

**Aus der Klinik und Poliklinik für Psychiatrie, Psychosomatik und Psychotherapie
der Universität Würzburg**

Direktor: Professor Dr. med. J. Deckert

**Haplotyp-Analyse des Genes DYNLL1 bezogen auf Schizophrenie und die bipolare
Störung**

Inaugural - Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der

Medizinischen Fakultät

der

Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Hannah Grußendorf

aus Heidelberg

Würzburg, Mai 2009

Referent: Prof. Dr. med. K. P. Lesch

Korreferent: Prof. Dr. med. U. Walter

Dekan: Prof. Dr. med. M. Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 15.12.09

Die Promovendin ist Ärztin.

Meinen Eltern und Kristen gewidmet

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Einführung Schizophrenie (SCZ)	1
1.1.1	Geschichte der SCZ.....	1
1.1.2	Die Geschichte der Klassifikationsprinzipien	4
1.2	Ätiologie endogener Psychosen.....	5
1.2.1	Strukturelle, histomorphologische Veränderungen und Entwicklungsstörungen des Gehirns	6
1.2.2	Neurodegeneration versus Entwicklungsstörungen.....	6
1.2.3	Die Dopamin (Serotonin) Hypothese	7
1.2.4	Die Glutamathypothese	8
1.2.5	Genetische Befunde	9
1.3	Einführung: Bipolare Störungen (bipolare Erkrankung, BPD).....	12
1.3.1	Geschichtliche Daten und Definition	12
1.3.2	Gemeinsamkeiten der SCZ und der bipolaren Störung	14
1.3.2.1	Epidemiologie und Klinik.....	14
1.3.2.2	Genetische Überlappungsbereiche	14
1.4	PIN/ DLC1/LC8/DYNLL1.....	15
1.4.1	Struktur und verschiedene Funktionen des Proteins PIN/ DLC1/LC8/DYNLL1.....	15
1.4.2	DYNLL1 und seine Assoziation mit SCZ und BPD	18
1.4.2.1	DYNLL1 als Kandidatengen für SCZ und BPD.....	19
1.4.2.2	DYNLL1 und sein Zusammenhang mit NOS	20
1.4.2.3	DYNLL1 und seine Interaktion mit dem GKAP-PSD 95 Protein-Komplex	22
1.4.2.4	DYNLL1 und seine Interaktion mit einem Gerüst-Protein namens Gephyrin	23
1.4.2.5	Interaktion von DYNLL1 mit dem LIS1-Protein.....	23
1.4.2.6	DYNLL1 als Bestandteil des DISC1 regulierten Mikrotubuli basierten Motorkomplex	24

2	Fragestellung und Zielsetzung dieser Arbeit.....	24
3	Material und Methoden.....	25
3.1	Materialien.....	25
3.1.1	Probanden	25
3.1.2	Genotypisierung.....	26
3.1.3	Allel-spezifische Primerextension und MALDI-ToF MS	29
3.2	Methoden	30
3.2.1	DNA-Extraktion	30
3.2.2	Polymerasekettenreaktion	31
3.2.2.1	Komponenten der PCR-Ansätze und PCR-Bedingungen der verschiedenen Primer.....	31
3.2.2.2	Amplifizierung	32
3.2.3	Gelelektrophorese.....	33
3.2.4	Anfertigen von Agarose-Gelen, Auftrennung der DNA und Auswertung	33
3.2.5	Verdau mit Alkalischer Phosphatase für die iPlex Reaktion	34
3.2.6	iPLEX Reaktion (Single Base Extension Reaktion)	34
3.2.7	Reinigung durch das Ionenaustauschharz.....	35
3.2.8	MALDI-ToF Massenspektrometer.....	35
3.2.9	Statistische Analyse und Haplotypanalyse	36
4	Ergebnisse	36
4.1	Assoziation von DYNLL1 mit schizophrenen Psychosen.....	37
4.1.1	Einzelmarker-Assoziationstest.....	37
4.1.2	Haplotypen.....	38
4.2	Assoziation von DYNLL1 mit der bipolaren Störung.....	41
4.2.1	Einzelmarker-Assoziationstest.....	41
4.2.2	Haplotypen.....	45
5	Diskussion	47
5.1	Ziel der Arbeit.....	47
5.2	Ergebnisse der Arbeit.....	48
5.2.1	DYNLL1 und SCZ	48
5.2.1.1	Einzelmarkerassoziationen.....	48

5.2.1.2	Haplotypassoziation.....	48
5.2.2	DYNLL1 und BPD	49
5.2.2.1	Einzelmarkerassoziationen.....	49
5.2.2.2	Haplotypassoziation.....	49
5.3	Ein Hotspot für SCZ und BPD: Locus 12q22-24	50
5.4	Integration von DYNLL1 in bestehende pathophysiologische Konzepte endogener Psychosen und bipolarer Störungen.....	52
5.4.1	Interaktion von DYNLL1 mit NOS-I und deren reduzierte Aktivität in verschiedenen Gehirnregionen	52
5.4.1.1	NO als second messenger und Modulator monoaminergener Funktion und seine Funktion im striatalen System	54
5.4.1.2	Rolle von NO in der Entwicklung und Reifung des Gehirnes	55
5.4.2	Interaktion von DYNLL1 mit NMDA- Rezeptoren.....	55
5.4.3	DYNLL1 und seine Interaktion mit Gephyrin.....	57
5.4.4	DYNLL1 und seine Rolle im Signalweg des LIS1-Proteins.....	57
5.4.5	Interaktion von NUDEL, und damit DYNLL1 und DISC1	58
5.4.6	Assoziation von Kinesin KIF 2 mit SCZ	59
5.4.7	Interaktion von DYNLL1 mit KIBRA	60
5.5	Zusammenfassung.....	60
6	Literatur	63

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: DYNLL1-Dimer Komplex (Liang et al., 1999).....	17
Abbildung 2: LOD-Scores von Markern am Locus 12q24 (Reif et al., 2006)	20
Abbildung 3: Interaktionspartner von NOS-I (Nedvetsky et al., 2002).....	21
Abbildung 4: Interaktionen von DYNLL1 (PIN) am Glutamatrezeptor, modifiziert nach Moghaddam (Moghaddam, 2003).	23
Abbildung 5: Aufbau eines ToF Massenanalysators (Althoff, 2005)	35
Abbildung 6: Haplotyp-Struktur des DYNLL1-Locus	39

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Enzyme und Nukleotide.....	26
Tabelle 2: Chemikalien.....	27
Tabelle 3: Geräte.....	28
Tabelle 4: Puffer aus eigener Herstellung	28
Tabelle 5: Oligonukleotide: Primersequenzen der SNPs	29
Tabelle 6: Chemikalien und Sonstiges	30
Tabelle 7: Geräte.....	30
Tabelle 8: PCR-Ansatz und Bedingungen.....	32
Tabelle 9: Genotypfrequenzen SCZ: DYNLL1 und Männer (abs. n und %).....	38
Tabelle 10: Genotypfrequenzen SCZ: DYNLL1 und Frauen (abs. n und %).....	38
Tabelle 11: Haplotypen SCZ: Männer und Frauen.....	40
Tabelle 12: Haplotypen SCZ: Männer	40
Tabelle 13: Haplotypen SCZ: Frauen	40
Tabelle 14: Permutationstest, kontrolliert für die Anzahl der Haplotypen.....	40
Tabelle 15: Permutationstest incl. Einzelmarkern, kontrolliert für die Anzahl der Haplotypen	41
Tabelle 16: Genotypfrequenzen BPD: DYNLL, Männer und Frauen (abs. n und %).....	42
Tabelle 17: Genotypfrequenzen BPD: DYNLL1 und Männer (abs. n und %)....	44
Tabelle 18: Genotypfrequenzen BPD: DYNLL1 und Frauen (abs. n und %)	45
Tabelle 19: Haplotypen BPD: Männer und Frauen.....	45

Tabelle 20: Permutationstest (Männer und Frauen) kontrolliert für Einzelmarker und Haplotypen	46
Tabelle 21: Haplotypen BPD: Frauen.....	46
Tabelle 22: Permutationstest (Frauen) kontrolliert für die Anzahl der Einzelmarker und Haplotypen	46

Abkürzungsverzeichnis

AMDP	Arbeitsgemeinschaft für Methodik und Dokumentation in der Psychiatrie (2000)
AMPA	Alpha-Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazol-Propionat
BIM	Blc-2-modifying
BPD	Bipolar Disorder (Bipolare Störung)
C. elegans	Caenorhabditis elegans
Ca ²⁺	Calcium
CAPON	Carboxy-terminal PDZ ligand of NO synthase
CDHC	Cytolasmatic dynein heavy chain
COMT	Catecholamin-o-Methyltransferase
D ₂	Dopamin-2-Rezeptor
Da	Dalton
DAAO	D-amino-acid-oxidase
DAC	Diammoniumhydrogencitrat
DAT	Dopamintransporter
DdNTP/ DNTP	Dideoxynucleotide
DLC 1	Dynein light chain 1
DLPC	Dorsolateral
DNA	Deoxyribonucleic acid
DNYLL1	Dynein light chain, LC8 type 1 (DNCL1, DLC1, PIN)
DISC	Disrupted in schizophrenia
DSM	Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders
DTNBP	Dysbindin
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
GABA	Gamma-amino-buttersäure
GI	Gyrifizierungsindex
GAD	L-glutamic acid decarboxylase
GKAP	Guanylatkinase-domain-associated protein
Glu	Glutamat
GlyT	Glycine transporter
GRIN	Glutamatrezeptorgen
Gq	G-Protein
HC	Heavy chain
HPA	Hydroxypicolinic acid
Hsp90	Heat shock protein 90
5HTT	5 Hydroxytryptamine transporter
IC	Intermediate chain
ICD	International statistical classification of diseases and related health problems
kD	Kilodalton
kb	kilobase
KIBRA	Kidneybrain Protein
KIF	Kinesin
LD	Linkage Disequilibrium
LIC	Light intermediate chain

LIS	Lissencephalie
LOD	Logarithm of odds
M	Mitose
MALDI-TOF	Matrix-assisted Laser Desorption Ionisation Time of flight
mGlu	Metabotroper Glutamatrezeptor
MRT	Magnetresonanz Tomographie
MS	Massenspektrometer
NADPH	Nicotinamide adenide dinucleotide phosphat (Reduced form)
NET	Noradrenalintransporter
NMDAR	N-Methyl-D-Aspartat-Rezeptor
NOS	NO-Synthase
NUDEL-(L)	Nucleardistribution-element (like)
Nuk	Nukleotide
OD	Optische Dichte
Ox	Oxide
PANSS	The positive and negativ syndrom scale for schizophrenia
PCR	Polymerase chain reaction
PDZ	Post synaptic density, disc large and zo1 protein domain
PE	Primer Extension
PET	Positronen-Emissionstomographie
PFK-M	Phosphofruktokinase
PIN	Protein inhibitor of the nitric oxide synthase
PRODH	Prolindehydrogenase 2
PSD	Post synaptic density
RGS ₄	Regulator of G-protein 4
RNA	Ribonucleic acid
SAP	Shrimp alkalic phosphatase
SCZ	Schizophrenie
SDS	Sodium-dodecylsulfat
SPECT	Single photon emission computed tomography
STR	Short tandem repeat
ToF	Time of flight
UV	Ultraviolett
VNTR	Variation number of tandem repeats
WHO	World health organisation

1 Einleitung

1.1 Einführung Schizophrenie (SCZ)

1.1.1 Geschichte der SCZ

Schriftliche Zeugnisse belegen, dass Geisteskrankheiten schon seit über 2000 Jahren das Interesse von Wissenschaftlern auf sich zogen. Schon Hippokrates (460-377 v.Chr.) beschäftigte sich in seinem Werk „Über die heilige Krankheit“ mit der Frage nach dem Ursprung von Geisteskrankheiten. Doch erst im Jahr 1870 fasste Emil Kraepelin (1856-1939) verschiedene Geisteskrankheiten unter dem Begriff der „Dementia praecox“ zusammen und beschrieb damit das Krankheitsbild der SCZ. Er unterschied die „Dementia praecox“ mit chronischem Verlauf und schlechter Prognose, die sich in der zweiten bis dritten Lebensdekade manifestiert und progredient zu dementiellen Abbau führt, von dem „manisch-depressiven Irresein“ mit guter Prognose. Kognitive Störungen waren neben Wahn, Halluzinationen und psychomotorischen Auffälligkeiten für ihn ein kennzeichnendes Symptom.

Während für Kraepelin damit Verlauf und Ausgang der Erkrankung entscheidende Charakteristika waren, betonte Eugen Bleuler (1857-1939) die im Querschnitt erfassbare Symptomatik und führte 1911 erstmals den Begriff „Schizophrenie“, wörtlich übersetzt „Spaltungsirrsinn“, ein. Das zugrunde liegende Defizit sah er in einer Denkstörung, die er als „Spaltung psychischer Funktionen“ bezeichnete. Bleuler hatte nach langer Beobachtung festgestellt, dass bei allen von Kraepelin beschriebenen Dementia praecox-Formen bestimmte Symptome gehäuft auftraten. So unterschied er Grundsymptome in vier Bereichen, die als die vier „A“ bezeichnet werden: Assoziation (Störung des Gedankenganges); Affekt (Affektverflachung, Parathymie); Ambivalenz (im Fühlen, Handeln und Wollen); Autismus (Loslösung von der Wirklichkeit). Von diesen Grundsymptomen grenzte er akzessorische Symptome wie z.B. Wahn und Halluzinationen ab. Darüber hinaus erkannte er damals schon die Vielfältigkeit der Erkrankungen und sprach deshalb von der „Gruppe der Schizophrenien“. Er beobachtete außerdem, dass die Erkrankung nicht

zwangsläufig in einer „Demenz“ endete. So postulierte er, dass diesen Krankheiten ein grundlegend anderer Mechanismus als der vaskulär bedingten oder durch neuronalen Untergang verursachten Demenz des höheren Alters zugrunde liegen musste (Bleuler, 1911). Bis heute spielen beide Konzepte, das einer progredienten neurodegenerativen als auch das einer neurodevelopmentalen Genese schizophrener Erkrankungen eine bedeutende Rolle.

Um die verschiedenen Formen der SCZ besser untereinander oder auch von anderen psychiatrischen Erkrankungen abgrenzbar zu machen, unterteilte Kurt Schneider (1897-1967) die verschiedenen Symptome der SCZ in Symptome ersten und zweiten Ranges. Als Vertreter der phänomenologischen Richtung handelt es sich hierbei um ein rein beschreibendes Konzept ohne Berücksichtigung des Krankheitsverlaufes (Schneider, 1967). Die Schneiderschen Erst- und Zweitrangsymptome sind jedoch bis heute von großer diagnostischer Wertigkeit und finden sich in fast unveränderter Form in den aktuellen Diagnosemanualen ICD-10 und DSM-IV.

Nach ICD-10 werden heute verschiedene Subtypen der SCZ unterschieden. Zum einen ist der paranoide Subtyp zu differenzieren, dessen Kriterien wie Halluzinationen, Störungen des Icherlebens und Wahn bei 80% der Patienten im Verlauf der Erkrankung auftreten. Zum anderen der hebephrene Subtyp, bei dem Negativsymptome wie Antriebsmangel und affektive Verflachung sowie formale Denkstörungen im Vordergrund stehen. Dieser beginnt sehr früh, zwischen dem 15. und 25. Lebensjahr und hat eine eher schlechte Prognose. Darüber hinaus grenzt man den katatonen Subtyp ab, der gekennzeichnet ist von den im Vordergrund stehenden psychomotorischen Störungen, die zwischen Extremen wie Erregung und Stupor, sowie Befehlsautomatismus und Negativismus alternieren können. Manchmal kann man Symptome verschiedener Subtypen bei einem Patienten diagnostizieren, so dass eine Zuordnung zu einer der obigen Formen nicht möglich ist. Diese Form wird als undifferenzierte SCZ bezeichnet. Darüber hinaus können verschiedene Sonderformen abgegrenzt werden. Einerseits die Schizophrenia simplex, die sich durch das Fehlen oben beschriebener Symptome ersten Ranges

auszeichnet, andererseits die schizotype Störung mit exzentrischem Verhalten und Störungen der Affektivität und des Antriebs, jedoch ohne charakteristische schizophrene Symptome. Ein Drittel der Erkrankten hat einen chronischen Verlauf und entwickelt ein sogenanntes schizophreses Residuum, das durch uncharakteristische Negativsyndrome geprägt ist.

Eine weitere, heutzutage jedoch seltener verwendete Systematik ist die von Wernicke, Kleist und Leonhard. Hierbei handelt es sich um eine vor allem von Karl Leonhard (1904-1988) ausgearbeitete, umfassende Klassifizierung endogener Psychosen. Die Bedeutung dieser Klassifikation besteht vor allem darin, dass es sich um psychopathologisch exakt beschriebene Quer- und Längsschnittbeschreibungen handelt, mit denen der Verlauf und die Prognose vorausgesagt werden kann. Karl Leonhard grenzte Erkrankungen mit guter von solchen mit schlechter Langzeitprognose ab. Zu den Erkrankungen mit guter Langzeitprognose zählte er die monopolar phasische Psychosen, die manisch depressive Erkrankung und die bipolar angelegten, phasisch verlaufenden zyklischen Psychosen. Krankheiten mit schlechter Langzeitprognose waren für ihn die verschiedenen Formen der SCZ im engeren Sinne. Diese unterteilte er in unsystematische Schizophrenien auf der einen, und systematische Schizophrenien auf der anderen Seite. Die unsystematischen Schizophrenien nach Leonhard haben eine hohe Heredität, beginnen eher akut, verlaufen in Schüben, und führen zu dauerhaften Defekten wechselnden Ausmaßes. Auch bei dieser Gruppe unterschied er drei Unterformen: Die periodische Katatonie, die mit qualitativen Veränderungen der Psychomotorik einhergeht, und bei welcher der Patient unter akinetischen und hyperkinetischen Polen leidet; die Kataphrasie, deren Grundsymptome formale Denkstörungen mit gedanklichen und sprachlichen Verfehlungen, logischen Entgleisungen und Neologismen sind; zuletzt die affektvolle Paraphrenie, die sich durch gereizt-feindseeligen Affekt und dadurch getragene Wahninhalte und Halluzinationen auszeichnet. Die systematischen Schizophrenien hingegen zeichnen sich durch geringe Vererblichkeit, schlechte Prognose und schleichenden Beginn aus. Hier unterteilte Leonhard nochmals in drei Unterkategorien, nämlich die systematischen Katatonien, die Hebephrenien, bei denen als Charakteristikum

eine Affektverflachung im Vordergrund steht und schließlich die systematischen Paraphrenien. Für jede dieser drei Kategorien der systematischen Schizophrenien beschrieb Leonard jeweils vier bis sechs Subtypen.

1.1.2 Die Geschichte der Klassifikationsprinzipien

Da einerseits die Ätiologie psychischer Erkrankungen bis heute noch unklar ist, und andererseits die Spezifität psychopathologischer Symptome und Syndrome äußerst gering ist, stellte das Erarbeiten einer Krankheitssystematik im Fach Psychiatrie eine schwierige Aufgabe dar. Um jedoch psychische Erkrankungen weltweit einheitlich diagnostizierbar zu machen, gab es verschiedene Ansätze, die unübersichtliche Fülle an Krankheitsbilder zu systematisieren.

Ein wichtiger Klassifikationsansatz im 20. Jahrhundert unterschied psychische Erkrankungen nach ihrer Ätiologie. Das sogenannte Triadische System differenzierte psychiatrische Erkrankungen, die durch (vermutlich) morphologisch fassbare Substrate verursacht wurden, in organische Psychosen bei bekanntem Substrat und endogene Psychosen bei vermutetem Substrat. Davon abzugrenzen waren Erkrankungen, die durch psychische oder soziale Faktoren verursacht wurden, auch genannt abnorme Variationen seelischen Wesens.

Basierend auf dieser ätiologischen Klassifikation psychischer Erkrankungen erfolgte die Diagnosestellung im triadischen System nach der sogenannten Schichtenregel. In der Reihenfolge: 1. Abnorme Variation seelischen Lebens, 2. Endogene Psychosen und 3. Organische Psychosen, bestimmten jeweils die Symptome der tiefsten (in der Reihenfolge 1 – 3) erreichten Schicht die Diagnose. Die neunte Revision der internationalen Klassifikation psychischer Erkrankungen der WHO (ICD-9) hatte ein solches Schema als Grundlage. Mit der Zeit jedoch kristallisierten sich die Nachteile dieser ätiologisch orientierten Klassifikation immer deutlicher heraus. Es wurde zum Beispiel deutlich, dass die Diagnosen stark von der Meinung des Untersuchers geprägt waren. Diese Nachteile führten 1991 und 1994 zur Entwicklung zweier moderner Klassifikationssysteme: der heute gültigen ICD-10, erstellt von der WHO, und der DSM-IV der amerikanischen psychiatrischen Gesellschaft. Diese beiden

Systeme klassifizieren psychische Erkrankungen im Wesentlichen nach phänomenologischen Gesichtspunkten, wie zum Beispiel Symptomatik, Schweregrad und Verlauf. Die Ursachen werden nur in weitgehend gesicherten Fällen berücksichtigt. Beide Klassifikationssysteme hatten drei wesentliche Neuerungen:

Erstens das Komorbiditätsprinzip, durch das es möglich wurde, verschiedene psychische Erkrankungen gleichzeitig zu diagnostizieren. Die Schichtenregel wurde somit weitgehend aufgehoben. Zweitens wurde auf eine operationalisierte Diagnostik Wert gelegt. Drittens wurde die multiaxiale Diagnostik eingeführt, um der Komplexität klinischer Bedingungen eines Patienten im Sinne eines bio-psycho-sozialen Ansatzes Rechnung zu tragen. Der Unterschied zwischen den beiden Klassifikationen liegt darin, dass die American Psychiatric Association fünf Achsen unterscheidet, die WHO jedoch nur drei (Weltgesundheitsorganisation, 1991; American Psychiatric Association, 1994). Obwohl die Systematisierung psychiatrischer Erkrankungen dank dieser Klassifikationen weitgehend gelungen ist, gibt es jedoch noch viele unbeantwortete Fragen und Kritik.

1.2 Ätiologie endogener Psychosen

Trotz jahrelanger Versuche die Ätiologie schizophrener Erkrankungen zu erforschen, ist diese bis heute noch weitgehend ungeklärt. Während Hypothesen, die von einer primären neurodegenerativen Genese schizophrener Erkrankungen ausgehen, zunehmend in den Hintergrund treten, gewinnen Theorien, die schizophrene Psychosen als neurodevelopmentale Krankheiten auffassen, an Bedeutung. Am ehesten sind schizophrene Erkrankungen jedoch multifaktoriell bedingt, mit einer nicht unwesentlichen genetischen Beteiligung. Im Folgenden werden nun die wichtigsten Forschungsprojekte und Ergebnisse angeführt.

1.2.1 Strukturelle, histomorphologische Veränderungen und Entwicklungsstörungen des Gehirns

Post mortem Untersuchungen und bildgebende Verfahren wie MRT, PET und SPECT Untersuchungen machten es in den letzten Jahren möglich, strukturelle Veränderungen im Gehirn genauer zu untersuchen. Am konsistentesten über Jahre zeigten sich folgende Befunde: In der wohl am häufigsten untersuchten Struktur, dem Temporallappen, konnten vor allem im medialen Teil, der den Hippocampus einschließt, neuropathologische Veränderungen bei SCZ-Patienten gefunden werden (Honea et al., 2005). 1986 konnten Jakob und Beckmann zusätzlich zu einer asymmetrischen Veränderung des Hirnwindungsmusters im Temporallappen eine diffuse Veränderung der Zytoarchitektur im entorhinalen Kortex (Gyrus parahippocampalis) nachweisen (Jakob, 1986). Mittels MRT-Studien und Neuroimaging-Techniken konnte eine Reduktion des Hippocampus-Volumens um bis zu 80 % bei Patienten mit SCZ aufgezeigt werden. Diese trat sogar bilateral auf. (Geuze et al., 2005; Steen et al., 2006). Darüber hinaus wurden auch im Frontal-, Okzipital- und Parietallappen Volumenminderungen gefunden (Bilder et al., 1994; McCarley et al., 1999). Auch subkortikale Strukturen wie Basalganglien, Thalamus und Kleinhirn zeigten bei schizophrenen Patienten Volumenveränderungen (Elkashef et al., 1994; Gaser et al., 1999; Levitt et al., 1999).

1.2.2 Neurodegeneration versus Entwicklungsstörungen

Bis heute fehlen eindeutige Beweise für eine neurodegenerative Genese schizophrener Erkrankungen. In keiner der post mortem Studien konnte beispielsweise eine Astrogliose festgestellt werden. Im Gegensatz hierzu wiesen einige Forschungsergebnisse auf Entwicklungsanomalien im Gehirn hin, die mit einer Migrationsstörung während der Hirnreifungsphase vereinbar sein könnten (Akbarian et al., 1993; Beckmann et al., 1994; Harrison et al., 1999; Lewis et al., 2002; Sawa et al., 2002).

In den letzten Jahren wurde versucht mittels des so genannten Gyrfizierungsindex, der das Ausmaß der Gyrfizierung des Gehirnes beschreibt,

Entwicklungsanomalien bei schizophrenen Patienten festzustellen. Die Gyrfizierung ändert sich nach dem 1. Lebensjahr nicht mehr. 2001 konnte jedoch ein höherer Gyrfizierungsindex (GI) im dorsolateralen präfrontalen Kortex bei schizophrenen Patienten festgestellt werden, dies konnte auch im Verlauf nochmals bestätigt werden (Vogelely et al., 2001; Falkai et al., 2007). Beim paranoiden Subtyp zeigte sich dagegen ein reduzierter GI in der linken Hemisphäre, was wiederum auf die Heterogenität der Erkrankung hinweist (Sallet et al., 2003).

Zusammenfassend kann man sagen, dass beide Thesen - die der Entwicklungsstörung und die der progredienten Entwicklung - sich nicht unbedingt ausschließen, sondern als komplementär gelten können.

