

**Aus der
Klinik und Poliklinik für Psychiatrie, Psychosomatik und Psychotherapie
der Universität Würzburg
Direktor: Professor Dr. med. Deckert**

DAAO-Haplotypanalyse bei Schizophrenien und bipolaren Psychosen

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät**

der

**Julius-Maximilians-Universität Würzburg
vorgelegt von
Jennifer Lee Thoma
aus Hardheim**

Würzburg, Oktober 2009

Referent: Prof. Dr. A. Reif

Koreferent: Priv-Doz. Dr. Th. Bohrer

Dekan: Prof. Dr. M. Frosch

Tag der mündlichen Prüfung:

16. Februar 2010

Die Promovendin ist Ärztin

Meinen Eltern in Liebe und Dankbarkeit gewidmet

Inhaltsverzeichnis

| | | |
|------------|---|-----------|
| 1 | Einleitung | 1 |
| 1.1 | Das Krankheitsbild Schizophrenie | 1 |
| 1.1.1 | Historischer Überblick und aktuelle Klassifikation | 1 |
| 1.1.2 | Ätiologie | 6 |
| 1.1.3 | Biochemische Befunde | 6 |
| 1.1.3.1 | <i>Die Dopaminhypothese</i> | 6 |
| 1.1.3.2 | <i>Die Glutamathypothese</i> | 6 |
| 1.1.3.3 | <i>Die Serotoninhypothese</i> | 7 |
| 1.1.4 | Genetik der Schizophrenie | 9 |
| 1.2 | Bipolare Psychosen | 11 |
| 1.2.1 | Gemeinsamkeiten der Schizophrenie und der bipolaren Störung | 12 |
| 1.3 | D-Aminosäure-Oxidase (DAAO, D-amino-acid-oxidase) | 13 |
| 1.3.1 | Vorkommen und Funktion von DAAO | 14 |
| 1.3.2 | DAAO und Schizophrenie | 16 |
| 2 | Fragestellung | 17 |
| 3 | Materialien und Methoden | 18 |
| 3.1 | Materialien | 18 |
| 3.1.1 | Patienten-Kollektiv | 18 |
| 3.1.2 | Material für PCR und Gelelektrophorese | 20 |
| 3.1.2.1 | <i>Geräte</i> | 20 |
| 3.1.2.2 | <i>Chemikalien</i> | 21 |
| 3.1.2.3 | <i>Puffer</i> | 21 |
| 3.1.2.4 | <i>cDNA-Herstellung</i> | 22 |
| 3.1.2.5 | <i>Nucleotide</i> | 22 |
| 3.1.2.6 | <i>Enzyme</i> | 22 |
| 3.1.2.7 | <i>Wasser</i> | 22 |
| 3.1.2.8 | <i>Oligonucleotidprimer</i> | 22 |

| | | |
|------------|--|-----------|
| 3.1.3 | Material für Allel-spezifische Primerextension und die MALDI-ToF Massenspektrometrie | 24 |
| 3.1.3.1. | <i>Geräte</i> | 24 |
| 3.2.3.2. | <i>Chemikalien</i> | 24 |
| 3.1.4. | Software | 25 |
| 3.2 | Methoden | 26 |
| 3.2.1 | Polymerasekettenreaktion | 26 |
| 3.2.1.1. | <i>Reaktionsansätze</i> | 28 |
| 3.2.1.2. | <i>Programmierung des Thermocyclers</i> | 28 |
| 3.2.2 | Agarose-Gelelektrophorese | 29 |
| 3.2.3. | Sequenom MassArray-Technologie | 32 |
| 3.2.3.1. | <i>Verdau mit alkalischer Phosphatase für die iPLEX Reaktion</i> | 32 |
| 3.2.3.2. | <i>iPLEX Reaktion, Single Base Extension Reaktion</i> | 32 |
| 3.2.3.3. | <i>Reinigung durch das Ionenaustauschharz</i> | 33 |
| 3.2.4. | MALDI-ToF | 34 |
| 3.2.5 | Haplotypanalyse und statistische Analyse | 35 |
| 4 | Ergebnisse | 36 |
| 4.1 | Assoziation von DAAO mit schizophrenen Psychosen | 36 |
| 4.2. | Assoziation von DAAO mit bipolaren Psychosen | 39 |
| 5 | Diskussion | 43 |
| 5.1. | Gegenstand und Ziel der Arbeit | 43 |
| 5.2. | DAAO in bisherigen Untersuchungen | 45 |
| 5.3. | Der 12q22-24-Locus als Hotspot für Schizophrenien und bipolare Psychosen | 48 |
| 5.4. | DAAO und seine Interaktion mit DAOA | 49 |
| 5.5. | Vergleich bisheriger Befunde mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit | 50 |
| 6 | Zusammenfassung | 51 |

