet D, Lowe TM, McLysaght A, Mikkelsen T, Moran JV, Mulder N, Pollara VJ, Ponting CP, Schuler G, Schultz J, Slater G, Smit AF, Stupka E, Szustakowski J, Thierry-Mieg D, Thierry-Mieg J, Wagner L, Wallis J, Wheeler R, Williams A, Wolf YI, Wolfe KH, Yang SP, Yeh RF, Collins F, Guyer MS, Peterson F, Felsenfeld A, Wetterstrand KA, Patrinos A, Morgan MJ, de Jong P, Catanese JJ, Osoegawa K, Shizuya H, Choi S, Chen YJ, International Human Genome Sequencing Consortium. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 2001; 409: 860-921.
- Laruelle M, Abi-Dargham A, Casanova MF, Toti R, Weinberger DR, Kleinman JE. Selective abnormalities of prefrontal serotonergic receptors in schizophrenia. A postmortem study. *Arch Gen Psychiatry* 1993; 50: 810-818.
- Laruelle M, Abi-Dargham A, Gil R, Kegeles L, Innis RB. Increased dopamine transmission in schizophrenia: relationship to illness phases. *Biol Psychiatry* 1999; 46: 56-72.
- Lasky-Su J, Faraone SV, Glatt SJ, Tsuang MT. Meta-Analysis of the Association Between Two Polymorphisms in the Serotonin Transporter Gene and Affective Disorders. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 2005; 133 B: 110-115.
- Laux G. Affektive Störungen. In: Möller H-J, Laux G, Kapfhammer H-P, eds., *Psychiatrie und Psychotherapie*. 2 ed. Berlin: Springer, 2003: 1151-1232.
- Lewontin RC. The interaction of selection and linkage II. Optimum models. *Genetics* 1964; 50: 757-782.
- Liu J, Juo SH, Dewan A, Grunn A, Tong X, Brito M, Park N, Loth JE, Kanyas K, Lerer B, Endicott J, Penchaszadeh G, Knowles JA, Ott J, Gilliam TC, Baron M. Evidence for a putative bipolar disorder locus on 2p13-16 and other potential loci on 4q31, 7q34, 8q13, 9q31, 10q21-24, 13q32, 14q21 and 17q11-12. *Molecular Psychiatry* 2003; 8: 333-342.

- Liu L, Wong TP, Pozza MF, Lingenhoehl K, Wang Y, Sheng M, Auberson YP, Wang YT. Role of NMDA receptor subtypes in governing the direction of hippocampal synaptic plasticity. *Science* 2004; 304: 1021-1024.
- Liu QR, Lopez-Corcuera B, Mandiyan S, Nelson H, Nelson N. Cloning and expression of a spinal cord- and brain-specific glycine transporter with novel structural features. *J Biol Chem* 1993; 268: 22802-22808.
- Lohoff FW, Sander T, Ferraro TN, Dahl JP, Gallinat J, Berrettini WH. Confirmation of association between the Val66Met polymorphism in the brain-derived neurotrophic factor (BDNF) gene and bipolar I disorder. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 2005; 139: 51-53.
- López-Figueroa AL, Norton CS, López-Figueroa MO, Armellini-Dodel D, Burke S, Akil H, López JF, Watson SJ. Serotonin 5-HT1A, 5-HT1B, and 5-HT2A Receptor mRNA Expression in Subjects with Major Depression, Bipolar Disorder, and Schizophrenia. *Biol Psychiatry* 2004; 55: 225-233.
- Maier W, Lichtermann D, Minges J, Hallmeyer J, Heun R, Benkert O, Levinson DF. Continuity and discontinuity of affective disorders and schizophrenia. Results of a controlled family study. *Arch Gen Psychiatry* 1993; 50: 871-883.
- Maier W, Rietschel M, Lichtermann D, Wildenauer DB. Family and genetic studies on the relationship of schizophrenia to affective disorders. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* 1999; 249, Suppl. 4: IV/57-IV/61.
- Maier W, Schwab S, Rietschel M. Genetik psychiatrischer Störungen. In: Möller H-J, Laux G, Kapfhammer H-P, eds., *Psychiatrie und Psychotherapie*. 2 ed. Berlin: Springer, 2003: 69-105.
- Maier W, Höfgen B, Zobel A, Rietschel M. Genetic models of schizophrenia and bipolar disorder: Overlapping inheritance or discrete genotypes? *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* 2005; 255: 159-166.