1.2.3 Die Dopamin (Serotonin) Hypothese

Schon in den 70er Jahren wurde aufgrund der erfolgreichen Behandlung Schizophrener mit Neuroleptika die so genannte Dopamin-Hypothese der SCZ postuliert. Sie berief sich auf den Nachweis antagonistischer Eigenschaften der Neuroleptika an Dopaminrezeptoren, wie zum Beispiel an D2 Rezeptoren (Creese et al., 1976). Doch schon in den 80er Jahren wurde diese Hypothese umformuliert, da sich zeigte, dass einem hyperaktivem mesolimbischen System, assoziiert mit Positivsymptomen, ein hypoaktives mesokortikales System, vergesellschaftet mit Negativsymptomen gegenüber steht (Kapur et al., 2001). 1991 erstellte Davis et al. die Hypothese, dass eine niedrige präfrontale Dopaminaktivität von Neuronen, die die Aufgabe haben, kortikale Dopaminaktivität zu hemmen, zu einer erhöhten striatalen Dopaminaktivität führt (Davis et al., 1991). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass ein hyperaktives Dopaminsystem in einer Verschlechterung der Erkrankung resultiert (Liebermann et al., 1984). Eine erhöhte Dopaminsyntheserate konnte auch mittels PET-Studien aufgezeigt werden (Carlsson et al., 1999). Leider erbrachten post mortem Studien in bezug auf Metabolite und Rezeptoren nur sehr inkonsistente Befunde. In zahlreichen Kopplungsanalysen und Assoziationsuntersuchungen konnten keine Gene, die für die dopaminerge Transmission kodierten, als konsistent mit der Erkrankung assoziiert gefunden

werden (Tarazi et al., 1999). Lediglich der Polymorphismus der COMT, ein Enzym, welches Catecholamine wie Dopamin O-methyliert und damit inaktiviert (Catecholamin-o-Methyltransferase) wurde mehrfach mit schizophrenen Erkrankungen assoziiert gefunden, wobei Replikationsuntersuchungen jedoch weitgehend negative Befunde erbrachten.

Es ist mittlerweile bekannt, dass atypische Neuroleptika die dopaminerge Aktivität im präfrontalen Kortex aktivieren und die im mesolimbischen System über den D2 Rezeptor supprimieren, was eine Wirkung auf die Positivsymptome hat. Außerdem blockieren diese darüber hinaus auch den Serotonin 5HT_{2A}-Rezeptor, wodurch der Dopamintransport stimuliert wird, was den Benefit dieser Medikamente auf negative Symptome noch unterstützt (Meltzer et al., 2003). Zusammengefasst kann man sagen, dass in einigen Hirnbereichen eine dopaminerge Hypo- in anderen eine Hyperfunktion besteht.

1.2.4 Die Glutamathypothese

Glutamat, der wichtigste exzitatorische Neurotransmitter im Gehirn, wirkt u. a. über NMDA-(N-Methyl-D-Aspartat), AMPA-(alpha-Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazol-Propionat) und Kainat-Rezeptoren. 1980 postulierte Kim nach Messung des Glutamatspiegels im Liquor, dass erniedrigte Glutamatspiegel mit den schizophrenen Krankheitsbildern vergesellschaftet sind (Kim et al., 1980). Dieses konnte jedoch 2 Jahre später nicht repliziert werden (Gattaz et al., 1982), woraufhin in den folgenden Jahren weitere Untersuchungen folgten. Erstmalig gelang es 1991 mittels NMDA-Antagonisten wie Phenylcyclidin eine SCZ-ähnliche, sog. Modellpsychose bei jungen Erwachsenen zu induzieren. Diese zeigten Positiv- und Negativsyndrome sowie auch kognitive Defizite (Javitt et al., 1991). Weitere Studien mit MK-801 und dem Anästhetikum Ketamin erbrachten ähnliche Befunde, die im Jahre 2006 von einem Mausmodell unterstützt wurden (Olney et al., 1999; Becker et al., 2004; Nabeshima et al., 2006). Diese Erkenntnisse weisen auf eine glutamaterge Unterfunktion, zumindest bei manchen schizophrenen Erkrankungen hin.

Post mortem Studien konnten oben genannte Ergebnisse stützen. Es zeigte sich nicht nur eine Reduktion von NMDA-Rezeptoren im präfrontalen Kortex

und im Temporallappen, sondern auch eine verminderte Expression präsynaptischer Marker GABAerger Interneurone wie GAT1 und Glutamatsäuredecarboxylase (GAD) (Simpson et al., 1998; Toyooka et al., 2002; Meador-Woodruff et al., 2003; Emamian et al., 2004). Eine erniedrigte GABA-Konzentration selbst wurde im Nucleus accumbens und im Thalamus gefunden (Bird et al., 1978). Dagegen fand man im präfrontalen orbitalen Kortex eine erhöhte Anzahl glutamaterger Rezeptoren (Simpson et al., 1992; Deakin and Simpson, 1997). Akbarian stellte anhand dieser Ergebnisse 1996 die Hypothese auf, dass durch die verminderte Anzahl GABAerger Interneurone dieser Region deren Hemmfunktion vermindert wird und es so zu einer erhöhten, toxisch wirkenden Glutamatausschüttung kommt, die zu einem reflektorischen Rezeptoranstieg führt (Akbarian et al., 1996).

Für die Glutamathypothese spricht außerdem das Ergebnis von Assoziationsstudien zwischen dem *D-amino-acid-oxidase* Gen (DAAO), dem G72 Gen und SCZ. Beide Gene sind an der Regulation des NMDA-Rezeptors beteiligt (Chumakov et al., 2002; Harrison et al., 2003).

Neueste Studien befassten sich mit der Hypothese, dass pathophysiologisch auch Veränderungen der Dopamin-Glutamat-Interaktion von Bedeutung sind (Mueller et al., 2004). Doch nicht nur die Dysfunktion des Glutamat- und Dopamin-Stoffwechsels, sondern auch eine zusätzliche Dysfunktion der Neurotransmitter GABA (Gamma-Aminobuttersäure) und Serotonin stehen mittlerweile im Verdacht, in der Pathophysiologie der SCZ eine Rolle zu spielen.

1.2.5 Genetische Befunde

Neben prä- und perinatalen Geburts- und Schwangerschaftskomplikationen, Infektionen der Mutter während der Schwangerschaft, pädiatrischen Gehirninfectionen und Drogenkonsum in der Kindheit oder Adoleszenz (vor allem Cannabis und Amphetamine) gilt die familiäre Belastung heutzutage als stärkster gesicherter Risikofaktor der SCZ (McGrath et al., 1995; Kendler et al., 1997). Mit Hilfe von formalgenetischen Studien wie Familienuntersuchungen, Zwillings- und Adoptionsstudien konnte die Heredität der SCZ belegt und auf über 80 % berechnet werden. Die Ergebnisse von Zwillingsstudien zeigten eine

Konkordanz von 50 % bei monozygoten und eine Konkordanz von 10 % bei dizygoten Zwillingen. So wurde einerseits die Rolle genetischer Faktoren, andererseits aber auch eine zumindest modulierende Rolle von Umweltfaktoren auf die Pathogenese deutlich (Sullivan et al., 2003). Zur weiteren Aufklärung genetischer Ursachen der SCZ wurden verschiedene Methoden eingesetzt. Zwei davon werden im Folgenden aufgeführt. Eine Möglichkeit ist die Kopplungsanalyse, bei der in Familien mit mehreren Erkrankten polymorphe DNA-Sequenzen als Marker einer chromosomaler Regionen ausgewählt werden. Diese Marker werden dahingehend untersucht, ob sie mit der Krankheit gemeinsam vererbt werden (Propping et al., 1994). Eine komplementäre Möglichkeit mit einem ganz anderen Ansatz stellen Assoziationsstudien dar. Hier werden genetische Varianten, entweder Einzelbasenpolymorphismen (SNPs, *Single Nucleotide Polymorphisms*), also der Austausch einer einzelnen Base, oder eine unterschiedliche Anzahl von Di-, Tri- oder sonstigen Polynukleotiden (VNTR, *Variable Number of Tandem Repeats*) bestimmter Kandidatengene, deren Proteine für die Pathogenese wichtig sein könnten, bei großen Gruppen von schizophrenen Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollpersonen analysiert. Die Variabilität des Genoms ist ganz entscheidend durch die SNPs geprägt. Da es im menschlichen Genom jedoch ca. 3 Millionen dieser Einzelbasenpolymorphismen gibt, aber nur ein geringer Anteil für die Entstehung von Krankheiten relevant ist, war die Entdeckung der Haplotypblockstruktur des menschlichen Genoms ein großer Durchbruch für die genetische Forschung. Man fand, dass es Regionen im menschlichen Genom gibt, in denen nahezu keine Rekombinationsereignisse stattfinden; diese wechseln sich mit sogenannten „Hotspots“ der Rekombination ab. Die häufigen Haplotypen der resultierenden Blöcke können mittels ausgewählter Polymorphismen charakterisiert werden. Die Allele der übrigen Polymorphismen stehen mit diesen Varianten im Kopplungsungleichgewicht und lassen sich daher daraus ableiten. Entscheidend ist es jedoch für assoziierte Varianten Auswirkungen auf Genexpression, Proteinfunktion und physiologische Parameter nachzuweisen (Freudenberg, 2002). Die oben genannten Familien- und Zwillingsstudien zeigen zwar die Heredität dieser Erkrankung auf, zeigen

aber auch, dass der SCZ kein klassisches Vererbungsmuster nach den Mendelschen Gesetzen zugrunde liegt. Die hohe Heredität von 0,7-0,85 und das zehnfach erhöhte Risiko von Geschwistern eines Patienten, selbst zu erkranken, führten dazu, dass sich viele Forschungsgruppen mit dem Suchen von Vulnerabilitäts -und Dispositionsgenen beschäftigten (Levinson et al., 2000). Bei zahlreichen Kandidatenregionen zeigte sich eine Kopplung mit schizophrenen Erkrankungen: Auf dem mehrfach replizierten Locus 1q21-22 konnte mittels positionaler Klonierung der Regulator des G-Protein 4 (RGS4) als ein mögliches zugrunde liegendes Gen identifiziert werden (Brzustowicz et al., 2000; Chowdary et al., 2002; Morris et al., 2003). Weitere mehrfach replizierte Loci sind Chromosom 3p und 5q (Schwab et al., 1998; Straub et al., 1998; Gurling et al., 2001) als auch 6p24-22 (Moises et al., 1995; Schwab et al., 2000; Lindholm et al., 2001; Maziade et al., 2001). Das Dysbindin-Gen (DTNBP1) wurde ebenfalls in dieser Region als Vulnerabilitätsgen identifiziert (Straub et al., 2002). Auch andere Regionen auf Chromosom 6 wurden als mit SCZ assoziiert identifiziert, so zum Beispiel 6q21-22.3 (Martinez et al., 1999; Levinson et al., 2000; Lindholm et al., 2001). Auf Chromosom 8 wurde neben der Region 8p21-22/24 das Neuregulin-Gen (8p21-12) als Kandidatengen für SCZ vorgeschlagen (Blouin et al., 1998; Stefansson et al., 2002). Weitere mit SCZ assoziierte Genloci sind 10p14 (Faraone et al., 1996; Schwab et al., 1998; DeLisi et al., 2002), 11q und 13q 22-34; hier wurde neben dem G30 Gen das G72 Gen als Vulnerabilitätsgen identifiziert (13q32-33), das genauso wie das D-amino-oxidase-Gen (DAAO-Gen, auf 12q24) an der Regulation des NMDA-Rezeptors beteiligt ist (Lin et al., 1997; Blouin et al., 1998; Stefansson et al., 2002). Ein weiterer replizierter Genlocus ist interessanterweise 12q22-24, auf dem sich auch das Gen befindet, das für die neuronale NO-Synthase kodiert. Hier zeigte sich eine Kopplung mit SCZ, vor allem mit Negativsymptomen, darüber hinaus mit schizoaffektiven Psychosen. Auf diesem Locus befindet sich DYNLL1 (Bailer et al., 2000; Brzustowicz et al., 2000; Bailer et al., 2002; DeLisi et al., 2002). Auch der Locus 18p11 mit seinem vielversprechenden Kandidatengen für die Inositolmonophosphatase (IMPA 2) konnte in einigen Studien als mit SCZ assoziiert gefunden werden (Berrettini et al., 1994;

Berrettini et al., 1997; Detera-Wadleigh et al., 1999; Yoshikawa et al., 2001). Auf dem Locus 22q11, der aufgrund seiner Deletion beim 22q11-Deletions-Syndrom (bei dem schizophrene Erkrankungen überzufällig häufig vorkommen) von äußerstem Interesse ist, fand man bei Patienten mit SCZ assoziierte SNPs im Gen, welches für Prolin-Dehydrogenase 2 (PRODH2) kodiert (Liu et al., 2002), als auch Veränderungen des Gens für Catecholamin-o-methyltransferase (Shifman et al., 2002).

Ein Problem stellte jedoch dar, dass bei vielen mit der SCZ assoziierten Haplotypen die Ergebnisse beträchtlich zwischen den einzelnen Populationen differierten. Außerdem handelte es sich häufig um eher nicht funktionale, meistens auch intronisch gelegene Polymorphismen. Leider konnten bis zum heutigen Tag durch Linkage-Analysen nur wenige funktionelle Genvarianten bzw. Mutationen bei schizophrenen Erkrankungen gefunden werden. Dieses macht deutlich, dass die Genetik dieser Erkrankung hochkomplex ist (Meyer et al., 2001).

Zusammengefasst kann man sagen, dass sicher eine Vielzahl an Genen an dieser Erkrankung beteiligt sind, doch auch die Interaktion der Genprodukte untereinander, auch genannt Epistasis, wie auch Wechselwirkungen mit Umweltfaktoren leisten einen Beitrag. Die Summierung von Risikogenen trägt letztendlich dazu bei, die individuelle Prädisposition überschwellig werden zu lassen. Dies resultiert dann in der Erkrankung des Individuums.

1.3 Einführung: Bipolare Störungen (bipolare Erkrankung, BPD)

Es bestehen epidemiologische und klinische Gemeinsamkeiten von SCZ und bipolaren Störungen, außerdem auch genetische Überlappungen zwischen beiden Krankheitsbildern. Deshalb wird die BPD im Folgenden näher erläutert, und in der vorgelegten Arbeit mit untersucht.

1.3.1 Geschichtliche Daten und Definition

Die BPD ist eine psychische Erkrankung, die mit einer Lebenszeitprävalenz von 1 % häufig ist. Durch die Beschreibung der Melancholie durch Hippokrates und das Alte Testament sind affektive Störungen die am frühesten beschriebenen

psychiatrischen Erkrankungen. Durch Kraepelin wurden erstmals manische und depressive Episoden unter der Krankheitseinheit des damals so genannten „*manisch-depressiven Irreseins*“ zusammengefasst. Er grenzte die affektiven Störungen somit klar von der SCZ ab. Außerdem wurden durch ihn leichtere Verstimmungszustände als „Grundzustände des manisch-depressiven Irreseins“ betrachtet. Diagnostiziert wurden diese Zustände anhand der Psychopathologie und des Verlaufes.

Nachdem man im Laufe der Zeit unter dem Einfluss psychodynamischen Denkens das Konzept der neurotischen Depression entwickelt hatte, das Depressionen in organisch, endogen und psychogen unterteilte, kam man in den heutigen Klassifikationssystemen wieder davon ab. So unterteilt ICD-10 die affektiven Störungen nach psychopathologischen und Verlaufskriterien in die manische Episode (F32), die depressive Episode (F32), die bipolar affektive Störung (F31), die rezidivierende depressive Störung (F33) und die anhaltende affektive Störung mit Zykllothymie und Dysthymie (F34).

Die BPD ist charakterisiert durch depressive und manische Episoden. Diagnosekriterien der manische Phase sind euphorische oder dysphorische Stimmung, Antriebssteigerung, Ideenflucht, Ablenkbarkeit, vermindertes Schlafbedürfnis, gesteigerte Libido, Größenwahn, Verlust sozialer Hemmungen, tollkühnes Verhalten und gesteigerte Geselligkeit (nach ICD-10). Die Kriterien der depressiven Episode sind deprimierter Affekt, Interessenverlust, Antriebsminderung, Konzentrationsstörungen, vermindertes Selbstwertgefühl, Schuldgefühle, Suizidgedanken, Schlafstörungen, verminderter oder gesteigerter Appetit und psychomotorische Agitiertheit oder Hemmung (ebenfalls nach ICD-10).

Die Ätiologie dieser Erkrankung ist, ähnlich der SCZ, komplex. Schon lange sprachen epidemiologische Studien genetischen Faktoren eine große Rolle zu, was sich in einer hohen Dichte betroffener Individuen in großen Stammbäumen widerspiegelt (Berrettini, 2000). Daher bot es sich an, zu dieser Erkrankung umfangreiche Linkageanalysen durchzuführen. Interessanterweise fanden sich hier nun mehrere Kandidatengene, die sowohl mit der bipolaren Störung wie auch mit der SCZ assoziiert sind.

1.3.2 Gemeinsamkeiten der SCZ und der bipolaren Störung

1.3.2.1 Epidemiologie und Klinik

Sowohl die SCZ, wie auch die BPD betrifft Männer und Frauen in gleichem Maße und tritt weltweit mit einer Lebenszeitprävalenz von 1 % auf, und zwar gehäuft mit einem Ersterkrankungsalter zwischen dem 15. und dem 25. Lebensjahr (Tsuang et al., 2002). Beide Erkrankungen können in Schüben verlaufen. Patienten beider Erkrankungsgruppen haben ein erhöhtes Suizidsrisiko. Psychotische Symptome wie Wahnvorstellungen, Halluzinationen oder Denkstörungen können auch bei der bipolaren Störung vorhanden sein, obgleich jedoch diese nicht im Zentrum des Krankheitsgeschehens stehen. Therapeutisch werden bei der bipolaren Erkrankung Stimmungsstabilisatoren als Medikamente der ersten Wahl eingesetzt, die z. T. auch bei schizophrenen Psychosen verabreicht werden. Interessanterweise fungieren etliche atypische Neuroleptika auch als antimaniische und stimmungsstabilisierende Substanzen. Mittlerweile gilt als gesichert, dass ein Defizit des Glutamat-Vorläufers GABA, ein inhibitorischer Transmitter exzitatorischer Nervenzellen des ZNS, eine wichtige Rolle bei der Pathophysiologie der Depression spielt. Dies wird unterstützt durch neuere Studien, die zeigen konnten, dass eine Verabreichung des NMDA-Antagonisten Ketamin antidepressive Effekte hat (Garcia et al., 2008).

1.3.2.2 Genetische Überlappungsbereiche

Die Heritabilität der beiden Erkrankungen ist ähnlich, mit geschätzten Zahlen von 70 % bis 80 % (Berrettini et al., 2002). Interessanterweise konnte in Familienstudien gezeigt werden, dass erstgradig Verwandte von Patienten mit SCZ wie auch von Patienten mit BPD, ein erhöhtes Risiko haben, an einer schizoaffektiven Psychose oder an einer unipolaren Depression zu erkranken (Kendler et al., 1993; Maier et al., 1993; Somnath et al., 2002). So liegt besonderes Interesse darin, nach Genen zu fahnden, die für beide Erkrankungen wichtig sind. Zum einen wurde hier der bereits erwähnte Locus

18p11.2 identifiziert, der sowohl als Hotspot für SCZ wie auch für BPD gilt (Schwab et al., 2000; Yoshikawa et al., 2001). Auch auf dem Locus 13q32-33, auf dem sich das Gen G72 befindet, waren SNPs eindeutig mit SCZ und BPD assoziiert (Lin et al., 1997; Kelsoe et al., 2001; Chumakov et al., 2002; Hattori et al., 2003). Auch wurden verschiedene BPD-Kandidatengene beschrieben, die auf dem nicht nur für SCZ, sondern auch für BPD wichtigen Locus 22q11 liegen: zum einen das Gen für die Prolinhydrogenase (PRODH2), zum anderen das für die G-Protein gekoppelte Rezeptorkinase 3 (GRK3) und darüber hinaus das für die Catecholamin-o-Methyltransferase (COMT) (Niculescu et al., 2000; Egan et al., 2001; Liu et al., 2002; Shifman et al., 2002). Eine weiterer für beide Erkrankungen wichtiger Locus ist 8p22, auf dem sich auch das für SCZ wichtige Neuregulin 1 Gen befindet (Blouin et al., 1998; Ophoff et al., 2002; Stefansson et al., 2002). Weitere Studien konnten zeigen, dass der Locus 10p14 für beide Erkrankungen relevant ist (Faraone et al., 1998; Straub et al., 1998; Foroud et al., 2000; Schwab et al., 2000). Locus 12q24.2, u.a. der Locus des NOS1-Genes, liegt ebenfalls in einer Region, die für beide Erkrankungen von Bedeutung ist (Ewald et al., 1998; Detera-Wadleigh et al., 1999; Morissette et al., 1999; Degn et al., 2001; Ewald et al., 2002; Curtis et al., 2003; Maziade et al., 2005; Shink et al., 2005). Ebenfalls auf diesem Locus ist das DYNLL1 Gen zu finden, welches für ein im Folgenden näher beschriebenes mit NOS-1 interagierendes Protein kodiert. Durch diese Interaktionen, und außerdem durch seine Lage, ist dieses Gen ein relevantes Kandidatengen für beide Erkrankungen.

1.4 PIN/ DLC1/LC8/DYNLL1

1.4.1 Struktur und verschiedene Funktionen des Proteins PIN/ DLC1/LC8/DYNLL1

Im Jahre 1996 wurde erstmals ein Protein beschrieben, welches spezifisch die neuronale Stickstoffmonoxid-Synthase (NOS-I) hemmt. Es wirkt indem es durch seine Bindung an den N-Terminus der NOS-I die Dimerisation derselben destabilisiert. Aufgrund dieser Funktion bekam dieses Regulatorprotein den

Namen PIN (für „*Protein inhibitor of nNOS*“) (Jaffrey, 1996). In weiteren Veröffentlichungen konnten diese Ergebnisse in Versuchen mit aufgereinigter nNOS jedoch nicht repliziert werden. Der 1996 postulierten spezifischen Bindung an die Isoform NOS-I stand jetzt eine unspezifische Bindung an alle Stickstoffmonoxidsynthasen (NOS-I, NOS-II und NOS-III) gegenüber. Außerdem war die Potenz von PIN hinsichtlich einer Hemmung von NOS-I bei diesen Versuchen wesentlich geringer als vorbeschrieben. Lediglich für sehr hohe Konzentrationen des Proteins konnte eine 50%ige Inhibition von NOS-I repliziert werden. Auch eine andere Studie konnte die Ergebnisse von Snyder et al. nicht replizieren (Hemmens et al., 1998; Rodriguez-Crespo et al., 2001). 1999 wurde die Struktur des PIN näher untersucht. Da es sich um eine 8kD große Dynein-Nebenkette handelt, die aus 89 Aminosäuren besteht, wurde es mit dem alternativen Namen LC8 (dynein light chain 8) und DLC1 (Dynein Light Chain 1) bezeichnet. Mittlerweile lautet der offizielle Name DYNLL1 (Dynein light chain LC8 type 1). Diese Dynein-Nebenkette ist eine Komponente des cytoplasmatischen Dynein-Motorkomplexes: um eine oder mehrere schwere Ketten (HC), an deren Kopf die für Motoraktivität der Mikrotubuli verantwortliche Hydrolyse von ATP stattfindet, sind verschiedene 74 kD große Intermediärketten (IC) gruppiert, darüber hinaus vier 50-60 kD leichte Intermediärketten (LIC) und verschiedene leichte Ketten mit einer Masse von weniger als 22 kD (LC). Insgesamt bilden diese Strukturen das Mechanoprotein Dynein, das Querbrückenkomplexe zwischen benachbarten Mikrotubulusdoubletten bildet, was die zum Minusende gerichtete Bewegung verschiedenster Strukturen sicher stellt. Im Zytoplasma spielt es eine wichtige Rolle für den retrograden vesikulären Transport in Axonen, für die zelluläre Lokalisation des Golgiapparates und der Lysosomen und die Spindelbildung. Extrazellulär ist es für den Zilien- und Flagellenschlag essentiell (King et al., 1996; Vallee and Sheetz, 1996; Hirokawa et al., 1998). In biochemischen Studien zeigte sich, dass DYNLL1 eine stöchiometrische Komponente sowohl von cytoplasmatischem Dynein des Gehirnes als auch von Myosin Va, einem auf Aktin basierenden molekularen Motor, sein muss (King et al., 1996; Espindola et al., 2000; Naisbitt et al., 2000).

DYNLL1 selbst besteht aus 2 Monomeren, die ein Dimer bilden. Jedes dieser 2 Monomere wird aus zwei Paaren von alpha-Ketten gebildet, die die äußere Begrenzung darstellen. Jedes alpha-Ketten-Paar ist mit einem so genannten Beta-Sheet verbunden, bestehend aus 5 antiparallelen Beta-Ketten. Bei Bindung von NOS-I wird ein am N-terminal (zwischen den Aminosäuren 228 und 244) befindliches Peptid der NOS-I wie eine sechste Beta-Kette an DYNLL1 gebunden (siehe Abb.1). Die Bindungsdomäne der NOS-I für DYNLL1 liegt außerhalb der Regionen für die Bindung von Calmodulin, Kofaktoren, und auch nicht im Bereich der Protein bindenden Domäne (PDZ), die für die Bindung von NOS-I an synaptische Strukturen zuständig ist (Jaffrey, 1996). DYNLL1 wird im Gehirn konstitutiv, bei Ischämie jedoch vermehrt exprimiert (Greenwood et al., 1997; Gillardon et al., 1998).