Danksagung

Curriculum vitae

Tabellenverzeichnis

| | |
|---|-----------|
| Tabelle 1: Symptome 1. und 2. Ranges nach Kurt Schneider | 2 |
| Tabelle 2: Diagnosekriterien der Schizophrenie nach ICD-10 | 3 |
| Tabelle 3: Subtypisierung der Schizophrenien in der ICD-10 | 4 |
| Tabelle 4: Sequenzen der verwendeten Primer | 23 |
| Tabelle 5: PCR-Reaktionsansätze | 28 |
| Tabelle 6: Einzelmarkerdaten Schizophrenie | 36 |
| Tabelle 7: Haploblock Schizophrenie (Gabriel) | 38 |
| Tabelle 8: Haploblock Schizophrenie (Solid Spine) | 38 |
| Tabelle 9: Einzelmarkerdaten bipolare Psychosen | 39 |
| Tabelle 10: Haploblock bipolare Psychosen (Gabriel) | 41 |
| Tabelle 11: Haploblock bipolare Psychosen (Solid Spine) | 41 |

Abbildungsverzeichnis

| | |
|--|-----------|
| Abbildung 1: Multifaktorielle Entstehung der Schizophrenie | 5 |
| Abbildung 2: LOD-Scores von Makern am Locus 12q24 | 14 |
| Abbildung 3: Schematische Darstellung des PCR-Zyklus | 27 |
| Abbildung 4: Schematische Darstellung der Agarose-Gelelektrophorese | 30 |
| Abbildung 5: a)-e) Gelelektrophorese-Bilder | 31 |
| Abbildung 6: Aufbau eines ToF- Massenanalysators | 34 |
| Abbildung 7: LD Plot Schizophrenie (Solid Spine) | 37 |
| Abbildung 8: LD Plot bipolare Psychosen (Gabriel) | 40 |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|------------------|--|
| AMPA | Alpha-Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazol-Propionat |
| Bip/ BPD | Bipolar Disorder (Bipolare Störung) |
| bzw. | beziehungsweise |
| 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 |
| DASPO | D-Aspartat-Oxidase |
| DdNTP/ DNTP | Dideooxynucleotides |
| DNA | Deoxyribonucleic acid |
| DISC | Disrupted in schizophrenia |
| DSM | Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders |
| DTNBP | Dysbindin |
| EEO | Equal Employment Opportunity |
| EDTA | Ethylenediaminetetraacetic acid |
| GABA | Gamma-amino-buttersäure |
| GI | Gyrifizierungsindex |
| GAD | L-glutamic acid decarboxylase |
| GAT | Guidance automatic toolkid |
| GKAP | Guanylatkinase-domain-associated protein |
| Glu | Glutamat |
| Gly T | Glycine transporter |
| HCL | Hydrogen chloride |
| HC | Heavy chain |
| H ₂ O | Hydrogen oxide/ Wasser |
| 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 | Kilo Dalton |
| kb | Kilo base |
| KIF | Kinesin |
| LD | Linkage Disequilibrium |
| LIC | Light intermedate chain |
| LOD | Logarithm of odds |
| MALDI-TOF | Matrix-assisted Laser Disorption Ionisation Time of flight |

| | |
|------------------------------|---|
| MgCl | Magnesium Chlorid |
| mGlu | Metabotroper Glutamatrezeptor |
| MRT | Magnetresonanz Tomographie |
| MS | Massenspektrometer |
| NaCl | Natrium Chlorid |
| NADPH | Nicotinamide adenide dinucleotide phosphat (Reduced form) |
| NH ₄ ⁺ | Ammonium |
| NH ₄ Cl | Ammonium chloride |
| NET | Noradrenalintransporter |
| NMDAR | N-Methyl-D-Aspartat-(Rezeptor) |
| NO | Nitric oxide (Stickstoffmonoxid) |
| NOS | NO-Synthase |
| Nuk | Nukleotide |
| O ₂ | Oxygen |
| 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 | Positron emission tomography |
| PFK-M | Phosphofruktokinase |
| 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 |
| Sog. | Sogenannt |
| SPECT | Single photon emission computed tomography |
| SPSS | Statistical package for the social sciences |
| STR | Short tandem repeat |
| TOF | Time of flight |
| UV | Ultraviolett |
| VNTR | Variation number of tandem repeats |
| WHO | World health organisation |
| z.B. | Zum Beispiel |