- Mandich P, Schito AM, Bellone E, Antonacci R, Finelli P, Rocchi M, Ajmar F. Mapping of the human NMDAR2B receptor subunit gene (GRIN2B) to chromosome 12p12. *Genomics* 1994; 22: 216-218.
- Manji HK, Lenox RH. The nature of bipolar disorder. *J Clin Psychiatry* 2000; 61: 42-57.
- Masan PS. Atypical antipsychotics in the treatment of affective symptoms: a review. *Ann Clin Psychiatry* 2004; 16: 3-13.
- McGuffin P, Rijdsdijk F, Andrew M, Sham P, Katz R, Cardno A. The Heritability of Bipolar Affective Disorder and the Genetic Relationship to Unipolar Depression. *Arch Gen Psychiatry* 2003; 60: 497-502.
- McInnis MG, Lan TH, Willour VL, McMahon FJ, Simpson SG, Addington AM, MacKinnon DF, Potash JB, Mahoney AT, Chellis J, Huo Y, Swift-Scanlan T, Chen H, Koskela R, Stine OC, Jamison KR, Holmans P, Folstein SE, Ranade K, Friddle C, Botstein D, Marr T, Beaty TH, Zandi P, DePaulo JR. Genome-wide scan of bipolar disorder in 65 pedigrees: supportive evidence for linkage at 8q24, 18q22, 4q32, 2p12, and 13q12. *Mol Psychiatry* 2003; 8: 288-298.
- McMahon FJ, Stine OC, Meyers DA, Simpson SG, DePaulo JR. Patterns of maternal transmission in bipolar affective disorder. *Am J Hum Genet* 1995; 56: 1277-1286.
- Meltzer H. Serotonergic dysfunction in depression. *Br J Psychiatry Suppl* 1989; 8: 25-31.
- Mendlewicz J, Rainer JD. Adoption study supporting genetic transmission in manic-depressive illness. *Nature* 1977; 268: 327-329.
- Middleton FA, Pato MT, Gentile KL, Morley CP, Zhao X, Eisener AF, Brown A, Petryshen TL, Kirby AN, Medeiros H, Carvalho C, Macedo A, Dourado A, Coelho I, Valente J, Soares MJ, Ferreira CP, Lei M, Azevedo MH, Kennedy JL, Daly MJ, Sklar P, Pato CN. Genomewide linkage analysis of bipolar disorder by use of a high-density single-nucleotide-polymorphism (SNP) genotyping assay: a comparison with microsatellite

marker assays and finding of significant linkage to chromosome 6q22. *Am J Hum Genet* 2004; 74: 886-897.

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

Möller H-J. Bipolar Disorder and Schizophrenia: Distinct Illnesses or a Continuum? *J Clin Psychiatry* 2003; 64: 23-27.

Morissette J, Villeneuve A, Bordeleau L, Rochette D, Laberge C, Gagné B, Laprise C, Bouchard G, Plante M, Gobeil L, Shink E, Weissenbach J, Barden N. Genome-Wide Search for Linkage of Bipolar Affective Disorders in a Very Large Pedigree Derived From a Homogeneous Population in Quebec Points to a Locus of Major Effect on Chromosome 12q23-q24. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 1999; 88: 567-587.

Morrow JA, Collie IT, Dunbar DR, Walker GB, Shahid M, Hill DR. Molecular cloning and functional expression of the human glycine transporter GlyT2 and chromosomal localisation of the gene in the human genome. *FEBS Lett* 1998; 439: 334-340.

Müller DJ, de Luca V, Sicard T, King N, Strauss J, Kennedy JL. Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) gene and rapid-cycling bipolar disorder: family-based association study. *Br J Psychiatry* 2006; 189: 317-323.

Mundo E, Tharmalingham S, Walker M, Bolonna AA, Kerwin RW, Macciardi F. Linkage disequilibrium between the NMDAR1 gene and Bipolar Disorder. *Am J Hum Genet* 2000; 67: 356.

Mundo E, Tharmalingham S, Neves-Pereira M, Dalton EJ, Macciardi F, Parikh SV, Bolonna A, Kerwin RW, Arranz MJ, Makoff AJ, Kennedy JL. Evidence that the N-methyl-D-aspartate subunit 1 receptor gene (GRIN1) confers susceptibility to bipolar disorder. *Molecular Psychiatry* 2003; 8: 241-245.