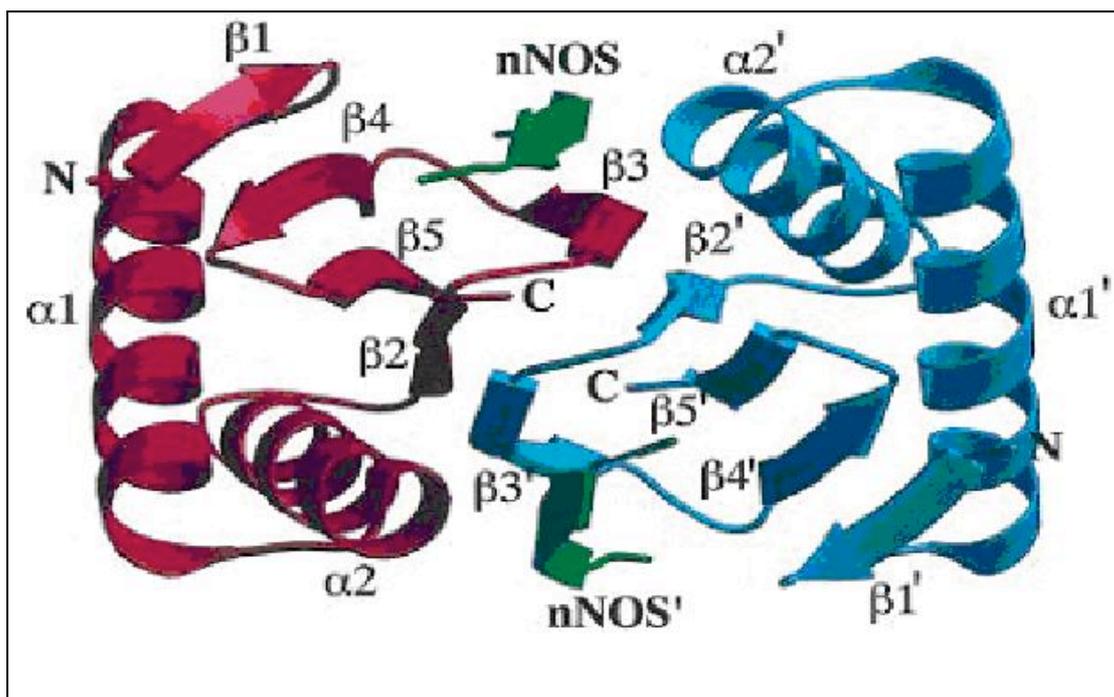


Abbildung 1: DYNLL1-Dimer Komplex (Liang et al., 1999)

Der DYNLL1-Dimer Komplex (rot und blau), hier verbunden mit zwei Peptiden, die NOS-I zugehören. Blick entlang einer zweifach gefalteten Achse, welche die zwei Hälften des Dimers miteinander verbindet.

DYNLL1 ist zwischen verschiedenen Spezies hochkonserviert. Das Protein der Ratte und der Maus gleicht dem humanen Protein zu 100%, das der Fruchtfliege *Drosophila* zu 92%, und das von *C. elegans* zu 92%. Aminosäuresequenzidentität zeigt es zu einem Protein der grünen Alge *Chlamydomonas reinhardtii*, wo es eine Komponente des makromolekularen Komplexes ist, der flagelläres und cytosolisches Dynein beinhaltet. Die Deletion von Allelen des DYNLL1 Genes führt in der Alge zu unbeweglichen, kurzen Flagellen mit fehlerhaften Speichen in allen Armen, außerdem zu schnabelartigen Überhängen in den β -Tubuli des äußeren Paares der Mikrotubuli. Auch der retrograde intraflagelläre Transport ist gestört (Pazour et al., 1998).

In *Drosophila* führt ein partieller Verlust dieses Gens zur fehlerhaften Flügelentwicklung und weiblicher Sterilität, ein kompletter Verlust zum Absterben des Embryos und Apoptose (Dick et al., 1996; Phillis et al., 1996). Dieses hohe Maß an Konservierung lässt vermuten, dass es sich bei DYNLL1 um ein biologisch sehr wichtiges Protein handeln muss.

Mit der Zeit wurden immer mehr Interaktionen von DYNLL1 mit unterschiedlichen zellulären Proteinen oder Strukturen publiziert. So bindet dieses nicht nur NOS-I, sondern auch an den renalen Transkriptionsfaktor Kid-1, an die Mikrotubulin assoziierte Kinase, an deren intraneuralen Transport DYNLL1 auch beteiligt ist, genauso wie an das Produkt des *swallow* Genes von *Drosophila* (Naisbitt et al., 2000; Lo et al., 2001; Rodriguez-Crespo et al., 2001; Fuhrmann et al., 2002; Navarro-Lerida et al., 2004). Darüber hinaus bindet DYNLL1 an pro-apoptotische Proteine wie das BIM (Bcl-2-modifying factor) und reguliert so deren Zelltod induzierende Funktion. Ist dieses Zusammenspiel gestört, sind die betroffenen Zellen anfälliger für pro-apoptotische Stimuli (Day et al., 1999).

1.4.2 DYNLL1 und seine Assoziation mit SCZ und BPD

1.4.2.1 DYNLL1 als Kandidatengen für SCZ und BPD

Wie oben erwähnt, geht man bei beiden Erkrankungen heutzutage von einer Heredität von bis zu 70 - 80% aus. DYNLL1 stellt aus mehreren Gründen ein hochinteressantes, neues Kandidatengen dar: Der Genlocus von DYNLL1 liegt auf dem bereits erwähnten Locus 12q22-24, nur circa 2 Megabasen von NOS1, das für das NO produzierende Enzym NOS-I kodiert, entfernt. 12q22-24 wurde in den letzten Jahren konstant als ein mit SCZ gekoppelter Locus publiziert. Die Kopplungswahrscheinlichkeit wird in LOD (*logarithm of the odds*)-scores angegeben. Konstant wurden hier LOD- Scores von 2 bis 3 veröffentlicht.

Auch zeigte sich, dass besonders die Negativsymptome bei SCZ mit eben diesem Locus assoziiert sind (Bailer et al., 2000; Brzustowicz et al., 2000; Bailer et al., 2002; DeLisi et al., 2002; Wilcox et al., 2002). Interessant ist auch, dass eben dieser Locus auch als ein Hotspot für BPD und auch Depression, letzteres sogar mit LOD-scores über 6, bekannt geworden ist (Ewald et al., 1998; Detera-Wadleigh, 1999; Morissette et al., 1999; Degn et al., 2001; Curtis et al., 2003; Akbevich et al., 2003; Maziade et al., 2005; Shink et al., 2005). So lag es nahe, DYNLL1 in Anbetracht seiner Lage als Kandidatengen zu untersuchen, und mehrere Polymorphismen als auch deren Haplotyp auf ihre Assoziation mit SCZ und BPD hin zu testen. Nicht nur die Nähe zum NOS-I-Locus, sondern auch seine Interaktionen mit NOS-I und darüber hinaus mit weiteren, in die Pathogenese beider Erkrankungen involvierten Proteinen, lassen auf eine Rolle bei dieser Erkrankung schließen.

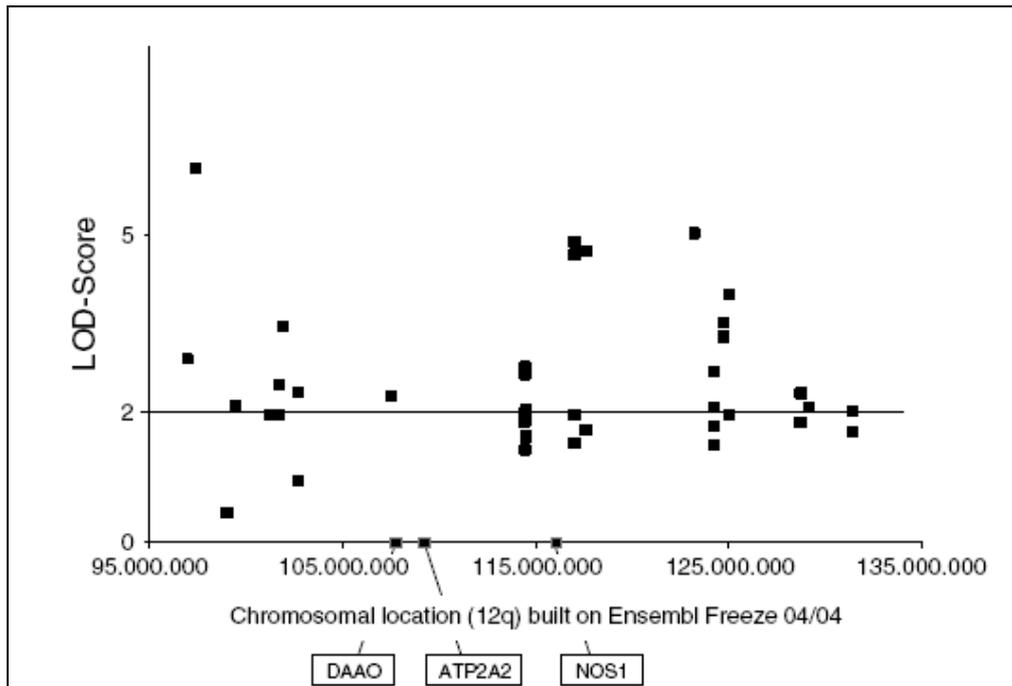


Abbildung 2: LOD-Scores von Markern am Locus 12q24 (Reif et al., 2006)

LOD-Scores von Markern am Locus 12q24, auf dem sich auch DYNLL1 befindet. Herausgehoben sind diejenigen Marker, deren hohe LOD-Scores auf eine Assoziation mit SCZ oder affektive Psychosen hinweisen.

1.4.2.2 DYNLL1 und sein Zusammenhang mit NOS

Bereits in den 60er Jahren wurde in Russland ein Zusammenhang zwischen dem NO-Metabolismus und der SCZ postuliert (Averbukh et al., 1966). Aufgrund vieler Studien geht man heute davon aus, dass NO als wichtiger pleiotroper Botenstoff in der Pathophysiologie der SCZ eine bedeutende Rolle spielt. DYNLL1 interagiert mit und hemmt das NO bildende Enzym die NOS-I, wenn auch nicht spezifisch (Jaffrey, 1996; Hemmens et al., 1998; Rodriguez-Crespo et al., 2001). Wichtig ist zu erwähnen, dass bei endogenen Psychosen in manchen Hirnregionen eine gesteigerte, in anderen wiederum eine verminderte NO-Synthese nachzuweisen ist (Bernstein et al., 2005). Studien konnten zeigen, dass NO nicht nur als *second messenger* des Glutamatsystems fungiert, sondern auch die Entladungsmuster dopaminerger striataler Neurone moduliert (siehe Abb. 3). Daneben hat NO auch Einflüsse auf

das serotoninerge System (West et al., 2000; Kiss et al., 2001; Fallin et al., 2005).

Interessanterweise konnten sowohl im (prä)frontalen und temporalen Kortex, wie auch im Hypothalamus, im Putamen und cerebellären Vermis, somit Regionen, die, wie oben beschrieben in der Pathogenese der SCZ eine Rolle spielen, Malformation nitrinerner Neurone, wie auch eine veränderte NOS-I Aktivität festgestellt werden (Akbarian et al., 1993; Doyle et al., 1995; Akbarian et al., 1996; Karson et al., 1996; Bernstein et al., 1999; Bernstein et al., 2001; Xing et al., 2002). Dass NOS, beziehungsweise ihre unterschiedlichen Expressionsmuster in der Neuronenentwicklung und Reifung des Gehirnes eine Rolle spielen müssen, konnte mit pränatal erhobenen Befunden untermauert werden (Downen et al., 1999; Contestabile, 2000).

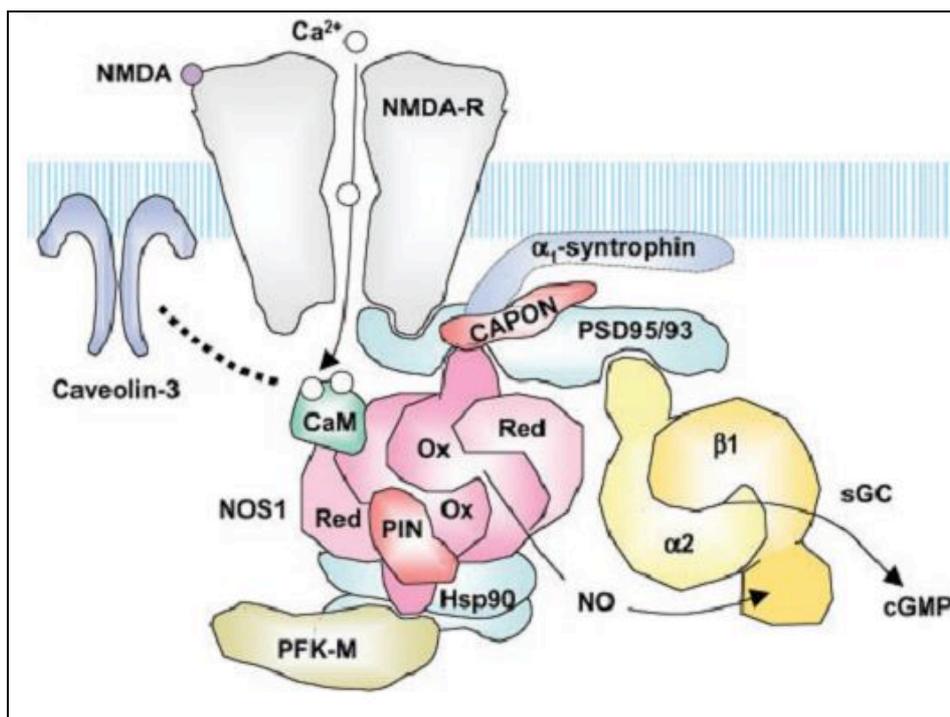


Abbildung 3: Interaktionspartner von NOS-I (Nedvetsky et al., 2002).

1.4.2.3 DYNLL1 und seine Interaktion mit dem GKAP-PSD 95 Protein-Komplex

Für die Funktionalität des NMDA-Rezeptors, einem Bestandteil des Glutamatsystems, ist die Interaktion von DYNLL1 und dem GKAP-PSD 95 Protein-Komplex wichtig (siehe Abb. 4). Wie oben erwähnt, ist die glutamaterge Unterfunktion bei einigen Erkrankungen des schizophrenen Formenkreises, wie auch bei bipolaren Störungen von großer Bedeutung. GKAP (Guanylatkinase-domain-assoziiertes Protein) bindet mit einem zentralen Segment an PSD-95 (Postsynaptic density Protein 95). Dieses gehört zu der Gruppe von Gerüstkomplexproteinen. Dieser Gerüstkomplex ist für die Signalfunktion der NMDA-Rezeptoren essentiell. Dass Veränderungen anderer, an dieser Interaktion involvierter Proteine signifikant mit endogenen Psychosen assoziiert sind, konnten andere Studien aufweisen (Kornau et al., 1995; Niethammer et al., 1998; Haraguchi et al., 2000; Ohnuma et al., 2000; Clinton et al., 2004; Brzustowicz et al., 2004; Kristiansen et al., 2005; Zheng et al., 2005). So liegt es nahe, dass DYNLL1 ebenso an der Pathophysiologie der SCZ oder der bipolaren Störungen beteiligt sein könnte.

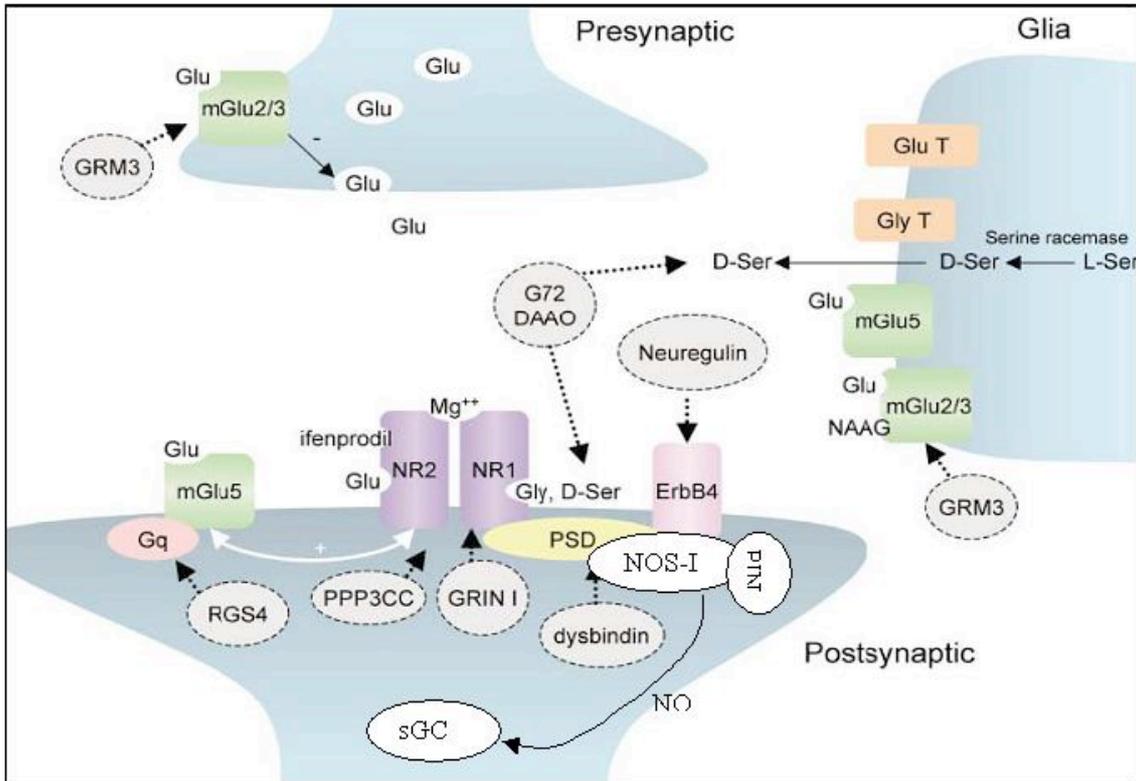


Abbildung 4: Interaktionen von DYNLL1 (PIN) am Glutamatrezeptor, modifiziert nach Moghaddam (Moghaddam, 2003).

1.4.2.4 DYNLL1 und seine Interaktion mit einem Gerüst-Protein namens Gephyrin

DYNLL1 interagiert außerdem mit Gephyrin, einem Gerüst-Protein. Studien konnten sowohl Interaktionen mit dem Glycinrezeptor als auch mit dem GABA-A Rezeptor aufzeigen (Triller et al., 1985; Triller et al., 1987; Prior et al., 1992; Bohlhalter et al., 1994; McGrath et al., 1995). GABA ist Vorläufer von Glutamat und Glycin ist Co-Agonist des NMDA-Rezeptors, somit ein wichtiger Bestandteil des Glutamatsystems, welches bei beiden Erkrankungen gestört ist.

1.4.2.5 Interaktion von DYNLL1 mit dem LIS1-Protein

Interessanterweise konnte in Studien aufgezeigt werden, dass bei SCZ und Lissencephalie gleichartige Veränderung, wie zum Beispiel eine Verdickung des Kortex vorhanden sind. In der Signalkaskade, die bei Lissencephalie

gestört ist, ist DYNLL1 ebenfalls ein Bestandteil (Pilz et al., 1998; Dobyms et al., 1999; Ross et al., 2001; Ozeki et al., 2003).

1.4.2.6 DYNLL1 als Bestandteil des DISC1 regulierten Mikrotubuli basierten Motorkomplex

Darüber hinaus interagiert DYNLL1 mit dem Mikrotubuli basierten Dynein Motor-Komplex, der neben LIS1 und NUDEL, auch Dynein und Dynactin enthält. Das Protein DISC1 reguliert die Funktion dieses Komplexes und gilt als ein Risikofaktor für SCZ. Bei einer schottischen Familie konnte eine balancierte Translokation (1;11)(q42.1;q14.3) gefunden werden, die mit SCZ co-segregierte. Ein verändertes DISC1 führte in Studien zu einem verminderten Neuronenwachstum und einer veränderten neuronalen Migration (Millar et al., 2000; Blackwood et al., 2001, Kamiya et al., 2005) Da das DYNLL1-Protein ebenfalls mit diesem Komplex interagiert, könnte dessen Dysfunktion ähnliche Folgen haben. 2008 zeigte eine Studie die Assoziation mehrerer SNPs des DISC1 Genes mit bipolaren Störungen (Hennah et al., 2008).

2 Fragestellung und Zielsetzung dieser Arbeit

Die Lage des DYNLL1-Gen auf einem *Hot spot* für SCZ und BPD, dem Locus 12q22-24, sowie die oben beschriebenen, für beide Erkrankungen wichtigen Interaktionen des DYNLL1 Proteins, ließen uns die Ausgangshypothese dieser Arbeit formulieren: Polymorphismen im DYNLL1 Gen sind mit SCZ und BPD assoziiert.

Die Zielsetzung dieser Arbeit lag darin, in einer Fall-Kontroll-Studie sechs SNPs im DYNLL1-Gen als auch deren entsprechende Haplotypen zu untersuchen. Zu diesem Zweck wurde die DNA von 246 SCZ-Patienten, sowie 90 BPD-Patienten untersucht. Verglichen wurden die Ergebnisse mit denen von 284 gesunden Probanden.

3 Material und Methoden

3.1 Materialien

3.1.1 Probanden

An unserer Studie nahmen insgesamt 620, nicht miteinander verwandte Probanden teil, die im Mittel 44 ± 14 Jahre alt waren. Alle Personen stammten aus der unterfränkischen Region.

Die Diagnosestellung erfolgte durch ein ausführliches, semi-strukturiertes klinisches Interview analog dem AMDP Interview (Arbeitsgemeinschaft für Methodik und Dokumentation in der Psychiatrie 2000), durchgeführt durch einen erfahrenen Psychiater, sowie Durchsicht der Krankenakte und ggf. auswärtiger Arztbriefe und Angehörigeninterviews. Erfasst wurden weiterhin Familienanamnese, Suchtmittelabusus und Ersterkrankungsalter. Alle Patienten litten an einer chronisch verlaufenden Erkrankung und befanden sich mindestens einmal in stationärer Behandlung in der Klinik und Poliklinik für Psychiatrie, Psychosomatik und Psychotherapie des Universitätsklinikums Würzburg. Vor der genetischen Analyse wurde daraufhin eine ICD-10 Diagnose gestellt. Von den untersuchten Patienten litten 246 nach ICD-10 Kriterien an einer SCZ; außerdem nahmen an der Studie 90 Patienten teil, die nach den ICD-10 Kriterien an einer BPD litten. Keiner der Patienten litt an signifikanten neurologischen Komorbiditäten, Epilepsie, mentaler Retardierung oder anderen Krankheiten, die zu organischen Psychosen führen könnten. Die Kontrollen stammten von 284 gesunden Probanden, von denen 150 männlich und 134 weiblich waren. Sie stammten ebenfalls aus der unterfränkischen Gegend und hatten den gleichen genetischen Hintergrund wie die Patienten. Das Alter betrug 35 ± 13 Jahre. Die Kontrollen wurden zwar nicht auf psychiatrische Krankheiten hin untersucht, wurden aber ausführlich über den Inhalt der Studie informiert und nahmen keine Medikamenten ein. So konnte man von einem geringen Anteil an Probanden mit endogenen Psychosen in der Kontrollgruppe ausgehen (Reif et al., 2006).

Die Regeln der Deklaration von Helsinki einhaltend, wurden nur Patienten und Freiwillige, die schriftlich informiert ihre Zustimmung gaben, in die Studie aufgenommen. Vor Beginn der Studie wurde die Untersuchung durch die Ethik-Kommission der Universität Würzburg genehmigt.

3.1.2 Genotypisierung

Sechs SNPs wurden in dieser Studie untersucht:

SNP 10 rs1167705 (G/T); SNP11 rs 12857 (G/T); SNP 12 rs 3916065 (G/T); SNP 13 rs 787828 (A/T); SNP 18 rs580016 (A/G); SNP 19 rs 978815 (A/G) ;

Im Folgenden sind in den Tabellen 1-3 die zur Genotypisierung verwendeten Materialien aufgelistet, in Tabelle 4 die Puffer. Tabelle 5 gibt eine Übersicht über die verwendeten Primer.

