

# Identifikation von Dispositionsgenen bei schizophrenen Störungen

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

vorgelegt von  
Katrin Alexa Concha Klein  
aus Bonn

2009

Angefertigt mit Genehmigung der  
Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: Prof. Dr. P. Propping
2. Gutachter: Prof. Dr. Dr. H. Walter

Tag der Mündlichen Prüfung: 13.10.2009

Aus dem Institut für Humangenetik der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

Direktor: Prof. Dr. P. Propping

Meiner Familie



## **Inhaltsverzeichnis**

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG</b>	<b>8</b>
<b>2</b>	<b>THEORETISCHE GRUNDLAGEN</b>	<b>9</b>
2.1	Schizophrene Störungen	9
2.1.1	Klinisches Erscheinungsbild	9
2.1.2	Epidemiologie, Genetik und Pathophysiologie	11
2.2	Methoden der Genidentifikation bei genetisch komplex vererbten Erkrankungen	13
2.2.1	Kopplungsuntersuchungen	14
2.2.2	Assoziationsuntersuchungen	14
2.2.2.1	Prinzip	14
2.2.2.2	Untersuchungsdesign	17
2.3	Molekulargenetische Befunde bei schizophrenen Störungen	17
2.3.1	Dysbindin (DTNBP1)	18
2.3.2	Neuregulin-1 (NRG1)	18
2.3.3	D-Amino-Acid-Oxidase-Activator (DAOA), D-Amino-Acid-Oxidase (DAO)	19
2.4	In vorliegender Arbeit untersuchte Kandidatengene für schizophrene Störungen	21
2.4.1	Der NMDA-Rezeptor: Aufbau, Struktur und Funktion	21
2.4.1.1	Untereinheit GRIN1	23
2.4.1.2	Untereinheit GRIN2A	23
2.4.1.3	Untereinheit GRIN2B	24
2.4.2	Glutamat- bzw. Glycin-assoziierte Neurotransmitter-Transporter: Aufbau, Struktur und Funktion	25
2.4.2.1	SLC1A4	25
2.4.2.2	SLC6A5	26
2.4.2.3	SLC6A9	26
2.4.3	Phosphoserin-Phosphatase (PSPH): Aufbau, Struktur und Funktion	27
<b>3</b>	<b>FRAGESTELLUNG DIESER ARBEIT</b>	<b>28</b>
<b>4</b>	<b>MATERIAL</b>	<b>29</b>
4.1	Untersuchungskollektiv	29
4.2	Geräte	30
4.3	Chemische Substanzen	30

4.4	Enzyme, Puffer, Nukleotide	30
4.5	Längenstandards	31
4.6	STR-Marker, synthetische Oligonukleotide	31
4.7	SNPs	33
4.8	Software	35
<b>5</b>	<b>METHODEN</b>	<b>36</b>
5.1	Gewinnung humaner DNA	36
5.1.1	Isolierung und Aufbereitung humaner DNA	36
5.1.2	Konzentrations- und Reinheitsbestimmung der isolierten DNA	37
5.2	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	37
5.3	Agarosegel-Elektrophorese	39
5.4	Elektrophorese im Sequencer	40
5.4.1	Vorbereitungen	40
5.4.1.1	Vorbehandlung der Glasplatten	40
5.4.1.2	Herstellung der Gelstocklösung	41
5.4.1.3	Herstellung des 4,25%igen Polyacrylamidgels	41
5.4.2	Elektrophorese	41
5.4.3	Bestimmung der PCR-Fragmentlängen mittels Genotyper	42
5.4.4	Analyse der Genotypen	42
5.5	Statistische Auswertung	42
<b>6</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>44</b>
6.1	GRIN1	44
6.1.1	Einzelmarker-Analyse	44
6.1.2	Haplotyp-Analyse	46
6.2	GRIN2A	46
6.2.1	Einzelmarker-Analyse	46
6.2.2	Haplotyp-Analyse	46
6.3	GRIN2B	47
6.3.1	Einzelmarker-Analyse	47
6.3.2	Haplotyp-Analyse	49
6.4	SLC1A4	49

6.4.1	Einzelmarker-Analyse	49
6.4.2	Haplotyp-Analyse	49
6.5	SLC6A5	50
6.5.1	Einzelmarker-Analyse	50
6.5.2	Haplotyp-Analyse	50
6.6	SLC6A9	52
6.6.1	Einzelmarker-Analyse	52
6.6.2	Haplotyp-Analyse	52
6.7	PSPH	52
6.7.1	Einzelmarker-Analyse	52
6.7.2	Haplotyp-Analyse	53
<b>7</b>	<b>DISKUSSION</b>	<b>54</b>
7.1	Ansatz, Aufbau und Methodik vorliegender Arbeit	54
7.2	Ergebnisdiskussion	55
7.2.1	NMDA-Rezeptor-Untereinheiten	56
7.2.1.1	GRIN1	56
7.2.1.2	GRIN2A	59
7.2.1.3	GRIN2B	60
7.2.2	Glutamat- bzw. Glycin-assoziierte Neurotransmitter-Transporter	62
7.2.2.1	SLC1A4	62
7.2.2.2	SLC6A5	63
7.2.2.3	SLC6A9	63
7.2.3	Das Enzym Phosphoserin-Phosphatase (PSPH)	63
7.3	Ausblick	64
<b>8</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>66</b>
<b>9</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>67</b>
<b>10</b>	<b>DANKSAGUNG</b>	<b>78</b>
<b>11</b>	<b>LEBENS LAUF</b>	<b>79</b>

## **1 Einleitung**

Die schizophrenen Störungen gehören zu der Gruppe der endogenen Psychosen, bei denen hereditäre Faktoren als wichtige Teilursache angesehen werden. Mit einem lebenslangen Morbiditätsrisiko von ca. 1% bei beiden Geschlechtern sind sie eine der häufigsten psychiatrischen Krankheiten. Hinsichtlich der Prognose handelt es sich zudem um eine der schwerwiegendsten psychiatrischen Erkrankungen: Im Allgemeinen manifestiert sich die Krankheit im späten Adoleszenten- oder frühen Erwachsenenalter und persistiert daraufhin oftmals (Sartorius et al., 1986). Männer erkranken im Durchschnitt etwas früher als Frauen (Häfner, 1995; Huber, 1999). Nur 30% aller Patienten erleben nach dem ersten Schub eine Vollremission, ca. 50% entwickeln im Verlauf der Erkrankung starke emotionale, soziale und/oder kognitive Defizite. Sie stellen für die Patienten, deren Familien und nicht zuletzt für die Gesellschaft eine große Belastung dar. Zudem ist die Suizidrate hoch: Die Hälfte aller Patienten mit einer schizophrenen Störung wird im Laufe ihres Lebens einen Suizidversuch unternehmen, 10% versterben daran (Caldwell und Gottesman, 1992).

Die molekulare Genetik bietet derzeit einen der erfolgversprechendsten Ansätze bei der Detektion ursächlicher Faktoren schizophrener Störungen, nicht zuletzt wegen der enormen Weiterentwicklung ihrer methodischen Möglichkeiten. Neuere Assoziationsbefunde (Chumakov et al., 2002) weisen auf eine Bedeutung der glutamatergen Neurotransmission bei der Entstehung schizophrener Störungen hin. Diese molekulargenetischen Hinweise bilden die Grundlage dieser Arbeit.

## **2 Theoretische Grundlagen**

### **2.1 Schizophrene Störungen**

#### **2.1.1 Klinisches Erscheinungsbild**

Die Erscheinungsbilder schizophrener Störungen sind seit langem bekannt. Erste, sehr differenzierte klinische Beschreibungen finden sich im frühen 19. Jahrhundert unter anderem in Frankreich bei Pinel (1809) und in Großbritannien bei Haslam (1809). 1898 fasste der deutsche Psychiater Kraepelin die bis dahin mit verschiedenen Begriffen belegten Erscheinungsbilder unter der Krankheitsbezeichnung „Dementia praecox“ zusammen. Damit bezog er sich auf den starken geistigen Abbau, der im Verlauf der Krankheit entstehen kann. 1911 führte Bleuler den auch heute noch verwendeten Terminus „Schizophrenie“ ein, um damit den Zustand der Bewusstseinspaltung bei den Patienten deutlicher hervorzuheben. Schneider trug 1939 durch die Differenzierung in Symptome ersten und zweiten Ranges erheblich zur Operationalisierung der Diagnostik schizophrener Störungen bei.

Kennzeichnend für schizophrene Störungen ist ein Komplex psychopathologischer Symptome: Nach Schneider (1939), dessen Konzept auch maßgeblich in die heute gültige ICD-10-Klassifikation (WHO, 1992) eingeflossen ist, wird zwischen sogenannten Erst- und Zweitrangsymptomen unterschieden. An für die Diagnose maßgebenden Symptomen ersten Ranges werden Wahnwahrnehmungen, Störungen des Ich-Erlebens sowie dialogisierende akustische Halluzinationen genannt. Als Symptome zweiten Ranges gelten unter anderem gustatorische, olfaktorische oder optische Halluzinationen, Wahneinfälle und Zönästhesien. Das klinische Erscheinungsbild imponiert zudem durch mehr oder minder starke Beeinträchtigungen der Affektivität und des Antriebs, sowie durch Einschränkungen in fast allen psychosozialen Bereichen. Die geschilderte Kernsymptomatik schizophrener Störungen zeigt sich in allen Bevölkerungen gleich, wenn auch die Ausgestaltung kulturspezifische Unterschiede aufweist.

Je nach vorherrschender Symptomatik werden traditionell fünf Subtypen der Schizophrenie unterschieden:

- 1.) Die hebephrene Form: auftretend meist in der Pubertät, gekennzeichnet durch stark ausgeprägte affektive Störungen, formale Denkstörungen sowie Störungen im Sozialverhalten.

- 2.) Die katatone Form: psychomotorische Störungen wie Hyperkinese oder Stupor, Bewegungsautomatismen, besonders risikoreich wegen der Gefahr einer vegetativen Entgleisung.
- 3.) Die paranoid-halluzinatorische Form: geprägt durch produktive Symptomatik wie Wahn und Halluzinationen.
- 4.) Der Residualtyp: er führt zu starken Persönlichkeitsveränderungen mit überwiegender Negativsymptomatik.
- 5.) Die Schizophrenia simplex: ohne Auftreten von Produktivsymptomatik kommt es schleichend zu einem Residualtyp.

Die neueren operationalisierten Diagnosesysteme, ICD-10 (WHO, 1992) und DSM-IV (American Psychiatric Association, 1994), basieren auf dieser traditionellen Einteilung (siehe Tabelle 1), allerdings weichen ihre diagnostischen Definitionen und z. T. auch die Systematiken davon ab.

**Tabelle 1: Klassifikation der Subtypen schizophrener Störungen nach ICD-10 und DSM-IV**

<b>ICD-10</b>	<b>DSM-IV</b>
Hebephrener Typ	Desorganisierter Typ
Katatone Schizophrenie	Katatoner Typ
Paranoide Schizophrenie	Paranoider Typ
Undifferenzierte Schizophrenie	Undifferenzierter Typ
Schizophrenes Residuum	Residualtyp
Schizophrenia simplex	
Postschizophrene Depression	

Im Verlauf eines schizophrenen Schubes werden meist drei typische Phasen durchlaufen:

- 1.) Die Prodromalphase: keine schizophrene Symptomatik, jedoch Sinken des Leistungsniveaus, sozialer Rückzug, Vernachlässigung der Hygiene, erste Kommunikations-, Denk- und Wahrnehmungsstörungen.
- 2.) Die akute Phase: die schizophrene Symptomatik steht im Vordergrund, oft durch psychosozialen Stress ausgelöst.
- 3.) Die Residualphase: Besserung des Leistungsniveaus, meist jedoch noch allgemein beeinträchtigter Zustand mit unterschiedlicher Dauer.

Die gesamte Verlaufstypologie der schizophrenen Störungen ist sehr vielgestaltig, manche Autoren bzw. Klassifikationssysteme unterscheiden bis zu zehn unterschiedliche Verlaufsformen (siehe Tabelle 2).

**Tabelle 2: Verlaufsformen der Schizophrenie nach Bleuler**

<b>Einfache Verläufe</b>	<b>Prozentsatz</b>
akut zu schweren chronischen Zuständen	< 1%
chronisch zu schweren chronischen Zuständen	5- 10%
akut zu leichten chronischen Zuständen	5%
chronisch zu leichten chronischen Zuständen	15- 25%
<b>Wellenförmige Verläufe</b>	
wellenförmig zu schweren chronischen Zuständen	5%
wellenförmig zu leichten chronischen Zuständen	20- 25%
Heilung nach wellenförmigem Verlauf	35- 40%
<b>Andere Verläufe</b>	5%

Zum Verlauf der Erkrankung ist zu sagen, dass der Erstmanifestation nur in etwa 30% der Fälle eine Vollremission folgt, bei weiteren 20% kommt es nach mehreren Krankheitsschüben zur Ausheilung. Ca. 50% der Patienten entwickeln jedoch nach mehreren Krankheitsepisoden sogenannte Residualzustände bzw. Defektsyndrome. Statistisch gesehen werden 50% der Patienten mindestens einmal im Leben einen Suizidversuch unternehmen. Diese empirischen Daten unterstreichen die Bedeutung der Ursachenforschung bei schizophrenen Störungen.

### **2.1.2 Epidemiologie, Genetik und Pathophysiologie**

Mit einem lebenslangen Morbiditätsrisiko von etwa 1%, unabhängig von Geschlecht oder soziokulturellem Hintergrund, gehört die Schizophrenie zu den häufigen sogenannten Volkskrankheiten. Die jährliche Inzidenzrate in der Bevölkerung beträgt 0,05%. Das Prädilektionsalter liegt zwischen der Pubertät und dem jungen Erwachsenenalter, in der Regel bei Männern etwas früher als bei Frauen (Häfner, 1995; Huber, 1999). Bis zum 40. Lebensjahr der Patienten haben sich 80% der schizophrenen Psychosen manifestiert.

Ätiologisch geht man von einer multifaktoriellen Genese aus, in deren Zentrum eine genetisch bedingte Vulnerabilität steht. Die genetische Komponente ist der bislang stärkste erkannte Risikofaktor der Schizophrenie. Hierbei wird von einem komplexen genetischen Erbgang ausgegangen, bei dem mehrere Genveränderungen gleichzeitig der Erkrankung zugrunde liegen und in Wechselwirkung (Epistase) zueinander zur Krankheitsprädisposition beitragen. Das

klinische Erscheinungsbild dürfte dabei einen Endzustand darstellen, zu dem auch nicht-genetische Faktoren beigetragen haben (Propping, 1989). Vor dem komplexen Hintergrund schizophrener Psychosen werden gegenwärtig zwei genetische Modelle diskutiert: Das oligogene Modell, bei dem wenige Genveränderungen mit jeweils starkem Effekt zur Erkrankung beitragen, und das polygene Modell, bei dem viele Gene mit jeweils geringem Effekt zur Erkrankung beitragen. Aktuell wird von mehreren Arbeitsgruppen das polygene Modell favorisiert. Dieses setzt jedoch eine hohe Frequenz jeder einzelnen Genvariante in der Bevölkerung voraus.

Allgemein konnte die erbliche Komponente der Schizophrenie durch Familienstudien belegt werden. Die wohl umfangreichste Arbeit in diesem Bereich stammt von Irving Gottesman (1991): Die Ergebnisse von insgesamt 40 europäischen Familienstudien fasste er in einer Analyse zusammen. In dieser belegt er empirisch, dass innerhalb der betroffenen Familien vor allem zwei Faktoren das Erkrankungsrisiko erhöhen: Die verwandtschaftliche Nähe zu der erkrankten Person einerseits, sowie die Anzahl der Erkrankten innerhalb der Familie andererseits (siehe Tabelle 3). So steigt beispielsweise das Lebenszeitrisko eines Kindes mit einem schizophrenen Elternteil von 1% (Basisrisiko) auf 13%, bei zwei schizophrenen Elternteilen sogar auf 46%. Verwandte zweiten Grades erkranken zwei- bis dreimal häufiger als Verwandte dritten Grades. Das höchste Erkrankungsrisiko haben monozygote Zwillinge von Erkrankten; ihre Konkordanzrate liegt bei 48%.

**Tabelle 3: Lebenszeitrisko für schizophrene Störungen Angehöriger von Patienten, nach Gottesman (1991)**

Verwandtschaftsgrad	Anteil aufgrund der Abstammung gemeinsamer Gene	Morbiditätsrisiko
		1%
Dritter Grad	12,5%	
Cousins, Cousinsen		2%
Zweiter Grad	25%	
Enkel		5%
Erster Grad	50%	
Eltern		6%
Geschwister		9%
Kinder		13%
Geschwister bei einem zusätzlich betroffenen Elternteil		17%
Kind mit zwei betroffenen Elternteilen		46%
Zwillinge		
dizygot	50%	17%
monozygot	100%	48%

Auch Zwillings- und Adoptionsstudien (Ingraham und Kety, 2000) bestätigen das Zugrundeliegen genetischer Komponenten, zum Beispiel ändern sich die Inzidenzraten durch Wegadoption von Kindern schizophrener Eltern nicht. Vor allem Zwillingsstudien zeigen aber auch – durch den großen Anteil diskordanter monozygoter Zwillinge – die Bedeutung von nicht-genetischen Faktoren bei der Entstehung der Schizophrenie. Unter diesen nicht-genetischen Einflüssen werden prä- und perinatale Schädigungen, soziale Deprivation, ein urbanes Umfeld etc. kontrovers diskutiert.

Als pathophysiologische Ursachen schizophrener Erkrankungen werden seit längerem Störungen unterschiedlicher Neurotransmittersysteme diskutiert. Zum Beispiel führte die Beobachtung, dass Substanzen, die im ZNS Dopamin freisetzen (etwa Amphetamin), schizophrene Symptome auslösen können, während Stoffe, die Dopaminrezeptoren im ZNS blockieren (etwa Neuroleptika), antipsychotisch wirken, zu der Annahme, dass die Schizophrenie durch eine funktionelle Überaktivität des dopaminergen Systems bedingt ist. Entsprechend basiert auch ein großer Teil der pharmakologischen Behandlung schizophrener Patienten auf dieser Hypothese. Neuere Untersuchungen postulieren allerdings, dass die Änderungen des dopaminergen Systems wahrscheinlich nicht die eigentliche Ursache der Schizophrenie darstellen, sondern Folgen einer weitaus komplexer veränderten Erregungsübertragung an kortikalen glutamatergen Synapsen sind (Laruelle et al., 2003). Diese Hypothese stützen auch die neuesten Assoziationsfunde mehrerer Gene wie der *D-Amino-Acid-Oxidase (DAO)*, des *D-Amino-Acid-Oxidase-Activators (DAOA)*, des *Dysbindin-1 (DTNBP1)* und des *Neuregulin-1 (NRG1)*, die alle in den Stoffwechsel glutamaterger kortikaler Synapsen eingreifen und so in pathogenetischem Zusammenhang mit der Schizophrenie stehen könnten (O'Donovan et al., 2003; Owen et al., 2005).

## **2.2 Methoden der Genidentifikation bei genetisch komplexen Erkrankungen**

Um eine Erkrankung effektiv behandeln zu können, ist das Wissen um die verursachenden Faktoren von größter Bedeutung. Die molekulargenetische Forschung zielt darauf ab, die Gene zu identifizieren, die den Erkrankungen zugrunde liegen. Dabei stellen aber gerade die komplex vererbten psychiatrischen Erkrankungen eine besondere Herausforderung dar, da die Identifikation von krankheitsverursachenden Genen durch eine wahrscheinlich hohe Frequenz der jeweiligen Veränderungen in der Bevölkerung erschwert wird. Zudem bereiten die Locus-Heterogenität und die inkomplette Penetranz zusätzliche Probleme bei der Genidentifikation.

Zwei Methoden stehen bei der Genidentifikation grundsätzlich zur Verfügung: Kopplungs- und Assoziationsuntersuchungen.

### **2.2.1 Kopplungsuntersuchungen**

Kopplung beschreibt die gemeinsame Vererbung (Kosegregation) eines genetischen Markers mit einem Phänotyp, z. B. einer Krankheit, innerhalb einer Familie. Ein genetischer Marker ist eine variable DNA-Sequenz, deren genomische Lokalisation bekannt ist. Je geringer die genetische Distanz zwischen dem Marker und dem krankheitsverursachenden Gen ist, desto geringer ist die Wahrscheinlichkeit, dass beide durch ein Rekombinationsereignis (crossing over) in der Meiose getrennt werden. Aus einem Kopplungsbefund lassen sich somit Rückschlüsse über die chromosomale Lage eines potentiellen Krankheitsgens treffen.

Als Maß für die Wahrscheinlichkeit einer genetischen Kopplung zweier Loci dient der LOD-Score. Als LOD- (logarithm of the odds-) Score wird der dekadische Logarithmus der Wahrscheinlichkeit für das gemeinsame Auftreten zweier Loci unter Annahme einer bestimmten Rekombinationswahrscheinlichkeit ( $\theta < 0,5$ ), geteilt durch die entsprechende Wahrscheinlichkeit unter Annahme freier Rekombination ( $\theta = 0,5$ ), bezeichnet. Ein LOD-Score gilt als signifikant, wenn er mindestens = 3 ist, also das Verhältnis der Wahrscheinlichkeiten den Wert 1000 übersteigt. Dies entspricht wegen der multiplen Vergleiche etwa einem p-Wert  $< 0,05$ . Ein LOD-Score von -2 oder weniger spricht dafür, dass keine Kopplung vorliegt. Der LOD-Score hat seine größte Aussagekraft bei parametrischen Kopplungsanalysen, d. h. wenn dem Kopplungsansatz bestimmte Aussagen über Parameter der Krankheit zugrunde gelegt werden. Kopplungsanalysen ermöglichen aber auch, ohne jede Hypothese bezüglich der Pathophysiologie einer Erkrankung nach ursächlichen Genorten zu suchen. Ein Nachteil dabei ist, dass nur Gene mit einem moderaten bis starken krankheitsprädisponierenden Anteil erfasst werden können.