1 Einleitung

1.1 Das Krankheitsbild Schizophrenie

1.1.1 Historischer Überblick und aktuelle Klassifikation

Bereits in Antike und Mittelalter waren Geisteskrankheiten bekannt. Lange gab es jedoch keine klare Abgrenzung der Krankheiten untereinander. Im späten 19. Jahrhundert beschrieb Emil Kraepelin (1856–1926) dann das Krankheitsbild der Schizophrenie als „Dementia praecox“ und grenzte es von dem gutartig verlaufenden „manisch-depressiven Irresein“ ab. Der Schweizer Psychiater Egon Bleuler (1857–1939) machte in seiner Arbeit von 1911 den Vorschlag, aufgrund der Heterogenität der Erkrankung von einer „Gruppe der Schizophrenien (schizo = ich spalte, phren = Geist)“ zu sprechen. Dessen Einteilung stützte sich auf das Vorhandensein von Grund-, akzessorischen, sowie Primär- und Sekundärsymptomen der Schizophrenie (Bleuler 1911).

Karl Leonhard (1904–1988) knüpfte dagegen zusammen mit Karl Kleist (1879–1960) an die Arbeiten von Carl Wernicke (1848–1905) an. Sie definierten distinkte psychiatrische Krankheitseinheiten, die hinsichtlich ihrer Symptomatik, Genese, familiären Belastung, Verlauf und Therapie scharf voneinander abzugrenzen seien. Leonhard arbeitete diesen Ansatz 1980 am prägnantesten in seiner „Einteilung der endogenen Psychosen“ heraus. Einen ganz anderen nosologischen Ansatz vertretend, definierte Kurt Schneider (1887–1967) im Jahr 1957 Symptome des ersten und zweiten Ranges, die im Hinblick auf Diagnostik und Einteilung hilfreich sein sollen (Tab. 1).

1. Einleitung

| <u>Symptome 1. Ranges</u> | <u>Symptome 2. Ranges</u> |
|--|---|
| <ul style="list-style-type: none">▪ Gedankenlautwerden▪ Hören von Stimmen in der Form von Rede und Gegenrede▪ Hören von Stimmen, die das Eigene Tun mit Bemerkungen begleiten▪ leibliche Beeinflussungserlebnisse▪ Gedankenentzug und andere Gedankenbeeinflussungen▪ Gedankenausbreitung▪ Wahrnehmungen▪ alles von anderen Gemachte und Beeinflusste auf dem Gebiet des Fühlens, Strebens (der Triebe) und des Wollens | <ul style="list-style-type: none">▪ die übrigen Sinnestäuschungen▪ Wahneinfälle▪ Ratlosigkeit▪ depressive und frohe Verstimmungen▪ erlebte Gefühlsverarmung |

Tabelle 1: Symptome 1. und 2. Ranges nach Kurt Schneider

1. Einleitung

Heute gelten im Allgemeinen die diagnostischen Kriterien der ICD-10 (Tabelle 2) und des DSM-IV (Tabelle 3). Hier wird deutlich, dass die Kriterien nach Schneider weitgehend in die modernen Diagnosekriterien Eingang gefunden haben. Die Diagnose einer Schizophrenie kann gestellt werden, wenn mindestens ein eindeutiges Symptom der Gruppe 1–4 oder mindestens zwei Symptome der Gruppe 5–9 für einen Zeitraum von mindestens einem Monat bestanden haben. Besonders zu erwähnen ist, dass zum ersten Mal auch reine „negative“ Symptome in den Diagnosekriterien aufgelistet werden, nämlich die der Gruppen 8 und 9.