Taq-Polymerase	BioRad, München
Hotstar	Qiagen
DNTP (100mM; dGTP, dATP, dTTP, dCTP)	Promega GmbH, Mannheim

Tabelle 1: Enzyme und Nukleotide

Agarose, Biozym LE	Biozym, Biotech Tradinh GmbH Wien
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt
100bp DNA-Leiter	Peqlab, Erlangen
Ethanol	BAKER, Deventer Holland
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Glycerol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
KCl (für PCR-Puffer)	Applichem, Darmstadt
MgCl ₂	Applichem, Darmstadt
N,O-Bis-(trimethylsilyl)-acetamid (BSA)	Applichem, Darmstadt
Tris-Acetat, Tris-HCL	Merck, Darmstadt
Tween 20	Applichem, Darmstadt

Wasser für PCR	Merck, Darmstadt
Xylen Cyanol FF GmbH	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim

* Alle Chemikalien besaßen analytischen Reinheitsgrad

Tabelle 2: Chemikalien

Autoclav	Wolf Sanoclav, Bad Überkingen-Hausen
Biometra T-Gradient Thermocycler	Biometra, Göttingen
Biometra UNOII Thermoblock	Biometra, Göttingen
CEQ 8000 (Kapillarsequenzierer)	Beckmann-Coulter, Krefeld
Chemi Doc	Bio-Rad, München
Filterspitzen	Sarstedt, Nümbrecht
Gelkammern, Käbme, Spacer, Klammern	Peqlab, Erlangen
Glaskolben	Schott AG, Mainz
Heizrührplatte	Gesellschaft für Laborbedarf GmbH Würzburg
Mikrowelle	Siemens
Multiply- μ Strip Pro Biosphere	Sarstedt, Nümbrecht
Personal Spin-Vortex, Microspin FV-2400	lab-4-you GmbH Berlin
Pipetten	Eppendorf, Hamburg
Printer und Printerpapier	Sony
Reaktionsgefäße: PCR Softtubes 0,2 ml Safe Lock 1,5 ml	Sarstedt, Nümbrecht Eppendorf, Hamburg
Spannungsgerät: Power Supply	LKB, Bromma, Schweden
Spitzbodenröhrchen 15 ml, 50 ml	Sarstedt, Nümbrecht
T- Gradient Thermocycler :	Biometra, Göttingen
UV- Tisch, Flou- Link	MWG Biotech
Waage Toledo	Mettler, Gießen

Wasserbad	GFL (Gesellschaft für Labortechnik), Burgwedel
96-well Mikrotiterplatte	Eppendorf, Hamburg
Zentrifugen: Mikroliter, Rotanta 96RS, Megafuge 1.OR	Hettich, Tuttlingen Hernaesus Instruments GmbH, Osterode

Tabelle 3: Geräte

1xTAE-Puffer	40mM Tris-Acetat, 1mM EDTA, (pH 8,0)
Auftragspuffer für Gel (Blaupuffer)	0,25 % Bromphenolblau 0,25 % Xylen Cyanol FF 30 % Glycerol in Wasser
Hotstar-Puffer	Qiagen
Kernlysispuffer	10mM Tris-HCL 400mM NaCl 2 mM Na ₂ EDTA-Puffer pH ca. 8,2
Lysispuffer	155 mM NH ₄ CL 10mM KHCO ₃ 0,1mM EDTA (pH evtl. mit 15% HCL auf 7,4 einstellen)
PCR-Puffer mit MgCl ₂	500 mM KCl 100 mM Tris-HCl (pH 8,3) 0,25% Tween-20 0,25 mg/ml BSA 10 mM oder 15 mM MgCl ₂
PCR Puffer Goldstar	75 mM Tris-HCl 20 mM (NH ₄) ₂ SO ₄ 0.01% Tween-20

Tabelle 4: Puffer aus eigener Herstellung

SNP, MWG-Biotech AG, Ebersberg	Primersequenz	Produkt- größe
DYNLL1-SNP 10-F (rs1167705)	5'-GTC CAG GGT GAA GCT TCT TG-3'	151 bp
DYNLL1-SNP 10-R	5'-TGT CTC CTC AAG CCA GA-3'	
DYNLL1-SNP11-F (rs12857)	5'-CTT AGA TGC GCC ACG GTT T-3'	152 bp
DYNLL1-SNP 11-R	5'-GAA ATA AGG CAG CGA GGA CA-3'	
DYNLL1-SNP 12-F (rs3916065)	5'-CGC AGG AAC CAC ACA GAA G-3'	185 bp
DYNLL1-SNP 12-R	5'-GGC GTA GAA GCT TCC AGA AA-3'	
DYNLL1-SNP 13-F (rs787828)	5'-ATC GCC CTC TTC TGT GTA GC-3'	172 bp
DNYLL1-SNP 13-R	5'-TGG CAG ACT TGT AGG TGG AA-3'	
DYNLL1-SNP 18-F (rs580016)	5'-CGTTGGATGACGGTTTCGGTAGCG A CGGA-3'	100 bp
DYNLL1-SNP 18-R	5'-ACGTTGGATGTGGCCGACTGCAAC G GTCT-3'	
DYNLL1-SNP 19-F (rs9788155)	5'-ACGTTGGATGTGAAGCCCACAGGG AATTTG-3'	95 bp
DYNLL1-SNP 19-R	5'-ACGTTGGATGGACAGATCATCCGTT CTGAG-3'	

Tabelle 5: Oligonukleotide: Primersequenzen der SNPs

3.1.3 Allel-spezifische Primerextension und MALDI-ToF MS

10x Reaction Buffer C (500mM Tris-HCl, pH 9,5)	SOLIS BIODYNE, Tartu, Estonia
3-Hydroxypicolinic Acid (3-HPA)	Bruker Daltonik, Bremen
Ammonium acetate (für MALDI) 99%	Fluka Chemie GmbH, Buchs, Schweiz
Agarose low EEO	AppliChem, Darmstadt
1kb DNA Ladder, GeneRuler	MBI Fermentas, St. Leon-Rot

ddNTP (A,T,G,C) 20mM	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
Diammoniumhydrogencitrat (DAC), 98%	Sigma-Aldrich, Steinheim
DNA-Polymerase, Thermipol (5U/l)	Solis Biodyne, Tartu, Estonia
H ₂ O	Nanopure
iPlex-buffer10x	Sequenom, San Diego
iPlex terminatin mix	Sequenom, San Diego
iPlex Enzym	Sequenom, San Diego
MgCl ₂ , 25mM	Solis Biodyne, Tartu
Shrimp Alkalische Phosphatase (SAP) (1U/l)	USB, Cleveland-Ohio
SAP-Reaktionspuffer	USB, Cleveland-Ohio

Tabelle 6: Chemikalien und Sonstiges

Chip	Sequenom, San Diego
MALDI-ToF autoflex 1-Massenspektrometer	Bruker Daltonik, Bremen
PCR-Cycler, T1-Thermocycler	Biometra GmbH, Göttingen
Software: TYPER 3.4	Sequenom, San Diego
Tischzentrifuge Microspin FV-2400	BioSan, Riga, Lettland
Tischzentrifuge Galaxy	Mini Merck Eurolab, Saarbrücken

Tabelle 7: Geräte

3.2 Methoden

3.2.1 DNA-Extraktion

Jedem Probanden wurde Vollblut abgenommen. Die DNA wurde durch Mitarbeiter des Labors der Klinik für Psychiatrie und Psychotherapie der Universität Würzburg aus Leukozyten mittels Salzfällung nach einem Standardverfahren extrahiert (Miller et al., 1988). Danach erfolgte eine

photometrische Konzentrationsbestimmung bei einer Wellenlänge von 260 nm. Hierbei entspricht eine Konzentration von 50µg/ml doppelsträngiger DNA einer optischen Dichte (OD 260) von 1.

3.2.2 Polymerasekettenreaktion

Mittels PCR können selektiv DNA-Abschnitte amplifiziert werden. Der PCR-Prozess besteht aus 30-50 Zyklen, die jeweils aus 3 Schritten bestehen und in einem sog. Thermocycler durchgeführt werden. Denaturierung (*Melting*): Um die Wasserstoffbrückenbindungen der doppelsträngigen DNA aufzubrechen, muss das Gemisch auf 95°C erhitzt werden. Hierbei wird die DNA im ersten Zyklus länger erhitzt, um die vollständige Trennung der Ausgangs-DNA und der Primer sicherzustellen. Für die Primerhybridisierung (*Annealing*) wird die Temperatur nun auf eine primerspezifische *Annealing*-Temperatur abgesenkt. Diese muss exakt gewählt werden, da bei zu niedriger Temperatur eine Anlagerung an falscher Stelle und bei zu hoher Temperatur gar keine Anlagerung erfolgt. Bei der Elongation (Polymerisation) werden mit Hilfe der Taq-Polymerase aus *Thermus aquaticus* die fehlenden Stränge nun zwischen den Primern vom 3' Ende bei einer Temperatur von 72°C mit freien Nukleotiden aufgefüllt. Diese drei Schritte werden üblicherweise 30-50 Mal, in der vorliegenden Arbeit 35-mal wiederholt. Als Endergebnis einer PCR erhält man zumindest theoretisch nach n Zyklen 2^n doppelsträngige Moleküle, die Kopien der DNA-Sequenzen darstellen.

3.2.2.1 Komponenten der PCR-Ansätze und PCR-Bedingungen der verschiedenen Primer

Primer	rs1167705	rs12857	rs3916065	rs787828
15mM MgCl ₂	3,75µl		3,75µl	3,75µl
25mM MgCl ₂		1,2µl		
Goldstar Puffer 10x		3,75µl		
2,5 mM Nuk each	1,5µl	1,5µl	1,5µl	1,5µl
Primer R und F (pmol/µl)= 1:10-	1,05µl jeweils	1,05µl jeweils	2,2µl jeweils	1,05 jeweils

Verdünnung				
Template (ng/μl)	1,5μl	1,8μl	3,0μl	2,5μl
TAQ.Polymerase (U)	0,4μl	0,45μl	0,4μl	0,4μl
H ₂ O	28,25μl	28,25μl	24,45μl	27,25μl
Annealing- Temperatur	59,3°C	Td 61,9- 57,4°C	58°C	58,4°C
Zyklenanzahl	35	25	35	35

Tabelle 8: PCR-Ansatz und Bedingungen

Komponenten des PCR-Ansatzes und PCR-Bedingungen der verschiedenen Primer für einen Ansatz von 37,5μl

Rs580016 und rs9788155 wurden gemäß des Sequenom iPlex[®]-Protokolls mit Hilfe eines epMotion 7045-Pipettier-Roboters angefertigt. Es wurden jeweils zu 480μl Primer Mix (0,5μM), 156 μl 25 mM MgCl₂ Lösung, 300μl 10x Hotstar-Puffer 1,25, 48μl 25mM dNTP, 48μl Taq-Polymerase Hotstar 0,5U/rxn und 888μl H₂O hinzu gegeben.

3.2.2.2 Amplifizierung

rs1167705 (SNP 10), rs3916065 (SNP 12), und rs787828 (SNP 13) wurden unter den gleichen Bedingungen amplifiziert: Im Thermocycler erfolgte vor dem ersten Zyklus eine initiale Denaturierung bei 95 °C für 3 min, daraufhin 35 Zyklen mit folgenden Bedingungen: Denaturierung bei 95 °C für 45 s, die jeweiligen oben aufgeführten Primer-Annealing Temperaturen für 45 s, dann die Extension bei 72 °C für 45 s. Nach dem letzten Zyklus erfolgte abschließend eine finale Elongation bei 72 °C für 3 min.

Die Amplifikation von rs12857 (SNP 11) gestaltete sich etwas komplizierter. Nach Testung verschiedenster Bedingungen zeigte sich folgendes Protokoll als am erfolgreichsten: Nach der initialen Denaturierung bei 95 °C für 3 min folgte eine Denaturierung bei 95° für 45 s, daraufhin die Absenkung auf eine Annealingtemperatur von 61,9°C für 45 s und die Extension bei 72 °C für 45s. Diese drei Schritte a 45 s mussten neunmal wiederholt werden, und zwar

jeweils mit einer 0,5°C niedrigeren Annealingtemperatur (bis zu 57,4°C). Daraufhin folgten 25 Zyklen mit folgenden Bedingungen: Denaturierung bei 95°C für 45 s, dann 45 s bei 56,9°C Primer-Annealing Temperatur, daraufhin die Extension bei 72 °C für 45 s. Nach dem letzten Zyklus erfolgte abschließend eine finale Elongation bei 72 °C für 3 min.

Die Amplifikationen von rs580016 (SNP18) und rs9788155 (SNP19) wurden nach dem iPlex-Protokoll angefertigt. Es erfolgte vor dem ersten Zyklus eine initiale Denaturierung bei 94 °C für 15 min, daraufhin 44 Zyklen mit folgenden Bedingungen: Denaturierung bei 95 °C für 20 s, die Primer-Annealing Temperatur von 56°C für 30 s, dann die Extension bei 72 °C für 1 min. Nach dem letzten Zyklus erfolgte abschließend eine finale Elongation bei 72 °C für 3 min.

3.2.3 Gelelektrophorese

Zur Erfolgskontrolle der PCR, zur Kontrolle der Größe und zum Ausschluß einer Kontamination wird das Verfahren der Gelelektrophorese eingesetzt. Diese ist eine analytische Methode, um Moleküle entsprechend ihrer Größe und Ladung aufzutrennen. Dabei wandert die Mischung aus zu trennenden Molekülen unter dem Einfluss eines elektrischen Feldes durch ein Gel, in vorliegendem Fall durch ein Agarosegel, das in einer ionischen Pufferlösung liegt. Dabei bewegen sich negativ geladene Anionen in Richtung Anode und positiv geladene Kationen in Richtung Kathode. Zur Trennung von DNA eignen sich am besten großporige Gele wie Agarosegele.

3.2.4 Anfertigen von Agarose-Gelen, Auftrennung der DNA und Auswertung

Es wurden 2 %ige Agarosegele angefertigt. Dazu wurden 2g Agarose mit 100 ml 1x TAE Puffer durch Schwenken des Kolbens vermischt und anschließend im Mikrowellenherd unter intermittierendem Schwenken bis zur völligen Auflösung der Agarose erhitzt. Nach Abkühlung auf 60°C erfolgt eine Zugabe von 5µl wässriger 1%iger Ethidiumbromidlösung (Endkonzentration 1mg/l). Letzteres machte nach beendeter Gelelektrophorese unter UV- Belichtung mit

302 nm die Visualisierung des rot erscheinenden Ethidiumbromid-DNA-Komplexes sichtbar. Als Referenz diente eine 1kb DNA-Leiter.

Die DNA-haltigen Proben wurden vor Pipettierung in die 25 oder 50µl großen Geltaschen mit Blaupuffer in einem Verhältnis von 1/3 bis 1/5 versetzt, um durch Visualisierung der Lauffront den Gellauf besser verfolgen zu können. Direkt nach Auftragen der Proben wurde eine Spannung von 120 V an die Gelkammer angelegt, bis eine eindeutig vollständige Auftrennung erreicht war. Das Ergebnis der Gelelektrophorese wurde nach Beendigung unter UV-Belichtung betrachtet und mittels Chemie-Doc fotografiert.

3.2.5 Verdau mit Alkalischer Phosphatase für die iPLEX Reaktion

Um Reste von desoxy-Nukleotidtriphosphaten nach der PCR-Reaktion zu entfernen, wurden die Reaktionsprodukte mit Shrimp Alkalischer Phosphatase (SAP) verdaut. Dieses Enzym dephosphoryliert dNTPs. Je Probe wurden 10 x SAP-Buffer (0,17µl), außerdem 1,53µl H₂O und 0,30µl SAP (1U/µl) verwendet. Im Thermocycler erfolgte in 384 well Platten die Reaktion für 40 min bei 37°C und, um die SAP zu inaktivieren, zuletzt für 5 min bei 85°C.

3.2.6 iPLEX Reaktion (Single Base Extension Reaktion)

Für die auf den SAP-Verdau folgende Einzelbasenextension wurde ein iPLEX Reaktionsmix erstellt: 412µl Nanopure H₂O wurden mit jew. 109µl iPLEX Buffer Plus (10x) und iPLEX Termination Mix, außerdem 438µl Extension primer mix (mit steigender Konzentration und Masse) und 21,8µl iPLEX Enzym gemischt. Zu den gereinigten PCR Produkten wurden 2µl Mix pipettiert. Es erfolgten daraufhin folgende Schritte der Primer-Extensionreaktion im Thermocycler: Nach einer initialen Denaturierung für 30 s bei 94°C erfolgten 40 Zyklen mit jeweils 5 s bei 94°C, darauf folgten 5 s mit einer Annealingtemperatur von 52°C. Die Elongation, d.h. die Verlängerung des Primers um eine Base erfolgte bei 80°C. In jedem der 40 Zyklen wurde die 2 letzteren Schritte fünfmal wiederholt. Der letzte Schritt betrug 3 min bei 72°C.

3.2.7 Reinigung durch das Ionenaustauschharz

Mittels des folgenden Ansatzes wurden Salze aus dem Reaktionsgemisch entfernt, welche die MALDI-Analyse stören würden. In jeden Reaktionsansatz wurden 16 µl H₂O pipettiert. Daraufhin wurden 6 mg Ionenaustauschharz hinzugefügt, die Platten wurden verschlossen und 20 min gewendet. Als letzter Schritt folgte eine Zentrifugation (3000 rpm) von 5 min. Daraufhin wurden 25 nl des gereinigten iPlex Ansatzes mittels eines Nanodispensers auf einen SpectroChip[®] gespottet, daraufhin erfolgte die weitergehende Analyse mittels eines Bruker AutoFlex MALDI-ToF Massenspektrometers.

3.2.8 MALDI-ToF Massenspektrometer

Der MALDI (*Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation*)-Prozess ist eine schonende Methode zur Ionisierung von Biomolekülen, ohne dass diese dabei stark fragmentieren. Die Kokristallisation von Biomolekül und Matrix ist die Voraussetzung für den MALDI-Prozess. Im Hochvakuum (8×10^{-7} mbar) wird das Kristall einem kurzen Laserpuls ausgesetzt. Dadurch ionisiert der Analyt und geht in die Gasphase über. Die Masse des Moleküls wird bestimmt, indem die benötigte Zeit gemessen wird, die es für eine genau definierte Strecke zwischen Elektrode und Detektor benötigt. Die Messung findet in einem ca. 1 m langem Flugrohr statt, an dessen Ende sich der Detektor befindet.

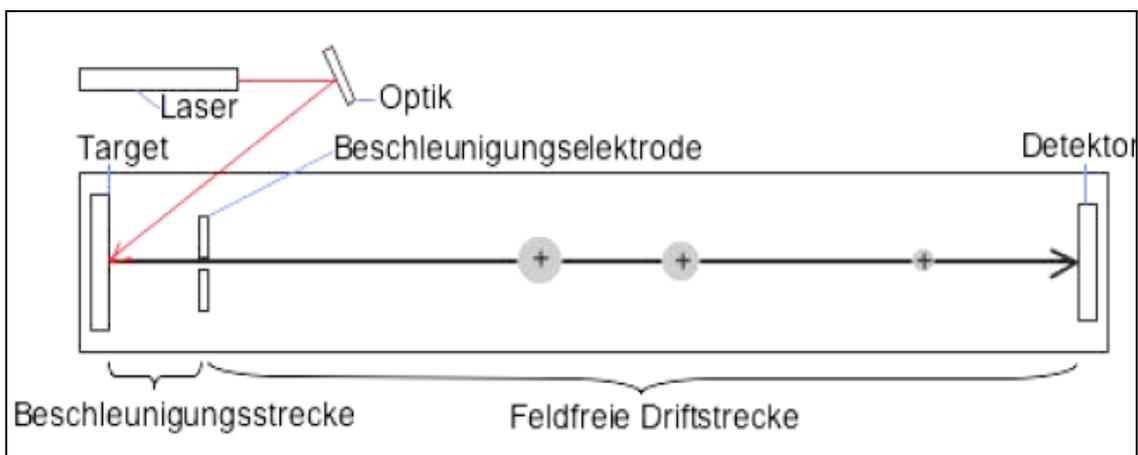


Abbildung 5: Aufbau eines ToF Massenanalysators (Althoff, 2005)

Aufgrund der Massendifferenz der verschiedenen Nukleotide unterscheiden sich auch die Amplifikate der Einzelbasenverlängerung je nach Allel in ihrer Masse. Aus den gemessenen Massen kann daher auf den vorliegenden Genotyp zurückgeschlossen werden. Diese Auswertung fand mit Hilfe der Software Typer 3.4 der Firma Sequenom (San Diego, CA, USA) statt.

3.2.9 Statistische Analyse und Haplotypanalyse

Die Einzelassoziation-Tests wurden in Form von Chi-Quadrat Tests mit SPSS 9,0 für Windows (SPSS Inc., Chicago, USA) durchgeführt. Das paarweise bestehende Kopplungsungleichgewicht (*Linkage disequilibrium*) zwischen den Polymorphismen wurde mit 2LD bestimmt (Zhang et al., 2004).

Mittels des Haploview Programms wurde bestimmt, ob sich die Frequenz der spezifischen Haplotypen bei Patienten signifikant von der der Kontrollen unterscheidet. Haploview führte darüber hinaus Permutationstests auf eine globale Assoziation der Haplotypen mittels zufälligen Zuweisens der Fall-Kontroll-Markierungen durch. Werden mit dieser Methode eine bestimmte Anzahl signifikantere p-Werte erhalten als in der Auswertung mit den „echten“ Markierungen, spricht dies dafür, dass es sich um Zufallsbefunde handelt; dies spiegelt sich dann in einem permutations-korrigierten p-Wert größer 0,05 wieder.

Für die vorliegende Studie wurden 10.000 Permutationen durchgeführt. Power-Kalkulationen wurden unter Gebrauch der GPOWER Software durchgeführt (Erdfelder, 1996).

4 Ergebnisse

Alle Genotypen befanden sich im Hardy-Weinberg-Equilibrium (nicht gezeigt). Eine Powerkalkulation mittels GPOWER zeigte, dass das SCZ-Sample ausreichte, um einen Effekt von 0,15 für die Genotypen und 0,10 für die Allele zu ermitteln, d.h. das Sample hatte eine ausreichende Größe, um auch kleinere Effekte gemäß der Cohenschen Konvention zu erkennen.

4.1 Assoziation von DYNLL1 mit schizophrenen Psychosen

4.1.1 Einzelmarker-Assoziationstest

In einer Fall-Kontrollstudie wurden sechs SNPs und die entsprechenden Haplotypen bei 246 Patienten, die an SCZ erkrankt sind, untersucht. Zum Vergleich wurden 284 gesunde Probanden in die Studie eingeschlossen (Tabelle 9 für Männer und Tabelle 10 für Frauen). Zuerst wurde nach einer möglichen Einzelmarker-Assoziation der sechs SNPs mit SCZ gesucht. Wie Tabelle 10 zeigt, war ein Marker (SNP 13, rs787828), allerdings nur bei Frauen, tendentiell mit der Krankheit assoziiert ist ($\chi^2= 4,8369$, $p=0,0891$). Für alle anderen Marker zeigte sich kein signifikantes Ergebnis.

Marker		SCZ: männlich	Kontrollen
rs1167705 (SNP 10)	G	16 (0,13)	24 (0,14)
	G/T	58 (0,46)	76 (0,44)
	T	51 (0,41)	71 (0,42)
	X ² =0,1516 P=0,9270		
rs12857 (SNP 11)	G	85 (0,71)	117 (0,75)
	G/T	30 (0,25)	33 (0,21)
	T	5 (0,04)	7 (0,04)
	X ² =0,6142 P=0,7356		
rs3916065 (SNP12)	G	8 (0,07)	11 (0,07)
	G/T	45 (0,42)	72 (0,44)
	T	55 (0,51)	79 (0,49)
	X ² =0,21114 P=0,8997		
rs787828 (SNP13)	A	44 (0,38)	68 (0,41)
	A/T	56 (0,48)	71 (0,44)
	T	17 (0,14)	24 (0,15)
	X ² =0,56778 P=0,7528		
rs580016 (SNP18)	A	80 (0,71)	116 (0,71)
	A/G	28 (0,25)	40 (0,25)
	G	5 (0,04)	7 (0,04)
	X ² =0,0054 P=0,9973		
rs9788155 (SNP19)	A	9 (0,07)	12 (0,07)
	A/G	57 (0,46)	69 (0,43)
	G	59 (0,47)	81 (0,5)

	X ² =0,2629 P=0,8768		
--	------------------------------------	--	--

Tabelle 9: Genotypfrequenzen SCZ: DYNLL1 und Männer (abs. n und %)

Marker		SCZ: weiblich	Kontrollen
rs1167705 (SNP 10)	G	12 (0,12)	22 (0,14)
	G/T	52 (0,52)	62 (0,38)
	T	36 (0,36)	78 (0,68)
	X ² =4,8944 P=0,0865		
rs12857 (SNP 11)	G	658 (0,66)	111 (0,73)
	G/T	30 (0,3)	40 (0,26)
	T	4 (0,04)	2 (0,01)
	X ² = 2,6691 P= 0,2633		
rs3916065 (SNP12)	G	4 (0,05)	16 (0,11)
	G/T	30 (0,36)	58 (0,38)
	T	50 (0,6)	77 (0,51)
	X ² = 2,9902 P=0,2242		
rs787828 (SNP13)	A	30 (0,32)	71 (0,46)
	A/T	49 (0,52)	62 (0,4)
	T	15 (0,16)	22 (0,14)
	X²= 4,8369 P=0,0891		
rs580016 (SNP18)	A	63 (0,7)	107 (0,69)
	A/G	22 (0,24)	45 (0,29)
	G	5 (0,06)	3 (0,02)
	X ² = 2,7311 P=0,2552		
rs9788155 (SNP19)	A	10 (0,1)	18 (0,11)
	A/G	32 (0,32)	60 (0,38)
	G	58 (0,58)	81 (0,51)
	X ² =1,2373 P=0,5387		

Tabelle 10: Genotypfrequenzen SCZ: DYNLL1 und Frauen (abs. n und %)

4.1.2 Haplotypen

Da sich die SNPs in signifikantem LD befanden, wurde im nächsten Schritt eine Haplotypanalyse durchgeführt, sowohl für die gesamte Stichprobe, als auch nach Geschlechtern getrennt. Mittels Haploview wurden geschätzte DYNLL1

Haplotyp-Frequenzunterschiede zwischen Kontrollen und Patienten ermittelt (siehe Abb. 6).

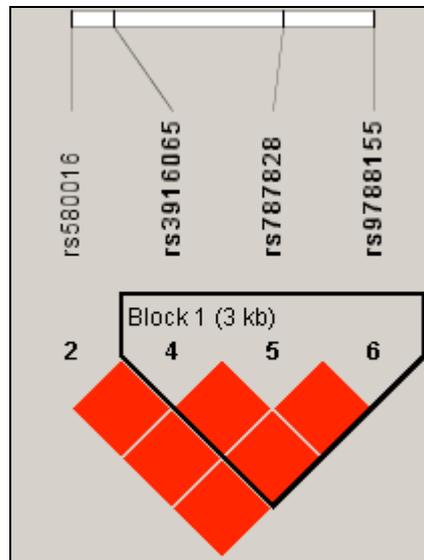


Abbildung 6: Haplotyp-Struktur des DYNLL1-Locus

Haplotyp-Struktur des DYNLL1-Locus berechnet mit der Solid Spine-Methode; die Berechnung erfolgte auf dem Boden der Ergebnisse von 246 SCZ Patienten und 284 Kontrollen.

Der Test auf eine globale Haplotyp-Assoziation mit SCZ ergab bei Frauen eine signifikante Assoziation des Haplotyps TTATAG mit SCZ ($\chi^2= 8,162$; $p= 0,0043$; vgl. Tabelle 13), was auch nach Permutation signifikant blieb ($p= 0,0268$; vgl. Tabelle 14). Die Frequenz dieses Haplotyps war mit 1% jedoch sehr niedrig. Alle anderen Haplotypen zeigten bezüglich SCZ keine Signifikanz. Im Folgenden werden tabellarisch die Frequenzen der Haplotypen, das Fall-Kontrollverhältnis, das jeweilige X^2 und der errechnete p - Wert zuerst im gemeinsamen Sample, dann jeweils Männer und Frauen getrennt aufgezeigt (siehe Tab. 11-13). In Tabelle 14 werden die Ergebnisse des Permutationstestes, kontrolliert für die Anzahl der Haplotypen, in Tabelle 15 die des Permutationstests, jedoch inklusive Einzelmarkern, ebenfalls kontrolliert, für die Anzahl der Haplotypen dargestellt.