### **2.2.2 Assoziationsuntersuchungen**

#### **2.2.2.1 Prinzip**

Assoziation bezeichnet das überzufällig häufige Auftreten eines Risikofaktors wie z. B. einer bestimmten DNA-Sequenzvariante in einem Patientenkollektiv, verglichen mit einem Kontrollkollektiv. Eine Assoziation kann folgende Ursachen haben:

- 1.) Das untersuchte Allel trägt direkt zu der Krankheit bei, z. B. durch eine Veränderung der Genexpression oder der Aminosäuresequenz des Genproduktes. Das Vorhandensein dieses untersuchten Allels muss weder notwendig noch ausreichend sein, damit die Krankheit auftritt, es erhöht aber die Wahrscheinlichkeit.
- 2.) Das untersuchte Allel trägt nicht direkt zu der Krankheit bei, liegt aber in engster räumlicher Nähe zu einem am Krankheitsgeschehen beteiligten Genort, und es besteht ein Kopplungsungleichgewicht (linkage disequilibrium, LD) zwischen dem untersuchten und dem krankheitsverursachenden Allel. Unter einem Kopplungsungleichgewicht versteht man die Verknüpfung eines bestimmten Markerallels mit der genetischen Veränderung in der Population. Es lässt sich nur dann finden, wenn viele Patienten, auch wenn nicht unmittelbar verwandt, die gleiche chromosomale Region von einem gemeinsamen Vorfahren geerbt haben (Gründereffekt). Das Kopplungsungleichgewicht bleibt in einer Population nur unter bestimmten Bedingungen erhalten. Unter anderem darf nicht wiederholt die gleiche Mutation bei unabhängigen Personen auftreten, den Trägern der Mutation darf kein Selektionsnachteil entstanden sein, und es dürfen keine häufigen Rekombinationen zwischen den beiden Genorten stattfinden. Untersuchungen zum Organisationsprinzip des Kopplungsungleichgewichts haben dabei Hinweise auf eine Blockstruktur geliefert, bei der sich ausgedehnte Regionen, in denen fast keine Rekombinationsereignisse stattgefunden haben, mit sog. Hotspots der Rekombination abwechseln (Freudenberg et al., 2002). Der Ausprägungsgrad eines Kopplungsungleichgewichts und die Distanz, über die es sich erstreckt, variieren zwischen verschiedenen genomischen Regionen und Populationen. Bei der europäischen Population scheint sich ein LD durchschnittlich über Distanzen von ca. 10-30 Kb zu erstrecken (Ardlie et al., 2002). Je nach genomischer Region kann sich ein Kopplungsungleichgewicht aber auch über viel größere Distanzen erstrecken (Abecasis et al., 2001; Reich et al., 2001).
- 3.) Ein Fehler erster Art, also eine falsch-positive Assoziation, ist ebenfalls möglich. Dieser kann z. B. eintreten, wenn die verglichenen Kollektive aus unterschiedlichen ethnischen Gruppen kommen (genetische Stratifikation).

Der Grad der Assoziation lässt sich als relatives Risiko beschreiben. Das relative Risiko sagt aus, wie viel mal wahrscheinlicher eine Erkrankung bei Trägern eines bestimmten Allels auftritt als bei Personen, die dieses Allel nicht tragen. Es lässt sich unter bestimmten Voraussetzungen

(geringe Frequenz der Krankheit in der Allgemeinbevölkerung) mittels Berechnung der "odds ratio" (OR) abschätzen:

$$\text{OR} = \frac{a \times b}{c \times d}$$

Dabei sind:

a = Anzahl der erkrankten Allelträger

b = Anzahl der gesunden Nicht-Allelträger

c = Anzahl der erkrankten Nicht-Allelträger

d = Anzahl der gesunden Allelträger.

Neben dem relativen Risiko, welches das Erkrankungsrisiko für Träger eines bestimmten Allels im Vergleich zu Nichtträgern angibt, ist die Bedeutung eines Allels für die Erkrankungshäufigkeit in der Allgemeinbevölkerung ebenfalls von Interesse. Dies wird durch die sog. ätiologische Fraktion (ÄF) abgeschätzt (Khoury et al., 1993). Sie gibt den Anteil der Krankheitsfälle in der Bevölkerung an, der auf das Vorhandensein des assoziierten Allels zurückzuführen ist.

$$\text{ÄF} = \frac{f(\text{OR} - 1)}{1 + f(\text{OR} - 1)}$$

Grundsätzlich lassen sich mit Assoziationsuntersuchungen einzelne Gene untersuchen. Hierbei muss zwischen einem funktionellen Kandidatengenansatz, bei dem aufgrund pathophysiologischer Hypothesen bestimmte Gene benannt und analysiert werden, und einem positionellen Ansatz unterschieden werden. Beim positionellen Ansatz werden Gene untersucht, die in chromosomalen Regionen lokalisiert sind, für die es Hinweise auf das Vorliegen von Krankheitsgenen gibt. Abgesehen von den Kandidatengenansätzen können mittlerweile aber auch ganze chromosomale Abschnitte oder das gesamte Genom auf Assoziation hin untersucht werden.

Beim Kandidatengenansatz werden sowohl in der kodierenden Sequenz des Gens als auch in nicht kodierenden sowie flankierenden Abschnitten genetische Varianten gewählt. Bei diesen Varianten kann es sich um alle Arten von Polymorphismen handeln. Meist werden jedoch sog. *Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs)* untersucht, oder aber Mikrosatellitenmarker (*Short Tandem Repeats, STRs*). SNPs sind die häufigsten genetischen Varianten zwischen Individuen und Gesamtpopulation. Es handelt sich dabei um biallelische DNA-Varianten, die durch

einfachen Basenaustausch zustande kommen. Im menschlichen Genom, das ca. drei Milliarden Basenpaare umfasst, treten SNPs durchschnittlich alle 1000 Nukleotide auf. Mittels neuerer Methoden wie zum Beispiel dem massenspektrometrischen MALDI-TOF-Verfahren ist eine hocheffiziente high-throughput-Analyse von SNPs möglich.

Mikrosatellitenmarker (STRs) sind kurze, repetitive DNA-Sequenzen von ein bis vier Nukleotiden. Die Anzahl der Repeateinheiten ist hierbei variabel, so dass ein genetischer Polymorphismus entsteht. An den meisten STR-Loci lassen sich zwischen fünf und zehn Allele unterscheiden, die aufgrund ihrer unterschiedlichen Länge zum Beispiel in der Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennt und mittels Laser detektiert werden können. Bisher sind genomweit weit über 10.000 STRs mit ihrer chromosomalen Lokalisation bekannt.

### **2.2.2.2 Untersuchungsdesign**

Für Assoziationsuntersuchungen stehen zwei methodisch unterschiedliche Ansätze zur Verfügung:

- 1.) Fall-Kontroll-Untersuchung (*case-control study*): Bei der klassischen Fall-Kontroll-Assoziationsstudie wird untersucht, ob sich die Allel- und Genotypfrequenzen zwischen einem Patienten- und einem Kontrollkollektiv unterscheiden. Ein Vorteil ist die Möglichkeit der schnellen, effektiven Rekrutierung sowohl von Patienten- als auch von Kontrollkollektiven. Eine Schwierigkeit ist jedoch das Erstellen von genetisch vergleichbaren Kollektiven. Allelfrequenzen können in verschiedenen ethnischen Subpopulationen voneinander abweichen, so dass es zu Stratifikationseffekten und damit möglicherweise zu falschen Assoziationen kommt. Dieses Problem versucht man dadurch zu vermeiden, dass man Patienten- und Kontrollkollektiv mit ethnisch gleichem Hintergrund rekrutiert.
- 2.) Familienbasierte Untersuchung (*family-based study*): Bei der familienbasierten Assoziationsstudie werden Patienten samt deren Eltern untersucht. Hierbei lässt sich die Problematik des Stratifikationseffektes umgehen, nachteilig ist aber der deutlich höhere Aufwand beim Kollektivaufbau.

## **2.3 Molekulargenetische Befunde bei schizophrenen Störungen**

Molekulargenetische Untersuchungen bei genetisch komplexen Erkrankungen werden international seit Mitte der 80er Jahre des letzten Jahrhunderts durchgeführt. Durch das rasche

Fortschreiten der technischen Möglichkeiten sowie die vollständige Beschreibung des menschlichen Genoms durch das Humane Genomprojekt ist die Durchführung molekulargenetischer Analysen in den letzten Jahren erheblich verbessert worden. Trotz dieser Entwicklungen sieht sich aber speziell das Gebiet der psychiatrischen Genetik einer großen Herausforderung gegenüber. Zu einer geschätzten Heritabilität von 65-85% (Cannon et al., 1998a; Levinson und Mowry, 2000; Owen et al., 2002) bei der schizophrenen Psychose kommen unzählige nicht-hereditäre Faktoren hinzu. Die Entschlüsselung von Dispositionsgenen ist zudem durch das Vorliegen wahrscheinlich mehrerer Dispositionsgene mit jeweils geringem Krankheitseffekt stark erschwert. Viele positive Kopplungs- und Assoziationsbefunde, die anfangs für Euphorie sorgten, konnten nicht repliziert werden. Erst in jüngster Zeit konnten mehrere putative Dispositionsgene durch systematische Untersuchungen auf Kopplungsungleichgewicht in zuvor identifizierten Kopplungsregionen detektiert werden (O'Donovan et al., 2003; Übersichtsarbeiten von Riley und McGuffin, 2000). Ihre Bedeutung an der Krankheitsentstehung scheint anhand positiver Replikationsbefunde mittlerweile belegt. Im Folgenden sollen nur die für diese Arbeit wichtigsten Vorbefunde dargestellt werden.

### **2.3.1 Dysbindin (DTNBP1)**

Drei Arbeitsgruppen fanden durch genomweite Kopplungsanalysen in der chromosomalen Region 6p22-p24 Kopplungshinweise bei schizophrenen Störungen (Übersichtsarbeiten von Riley und McGuffin, 2000; Sklar, 2002). Straub et al. (2002) konnten daraufhin durch eine systematische Untersuchung auf Kopplungsungleichgewicht *Dysbindin (DTNBP1)* in der chromosomalen Region 6p22.3 als Kandidatengen für schizophrene Störungen identifizieren, bei Untersuchungen ergaben sich für mehrere genetische Marker signifikante Assoziationshinweise bei schizophrenen Patienten. Die Ergebnisse wurden mehrfach an unabhängigen Kollektiven repliziert (Schwab et al., 2003; Van den Bogaert et al., 2003; Williams et al., 2004). *DTNBP1* scheint über den Dystrophin-Protein-Komplex (DPC) an der Signaltransduktion vieler Neurotransmittersysteme wie dem glutamatergen und GABA-ergen System beteiligt zu sein. Allerdings sind die Befunde im Einzelnen nicht widerspruchsfrei.

### 2.3.2 Neuregulin-1 (NRG1)

In einem umschriebenen Areal auf Chromosom 8p fanden fünf Arbeitsgruppen Kopplungshinweise zu schizophrenen Störungen (Übersichtsarbeiten von Riley und McGuffin, 2000; Sklar, 2002). Durch systematische Untersuchungen auf Kopplungsungleichgewicht identifizierte daraufhin die Firma deCode Genetics *Neuregulin-1* (*NRG1*) in der chromosomalen Region 8p12 als krankheitsverursachendes Gen bei schizophrenen Störungen (Stefansson et al., 2002). Dieser Befund wurde mehrfach an unabhängigen Kollektiven schizophrener Patienten repliziert (Stefansson et al., 2003; Williams et al., 2003). *NRG1* ist unter anderem am glutamatergen Vesikeltransport beteiligt und beeinflusst das glutamaterge System überdies durch Interaktion mit dem ErbB3-Rezeptor sowie durch Expressionsregulation verschiedener NMDA-Rezeptor-Subunits. ErbB3 scheint zudem in post-mortem-Gehirnen schizophrener Patienten vermindert exprimiert zu sein (Hakak et al., 2001).

### 2.3.3 D-Amino-Acid-Oxidase-Activator (DAOA), D-Amino-Acid-Oxidase (DAO)

In der chromosomalen Region 13q32-q34 fanden drei Arbeitsgruppen positive Kopplungshinweise bei schizophrenen Störungen (siehe Übersichtsarbeiten Riley und McGuffin, 2000; Sklar, 2002). Interessanterweise ergaben sich in dieser Region ebenfalls positive Kopplungsbefunde für bipolar-affektive Störungen. Auch in einer Meta-Analyse (kombinierte Auswertung mehrerer Genom-Scans) fanden sich für beide Erkrankungen positive Befunde (Badner und Gershon, 2002).

Chumakov et al. (2002) gelang durch eine systematische Untersuchung auf Kopplungsungleichgewicht mit 191 SNPs in einer fünf Mb großen Kandidatenregion auf 13q33 die Identifikation eines SNPs, der signifikant häufiger in einem Kollektiv schizophrener Patienten gegenüber gesunden Kontrollpersonen vorkam. Die Analyse flankierender SNPs in diesem Bereich ergab für viele weitere Marker positive Assoziationshinweise. Die Ergebnisse konnten in einem unabhängigen Kollektiv mit schizophrenen Störungen repliziert werden, auch hier ergaben sich positive Assoziationsergebnisse. Innerhalb der identifizierten LD-Region liegen zwei Gene, *G30* und *DAOA*. Es handelt sich dabei um teilweise überlappende Sense- und Antisense-Gene, d. h. ihre Transkription erfolgt jeweils an dem gegenüberliegenden DNA-Strang. Bislang konnte jedoch nur ein Translationsprodukt von *DAOA* nachgewiesen werden. Eine Analyse des *DAOA*-Proteins im 2-Hybrid-Yeast-System zeigte zudem eine zelluläre Interaktion mit einem Enzym,

der *D-Amino-Acid-Oxidase (DAO)*. Das *DAO*-Gen ist in der chromosomalen Region 12q24 lokalisiert. Assoziationsanalysen mit SNPs innerhalb des *DAO*-Gens ergaben wiederum positive Assoziationshinweise in einem der o. g. Fall-Kontroll-Kollektive mit schizophrenen Störungen. Die Assoziationsbefunde in beiden Genen, sowohl im *DAOA*- als auch im *DAO*-Gen, konnten an weiteren unabhängigen Fall-Kontroll-Kollektiven schizophrener Patienten repliziert werden (Addington et al., 2004; Korostishevsky et al., 2004; Schumacher et al., 2004; Wang et al., 2004). Die identifizierten Krankheitsgene kodieren für Proteine, die an der enzymatischen Degradierung der Aminosäure D-Serin beteiligt sind. Bei D-Serin handelt es sich um einen entscheidenden Koagonisten bei der Aktivierung glutamaterger NMDA-Rezeptoren im Vorderhirn (Mothet et al., 2000). D-Serin bindet dabei an Glycin-Bindungsstellen der NMDA-Rezeptor-1-Untereinheit (GRIN1). Die höchste D-Serin-Konzentration findet sich in Astrozyten Typ II des Vorderhirns (Schell et al., 1995). Interessanterweise konnte gezeigt werden, dass D-Serin als Adjuvans den therapeutischen Effekt von Antipsychotika verstärken kann. Dabei scheint D-Serin sowohl die Positiv- und die Negativsymptomatik bei schizophrenen Patienten zu verbessern, als auch deren durch die Erkrankung beeinträchtigte kognitive Funktionen (Tsai et al., 1998). Antagonistische Liganden am NMDA-Rezeptor (z. B. Phencyclidin, Ketamin) können hingegen bei psychisch gesunden Individuen akut schizophrenie-ähnliche exogene Psychosen auslösen. Folgeschäden durch chronischen Missbrauch können sogar dem klinischen Erscheinungsbild der endogenen schizophrenen Psychose gleichen (Olney et al., 1999). Bei Patienten mit schizophrener Störung wurde Exazerbation sowohl der Positiv- als auch der Negativsymptome bei Missbrauch dieser antagonistischen Substanzen beobachtet (Olney et al., 1999). Allgemein wird vermutet, dass ein ähnlich antagonistischer Effekt durch eine Heraufregulation des *DAO-DAOA*-Komplexes mit verstärkter Degradierung von D-Serin und der damit verbundenen Hypofunktion von NMDA-Rezeptoren bzw. des glutamatergen Neurotransmittersystems hervorgerufen wird. Diese Hypothese wird gestützt durch den Nachweis niedrigerer D-Serin-Spiegel bei schizophrenen Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollpersonen (Hashimoto et al., 2003; Kumashiro et al., 1995). Therapeutische Ansätze durch Gabe von D-Serin zusätzlich zu atypischen Neuroleptika wie Risperidon und Olanzapin brachten gute Erfolge bei der Behandlung vor allem therapieresistenter schizophrener Positiv- und Negativsymptomatik, nicht jedoch in Kombination mit Clozapin (Evins et al., 2001; Hashimoto et al., 2003; Heresco-Levy et al., 2005).

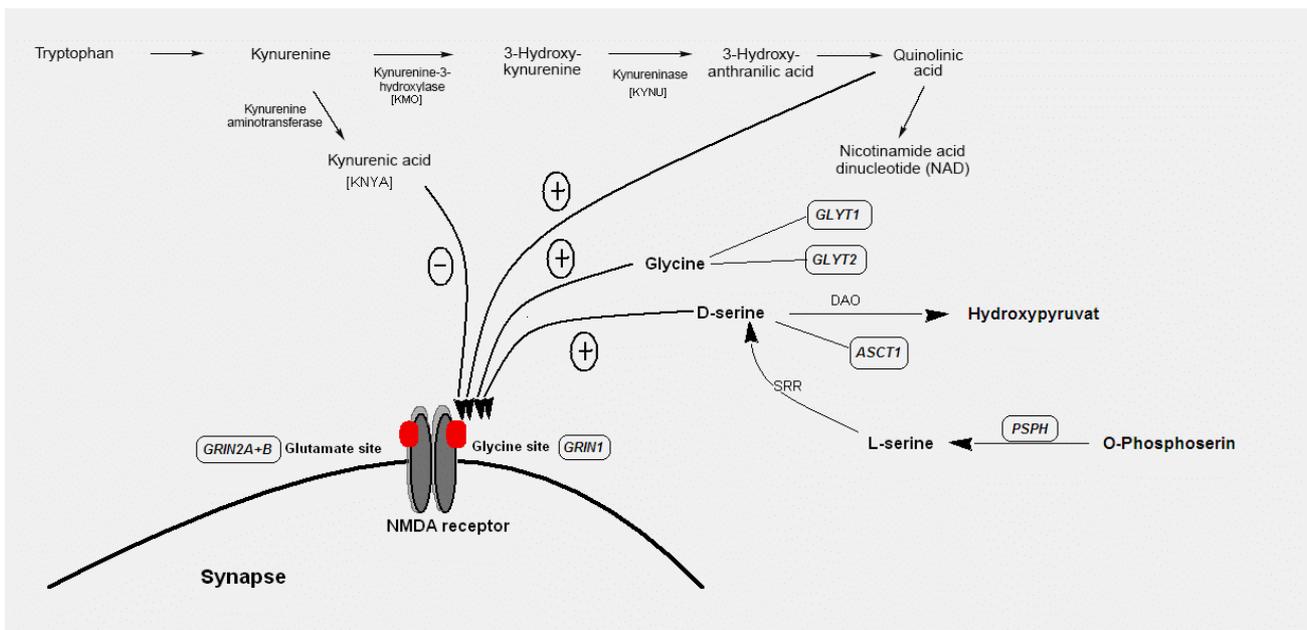


Abbildung 1: Der NMDA-Rezeptor und seine Interaktionspartner

## 2.4 In vorliegender Arbeit untersuchte Kandidatengene für schizophrene Störungen

### 2.4.1 Der NMDA-Rezeptor: Aufbau, Struktur und Funktion

Der N-Methyl-D-Aspartat-Rezeptor (NMDAR) ist ein heteromerer, liganden-gesteuerter Ionenkanal, der mit verschiedenen intrazellulären Proteinen interagiert (McBain und Mayer, 1994). Er gehört zur Oberfamilie der Glutamatrezeptoren, die die vorherrschenden exzitatorischen Rezeptoren im Säugetiergehirn sind.

Bisher sind sieben Untereinheiten des NMDA-Rezeptors bekannt, für die sieben Gene dreier Genfamilien kodieren: *GRIN1*, *GRIN2A-D* und *GRIN3A-B* (Dingledine et al., 1999, Nishi et al., 2001). *GRIN1* besitzt acht funktionelle Isoformen, die durch alternatives Spleißen entstehen (Durand et al., 1992; Hollmann et al., 1993). Im Gegensatz dazu lässt sich die Heterogenität der *GRIN2*-Untereinheit auf die Existenz mehrerer Gene zurückführen, *GRIN2A-D* (Kutsuwada et al., 1992; Monyer et al., 1992). Die Entdeckung weiterer Untereinheiten, *GRIN3A* und *GRIN3B*, liegt noch nicht lange zurück (Das et al., 1998; Eriksson et al., 2002; Nishi et al., 2001).

Strukturell liegen NMDA-Rezeptoren als Tetramere vor (Chen et al., 1999; Laube et al., 1998; Rosenmund et al., 1998; Schorge, 2003). Die spezifische Expression der Untereinheiten im Gehirn und somit die Zusammensetzung des Rezeptors variiert sowohl topographisch als auch in den verschiedenen Entwicklungsstadien (Ishii et al., 1993, Laurie et al., 1997), wobei jede

Rezeptorvariante eigene biophysiological Eigenschaften und Funktionen aufweist. Stets bildet GRIN1 das essentielle Grundgerüst, welches durch drei weitere Untereinheiten, meist aus der GRIN2-Gruppe, ergänzt wird. GRIN2-Untereinheiten bilden einen Teil der Ligandenbindungsstellen und modulieren die Funktion des Rezeptors. GRIN3-Untereinheiten scheint eine inhibitorische Funktion zuzukommen.