| <u>Kriterien-</u> | <u>Symptomatik</u> |
|-------------------|---|
| <u>Gruppe</u> | |
| 1 | Ich-Störungen (Gedankenlautwerden, Gedankeneingebung, Gedankenentzug, oder Gedankenausbreitung) |
| 2 | Inhaltliche Denkstörungen in Form von Kontrollwahn, Beeinflussungswahn, Gefühl des Gemachten, Wahnwahrnehmungen) |
| 3 | Akustische Halluzinationen in Form kommentierender, dialogischer oder anderer Stimmen, die aus einem Teil des Körpers kommen |
| 4 | Anhaltender, kulturell unangemessener oder völlig unrealistischer (bizarrer) Wahn (z.B. das Wetter kontrollieren zu können oder im Kontakt mit Außerirdischen zu sein) |
| 5 | Anhaltende Halluzinationen jeder Sinnesmodalität |
| 6 | Formale Denkstörungen in Form von Gedankenabreißen oder Einschlebung in den Gedankenfluss, was zu Zerfahrenheit, Danebenreden oder Wortneubildungen (Neologismen) führt |
| 7 | Katatone Symptome wie Erregung, Haltungstereotypen oder wächserne Biagsamkeit (Flexibilitas cerea), Negativismus, Mutismus und Stupor |
| 8 | „Negative“ Symptome wie auffällige Apathie, Sprachverarmung, verflachter oder inadäquater Affekt, zumeist mit sozialem Rückzug und verminderter sozialer Leistungsfähigkeit |
| 9 | Sehr eindeutige und durchgängige Veränderungen bestimmter umfassender Aspekte des Verhaltens, die sich in Ziellosigkeit, Trägheit, einer „in sich selbst verlorenen Haltung“ und sozialem Rückzug manifestieren |

Tabelle 2: Diagnosekriterien der Schizophrenie nach ICD-10

1. Einleitung

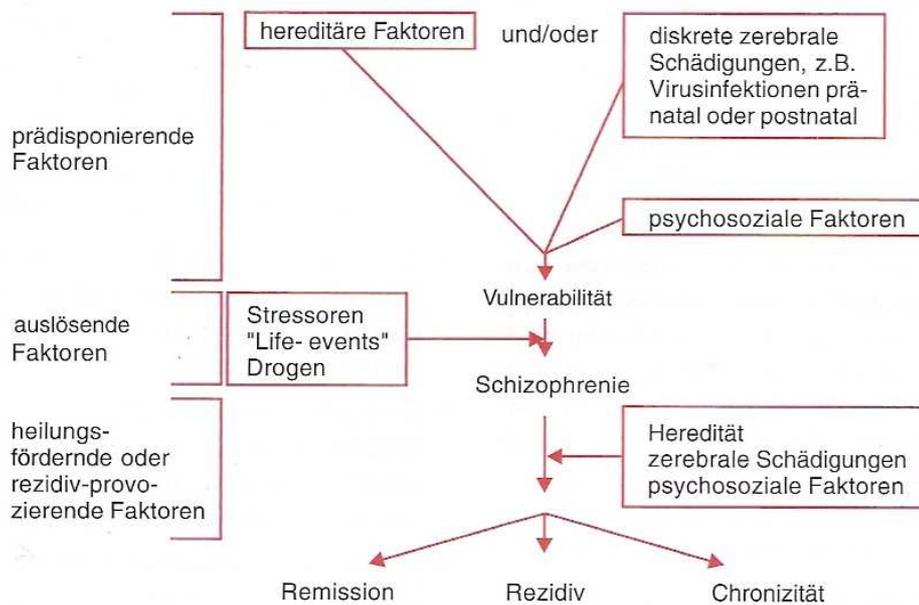
In der ICD-10 werden verschiedene Subtypen der Schizophrenien unterschieden. Die paranoide Schizophrenie, die am häufigsten vorkommt (40%), gehört zusammen mit der hebephrenen (15%), sowie der katatonen (15%) Schizophrenie zu den drei „klassischen“ Formen. Die Tabelle 3 gibt einen Überblick über die Subtypen der Schizophrenie (ICD-10 Codenummer F20.x).