Haplotyp	Frequenz	Fall- Kontroll Verhältnis	X ²	p- Wert
GGATTG	0,353	162,9: 283,1; 230,1: 435,6	0,447	0,5039
TGAGAA	0,291	121,7: 324,3; 201,4: 464,3	1,136	0,2865
TGATAG	0,181	75,8: 370,2; 125,1: 540,7	0,575	0,4484
TTGTAG	0,162	73,5: 372,4; 106,8: 558,9	0,038	0,8445

Tabelle 11: Haplotypen SCZ: Männer und Frauen

Haplotyp	Frequenz	Fall- Kontroll Verhältnis	X ²	p- Wert
GGATTG	0,361	89,9: 162,1; 123,9: 216,1	0,036	0,8495
TGAGAA	0,293	72,8: 179,2; 100,8: 239,2	0,038	0,8456
TGATAG	0,172	43,0: 209,0; 59,0: 281,0	0,0090	0,9229
TTGTAG	0,160	39,8: 212,2; 54,8: 285,2	0,012	0,912

Tabelle 12: Haplotypen SCZ: Männer

Haplotyp	Frequenz	Fall- Kontroll Verhältnis	X ²	p- Wert
GGATTG	0,342	75,8: 130,2; 105,9: 220,1	1,046	0,3064
TGAGAA	0,284	50,8: 155,2; 100,4: 225,6	2,334	0,1266
TGATAG	0,186	32,8: 173,2; 66,3: 269,7	1,627	0,2021
TTGTAG	0,159	32,7: 173,3; 51,8: 274,2	0,0	0,9988
TTATAG	0,010	5,4: 200,6; 0,1: 325,9	8,162	0,0043

Tabelle 13: Haplotypen SCZ: Frauen

Name	X ²	Permutations p-Wert
Block 1 : TTATAG	8,162	0,0166
Block 1 :TGAGAA	2,334	0,4270
Block 1 :TGATAG	1,627	0,5480
Block 1 :GGATTG	1,046	0,7689
Block 1 :TTGTAG	0,0	1,0000

Tabelle 14: Permutationstest, kontrolliert für die Anzahl der Haplotypen

Name	X ²	Permutations p-Wert
Block 1 : TTATAG	8,162	0,0268
rs787828	3,071	0,4101
rs3916065	2,81	0,4801
Block 1 :TGAGAA	2,334	0,5694
rs12857	2,044	0,6282
Block 1 :TGATAG	1,627	0,7151
rs1167705	1,523	0,7472
rs9788155	1,056	0,8730
Block 1 :GGATTG	1,046	0,8751
rs580016	0,142	0,9991
Block 1 :TTGTAG	0,0	1,0000

Tabelle 15: Permutationstest incl. Einzelmarkern, kontrolliert für die Anzahl der Haplotypen

4.2 Assoziation von DYNLL1 mit der bipolaren Störung

4.2.1 Einzelmarker-Assoziationstest

Auch hinsichtlich der bipolaren Störung wurde auf eine Einzelmarker-Assoziation der sechs DYNLL1-SNPs mit der Erkrankung getestet. Hier waren zwei Marker in der Gesamtstichprobe (also Männer und Frauen) signifikant mit der Erkrankung assoziiert: SNP 11 (rs12857) war hochsignifikant ($\chi^2= 10,55$; $p= 0,005$), SNP 18 (rs580016) gerade noch signifikant ($\chi^2=6,42$; $p=0,04$) (siehe Tab. 16). Im folgendem zeigt Tabelle 16 Genotypfrequenzen von Männern und Frauen, in Tabelle 17 und 18 sind die der Männer und Frauen dagegen getrennt dargestellt.

Marker		BPD gesamt	Kontrollen
rs1167705 (SNP 10)	G	5 (0,07)	46 (0,04)
	G/T	34 (0,47)	138 (0,41)
	T	34 (0,47)	149 (0,45)

	$X^2=2,7290$ $P=0,2555$		
rs12857 (SNP 11)	G	39 (0,54)	228 (0,74)
	G/T	30 (0,42)	73 (0,24)
	T	38 (0,04)	9 (0,03)
	$X^2=10,5508$ $P=0,0051$		
rs3916065 (SNP12)	G	5 (0,07)	27 (0,09)
	G/T	35 (0,49)	130 (0,42)
	T	31 (0,44)	156 (0,5)
	$X^2=1,4394$ $P=0,4869$		
rs787828 (SNP13)	A	35 (0,47)	139 (0,44)
	A/T	33 (0,45)	133 (0,42)
	T	6 (0,08)	46 (0,14)
	$X^2=2,1117$ $P=0,3479$		
rs580016 (SNP18)	A	40 (0,55)	223 (0,7)
	A/G	29 (0,4)	85 (0,27)
	G	4 (0,05)	10 (0,03)
	$X^2=6,4181$ $P=0,0404$		
rs9788155 (SNP19)	A	5 (0,07)	30 (0,09)
	A/G	35 (0,48)	129 (0,4)
	G	33 (0,45)	162 (0,51)
	$X^2=1,61$ $P=0,4471$		

Tabelle 16: Genotypfrequenzen BPD: DYNLL, Männer und Frauen (abs. n und %)

Marker		BPD männlich	Kontrollen
rs1167705 (SNP 10)	G	2 (0,1)	24 (0,14)
	G/T	6 (0,29)	76 (0,44)
	T	13 (0,62)	71 (0,42)
	X ² =3,1608 P=0,2059		
rs12857 (SNP 11)	G	11 (0,52)	117 (0,75)
	G/T	9 (0,43)	33 (0,21)
	T	1 (0,05)	7 (0,04)
Fishers Test:	P=0.0083 P= 0,798		
rs3916065 (SNP12)	G	2 (0,1)	11 (0,07)
	G/T	9 (0,43)	72 (0,44)
	T	10 (0,48)	79 (0,49)
	X ² =0,2112 P=0,8998		
rs787828 (SNP13)	A	13 (0,62)	68 (0,42)
	A/T	6 (0,29)	71 (0,44)
	T	2 (0,1)	24 (0,15)
	X ² =3,0799 P=0,2147		
rs580016 (SNP18)	A	10 (0,5)	116 (0,71)
	A/G	9 (0,45)	40 (0,25)
	G	1 (0,05)	7 (0,04)
	X ² =3,9644 P=0,1378		
rs9788155 (SNP19)	A	2 (0,1)	12 (0,07)
	A/G	9 (0,43)	69 (0,43)
	G	10 (0,48)	81 (0,5)
	X ² =0,1303		

	P=0,9369		
--	----------	--	--

Tabelle 17: Genotypfrequenzen BPD: DYNLL1 und Männer (abs. n und %)

Marker		BPD : weiblich	Kontrollen
rs1167705 (SNP 10)	G	3 (0,06)	22 (0,14)
	G/T	28 (0,54)	62 (0,38)
	T	21 (0,4)	78 (0,48)
	X ² =4,8391 P=0,0890		
rs12857 (SNP 11)	G	28 (0,55)	111 (0,73)
	G/T	21 (0,41)	40 (0,26)
	T	2 (0,04)	2 (0,01)
Fishers Test:	P=0.0031 Pr<= P=0,0327		
rs3916065 (SNP12)	G	3 (0,06)	16 (0,11)
	G/T	26 (0,52)	58 (0,38)
	T	21 (0,42)	77 (0,51)
	X ² =3,1223 P=0,02099		
rs787828 (SNP13)	A	22 (0,41)	71 (0,46)
	A/T	27 (0,51)	62 (0,40)
	T	4 (0,08)	22 (0,14)
	X ² =2,6642 P=0,2639		
rs580016 (SNP18)	A	30 (0,57)	107 (0,69)
	A/G	20 (0,38)	45 (0,29)
	G	3 (0,06)	3 (0,02)
Fishers Test:	P=0,0074 Pr<= P=0,1343		
rs9788155 (SNP19)	A	3 (0,06)	18 (0,11)
	A/G	26 (0,5)	60 (0,38)

	G	23 (0,4)	81 (0,51)
	X ² =3,0177, P=0,2212		

Tabelle 18: Genotypfrequenzen BPD: DYNLL1 und Frauen (abs. n und %)

4.2.2 Haplotypen

In der Haplotypanalyse zeigte sich in der Gesamtstichprobe eine Signifikanz für den Haplotyp TTGTAG ($\chi^2= 6,252$; $p=0,0124$), wobei jedoch nach Permutation nur noch eine tendentielle Assoziation zu beobachten war ($p=0,065$). Dieser Haplotyp hatte eine Frequenz von 17,6 %. Der assoziierte Einzelmarker SNP11 (rs12857) blieb auch nach Permutation signifikant assoziiert ($p=0,0179$) (siehe Tabelle 19-21). In Tabelle 19 und 21 werden die Frequenzen der Haplotypen, das Fall- Kontrollverhältnis, das jeweilige X² und der errechnete p-Wert im gemeinsamen Sample, dann im Frauensample aufgezeigt (auf entsprechende Berechnungen für Männer wurde aufgrund der geringen Fallzahl verzichtet). Es folgen in Tabelle 20 und 22 jeweils die Ergebnisse des Permutationstestes, kontrolliert für die Anzahl der Haplotypen incl. Einzelmarkern.

Haplotyp	Frequenz	Fall- Kontroll Verhältnis	X ²	p- Wert
GGATTG	0,339	46,0: 104,0; 231,0: 435,0	0,881	0,3478
TGAGAA	0,302	45,0: 105,0; 201,6:464,4	0,0040	0,9473
TGATAG	0,179	22,0: 128,0; 124,3: 541,7	1,33	0,2488
TTGTAG	0,176	37,0: 113,0; 106,8: 559,2	6,252	0,0124

Tabelle 19: Haplotypen BPD: Männer und Frauen

Name	X ²	Permutations p-Wert
rs12857	8,878	0,0171
Block 1: TTGTAG	6,252	0,0658
rs580016	4,846	0,1296
Block 1: TGATAG	1,33	0,7953

rs787828	1,315	0,8020
rs1167705	1,083	0,8399
Block 1:GGATTG	0,881	0,8770
rs3916065	0,292	0,9782
rs9788155	0,109	1,0000
Block 1:TGAGAA	0,0040	1,0000

Tabelle 20: Permutationstest (Männer und Frauen) kontrolliert für Einzelmarker und Haplotypen

Haplotyp	Frequenz	Fall- Kontroll Verhältnis	X ²	p- Wert
GGATTG	0,329	36,0: 72,0; 107,0: 219,0	0,01	0,922
TGAGAA	0,306	32,0: 76,0; 100,6: 225,4	0,059	0,8089
TGATAG	0,183	14,0: 94,0; 65,3: 260,7	2,71	0,0997
TTGTAG	0,179	26,0: 82,0; 51,9: 274,1	3,658	0,0558

Tabelle 21: Haplotypen BPD: Frauen

Name	X ²	Permutations p-Wert
rs12857	5,587	0,0920
Block 1: TTGTAG	3,658	0,2452
Block 1: TGATAG	2,71	0,3896
rs580016	2,304	0,5530
rs1167705	0,0	1,0000
rs3916065	0,172	1,0000
rs787828	0,049	1,0000
rs9788155	0,012	1,0000
Block 1:GGATTG	0,01	1,0000
Block 1:TGAGAA	0,059	1,0000

Tabelle 22: Permutationstest (Frauen) kontrolliert für die Anzahl der Einzelmarker und Haplotypen

5 Diskussion

5.1 Ziel der Arbeit

Die genetische Komponente der SCZ und der bipolaren Störung ist mit einer Heritabilität von bis zu 80% sehr hoch (Sullivan et al., 2003). So ist es zu einem der Ziele der biologisch ausgerichteten Psychiatrie geworden, die Pathophysiologie dieser Erkrankungen genauer zu erforschen, nicht zuletzt um die Entwicklung effektiverer und nebenwirkungsärmerer Medikamente zu unterstützen.

Das DYNLL1-Gen ist aufgrund seiner Funktion und Interaktion ein hochrelevantes Kandidatengen für BPD und SCZ. Zum einen ist die Funktion als Inhibitor von NOS-I und seine Beteiligung am postsynaptischen NMDA-Proteinkomplex, zum anderen ist auch die mögliche Interaktion mit NUDEL/DISC1 und KIBRA zu nennen. Auf SCZ bezogen, ist die Ähnlichkeit von DYNLL1 und KIF2 außerdem relevant (Triller et al., 1985; Triller et al., 1987; Prior et al., 1992; Bohlhalter et al., 1994; Jaffrey, 1996; Hemmens et al., 1998; Niethammer and Sheng, 1998; Rodriguez-Crespo et al., 2001; Navarro-Lerida et al., 2004; Li et al., 2006; Rayala et al., 2006). Diese Rationale wird durch die Lage des DYNLL1-Locus auf einem „Hot spot“ für SCZ und BPD weiter unterstützt (Ewald et al., 1998; Detera-Wadleigh et al., 1999; Morissette et al., 1999; Bailer et al., 2000; Degn et al., 2001; Bailer et al., 2002; Curtis et al., 2003; Maziade et al., 2005; Shink et al., 2005). Das Ziel der vorliegenden Arbeit bestand darin, in einer Fall-Kontroll-Studie Polymorphismen des DYNLL1-Gen bei an SCZ oder BPD Erkrankten aufzuzeigen. Es wurden mittels molekulargenetischer Methoden sechs SNPs und die entsprechenden Haplotypen bei 246 SCZ-Patienten und 90 BPD-Patienten untersucht. Zum Vergleich wurden die Ergebnisse von 284 gesunden Probanden herangezogen.

Um trotz der Heterogenität der Erkrankung ein relativ einheitliches Patientengut zu untersuchen, wurde darauf geachtet, eine ethnisch homogene Stichprobe zu rekrutieren, die engen Einschlusskriterien unterlag. Darüber hinaus wurden nur chronisch kranke Patienten eingeschlossen, um die Stichprobe noch enger zu

definieren. Während das SCZ-Sample eine ausreichende Power zur Detektion kleiner bis mittlerer Effekte aufwies, ist das BPD-Sample aufgrund der geringeren Größe allenfalls als prälaminiär zu betrachten. Diese Befunde müssen also noch an einem größeren Sample repliziert werden.

5.2 Ergebnisse der Arbeit

5.2.1 DYNLL1 und SCZ

5.2.1.1 Einzelmarkerassoziationen

Primär wurde in einer Fall-Kontrollstudie nach möglichen Einzelmarker-Assoziationen von sechs SNPs des DYNLL1-Genes aufgrund seiner Lage auf dem Locus 12q22-24, einem *Hot spot* für SCZ und die BPD gesucht. Es wurden die SNPs rs1167705 (SNP 10), rs12857 (SNP 11), rs3016065 (SNP 12), rs787828 (SNP 13), rs580016 (SNP 18), rs9788155 (SNP 19) bei 246 an SCZ leidenden Patienten und 284 gesunden Probanden untersucht. Im gesamten Sample ließ sich keine Assoziation finden. Bei geschlechts-differenzierter Betrachtung zeigte sich bei Männern keine signifikanten Befunde. Bei den weiblichen Patienten fand sich ein Marker rs787828 (SNP 13) tendentiell mit der Krankheit assoziiert ($p=0,0891$).

5.2.1.2 Haplotypassoziation

Im zweiten Schritt wurde eine Haplotypanalyse durchgeführt. Durch die Haplotypblockstruktur des menschlichen Genoms ist die Charakterisierung einzelner Haploblöcke durch SNPs möglich. Daraufhin können die Allele der anderen Polymorphismen, die mit diesen im Kopplungsungleichgewicht (Linkage Disequilibrium, LD) stehen, daraus abgeleitet werden. Durch das Phänomen des Kopplungsungleichgewichts ist es möglich, nur einige ausgewählte SNPs zu untersuchen. Alle sechs ausgewählten SNPs befanden sich in signifikantem LD. Die Haplotypanalyse wurde sowohl für die gesamte Stichprobe, als auch nach Geschlechtern getrennt durchgeführt. Mittels

Haploview wurden geschätzte PIN Haplotyp-Frequenzunterschiede zwischen Kontrollen und Patienten ermittelt.

Der Test für die globale Haplotypassoziation mit SCZ zeigte bei Frauen eine Signifikanz für den Haplotyp TTATAG. Allerdings war die Frequenz dieses Haplotyps mit 1% sehr selten. Alle anderen Haplotypen (Männer und gesamtes Kollektiv) zeigten bezüglich SCZ keine Signifikanz. Da solch seltene Haplotypen aufgrund der Störanfälligkeit hinsichtlich falsch-positiver Befunde meist gar nicht erst analysiert werden (die Grenze liegt im überwiegenden Fall bei 3%), sollte diesem Befund nicht allzu viel Gewicht beigemessen werden. Da dieser Haplotyp jedoch ausschließlich bei betroffenen Frauen gefunden wurde, ist es sinnvoll, genau diese Probandinnen zu re-sequenzieren, um eventuell eine Mutation, die mit diesem Haplotyp im LD ist, zu identifizieren. Bei den untersuchten SNPs handelte es sich ja schließlich um nicht funktionale, in Introns gelegene Polymorphismen, so dass nicht ausgeschlossen werden kann, dass es seltene, aber funktionale Varianten im DYNLL1-Gen gibt, die mit der Erkrankung in Verbindung stehen. Entsprechende Analysen werden derzeit durchgeführt, wobei bislang jedoch zumindest nach Resequenzierung der codierenden DYNLL1-Regionen bei den betreffenden Patienten keine Mutation identifiziert werden konnte (Reif, unpubliziert).

5.2.2 DYNLL1 und BPD

5.2.2.1 Einzelmarkerassoziationen

Oben genannte SNPs wurden ebenfalls bei einer kleineren Zahl an BPD leidender Patienten untersucht. In der Gesamtstichprobe waren zwei Marker signifikant mit BPD assoziiert (SNP 11, rs12857, $p=0,0051$; SNP 18, rs580016, $p=0,0404$).

5.2.2.2 Haplotypassoziation

Bezüglich der Haplotypanalyse waren in dem nach Geschlechtern getrenntem Sample keine Signifikanzen festzustellen. In der Gesamtstichprobe zeigte sich

jedoch eine signifikante Assoziation des Haplotyps TTGTAG, der eine Frequenz von 17,6% hatte, mit der bipolaren Erkrankung.

Aktuell handelt es sich hier natürlich vorerst um ein rein statistisches Ergebnis, das aufgrund der kleinen Stichprobengröße auch falsch-positiv sein kann. Erst die Replikation dieses Befundes und die Identifizierung einer biologisch funktionalen Variante im Hinblick auf Genexpression, Proteinfunktion und physiologische Parameter würde eine tatsächliche Beteiligung von DYNLL1 in der Pathophysiologie der bipolaren Störung unterstreichen. Jedoch kann es sein, dass diese, anders als bei den Hauptgeneffekten monogener Erkrankungen sehr subtil ausfallen, gerade weil es sich bei psychiatrischen Erkrankungen um komplexe genetische Krankheiten handelt.

5.3 Ein Hotspot für SCZ und BPD: Locus 12q22-24

In der vorliegenden Arbeit konnten sowohl Einzelmarkerassoziationen (rs787828 mit SCZ, rs1167705 und rs580016 dagegen mit BPD) als auch Assoziationen auf Haplotyp-Ebene (TTATAG mit Schizophrenie und TTGTAG mit der bipolaren Erkrankung) mit beiden Erkrankungen gefunden werden. Wichtig ist es, dieses Ergebnis in Zusammenschau mit anderen zu sehen. Unter anderem erfolgte die Untersuchung dieses Genes aufgrund seiner positionale Lage auf dem 12q22-24-Locus, einem *Hot spot* für beide Erkrankungen. Auch in vielen anderen Arbeitsgruppen stand dieser im Focus. So konnten Studien über die letzten Jahre konstant mit LOD-Scores von 2 bis 3 aufzeigen, dass dieser Locus mit SCZ gekoppelt ist. Mit LOD-Scores von über 6 lag die Kopplungsrate von BPD und Depressionen sogar noch höher. So ergab eine Linkage-Analyse von 110 Familien mit monopolarer Depression aus Utah zum Beispiel LOD-Score von 6,1 am NOS1-Lokus 12q22-23.2, wobei der hohe LOD-Score der Homogenität des Samples geschuldet sein mag (Ewald et al., 1998; Detera-Wadleigh et al., 1999; Morissette et al., 1999; Detera-Wadleigh et al., 1999; Bailer et al., 2000; Degn et al., 2001; Bailer et al., 2002; Akbevich et al., 2003; Curtis et al., 2003; Maziade et al., 2005; Shink et al., 2005). Nur 2 mb von dem DYNLL1-Gen entfernt, ebenfalls auf dem *Hot spot*, liegt der NOS1-Genlocus auf Chromosom 12q24.2.

Im Jahre 2005 war in einer Studie, die eine Assoziation von 64 Kandidatengenen mit BPD und SCZ untersuchte, in der variablen Region von NOS1 auf Einzelmarker- und Haplotypebene eine Assoziation mit beiden Erkrankungen gefunden worden. Ein Jahr später konnte in einer Studie, in der 195 chronische SCZ-Patienten und 72 Patienten mit BPD teilnahmen, eine Assoziation von NOS ex1c-SNP mit SCZ gezeigt werden. Dieser Polymorphismus war interessanterweise mit verminderter präfrontaler Aktivität assoziiert. In derselben Studie zeigte ein NOS1 ex1f-VNTR nicht nur eine Assoziation mit SCZ, sondern auch eine Modulation der Erkrankungsschwere. Diese beiden Befunde unterstreichen die Funktionalität dieser assoziierten Varianten auf Systemebene. Auch die Zwischenergebnisse einer kürzlich publizierten chinesischen Studie zeigten eine Assoziation der NOS1-Promoter-Region mit schizophrenen Psychosen. In einer genomweiten Kopplungsanalyse wurde darüber hinaus ein SNP im NOS1-Gen mit SCZ assoziiert gefunden. Auch ein anderer Marker, D12S366, der genauso wie DYNLL1 Locus sehr nah (nur 800 KB) an dem NOS1 Locus liegt, zeigte eine Assoziation mit SCZ (Detera-Wadleigh et al., 1999; Bailer et al., 2000; Bailer et al., 2002).

Das Gen, welches für *D-amino-acid oxidase* (DAAO) kodiert, befindet sich ebenfalls auf diesem Locus. DAAO ist ein Enzym, welches eine entscheidende Rolle im Metabolismus von D-Serin spielt, einem potenten Aktivator des glutamatergen NMDA-Rezeptors. Bereits 2002 konnte in einer französisch-kanadischen Studie eine Assoziation von 4 SNPs, welche sich alle auf dem Locus 12q24 befanden, mit SCZ aufgezeigt werden. In einer deutschen Studie mit 299 SCZ-Patienten und 300 Patienten mit BPD, zeigte sich ebenfalls eine Assoziation mit SCZ. Es folgten Studien mit chinesischen Patienten und Ashkenazi-Juden, als auch eine gemeinsame Studie mit Probanden aus den USA und Südafrika, welche ebenfalls zum gleichen Ergebnis kamen (Chumakov et al., 2002; Hall et al., 2004; Schumacher et al., 2004; Wang et al., 2004; Zou et al., 2005). Bezüglich BPD konnten 4 unabhängige Studien signifikante Assoziationen zwischen SNPs auf dem DAAO Locus aufzeigen (Hattori et al., 2003; Chen et al., 2004).

5.4 Integration von DYNLL1 in bestehende pathophysiologische Konzepte endogener Psychosen und bipolarer Störungen

Ob die in dieser Arbeit identifizierten assoziierten Varianten Auswirkungen auf Genexpression und Proteinfunktion haben, muss nachfolgend untersucht werden. Fakt ist, dass bereits in vielen Studien nachgewiesen werden konnte, dass das Protein DYNLL1 in für BPD und SCZ wichtige Signaltransduktions-Kaskaden involviert ist. So liegt es daher nahe, dass ein durch veränderte Genexpression verändertes DYNLL1 Protein in der Pathophysiologie der Erkrankungen eine Rolle spielen könnte. Es werden im Folgenden Ergebnisse anderer Arbeitgruppen aufgezeigt, die die Rolle des DYNLL1 Proteins in Signaltransduktions-Kaskaden unterstreichen.

5.4.1 Interaktion von DYNLL1 mit NOS-I und deren reduzierte Aktivität in verschiedenen Gehirnregionen

Obwohl die initial von Jaffrey und Snyder postulierte Spezifität und hohe Potenz von DYNLL1 hinsichtlich einer Hemmung von NOS-I nicht repliziert werden konnte, wurde eine prinzipielle Interaktion mit und Hemmung der NOS-I durch dieses Regulatorprotein nie angezweifelt (Jaffrey, 1996). Daher ist es interessant, den aktuellen Stand der Forschung bzgl. des Zusammenhanges zwischen NO, bzw. NO-Synthase, und DYNLL1 zu betrachten.

Die neuronale NO-Synthase (nNOS oder NOS-I) ist ein Enzym, das in mehr als 1% aller Neurone, aber auch in vielen anderen Geweben vorkommt (Snyder et al., 2000). Es katalysiert unter Verbrauch von O₂ und NADPH die Bildung von NO und L-Citrullin aus L-Arginin (AN Schmidt et al.1991). Die Aktivität wird durch die freie Calciumkonzentration und das Calcium bindende Protein Calmodulin reguliert (Schmidt et al., 1991; Stuehr et al., 1992; Abu-Soud et al., 1993). NO ist ein wichtiger pleiotroper Botenstoff. In der Pathophysiologie der SCZ spielt NO möglicherweise eine bedeutende Rolle. Relevant ist hierbei, dass sowohl eine Steigerung als auch eine Verminderung von NO-Spiegeln gezeigt wurde. Als Grund hierfür wird angenommen, dass bei ein und derselben Krankheitsentität in einer Region des Gehirnes eine gesteigerte, in einer anderen eine verminderte NO-Synthase vorkommt, ähnlich der dopaminergen

Hypo- und Hyperfunktion in jeweils verschiedenen Hirnbereichen (Bernstein et al., 2005).