Der NMDA-Rezeptor besitzt zwei Substratbindungsstellen: eine für Glutamat und eine weitere für den Koagonisten Glycin. Analysen von mutierten GRIN1- und GRIN2-Untereinheiten deuten daraufhin, dass die Glycin-Bindungsstelle auf der GRIN1-Untereinheit lokalisiert ist und die Glutamat-Bindungsstelle auf der GRIN2-Untereinheit liegt (Anson et al., 1998; Hirai et al., 1996; Kuryatov et al., 1994; Laube et al., 1997). Die Substrat-Bindung führt zur Öffnung eines  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionenkanals unter Expulsion von  $\text{Mg}^{2+}$ .

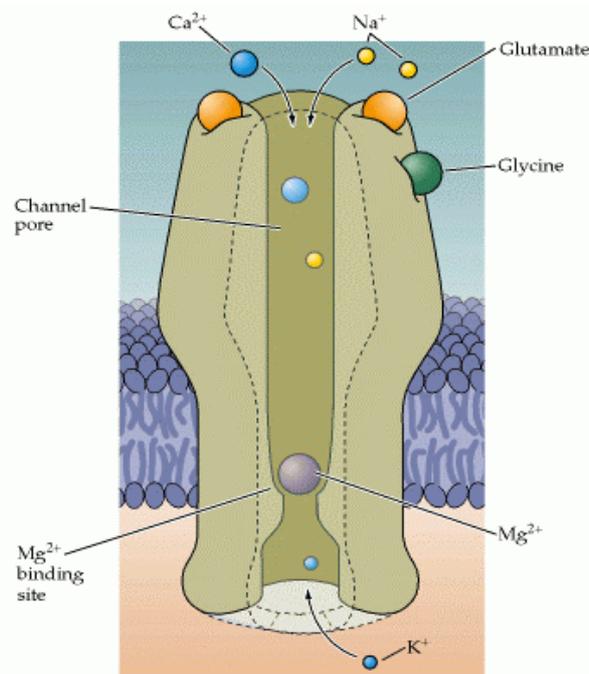


Abbildung 2: Der NMDA-Rezeptor und seine Substrate

Hauptsächlich sind NMDA-Rezeptoren an postsynaptischen Membranen zu finden, seltener auch präsynaptisch (Liu et al., 1994). Sie haben verschiedene Aufgaben in der Neurotransmission, u. a. ist die Aktivierung des NMDA-Rezeptors mit langanhaltenden Veränderungen in der Intensität der synaptischen Übertragung, d. h. der Langzeitpotenzierung, assoziiert (Ali und Salter, 2001). Außerdem spielen NMDA-Rezeptoren eine wichtige Rolle bei der Organisation von afferenten Fasern in der neuronalen Entwicklung (Collingridge und Singer, 1990). Über diese und weitere

Funktionen ist der NMDA-Rezeptor in eine ganze Reihe von physiologischen Prozessen (v. a. synaptisches Lernen und Gedächtnisbildung) involviert und wahrscheinlich auch an pathologischen Prozessen (Schizophrenie, Epilepsie, Morbus Alzheimer, Morbus Parkinson, Chorea Huntington; siehe Übersicht Loftis und Janowsky, 2003) beteiligt.

#### **2.4.1.1 Untereinheit GRIN1**

Das Gen der GRIN1-Untereinheit (*OMIM-Nummer 138249*) des NMDA-Rezeptors ist auf Chromosom 9q34 lokalisiert. Es umfasst eine Region von ca. 31 Kb und enthält 21 Exons. Die mRNA besteht aus bis zu 5142 bp. Das Protein ist eine obligatorische Komponente jedes funktionellen NMDA-Rezeptorkanals. Seine genetische Vielfalt ist durch alternatives Spleißen des Gens in insgesamt acht funktionelle Isoformen bedingt, die durch Vorhandensein oder Fehlen dreier kurzer Exonabschnitte in der N-terminalen (N1) bzw. C-terminalen (C1, C2) Region des Proteins entstehen (Hollmann et al., 1993; Zimmer et al., 1995). *GRIN1* wird im zentralen Nervensystem (ZNS) exprimiert und findet sich als Teil des NMDA-Rezeptors hauptsächlich an postsynaptischen Membranen in Neuronen des zerebralen Kortex und des Cerebellums, Pyramidenzellen des Hippocampus und mesenzephalen dopaminergen Neurons, sowohl während der fetalen Entwicklung als auch im adulten humanen Gehirn. Je nach Isoform besteht das Produkt aus bis zu 1484 Aminosäuren und spielt eine zentrale Rolle bei der Bildung des verbalen Gedächtnisses und der kognitiven Funktionen durch Langzeitpotenzierung. Es hat ebenfalls maßgebliche Auswirkungen auf die Plastizität der Synapsen sowie der exzitatorischen Neurotransmission.

#### **2.4.1.2 Untereinheit GRIN2A**

Das Gen der GRIN2A-Untereinheit (*OMIM-Nummer 138253*) des NMDA-Rezeptors liegt auf dem Chromosom 16p13. Es umfasst eine Region von ca. 421 Kb und besteht aus 14 Exons. Die mRNA umfasst 6289 bp. Das Protein besteht aus 1464 Aminosäuren und ist zu 70% identisch mit GRIN2B und noch zu ca. 20% homolog zu GRIN1 (Monyer et al., 1992). Zusammen mit GRIN2B-D gehört es zu den Epsilon-Untereinheiten des NMDA-Rezeptors. GRIN2A besitzt die gleiche Grundstruktur wie GRIN1 (Hollmann und Heinemann, 1994), unterscheidet sich aber durch eine 627 Aminosäuren große Region im C-terminalen Bereich. GRIN2A ist, wie auch andere Untereinheiten des NMDA-Rezeptors, vor allem im postsynaptischen Bereich von

Neuronen zu finden. Seine Verteilung im sich entwickelnden und adulten Gehirn ist ähnlich der von GRIN1 (Monyer et al., 1992). Stark wird *GRIN2A* vor allem im zerebralen Kortex und Hippocampus exprimiert.

*GRIN2A* ist in die exzitatorische Neurotransmission involviert. Es spielt eine wesentliche Rolle bei der Langzeitpotenzierung des verbalen Gedächtnisses und kognitiver Funktionen. Außerdem ist es am neuronalen Zelltod (Apoptose) beteiligt. Liu et al. (2004) zeigten, dass eine selektive Blockade der GRIN2A-Untereinheit des NMDA-Rezeptors negative Auswirkungen auf die Langzeitpotenzierung, nicht aber auf die Langzeitdepression an neuronalen Synapsen hat.

#### **2.4.1.3 Untereinheit GRIN2B**

Das Gen der GRIN2B-Untereinheit (*OMIM-Nummer 138252*) des NMDA-Rezeptors ist auf dem Chromosom 12p12 lokalisiert. Es umfasst eine Region von ca. 418 Kb und enthält 13 Exons. Die mRNA besteht aus 6237 bp. Das Protein besteht aus 1484 Aminosäuren und ist zu 70% identisch mit GRIN2A und noch zu ca. 20% homolog zu GRIN1 (Monyer et al., 1992). Zusammen mit GRIN2A, -C und -D gehört es zu den Epsilon-Untereinheiten des NMDA-Rezeptors. GRIN2B besitzt die gleiche Grundstruktur wie GRIN1 (Hollmann und Heinemann, 1994), unterscheidet sich aber auch durch eine 644 Aminosäuren große Region im C-terminalen Bereich. GRIN2B ist, wie auch andere Untereinheiten des NMDA-Rezeptors, vor allem im postsynaptischen Bereich von Neuronen lokalisiert. Seine Verteilung variiert während der verschiedenen Entwicklungsstadien des Säugetiergehirns (Monyer et al., 1994). Während der fetalen Entwicklung wird ein starker Anstieg der mRNA-Spiegel in bestimmten Regionen wie dem zerebralen Kortex, dem Thalamus und dem Rückenmark beobachtet. Niedrige Spiegel finden sich im Hippocampus, den Colliculi und im Hypothalamus. Postnatal finden sich hohe Spiegel vor allem im zerebralen Kortex, dem Hippocampus, den thalamischen Nuclei und dem Neostriatum, aber niedrige Spiegel im Cerebellum. Ab dem 20. postnatalen Tag sinken die Spiegel zu adulten Werten ab. *GRIN2B* wird dann vor allem im zerebralen Kortex und dem Hippocampus exprimiert (Ishii et al., 1993).

*GRIN2B* ist in die exzitatorische Neurotransmission involviert. Es spielt eine wesentliche Rolle bei der Ausbildung des verbalen Gedächtnisses und kognitiver Funktionen. Außerdem ist es am neuronalen Zelltod (Apoptose) beteiligt. Im Gegensatz zu GRIN2A hat eine selektive Blockade nur der GRIN2B-Untereinheit eine Aufhebung der Langzeitdepression an neuronalen Synapsen zur Folge, aber keine Auswirkung auf die Langzeitpotenzierung (Liu et al., 2004).

## **2.4.2 Glutamat- bzw. Glycin-assoziierte Neurotransmitter-Transporter: Aufbau, Struktur und Funktion**

Transportproteine liegen allgemein in Zellmembranen in unterschiedlichen Geweben des menschlichen Körpers vor und dienen dazu, meist spezifische Substrate über die Membran hinweg in die Zelle hinein oder aus der Zelle heraus zu transportieren. Die in vorliegender Arbeit untersuchten Neurotransmitter-Transporter gehören der Solute-Carrier- (SLC-) Familie an. Es handelt sich um Carrier-Proteine für Glutamat bzw. Glycin, die Substrate für den NMDA-Rezeptor sind. Genetische Varianten in den entsprechenden Transporter-Genen könnten sich also möglicherweise über eine Änderung der Glycin- und/ oder Glutamat-Konzentrationen auf den Aktivierungszustand des NMDA-Rezeptors auswirken.

### **2.4.2.1 SLC1A4**

Das *SLC1A4*-Gen (*Solute-Carrier-Family-1-Member-4-Gen*; OMIM-Nummer 600229) liegt auf Chromosom 2p13. Es umfasst eine Region von ca. 34 Kb und enthält acht Exons. Die mRNA besteht aus 4500 bp. Das Gen kodiert für einen aus 532 Aminosäuren bestehenden  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -abhängigen Transporter, ASCT1, dessen Substrate Glutamat bzw. neutrale Aminosäuren sind. Erstmals beschrieben wurde dieser Transporter von Arriza et al. (1993), später isolierten Hofmann et al. (1994) die kodierende cDNA. Der Transporter befindet sich, außer in endokrinen und exokrinen Geweben, vor allem an plasmatischen Membranen des menschlichen zentralen Nervensystems (ZNS).

### **2.4.2.2 SLC6A5**

Das *SLC6A5*-Gen (*Solute-Carrier-Family-6-Member-5-Gen*; OMIM-Nummer 604159) ist auf Chromosom 11p15 lokalisiert. Es umfasst eine Region von ca. 55 Kb und besteht aus 16 Exons. Die mRNA umfasst 2711 bp. Das Gen kodiert für einen aus 797 Aminosäuren bestehenden  $\text{Na}^+/\text{Cl}^-$ -abhängigen Transporter für Glycin (GlyT2). GlyT2 wird zentralnervös exprimiert, vor allem in der Medulla oblongata, weniger im Rückenmark und im Cerebellum. Er scheint vor allem eine Rolle bei der Neurotransmission an strychnin-sensitiven glycinergen Synapsen zu spielen (Morrow et al., 1998).

### 2.4.2.3 SLC6A9

Das *SLC6A9*-Gen (*Solute-Carrier-Family-6-Member-9-Gen*; *OMIM-Nummer 601019*) liegt auf Chromosom 1p33. Es umfasst eine Region von ca. 19 Kb und enthält 13 Exons. Seine mRNA besteht aus bis zu 2213 bp. Das Gen kodiert für einen aus 692 Aminosäuren bestehenden Na<sup>+</sup>/Cl<sup>-</sup>-abhängigen Transporter für Glycin (GlyT1). GlyT1 unterscheidet sich von GlyT2 in der molekularen Struktur, der Gewebsspezifität und den pharmakologischen Eigenschaften (Liu et al., 1993). Durch gewebsspezifisches alternatives Spleißen (Borowsky et al., 1993) entstehen zwei ähnliche, aber in ihren Eigenschaften unterschiedliche Transporter, GlyT1a und GlyT1b. GlyT1a findet sich im ZNS v. a. in der grauen Substanz, sowie in Makrophagen und Mastzellen des peripheren Gewebes. GlyT1b wird nur in der weißen Substanz des ZNS exprimiert. Beide Transporter scheinen eine Rolle bei der Regulation des Glycinspiegels in der NMDA-Rezeptor-vermittelten Neurotransmission zu spielen (Morrow et al., 1998).

### 2.4.3 Die Phosphoserin-Phosphatase (PSPH) – Aufbau, Struktur und Funktion

Die Phosphoserin-Phosphatase besteht aus 225 Aminosäuren und ist ein ubiquitär im menschlichen Körper vorkommendes Enzym mit einer Molekularmasse von 26 KDa. Sie katalysiert spezifisch den dritten und letzten Schritt der Serin-Biosynthese aus Kohlenhydraten, die Umwandlung von L- (oder D-) O-Phospho-Serin in L- (oder D-) Serin mittels Hydrolyse unter Abspaltung von Phosphat. D-Serin ist ein wichtiger Koagonist an der Glycin-Bindungsstelle bei der Aktivierung des NMDA-Rezeptors. Erniedrigte D-Serin- und Gesamt-Serin-Serumspiegel, wie sie bei schizophrenen Patienten beobachtet wurden (Kumashiro et al., 1995; Hashimoto et al., 2003), könnten auf eine Dysfunktion der PSPH zurückzuführen sein.

Das *PSPH*-Gen (*OMIM-Nummer 172480*) liegt auf Chromosom 7p15. Es umfasst eine Region von ca. 10 Kb und enthält fünf Exons. Die mRNA besteht aus 1406 bp. Das Produkt ist ein aus 225 Aminosäuren bestehendes Enzym, das den letzten Schritt der Serin-Biosynthese aus Kohlenhydraten, die Umwandlung von L- (oder D-) O- Phospho-Serin in L- (oder D-) Serin, katalysiert. In den meisten Geweben findet sich nur eine identische Isoform der Phosphoserin-Phosphatase. Mittels Gel-Elektrophorese entdeckten Moro-Furlani et al. (1980) jedoch Isoenzyme der PSPH in verschiedenen humanen post-mortem-Geweben wie Niere und Leber, die auf post-translationale Modifikationen zurückzuführen sind.

### 3 Fragestellung dieser Arbeit

Neuere Untersuchungen legen Störungen der Signalübertragung an glutamatergen Rezeptoren als ein zellbiologisches Korrelat bei schizophrenen Störungen nahe. Vor allem die positiven Assoziationsuntersuchungen zwischen genetischen Varianten der beiden Gene DAOA (Chumakov et al., 2002; Addington et al., 2004; Korostishevsky et al., 2004; Schumacher et al., 2004; Wang et al., 2004) und DAO (Chumakov et al., 2002; Schumacher et al., 2004) und schizophrenen Störungen implizieren eine Beteiligung der NMDA-Rezeptoren am Krankheitsgeschehen. Ebenso deuten Untersuchungen der D-Serin-Spiegel schizophrener Patienten (Hashimoto et al., 2003) auf die Bedeutung dieses Neurotransmittersystems im Sinne einer Unterfunktion hin. Der Beitrag dieses Pathways am Entstehungsprozess schizophrener Störungen begründet Vermutungen, wonach auch andere Proteine, die ebenfalls an zellbiologischen Prozessen dieses Pathways beteiligt sind bzw. deren Gene, in den Krankheitsprozess schizophrener Störungen involviert sein könnten.

Auf der Basis dieser Überlegungen wurden insgesamt sieben Kandidatengene (*GRIN1*, *GRIN2A*, *GRIN2B*, *SLC1A4*, *SLC6A5*, *SLC6A9*, *PSPH*) ausgewählt, deren korrespondierende Proteine an der glutamatergen Neurotransmission beteiligt sind. Drei dieser Kandidatengene kodierten für Untereinheiten des NMDA-Rezeptors, drei für Transporterproteine, sowie eines für die Phosphoserin-Phosphatase. Alle diese Produkte sind an der Regulation des glutamatergen Neurotransmitter-Systems im Bereich des Vorderhirns beteiligt. Im Einzelnen wurden Assoziationsuntersuchungen mit 19 STR-Markern (*GRIN1\_1317190*, *GRIN2A\_100195*, *GRIN2A\_100620*, *GRIN2A\_101650*, *GRIN2A\_100500*, *GRIN2A\_103270*, *GRIN2A\_103995*, *GRIN2A\_104140*, *GRIN2B\_139030*, *GRIN2B\_139780*, *GRIN2B\_140810*, *GRIN2B\_141230*, *GRIN2B\_141660*, *GRIN2B\_142600*, *SLC1A4\_654770*, *SLC6A5\_214235*, *SLC6A5\_214420*, *SLC6A9\_434835*, *PSPH\_555080*) und 29 SNPs (*rs4880213*, *rs6293*, *rs243\_1001*, *rsIVS11\_6608*, *rs1430*, *rs5765*, *rs1014531*, *rs2267792*, *rs3743833*, *rs1805522*, *rs1805482*, *rs741360*, *rs3764030*, *rs1805552*, *rs2192971*, *rs1064512*, *rs759458*, *rs2075209*, *rs3732062*, *rs2241940*, *rs1443548*, *rs228968*, *rs2000959*, *rs2276433*, *rs3740871*, *rs224832*, *rs3791129*, *rs4255091*, *rs4496923*) durchgeführt, die innerhalb der kodierenden und nicht-kodierenden Regionen der Kandidatengene lagen. Die Untersuchungsergebnisse wurden jeweils als Einzelmarker sowie als Haplotypen analysiert.

Der Aufbau des Untersuchungskollektivs erfolgte durch Mitarbeiter der Psychiatrischen Klinik des Universitätsklinikums Bonn und des Zentralinstituts für Seelische Gesundheit in Mannheim.

Die molekulargenetischen Arbeiten (STR-Marker) wurden am Institut für Humangenetik des Universitätsklinikums Bonn durchgeführt. Darin liegt auch der Beitrag dieser Arbeit. Die SNPs wurden an der GSF (Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit) in Neuherberg genotypisiert. Die statistische Auswertung der erhobenen Untersuchungsdaten erfolgte am Institut für Medizinische Biometrie, Informatik und Epidemiologie (IMBIE) des Universitätsklinikums Bonn.

## **4 Material**

### **4.1 Untersuchungskollektiv**

Im Rahmen einer Fall-Kontroll-Studie wurden die DNA-Proben von 360 an einer schizophrenen Störung erkrankten Patienten und 325 psychisch gesunden Kontrollpersonen untersucht.

Das Patientenkollektiv war deutscher Herkunft, sämtliche Patienten wurden von Psychiatern der Psychiatrischen Klinik des Universitätsklinikums Bonn und des Zentralinstituts für Seelische Gesundheit in Mannheim rekrutiert. Von den untersuchten 360 Patienten waren 196 männlich (m) und 164 weiblich (w). Ihr Alter variierte zum Zeitpunkt der Untersuchung (2003) zwischen 22 und 85 Jahren (Mittelwert: 44,68 Jahre). Die Diagnose der schizophrenen Störung wurde von zwei Psychiatern unabhängig voneinander gestellt. Zur Diagnosefindung dienten strukturierte Interviews (SCID I), Einsicht von Krankenakten sowie Befragung der Angehörigen und Aufnahme der Familienanamnese. Dabei wurden die DSM-IV-Kriterien der American Psychiatric Association (1994) der Diagnose zugrundegelegt. Die Patienten litten entweder an einer Schizophrenie desorganisierten Typs (DSM-IV 295.10), an einer katatonen Typs (DSM-IV 295.20), an einer paranoiden Typs (DSM-IV 295.30), an einer residualen Typs (DSM-IV 295.60), an einer undifferenzierten Typs (DSM-IV 295.90) oder an einer schizoaffektiven Störung (DSM-IV 295.70).

Bei den Kontrollpersonen handelte es sich um Blutspender; sie wurden am Institut für Experimentelle Hämatologie und Transfusionsmedizin des Universitätsklinikums Bonn rekrutiert. Es wurden nur Kontrollpersonen in die Studie aufgenommen, die deutscher Herkunft und psychisch gesund waren.

Alle Patienten und Kontrollpersonen wurden vor der Blutentnahme über die geplanten molekulargenetischen Studien informiert und gaben ihr schriftliches Einverständnis zur Verwendung ihrer DNA-Probe. Die geplante Studie war der Ethikkommission des Universitätsklinikums Bonn vorgelegt worden. Die Ethikkommission hat keine Einwände erhoben.