- Nakata K, Ujike H, Sakai A, Uchida N, Nomura A, Imamura T, Katsu T, Tanaka Y, Hamamura T, Kuroda S. Association study of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) gene with bipolar disorder. *Neurosci Lett* 2003; 337: 17-20.
- Nemeroff CB. The neurobiology of depression. *Sci Am* 1998; 278: 42-49.
- Neves-Pereira M, Mundo E, Muglia P, King N, Macciardi F, Kennedy JL. The brain-derived neurotrophic factor gene confers susceptibility to bipolar disorder: evidence from a family-based association study. *Am J Hum Genet* 2002; 71: 651-655.
- Nishiguchi N, Shirakawa O, Ono H, Hashimoto T, Maeda K. Novel polymorphism in the gene region encoding the carboxyl-terminal intracellular domain of the NMDA receptor 2B subunit: analysis of association with schizophrenia. *Am J Psychiatry* 2000; 157: 1329-1331.
- Nong Y, Huang YQ, Ju W, Kalia LV, Ahmadian G, Wang YT, Salter MW. Glycine binding primes NMDA receptor internalization. *Nature* 2003; 422: 302-307.
- Okada T, Hashimoto R, Numakawa T, Iijima Y, Kosuga A, Tatsumi M, Kamijima K, Kato T, Kunugi H. A complex polymorphic region in the brain-derived neurotrophic factor (BDNF) gene confers susceptibility to bipolar disorder and affects transcriptional activity. *Mol Psychiatry* 2006; 11: 695-703.
- Oswald P, Del-Favero J, Massat I, Souery D, Claes S, Van Broeckhoven C, Mendlewicz J. Non-replication of the brain-derived neurotrophic factor (BDNF) association in bipolar affective disorder: a Belgian patient-control study. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 2004; 129B: 34-35.
- Pato CN, Pato MT, Kirby A, Petryshen TL, Medeiros H, Carvalho C, Macedo A, Dourado A, Coelho I, Valente J, Soares MJ, Ferreira CP, Lei M, Verner A, Hudson TJ, Morley CP, Kennedy JL, Azevedo MH, Daly MJ, Sklar P. Genome-wide scan in Portuguese Island families implicates multiple loci in bipolar disorder: fine mapping adds support on chromosomes 6 and 11. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 2004; 127: 30-34.

- Poirier J, Davignon J, Bouthillier D, Kogan S, Bertrand P, Gauthier S. Apolipoprotein E polymorphism and Alzheimer's disease. *Lancet* 1993; 342: 697-699.
- Preisig M, Bellivier F, Fenton BT, Baud P, Berney A, Courtet P, Hardy P, Golaz J, Leboyer M, Mallet J, Matthey M-L, Mouthon D, Neidhart E, Nosten-Bertrand M, Stadelmann-Dubuis E, Giumon J, Ferrero F, Buresi C, Malafosse A. Association Between Bipolar Disorder and Monoamine Oxidase A Gene Polymorphisms: Result of a Multicenter Study. *Am J Psychiatry* 2000; 157: 948-955.
- Propping P. *Psychiatrische Genetik. Befunde und Konzepte*. Berlin, Heidelberg, New York, Tokyo: Springer, 1989.
- Reich DE, Cargill M, Bolk S, Ireland J, Sabeti PC, Richter DJ, Lavery T, Kouyoumjian R, Farhadian SF, Ward R, Lander ES. Linkage disequilibrium in the human genome. *Nature* 2001; 411: 199-204.
- Rice J, Reich T, Andreasen NC, Endicott J, Van Eerdewegh M, Fishman R, Hirschfeld RM, Klerman GL. The familial transmission of bipolar illness. *Arch Gen Psychiatry* 1987; 44: 441-447.
- Risch N, Merikangas K. The future of genetic studies of complex human diseases. *Science* 1996; 273: 1516-1517.
- Scarr E, Copolov DL, Dean B. A proposed pathological model in the hippocampus of subjects with schizophrenia. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2001; 28: 70-73.
- Schell MJ. The N-methyl D-aspartate receptor glycine site and D-serine metabolism: an evolutionary perspective. *Phil Trans R Soc Lond B* 2004; 359: 943-964.
- Schumacher J, Abou Jamra R, Freudenberg J, Becker T, Ohlraun S, Otte ACJ, Tullius M, Kovalenko S, Van Den Bogaert A, Maier W, Rietschel M, Propping P, Nöthen MM, Cichon S. Examination of G72 and D-amino-acid oxidase as genetic risk factors for schizophrenia and bipolar affective disorder. *Mol Psychiatry* 2004; 9: 203-207.