Mehrere Regionen des Gehirnes, die in der Pathogenese der SCZ eine Rolle spielen, zeigten eine Malformation nitritinurer Neurone als auch eine veränderte NOS-I Aktivität. So wurde vor allem in den tiefen Schichten des frontalen und temporalen Kortex eine Malformationen nitritinurer Neurone bei SCZ-Patienten beschrieben (Akbarian et al., 1993; Akbarian et al., 1993; Akbarian et al., 1996). Mit den Resultaten von Akbarian et al. übereinstimmend, wurde eine reduzierte NOS- Aktivität im präfrontalen Kortex gefunden, obwohl die Menge an NOS-I und NOS-II Protein normal war (Xing et al., 2002). Interessanterweise konnte, wie oben schon beschrieben, eine Assoziation mit SCZ, sowohl mit einem Polymorphismus im NOS1-Exon 1c (G-84A), als auch mit einem NOS1 ex1f-VNTR festgestellt werden. Ersterer ging mit verminderter präfrontaler Aktivität einher, während die Existenz des zweiten Einfluß auf die Erkrankungsschwere hatte (Reif et al., 2006). Auch im rechten paraventriculären Nucleus des Hypothalamus konnte eine Reduktion der NOS I-immunreaktiven Neurone bei SCZ-Patienten gezeigt werden (Bernstein et al., 1999). In zwei post-mortem Untersuchungen konnte außerdem nachgewiesen werden, dass im Putamen von Erkrankten signifikant weniger NOS-positive Zellen vorhanden waren als bei Gesunden (Lauer et al., 2005; Fritzen et al., 2007). Dagegen konnte im Hirnstamm eine gesteigerte Anzahl NOS-I positiver Neurone, darüberhinaus im cerebellären Vermis erhöhte NOS-I Konzentrationen bei SCZ Patienten nachgewiesen werden. Anders verhielt es sich in der Molekularschicht des cerebellären Kortex, hier waren keine Auffälligkeiten nachzuweisen. (Doyle et al., 1995; Karson et al., 1996; Bernstein et al., 2001). Insgesamt geben diese histopathologischen Daten Hinweise für eine Störung des NO-Systems bei schizophrenen Patienten, welche mit einer abnormalen Hirnentwicklung in Zusammenhang zu stehen scheint.

5.4.1.1 NO als second messenger und Modulator monoaminerger Funktion und seine Funktion im striatalen System

Durch Interaktion mit NOS1 hat das DYNLL1 Protein Auswirkungen auf die Synthese des pleiotropen Botenstoffes. Zum einen fungiert NO als *second messenger* des NMDA Rezeptors. Die Hypofunktionalität des Glutamatsystems ist bei der SCZ wie auch bei bipolaren Störungen in mehreren Studien belegt worden, so dass nahe liegt, dass auch eine Unterfunktion des *second messengers* dabei eine Rolle spielen kann. Erst kürzlich konnten in einer Untersuchung von 64 Kandidatengenen in einer genetisch homogenen Population Assoziationen von schizophrenen Psychosen mit Genen des Glutamatsystems als auch mit NOS1 festgestellt werden. Diese Resultate unterstreichen die enge Interaktion der beiden Systeme und den potentiellen epistatischen Effekt (Fallin et al., 2005). Zum anderen wird vermutet, dass NO Einfluss auf das serotoninerge und dopaminerge System hat, indem es durch direkte chemische Interaktion mittels Nitrosylierung die Monoamintransporter 5HTT, NET und DAT hemmt, was die Konzentration der Monoamine im synaptischen Spalt erhöht, wobei es hier jedoch widersprüchliche Befunde gibt (Kiss et al., 2001). Belegt ist, dass eine erhöhte Dopaminaktivität eine Rolle in der Pathogenese der SCZ spielt. NO moduliert die Entladungsmuster dopaminerger striataler Neurone (West et al., 2000). Es wurde postuliert, dass NO durch Integration des Input aus dem präfrontalen Kortex und nigrostriatalem Dopaminsystem den striatalen Output reguliert. Durch tonisches und phasisches Feuern dopaminerger Neurone, welche durch NO moduliert werden, kommt es zur Feinabstimmung striataler Afferenzen (West et al., 2002). Gut zu aktuellen Konzepten der Pathogenese schizophrener Erkrankungen passend, führt eine nitrienerge Hypofunktion am ehesten zu einer Störung des tonischen Musters und somit zu einer Dysregulation des striatalem Outputs. Dies konnte bereits durch pharmakologische Studien gezeigt werden. NO schafft durch seine verschiedenen Funktionen eine Verbindung zwischen dem glutamatergen Input des präfrontalen Kortex, den es als *second messenger* beeinflusst, und dem nigrostriatalen System. Die modulierende Rolle von NO scheint davon abzuhängen, ob nitrienerge striatale Interneurone

sensorische Informationen des präfrontalen Kortex und Motoraktivität integrieren. Dieses ist zumindest bei einigen Formen der SCZ, die mit psychomotorischen Symptomen einhergehen, gestört (Stewart et al., 1994; West et al., 1997; West et al., 2000; Saka et al., 2002). Im Gegensatz hierzu ist bekannt, dass bei BPD erniedrigte Dopaminspiegel eine Rolle spielen.

Dass NOS-I eine Wirkung auf das Serotonin-System hat, konnten neben oben genannter noch andere Studien zeigen. Zum Beispiel fand man bei NOS-I Knockout-Mäusen sowohl einen beeinträchtigten Serotonin-Umsatz, desensibilisierte Serotonin-Rezeptoren als auch eine verminderte 5HTT-Expression in Neuronen (Chiavegatto et al., 2001).

5.4.1.2 Rolle von NO in der Entwicklung und Reifung des Gehirnes

NOS, beziehungsweise ihre unterschiedlichen Expressionsmuster und somit wahrscheinlich auch die beeinflussenden Proteine spielen eine Rolle in der Neuronenentwicklung und bei der Reifung des Gehirns (Downen et al., 1999; Contestabile, 2000). Im Striatum von Nagetieren wurden ab dem 18. embryonalen Entwicklungstag NOS positive Neurone gefunden, die in der 3. - 4. postnatalen Woche am zahlreichsten zu finden waren. Interessanterweise zeigten sich auch bei der pränatalen Exposition bekannter Risikofaktoren der SCZ, wie zum Beispiel dem Influenzavirus, ein signifikantes Absinken der NOS-Expression (Saka et al., 2002). Dass Veränderungen im NO-Metabolismus mit SCZ-ähnlichen Symptomen vergesellschaftet sind, konnte außerdem auch durch mehrere pharmakologische Studien an Tiermodellen bestätigt werden (Garthwaite et al., 1989; Black et al., 1999; Harkin et al., 1999; Karolewicz et al., 1999; Bujas-Bobanovic et al., 2000; da Silva et al., 2000; Yildiz et al., 2000; Bird et al., 2001; Klamer et al., 2001).

5.4.2 Interaktion von DYNLL1 mit NMDA- Rezeptoren

Die Interaktion von DYNLL1 mit dem GKAP-PSD 95 Protein-Komplex, der für die Funktionalität des NMDA Rezeptors von großer Bedeutung ist, wird im folgendem hervorgehoben. Dies ist deshalb so interessant, da bei einigen

Erkrankungen des schizophrenen Formenkreises, wie auch bei bipolaren Störungen, die glutamaterge Unterfunktion eine Rolle spielt.

Für die Funktion des NMDA-Rezeptors sind verschiedene Protein-Interaktionen von Bedeutung. Wichtig ist unter anderem die Bindung mit dem GKAP-PSD 95 Protein-Komplex. GKAP (Guanylatkinase-domain-assoziiertes Protein) bindet mit einem zentralen Segment an PSD-95 (postsynaptic density Protein 95). Dieses gehört zu der Gruppe von Proteinen, die einen Gerüstkomplex bilden, der für die Austausch- und Signalfunktion der NMDA-Rezeptoren von großer Bedeutung ist. DYNLL1 interagiert mit eben diesem Komplex. So bindet, von dem Adapterprotein CAPON vermittelt, auch NOS-I via seiner PSD95 Domäne an den NMDA-Rezeptor (Kornau et al., 1995; Niethammer et al., 1998). Verschiedenste Studien zeigten auf, dass Veränderungen von Proteinen, die in dieser Interaktion involviert sind, signifikant mit endogenen Psychosen und bipolaren Störungen assoziiert sind. Dass die PSD-95 Expression bei Patienten mit SCZ und bipolaren Störungen vermindert ist, konnte mehrfach nachgewiesen werden (Ohnuma et al., 2000; Clinton et al., 2004; Kristiansen et al., 2005). Interessanterweise bindet GKAP auch direkt an NOS-I, so dass sich ein PSD95-GKAP-NOS-I Komplex, der physikalisch und funktionell mit dem NMDA-Rezeptor verknüpft ist, bildet (Haraguchi et al., 2000). Das oben erwähnte Bindungsprotein CAPON (carboxy-terminal PDZ ligand of neuronal NO Synthase) war in zwei unabhängigen Linkageanalysen mit SCZ assoziiert (Brzustowicz et al., 2004; Zheng et al., 2005). Eine neue Isoform von CAPON konnte interessanterweise in Gehirnen sowohl von Patienten mit SCZ, als auch von Patienten mit BPD gefunden werden (Xu et al., 2005).

Interessant ist, dass in post-mortem Studien im Thalamus und Hippocampus schizophrener Patienten nicht nur die Expression der NMDA-Rezeptoruntereinheiten NR1 und NR2c erhöht war, sondern auch zusammen mit anderen PSD-Proteinen PSD-95 vermindert exprimiert wurde (Meador-Woodruff et al., 2003). Auch interagiert DYNLL1 direkt mit zwei unterschiedlichen NMDA-Rezeptoren: NMDAR-L und NMDAR NR3A2, wobei aber Näheres über diese Interaktion noch nicht bekannt ist (Navarro-Lerida et al., 2004).

5.4.3 DYNLL1 und seine Interaktion mit Gephyrin

Darüberhinaus interagiert DYNLL1 mit Gephyrin, ein Protein, das durch synaptische Lokalisation von Glycin- und GABA-Rezeptoren Auswirkungen auf das Glutamatsystem hat. Gephyrin ist ein Gerüst-Protein, das unter anderem an der postsynaptischen Membran inhibitorischer Synapsen gefunden wurde (Triller et al., 1985; Triller et al., 1987; Prior et al., 1992; Bohlhalter et al., 1994). Hier bindet es direkt an die cytoplasmatische Schleife der Beta-Untereinheit des Glycin-Rezeptors (McGrath et al., 1995). Auch mit der GABA-A Rezeptor-Untereinheiten interagiert es indirekt. GABA als Vorläufer von Glutamat spielt eine wichtige Rolle in der Pathophysiologie beider Erkrankungen.

In Versuchen mit Knock-out Mäusen und Zellkulturen konnte man aufzeigen, dass Gephyrin für die synaptische Lokalisation von Glycin- und GABA-Rezeptoren essentiell ist (Kirsch et al., 1993; Essrich et al., 1998). Gephyrin als submembranöses Gerüst immobilisiert inhibitorische Neurotransmitterrezeptoren an der postsynaptischen Membran (Kneussel et al., 2000; Meier et al., 2001). Hierbei ist die Interaktion mit den leichten Dynein Ketten 1 und 2, die zwischen den Aminosäuren 181 und 243 an Gephyrin binden, notwendig (Fuhrmann et al., 2002). Da Glycin eine Funktion als Co-Agonist am NMDA-Rezeptor hat, und außerdem Einfluss auf den Transmittertransport von GABA, einem Vorläufer von Glutamat hat, könnten Funktionseinschränkungen Auswirkung auf den bei BPD und SCZ gestörten Glutamatstoffwechsel haben Dies könnte unter anderem durch Veränderungen von DYNLL1 aufgrund seiner Interaktion mit Gephyrin bedingt sein (Javitt, 2002).

5.4.4 DYNLL1 und seine Rolle im Signalweg des LIS1-Proteins

In Zusammenhang mit SCZ ist außerdem zu erwähnen, dass DYNLL1 möglicherweise eine Rolle im Signalweg des LIS1-Proteins (Lissenzephaliegen 1) spielt. Dieses wird vorwiegend in fetalem und adultem Gehirn exprimiert, wo es mit Tubulin interagiert, um die Dynamik der Mikrotubuli zu beeinflussen. Bei einer Deletion bzw. Mutation des LIS1-Genes kommt es zur Lissencephalie,

welche charakteristischerweise unter anderem mit einem verdickten (10-20 mm) Kortex einhergeht (Pilz et al., 1998; Dobyms et al., 1999; Ross et al., 2001). Interessant ist, dass bei schizophrenen Erkrankungen ähnliche Veränderungen im Kortex gefunden wurden (Ozeki et al., 2003). Auch ist zumindest bei manchen Formen der SCZ eine Migrationsstörung in der Entwicklung der Neurone an der Entstehung der Krankheit beteiligt. Ähnlich wie DYNLL1 ist LIS1 auch ein hochkonserviertes Protein (Xiang et al., 1995).

Die Kaskade, die bei fast allen Formen der Lissencephalie durchbrochen ist, beinhaltet unter anderem NUDE (nuclear distribution element) bzw. NUDEL (*Nude like*, das humane Pendant), dessen N - Terminal mit cytoplasmatischem Dynein , also möglicherweise auch mit DYNLL1, interagiert (Efimov et al., 2000; Feng et al., 2000; Kitagawa et al., 2000; Sasaki et al., 2000; Hoffmann et al., 2001; Sweeney et al., 2001; Coquelle et al., 2002; Tai et al., 2002).

Auch die Funktion von NUDEL in der Reelin-Signalkaskade könnte durch ein funktionsgestörtes DYNLL1 dysfunktional sein. Eine Mutation im Reelin-Gen der Maus führt durch die nicht mehr funktionierende Signalkaskade, der auch NUDEL angehört, zu einer abnormen kortikalen Entwicklung. Interessanterweise haben erst kürzlich Forschungsgruppen eine Abnahme der Expression von Reelin im Gehirn von SCZ-Patienten entdeckt (Guidotti et al., 2000; Hong et al., 2000; Fatemi et al., 2001; Rice et al., 2001; Ross et al., 2001).

5.4.5 Interaktion von NUDEL, und damit DYNLL1 und DISC1

DYNLL1 interagiert interessanterweise evtl. auch mit dem Produkt des DISC-1 Genes (*Disrupted-in-Schizophrenia-Gen*). DISC1 wurde durch eine Studie in einer schottischen Familie als Risikofaktor für SCZ entdeckt. Bei dieser Familie konnte eine balancierte Translokation (1;11)(q42.1;q14.3) gefunden werden, die mit SCZ co-segregierte (Millar et al., 2000; Blackwood et al., 2001). In der Folge zeigten mehrere Assoziationsstudien, dass DISC1 auch bei nicht dieser Familie angehörigen SCZ-Patienten eine Rolle spielt (Hodgkinson et al., 2004; Harrison et al., 2005). DISC1 hat eine Schlüsselposition im Mikrotubuli basierten Dynein Motor-Komplex, der (neben LIS1 und NUDEL) Dynein und Dynactin enthält,

inne. DISC1 steigert die Funktion dieses Komplexes, indem es ihn an den Centrosomen akkumuliert und stabilisiert. Dieses ist wichtig für Organisation und Dynamik der Mikrotubuli. Eine verminderte Funktion von DISC1 resultiert in einer Dissoziation des Komplexes von den Centrosomen, was dazu führt, dass das Neuronenwachstum *in vitro* und die neuronale Migration *in vivo* vermindert ist (Ozeki et al., 2003; Hayashi et al., 2005; Kamiya et al., 2005)(Kamiya et al., 2005).

Normalerweise binden NUDEL und das DISC1-Protein aneinander, um die Entwicklung von Neuronen zu regulieren. Auch können sie einen Komplex mit LIS-1 bilden, dessen Funktion jedoch nicht ganz geklärt ist (Brandon et al., 2004). Das durch Mutation veränderte DISC1 Protein ist jedoch nur noch zu einer mangelhaften Bindung an NUDEL fähig, was zu einer kompetitiven Hemmung der NUDEL-Oligopeptidase führt (Ozeki et al., 2003; Hayashi et al., 2005). Dies führt zu einem veränderten Wachstum der Neurone. Da Dynein und somit wahrscheinlich DYNLL1 ebenfalls eine wichtige Funktion in diesem Motorkomplex spielen, liegt es nahe, dass auch Mutationen im DYNLL1-Gen zu einer mangelhaften Funktion des Komplexes führen müssten. Interessanterweise konnte in Zwillingsstudien aufgezeigt werden, dass LIS1 und DISC1, über die Interaktionsproteine ATF4 und ATF5, in der Pathophysiologie der BPD ebenfalls eine Rolle spielen. Auch konnte erst kürzlich eine Assoziation mehrerer SNPs mit bipolaren Störungen gefunden werden (Kakiuchi et al., 2007; Hennah et al., 2008).

5.4.6 Assoziation von Kinesin KIF 2 mit SCZ

Bemerkenswert ist darüber hinaus, dass DYNLL1 in Struktur und Funktion Ähnlichkeiten mit Kinesin zeigt. Genauso wie Dynein ist auch Kinesin ein Mikrotubuli assoziiertes Motorprotein, beide haben den Transport von Protein entlang der Mikrotubuli zur Aufgabe. Interessanterweise wurde eine signifikante Assoziation von Veränderungen im Gen, das für Kinesin KIF2 kodiert, mit SCZ festgestellt (Li et al., 2006).

5.4.7 Interaktion von DYNLL1 mit KIBRA

Im Zuge einer Studie über Coaktivatoren von DYNLL1, allerdings in Mammacarcinomzellen, konnte eine Interaktion von DYNLL1 mit dem Protein KIBRA (*kidney brain*) nachgewiesen werden (Rayala et al., 2006).

Ein genomweites Screening auf für Merkfähigkeit und Gedächtnis relevante Genvarianten identifizierte KIBRA als Kandidatengen für Gedächtnisleistung. Das resultierende Protein KIBRA ist kürzlich als Bindungspartner der humanen Isoform von Dendrin identifiziert worden, einem vermeintlichen Modulator der synaptischen Plastizität. In einer Studie konnte bei Probanden mit einer Substitution von T durch C in einem Intron des für KIBRA kodierenden Genes ein signifikant besseres Ergebnis in Tests des episodischen Gedächtnis nachgewiesen werden. Darüber hinaus zeigte eine Genexpressionsstudie, dass KIBRA in allen für das Gedächtnis wichtigen Regionen, inklusive des Hippocampus und des Temporallappens, stark exprimiert ist. Im Hippocampus zeigten sich im funktionellen MRT auch allelabhängige Unterschiede der Aktivierung, nämlich eine erhöhte Aktivierung bei nicht T-Allelträgern. Die Ergebnisse dieser Studie lassen also auf eine Rolle von KIBRA in bezug auf Gedächtnis und Merkfähigkeit schließen (Papassotiropoulos et al., 2006). In Zusammenschau dieser Ergebnisse liegt auf der Hand, dass eine Veränderung des DYNLL1 Proteins durch fehlerhafte Genexpression durchaus eine Rolle in der Pathophysiologie von SCZ und BPD spielen könnte.

5.5 Zusammenfassung

Mit einer Lebenszeitprävalenz von 1 % und aufgrund der Ersterkrankung in der frühen Adoleszenzperiode verursachen Schizophrenien und bipolare Störungen großes individuelles Leid. In der Altersgruppe vom 15. bis zum 44. Lebensjahr liegen Schizophrenien auf Rang 3 hinsichtlich der durch Behinderung beeinträchtigten Lebensjahre (years of life lived with disability). Sowohl BPD als auch SCZ sind lebenslang andauernde Erkrankungen. Ein Ziel der biologisch orientierten Psychiatrie ist es daher, bessere Kenntnisse über Genese und Pathophysiologie dieser beiden großen psychiatrischen Erkrankungen zu

gewinnen. Diese Erkenntnisse könnten dann zur Entwicklung besserer und nebenwirkungsärmerer Medikamente angewendet werden.

Die genetische Komponente schizophrener Erkrankungen und bipolarer Störungen liegt mit einer Heritabilität von bis zu 80 % im Vergleich zum Anteil von Umweltfaktoren sehr hoch (Sullivan et al., 2003). Allerdings scheinen aber auch Gen-Umwelt-Interaktionen, die bis jetzt kaum untersucht wurden, wie auch Gen-Gen-Interaktionen, deren einzelne Varianten jeweils nur geringe bis mittlere individuelle Beiträge liefern, eine Rolle zu spielen. Sind diese Gene Teil bestimmter Signal-Transduktionskaskaden bzw. morphoregulatorischer Netzwerke so können sich Effekte genetischer Variationen summieren bzw. potenzieren (Epistasie) (Fanous et al., 2005). So liegt es nahe, bestimmte Kandidatengene und deren Varianten genauer zu untersuchen.

Aufgrund seiner Lage auf dem Locus 12q22-24, einem *Hot spot* für SCZ und BPD, stellt DYNLL1 ein interessantes positionales Kandidatengen dar. Doch auch durch seine Funktion als Inhibitor von NOS-I, seiner Beteiligung am postsynaptischen NMDA-Proteinkomplex, einer möglichen Interaktion mit NUDEL/DISC1, seiner Ähnlichkeit zu KIF2 und nicht zuletzt wegen der Interaktion mit KIBRA ist DYNLL1 ein relevantes funktionelles Kandidatengen für Psychosen.

In einer Fall-Kontrollstudie wurden daher sechs SNPs und deren entsprechenden Haplotypen bei 284 Kontrollen, 246 Patienten, die an einer SCZ und 90 Patienten, die an einer BPD litten analysiert, um eine Assoziation dieses Gens mit den entsprechenden Phänotypen zu untersuchen.

Es zeigt sich eine tendentielle Assoziation des Markers rs787828 im DYNLL1-Gen mit der SCZ, darüber hinaus eine signifikante Assoziation eines Haplotyps (TTATAG) mit dieser Erkrankung. Da dieser Haplotyp mit einer Frequenz von 1% selten ist, ist die Bedeutung dieses Befundes allerdings noch unklar. Bei der bipolaren Störung waren dagegen sowohl zwei Polymorphismen (rs1167705 und rs580016) als auch ein Haplotyp (TTGTAG) signifikant mit der Erkrankung assoziiert. Aufgrund der kleineren Stichprobengröße ist es jedoch wichtig, diesen Befund nochmals zu replizieren, um falsch positive Befunde auszuschließen.

Um die Bedeutung von DYNLL1 in der Pathophysiologie der SCZ und der bipolaren Störung weiter aufzuklären, müssen die assoziierten Varianten bezüglich möglicher Auswirkungen auf Genexpression, Proteinfunktion und physiologische Parametern hin untersucht werden. Jedoch kann es aufgrund der Komplexität der beiden Erkrankungen sein, dass solche molekularen Konsequenzen – anders als bei den Hauptgeneffekten monogener Erkrankungen – sehr subtil ausfallen. Bei diesen komplexen Erkrankungen ist zu erwähnen, dass auch den bereits identifizierten Genvarianten keine kausale, sondern nur eine dispositionelle, das Erkrankungsrisiko modulierende Bedeutung zuzuschreiben ist.

6 Literatur

- Abu-Soud HM, Stuehr DJ. 1993. Nitric oxide synthases reveal a role for calmodulin in controlling electron transfer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:10769-10772.
- Akbarian S, Bunney WE, Jr., Potkin SG, Wigal SB, Hagman JO, Sandman CA, Jones EG. 1993. Altered distribution of nicotinamide-adenine dinucleotide phosphate-diaphorase cells in frontal lobe of schizophrenics implies disturbances of cortical development. *Arch Gen Psychiatry* 50:169-177.
- Akbarian S, Sucher NJ, Bradley D, Tafazzoli A, Trinh D, Hetrick WP, Potkin SG, Sandman CA, Bunney WE, Jr., Jones EG. 1996. Selective alterations in gene expression for NMDA receptor subunits in prefrontal cortex of schizophrenics. *J Neurosci* 16:19-30.
- Akbarian S, Vinuela A, Kim JJ, Potkin SG, Bunney WE, Jr., Jones EG. 1993. Distorted distribution of nicotinamide-adenine dinucleotide phosphate-diaphorase neurons in temporal lobe of schizophrenics implies anomalous cortical development. *Arch Gen Psychiatry* 50:178-187.
- Althoff VZ, M.;. 2005. Genotypisierung von SNPs im humanen FZD3-Gen in einem Kollektiv von Schizophrenie-Patienten.
- Averbukh ML, Kas'ko AF, Nikolenko ES, Rybas, II. 1966. [On the diagnostic significance of Black's reaction in psychiatric patients]. *Lab Delo* 5:289-291.
- Bailer U, Leisch F, Meszaros K, Lenzinger E, Willinger U, Strobl R, Gebhardt C, Gerhard E, Fuchs K, Sieghart W, Kasper S, Hornik K, Aschauer HN. 2000. Genome scan for susceptibility loci for schizophrenia. *Neuropsychobiology* 42:175-182.
- Bailer U, Leisch F, Meszaros K, Lenzinger E, Willinger U, Strobl R, Heiden A, Gebhardt C, Doge E, Fuchs K, Sieghart W, Kasper S, Hornik K, Aschauer HN. 2002. Genome scan for susceptibility loci for schizophrenia and bipolar disorder. *Biol Psychiatry* 52:40-52.
- Becker A, Grecksch G. 2004. Ketamine-induced changes in rat behaviour: a possible animal model of schizophrenia. Test of predictive validity. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 28:1267-1277.
- Beckmann H, Jakob H. 1994. [Prenatal developmental disorders of brain structures in schizophrenic psychoses]. *Nervenarzt* 65:454-463.
- Bernstein HG, Bogerts B, Keilhoff G. 2005. The many faces of nitric oxide in schizophrenia. A review. *Schizophr Res* 78:69-86.
- Bernstein HG, Grecksch G, Becker A, Hollt V, Bogerts B. 1999. Cellular changes in rat brain areas associated with neonatal hippocampal damage. *Neuroreport* 10:2307-2311.
- Bernstein HG, Krell D, Braunewell KH, Baumann B, Gundelfinger ED, Diekmann S, Danos P, Bogerts B. 2001. Increased number of nitric oxide synthase immunoreactive Purkinje cells and dentate nucleus neurons in schizophrenia. *J Neurocytol* 30:661-670.
- Berrettini W. 2002. Review of bipolar molecular linkage and association studies. *Curr Psychiatry Rep* 4:124-129.