## 4.2 Geräte

Folgende Geräte fanden im Laufe der Untersuchungen Anwendung:

- Autoklav Varioklav Dampfsterilisator Typ 500 EP-Z, H+P  
Labortechnik, Oberschleißheim
- DNA-Sequenzierer Abi Prism 377 DNA Sequencer, Perkin Elmer Applied  
Biosystems, Weiterstadt
- Elektrophoresekammern Multigel-Long, Biometra, Göttingen
- Gel-Dokumentationssystem Digit-Store Duo, Intas, Göttingen
- Magnetrührer IKA RET-G, IKA Labortechnik, Staufen
- Multipipetten PreCision, Biozym, Hess. Oldendorf  
Proline, Biohit, Rosbach
- Pipettierhilfe 3000 Series, Kloehn Ltd., Las Vegas, U.S.A.
- PCR-Geräte PTC-200 und PTC-225, MJ Research, Watertown, U.S.A.
- Photometer Genequant II, Pharmacia Biotech, Cambridge, U.K.
- Spannungsgerät Gene Power Supply 200/400, Pharmacia Biotech, Freiburg
- Trockenschrank T 20 Function Line, Heraeus, Hanau
- Waage SBC 52, Scaltec, Heiligenstadt
- Vortex-Mixer REAX 1 DR, Heidolph, München
- Zentrifugen Megafuge 1.0, Heraeus Sepatech, Osterode

## 4.3 Chemische Substanzen

siehe Kapitel 5

## 4.4 Enzyme, Puffer, Nukleotide

Zur Amplifikation der STR-Marker wurden folgende Materialien verwendet:

- Multiplex PCR Kit Qiagen, Hilden
- PCR-Puffer BioTherm, GeneCraft, Lüdinghausen
- Taq-Polymerase BioTherm, GeneCraft, Lüdinghausen
- dNTP BioTherm, GeneCraft, Lüdinghausen

#### 4.5 Längenstandards

Bei der Agarosegel-Elektrophorese:

- 100 bp DNA-Leiter Life Technologies Gibco BRL, Eggenstein

Bei der Polyacrylamidgel-Elektrophorese:

- GS 500 Rox Perkin Elmer Applied Biosystems, Weiterstadt

#### 4.6 STR-Marker, synthetische Oligonukleotide

Insgesamt wurden 19 STR-Marker in sieben Kandidatengenen auf Assoziation mit schizophrenen Störungen untersucht. Das Auffinden der STR-Marker innerhalb der Kandidatengene erfolgte mit Hilfe des Tandem Repeat Finder-Programms (TRF, Version 2.02). Die entsprechenden genomischen Sequenzen und Lokalisationen der STR-Marker wurden mittels des Genome Browser-Programms der University of California Santa Cruz (UCSC) bestimmt. Hierbei fand die Version November 2002 Verwendung. Die Bezeichnung der STR-Marker erfolgte anhand der Position im jeweiligen Locus, in Kilobasenpaaren (kb).

Zur Amplifikation der 19 STR-Marker wurden 38 synthetische Oligonukleotide eingesetzt, die als Forward- und Reverse-Primer dienten. Die Primer waren zwischen 21 und 24 Basen lang. Zur Detektion der Fragmentlängen und zur Unterscheidung der STR-Marker voneinander bei der Analyse wurden die Forward-Primer an ihrem 5'-Ende mit fluoreszierenden Farbstoffen markiert. Zwei verschiedene Farbstoffe fanden dabei Verwendung: Hex ([H], grün) und Fam ([F], blau). Die synthetischen Oligonukleotide wurden von der Firma Qiagen Operon, Köln, hergestellt.

**Tabelle 4: STR-Marker und verwendete Primer**

Marker	Lokalisation*	Position (bp)*	Repeat	Primersequenz 5'-3' (forward)	Primersequenz 5'-3' (reverse)
GRIN1_1317190	9q34	131719000	(AAAT) <sub>n</sub>	[F]GGAGAATTGC ATGAACGGTGAG	GGACCTTATAGAATGG GTCGGAA
GRIN2A_100195	16p13	10019500	(AC) <sub>n</sub>	[F]GCCTGAATTC CTGTCTGAGTTT	CAAACCTGGATC GAGCTCCTACT
GRIN2A_100500	16p13	10050000	(GT) <sub>n</sub>	[F]CCACAACACC AACCTACCACTT	GACAACCATGG TGGGGATTGTA
GRIN2A_100620	16p13	10062000	(TTTA) <sub>n</sub>	[H]CTCACTGCAA CCTAAACCTCCT	CAGTGGCTCAT ACTTGTGATGT

Marker	Lokalisation*	Position (bp)*	Repeat	Primersequenz 5'-3' (forward)	Primersequenz 5'-3' (reverse)
GRIN2A_101650	16p13	10165000	(CA) <sub>n</sub>	[H]GAGTTCCTTC CTGATATCTGGA	CAGTCAACAAA CCATGTTGGTT
GRIN2A_103270	16p13	10327000	(AC) <sub>n</sub>	[F]CCCAGACCTA CTGAATCTGACA	GGAAATGAGAC CACCAGCAAGA
GRIN2A_103995	16p13	10399500	(AAT) <sub>n</sub>	[F]GGCGACAAGA GCAAAACTCTGT	CTGGGGACAGA CATAAGAGTGA
GRINGRIN2A_104140	16p13	10414000	(AC) <sub>n</sub>	[H]AGATCTCTGC TACCGCTTCCT	ACAGGGAGAAG CATTGGAGCA
GRIN2B_139030	12p12	13903000	(TC) <sub>n</sub> +(AC) <sub>n</sub>	[H]CATTGGCCAA TGAGACTGCAGA	CCTCCATACCGT GTTTATTATGT
GRIN2B_139780	12p12	13978000	(TG) <sub>n</sub>	[F]GGCAGCCAAA TGCAGAAGTTCT	GAGGCAGACCA TCTGGTTTCTT
GRIN2B_140810	12p12	14081000	(GTTTT) <sub>n</sub>	[H]CCGCTTATAG GCAACAGGATT	CTAACTCTGCC TATTGCTTGGA
GRIN2B_141230	12p12	14123000	(TG) <sub>n</sub>	[H]GGTCAATTTG GTCAAGCTGGT	CACTCTAGCCT GGGCTACAAGA
GRIN2B_141660	12p12	14166000	(AC) <sub>n</sub>	[H]CCTCCTCCCA GAACTTAAAGGA	CATCAAAGTGG GAGAGTGGAGT
GRIN2B_142600	12p12	14360000	(AC) <sub>n</sub>	[F]GAACCACCTG AGCAGCATTTCA	CCAGATGCAGC TGGAAGAAGAA
SLC1A4_654770	2p13	65477000	(TATT) <sub>n</sub>	[H]CCCTGCAGAT GATTCTGATACC	CCGTAATCCCA GTTACTCAGGA
SLC6A5_214235	11p15	21423500	(AAG) <sub>n</sub>	[F]GAAGCCGTGA AAGATAACACGA	CACAACTCGTA TTCACTTCCAGA
SLC6A5_214420	11p15	21442000	(AC) <sub>n</sub>	[H]ACTTCAGAGT GACAGGGTGACA	CATGCAAATAC CTCCTGGCGTA
SLC6A9_434835	1p33	43483500	(AC) <sub>n</sub>	[F]CTCATTCA CCTCTGCCAGCT	GTCACTCATCA GACACCCAAT
PSPH_555080	7p15	55508000	(GT) <sub>n</sub>	[F]GTTGCAGTCA GCTGAAATGGT	CCTTCTGAACT ATCTGAACAATT

\* Chromosomale Lokalisation und Position in Basenpaaren (bp) bestimmt anhand UCSC Genome Browser, Version (freeze) November 2002

#### 4.7 SNPs

Parallel zu der STR-Marker Analyse wurden an der GSF (Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit) in Neuherberg 29 SNPs in den sieben Kandidatengenomen typisiert. Die genomischen Sequenzen und Lokalisation der SNPs wurden ebenfalls mittels des Genome Browser-Programms der UCSC, Version November 2002, bestimmt.

**Tabelle 5: SNPs**

Marker	Chromosomale Lokalisation*	Position (bp)*	Polymorphismus
rs4880213	9q34	131722664	C/T
rs243_1001	9q34	131724747	C/G
rs6293	9q34	131741594	A/G
rsIVS11_6608	9q34	131746233	A/G
rs1014531	16p13	9991642	A/G
rs5765	16p13	9991928	C/T
rs2267792	16p13	10026806	A/C
rs1430	16p13	10079736	A/G
rs3743833	16p13	10263819	A/C
rs1805522	12p12	13906438	A/G
rs1805482	12p12	13909471	A/G
rs1805552	12p12	13936025	C/T
rs741360	12p12	13967500	C/T

<b>Marker</b>	<b>Chromosomale Lokalisation*</b>	<b>Position (bp)*</b>	<b>Polymorphismus</b>
rs2192971	12p12	13978067	G/T
rs3764030	12p12	14278029	C/T
rs1064512	2p13	65403058	C/G
rs3732062	2p13	65414408	C/T
rs759458	2p13	65431537	A/G
rs2075209	2p13	65432295	A/G
rs2241940	11p15	21423882	A/G
rs1443548	11p15	21424574	C/T
rs2289683	11p15	21437943	C/T
rs3740871	11p15	21449912	A/G
rs2000959	11p15	21460211	A/C
rs2276433	11p15	21475432	A/G
rs2248632	1p33	43467029	A/G
rs3791129	1p33	43480516	A/G
rs4255091	7p15	55546862	C/G
rs4496923	7p15	55551871	A/G

\* Chromosomale Lokalisation und Position in Basenpaaren (bp) bestimmt anhand UCSC Genome Browser, Version (freeze) November 2002

## 4.8 Software

Zur Bestimmung und Analyse der Genotypen wurden folgende Software-Programme der Firma Perkin Elmer Applied Biosystems, Weiterstadt, verwendet:

- ABI-Prism Geno Typer, Version 2.5
- ABI-Prism Gene Scan, Version 3.1.2



### 5.1.2 Konzentrations- und Reinheitsbestimmung der isolierten DNA

Mittels eines Photospektrometers wurde bei Wellenlängen von 260 und 280 nm die Konzentration der DNA bestimmt sowie ihr Reinheitsgrad überprüft. Die DNA-Konzentration ließ sich hierbei mit Hilfe des Lambert-Beerschen Gesetzes aus der optischen Dichte bei 260 nm errechnen. Der Quotient der Absorptionswerte bei 260 nm und 280 nm lässt Aussagen über die Reinheit der isolierten DNA zu: Zahlreiche Verbindungen wie Proteine, Ethanol und Salze, die sich nach der Fällung noch in der Lösung befinden können, absorbieren Licht im Bereich von 280 nm Wellenlänge. So wies mit diesen Substanzen verunreinigte DNA Absorptionsquotienten unter 1,7 auf; in diesem Falle musste die Lösung erneut ausgefällt werden. Werte zwischen 1,7 und 1,9 zeigten an, dass die DNA in reiner Form vorliegt; Werte über 1,9 deuteten auf RNA-Rückstände hin.

### 5.2 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die PCR nach Mullis und Faloona (1987) ist eine in-vitro-Methode zur selektiven Amplifikation von DNA-Abschnitten. Dabei müssen die den zu amplifizierenden Abschnitt (zwischen 100 und 3000 Basenpaaren Länge) flankierenden Bereiche bekannt sein. Mittels dieser Information wurden zwei spezifische Oligonukleotide bestimmt, die als Startermoleküle (Primer) fungierten und in Anwesenheit der übrigen Komponenten (Puffer, dNTP, Taq) den DNA-Zielabschnitt replizierten.

Ein PCR-Zyklus bestand aus folgenden Schritten:

1. Hitzedenaturierung: Der zu vermehrende doppelsträngige DNA-Abschnitt wurde mittels Hitzedenaturierung bei 95°C in Einzelstränge geteilt; diese dienten dann als Matrize für die nachfolgende DNA-Synthese.
2. Hybridisierung: Synthetische Oligonukleotide, die als Startermoleküle (Primer) dienten, banden bei 45-72°C an die DNA-Matrize (sog. annealing).
3. Synthese: Bei 72°C wurde, beginnend an den beiden Primern, durch die thermostabile Taq-Polymerase ein DNA-Komplementärstrang gebildet.

Dieser Zyklus wurde 30-40 mal wiederholt, dabei wurden sowohl der originale DNA-Abschnitt als auch dessen Kopien amplifiziert. So kam es zu einer exponentiellen Vermehrung des DNA-Abschnittes auf etwa  $10^6$  bis  $10^7$ .

Ein PCR-Reaktionsansatz benötigte folgende Komponenten: Die Matrizen-DNA, zwei gegenläufig orientierte Primer, PCR-Puffer,  $MgCl_2$ , die vier Desoxy-Nukleosidtriphosphate (dNTP) in ausreichender Menge, sowie thermostabile Taq-Polymerase.

Bei den PCR-Reaktionen, bei denen mehrere DNA-Abschnitte gleichzeitig amplifiziert wurden, kamen spezielle, sogenannte Multiplex-Ansätze zur Anwendung.

Für einen Multiplex-Reaktionsansatz (10  $\mu$ l) wurden folgende Komponenten verwendet:

Volumen	Inhalt	bestehend aus
	genomische DNA	
5,0 $\mu$ l	Multiplex PCR Master Mix	HotStarTaq <sup>®</sup> DNA Polymerase Multiplex PCR Puffer (enthält 6mM $MgCl_2$ ) dNTP Mix (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)
2,0 $\mu$ l	Q-Solution	PCR-Zusatz zur Qualitätssteigerung bei Multiplex-PCR (Qiagen)
0,6 $\mu$ l	Primer-Mix	je nach Ansatz 3- 7 Primern (forward und reverse, 1 :1) im optimierten Verhältnis
2,4 $\mu$ l	H <sub>2</sub> O	autoklaviertem, destillierten H <sub>2</sub> O

Bei wiederholten PCRs einzelner STRs wurde folgender Ansatz (10 $\mu$ l) benutzt:

Volumen	Inhalt	bestehend aus
	genomische DNA	
0,2 $\mu$ l	dNTP Mix	dATP, dCTP, dGTP, dTTP
0,1 $\mu$ l	Taq- Polymerase	
1,0 $\mu$ l	Puffer+ $MgCl_2$	
0,5 $\mu$ l	Primer	forward und reverse, 1:1
8,2 $\mu$ l	H <sub>2</sub> O	autoklaviertem, destillierten H <sub>2</sub> O

Für den PCR-Vorgang wurden sog. Tochterplatten verwendet. Dazu wurde jeweils 1  $\mu$ l DNA in Mikrotiterplatten mit jeweils 96 Reaktionsgefäßen, den sogenannten wells, pipettiert und bei Raumtemperatur luftgetrocknet. Die übrigen Komponenten des PCR-Ansatzes wurden in einem Eppendorfgefäß mittels eines Vortexers gemischt, und jeweils 10  $\mu$ l in jedes well verbracht. Die anschließende PCR erfolgte im PCR-Gerät nach folgenden Programmschemata:

Für einen Multiplex-Ansatz:

Schritt	Temperatur (°C)	Dauer	Bedeutung
1	95	15 min	initiale Denaturierung
2	97	30 sec	Denaturierung
3	63-55	90 sec	Hybridisierung
4	72	40 sec	Synthese
		<i>Schritt 2-4 : je 4 Zyklen</i>	
5	60	30 min	finale Synthese

Für einen Einzelmarker-Ansatz:

Schritt	Temperatur (°C)	Dauer	Bedeutung
1	95	5 min	initiale Denaturierung
2	95	30 sec	Denaturierung
3	63-56	30 sec	Hybridisierung
4	72	30 sec	Synthese
		<i>Schritt 2-4: je 3 Zyklen</i>	
5	95	30 sec	Denaturierung
6	55	30 sec	Hybridisierung
7	72	30 sec	Synthese
		<i>Schritt 5-7: 16 Zyklen</i>	
8	72	15 min	finale Synthese

### 5.3 Agarosegel-Elektrophorese

Um die Amplifikation des gesuchten DNA-Abschnittes nach der PCR zu überprüfen, wurden Proben des PCR-Produktes mittels Elektrophorese im Agarosegel aufgetrennt.

Herstellung und Zusammensetzung des Agarosegels:

Für ein 2%iges Agarosegel wurden 4 g Agarose mit 200 ml 1x TBE versetzt und bis zur vollständigen Lösung aufgeköcht. Nach Abkühlung auf ca. 50 °C wurde Ethidiumbromid (1µg/ml) zugesetzt. Die Gellösung wurde nun luftblasenfrei in einen mit mehreren Kämmen bestückten Gelträger gegossen. Bis zum Erstarren (ca. 1 h) wurde das Gel horizontal und erschütterungsfrei gelagert. Dann wurden die Kämmen entfernt, und das Gel in einen mit 1x TBE als Puffer gefüllten Elektrophoreseapparat gelegt. Das gesamte Gel wurde dabei mit dem Puffer bedeckt. Zur Elektrophorese wurden 4 µl des PCR-Produktes mit 5 µl Blaupuffer versetzt und in die Geltaschen verbracht. Als Längenstandard wurde in eine freie Tasche 3 µl einer DNA-Leiter

(100 bp) pipettiert. Die Elektrophorese erfolgte unter Anlegen einer Spannung von 120 Volt in ca. 10 min.

Das Prinzip der Gelelektrophorese beruht auf der Polarisierung geladener Teilchen innerhalb eines elektrischen Feldes. Hauptladungsträger von Nukleinsäuren sind die negativ geladenen Phosphatgruppen; Molekulargewicht und Gesamtladung sind somit proportional zueinander. Aufgrund des Molekularsiebeffektes, der durch die netzartige Struktur des polymerisierten Gels entsteht, ist die Wanderungsgeschwindigkeit der DNA-Moleküle im Agarosegel nahezu umgekehrt proportional zum Molekulargewicht. Weiterhin hängt die Wanderungsgeschwindigkeit linearer DNA-Moleküle von der angelegten Spannung sowie der Agarosegel-Konzentration ab. Hierfür wurde ein 2%iges Gel verwendet, das sich besonders gut zur Auftrennung von DNA-Fragmenten mit 100 bis 750 bp eignet.

Das in der Gelmatrix befindliche Ethidiumbromid wandert entgegengesetzt zu den DNA-Fragmenten von der Anode zur Kathode und interkaliert in die DNA-Doppelhelix. Ethidiumbromid fluoresziert unter UV-Bestrahlung; mittels Durchleuchtung des Agarosegels mit UV-Licht der Wellenlänge 312 nm können die DNA-Fragmente als fluoreszierende Banden sichtbar gemacht werden. Durch Vergleich der Laufstrecken der jeweiligen Banden mit dem Längenstandard wird die Größe der untersuchten DNA-Fragmente abgeschätzt. Die Spezifität des amplifizierten Produktes lässt sich anhand der Klarheit der Banden sowie eventuell durch unspezifisch vervielfältigte Produkte vorhandene zusätzliche Banden beurteilen.

## **5.4 Elektrophorese im Sequencer**

Die PCR-Produkte wurden auf einem Polyacrylamidgel im Automatischen Sequenziergerät (Modell ABI-Prism 377-96) elektrophoretisch aufgetrennt und anschließend mittels eines PC-Software-Programmes (Genotyper) ihre Genotypen bestimmt.

### **5.4.1 Vorbereitungen**

#### **5.4.1.1 Vorbehandlung der Glasplatten**

Die Glasplatten für die Elektrophorese wurden mit einem Detergens (Extran) behandelt, mit Aqua dest. gespült und mit Isopropanol gereinigt. Danach wurden Abstandshalter (Spacer, 0,2 mm) aufgelegt und die Glasplatten in einer dafür vorgesehenen Apparatur zusammengesetzt.

#### 5.4.1.2 Herstellung der Gelstocklösung

18 g Harnstoff (Urea) wurden in 24,9 ml bidest H<sub>2</sub>O und 6 ml 10x TBE unter Rühren gelöst, mit 5,6 ml der 40%igen Acrylamid-Lösung (Acrylamid : Bisacrylamid = 29 : 1) gemischt, durch einen 0,2 µm dicken Filter filtriert und entgast. Die fertige Gelstocklösung wurde bis zum Gebrauch bei 4 °C aufbewahrt.

Bei der Herstellung der Gelstocklösung fanden folgende Reagenzien Verwendung:

- Acrylamid
- Bisacrylamid
- Harnstoff (Urea)
- 10xTBE-Puffer:           500mM Tris (Tris-(hydroxymethyl) aminomethan)  
                                  500mM Borsäure  
                                  20 mM EDTA, pH 8,0

#### 5.4.1.3 Herstellung des 4,25%igen Polyacrylamidgels

Zur Polymerisation wurde die Gelstocklösung in ein Becherglas überführt, mit 250 µl 10%iger Ammoniumpersulfatlösung (APS) sowie 35 µl TEMED versetzt und anschließend sofort zwischen die vorbereiteten Glasplatten gegossen. Nach Einsetzen der Kämme polymerisierte das Gel innerhalb von 1h in horizontaler Lage.

Verwendet wurden:

- Gelstocklösung (s.o.)
- Ammoniumpersulfatlösung (10%)      10 g Ammoniumpersulfat  
  100 ml H<sub>2</sub>O
- TEMED                                    N',N',N',N-Tetramethyldiamin

#### 5.4.2 Elektrophorese

Für die Elektrophorese wurde das Gel vertikal in den ABI 377-Sequenzierer eingespannt und eine obere und untere Pufferkammer mit 1x TBE gefüllt. Die optimale Lauftemperatur betrug 51°C, sodass das Gel zunächst vorgeheizt werden musste. In einem Kontrolllauf (Pre-Run) maß der Laser, ob sich Verunreinigungen auf den Glasplatten befanden. Anschließend wurden die PCR-Produkte aufgetragen. Dazu wurden 1,0 µl jedes PCR-Produktes mit 1,5 µl einer Lösung, bestehend aus einem internen DNA-Längenstandard (GS-500), einem farbigen Ladepuffer und

Formamid, bei 95°C zwei Minuten lang denaturiert. Anschließend wurden die 96 Geltaschen mit einer manuellen Pipettierhilfe (Kloehn Ltd., Las Vegas, U.S.A.) mit den 2,5 µl PCR-Produkt + Lösung beladen. Die Laufzeit hing von der Fragmentgröße ab; sie betrug in der Regel bei 2400 Volt zwischen 3 und 4 h.