| <u>Code</u> | <u>Subtyp</u> | <u>Charakterisierung</u> |
|-------------|---|---|
| F 20.0 | Paranoide Schizophrenie | Paranoid-halluzinatorisches Erleben im Vordergrund |
| F 20.1 | Hebephrene Schizophrenie | Affekt-, Antriebs- und formale Denkstörung im Vordergrund |
| F 20.2 | Katatone Schizophrenie | Psychomotorische (katatone) Symptome im Vordergrund |
| F 20.3 | Undifferenzierte Schizophrenie | Zustandsbilder, die die Schizophreniekriterien erfüllen, ohne jedoch einer der Unterformen F 20.0–20.2 zu entsprechen |
| F 20.4 | Postschizophrene Depression | Depressive Episode, die innerhalb eines Jahres nach einer schizophrenen Episode auftritt. Schizophrene Symptome müssen noch vorhanden sein, beherrschen aber nicht mehr das klinische Bild. |
| F 20.5 | Schizophrenes Residuum | Folgezustand einer Schizophrenie mit im Vordergrund stehender Negativsymptomatik |
| F 20.6 | Schizophrenia simplex („blande Psychose“) | Vorsichtig zu stellende Ausschlussdiagnose, die sich durch einen langsamen, chronisch progredienten Verlauf mit schizophrener Residualsymptomatik ohne charakteristische psychotische Symptome auszeichnet. |

Tabelle 3: Subtypisierung der Schizophrenien in der ICD-10

1.1.2 Ätiologie

Die Schizophrenie ist keine ätiologisch einheitliche Erkrankung. Als gesicherte Hypothesen für Ätiologie und Pathophysiologie gelten ein genetischer Beitrag, sowie eine Beteiligung neurobiologischer Veränderungen im Gehirn, zu einem geringeren Anteil auch psychosoziale Faktoren. Am wahrscheinlichsten ist eine multifaktorielle Genese (Abbildung 1) (Ebert 2005):



Je stärker hereditäre Faktoren oder zerebrale Schädigungen sind, um so mehr treten psychosoziale Vulnerabilität und auslösende Faktoren bei der Entstehung der Schizophrenie und der Verlaufsgestaltung zurück.

Abbildung 1: Multifaktorielle Entstehung der Schizophrenie

1.1.3 Biochemische Befunde

Mit der Schizophrenie werden pathogenetisch hauptsächlich drei Neurotransmittersysteme in Verbindung gebracht, nämlich das dopaminerge, das glutamaterge, sowie das serotonerge System.

1.1.3.1 Die Dopaminhypothese

Die Dopaminhypothese der Schizophrenie (Carlsson 1967) prägte über Jahrzehnte hinweg die biologische Forschung. Sie postuliert prä- und postsynaptische Regulationsstörungen des Dopaminstoffwechsels, die in einer Überaktivität dopaminerger Neurone resultiert. Sie beruht auf der Beobachtung, dass Antipsychotika, zumindest die sog. „klassischen“, zu einer Blockade der Dopaminrezeptoren führen, vor allem des D₂-Subtyps. Hierbei korreliert die antipsychotisch wirksame Dosis der Substanz mit der Affinität zum Dopaminrezeptor (Kapur et al. 1996). Außerdem lassen sich durch die Einnahme von dopaminergen Substanzen, wie Amphetamin, akut psychotische Symptome induzieren. Zweifel an dieser Hypothese kamen auf, weil die Blockade der Dopamin-D₂-Rezeptoren bereits nach Minuten bis Stunden einsetzt, die antipsychotische Wirkung der Neuroleptika allerdings erst nach Tagen bis Wochen eintritt.

1.1.3.2 Die Glutamathypothese

Glutamat ist der wichtigste exzitatorische Neurotransmitter im Gehirn. Es wirkt u. a. über NMDA-(N-Methyl-D-Aspartat), AMPA-(alpha-Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazol-Propionat) und Kainat-Rezeptoren. In größeren Mengen gilt es als Neurotoxin. Antagonistisch dazu ist der wichtigste hemmende Transmitter die Gamma-Aminobuttersäure (GABA).

Anfang der 80er Jahre wurde die Glutamathypothese der Schizophrenie postuliert, die eine glutamaterge Unteraktivität annimmt (Tuominen 2005). Sie basiert auf Befunden über verminderte Glutamat-Konzentrationen im Liquor schizophrener Patienten (Kim 1980). In einer kurz darauf veröffentlichten Studie konnten diese Ergebnisse jedoch nicht repliziert werden (Gattaz 1982).

Anfang der 90er Jahre beobachtete man einen psychotropen Effekt der nicht-kompetitiven Glutamatrezeptor-Antagonisten (Lieberman 1993). Es war möglich, mittels des NMDA-Antagonisten Phencyclidin (PCP) eine „Modellpsychose“ bei Adoleszenten zu erzeugen, die sowohl Positiv-, als auch Negativsymptome, sowie kognitive Defizite aufwies (Javitt 1991). Auch durch das Narkosemittel Ketamin, ebenfalls ein NMDA-Rezeptor-Antagonist, können ähnliche Symptome ausgelöst werden (Becker 2004). Glutamat-Antagonisten können sowohl schizophreniforme Psychosen in ansonsten psychiatrisch gesunden Personen auslösen, als auch eine Exazerbation der Psychose bei stabilen chronisch Schizophrenen bewirken (Schosser and Aschauer 2004).