- Schumacher J, Abou Jamra R, Becker T, Ohlraun S, Klopp N, Binder EB, Schulze TG, Deschner M, Schmal C, Hofels S, Zobel A, Illig T, Propping P, Holsboer F, Rietschel M, Nöthen MM, Cichon S. Evidence for a relationship between genetic variants at the brain-derived neurotrophic factor (BDNF) locus and major depression. *Biol Psychiatry* 2005; 58: 307-314.
- Schumacher J, Kaneva R, Abou Jamra R, Orozco Diaz G, Ohlraun S, Milanova V, Lee J-A, Rivas F, Mayoral F, Fuerst R, Flaquer A, Windemuth C, Gay E, Sanz S, González MJ, Gil S, Cabaleiro F, Del Rio F, Perez F, Haro F, Kostov C, Chrobov V, Nikolova-Hill A, Stoyanova V, Onchev G, Kremensky I, Strauch K, Schulze TG, Nürnberg P, Gaebel W, Klimke A, Auburger G, Wienker TF, Kalaydjieva L, Propping P, Cichon S, Jablensky A, Rietschel M, Nöthen MM. Genomwide Scan and Fine-Mapping Linkage Studies in Four European Samples with Bipolar Affective Disorder Suggest a New Susceptibility Locus on Chromosome 1p35-p36 and Provides Further Evidence of Loci on Chromosome 4q31 and 6q24. *Am J Hum Genet* 2005; 77: 1102-1111.
- Skibinska M, Hauser J, Czerski PM, Leszczynska-Rodziewicz A, Kosmowska M, Kapelski P, Slopian A, Zakrzewska M, Rybakowski JK. Association analysis of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) gene Val66Met polymorphism in schizophrenia and bipolar affective disorder. *World J Biol Psychiatry* 2004; 5: 215-220.
- Sklar P, Gabriel SB, McInnis MG, Bennett P, Lim YM, Tsan G, Schaffner S, Kirov G, Jones I, Owen M, Craddock N, DePaulo JR, Lander ES. Family-based association study of 76 candidate genes in bipolar disorder: BDNF is a potential risk locus. *Brain-derived neurotrophic factor*. *Mol Psychiatry* 2002; 7: 579-593.
- Sklar P, Gabriel SB, McInnis MG, Bennett P, Lim YM, Tsan G, Schaffner S, Kirov G, Jones I, Owen M, Craddock N, DePaulo JR, Lander ES. Family-based association study of 76 candidate genes in bipolar disorder: BDNF is a potential risk locus. *Mol Psychiatry* 2002; 7: 579-593.

- Spielman RS, McGinnis RE, Ewens WJ. Transmission test for linkage disequilibrium: the insulin gene region and insulin-dependent diabetes mellitus (IDDM). *Am J Hum Genet* 1993; 52: 506-516.
- Stine OC, McMahon FJ, Chen L, Xu J, Meyers DA, MacKinnon DF, Simpson SG, McInnis MG, Rice JP, Goate A, Reich T, Edenberg HJ, Foroud T, Nurnberger JIJ, Detera-Wadleigh SD, Goldin LR, Guroff JJ, Gershon ES, Blehar MC, DePaulo JR. Initial Genome Screen for Bipolar Disorder in the NIMH Genetics Initiative Pedigrees: Chromosomes 2, 11, 13, 14, and X. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 1997; 74: 263-269.
- Strober M, Morell W, Burroughs J, Lampert C, Danforth H, Freeman R. A family study of bipolar I disorder in adolescence. Early onset of symptoms linked to increased familial loading and lithium resistance. *J Affective Disord* 1988; 15: 255-268.
- Takano H, Onodera O, Tanaka H, Mori H, Sakimura K, Hori T, Kobayashi H, Mishina M, Tsuji S. Chromosomal localization of the epsilon 1, epsilon 3 and zeta 1 subunit genes of the human NMDA receptor channel. *Biochem Biophys Res Commun* 1993; 197: 922-926.
- Taylor MA. Are schizophrenia and affective disorder related? A selective literature review. *Am J Psychiatry* 1992; 149: 22-32.
- The International HapMap Consortium. The International HapMap Project. *Nature* 2003; 426: 789-796.
- The International HapMap Consortium. A haplotype map of the human genome. *Nature* 2005; 437: 1299-1320.
- Torgersen S. Genetic factors in moderately severe and mild affective disorders. *Arch Gen Psychiatry* 1986; 43: 222-226.
- Tsuang MT, Faraone SV. *The genetics of mood disorders*. Baltimore: The Johns Hopkins University Press, 1990.