#### **5.4.3 Bestimmung der PCR-Fragmentlängen mittels Genotyper**

Die Bestimmung der PCR-Fragmentlängen erfolgte mit Hilfe des ABI-Genotyper-Softwareprogramms (ABI-Prism Geno Typer, Version 2.5). Der mit den PCR-Produkten aufgetragene interne Längenstandard (Genescan-500: Rox Size Standard) ist mit einem Farbstoff markiert und kann von den anders markierten Proben unterschieden werden. Die bekannten Fragmentlängen des Standards dienen der Erzeugung einer Kalibrierungskurve. Mit Hilfe dieser Kurve konnten die Längen unbekannter PCR-Produkte durch Extrapolation ermittelt werden. Zur besseren Erkennung eines systematischen Fehlers wurden außerdem zwei Kontroll-DNAs, deren Fragmentlängen bekannt waren, mitanalysiert.

#### **5.4.4 Analyse der Genotypen**

Anhand des internen Längenstandards und der Kontroll-DNA fand eine automatische Bestimmung der Genotypen durch die Softwareprogramme Gene Scan, Version 3.1.2., und Geno Typer, Version 2.5, statt. Die so ermittelten Genotypen wurden daraufhin von zwei Personen, die keine Kenntnis über den Erkrankungsstatus hatten, unabhängig voneinander gelesen. Bei unklaren Genotypen wurde die Analyse vollständig wiederholt.

Anschließend wurde die Allelverteilung auf Konsistenz mit dem Hardy-Weinberg-Gleichgewicht überprüft. Wenn im Einzelfall inkompatible Genotypen auftraten, wurde die DNA der betreffenden Person nochmals durch PCR vervielfältigt und die Genotypen neu bestimmt.

### **5.5 Statistische Auswertung**

Die statistische Auswertung der erhobenen Untersuchungsdaten wurde von Herrn Dr. Tim Becker am 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 einer  $\chi^2$ -Testes auf eine mögliche Abweichung vom Hardy-

Weinberg-Gleichgewicht überprüft. Für die Assoziationsuntersuchung der genotypisierten Varianten wurden der *Fisher's exact test* für die 2x3-Tafel der Genotypverteilung sowie der *Cochran-Armitage trend test* verwendet (Armitage, 1955). Die Haplotyp-Verteilung der Patienten und Kontrollen wurde mittels FAMHAP verglichen (Becker et al., 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 für die genotypisierten Polymorphismen exemplarisch im Fall-Kontroll-Kollektiv eine Berechnung des paarweisen Inter-Marker-Kopplungsungleichgewichts durchgeführt. Als Maß für das Kopplungsungleichgewicht zwischen zwei Markern dienen die Koeffizienten  $D'$  (Lewontin, 1964) und  $\Delta^2$  (Devlin und Risch, 1995).

## 6 Ergebnisse

Ziel dieser Arbeit war die Identifikation von Dispositionsgenen bei schizophrenen Störungen. Dazu wurden Assoziationsuntersuchungen mit 19 STR-Markern und 29 SNPs in insgesamt sieben Kandidatengenen, deren korrespondierende Proteine an der glutamatergen Neurotransmission beteiligt sind, an einem schizophrenen Patienten- (n=360) und einem Kontrollkollektiv (n=325) durchgeführt. Bei der statistischen Auswertung der analysierten Marker wurden diese einzeln auf Assoziation mit schizophrenen Störungen untersucht. Dazu wurden die Allel- und Genotypfrequenzen der Fall- und Kontrollkollektive mittels Armitage Trend Test auf signifikante Verteilungsunterschiede hin untersucht. Im Vorfeld wurde die Häufigkeitsverteilung der Allele und Genotypen auf mögliche Abweichungen vom Hardy-Weinberg-Gleichgewicht hin überprüft. Zusätzlich zu den Einzelmarker-Analysen wurden Haplotyp-Analysen von Kombinationen mehrerer Marker durchgeführt. Unter einem Haplotyp versteht man den geerbten Komplex gekoppelter Allele, die auf einem chromosomalen Bereich in LD zueinander liegen. Da sich die Allele der untersuchten Marker nicht immer sicher dem mütterlichen oder väterlichen Chromosom zuordnen lassen, kann keine definitive Aussage über einen Haplotyp bei einer bestimmten Person getroffen werden, sondern es werden vielmehr die Haplotyp-Wahrscheinlichkeiten berechnet und auf eine Assoziation mit schizophrenen Störungen untersucht. Im Folgenden werden die Ergebnisse geordnet nach Kandidatengenen dargestellt.

### 6.1 GRIN1

Innerhalb des *GRIN1*-Gens wurden ein STR-Marker (*GRIN1\_1317190*) und vier SNPs (*rs4880213*, *rs6293*, *rs243\_1001*, *rsIVS11\_6608*) einzeln sowie in Haplotyp-Analyse auf Assoziation mit schizophrenen Störungen untersucht. Für eine genaue Beschreibung der Marker siehe Kapitel 2.6 und 2.7.

#### 6.1.1 Einzelmarker-Analyse

Die Ergebnisse der Einzelmarker-Analysen der untersuchten STR-Marker und SNPs am *GRIN1*-Locus sind Tabelle 6 zu entnehmen. Zwei der untersuchten SNPs, *rs4880213* und *rs243\_1001*, wiesen signifikante p-Werte ( $p=0,006$  bzw.  $p=0,027$ ) in der Genotypen- bzw. Allelverteilung auf. Die übrigen SNPs und STR-Marker zeigten keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen Patienten und Kontrollen.

Tabelle 6: Einzelmarker-Analysen an den Loci *GRIN1* und *GRIN2A*

Marker	Abstände (Kb)	Allel 1/2 <sup>a</sup>	Allelverteilung			Genotypenverteilung <sup>b</sup>						
			Kontrollen	Patienten	p-Wert	Kontrollen			Patienten			p-Wert
						1/1	1/2	2/2	1/1	1/2	2/2	
<b>GRIN1-Locus</b>												
<i>GRIN1_1317190</i>	0	7	-	-	0,470	-	-	-	-	-	-	---
<i>rs4880213</i>	3,664	C/T	0,58 (C)	0,63 (C)	0,078	0,36	0,42	0,20	0,37	0,50	0,12	<b>0,006</b>
<i>rs243_1001</i>	2,083	C/G	0,93 (G)	0,89 (G)	<b>0,027</b>	0,00	0,13	0,86	0,01	0,18	0,80	----
<i>rs6293</i>	16,847	A/G	0,64 (A)	0,66 (A)	0,471	0,42	0,45	0,12	0,44	0,43	0,11	0,966
<i>rsIVS11_6608</i>	4,639	A/G	0,94 (A)	0,92 (A)	0,118	0,90	0,09	0,00	0,85	0,14	0,00	----
<b>GRIN2A-Locus</b>												
<i>rs1014531</i>	0	A/G	0,57 (G)	0,60 (G)	0,185	0,19	0,46	0,34	0,13	0,51	0,35	0,053
<i>rs5765</i>	0,286	C/T	0,57 (C)	0,60 (C)	0,162	0,34	0,45	0,19	0,35	0,51	0,13	0,051
<i>GRIN2A_100195</i>	27,572	9	-	-	0,140	-	-	-	-	-	-	----
<i>rs2267792</i>	7,306	A/C	0,72 (C)	0,70 (C)	0,327	0,06	0,41	0,52	0,04	0,50	0,45	0,367
<i>GRIN2A_100500</i>	23,194	13	-	-	<b>0,019</b>	-	-	-	-	-	-	----
<i>GRIN2A_100620</i>	12,000	10	-	-	0,217	-	-	-	-	-	-	----
<i>rs1430</i>	17,736	A/G	0,73 (G)	0,72 (G)	0,481	0,08	0,36	0,55	0,06	0,43	0,50	0,905
<i>GRIN2A_101650</i>	85,264	16	-	-	0,599	-	-	-	-	-	-	----
<i>rs3743833</i>	98,819	A/C	0,84 (C)	0,85 (C)	0,528	0,01	0,27	0,70	0,01	0,25	0,72	1,000
<i>GRIN2A_103270</i>	63,181	16	-	-	0,494	-	-	-	-	-	-	----
<i>GRIN2A_103995</i>	72,500	7	-	-	0,881	-	-	-	-	-	-	----
<i>GRIN2A_104140</i>	14,500	18	-	-	0,066	-	-	-	-	-	-	----

<sup>a</sup>Allele der SNPs in alphabetischer Reihenfolge bzw. Anzahl der detektierten Allele der STR-Marker<sup>b</sup>1 bezeichnet das häufiger, 2 das seltener vorkommende Allel

### 6.1.2 Haplotyp-Analyse

Es wurden 3-Marker-Haplotypen im sog. 3-Marker-sliding-window analysiert. Im Folgenden sind die globalen p-Werte für die jeweilige Haplotypkombination im Schizophreniekollektiv dargestellt.

**Tabelle 7: Haplotyp-Analyse der Marker am *GRIN1*-Locus**

Haplotyp	p-Wert (global)
<i>GRIN1_1317190—rs4880213—rs 243_1001</i>	0,435
<i>rs4880213—rs243_1001—rs6293</i>	0,240
<i>rs243_1001—rs6293—rs IVS11_6608</i>	0,187

Die untersuchten Haplotypen zeigten keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen Patienten und Kontrollen.

## 6.2 GRIN2A

Innerhalb des *GRIN2A*-Gens wurden sieben STR-Marker (*GRIN2A\_100195*, *GRIN2A\_100620*, *GRIN2A\_101650*, *GRIN2A\_100500*, *GRIN2A\_103270*, *GRIN2A\_103995*, *GRIN2A\_104140*) und fünf SNPs (*rs1430*, *rs5765*, *rs1014531*, *rs2267792*, *rs3743833*) einzeln sowie in Haplotyp-Analyse auf Assoziation mit schizophrenen Störungen untersucht. Für eine genaue Beschreibung der Marker siehe Kapitel 2.6 und 2.7.

### 6.2.1 Einzelmarker-Analyse

Die Ergebnisse der Einzelmarker-Analyse der untersuchten STR-Marker und SNPs am *GRIN2A*-Locus sind Tabelle 6 zu entnehmen.

Für ein Allel eines STR-Markers, *GRIN2A\_100500*, ergab sich in der Einzelmarker-Analyse ein signifikanter p-Wert ( $p=0,019$ ). Die Allele und Genotypen der übrigen Marker zeigten keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen Patienten und Kontrollen.

### 6.2.2 Haplotyp-Analyse

Es wurden 3-Marker-Haplotyp-Analysen im 3-Marker-sliding-window durchgeführt. Im Folgenden sind die globalen p-Werte für Haplotypkombinationen am *GRIN2A*-Locus im

Schizophreniekollektiv dargestellt. Analysen anderer Markerkombinationen am *GRIN2A*-Locus erwiesen sich nicht als sinnvoll, da das Kopplungsungleichgewicht (LD) zwischen den Markern aufgrund zu großer Inter-Marker-Distanzen zu gering war.

**Tabelle 8: Haplotyp-Analyse der Marker am *GRIN2A*-Locus**

Haplotyp	p-Wert (global)
<i>rs1014531—rs5765—GRIN2A_100195</i>	<b>0,017</b>
<i>rs5765—GRIN2A_100195—rs2267792</i>	<b>0,0248</b>

Beide Haplotypkombinationen zeigten statistisch signifikante Unterschiede zwischen Patienten und Kontrollenglobale (p global= 0,017 bzw. p global=0,0248).

### 6.3 GRIN2B

Innerhalb des *GRIN2B*-Gens wurden sechs STR-Marker (*GRIN2B\_139030*, *GRIN2B\_139780*, *GRIN2B\_140810*, *GRIN2B\_141230*, *GRIN2B\_141660*, *GRIN2B\_142600*) und sechs SNPs (*rs1805522*, *rs1805482*, *rs741360*, *rs3764030*, *rs1805552*, *rs2192971*) einzeln sowie in Haplotyp-Analyse auf Assoziation mit schizophrenen Störungen untersucht. Für eine genaue Beschreibung der Marker siehe Kapitel 2.6 und 2.7.

#### 6.3.1 Einzelmarker-Analyse

Die Ergebnisse der Einzelmarker-Analysen der untersuchten STR-Marker und SNPs am *GRIN2B*-Locus sind Tabelle 9 zu entnehmen.

Für zwei STR- und einen SNP-Marker ergaben sich signifikante p-Werte in der Einzelmarker-Analyse: *GRIN2B\_139030* zeigte einen signifikanten p-Wert in der Allelverteilung (p= 0,009), ebenso *GRIN2B\_142600* (p= 0,015) und *rs2192971*(p=0,001). Die restlichen Marker zeigten keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen Patienten und Kontrollen.

Tabelle 9: Einzelmarker-Analysen an den Loci *GRIN2B* und *SLC1A4*

Marker	Abstände (Kb)	Allel 1/2 <sup>a</sup>	Allelverteilung			Genotypenverteilung <sup>b</sup>						
			Kontrollen	Patienten	p-Wert	Kontrollen			Patienten			p-Wert
						1/1	1/2	2/2	1/1	1/2	2/2	
<b>GRIN2B-Locus</b>												
<i>GRIN2B_139030</i>	0	18	-	-	<b>0,009</b>	-	-	-	-	-	-	---
<i>rs1805522</i>	3,438	A/G	0,95(G)	0,94(G)	0,431	0,00	0,10	0,91	0,00	0,11	0,89	----
<i>rs1805482</i>	3,033	A/G	0,68(G)	0,66(G)	0,434	0,10	0,44	0,46	0,11	0,46	0,43	1,000
<i>rs1805552</i>	26,554	C/T	0,78(C)	0,78(C)	0,901	0,62	0,34	0,05	0,60	0,36	0,04	1,000
<i>rs741360</i>	31,475	C/T	0,80(T)	0,82(T)	0,278	0,06	0,29	0,65	0,04	0,29	0,68	0,343
<i>GRIN2B_139780</i>	10,500	16	-	-	0,067	-	-	-	-	-	-	---
<i>rs2192971</i>	0,067	G/T	0,83(T)	0,90(T)	<b>0,001</b>	0,04	0,27	0,70	0,01	0,19	0,80	0,103
<i>GRIN2B_140810</i>	102,933	6	-	-	----	-	-	-	-	-	-	---
<i>GRIN2B_141230</i>	42,000	10	-	-	0,580	-	-	-	-	-	-	---
<i>GRIN2B_141660</i>	43,000	7	-	-	0,450	-	-	-	-	-	-	---
<i>GRIN2B_142600</i>	94,000	16	-	-	<b>0,015</b>	-	-	-	-	-	-	---
<i>rs3764030</i>	18,029	C/T	0,81(C)	0,80(C)	0,598	0,66	0,30	0,04	0,64	0,32	0,04	1,000
<b>SLC1A4-Locus</b>												
<i>rs1064512</i>	0	C/G	0,93(G)	0,94(G)	0,484	0,01	0,13	0,86	0,00	0,13	0,87	----
<i>rs3732062</i>	11,350	C/T	0,83(T)	0,83(T)	0,760	0,02	0,30	0,68	0,03	0,28	0,70	1,000
<i>rs759458</i>	17,129	A/G	0,75(G)	0,75(G)	0,983	0,06	0,38	0,56	0,06	0,38	0,56	1,000
<i>rs2075209</i>	0,758	A/G	0,81(G)	0,83(G)	0,387	0,04	0,30	0,67	0,02	0,31	0,68	0,145
<i>SLC1A4_654770</i>	44,705	10	-	-	---	-	-	-	-	-	-	---

<sup>a</sup>Allele der SNPs in alphabetischer Reihenfolge bzw. Anzahl der detektierten Allele der STR-Marker<sup>b</sup>1 bezeichnet das häufiger, 2 das seltener vorkommende Allel

### 6.3.2 Haplotyp-Analyse

Es wurden 3-Marker-Haplotyp-Analysen durchgeführt. Im Folgenden sind die globalen p-Werte für Haplotypkombinationen im Schizophreniekollektiv dargestellt, deren Marker in starkem Kopplungsungleichgewicht (LD) zueinander lagen.

**Tabelle 10: Ergebnisse der Haplotyp-Analyse der Marker am *GRIN2B*-Locus**

Haplotyp	p-Wert (global)
<i>GRIN2B_139030—rs1805522—rs1805482</i>	0,056
<i>rs1805522—rs1805482—rs1805552</i>	0,243
<i>rs1805482—rs1805552—rs741360</i>	0,273
<i>rs1805552—rs741360—GRIN2B_139780</i>	0,270

Keiner der untersuchten Haplotypen zeigte statistisch signifikante Unterschiede zwischen Patienten und Kontrollen.

## 6.4 SLC1A4

Innerhalb des *SLC1A4*-Gens wurden ein STR-Marker (*SLC1A4\_654770*) und vier SNPs (*rs1064512*, *rs759458*, *rs2075209*, *rs3732062*) einzeln sowie in Haplotyp-Analyse auf Assoziation mit schizophrener Psychose untersucht. Für eine genaue Beschreibung der Marker siehe Kapitel 2.6 und 2.7.

### 6.4.1 Einzelmarker-Analyse

Die Ergebnisse der Einzelmarker-Analysen der untersuchten STR-Marker und SNPs am *SLC1A4*-Locus sind Tabelle 9 zu entnehmen. Keiner der Marker zeigte in der Einzel-Analyse statistisch signifikante Unterschiede zwischen Patienten und Kontrollen.

### 6.4.2 Haplotyp-Analyse

Es wurden 2-Marker-Haplotyp-Analysen durchgeführt. Im Folgenden sind die globalen p-Werte für Haplotypkombinationen im Schizophreniekollektiv dargestellt.

**Tabelle 11: Ergebnisse der Haplotyp-Analyse der Marker am *SLC1A4*-Locus**

Haplotyp	p-Wert (global)
<i>SLC1A4_654770—rs2075209</i>	0,689
<i>rs2075209—rs759458</i>	0,537
<i>rs759458—rs3732062</i>	0,768
<i>rs3732062—rs1064512</i>	0,753

Die untersuchten Haplotypen zeigten keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen Patienten und Kontrollen.

## 6.5 SLC6A5

Innerhalb des *SLC6A5*-Gens wurden zwei STR-Marker (*SLC6A5\_214235*, *SLC6A5\_214420*) und sechs SNPs (*rs2241940*, *rs1443548*, *rs228968*, *rs2000959*, *rs2276433*, *rs3740871*) einzeln sowie in Haplotyp-Analyse auf Assoziation mit schizophrenen Störungen untersucht. Für eine genaue Beschreibung der Marker siehe Kapitel 2.6 und 2.7.

### 6.5.1 Einzelmarker-Analyse

Die Ergebnisse der Einzelmarker-Analysen der untersuchten STR-Marker und SNPs am *SLC6A5*-Locus sind Tabelle 13 zu entnehmen. Keiner der untersuchten Marker von *SLC6A5* wies signifikante p-Werte auf. Somit gab es keinen Hinweis auf Assoziation der untersuchten Polymorphismen dieses Genlocus mit schizophrenen Störungen.

### 6.5.2 Haplotyp-Analyse

Es wurde eine 5-Marker-Haplotyp-Analyse durchgeführt. Im Folgenden ist der globale p-Wert der Haplotypkombination im Schizophreniekollektiv dargestellt.

**Tabelle 12: Ergebnisse der Haplotyp-Analyse der Marker am *SLC6A5*-Locus**

Haplotyp	p-Wert (global)
<i>rs2241940—rs2289683—SLC6A5_214420— rs3740871—rs2000959</i>	0,407

Dieser Haplotyp zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen Patienten und Kontrollen.

Tabelle 13: Einzelmarker-Analysen an den Loci *SLC6A5*, *SLC6A9* und *PSPH*

Marker	Abstände (Kb)	Allel 1/2 <sup>a</sup>	Allelverteilung			Genotypenverteilung <sup>b</sup>						
			Kontrollen	Patienten	p-Wert	Kontrollen			Patienten			p-Wert
						1/1	1/2	2/2	1/1	1/2	2/2	
<b>SLC6A5-Locus</b>												
<i>SLC6A5_214235</i>	0	17	-	-	---	-	-	-	-	-	-	---
<i>rs2241940</i>	0,382	A/G	0,67(G)	0,63(G)	0,082	0,12	0,42	0,46	0,13	0,50	0,38	0,060
<i>rs1443548</i>	0,692	C/T	0,75(C)	0,76(C)	0,484	0,54	0,42	0,04	0,58	0,37	0,05	1,000
<i>rs2289683</i>	3,369	C/T	0,99(C)	1,00(C)	0,359	0,99	0,01	0,00	1,00	0,01	0,00	----
<i>SLC6A5_214420</i>	14,057	10	-	-	0,372	-	-	-	-	-	-	---
<i>rs3740871</i>	7,945	A/G	0,71(G)	0,71(G)	0,996	0,09	0,41	0,51	0,08	0,41	0,50	1,000
<i>rs2000959</i>	10,266	A/C	0,68(C)	0,71(C)	0,197	0,10	0,45	0,45	0,07	0,44	0,49	0,406
<i>rs2276433</i>	15,221	A/G	0,62(G)	0,65(G)	0,310	0,14	0,47	0,39	0,14	0,43	0,44	0,412
<b>SLC6A9-Locus</b>												
<i>rs2248632</i>	0	A/G	0,94(G)	0,94(G)	0,993	0,01	0,10	0,89	0,01	0,11	0,88	0,726
<i>rs3791129</i>	13,487	A/G	0,73(A)	0,71(A)	0,390	0,53	0,39	0,07	0,51	0,41	0,09	0,917
<i>SLC6A9_434835</i>	2,984	7	-	-	----	-	-	-	-	-	-	---
<b>PSPH-Locus</b>												
<i>PSPH_555080</i>	0	7	-	-	0,410	-	-	-	-	-	-	---
<i>rs4255091</i>	38,862	C/G	0,69(C)	0,68(C)	0,569	0,48	0,42	0,10	0,45	0,46	0,09	0,876
<i>rs4496923</i>	5,009	C/T	0,70(G)	0,68(G)	0,505	0,10	0,42	0,49	0,09	0,46	0,45	0,676

<sup>a</sup>Allele der SNPs in alphabetischer Reihenfolge bzw. Anzahl der detektierten Allele der STR-Marker<sup>b</sup>1 bezeichnet das häufigere, 2 das seltenere Allel

## 6.6 SLC6A9

Innerhalb des *SLC6A9*-Gens wurden ein STR-Marker (*SLC6A9\_434835*) und zwei SNPs (*rs224832*, *rs3791129*) einzeln sowie in Haplotyp-Analyse auf Assoziation mit schizophrenen Störungen untersucht. Für eine genaue Beschreibung der Marker siehe Kapitel 2.6 und 2.7.