Auch in post-mortem Untersuchungen ließen sich Hinweise, die die Glutamat-Hypothese untermauern, finden. Aufgrund inkonsistenter Befunde schloss man auf eine abnorme Expression der verschiedenen Glutamat-Rezeptor-Subtypen (Harrison et al. 1991). So fand man eine verminderte Anzahl von NMDA-Rezeptoren im Temporallappen (Meador-Woodruff 2003) und im präfrontalen Kortex (Toyooka 2002).

Aufgrund verschiedener Befunde einer verminderten Konzentration von GABA und GABAerger Interneurone im Gehirn kam Akbarian 1996 zu dem Schluss, dass durch die geringere Anzahl dieser Interneurone deren Hemmfunktion auf Glutamat weniger ausgeprägt ist. Hierdurch kommt es zu einer erhöhten Glutamatausschüttung in neurotoxischen Konzentrationen mit einem reflektorischen Rezeptoranstieg (Akbarian 1996).

Carlsson hob die Interaktion zwischen dem dopaminergen und glutamatergen System hervor, und zog eine partielle Stimulation und Inhibition der beiden Systeme in Betracht (Carlsson 1990)

1.1.3.3 Die Serotoninhypothese

Die psychotomimetischen Effekte von Lysergsäure-Diethyl-Amid (LSD), das eine strukturelle Ähnlichkeit zu Serotonin (5-HT) aufweist, weckte das Interesse an serotonergen Mechanismen. 5-HT hat Anteil an zahlreichen Funktionen, die bei der Schizophrenie gestört sind. Die Serotonin-Hypothese wird im Weiteren durch Veränderungen von 5-HT₂-Rezeptoren bei schizophrenen Patienten

1. Einleitung

unterstützt. Für diese Hypothese spricht außerdem, dass atypische Antipsychotika wie Risperidon und Clozapin auch eine Blockade von 5-HT_{2a}-Rezeptoren bewirken.

1.1.4 Genetik der Schizophrenie

Nachdem neurochemische und formalgenetische Untersuchungen lange Zeit im Vordergrund der Ursachenforschung standen, gewannen in den letzten Jahren molekulargenetische Studien immer mehr an Bedeutung.

Bereits Kraepelin hatte betont, dass bei schizophrenen Psychosen eine familiäre Häufung zu beobachten ist. Die Ergebnisse früherer Familienstudien, die vorwiegend in Skandinavien durchgeführt wurden, ließen eine erste Festlegung der Risikoziffern zu (McGue 1991). Demnach besteht für Verwandte ersten Grades ein ca. 10%iges Erkrankungsrisiko, mit zunehmender Entfernung im Verwandtschaftsgrad nimmt auch das Erkrankungsrisiko ab. Laut einer aktuelleren Studie besteht für die Schizophrenie in der Allgemeinbevölkerung ein Erkrankungsrisiko von etwa 1%, für Kinder schizophrener Eltern (bei einem erkrankten Elternteil) liegt die Erkrankungsrate bei 13%. Die Konkordanzrate bei zweieiigen Zwillingen beträgt 17%, bei eineiigen 48% (Gottesman 2001), so dass nach der Galtonschen Regel von einer erheblichen hereditären Komponente auszugehen ist. In Adoptionsstudien, in denen Kinder Schizophrener, die durch Adoption bei gesunden Eltern aufwuchsen, mit Kindern, die bei ihren biologischen Eltern aufwuchsen, verglichen wurden, konnte wiederholt eine ähnliche Heritabilität beobachtet werden (Kety et al. 1994). Hiermit wurde deutlich, dass im Gegensatz zu früheren Annahmen die familiären Umgebungsfaktoren nahezu vernachlässigbar sind.

Um die Genetik der Schizophrenie näher zu untersuchen, wurden verschiedenste Methoden eingesetzt. In Familien mit mehreren erkrankten Familienmitgliedern können sogenannte Kopplungsanalysen durchgeführt werden. Hierbei werden zahlreiche DNA-Sequenzen als Marker einer chromosomalen Region ausgewählt und untersucht, ob diese mit der Erkrankung gemeinsam vererbt werden.