- Berrettini WH. 2000. Genetics of psychiatric disease. *Annu Rev Med* 51:465-479.
- Berrettini WH, Ferraro TN, Goldin LR, Detera-Wadleigh SD, Choi H, Muniec D, Guroff JJ, Kazuba DM, Nurnberger JI, Jr., Hsieh WT, Hoehe MR, Gershon ES. 1997. A linkage study of bipolar illness. *Arch Gen Psychiatry* 54:27-35.
- Berrettini WH, Ferraro TN, Goldin LR, Weeks DE, Detera-Wadleigh S, Nurnberger JI, Jr., Gershon ES. 1994. Chromosome 18 DNA markers and manic-depressive illness: evidence for a susceptibility gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:5918-5921.
- Bilder RM, Wu H, Bogerts B, Degreef G, Ashtari M, Alvir JM, Snyder PJ, Lieberman JA. 1994. Absence of regional hemispheric volume asymmetries in first-episode schizophrenia. *Am J Psychiatry* 151:1437-1447.
- Bird DC, Bujas-Bobanovic M, Robertson HA, Dursun SM. 2001. Lack of phencyclidine-induced effects in mice with reduced neuronal nitric oxide synthase. *Psychopharmacology (Berl)* 155:299-309.
- Bird ED, Spokes EG, Barnes J, Mackay AV, Iversen LL, Shepherd M. 1978. Glutamic-acid decarboxylase in schizophrenia. *Lancet* 1:156.
- Black MD, Selk DE, Hitchcock JM, Wettstein JG, Sorensen SM. 1999. On the effect of neonatal nitric oxide synthase inhibition in rats: a potential neurodevelopmental model of schizophrenia. *Neuropharmacology* 38:1299-1306.
- Blackwood DH, Fordyce A, Walker MT, St Clair DM, Porteous DJ, Muir WJ. 2001. Schizophrenia and affective disorders-- cosegregation with a translocation at chromosome 1q42 that directly disrupts brain-expressed genes: clinical and P300 findings in a family. *Am J Hum Genet* 69:428-433.
- Bleuler E. 1911. Dementia praecox oder Gruppe der Schizophrenien. *Handbuch der Psychiatrie*, Leipzig, Wien, Aschaffenburg G. spezielle Teil 4:1-140.
- Blouin JL, Dombroski BA, Nath SK, Lasseter VK, Wolyniec PS, Nestadt G, Thornquist M, Ullrich G, McGrath J, Kasch L, Lamacz M, Thomas MG, Gehrig C, Radhakrishna U, Snyder SE, Balk KG, Neufeld K, Swartz KL, DeMarchi N, Papadimitriou GN, Dikeos DG, Stefanis CN, Chakravarti A, Childs B, Housman DE, Kazazian HH, Antonarakis S, Pulver AE. 1998. Schizophrenia susceptibility loci on chromosomes 13q32 and 8p21. *Nat Genet* 20:70-73.
- Bohlhalter S, Mohler H, Fritschy JM. 1994. Inhibitory neurotransmission in rat spinal cord: co-localization of glycine- and GABA_A-receptors at GABAergic synaptic contacts demonstrated by triple immunofluorescence staining. *Brain Res* 642:59-69.
- Brambilla P, Perez J, Barale F, Schettini G, Soares JC. 2003. GABAergic dysfunction in mood disorders. *Mol Psychiatry* 8:721-737, 715.
- Brandon NJ, Handford EJ, Schurov I, Rain JC, Pelling M, Duran-Jimeniz B, Camargo LM, Oliver KR, Beher D, Shearman MS, Whiting PJ. 2004. Disrupted in Schizophrenia 1 and Nudel form a neurodevelopmentally regulated protein complex: implications for schizophrenia and other major neurological disorders. *Mol Cell Neurosci* 25:42-55.

- Brzustowicz LM, Hodgkinson KA, Chow EW, Honer WG, Bassett AS. 2000. Location of a major susceptibility locus for familial schizophrenia on chromosome 1q21-q22. *Science* 288:678-682.
- Brzustowicz LM, Simone J, Mohseni P, Hayter JE, Hodgkinson KA, Chow EW, Bassett AS. 2004. Linkage Disequilibrium Mapping of Schizophrenia Susceptibility to the CAPON Region of Chromosome 1q22. *Am J Hum Genet* 74:1057-1063.
- Bujas-Bobanovic M, Bird DC, Robertson HA, Dursun SM. 2000. Blockade of phencyclidine-induced effects by a nitric oxide donor. *Br J Pharmacol* 130:1005-1012.
- Carlsson A, Waters N, Carlsson ML. 1999. Neurotransmitter interactions in schizophrenia--therapeutic implications. *Biol Psychiatry* 46:1388-1395.
- Chen YS, Akula N, Detera-Wadleigh SD, Schulze TG, Thomas J, Potash JB, DePaulo JR, McInnis MG, Cox NJ, McMahon FJ. 2004. Findings in an independent sample support an association between bipolar affective disorder and the G72/G30 locus on chromosome 13q33. *Mol Psychiatry* 9:87-92; image 85.
- Chiavegatto S, Dawson VL, Mamounas LA, Koliatsos VE, Dawson TM, Nelson RJ. 2001. Brain serotonin dysfunction accounts for aggression in male mice lacking neuronal nitric oxide synthase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:1277-1281.
- Chowdary KV, ;Mirnics K, Semwal P, Wood J, Bata T. 2002. Association and linkage analyses of RGS 4 polymorphisms in schizophrenia. *Hum Mol Genet*:1373-1380.
- Chumakov I, Blumenfeld M, Guerassimenko O, Cavarec L, Palicio M, Abderrahim H, Bougueleret L, Barry C, Tanaka H, La Rosa P, Puech A, Tahri N, Cohen-Akenine A, Delabrosse S, Lissarrague S, Picard FP, Maurice K, Essioux 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. 2002. 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* 99:13675-13680.
- Clinton SM, Meador-Woodruff JH. 2004. Abnormalities of the NMDA Receptor and Associated Intracellular Molecules in the Thalamus in Schizophrenia and Bipolar Disorder. *Neuropsychopharmacology* 29:1353-1362.
- Contestabile A. 2000. Roles of NMDA receptor activity and nitric oxide production in brain development. *Brain Res Brain Res Rev* 32:476-509.
- Coquelle FM, Caspi M, Cordelieres FP, Dompierre JP, Dujardin DL, Koifman C, Martin P, Hoogenraad CC, Akhmanova A, Galjart N, De Mey JR, Reiner O. 2002. LIS1, CLIP-170's key to the dynein/dynactin pathway. *Mol Cell Biol* 22:3089-3102.

- Creese I, Burt DR, Snyder SH. 1976. Dopamine receptor binding predicts clinical and pharmacological potencies of antischizophrenic drugs. *Science* 192:481-483.
- Curtis D, Kalsi G, Brynjolfsson J, McInnis M, O'Neill J, Smyth C, Moloney E, Murphy P, McQuillin A, Petursson H, Gurling H. 2003. Genome scan of pedigrees multiply affected with bipolar disorder provides further support for the presence of a susceptibility locus on chromosome 12q23-q24, and suggests the presence of additional loci on 1p and 1q. *Psychiatr Genet* 13:77-84.
- da Silva GD, Matteussi AS, dos Santos AR, Calixto JB, Rodrigues AL. 2000. Evidence for dual effects of nitric oxide in the forced swimming test and in the tail suspension test in mice. *Neuroreport* 11:3699-3702.
- Davis KL, Kahn RS, Ko G, Davidson M. 1991. Dopamine in schizophrenia: a review and reconceptualization. *Am J Psychiatry* 148:1474-1486.
- Day CL, Dupont C, Lackmann M, Vaux DL, Hinds MG. 1999. Solution structure and mutagenesis of the caspase recruitment domain (CARD) from Apaf-1. *Cell Death Differ* 6:1125-1132.
- Deakin JF, Simpson MD. 1997. A two-process theory of schizophrenia: evidence from studies in post-mortem brain. *J Psychiatr Res* 31:277-295.
- Degn B, Lundorf MD, Wang A, Vang M, Mors O, Kruse TA, Ewald H. 2001. Further evidence for a bipolar risk gene on chromosome 12q24 suggested by investigation of haplotype sharing and allelic association in patients from the Faroe Islands. *Mol Psychiatry* 6:450-455.
- DeLisi LE, Shaw SH, Crow TJ, Shields G, Smith AB, Larach VW, Wellman N, Loftus J, Nanthakumar B, Razi K, Stewart J, Comazzi M, Vita A, Heffner T, Sherrington R. 2002. A genome-wide scan for linkage to chromosomal regions in 382 sibling pairs with schizophrenia or schizoaffective disorder. *Am J Psychiatry* 159:803-812.
- Detera-Wadleigh SD. 1999. Chromosomes 12 and 16 workshop. *Am J Med Genet* 88:255-259.
- Detera-Wadleigh SD, Badner JA, Berrettini WH, Yoshikawa T, Goldin LR, Turner G, Rollins DY, Moses T, Sanders AR, Karkera JD, Esterling LE, Zeng J, Ferraro TN, Guroff JJ, Kazuba D, Maxwell ME, Nurnberger JI, Jr., Gershon ES. 1999. A high-density genome scan detects evidence for a bipolar-disorder susceptibility locus on 13q32 and other potential loci on 1q32 and 18p11.2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:5604-5609.
- Dick T, Ray K, Salz HK, Chia W. 1996. Cytoplasmic dynein (ddlc1) mutations cause morphogenetic defects and apoptotic cell death in *Drosophila melanogaster*. *Mol Cell Biol* 16:1966-1977.
- Dobyns WB, Truwit CL, Ross ME, Matsumoto N, Pilz DT, Ledbetter DH, Gleeson JG, Walsh CA, Barkovich AJ. 1999. Differences in the gyral pattern distinguish chromosome 17-linked and X-linked lissencephaly. *Neurology* 53:270-277.
- Downen M, Zhao ML, Lee P, Weidenheim KM, Dickson DW, Lee SC. 1999. Neuronal nitric oxide synthase expression in developing and adult human CNS. *J Neuropathol Exp Neurol* 58:12-21.

- Doyle CA, Slater P. 1995. Application of [3H]L-N(G)-nitro-arginine labelling to measure cerebellar nitric oxide synthase in patients with schizophrenia. *Neurosci Lett* 202:49-52.
- Efimov VP, Morris NR. 2000. The LIS1-related NUDF protein of *Aspergillus nidulans* interacts with the coiled-coil domain of the NUDE/RO11 protein. *J Cell Biol* 150:681-688.
- Egan MF, Goldberg TE, Kolachana BS, Callicott JH, Mazzanti CM, Straub RE, Goldman D, Weinberger DR. 2001. Effect of COMT Val108/158 Met genotype on frontal lobe function and risk for schizophrenia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:6917-6922.
- Elkashef AM, Buchanan RW, Gellad F, Munson RC, Breier A. 1994. Basal ganglia pathology in schizophrenia and tardive dyskinesia: an MRI quantitative study. *Am J Psychiatry* 151:752-755.
- Emamian ES, Karayiorgou M, Gogos JA. 2004. Decreased phosphorylation of NMDA receptor type 1 at serine 897 in brains of patients with Schizophrenia. *J Neurosci* 24:1561-1564.
- Erdfelder E, Faul, F, Buchner, A. 1996. GPOWER, a general power analyses program. *Instruments and Computers* 28:1-11.
- Espindola FS, Suter DM, Partata LB, Cao T, Wolenski JS, Cheney RE, King SM, Mooseker MS. 2000. The light chain composition of chicken brain myosin-Va: calmodulin, myosin-II essential light chains, and 8-kDa dynein light chain/PIN. *Cell Motil Cytoskeleton* 47:269-281.
- Essrich C, Lorez M, Benson JA, Fritschy JM, Luscher B. 1998. Postsynaptic clustering of major GABAA receptor subtypes requires the gamma 2 subunit and gephyrin. *Nat Neurosci* 1:563-571.
- Ewald H, Degn B, Mors O, Kruse TA. 1998. Significant linkage between bipolar affective disorder and chromosome 12q24. *Psychiatr Genet* 8:131-140.
- Ewald H, Flint T, Kruse TA, Mors O. 2002. A genome-wide scan shows significant linkage between bipolar disorder and chromosome 12q24.3 and suggestive linkage to chromosomes 1p22-21, 4p16, 6q14-22, 10q26 and 16p13.3. *Mol Psychiatry* 7:734-744.
- Falkai P, Honer WG, Kamer T, Dustert S, Vogeley K, Schneider-Axmann T, Dani I, Wagner M, Rietschel M, Muller DJ, Schulze TG, Gaebel W, Cordes J, Schonell H, Schild HH, Block W, Traber F, Steinmetz H, Maier W, Tepest R. 2007. Disturbed frontal gyrification within families affected with schizophrenia. *J Psychiatr Res* 41:805-813.
- Fallin MD, Lasseter VK, Avramopoulos D, Nicodemus KK, Wolyniec PS, McGrath JA, Steel G, Nestadt G, Liang KY, Haganir RL, Valle D, Pulver AE. 2005. Bipolar I disorder and schizophrenia: a 440-single-nucleotide polymorphism screen of 64 candidate genes among Ashkenazi Jewish case-parent trios. *Am J Hum Genet* 77:918-936.
- Fanous AH, Kendler KS. 2005. Genetic heterogeneity, modifier genes, and quantitative phenotypes in psychiatric illness: searching for a framework. *Mol Psychiatry* 10:6-13.
- Faraone SV, Blehar M, Pepple J, Moldin SO, Norton J, Nurnberger JI, Malaspina D, Kaufmann CA, Reich T, Cloninger CR, DePaulo JR, Berg K, Gershon ES, Kirch DG, Tsuang MT. 1996. Diagnostic accuracy and

- confusability analyses: an application to the Diagnostic Interview for Genetic Studies. *Psychol Med* 26:401-410.
- Faraone SV, Matise T, Svrakic D, Pepple J, Malaspina D, Suarez B, Hampe C, Zambuto CT, Schmitt K, Meyer J, Markel P, Lee H, Harkavy Friedman J, Kaufmann C, Cloninger CR, Tsuang MT. 1998. Genome scan of European-American schizophrenia pedigrees: results of the NIMH Genetics Initiative and Millennium Consortium. *Am J Med Genet* 81:290-295.
- Fatemi SH, Kroll JL, Stary JM. 2001. Altered levels of Reelin and its isoforms in schizophrenia and mood disorders. *Neuroreport* 12:3209-3215.
- Feng Y, Olson EC, Stukenberg PT, Flanagan LA, Kirschner MW, Walsh CA. 2000. LIS1 regulates CNS lamination by interacting with mNudE, a central component of the centrosome. *Neuron* 28:665-679.
- Foroud T, Castelluccio PF, Koller DL, Edenberg HJ, Miller M, Bowman E, Rau NL, Smiley C, Rice JP, Goate A, Armstrong C, Bierut LJ, Reich T, Detera-Wadleigh SD, Goldin LR, Badner JA, Guroff JJ, Gershon ES, McMahon FJ, Simpson S, MacKinnon D, McInnis M, Stine OC, DePaulo JR, Blehar MC, Nurnberger JI, Jr. 2000. Suggestive evidence of a locus on chromosome 10p using the NIMH genetics initiative bipolar affective disorder pedigrees. *Am J Med Genet* 96:18-23.
- Freudenberg JC, S. 2002. Blockstruktur des menschlichen Genoms. *Deutsches Ärzteblatt* 99:3190-3195.
- Fritzen S, Lauer M, Schmitt A, Topner T, Strobel A, Lesch KP, Reif A. 2007. NO synthase-positive striatal interneurons are decreased in schizophrenia. *Eur Neuropsychopharmacol*.
- Fuhrmann JC, Kins S, Rostaing P, El Far O, Kirsch J, Sheng M, Triller A, Betz H, Kneussel M. 2002. Gephyrin interacts with Dynein light chains 1 and 2, components of motor protein complexes. *J Neurosci* 22:5393-5402.
- Garthwaite J, Garthwaite G, Palmer RM, Moncada S. 1989. NMDA receptor activation induces nitric oxide synthesis from arginine in rat brain slices. *Eur J Pharmacol* 172:413-416.
- Gaser C, Volz HP, Kiebel S, Riehemann S, Sauer H. 1999. Detecting structural changes in whole brain based on nonlinear deformations-application to schizophrenia research. *Neuroimage* 10:107-113.
- Gattaz WF, Gattaz D, Beckmann H. 1982. Glutamate in schizophrenics and healthy controls. *Arch Psychiatr Nervenkr* 231:221-225.
- Geuze E, Vermetten E, Bremner JD. 2005. MR-based in vivo hippocampal volumetrics: 2. Findings in neuropsychiatric disorders. *Mol Psychiatry* 10:160-184.
- Gillardot F, Krep H, Brinker G, Lenz C, Bottiger B, Hossmann KA. 1998. Induction of protein inhibitor of neuronal nitric oxide synthase/cytoplasmic dynein light chain following cerebral ischemia. *Neuroscience* 84:81-88.
- Greenwood MT, Guo Y, Kumar U, Beausejourns S, Hussain SN. 1997. Distribution of protein inhibitor of neuronal nitric oxide synthase in rat brain. *Biochem Biophys Res Commun* 238:617-621.
- Guidotti A, Auta J, Davis JM, Di-Giorgi-Gerevini V, Dwivedi Y, Grayson DR, Impagnatiello F, Pandey G, Pesold C, Sharma R, Uzunov D, Costa E. 2000. Decrease in reelin and glutamic acid decarboxylase67 (GAD67)

- expression in schizophrenia and bipolar disorder: a postmortem brain study. *Arch Gen Psychiatry* 57:1061-1069.
- Gurling HM, Kalsi G, Brynjolfson J, Sigmundsson T, Sherrington R, Mankoo BS, Read T, Murphy P, Blaveri E, McQuillin A, Petursson H, Curtis D. 2001. Genomewide genetic linkage analysis confirms the presence of susceptibility loci for schizophrenia, on chromosomes 1q32.2, 5q33.2, and 8p21-22 and provides support for linkage to schizophrenia, on chromosomes 11q23.3-24 and 20q12.1-11.23. *Am J Hum Genet* 68:661-673.
- Hall D, Gogos JA, Karayiorgou M. 2004. The contribution of three strong candidate schizophrenia susceptibility genes in demographically distinct populations. *Genes Brain Behav* 3:240-248.
- Haraguchi K, Satoh K, Yanai H, Hamada F, Kawabuchi M, Akiyama T. 2000. The hDLG-associated protein DAP interacts with dynein light chain and neuronal nitric oxide synthase. *Genes Cells* 5:905-911.
- Harkin AJ, Bruce KH, Craft B, Paul IA. 1999. Nitric oxide synthase inhibitors have antidepressant-like properties in mice. 1. Acute treatments are active in the forced swim test. *Eur J Pharmacol* 372:207-213.
- Harrison PJ. 1999. The neuropathology of schizophrenia. A critical review of the data and their interpretation. *Brain* 122 (Pt 4):593-624.
- Harrison PJ, Owen MJ. 2003. Genes for schizophrenia? Recent findings and their pathophysiological implications. *Lancet* 361:417-419.
- Harrison PJ, Weinberger DR. 2005. Schizophrenia genes, gene expression, and neuropathology: on the matter of their convergence. *Mol Psychiatry* 10:40-68; image 45.
- Hattori E, Liu C, Badner JA, Bonner TI, Christian SL, Maheshwari M, Detera-Wadleigh SD, Gibbs RA, Gershon ES. 2003. Polymorphisms at the G72/G30 gene locus, on 13q33, are associated with bipolar disorder in two independent pedigree series. *Am J Hum Genet* 72:1131-1140.
- Hayashi MA, Portaro FC, Bastos MF, Guerreiro JR, Oliveira V, Gorrao SS, Tambourgi DV, Sant'Anna OA, Whiting PJ, Camargo LM, Konno K, Brandon NJ, Camargo AC. 2005. Inhibition of NUDEL (nuclear distribution element-like)-oligopeptidase activity by disrupted-in-schizophrenia 1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:3828-3833.
- Hemmens B, Woschitz S, Pitters E, Klosch B, Volker C, Schmidt K, Mayer B. 1998. The protein inhibitor of neuronal nitric oxide synthase (PIN): characterization of its action on pure nitric oxide synthases. *FEBS Lett* 430:397-400.
- Hennah W, Thomson P, McQuillin A, Bass N, Loukola A, Anjorin A, Blackwood D, Curtis D, Deary IJ, Harris SE, Isometsa ET, Lawrence J, Lonnqvist J, Muir W, Palotie A, Partonen T, Paunio T, Pylkko E, Robinson M, Soronen P, Suominen K, Suvisaari J, Thirumalai S, Clair DS, Gurling H, Peltonen L, Porteous D. 2008. DISC1 association, heterogeneity and interplay in schizophrenia and bipolar disorder. *Mol Psychiatry*.
- Hirokawa N, Noda Y, Okada Y. 1998. Kinesin and dynein superfamily proteins in organelle transport and cell division. *Curr Opin Cell Biol* 10:60-73.
- Hodgkinson CA, Goldman D, Jaeger J, Persaud S, Kane JM, Lipsky RH, Malhotra AK. 2004. Disrupted in schizophrenia 1 (DISC1): association

- with schizophrenia, schizoaffective disorder, and bipolar disorder. *Am J Hum Genet* 75:862-872.
- Hoffmann B, Zuo W, Liu A, Morris NR. 2001. The LIS1-related protein NUDF of *Aspergillus nidulans* and its interaction partner NUDE bind directly to specific subunits of dynein and dynactin and to alpha- and gamma-tubulin. *J Biol Chem* 276:38877-38884.
- Honea R, Crow TJ, Passingham D, Mackay CE. 2005. Regional deficits in brain volume in schizophrenia: a meta-analysis of voxel-based morphometry studies. *Am J Psychiatry* 162:2233-2245.
- Hong SE, Shugart YY, Huang DT, Shahwan SA, Grant PE, Hourihane JO, Martin ND, Walsh CA. 2000. Autosomal recessive lissencephaly with cerebellar hypoplasia is associated with human RELN mutations. *Nat Genet* 26:93-96.
- Jaffrey SR SS. 1996. PIN: An Associated Protein Inhibitor of Neuronal Nitric Oxide Synthase. *Science* 274:774-777.
- Jakob H. 1986. Prenatal developmental disturbances in the limbic allocortex in schizophrenics. *J Neural Transm* 65:303-326.
- Javitt DC. 2002. Glycine modulators in schizophrenia. *Curr Opin Investig Drugs* 3:1067-1072.
- Javitt DC, Zukin SR. 1991. Recent advances in the phencyclidine model of schizophrenia. *Am J Psychiatry* 148:1301-1308.
- Kakiuchi C, Ishiwata M, Nanko S, Kunugi H, Minabe Y, Nakamura K, Mori N, Fujii K, Yamada K, Yoshikawa T, Kato T. 2007. Association analysis of ATF4 and ATF5, genes for interacting-proteins of DISC1, in bipolar disorder. *Neurosci Lett* 417:316-321.
- Kamiya A, Kubo K, Tomoda T, Takaki M, Youn R, Ozeki Y, Sawamura N, Park U, Kudo C, Okawa M, Ross CA, Hatten ME, Nakajima K, Sawa A. 2005. A schizophrenia-associated mutation of DISC1 perturbs cerebral cortex development. *Nat Cell Biol* 7:1167-1178.
- Kapur S, Seemann P. 2001. Does fast dissociation from the dopamine D2 receptor explain the action of atypical antipsychotics? A new hypothesis. *Am J Psychiatry* 3:360-369.
- Karolewicz B, Bruce KH, Lee B, Paul IA. 1999. Nitric oxide synthase inhibitors have antidepressant-like properties in mice. 2. Chronic treatment results in downregulation of cortical beta-adrenoceptors. *Eur J Pharmacol* 372:215-220.
- Karson CN, Griffin WS, Mrak RE, Husain M, Dawson TM, Snyder SH, Moore NC, Sturmer WQ. 1996. Nitric oxide synthase (NOS) in schizophrenia: increases in cerebellar vermis. *Mol Chem Neuropathol* 27:275-284.
- Kelsoe JR, Spence MA, Loetscher E, Foguet M, Sadovnick AD, Remick RA, Flodman P, Khristich J, Mroczkowski-Parker Z, Brown JL, Masser D, Ungerleider S, Rapoport MH, Wishart WL, Luebbert H. 2001. A genome survey indicates a possible susceptibility locus for bipolar disorder on chromosome 22. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:585-590.
- Kendler KS, Gardner CO. 1997. The risk for psychiatric disorders in relatives of schizophrenic and control probands: a comparison of three independent studies. *Psychol Med* 27:411-419.