### 6.6.1 Einzelmarker-Analyse

Die Ergebnisse der Einzelmarker-Analysen der untersuchten STR-Marker und SNPs am *SLC6A9*-Locus sind Tabelle 13 zu entnehmen.

Auch die Einzelanalysen von STR-Markern und SNPs des Gens *SLC6A9* zeigten keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen Patienten und Kontrollen.

### 6.6.2 Haplotyp-Analyse

Es wurde eine 3-Marker-Haplotyp-Analyse durchgeführt. Der globale p-Wert für diese Haplotypkombination im Schizophreniekollektiv ist in Tabelle 17 dargestellt.

**Tabelle 14: Ergebnisse der Haplotyp-Analyse der Marker am *SLC6A9*-Locus**

Haplotyp	p-Wert (global)
<i>SLC6A9_434835—rs3791129—rs2248632</i>	0,486

Der untersuchte Haplotyp zeigte keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen Patienten und Kontrollen.

## 6.7 PSPH

Innerhalb des *PSPH*-Gens wurden ein STR-Marker (*PSPH\_555080*) und zwei SNPs (*rs4255091*, *rs4496923*) einzeln sowie in Haplotyp-Analyse auf Assoziation mit schizophrenen Störungen untersucht. Für eine genaue Beschreibung der Marker siehe Kapitel 2.6 und 2.7.

### 6.7.1 Einzelmarker-Analyse

Die Ergebnisse der Einzelmarker-Analysen der untersuchten STR-Marker und SNPs am *PSPH*-Locus sind Tabelle 13 zu entnehmen.

Die untersuchten STR-Marker und SNPs zeigten in der Einzelanalyse keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen Patienten und Kontrollen.

### 6.7.2 Haplotyp-Analyse

Es wurde eine 3-Marker-Haplotyp-Analyse durchgeführt; der globale p-Wert dieser Haplotyp-Analyse ist folgend dargestellt.

**Tabelle 15: Ergebnisse der Haplotyp-Analyse der Marker am *PSPH*-Locus**

Haplotyp	p-Wert (global)
<i>PSPH_555080—PSPH_4255091—PSPH_4496923</i>	0,671

Der untersuchte Haplotyp zeigte keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen Patienten und Kontrollen.

## 7 Diskussion

### 7.1 Ansatz, Aufbau und Methodik vorliegender Arbeit

Ziel dieser Arbeit war die Identifikation von Dispositionsgenen, die zur Entstehung schizophrener Störungen beitragen. Dazu wurden Assoziationsuntersuchungen mit 19 STR-Markern und 29 SNPs im Bereich von insgesamt sieben Kandidatengenen an einem schizophrenen Patienten- (n=360) und einem gesunden Kontrollkollektiv (n=325) durchgeführt. Bei den untersuchten Genen handelte es sich um aussichtsreiche Kandidatengene, da funktionelle Überlegungen und Vorbefunde anderer Arbeitsgruppen ihre Beteiligung am Entstehungsprozess schizophrener Störungen möglich erscheinen ließen. Im Mittelpunkt dieser Überlegungen standen Forschungsergebnisse, nach denen der glutamatergen Signaltransmission an humanen kortikalen Synapsen eine Bedeutung für schizophrene Störungen zukommen könnte. So wird vielfach vermutet, dass schizophrene Symptome durch eine Unterfunktion der glutamatergen Neurotransmission mit ausgelöst werden. Diese Hypothese existiert bereits seit den frühen achtziger Jahren und stützt sich u. a. auf pharmakologische Beobachtungen. So ist bekannt, dass antagonistisch wirkende Liganden an glutamatergen NMDA-Rezeptoren bei psychisch gesunden Personen akut Schizophrenie-ähnliche Psychosen hervorrufen können (Olney et al., 1999). Auch die jüngsten Forschungsergebnisse auf dem Gebiet der Molekulargenetik deuten auf eine Beteiligung der glutamatergen Neurotransmission am Entstehungsprozess schizophrener Störungen hin. So wurden positive Assoziationshinweise zwischen Patientenkollektiven und Polymorphismen in Genen identifiziert, deren Proteinprodukte innerhalb der glutamatergen Neurotransmission von funktioneller Relevanz sind. Die initialen Assoziationshinweise konnten nachfolgend an unabhängigen Kollektiven repliziert werden. Im Einzelnen handelt es sich um die Gene *DTNBPI*, *NRG1*, *DAO* und *DAOA*.

Die in dieser Arbeit untersuchten Kandidatengene kodieren sämtlich für Proteine, die ebenfalls am Stoffwechsel der glutamatergen Neurotransmission beteiligt sind. Entweder wirken sie direkt auf die NMDA-Rezeptoren ein oder sie beeinflussen die Verfügbarkeit seiner Substrate Glutamat, Glycin und Serin. Im Einzelnen kodieren drei der Kandidatengene für Untereinheiten des NMDA-Rezeptors, es handelt sich um die Gene *GRIN1*, *GRIN2A* und *GRIN2B*. Zwei der untersuchten Gene beeinflussen den transmembranösen Glycin-Transport im ZNS. Es handelt sich um die Gene *SLC6A5* und *SLC6A9*. Ein weiteres von uns untersuchtes Kandidatengen kodiert für ein Protein, das den transmembranösen Glutamat-Transport im ZNS beeinflusst, es

handelt sich um das *SLC1A4*-Gen. Noch ein weiteres von uns untersuchtes Kandidatengen, *PSPH*, kodiert für das Enzym Phosphoserin-Phosphatase, das an der Bereitstellung der an den NMDA-Rezeptoren agonistisch wirkenden Aminosäure D-Serin beteiligt ist.

Um den Beitrag der genannten Kandidatengene am Entstehungsprozess schizophrener Störungen zu testen, wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit Assoziationsuntersuchungen an einem schizophrenen Patienten- und einem gesunden Kontrollkollektiv durchgeführt. Als genetische Marker fanden dabei STR-Marker und SNPs Verwendung. SNPs, deren Allele sich nur in jeweils einem ausgetauschten Nukleotid unterscheiden, haben den Vorteil, von allen genetischen Varianten mit Abstand am häufigsten und gleichmäßigsten über das humane Genom verteilt zu sein. Seit dem im Jahr 2005 abgeschlossenen HapMap Projekt steht der Öffentlichkeit auch ein umfangreicher Datensatz von genomweit verteilten SNPs zur Verfügung. Durch diese Fortschritte können mittlerweile Kandidatengene und Kopplungsregionen mit SNPs untersucht werden, die in nur geringem Abstand zueinander lokalisiert sind. Dies ist von großem Vorteil, da sich Assoziationen häufig erst durch das Aufdecken von Kopplungsungleichgewichten und durch Haplotyp-Analysen auffinden lassen. Zum Zeitpunkt der vorliegenden Arbeit standen die umfangreichen HapMap-Daten bei der SNP-Auswahl noch nicht zur Verfügung. Um eine möglichst suffiziente Marker-Abdeckung im Bereich der einzelnen Kandidatengene zu gewährleisten, wurden daher zusätzlich STR-Marker untersucht, die zuvor über das Programm *Tandem Repeat Finder* (TRF, Benson, 1999) identifiziert wurden. Aufgrund ihrer multi-allelischen Eigenschaft stellen STR-Marker überdies geeignete Varianten für Assoziationsuntersuchungen dar.

Als Studiendesign wählten wir eine Fall-Kontroll-Studie, da die Rekrutierung solcher Kollektive aufgrund ihres vertretbaren Aufwandes deutliche Vorteile gegenüber familienbasierten Studien aufweist. Mögliche Stratifikationseffekte (krankheitsunabhängige genetische Unterschiede zwischen Patienten- und Kontrollkollektiv) wurden dabei durch den Aufbau eines dem Patientenkollektiv ethnisch vergleichbaren Kontrollkollektivs vermieden.

## 7.2 Ergebnisdiskussion

In den untersuchten Kandidatengenen, die für Untereinheiten des NMDA-Rezeptors kodieren (*GRIN1*, *GRIN2A*, *GRIN2B*), konnten wir zwischen einzelnen Markern und dem

Betroffenheitsstatus zum Teil signifikante Assoziationshinweise finden. Im Bereich der Gene, die für die unterschiedlichen Transporter-Proteine kodieren (*ASCT1*, *GlyT1* und *GlyT2*) und für die Bereitstellung unterschiedlicher Liganden bei der glutamatergen Neurotransmission von Bedeutung sind, konnten wir keine signifikanten Unterschiede der Allel- und Genotyp-Häufigkeiten zwischen dem untersuchten Patienten- und dem Kontrollkollektiv finden. Dies betrifft auch das Kandidatengen *PSPH*, das als Enzym an der glutamatergen Neurotransmission beteiligt ist. Nachfolgend werden zunächst die Ergebnisse diskutiert, die sich bei den Analysen an den Genen für die Untereinheiten des NMDA-Rezeptors ergeben haben. Darauf folgend werden die Ergebnisse diskutiert, die sich im Bereich der anderen Kandidatengene zeigten.

## 7.2.1 NMDA-Rezeptor-Untereinheiten

### 7.2.1.1 GRIN1

Bei *GRIN1* handelt es sich um eine Untereinheit des NMDA-Rezeptors, die zugleich obligate Komponente jeder funktionellen Rezeptorvariante ist. Da die Glycin-Bindungsstelle im Bereich der *GRIN1*-Untereinheit lokalisiert ist, stellt sie einen essentiellen Bestandteil des Rezeptors dar. Im Mausmodell führte eine verminderte Expression von *GRIN1* zu Verhaltensauffälligkeiten, die Ähnlichkeiten zu den pharmakologisch im Mausmodell induzierten schizophrenen Störungen aufzeigt (Mohn et al, 1999). Kodiert wird *GRIN1* von einer ca. 31 kb umfassenden Region auf Chromosom 9q34. Bei *GRIN1* handelt es sich dabei auch um ein positionelles Kandidatengen, da mehrfach Kopplungsbefunde zwischen Markern im Bereich von Chromosom 9q34 und schizophrenen Störungen gefunden wurden (Kaufmann et al., 1998; Riley et al., 1997). In vorliegender Arbeit untersuchten wir 5 genetische Polymorphismen im Bereich von *GRIN1*: 1 STR-Marker und 4 SNPs. Die Zwischen-Marker-Abstände betragen dabei zwischen 2,1 kb und 16,8 kb; die Marker erstreckten sich insgesamt über eine Region von 27,2 kb.

Einer der untersuchten SNPs, *rs4880213*, zeigte bei unseren Einzelmarker-Analysen eine signifikant unterschiedliche Genotyp-Verteilung zwischen dem Patienten- und dem Kontrollkollektiv ( $p=0,006$ , siehe Kapitel 6, Tabelle 6). Ein weiterer SNP, *rs11146020*, zeigte eine signifikant unterschiedliche Allelverteilung zwischen den Patienten und Kontrollen ( $p=0,027$ , siehe Kapitel 6, Tabelle 6). Erwähnenswert ist dabei, dass beide assoziierten Marker benachbart und im 5'UTR-Bereich von *GRIN1* lokalisiert sind. Allerdings halten unsere Ergebnisse keiner Korrektur auf multiples Testen stand, so dass falsch positive Ergebnisse aufgrund der hohen

Markerzahl, die im Rahmen vorliegender Studie getestet wurden, nicht auszuschließen sind. Die Einzelmarker-Analyse der übrigen im Bereich von *GRIN1* untersuchten SNPs (*rs6293*, *rsIVS11\_6608*) und die des STR-Markers zeigten keine signifikanten Assoziationshinweise. Auch die Haplotyp-Analysen ergaben keine weiterführenden Assoziationsbefunde.

Auch wenn unsere Assoziationshinweise bei den beiden SNPs, die im 5'UTR-Bereich von *GRIN1* lokalisiert sind, aufgrund der fehlenden Assoziation bei den drei anderen genetischen Varianten und der negativen Befunde bei unseren Haplotyp-Analysen nicht einfach zu bewerten sind, erscheinen die Befunde anderer Arbeitsgruppen in Zusammenschau mit unseren Ergebnissen interessant. So ergaben Analysen an zwei Schizophrenie-Kollektiven europäischer Herkunft positive Assoziationshinweise zu *rs11146020*, der im 5'UTR Bereich von *GRIN1* lokalisiert ist und der ebenfalls bei unserer Untersuchung signifikant assoziiert war: Begni et al. (2003) untersuchten *rs11146020* in einem italienischem Fall-Kontroll-Kollektiv, bestehend aus 139 schizophrenen Patienten und 145 gesunden Probanden, und fanden eine Assoziation ( $p=0,008$ ) mit dem gleichen Allel (Allel C), das auch in unserer Untersuchung assoziiert war. Die Gruppe spekuliert zudem darüber, dass *rs11146020* eine Konsensussequenz eines NF-kappa-B-Transkriptionsfaktors beeinflussen könnte. Die zweite Studie untersuchte zwei SNP-Marker in zwei relativ kleinen Kollektiven mit schizophrenen Störungen kanadisch-europäischer Herkunft. In einer dieser Stichproben (91 Patienten, 91 Kontrollen) war ebenfalls Allel C bei *rs11146020* signifikant ( $p=0,013$ ) und in der anderen Stichprobe (86 Kernfamilien mit schizophrenen Störungen) tendenziell assoziiert ( $p=0,14$ ) (Martucci et al., 2003). Der zweite von dieser Gruppe untersuchte SNP, der im Exon 6 von *GRIN1* lokalisiert ist, wies indes keine Assoziationshinweise auf (Martucci et al., 2003). In einer weiteren Studie mit schizophrenen Patienten europäischer Herkunft konnten die dargestellten Befunde nicht repliziert werden (Williams et al., 2002). Allerdings fand dabei ein Pooling-Ansatz Verwendung. Hierbei wurde die DNA von 184 schizophrenen Patienten und 184 Kontrollen nicht einzeln, sondern nach vorherigem Zusammenführen in ein Patienten- und ein Kontrollkollektiv analysiert. Da die Power bei diesem Ansatz im Vergleich zu individuellen Genotypisierungen wesentlich geringer ist, sind die Ergebnisse dieser Untersuchung nur eingeschränkt zu bewerten. In vier Stichproben mit chinesischer Herkunft wurden ebenfalls Varianten im Bereich von *GRIN1* auf Assoziation zum Erkrankungsstatus hin getestet (Hung et al., 2002; Chiu et al., 2003; Zhao et al., 2006). Von diesen zeigten die Kollektive positive Assoziationshinweise, die ebenfalls Marker im 5'UTR-

Bereich von *GRIN1* untersuchten. So fanden Zhao et al. (2006) bei 692 Patienten mit schizophrenen Störungen und 681 Kontrollen hochsignifikante ( $p=0.0000013$ ), und in einem zweiten Kollektiv, bestehend aus 351 Trios mit schizophrener Störung, signifikante Assoziationen ( $p=0.0019$ ) zwischen Allel G von *rs11146020* und der Erkrankung. Demgegenüber konnten Hung et al. (2002) und Chiu et al. (2003) keine Assoziationen nachweisen, allerdings fanden hierbei auch keine Varianten im 5'UTR-Bereich von *GRIN1* Einschluss. Für eine Bedeutung von *GRIN1* an der Entstehung schizophrener Störungen in der japanischen Population ergaben sich bislang keine Hinweise. Zwar wurden der einzigen bislang veröffentlichten Studie keine großen Stichproben zugrunde gelegt (196 Patienten, 216 Kontrollen), jedoch wurden 17 SNPs mit einer relativ guten Marker-Abdeckung – speziell auch im 5'UTR-Bereich von *GRIN1* – untersucht. Es ergaben sich keine Assoziationshinweise (Tani et al., 2002).

Zusammenfassend ergaben sich in allen bislang untersuchten Kollektiven mit ausreichend großer statistischer Power positive Assoziationshinweise zu *rs11146020* im 5'UTR-Bereich von *GRIN1*. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass in diesem Abschnitt, in dem auch ein Promotor für *GRIN1* lokalisiert ist, eine krankheitsverursachende Variante für schizophrene Störungen vermutet werden kann. Dass es sich bei *rs11146020* bereits um die Dispositionsvariante selber handelt, scheint jedoch unwahrscheinlich. Dem 2 kb upstream lokalisierten SNP *rs4880213* kam in unserer Untersuchung eine höhere prädiktive Bedeutung zu, und zwischen den Kollektiven europäischer und asiatischer Herkunft sind unterschiedliche Allele bei *rs11146020* assoziiert. Nach dem FirstEF-Programm (Davuluri et al., 2001), das die Lokalisation von regulatorischen Sequenzbereichen möglichst genau vorhersagt, liegt ein potentieller Promotor in unmittelbarer Nähe zu den dargestellten positiven Assoziationsbefunden. Diese Region umfasst etwa 1,6 kb. Zukünftige Untersuchungen müssen klären, inwieweit genetische Varianten speziell in diesem Bereich zur Krankheitsentstehung schizophrener Störungen beitragen. Sollten sich hierbei positive Assoziationshinweise ergeben, die auch in weiteren Stichproben repliziert werden können, müssen funktionelle Analysen mit Allel-spezifischen qualitativen und quantitativen Expressionsuntersuchungen klären, welcher genetischen Veränderung im 5'UTR-Bereich bzw. im Promotor von *GRIN1* die höchste Plausibilität als Dispositionsvariante zukommt.

### 7.2.1.2 GRIN2A

GRIN2A ist eine der fakultativen Epsilon-Untereinheiten des NMDA-Rezeptors und bildet zusammen mit GRIN1 einen funktionellen Rezeptor. Die unterschiedlichen Epsilon-Einheiten GRIN2A-D sind verantwortlich für die verschiedenen Eigenschaften der Glutamat-Bindungsstelle, die auf der GRIN2-Untereinheit lokalisiert ist (Anson et al., 1998; Hirai et al., 1996; Kuryatov et al., 1994; Laube et al., 1997). Transgene Mäuse mit einem Defizit an *GRINε1*, das das Ortholog zum humanen *GRIN2A* darstellt, zeigen einen erhöhten Serotonin- und Dopaminstoffwechsel im Striatum und frontalen Kortex, sie entwickeln zudem Verhaltensauffälligkeiten, die dem schizophrenen Mausmodell ähnlich sind (Miyamoto et al., 2002). Das Gen für *GRIN2A* liegt auf dem Chromosom 16p13 und umfasst eine Region von ca. 421,8 kb. In vorliegender Arbeit wurden insgesamt 12 genetische Polymorphismen in und um die kodierende Region untersucht: 5 SNPs und 7 STR-Marker. Die Zwischen-Marker-Abstände lagen dabei zwischen 0,2 und 98,8 kb; die Marker erstreckten sich insgesamt über eine Region von 422,3 kb.

Nur ein STR-Marker – *GRIN2A\_10050* – zeigte signifikante Unterschiede in der Allelverteilung zwischen Patienten und Kontrollen ( $p=0,019$ , siehe Kapitel 6, Tabelle 6). Alle übrigen Polymorphismen (STR-Marker: *GRIN2A\_100195*, *GRIN2A\_100620*, *GRIN2A\_101650*, *GRIN2A\_103270*, *GRIN2A\_103995*, *GRIN2A\_104140*; SNP-Marker: *rs1014531*, *rs5765*, *rs2267792*, *rs1430*, *rs3743833*) zeigten keine statistisch signifikante Assoziation zu schizophrenen Störungen. Allerdings zeigte ein STR-Marker – *GRIN2A\_10414* – eine Tendenz zur Assoziation ( $p=0,066$ ). Den 3-Marker-Haplotyp-Analysen am *GRIN2A*-Locus wurden insgesamt 4 Marker zugrunde gelegt. Aufgrund des zu niedrigen Kopplungsungleichgewichts zwischen den übrigen Markern konnten diese nicht in die Haplotyp-Analysen mit einbezogen werden. Insgesamt wurden zwei 3-Marker-Haplotyp-Kombinationen getestet. Dabei ergab sowohl die Haplotyp-Kombination *rs1014531-rs5765-GRIN2A\_100195* ( $p=0,017$ ) als auch die Haplotyp-Kombination *rs5765-GRIN2A\_100195-rs2267792* ( $p=0,024$ ) signifikante Assoziationshinweise zu schizophrenen Störungen (siehe Kapitel 6, Tabelle 6).