Veiga da Cunha M, Collet JF, Prieur B, Jaeken J, Peeraer Y, Rabbijns A, Van Schaftingen E. Mutations responsible for 3-phosphoserine phosphatase deficiency. *Eur J Hum Genet* 2004; 12: 163-166.

Venter JC, Adams MD, Myers EW, Li PW, Mural RJ, Sutton GG, Smith HO, Yandell M, Evans CA, Holt RA, Gocayne JD, Amanatides P, Ballew RM, Huson DH, Wortman JR, Zhang Q, Kodira CD, Zheng XH, Chen L, Skupski M, Subramanian G, Thomas PD, Zhang J, Gabor Miklos GL, Nelson C, Broder S, Clark AG, Nadeau J, McKusick VA, Zinder N, Levine AJ, Roberts RJ, Simon M, Slayman C, Hunkapiller M, Bolanos R, Delcher A, Dew I, Fasulo D, Flanigan M, Florea L, Halpern A, Hannenhalli S, Kravitz S, Levy S, Mobarry C, Reinert K, Remington K, Abu-Threideh J, Beasley E, Biddick K, Bonazzi V, Brandon R, Cargill M, Chandramouliswaran I, Charlab R, Chaturvedi K, Deng Z, Di Francesco V, Dunn P, Eilbeck K, Evangelista C, Gabrielian AE, Gan W, Ge W, Gong F, Gu Z, Guan P, Heiman TJ, Higgins ME, Ji RR, Ke Z, Ketchum KA, Lai Z, Lei Y, Li Z, Li J, Liang Y, Lin X, Lu F, Merkulov GV, Milshina N, Moore HM, Naik AK, Narayan VA, Neelam B, Nusskern D, Rusch DB, Salzberg S, Shao W, Shue B, Sun J, Wang Z, Wang A, Wang X, Wang J, Wei M, Wides R, Xiao C, Yan C, Yao A, Ye J, Zhan M, Zhang W, Zhang H, Zhao Q, Zheng L, Zhong F, Zhong W, Zhu S, Zhao S, Gilbert D, Baumhueter S, Spier G, Carter C, Cravchik A, Woodage T, Ali F, An H, Awe A, Baldwin D, Baden H, Barnstead M, Barrow I, Beeson K, Busam D, Carver A, Center A, Cheng ML, Curry L, Danaher S, Davenport L, Desilets R, Dietz S, Dodson K, Doup L, Ferriera S, Garg N, Gluecksmann A, Hart B, Haynes J, Haynes C, Heiner C, Hladun S, Hostin D, Houck J, Howland T, Ibegwam C, Johnson J, Kalush F, Kline L, Koduru S, Love A, Mann F, May D, McCawley S, McIntosh T, McMullen I, Moy M, Moy L, Murphy B, Nelson K, Pfannkoch C, Pratts E, Puri V, Qureshi H, Reardon M, Rodriguez R, Rogers YH, Romblad D, Ruhfel B, Scott R, Sitter C, Smallwood M, Stewart E, Strong R, Suh E, Thomas R, Tint NN, Tse S, Vech C, Wang G, Wetter J, Williams S, Williams M, Windsor S, Winn-Deen E, Wolfe K, Zaveri J, Zaveri K, Abril JF, Guigo R, Campbell MJ, Sjolander KV, Karlak B, Kejariwal A, Mi H, Lazareva B, Hatton T, Narechania A, Diemer K, Muruganujan A, Guo N, Sato S, Bafna V, Istrail S, Lippert R, Schwartz R, Walenz B, Yooseph S, Allen D, Basu A, Baxendale J, Blick L, Caminha M, Carnes-Stine J, Caulk P, Chiang YH, Coyne M, Dahlke C, Mays A, Dombroski M, Donnelly M, Ely D,

Esparham S, Fosler C, Gire H, Glanowski S, Glasser K, Glodek A, Gorokhov M, Graham K, Gropman B, Harris M, Heil J, Henderson S, Hoover J, Jennings D, Jordan C, Jordan J, Kasha J, Kagan L, Kraft C, Levitsky A, Lewis M, Liu X, Lopez J, Ma D, Majoros W, McDaniel J, Murphy S, Newman M, Nguyen T, Nguyen N, Nodell M, Pan S, Peck J, Peterson M, Rowe W, Sanders R, Scott J, Simpson M, Smith T, Sprague A, Stockwell T, Turner R, Venter E, Wang M, Wen M, Wu D, Wu M, Xia A, Zandieh A, Zhu X. The sequence of the human genome. *Science* 2001; 291: 1304-1351.