- Kendler KS, McGuire M, Gruenberg AM, O'Hare A, Spellman M, Walsh D. 1993. The Roscommon Family Study. IV. Affective illness, anxiety disorders, and alcoholism in relatives. *Arch Gen Psychiatry* 50:952-960.
- Kim JS, Kornhuber HH, Schmid-Burgk W, Holzmüller B. 1980. Low cerebrospinal fluid glutamate in schizophrenic patients and a new hypothesis on schizophrenia. *Neurosci Lett* 20:379-382.
- King SM, Barbarese E, Dillman JF, III, Patel-King RS, Carson JH, Pfister KK. 1996. Brain cytoplasmic and flagellar outer arm dyneins share a highly conserved Mr 8,000 light chain. *J Biol Chem* 271:19358-19366.
- Kirsch J, Wolters I, Triller A, Betz H. 1993. Gephyrin antisense oligonucleotides prevent glycine receptor clustering in spinal neurons. *Nature* 366:745-748.
- Kiss JP, Vizi ES. 2001. Nitric oxide: a novel link between synaptic and nonsynaptic transmission. *Trends Neurosci* 24:211-215.
- Kitagawa M, Umezumi M, Aoki J, Koizumi H, Arai H, Inoue K. 2000. Direct association of LIS1, the lissencephaly gene product, with a mammalian homologue of a fungal nuclear distribution protein, rNUDE. *FEBS Lett* 479:57-62.
- Klamer D, Engel JA, Svensson L. 2001. The nitric oxide synthase inhibitor, L-NAME, block phencyclidine-induced disruption of prepulse inhibition in mice. *Psychopharmacology (Berl)* 156:182-186.
- Kneussel M, Betz H. 2000. Clustering of inhibitory neurotransmitter receptors at developing postsynaptic sites: the membrane activation model. *Trends Neurosci* 23:429-435.
- Kornau HC, Schenker LT, Kennedy MB, Seeburg PH. 1995. Domain interaction between NMDA receptor subunits and the postsynaptic density protein PSD-95. *Science* 269:1737-1740.
- Kristiansen LV, Meador-Woodruff JH. 2005. Abnormal striatal expression of transcripts encoding NMDA interacting PSD proteins in schizophrenia, bipolar disorder and major depression. *Schizophr Res* 78:87-93.
- Lauer M, Johannes S, Fritzen S, Senitz D, Riederer P, Reif A. 2005. Morphological abnormalities in nitric-oxide-synthase-positive striatal interneurons of schizophrenic patients. *Neuropsychobiology* 52:111-117.
- Levinson DF, Holmans P, Straub RE, Owen MJ, Wildenauer DB, Gejman PV, Pulver AE, Laurent C, Kendler KS, Walsh D, Norton N, Williams NM, Schwab SG, Lerer B, Mowry BJ, Sanders AR, Antonarakis SE, Blouin JL, DeLeuze JF, Mallet J. 2000. Multicenter linkage study of schizophrenia candidate regions on chromosomes 5q, 6q, 10p, and 13q: schizophrenia linkage collaborative group III. *Am J Hum Genet* 67:652-663.
- Levitt JJ, McCarley RW, Nestor PG, Petrescu C, Donnino R, Hirayasu Y, Kikinis R, Jolesz FA, Shenton ME. 1999. Quantitative volumetric MRI study of the cerebellum and vermis in schizophrenia: clinical and cognitive correlates. *Am J Psychiatry* 156:1105-1107.
- Lewis DA, Levitt P. 2002. Schizophrenia as a disorder of neurodevelopment. *Annu Rev Neurosci* 25:409-432.
- Li C, Zheng Y, Qin W, Tao R, Pan Y, Xu Y, Li X, Gu N, Feng G, He L. 2006. A family-based association study of kinesin heavy chain member 2 gene (KIF2) and schizophrenia. *Neurosci Lett* 407:151-155.

- Liang J, Jaffrey SR, Guo W, Snyder SH, Clardy J. 1999. Structure of the PIN/LC8 dimer with a bound peptide. *Nat Struct Biol* 6:735-740.
- Liebermann JA, Kane JM, D G, R B, MS L, B K. 1984. Methylphenidate challenge as a predictor of relapse in schizophrenia. *Am J Psychiatry* 141:633-638.
- Lin JP, Bale SJ. 1997. Parental transmission and D18S37 allele sharing in bipolar affective disorder. *Genet Epidemiol* 14:665-668.
- Lindholm E, Ekholm B, Shaw S, Jalonen P, Johansson G, Pettersson U, Sherrington R, Adolfsson R, Jazin E. 2001. A schizophrenia-susceptibility locus at 6q25, in one of the world's largest reported pedigrees. *Am J Hum Genet* 69:96-105.
- Liu H, Abecasis GR, Heath SC, Knowles A, Demars S, Chen YJ, Roos JL, Rapoport JL, Gogos JA, Karayiorgou M. 2002. Genetic variation in the 22q11 locus and susceptibility to schizophrenia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:16859-16864.
- Lo KW, Naisbitt S, Fan JS, Sheng M, Zhang M. 2001. The 8-kDa dynein light chain binds to its targets via a conserved (K/R)XTQT motif. *J Biol Chem* 276:14059-14066.
- Maier W, Lichtermann D, Minges J, Hallmayer J, Heun R, Benkert O, Levinson DF. 1993. Continuity and discontinuity of affective disorders and schizophrenia. Results of a controlled family study. *Arch Gen Psychiatry* 50:871-883.
- Martinez M, Goldin LR, Cao Q, Zhang J, Sanders AR, Nancarrow DJ, Taylor JM, Levinson DF, Kirby A, Crowe RR, Andreasen NC, Black DW, Silverman JM, Lennon DP, Nertney DA, Brown DM, Mowry BJ, Gershon ES, Gejman PV. 1999. Follow-up study on a susceptibility locus for schizophrenia on chromosome 6q. *Am J Med Genet* 88:337-343.
- Maziade M, Roy MA, Chagnon YC, Cliche D, Fournier JP, Montgrain N, Dion C, Lavalley JC, Garneau Y, Gingras N, Nicole L, Pires A, Ponton AM, Potvin A, Wallot H, Merette C. 2005. Shared and specific susceptibility loci for schizophrenia and bipolar disorder: a dense genome scan in Eastern Quebec families. *Mol Psychiatry* 10:486-499.
- Maziade M, Roy MA, Rouillard E, Bissonnette L, Fournier JP, Roy A, Garneau Y, Montgrain N, Potvin A, Cliche D, Dion C, Wallot H, Fournier A, Nicole L, Lavalley JC, Merette C. 2001. A search for specific and common susceptibility loci for schizophrenia and bipolar disorder: a linkage study in 13 target chromosomes. *Mol Psychiatry* 6:684-693.
- McCarley RW, Wible CG, Frumin M, Hirayasu Y, Levitt JJ, Fischer IA, Shenton ME. 1999. MRI anatomy of schizophrenia. *Biol Psychiatry* 45:1099-1119.
- McGrath J, Murray R. 1995. Risk factors in schizophrenia: from conception to birth, in *Schizophrenia*. Blackwell:187-205.
- Meador-Woodruff JH, Clinton SM, Beneyto M, McCullumsmith RE. 2003. Molecular abnormalities of the glutamate synapse in the thalamus in schizophrenia. *Ann N Y Acad Sci* 1003:75-93.
- Meier J, Vannier C, Serge A, Triller A, Choquet D. 2001. Fast and reversible trapping of surface glycine receptors by gephyrin. *Nat Neurosci* 4:253-260.

- Meltzer HY, Li Z, Kaneda Y, Ichikawa J. 2003. Serotonin receptors: their key role in drugs to treat schizophrenia. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 27:1159-1172.
- Meyer J, Huberth A, Ortega G, Syagailo YV, Jatzke S, Mossner R, Strom TM, Ulzheimer-Teuber I, Stober G, Schmitt A, Lesch KP. 2001. A missense mutation in a novel gene encoding a putative cation channel is associated with catatonic schizophrenia in a large pedigree. *Mol Psychiatry* 6:302-306.
- Millar JK, Wilson-Annan JC, Anderson S, Christie S, Taylor MS, Semple CA, Devon RS, Clair DM, Muir WJ, Blackwood DH, Porteous DJ. 2000. Disruption of two novel genes by a translocation co-segregating with schizophrenia. *Hum Mol Genet* 9:1415-1423.
- Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. 1988. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* 16:1215.
- Moghaddam B. 2003. Bringing order to the glutamate chaos in schizophrenia. *Neuron* 40.
- Moises H, Yang L, Kristbjarnarson H, Wiese C, Byerly W, Macciardi F, Arolt V, Blackwood D, Liu X, Sjorgen B, et al. 1995. An international two-stage genome-wide search for schizophrenia susceptibility genes. *Nat Genet* 11:321-324.
- Morissette J, Villeneuve A, Bordeleau L, Rochette D, Laberge C, Gagne B, Laprise C, Bouchard G, Plante M, Gobeil L, Shink E, Weissenbach J, Barden N. 1999. Genome-wide search for linkage of bipolar affective disorders in a very large pedigree derived from a homogeneous population in Quebec points to a locus of major effect on chromosome 12q23-q24. *Am J Med Genet* 88:567-587.
- Morris DW, McGhee KA, Schwaiger S, Scully P, Quinn J, Meagher D, Waddington JL, Gill M, Corvin AP. 2003. No evidence for association of the dysbindin gene [DTNBP1] with schizophrenia in an Irish population-based study. *Schizophr Res* 60:167-172.
- Mueller HT, Haroutunian V, Davis KL, Meador-Woodruff JH. 2004. Expression of the ionotropic glutamate receptor subunits and NMDA receptor-associated intracellular proteins in the substantia nigra in schizophrenia. *Brain Res Mol Brain Res* 121:60-69.
- Nabeshima T, Mouri A, Murai R, Noda Y. 2006. Animal model of schizophrenia: dysfunction of NMDA receptor-signaling in mice following withdrawal from repeated administration of phencyclidine. *Ann N Y Acad Sci* 1086:160-168.
- Naisbitt S, Valtschanoff J, Allison DW, Sala C, Kim E, Craig AM, Weinberg RJ, Sheng M. 2000. Interaction of the postsynaptic density-95/guanylate kinase domain-associated protein complex with a light chain of myosin-V and dynein. *J Neurosci* 20:4524-4534.
- Navarro-Lerida I, Martinez Moreno M, Roncal F, Gavilanes F, Albar JP, Rodriguez-Crespo I. 2004. Proteomic identification of brain proteins that interact with dynein light chain LC8. *Proteomics* 4:339-346.
- Nedvetsky PI, Sessa WC, Schmidt HH. 2002. There's NO binding like NOS binding: protein-protein interactions in NO/cGMP signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:16510-16512.

- Niculescu AB, 3rd, Segal DS, Kuczenski R, Barrett T, Hauger RL, Kelsoe JR. 2000. Identifying a series of candidate genes for mania and psychosis: a convergent functional genomics approach. *Physiol Genomics* 4:83-91.
- Niethammer M, Sheng M. 1998. Identification of ion channel-associated proteins using the yeast two-hybrid system. *Methods Enzymol* 293:104-122.
- Ohnuma T, Kato H, Arai H, Faull RL, McKenna PJ, Emson PC. 2000. Gene expression of PSD95 in prefrontal cortex and hippocampus in schizophrenia. *Neuroreport* 11:3133-3137.
- Olney JW, Newcomer JW, Farber NB. 1999. NMDA receptor hypofunction model of schizophrenia. *J Psychiatr Res* 33:523-533.
- Ophoff RA, Escamilla MA, Service SK, Spesny M, Meshi DB, Poon W, Molina J, Fournier E, Gallegos A, Mathews C, Neylan T, Batki SL, Roche E, Ramirez M, Silva S, De Mille MC, Dong P, Leon PE, Reus VI, Sandkuijl LA, Freimer NB. 2002. Genomewide linkage disequilibrium mapping of severe bipolar disorder in a population isolate. *Am J Hum Genet* 71:565-574.
- Ozeki Y, Tomoda T, Kleiderlein J, Kamiya A, Bord L, Fujii K, Okawa M, Yamada N, Hatten ME, Snyder SH, Ross CA, Sawa A. 2003. Disrupted-in-Schizophrenia-1 (DISC-1): mutant truncation prevents binding to NudE-like (NUDEL) and inhibits neurite outgrowth. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:289-294.
- Papassotiropoulos A, Stephan DA, Huentelman MJ, Hoerndli FJ, Craig DW, Pearson JV, Huynh KD, Brunner F, Corneveaux J, Osborne D, Wollmer MA, Aerni A, Coluccia D, Hanggi J, Mondadori CR, Buchmann A, Reiman EM, Caselli RJ, Henke K, de Quervain DJ. 2006. Common Kibra alleles are associated with human memory performance. *Science* 314:475-478.
- Pazour GJ, Wilkerson CG, Witman GB. 1998. A dynein light chain is essential for the retrograde particle movement of intraflagellar transport (IFT). *J Cell Biol* 141:979-992.
- Phillis R, Statton D, Caruccio P, Murphey RK. 1996. Mutations in the 8 kDa dynein light chain gene disrupt sensory axon projections in the *Drosophila* imaginal CNS. *Development* 122:2955-2963.
- Pilz DT, Matsumoto N, Minnerath S, Mills P, Gleeson JG, Allen KM, Walsh CA, Barkovich AJ, Dobyns WB, Ledbetter DH, Ross ME. 1998. LIS1 and XLIS (DCX) mutations cause most classical lissencephaly, but different patterns of malformation. *Hum Mol Genet* 7:2029-2037.
- Prior P, Schmitt B, Grenningloh G, Pribilla I, Multhaup G, Beyreuther K, Maulet Y, Werner P, Langosch D, Kirsch J, et al. 1992. Primary structure and alternative splice variants of gephyrin, a putative glycine receptor-tubulin linker protein. *Neuron* 8:1161-1170.
- Propping P, Nothen MM, Korner J, Rietschel M, Maier W. 1994. [Genetic association in psychiatric diseases. Concepts and findings]. *Nervenarzt* 65:725-740.
- Rayala SK, den Hollander P, Manavathi B, Talukder AH, Song C, Peng S, Barnekow A, Kremerskothen J, Kumar R. 2006. Essential role of KIBRA

- in co-activator function of dynein light chain 1 in mammalian cells. *J Biol Chem* 281:19092-19099.
- Reif A, Herterich S, Strobel A, Ehlis AC, Saur D, Jacob CP, Wienker T, Topner T, Fritzen S, Walter U, Schmitt A, Fallgatter AJ, Lesch KP. 2006. A neuronal nitric oxide synthase (NOS-I) haplotype associated with schizophrenia modifies prefrontal cortex function. *Mol Psychiatry* 11:286-300.
- Rice DS, Curran T. 2001. Role of the reelin signaling pathway in central nervous system development. *Annu Rev Neurosci* 24:1005-1039.
- Rodriguez-Crespo I, Yelamos B, Roncal F, Albar JP, Ortiz de Montellano PR, Gavilanes F. 2001. Identification of novel cellular proteins that bind to the LC8 dynein light chain using a pepscan technique. *FEBS Lett* 503:135-141.
- Ross ME, Swanson K, Dobyns WB. 2001. Lissencephaly with cerebellar hypoplasia (LCH): a heterogeneous group of cortical malformations. *Neuropediatrics* 32:256-263.
- Ross ME, Walsh CA. 2001. Human brain malformations and their lessons for neuronal migration. *Annu Rev Neurosci* 24:1041-1070.
- Saka E, Iadarola M, Fitzgerald DJ, Graybiel AM. 2002. Local circuit neurons in the striatum regulate neural and behavioral responses to dopaminergic stimulation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:9004-9009.
- Sallet PC, Elkis H, Alves TM, Oliveira JR, Sassi E, de Castro CC, Busatto GF, Gattaz WF. 2003. Rightward cerebral asymmetry in subtypes of schizophrenia according to Leonhard's classification and to DSM-IV: a structural MRI study. *Psychiatry Res* 123:65-79.
- Sasaki S, Shionoya A, Ishida M, Gambello MJ, Yingling J, Wynshaw-Boris A, Hirotsune S. 2000. A LIS1/NUDEL/cytoplasmic dynein heavy chain complex in the developing and adult nervous system. *Neuron* 28:681-696.
- Sawa A. 2002. Schizophrenia: diverse approaches to a complex disease. *Science* 296:692-695.
- Schmidt HHHW, Pollock, J.S., Förstermann, U., Murad, F. 1991. Type 1 guanylyl cyclase activating-factor(GAF) synthase is a Calcium/Calmodulin-, NADPH- and tetrahydrobiopterin-dependent homodimer. In: FASEB.
- Schneider K. 1967. *Klinische Psychopathologie*. Lehrbuch Thieme Verlag Stuttgart, New York 8.
- 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. 2004. Examination of G72 and D-amino-acid oxidase as genetic risk factors for schizophrenia and bipolar affective disorder. *Mol Psychiatry* 9:203-207.
- Schwab SG, Hallmayer J, Albus M, Lerer B, Eckstein GN, Borrmann M, Segman RH, Hanses C, Freymann J, Yakir A, Trixler M, Falkai P, Rietschel M, Maier W, Wildenauer DB. 2000. A genome-wide autosomal screen for schizophrenia susceptibility loci in 71 families with affected siblings: support for loci on chromosome 10p and 6. *Mol Psychiatry* 5:638-649.

- Schwab SG, Hallmayer J, Albus M, Lerer B, Hanses C, Kanyas K, Segman R, Borrmann M, Dreikorn B, Lichtermann D, Rietschel M, Trixler M, Maier W, Wildenauer DB. 1998. Further evidence for a susceptibility locus on chromosome 10p14-p11 in 72 families with schizophrenia by nonparametric linkage analysis. *Am J Med Genet* 81:302-307.
- Shifman S, Bronstein M, Sternfeld M, Pisante-Shalom A, Lev-Lehman E, Weizman A, Reznik I, Spivak B, Grisaru N, Karp L, Schiffer R, Kotler M, Strous RD, Swartz-Vanetik M, Knobler HY, Shinar E, Beckmann JS, Yakir B, Risch N, Zak NB, Darvasi A. 2002. A highly significant association between a COMT haplotype and schizophrenia. *Am J Hum Genet* 71:1296-1302.
- Shink E, Morissette J, Sherrington R, Barden N. 2005. A genome-wide scan points to a susceptibility locus for bipolar disorder on chromosome 12. *Mol Psychiatry* 10:545-552.
- Simpson MD, Slater P, Deakin JF. 1998. Comparison of glutamate and gamma-aminobutyric acid uptake binding sites in frontal and temporal lobes in schizophrenia. *Biol Psychiatry* 44:423-427.
- Simpson MD, Slater P, Royston MC, Deakin JF. 1992. Regionally selective deficits in uptake sites for glutamate and gamma-aminobutyric acid in the basal ganglia in schizophrenia. *Psychiatry Res* 42:273-282.
- Snyder SH, Ferris CD. 2000. Novel neurotransmitters and their neuropsychiatric relevance. *Am. J. Psychiat.* 157:1738-1751.
- Somnath CP, Janardhan Reddy YC, Jain S. 2002. Is there a familial overlap between schizophrenia and bipolar disorder? *J Affect Disord* 72:243-247.
- Steen RG, Mull C, McClure R, Hamer RM, Lieberman JA. 2006. Brain volume in first-episode schizophrenia: systematic review and meta-analysis of magnetic resonance imaging studies. *Br J Psychiatry* 188:510-518.
- 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. 2002. Neuregulin 1 and susceptibility to schizophrenia. *Am J Hum Genet* 71:877-892.
- Stewart J, Deschamps SE, Amir S. 1994. Inhibition of nitric oxide synthase does not block the development of sensitization to the behavioral activating effects of amphetamine. *Brain Res* 641:141-144.
- Straub RE JY, MacLean CJ, Ma Y, Webb BT, Myakishev MV, Harris-kerr, Wormley B, Sadek H, Kadambi B, Cesare AJ, Gibberman A, Wang X, O'Neill FA, Walsh D, Kendlers KS. 2002. Genetic variation in the 6p22.3 gene DTNBP1, the human ortholog of the mouse dysbindin gene is associated with schizophrenia. *Am J Hum Genet* 71:337-348.
- Straub RE MC, Martin RB, Ma Y, Myakishev MV, Harris-kerr C, Webb BT, O'Neill A, Walsh D, Kendlers KS. 1998. A schizophrenia locus may be located in region 10p15-p11. *Am J Med Genet (Neuropsychiatr Genet)* 81:337-348.

- Stuehr DJ, Griffith OW. 1992. Mammalian nitric oxide synthases. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol* 65:287-346.
- Sullivan PF, Kendler KS, Neale MC. 2003. Schizophrenia as a complex trait: evidence from a meta-analysis of twin studies. *Arch Gen Psychiatry* 60:1187-1192.
- Sweeney KJ, Prokscha A, Eichele G. 2001. NudE-L, a novel Lis1-interacting protein, belongs to a family of vertebrate coiled-coil proteins. *Mech Dev* 101:21-33.
- Tai CY, Dujardin DL, Faulkner NE, Vallee RB. 2002. Role of dynein, dynactin, and CLIP-170 interactions in LIS1 kinetochore function. *J Cell Biol* 156:959-968.
- Tang W, Huang K, Tang R, Zhou G, Fang C, Zhang J, Du L, Feng G, He L, Shi Y. 2008. Evidence for association between the 5' flank of the NOS1 gene and schizophrenia in the Chinese population. *Int J Neuropsychopharmacol* 11:1063-1071.
- Tarazi FI, Baldessarini RJ. 1999. Dopamine D4 receptors: significance for molecular psychiatry at the millennium. *Mol Psychiatry* 4:529-538.
- Toyooka K, Iritani S, Makifuchi T, Shirakawa O, Kitamura N, Maeda K, Nakamura R, Niizato K, Watanabe M, Kakita A, Takahashi H, Someya T, Nawa H. 2002. Selective reduction of a PDZ protein, SAP-97, in the prefrontal cortex of patients with chronic schizophrenia. *J Neurochem* 83:797-806.
- Triller A, Cluzeaud F, Korn H. 1987. gamma-Aminobutyric acid-containing terminals can be apposed to glycine receptors at central synapses. *J Cell Biol* 104:947-956.
- Triller A, Cluzeaud F, Pfeiffer F, Betz H, Korn H. 1985. Distribution of glycine receptors at central synapses: an immunoelectron microscopy study. *J Cell Biol* 101:683-688.
- Tsuang MT, Stone WS, Faraone SV. 2002. Understanding predisposition to schizophrenia: toward intervention and prevention. *Can J Psychiatry* 47:518-526.
- Vallee RB, Sheetz MP. 1996. Targeting of motor proteins. *Science* 271:1539-1544.
- Vogeley K, Tepest R, Pfeiffer U, Schneider-Axmann T, Maier W, Honer WG, Falkai P. 2001. Right frontal hypergyria differentiation in affected and unaffected siblings from families multiply affected with schizophrenia: a morphometric mri study. *Am J Psychiatry* 158:494-496.
- 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. 2004. Association of G72/G30 with schizophrenia in the Chinese population. *Biochem Biophys Res Commun* 319:1281-1286.
- West AR, Galloway MP. 1997. Endogenous nitric oxide facilitates striatal dopamine and glutamate efflux in vivo: role of ionotropic glutamate receptor-dependent mechanisms. *Neuropharmacology* 36:1571-1581.
- West AR, Galloway MP, Grace AA. 2002. Regulation of striatal dopamine neurotransmission by nitric oxide: effector pathways and signaling mechanisms. *Synapse* 44:227-245.

- West AR, Grace AA. 2000. Striatal nitric oxide signaling regulates the neuronal activity of midbrain dopamine neurons in vivo. *J Neurophysiol* 83:1796-1808.
- Wilcox MA, Faraone SV, Su J, Van Eerdewegh P, Tsuang MT. 2002. Genome scan of three quantitative traits in schizophrenia pedigrees. *Biol Psychiatry* 52:847-854.
- Xiang X, Osmani AH, Osmani SA, Xin M, Morris NR. 1995. NudF, a nuclear migration gene in *Aspergillus nidulans*, is similar to the human LIS-1 gene required for neuronal migration. *Mol Biol Cell* 6:297-310.
- Xing G, Chavko M, Zhang LX, Yang S, Post RM. 2002. Decreased calcium-dependent constitutive nitric oxide synthase (cNOS) activity in prefrontal cortex in schizophrenia and depression. *Schizophr Res* 58:21-30.
- Xu B, Wratten N, Charych EI, Buyske S, Firestein BL, Brzustowicz LM. 2005. Increased expression in dorsolateral prefrontal cortex of CAPON in schizophrenia and bipolar disorder. *PLoS Med* 2:e263.
- Yildiz F, Erden BF, Ulak G, Utkan T, Gacar N. 2000. Antidepressant-like effect of 7-nitroindazole in the forced swimming test in rats. *Psychopharmacology (Berl)* 149:41-44.
- Yoshikawa T, Kikuchi M, Saito K, Watanabe A, Yamada K, Shibuya H, Nankai M, Kurumaji A, Hattori E, Ishiguro H, Shimizu H, Okubo Y, Toru M, Detera-Wadleigh SD. 2001. Evidence for association of the myo-inositol monophosphatase 2 (IMPA2) gene with schizophrenia in Japanese samples. *Mol Psychiatry* 6:202-210.
- Zhang Y, Yu X, Yuan Y, Ling Y, Ruan Y, Si T, Lu T, Wu S, Gong X, Zhu Z, Yang J, Wang F, Zhang D. 2004. Positive association of the human frizzled 3 (FZD3) gene haplotype with schizophrenia in Chinese Han population. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 129:16-19.
- Zheng Y, Li H, Qin W, Chen W, Duan Y, Xiao Y, Li C, Zhang J, Li X, Feng G, He L. 2005. Association of the carboxyl-terminal PDZ ligand of neuronal nitric oxide synthase gene with schizophrenia in the Chinese Han population. *Biochem Biophys Res Commun* 328:809-815.
- Zou F, Li C, Duan S, Zheng Y, Gu N, Feng G, Xing Y, Shi J, He L. 2005. A family-based study of the association between the G72/G30 genes and schizophrenia in the Chinese population. *Schizophr Res* 73:257-261.

Danksagung

Danken möchte ich Herrn Prof. Dr. K.P. Lesch für die Vergabe der Arbeit und die Möglichkeit zur Durchführung molekularbiologischer Experimente in seinem Labor.

Danken möchte ich ganz besonders Herrn PD Dr. A. Reif, der meine Arbeit sehr gut betreut hat und mir stets Rat und Tat beiseite stand.

Herrn Prof Dr. U. Walter danke ich für die Übernahme des Korreferats.

Herrn Prof. Dr. J. Deckert, dem Direktor der Klinik für Psychiatrie, Psychosomatik und Psychotherapie der Universität Würzburg, möchte ich für die Möglichkeit zur Promotion an der Klinik bedanken.

Danken möchte ich auch Frau Töpner für die exzellente Betreuung der Versuche.

Frau Prof. Dr. Dipl. theol. C. M. Freitag danke ich für die Erstellung der Statistik.

Herrn Prof. Dr. M. Zimmer und Mitarbeitern danke ich für die Kooperation.

Ganz besonderer Dank gilt meinen Eltern, ohne die meine akademische Ausbildung und diese Promotionsarbeit nie möglich gewesen wäre.

Ulla Kuhne, Sonja Rabus, Caroline Büchner, Nicola Glaser-Gallion, Katharina Zipp, Nicole Steinert, Johanna Finke und Christiane Albrecht danke ich für die stetige Ermutigung und all die Kraft, die mir durch unsere jahrelange Freundschaft gegeben wurde.

Zuletzt danke ich Kristen, dem wichtigsten Part in meinem Leben, auf dessen Unterstützung ich mich immer verlassen konnte.