In Zusammenschau mit den in der Literatur veröffentlichten Assoziationsdaten anderer Arbeitsgruppen fällt die Beurteilung, ob es sich bei *GRIN2A* um ein Dispositionsgen für schizophrene Störungen handelt, nicht einfach. Den unabhängigen Untersuchungen wurde zwar

ausschließlich der im 5'UTR-Bereich von *GRIN2A* lokalisierte STR-Marker *GRIN2A\_10414* zugrunde gelegt, allerdings ergaben sich dabei in drei Studien positive und nur in einer negative Assoziationshinweise: Itokawa et al. (2003) untersuchten 375 schizophrene Patienten und 378 Kontrollen japanischer Herkunft und fanden eine Assoziation zu dem STR-Marker ( $p=0,05$ ). Bei 672 Patienten mit schizophrener Störung und 686 Kontrollen aus Japan beobachteten Iwayama-Shigeno et al. (2005) ebenfalls eine signifikante Assoziation mit dem STR-Marker ( $p=0,011$ ). Des Weiteren berichten Tang et al. (2006) bei 122 schizophrenen Sib-pair-Familien chinesischer Herkunft über eine hochsignifikante Assoziation unter Zugrundelegen des STR-Markers ( $p=0,0002$ ). Allerdings fanden die Befunde in der größten asiatischen Stichprobe keine Bestätigung ( $p=0,60$  in einer kombinierten Auswertung von 704 Patienten, 688 Kontrollen und 353 Trios mit schizophrenen Störungen, alle chinesischer Herkunft) (Zhao et al., 2006). Auch wenn bislang keine Untersuchungen an europäischen Kollektiven vorliegen, zeigte der o. g. STR-Marker – *GRIN2A\_10414* – in unserer Untersuchungen eine tendenzielle Assoziation ( $p=0,066$ ). Es ist nicht zu beurteilen, ob sich unter Zugrundelegen eines größeren Fall-Kontroll-Kollektivs signifikante Befunde gezeigt hätten. Da ein in vitro Promotor-Assay Hinweise auf eine bei *GRIN2A\_10414* Allel-spezifische Transkription von *GRIN2A* ergab, müssen zukünftige Untersuchungen an größeren Kollektiven den Beitrag dieses STR-Markers bei europäischen Patienten mit schizophrenen Störungen klären. Die positiven Befunde, die wir in unserem Kollektiv bei der Einzelmarker-Analyse und den Haplotyp-Analysen erhielten, können jedoch nicht durch ein Kopplungsungleichgewicht zu *GRIN2A\_10414* erklärt werden. Die Marker, die diesen Ergebnissen zugrunde liegen, sind dafür vom 5'UTR-Bereich von *GRIN2A* zu weit entfernt (Minimum von 364 kb), so dass kein Kopplungsungleichgewicht zwischen diesen Markern vorliegt. Um die Bedeutung dieser innerhalb von *GRIN2A* lokalisierten Varianten in Zukunft zu klären, müssen Replikationsuntersuchungen an unabhängigen Kollektiven durchgeführt werden.

### **7.2.1.3 GRIN2B**

GRIN2B ist neben GRIN2A eine weitere der Epsilon-Untereinheiten des NMDA-Rezeptors. Die unterschiedlichen Epsilon-Einheiten GRIN2A-D sind verantwortlich für die verschiedenen Eigenschaften der Glutamat-Bindungsstelle, die auf der GRIN2-Untereinheit lokalisiert ist (Anson et al., 1998; Hirai et al., 1996; Kuryatov et al., 1994; Laube et al., 1997); erst zusammen

mit einer GRIN1-Untereinheit bilden sie einen funktionellen Rezeptor (siehe Kapitel 2). *GRIN2B* liegt auf dem Chromosom 12p12 und umfasst eine Region von ca. 419 kb.

In vorliegender Arbeit untersuchten wir insgesamt 12 genetische Polymorphismen am *GRIN2B*-Locus: 6 SNPs und 6 STR-Marker. Die Zwischen-Marker-Abstände lagen dabei zwischen 0,06 und 102,9 kb; die Marker erstreckten sich insgesamt über eine Region von 375 kb. 2 STR-Marker und 1 SNP zeigten Hinweise auf Assoziation mit schizophrenen Psychosen: Die Allel-Verteilung von *GRIN2B\_139030*, der im 3'UTR von *GRIN2B* lokalisiert ist, war dabei signifikant unterschiedlich bei Patienten im Vergleich zu den Kontrollen ( $p=0,009$ , siehe Kapitel 6, Tabelle 9). Ein zweiter STR-Marker – *GRIN2B\_142600* –, der im 5'UTR von *GRIN2B* lokalisiert ist, wies ebenfalls eine unterschiedliche Allel-Verteilung zwischen Patienten und Kontrollen auf ( $p=0,015$ , siehe Kapitel 6, Tabelle 9). Von den SNPs zeigte *rs2192971*, der im Intron 4 von *GRIN2B* lokalisiert ist, eine signifikant unterschiedliche Allel-Verteilung zwischen Patienten und Kontrollen ( $p=0,001$ , siehe Kapitel 6, Tabelle 9). Allerdings sind die Abstände zwischen den assoziierten Varianten zu groß (75 kb zwischen *GRIN2B\_139030* und *rs2192971*, 281 kb zwischen *rs2192971* und *GRIN2B\_142600*), um von einem assoziierten Locus auszugehen, zwischen den genannten Marker besteht kein Kopplungsungleichgewicht. Alle übrigen Marker (*GRIN2B\_139780*, *GRIN2B\_140810*, *GRIN2B\_141230*, *GRIN2B\_141660*, *rs1805522*, *rs1805482*, *rs1805552*, *rs741360*, *rs3764030*), die allesamt zwischen den assoziierten Markern liegen, wiesen keine Assoziation mit schizophrenen Störungen auf. Diesbezüglich war auch keiner der untersuchten 3-Marker-Haplotypen am *GRIN2B*-Locus assoziiert. Aufgrund des großen genomischen Bereichs, über den sich *GRIN2B* erstreckt, und der in Bezug darauf relativ geringen Marker-Abdeckung waren aber keine Haplotyp-Analysen möglich, die das Gen vollständig abdeckten.

Die positiven Ergebnisse unserer Untersuchung müssen sehr vorsichtig bewertet werden. Auch die bisher veröffentlichten Assoziationsstudien zwischen *GRIN2B*-Varianten und schizophrenen Störungen sind schwierig zu bewerten. In 5 unabhängigen Stichproben (zwei japanische, zwei chinesische Kollektive und ein europäisches Kollektiv) wurden insgesamt 5 unterschiedliche SNP-Marker genotypisiert (Nishiguchi et al., 2000; Ohtsuki et al., 2001; Chiu et al., 2003; Di Maria et al., 2004; Qin et al., 2005). Die genannten Untersuchungen wurden kürzlich einer Meta-Analyse zugeführt (Li und He, 2007). Dabei ergaben sich lediglich bei einem SNP-Marker im 5'UTR-Bereich von *GRIN2B* Assoziationshinweise ( $p=0,005$ ), allerdings wurde dieser Marker

nur in zwei der genannten Kollektive untersucht. Der SNP-Marker liegt etwa 18 kb zu dem von uns untersuchten STR-Marker im 5'UTR-Bereich (*GRIN2B\_142600*) entfernt, zwischen beiden besteht Kopplungsungleichgewicht. Die Daten lassen Spekulationen darüber zu, dass genetische Varianten im 5'UTR-Bereich von *GRIN2B* zur Entstehung schizophrener Störungen beitragen, sie bedürfen allerdings weiterer Replikation in unabhängigen Kollektiven. Dabei sollte auch eine an der Haplotyp-Block-Struktur adaptierte Markerauswahl zugrunde gelegt werden. Die mittlerweile verfügbaren Informationen des HapMap Projekts und die moderneren Typisierungsverfahren sollten diese Untersuchungen zulassen.

## **7.2.2 Glutamat- bzw. Glycin-assoziierte Neurotransmitter-Transporter**

Die Solute-Carrier sind Transporter, die die spezifischen Substrate des NMDA-Rezeptors, Glutamat und Glycin, vom Zytoplasma in den synaptischen Spalt und umgekehrt befördern. Der Aktivitätszustand dieser spezifischen Transporter beeinflusst damit die Verfügbarkeit beider Substrate und somit indirekt auch den Aktivitätszustand der NMDA-Rezeptoren. Genetische Varianten im Bereich der Transporter-Gene könnten auf diese Weise am Entstehungsprozess schizophrener Störungen beteiligt sein.

### **7.2.2.1 SLC1A4**

*SLC1A4* kodiert für den  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -abhängigen Transporter ASCT1, dessen Substrate Glutamat bzw. neutrale Aminosäuren sind. Die kodierende Region des Gens liegt auf Chromosom 2p13 und umfasst ca. 34,4 kb. In vorliegender Arbeit wurden 5 genetische Polymorphismen untersucht: 1 STR-Marker und 4 SNPs. Die Zwischen-Marker-Abstände betragen dabei zwischen 0,7 und 44,7 kb; insgesamt erstreckten sich die Marker über einen genomischen Bereich 73,9 kb.

Keine der untersuchten Varianten zeigte in vorliegender Untersuchung Assoziation zu schizophrenen Störungen. Auch die Haplotyp-Analysen ergaben negative Assoziationsbefunde. Unsere Ergebnisse deuten darauf hin, dass *SLC1A4* ohne ätiologische Relevanz für schizophrene Patienten deutscher Herkunft ist. Allerdings wurden bislang keine anderen Assoziationsuntersuchungen an unabhängigen Kollektiven mit genetischen Varianten am *SLC1A4*-Locus durchgeführt, so dass unklar ist, ob dem Gen in anderen Populationen eine Bedeutung am Entstehungsprozess schizophrener Störungen zukommt.

### 7.2.2.2 SLC6A5

Das Gen für *SLC6A5* liegt in der chromosomalen Region 11p15 und kodiert für den Na<sup>+</sup>/Cl<sup>-</sup>-abhängigen Transporter GlyT2, dessen Substrat Glycin darstellt. *SLC6A5* umfasst eine Region von ca. 55,5 kb. In vorliegender Arbeit wurden 8 genetische Polymorphismen im Bereich von *SLC6A5* untersucht: 2 STR-Marker und 6 SNPs. Die Zwischen-Marker-Abstände betragen dabei zwischen 0,3 und 15,2 kb. Insgesamt erstreckten sich die Marker über eine Region von 51,9 kb.

Ebenso wie bei *SLCIA4*, ergaben sich bei den Einzelmarker- und bei den Haplotyp-Analysen keine Assoziationshinweise zu schizophrenen Störungen. Somit scheint es eher unwahrscheinlich, dass ein (starker) genetischer Effekt von *SLCIA4* ausgeht, der am Entstehungsprozess schizophrener Störungen in der deutschen Population beteiligt ist. Unabhängige Stichproben mit schizophrenen Störungen wurden bislang nicht auf Assoziation am *SLCIA4*-Locus hin getestet.

### 7.2.2.3 SLC6A9

Das *SLC6A9*-Gen kodiert für den Na<sup>+</sup>/Cl<sup>-</sup>-abhängigen Transporter GlyT1, dessen Substrat Glycin ist. Das Gen liegt auf Chromosom 1p33 und umfasst eine Region von ca. 19,8 kb. In vorliegender Arbeit wurden 3 genetische Polymorphismen untersucht: 1 STR-Marker und 2 SNPs. Die Zwischen-Marker-Abstände lagen zwischen 2,9 und 13,4 kb; insgesamt erstreckten sich die Marker über eine Region von 16,4 kb.

Wie auch bei den beiden Genen, die für Glutamat- bzw. Glycin-Transporter kodieren, zeigten weder die Einzelmarker- noch die Haplotyp-Analysen positive Assoziationshinweise. Bei unserer Untersuchung an einem Fall-Kontroll-Kollektiv mit schizophrenen Störungen, die keine Assoziationshinweise zum Erkrankungsstatus zeigten, handelt es sich um die bislang einzige veröffentlichte Analyse am *SLC6A9*-Locus.

## 7.2.3 Das Enzym Phosphoserin-Phosphatase (PSPH)

Die Phosphoserin-Phosphatase ist ein ubiquitär im menschlichen Körper vorkommendes Enzym, das spezifisch den dritten und letzten Schritt der Serin-Biosynthese aus Kohlenhydraten, die Umwandlung von L- (oder D-) O-Phospho-Serin in L- (oder D-) Serin mittels Hydrolyse unter Abspaltung von Phosphat katalysiert. Bei D-Serin handelt es sich um einen wichtigen

Koagonisten an der Glycin-Bindungsstelle der NMDA-Rezeptoren. Bei schizophrenen Patienten wurden erniedrigte D-Serin- und Gesamt-Serin-Serumspiegel festgestellt (Kumashiro et al., 1995; Hashimoto et al., 2003). Eine herabgesetzte Verfügbarkeit von D-Serin könnte daher auf eine Dysfunktion des die Biosynthese katalysierenden Enzyms PSPH zurückzuführen sein. Das Gen *PSPH* liegt in einem ca. 10,1 kb umfassenden Bereich auf Chromosom 7p15. In vorliegender Arbeit wurden insgesamt 3 genetische Polymorphismen, 1 STR-Marker und 2 SNPs, am *PSPH*-Locus untersucht. Die analysierte Region erstreckte sich über 43,8 kb, die Zwischen-Marker-Abstände lagen zwischen 5 und 38,8 kb.

Keine der untersuchten Varianten war bei vorliegender Arbeit zu unserem Kollektiv mit schizophrenen Störungen assoziiert. Es zeigten sich weder in der Einzelmarker- noch in der Haplotypanalyse signifikante Assoziationshinweise. Unsere Untersuchung lässt damit den Schluss zu, dass *PSPH* wahrscheinlich nicht am Entstehungsprozess schizophrener Störungen in der deutschen Population beteiligt ist. Unabhängige Assoziationsuntersuchungen zwischen genetischen Varianten am *PSPH*-Locus und schizophrenen Störungen liegen bislang noch nicht vor.

### 7.3 Ausblick

Die Molekulargenetik ist wie kaum ein anderer wissenschaftlicher Bereich durch die stetige Entwicklung neuer analytischer Methoden einem kontinuierlichen und tiefgreifenden Wandel unterworfen. Gerade die Analyse genetisch komplexer Erkrankungen wird zukünftig durch Innovationen beeinflusst werden, die sich aus der Zusammenarbeit von Genetik, Biometrie, Bioinformatik und der Klinik ergeben. Derzeit von besonderer Bedeutung ist das Zusammenwirken technischer Weiterentwicklungen mit hoher SNP-Genotypisierungskapazität sowie die Fortschritte des Humangenomprojekts, das 2004 abgeschlossen werden konnte (Human Genome Project, 2004), und die des in 2005 beendeten HapMap Projekts (The International HapMap Consortium, 2005). Speziell den interessanten Befunden im Bereich des *GRIN1*-Locus, die wir durch vorliegende Arbeit erheben konnten, kann durch diese Weiterentwicklungen nachgegangen werden. So wird die Genotypisierung einer ausreichend großen Anzahl von SNP-Markern, die in relativ geringen Abständen zueinander lokalisiert sind und deren Auswahl sich an der mittlerweile identifizierten Haplotyp-Block-Struktur orientiert, zur Klärung beitragen, inwieweit *GRIN1* am Entstehungsprozess schizophrener Störungen beteiligt ist.

Nach der Identifikation von Krankheitsgenen bei schizophrenen Störungen werden funktionelle Untersuchungen klären müssen, wie und auf welchem Wege die gefundenen Genvarianten zu einer veränderten Proteinstruktur, Expression oder Funktion führen. Speziell die positiven Assoziationsbefunde im 5'UTR-Bereich von *GRIN1*, die wir und unabhängige Untersuchergruppen finden konnten, legen dabei nahe, dass es sich um regulatorische Dispositionsvarianten an diesem Gen-Locus handelt. Allgemein wird das Gebiet der psychiatrischen Genetik mehr und mehr durch den Einsatz transgener Tiermodelle profitieren, da hierbei die pathophysiologisch zugrundeliegenden Prozesse in vivo beobachtbar sind. Zudem wird das Vergleichen unterschiedlicher Umweltfaktoren bei genetisch stark und weniger stark belasteten Erkrankten die Identifikation und quantitative Abschätzung nichtbiologischer Einflussfaktoren möglich machen.

## 8 Zusammenfassung

Mit einem lebenslangen Morbiditätsrisiko von ca. 1 %, unabhängig von der ethnischen Zugehörigkeit des Patienten, gehören die schizophrenen Störungen zu den häufigsten psychiatrischen Erkrankungen. Durch die oft starken Defizite im emotionalen, sozialen und/oder kognitiven Bereich sind die Patienten und deren Angehörige in ihrer Lebensqualität und nicht selten auch -erwartung eingeschränkt. Die hereditäre Komponente dieser Krankheit ist durch Zwillings-, Adoptions- und Familienstudien hinreichend belegt. Der Vererbungsmodus ist jedoch komplex, da er keinem monogenen Erbgang folgt. Vielmehr werden viele unterschiedliche Genvarianten zu der Krankheitsdisposition beitragen. Die Identifikation einiger dieser Dispositionsgene war Inhalt vorliegender Arbeit. Dabei wurden vor allem Gene, deren Produkte in die glutamaterge Neurotransmission, speziell im D-Serin/NMDA-Rezeptor-Pathway, eingreifen, auf Assoziation mit schizophrenen Psychosen untersucht. Aufgrund vorangegangener Assoziationsbefunde anderer Arbeitsgruppen erschienen sie als vielversprechende Kandidatengene.

Untersucht wurden in unserer Arbeit 19 STR-Marker und 29 SNPs im Bereich von insgesamt sieben Genen an einem Fall-Kontroll-Kollektiv von 360 schizophrenen Patienten und 325 psychisch Gesunden. In den untersuchten Kandidatengenen, die für Untereinheiten des NMDA-Rezeptors kodieren (*GRIN1*, *GRIN2A*, *GRIN2B*), konnten zwischen einzelnen Markern und dem Betroffenheitsstatus zum Teil signifikante Assoziationshinweise gefunden werden. Im Bereich der Gene, die für die unterschiedlichen Transporter-Proteine kodieren (*ASCT1*, *GlyT1* und *GlyT2*) und für die Bereitstellung unterschiedlicher Liganden bei der glutamatergen Neurotransmission von Bedeutung sind, gab es hingegen keine signifikanten Unterschiede der Allel- und Genotyp-Häufigkeiten zwischen dem untersuchten Patienten- und dem Kontrollkollektiv.

Speziell die positiven Assoziationsbefunde im 5'UTR-Bereich von *GRIN1*, die wir und unabhängige Untersucherguppen finden konnten, legen nahe, dass eine regulatorische Dispositionsvariante an diesem Gen-Lokus für den Entstehungsprozess schizophrener Psychosen von Bedeutung sein könnte. Die Bereitstellung immer neuerer Daten wie z. B. durch das internationale HapMapProjekt sowie die konstante Weiterentwicklung der Analysetechnologie bieten beste Voraussetzungen, diesen positiven Assoziationshinweisen in Zukunft nachzugehen.

## 9 Literaturverzeichnis

- Abecasis GR, Noguchi E, Heinzmann A, Traherne JA, Bhattacharyya S, Leaves NI, Anderson GG, Zhang Y, Lench NJ, Carey A, Cardon LR, Moffat MF, Cookson WO. *Extent and distribution of linkage equilibrium in three genomic regions*. Am J Hum Genet. 2001; 68:191-197.
- 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 JL. *Polymorphisms in the 13q33.2 gene G72/G30 are associated with childhood-onset schizophrenia and psychosis not otherwise specified*. Biol Psychiatry. 2004; 55:976-980.
- Ali DW, Salter MW. *NMDA receptor regulation by Src kinase signalling in excitatory synaptic transmission and plasticity*. Curr Opin Neurobiol. 2001; 11:336-342.
- American Psychiatric Association. *Diagnostic and statistical manual of mental disorders. Fourth Edition (DSM-IV)*. Washington D.C.: American Psychiatric Press, 1994.
- Anson LC, Chen PE, Wyllie DJ, Colquhoun D, Schoepfer R. *Identification of amino acid residues of the NR2A subunit that control glutamate potency in recombinant NR1/NR2A NMDA receptors*. J Neurosci. 1998; 18:581-589.
- 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.
- Arriza JL, Kavanaugh MP, Fairman WA, Wu YN, Murdoch GH, North RA, Amara SG. *Cloning and expression of a human neutral amino acid transporter with structural similarity to the glutamate transporter gene family*. J Biol Chem. 1993; 268:15329-15332.
- Badner JA, Gershon, ES. *Meta-analysis of whole-genome linkage scans of bipolar disorder and schizophrenia*. Mol Psychiatry. 2002; 7:405-411.
- Becker T, Cichon S, Jönsson E, Knapp M. *Multiple testing in the context of haplotype analysis revisited: application to case-control data*. Ann Hum Genet. 2005; 69:747-756.
- Becker T, Knapp M. *A powerful strategy to account for multiple testing in the context of haplotype analysis*. Am J Hum Genet. 2004; 75:561-570.

- 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.
- Bleuler E. *Dementia Praecox or the Group of Schizophrenias*. Leipzig: Deuticke, 1911. Republished: Trans. Joseph Zinkin. New York: International Universities Press, 1950.
- 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; 851-863.
- Caldwell CB, Gottesman II. *Schizophrenia--a high-risk factor for suicide: clues to risk reduction*. Suicide Life Threat Behav. 1992; 22:479-493.
- Cannon TD, Kaprio J, Lonnqvist J, Huttunen M, Koskenvuo M. *The genetic epidemiology of schizophrenia in a Finnish twin cohort. A population-based modeling study*. Arch Gen Psychiatry. 1998; 55:67-74
- Chen N, Luo T, Raymond LA. *Subtype-dependence of NMDA receptor channel open probability*. J Neurosci. 1999; 19:6844-6854.
- Chiu HJ, Wang YC, Liou YJ, Lai IC, Chen JY. *Association analysis of the genetic variants of the N-methyl D-aspartate receptor subunit 2b (NR2b) and treatment-refractory schizophrenia in the Chinese*. Neuropsychobiology. 2003; 47:178-181.
- Chumakov I, Blumenfeld M, Guerassimenko O, Cavarec L, Palicio M, Abderrahim H, Bouguelere L, Barry C, Tanaka H, La Rosa P, Puech A, Tahri N, Cohen-Akenine A, Delabrosse S, Lissarrague S, Picard FP, Maurice K, Essieux L, Millasseau P, Grel P, Debailleul V, Simon AM, Caterina D, Dufaure I, Malekzadeh K, Belova M, Luan JJ, Bouillot M, Sambucy JL, 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, Ouellette G, Fortier I, Raelson J, Sherbatich T, Riazanskaia N, Rogaev E, Raeymaekers P, Aerssens J, Konings F, Luyten W, Macciardi F, Sham PC, 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*. Proc Natl Acad Sci U S A. 2002; 99:13675-13680.