Wang X, He G, Gu N, Yang J, Tang J, Chen Q, Liu X, Shen Y, Qian X, Lin W, Duan Y, Feng G, He L. Association of G72/G30 with schizophrenia in the Chinese population. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 319: 1281-1286.

Weissman MM, Leaf PJ, Tischler GL, Blazer DG, Karno M, Bruce ML, Florio LP. Affective disorders in five United States communities. *Psychol Med* 1988; 18: 141-153.

Wender PH, Kety SS, Rosenthal D, Schlusinger F, Ortmann J, Lunde I. Psychiatric disorders in the biological and adoptive families of adopted individuals with affective disorders. *Arch Gen Psychiatry* 1986; 43: 923-929.

Williams NM, Bowen T, Spurlock G, Norton N, Williams HJ, Hoogendoorn B, Owen MJ, O'Donovan MC. Determination of the genomic structure and mutation screening in schizophrenic individuals for five subunits of the N-methyl-D-aspartate glutamate receptor. *Mol Psychiatry* 2002; 7: 508-514.

Zandi PP, Willour VL, Huo Y, Chellis J, Potash JB, MacKinnon DF, Simpson SG, McMahon FJ, Gershon E, Reich T, Foroud T, Nurnberger JIJ, DePaulo JRJ, McInnis MG. Genome scan of a second wave of NIMH genetics initiative bipolar pedigrees: chromosomes 2, 11, 13, 14, and X. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 2003; 119: 69-76.

Zimmer M, Fink TM, Franke Y, Lichter P, Spiess J. Cloning and structure of the gene encoding the human N-methyl-D-aspartate receptor (NMDAR1). *Gene* 1995; 159: 219-223.

Zubenko GS, Maher B, Hughes HB 3rd, Zubenko WN, Stiffler JS, Kaplan BB, Marazita ML. Genome-wide linkage survey for genetic loci that influence the development of depressive disorders in families with recurrent, early-onset, major depression. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 2003; 123: 1-18.

Danksagung

Vor allem und an erster Stelle gilt mein Dank Herrn Dr. med. Johannes Schumacher für die äußerst kompetente und engagierte Betreuung dieser Arbeit, von der Einführung in das Thema bis zur inhaltlichen Auseinandersetzung mit der schriftlichen Ausarbeitung.

Herrn Professor Dr. med. Peter Propping möchte ich für die Überlassung des Themas sowie die Möglichkeit danken, diese Arbeit am Institut für Humangenetik der Universität Bonn durchführen zu können.

Des Weiteren bedanke ich mich bei Herrn Dr. med. Thomas Schulze für die statistische Auswertung der Assoziationsuntersuchungen.

Ein herzlicher Dank gebührt der Arbeitsgruppe „Psychiatrische Genetik“ für jedwede Hilfestellung und die freundschaftliche Atmosphäre im Labor. Im Einzelnen danke ich Faten Dahdouh, Lucie Florin, Dipl.-Biol. Uwe Hein, Dr. rer. nat. Axel Hillmer, Katrin Klein, Nadine Kluk, Bärbel Lippke und Helge Neidt für ihre große Hilfsbereitschaft.

Ganz besonders herzlich danken möchte ich Herrn Dr. med. Rami Abou Jamra, der zunächst durch die Einarbeitung in das Thema und in die Arbeitsweisen und Techniken, dann durch seine unermüdliche Hilfsbereitschaft, Geduld und äußerst kompetente Unterstützung zu jedem Zeitpunkt wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat.

Mein größter Dank gilt meiner Familie für die Unterstützung während meines Studiums und die Motivation in jeder Lebenslage. Insbesondere danke ich meinem Mann Murillo für seine Zeit inklusive einiger wichtiger Hilfestellungen, die häufige hervorragende Beköstigung und dafür, dass er nie den Glauben an mich verloren hat.