- Collingridge GL, Singer W. *Excitatory amino acid receptors and synaptic plasticity*. Trends Pharmacol Sci. 1990; 11:290-296.
- Das S, Sasaki YF, Rothe T, Premkumar LS, Takasu M, Crandall JE, Dikkes P, Conner DA, Rayudu PV, Cheung W, Chen HS, Lipton SA, Nakanishi N. *Increased NMDA current and spine density in mice lacking the NMDA receptor subunit NR3A*. Nature. 1998; 393:377-381.
- Davuluri RV, Grosse I, Zhang MQ. *Computational identification of promoters and first exons in the human genome*. Nat Genet. 2001;29:412-417. Erratum in: Nat Genet 2002; 32:459.
- Lin D, He L. *Association study between the NMDA receptor 2B subunit gene (GRIN2B) and schizophrenia: A HuGe review and meta-analysis*. Genet Med. 2007; 9:4-8.
- Devlin B, Risch N. *A comparison of linkage disequilibrium measures for fine-scale mapping*. Genomics. 1995; 29:311-322.
- Di Maria E, Gulli R, Begni S, De Luca A, Bignotti S, Pasini A, Bellone E, Pizzuti A, Dallapiccola B, Novelli G, Ajmar F, Gennarelli M, Mandich P. *Variations in the NMDA receptor subunit 2B gene (GRIN2B) and schizophrenia: a case-control study*. Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet. 2004; 128:27-29
- Dingledine R, Borges K, Bowie D, Traynelis SF. *The glutamate receptor ion channels*. Pharmacol Rev. 1999; 51:7-61.
- Durand GM, Gregor P, Zheng X, Bennett MV, Uhl GR, Zukin RS. *Cloning of an apparent splice variant of the rat N-methyl-D-aspartate receptor NMDAR1 with altered sensitivity to polyamines and activators of protein kinase C*. Proc Natl Acad Sci U S A. 1992; 89:9359-9363.
- Eriksson M, Nilsson A, Froelich-Fabre S, Akesson E, Dunker J, Seiger A, Folkesson R, Benedikz E, Sundstrom E. *Cloning and expression of the human N-methyl-D-aspartate receptor subunit NR3A*. Neurosci Lett. 2002; 322:177-181.
- Evins AE, Amico E, Posever TA, Toker R, Goff DC. *D-Cycloserine added to risperidone in patients with primary negative symptoms of schizophrenia*. Schizophr Res. 2002; 56:19-23.
- Freudenberg J, Cichon S, Nöthen MM, Propping P. *Blockstruktur des menschlichen Genoms. Ein Organisationsprinzip der genetischen Variabilität*. Dtsch Ärztebl. 2002; 99:A 3190-3195.
- Gottesman II. *Schizophrenia Genesis*. New York: W. H. Freeman and Company, 1991.
- Häfner H. *Epidemiology of schizophrenia*. The disease model of schizophrenia in the light of current epidemiological knowledge. Eur Psychiatry 1995; 10: 217-227

- Hakak Y, Walker JR, Li C, Wong WH, Davis KL, Buxbaum JD, Haroutunian V, Fienberg AA. *Genome-wide expression analysis reveals dysregulation of myelination-related genes in chronic schizophrenia*. Proc Natl Acad Sci U S A. 2001; 98:4746-4751.
- Hashimoto K, Fukushima T, Shimizu E, Komatsu N, Watanabe H, Shinoda N, Nakazato M, Kumakiri C, Okada S, Hasegawa H, Imai K, Iyo M. *Decreased serum levels of D-serine in patients with schizophrenia: evidence in support of the N-methyl-D-aspartate receptor hypofunction hypothesis of schizophrenia*. Arch Gen Psychiatry. 2003; 60:572-576.
- Haslam J. *Observations on Madness and Melancholy*. New York: Arno Press, 1809/1976.
- Heresco-Levy U, Javitt DC, Ebstein R, Vass A, Lichtenberg P, Bar G, Catinari S, Ermilov M. *D-serine efficacy as add-on pharmacotherapy to risperidone and olanzapine for treatment-refractory schizophrenia*. Biol Psychiatry. 2005; 57:577-585.
- Hirai H, Kirsch J, Laube B, Betz H, Kuhse J. *The glycine binding site of the N-methyl-D-aspartate receptor subunit NR1: identification of novel determinants of co-agonist potentiation in the extracellular M3-M4 loop region*. Proc Natl Acad Sci U S A. 1996; 93:6031-6036.
- Hofmann K, Düker M, Fink T, 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.
- Hollmann M, Boulter J, Maron C, Beasley L, Sullivan J, Pecht G, Heinemann S. *Zinc potentiates agonist-induced currents at certain splice variants of the NMDA receptor*. Neuron. 1993; 10:943-954.
- Hollmann M, Heinemann S. *Cloned glutamate receptors*. Annu Rev Neurosci. 1994; 17:31-108.
- Huber G. *Psychiatrie*. Stuttgart, New York: Schattauer, 1999.
- Hung CC, Chen HY, Chen CH. *Systematic mutation analysis of the human glutamate receptor, ionotropic, N-methyl-D-aspartate 1 gene (GRIN1) in schizophrenic patients*. Psychiatr Genet. 2002; 12:225-230.
- Ingraham LJ, Kety SS. *Adoption Studies of Schizophrenia*. Am J Med Genet. 2000; Seminars in Medical Genetics, 97:18-22.
- Ishii T, Moriyoshi K, Sugihara H, Sakurada K, Kadotani H, Yokoi M, Akazawa C, Shigemoto R, Mizuno N, Masu M, et al. *Molecular characterization of the family of the N-methyl-D-aspartate receptor subunits*. J Biol Chem. 1993; 268:2836-2843.

- Itokawa M, Yamada K, Yoshitsugu K, Toyota T, Suga T, Ohba H, Watanabe A, Hattori E, Shimizu H, Kumakura T, Ebihara M, Meerabux JM, Toru M, Yoshikawa T. *A microsatellite repeat in the promoter of the N-methyl-D-aspartate receptor 2A subunit (GRIN2A) gene suppresses transcriptional activity and correlates with chronic outcome in schizophrenia.* Pharmacogenetics. 2003; 13:271-278.
- Iwayama-Shigeno Y, Yamada K, Itokawa M, Toyota T, Meerabux JM, Minabe Y, Mori N, Inada T, Yoshikawa T. *Extended analyses support the association of a functional (GT)<sub>n</sub> polymorphism in the GRIN2A promoter with Japanese schizophrenia.* Neurosci Lett. 2005; 378:102-105.
- Kaufmann CA, Suarez B, Malaspina D, Pepple J, Svrakic D, Markel PD, Meyer J, Zambuto CT, Schmitt K, Matise TC, Harkavy Friedman JM, Hampe C, Lee H, Shore D, Wynne D, Faraone SV, Tsuang MT, Cloninger CR. *NIMH Genetics Initiative Millenium Schizophrenia Consortium: linkage analysis of African-American pedigrees.* Am J Med Genet. 1998; 81:282-289.
- Khoury M, Beaty T, Cohen B. *Fundamentals of genetic epidemiology.* New York, Oxford: Oxford University Press, 1993.
- 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.
- Kraepelin E. *Dementia Praecox and Paraphrenia.* Huntington, New York: Robert E. Krieger Publishing Co., 1913/1919/1971 (trans. Barclay RM, 1919).
- Kumashiro S, Hashimoto A, Nishikawa T. *Free D-serine in post-mortem brains and spinal cords of individuals with and without neuropsychiatric diseases.* Brain Res. 1995; 681:117-125.
- Kuryatov A, Laube B, Betz H, Kuhse J. *Mutational analysis of the glycine-binding site of the NMDA receptor: structural similarity with bacterial amino acid-binding proteins.* Neuron. 1994; 12:1291-1300.
- Kutsuwada T, Kashiwabuchi N, Mori H, Sakimura K, Kushiya E, Araki K, Meguro H, Masaki H, Kumanishi T, Arakawa M, et al. *Molecular diversity of the NMDA receptor channel.* Nature. 1992; 358:36-41.

- Laruelle M, Kegeles LS, Abi-Dargham A. *Glutamate, dopamine, and schizophrenia: from pathophysiology to treatment*. Ann N Y Acad Sci. 2003; 1003:138-158.
- Laube B, Hirai H, Sturgess M, Betz H, Kuhse J. *Molecular determinants of agonist discrimination by NMDA receptor subunits: analysis of the glutamate binding site on the NR2B subunit*. Neuron. 1997; 18:493-503
- Laube B, Kuhse J, Betz H. *Evidence for a tetrameric structure of recombinant NMDA receptors*. J Neurosci. 1998; 18:2954-2961.
- Laurie DJ, Bartke I, Schoepfer R, Naujoks K, Seeburg PH. *Regional, developmental and interspecies expression of the four NMDAR2 subunits, examined using monoclonal antibodies*. Brain Res Mol Brain Res. 1997; 51:23-32.
- Levinson DF, Mowry BJ. *Genetics of schizophrenia*. In: Pfaff DW, Berretini WH, Maxson SC, Joh TH, Hrsg. *Genetic influences on neural and behavioral functions*. New York: CRC Press, 2000; 47–82.
- Lewontin RC. *The Interaction of Selection and Linkage. I. General Considerations; Heterotic Models*. Genetics. 1964; 49:49-67.
- Liu H, Wang H, Sheng M, Jan LY, Jan YN, Basbaum AI. *Evidence for presynaptic N-methyl-D-aspartate autoreceptors in the spinal cord dorsal horn*. Proc Natl Acad Sci U S A. 1994; 91:8383-8387.
- 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 YB, Disterhoft JF, Slater NT. *Activation of metabotropic glutamate receptors induces long-term depression of GABAergic inhibition in hippocampus*. J Neurophysiol. 1993; 69:1000-1004.
- Loftis JM, Janowsky A. *The N-methyl-D-aspartate receptor subunit NR2B: localization, functional properties, regulation, and clinical implications*. Pharmacol Ther. 2003; 97:55-85.
- Martucci L, Wong AH, Trakalo J, Cate-Carter T, Wong GW, Macciardi FM, Kennedy JL. *N-methyl-D-aspartate receptor NR1 subunit gene (GRIN1) in schizophrenia: TDT and case-control analyses*. Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet. 2003; 119:24-27.
- McBain CJ, Mayer ML. *N-methyl-D-aspartic acid receptor structure and function*. Physiol Rev. 1994; 74:723-760.

- Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. *A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells*. Nucleic Acids Res. 1988; 16:1215.
- Miyamoto Y, Nabeshima T. *Analysis of neuronal functions in mice lacking the NMDA receptor epsilon 1 subunit*. Nippon Yakurigaku Zasshi. 2002; 119:327-335.
- Mohn AR, Gainetdinov RR, Caron MG, Koller BH. *Mice with reduced NMDA receptor expression display behaviors related to schizophrenia*. Cell. 1999; 98:427-436.
- Monyer H, Burnashev N, Laurie DJ, Sakmann B, Seeburg PH. *Developmental and regional expression in the rat brain and functional properties of four NMDA receptors*. Neuron. 1994; 12:529-540.
- Monyer H, Sprengel R, Schoepfer R, Herb A, Higuchi M, Lomeli H, Burnashev N, Sakmann B, Seeburg PH. *Heteromeric NMDA receptors: molecular and functional distinction of subtypes*. Science. 1992; 256:1217-1221.
- Moro-Furlani AM, Turner VS, Hopkinson DA. *Genetical and biochemical studies on human phosphoserine phosphatase*. Ann Hum Genet. 1980; 43:323-333.
- 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.
- Mullis KB, Faloona FA. *Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction*. Methods Enzymol. 1987; 155:335-350.
- Nishi M, Hinds H, Lu HP, Kawata M, Hayashi Y. *Motoneuron-specific expression of NR3B, a novel NMDA-type glutamate receptor subunit that works in a dominant-negative manner*. J Neurosci. 2001;21:RC185.
- 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.
- O'Donovan MC, Williams NM, Owen MJ. *Recent advances in the genetics of schizophrenia*. Hum Mol Genet. 2003; 12 Spec No 2:R125-133.
- Ohtsuki T, Sakurai K, Dou H, Toru M, Yamakawa-Kobayashi K, Arinami T. *Mutation analysis of the NMDAR2B (GRIN2B) gene in schizophrenia*. Mol Psychiatry. 2001; 6:211-216.

- Olney JW, Newcomer JW, Farber NB. *NMDA receptor hypofunction model of schizophrenia*. J Psychiatr Res. 1999; 33:523-533.
- Owen MJ, O'Donovan MC, Gottesman II. *Schizophrenia*. In: McGuffin P, Owen MJ, Gottesman II, Hrsg. *Psychiatric Genetics and Genomics*. Oxford: Oxford University Press, 2002; 247-266.
- Owen MJ, O'Donovan MC, Harrison PJ. *Schizophrenia: a genetic disorder of the synapse?* BMJ. 2005; 330:158-159.
- Pinel P. *A Treatise of Insanity*. New York: Hafner, 1809/1962.
- Propping P. *Psychiatrische Genetik*. Berlin, Heidelberg: Springer, 1989.
- Qin S, Zhao X, Pan Y, Liu J, Feng G, Fu J, Bao J, Zhang Z, He L. *An association study of the N-methyl-D-aspartate receptor NR1 subunit gene (GRIN1) and NR2B subunit gene (GRIN2B) in schizophrenia with universal DNA microarray*. Eur J Hum Genet. 2005; 13:807-814.
- 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.
- Riley BP, McGuffin P. *Linkage and associated studies of schizophrenia*. Am J Med Genet. 2000; 97:23-44.
- Riley BP, Tahir E, Rajagopalan S, Mogudi-Carter M, Fauré S, Weissenbach J, Jenkins T, Williamson R. *A linkage study of the N-methyl-D-aspartate receptor subunit gene loci and schizophrenia in southern African Bantu-speaking families*. Psychiatr Genet. 1997; 7:57-74.
- Rosenmund C, Stern-Bach Y, Stevens CF. *The tetrameric structure of a glutamate receptor channel*. Science. 1998; 280:1596-1599.
- Sartorius N, Jablensky A, Korten A, Ernberg G, Anker M, Cooper JE, Day R. *Early manifestations and first-contact incidence of schizophrenia in different cultures. A preliminary report on the initial evaluation phase of the WHO Collaborative Study on determinants of outcome of severe mental disorders*. Psychol Med. 1986; 16:909-928.
- Schell MJ, Molliver ME, Snyder SH. *D-serine, an endogenous synaptic modulator: localization to astrocytes and glutamate-stimulated release*. Proc Natl Acad Sci U S A. 1995; 92:3948-3952.
- Schneider K. *Psychischer Befund und psychiatrische Diagnose*. Leipzig: Thieme, 1939.

- Schorge S, Colquhoun D. *Studies of NMDA receptor function and stoichiometry with truncated and tandem subunits*. J Neurosci. 2003; 23:1151-1158.
- Schumacher J, Jamra RA, Freudenberg J, Becker T, Ohlraun S, Otte AC, Tullius M, Kovalenko S, Bogaert AV, Maier W, Rietschel M, Propping P, Nothen 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.
- Schwab SG, Knapp M, Mondabon S, Hallmayer J, Borrmann-Hassenbach M, Albus M, Lerer B, Rietschel M, Trixler M, Maier W, Wildenauer DB. *Support for association of schizophrenia with genetic variation in the 6p22.3 gene, dysbindin, in sib-pair families with linkage and in an additional sample of triad families*. Am J Hum Genet. 2003; 72:185-190.
- Sklar P. *Linkage analysis in psychiatric disorders: the emerging picture*. Annu Rev Genomics Hum Genet. 2002; 3:371-413.
- Stefansson H, Sarginson J, Kong A, Yates P, Steinthorsdottir V, Gudfinnsson E, Gunnarsdottir S, Walker N, Petursson H, Crombie C, Ingason A, Gulcher JR, Stefansson K, St Clair D. *Association of neuregulin 1 with schizophrenia confirmed in a Scottish population*. Am J Hum Genet. 2003; 72:83-87.
- Stefansson H, Sigurdsson E, Steinthorsdottir V, Bjornsdottir S, Sigmundsson T, Ghosh S, Brynjolfsson J, Gunnarsdottir S, Ivarsson O, Chou TT, Hjaltason O, Birgisdottir B, Jonsson H, Gudnadottir VG, Gudmundsdottir E, Bjornsson A, Ingvarsson B, Ingason A, Sigfusson S, Hardardottir H, Harvey RP, Lai D, Zhou M, Brunner D, Mutel V, Gonzalo A, Lemke G, Sainz J, Johannesson G, Andresson T, Gudbjartsson D, Manolescu A, Frigge ML, Gurney ME, Kong A, Gulcher JR, Petursson H, Stefansson K. *Neuregulin 1 and susceptibility to schizophrenia*. Am J Hum Genet. 2002; 71:877-892.
- Straub RE, Jiang Y, MacLean CJ, Ma Y, Webb BT, Myakishev MV, Harris-Kerr C, Wormley B, Sadek H, Kadambi B, Cesare AJ, Gibberman A, Wang X, O'Neill FA, Walsh D, Kendler KS. *Genetic variation in the 6p22.3 gene DTNBP1, the human ortholog of the mouse dysbindin gene, is associated with schizophrenia*. Am J Hum Genet. 2002; 71:337-348.
- Tang J, Chen X, Xu X, Wu R, Zhao J, Hu Z, Xia K. *Significant linkage and association between a functional (GT)<sub>n</sub> polymorphism in promoter of the N-methyl-D-aspartate receptor subunit gene (GRIN2A) and schizophrenia*. Neurosci Lett. 2006; 409:80-82.

- Tani A, Kikuta R, Itoh K, Joo A, Shibata H, Ninomiya H, Tashiro N, Fukumaki Y. *Polymorphism analysis of the upstream region of the human N-methyl-D-aspartate receptor subunit NR1 gene (GRIN1): implications for schizophrenia*. Schizophr Res. 2002; 58:83-86.
- Tsai G, Yang P, Chung LC, Lange N, Coyle JT. *D-serine added to antipsychotics for the treatment of schizophrenia*. Biol Psychiatry. 1998; 44:1081-1089.
- Van Den Bogaert A, Schumacher J, Schulze TG, Otte AC, Ohlraun S, Kovalenko S, Becker T, Freudenberg J, Jonsson EG, Mattila-Evenden M, Sedvall GC, Czerski PM, Kapelski P, Hauser J, Maier W, Rietschel M, Propping P, Nöthen MM, Cichon S. *The DTNBP1 (dysbindin) gene contributes to schizophrenia, depending on family history of the disease*. Am J Hum Genet. 2003; 73:1438-1443.
- 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.
- Williams NM, Preece A, Morris DW, Spurlock G, Bray NJ, Stephens M, Norton N, Williams H, Clement M, Dwyer S, Curran C, Wilkinson J, Moskvina V, Waddington JL, Gill M, Corvin AP, Zammit S, Kirov G, Owen MJ, O'Donovan MC. *Identification in 2 independent samples of a novel schizophrenia risk haplotype of the dystrobrevin binding protein gene (DTNBP1)*. Arch Gen Psychiatry. 2004; 61:336–344.
- Williams NM, Preece A, Spurlock G, Norton N, Williams HJ, Zammit S, O'Donovan MC, Owen MJ. *Support for genetic variation in neuregulin 1 and susceptibility to schizophrenia*. Mol Psychiatry. 2003; 8:485-487.
- Williams NM, Spurlock G, Norton N, Williams HJ, Hamshere ML, Krawczak M, Kirov G, Nikolov I, Georgieva L, Jones S, Cardno AG, O'Donovan MC, Owen MJ. *Mutation screening and LD mapping in the VCFS deleted region of chromosome 22q11 in schizophrenia using a novel DNA pooling approach*. Mol Psychiatry. 2002; 7:1092-1100.
- World Health Organisation. *International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems, Tenth Revision (ICD-10)*. Geneva, World Health Organisation, 1992.
- World Health Organisation. *The ICD-10 Classification of Mental and Behavioural Disorders: Clinical Descriptions and Diagnostic Guidelines*. Geneva, World Health Organisation, 1992.
- Zhao X, Li H, Shi Y, Tang R, Chen W, Liu J, Feng G, Shi J, Yan L, Liu H, He L. *Significant association between the genetic variations in the 5' end of the N-methyl-D-aspartate receptor subunit gene GRIN1 and schizophrenia*. Biol Psychiatry. 2006; 59:747-753.

- 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.

### **Veröffentlichungen von im Rahmen dieser Arbeit erhobenen Daten:**

- Georgi A, Jamra RA, Klein K, Vilella AW, 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.
- Jamra RA, Klein K, Vilella AW, Becker T, Schulze TG, Schmael C, Deschner M, Klopp N, Illig T, Propping P, Cichon S, Rietschel M, Nothen 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.
- Jamra RA, Vilella AW, Klein K, Becker T, Schulze TG, Schmael C, Deschner M, Klopp N, Illig T, Propping P, Cichon S, Rietschel M, Nothen MM, Schumacher J. *No association between genetic variants at the GLYT2 gene and bipolar affective disorder and schizophrenia*. *Psychiatr Genet*. 2006; 16:91.