Eine andere Untersuchungsmethode sind Assoziationsanalysen. Ziel dieser Untersuchungen sind genetische Varianten bestimmter „Kandidatengene“, also Gene, die im Verdacht stehen, eine wichtige Rolle in der Pathogenese der Erkrankung zu spielen. Es werden hierbei große Gruppen von an Schizophrenien erkrankten Patienten mit ebenso großen Gruppen von

1. Einleitung

gesunden Vergleichspersonen analysiert. Als genetische Marker werden Einzelbasenpolymorphismen (Single Nucleotide Polymorphisms; SNPs), oder Repeatpolymorphismen (Di-, Tri- oder andere Polynukleotide; VNTR, Variable Number of Tandem Repeats) untersucht.

Die Variabilität des menschlichen Genoms ist ganz wesentlich durch Unterschiede in der DNA-Sequenz in Form von SNPs geprägt. Hiervon gibt es im Genom ca. drei Millionen, aber nur wenige sind für die Krankheitsentstehung verantwortlich. Durch die Haplotyp-Blockstruktur des Genoms ist es jedoch nicht nötig, im Rahmen von Assoziationsuntersuchungen jeden SNP in einem betreffenden Gen zu untersuchen. Die Untersuchung der bei einem Menschen vorliegenden Varianten kann also auf eine geringere Anzahl begrenzt bleiben und die restlichen können abgeleitet werden.

Auf dem Genom wechseln sich weite Blöcke mit fast gar keinen Rekombinationsereignissen mit Bereichen mit sehr ausgeprägter Rekombinationsaktivität („Hot-Spots“) ab. Durch die Abhängigkeit der Allele unterschiedlicher Polymorphismen innerhalb der Blöcke ist die beobachtete Zahl von Allelkombinationen stark eingeschränkt. Diese Allelkombinationen bezeichnet man als Haplotyp. Innerhalb eines Blockes findet man meist einige wenige häufige Haplotypen, die meist durch einige wenige Varianten sicher unterschieden werden können, so dass die Anzahl von Polymorphismen, die einen Haploblock charakterisieren, stark abnimmt. Wenn also die Blockstruktur bekannt ist, ist auch die Suche nach krankheitsverursachenden Haplotypen sehr viel einfacher (Freudenberg 2002).

1.2 Bipolare Psychosen

Unter bipolaren Störungen versteht man affektive Störungen, bei denen sowohl manische als auch depressive Episoden vorkommen. Die ICD-10 unterteilt 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 Zylothymie und Dysthymie (F34). Die bipolare Erkrankung besteht aus manischen und (meist häufigeren) depressiven Episoden, unterbrochen von Phasen mit normaler oder annähernd normaler Stimmungslage.

Diagnosekriterien der manische Phase sind nach ICD-10 euphorische oder dysphorische Stimmung, Antriebssteigerung, Ideenflucht, Ablenkbarkeit, vermindertes Schlafbedürfnis, gesteigerte Libido, Größenwahn, Verlust sozialer Hemmungen, tollkühnes Verhalten, gesteigerte Geselligkeit und Vertraulichkeit. Die Kriterien der depressiven Episode sind im Gegensatz dazu deprimierter Affekt, Interessenverlust, Antriebsminderung, Konzentrationsstörungen, vermindertes Selbstwertgefühl, Schuldgefühle, Suizidgedanken, Schlafstörungen, verminderter oder gesteigerter Appetit und psychomotorische Agitiertheit oder Hemmung.

In mehreren Zwillingsstudien konnte mit ca. 80-90% eine hohe Erblichkeit für bipolare Psychosen nachgewiesen werden (Kendler 2001, McGuffin 2003, Kieseppä 2004, Craddock 2006).

Anhand von Kopplungsanalysen, molekulargenetischer Studien und genetischer Epidemiologie gibt es zunehmende Hinweise auf Gemeinsamkeiten in der Vererbung von bipolaren Störungen und schizophrenen Psychosen. So fand z.B. Berretini in Zwillings- und Adoptionsstudien eine gemeinsame genetische Basis für bipolare Psychosen und Schizophrenien (Berretini 2002).

1.2.1 Gemeinsamkeiten der Schizophrenie und der bipolaren Störung

Schizophrene und bipolare Erkrankungen treten beide weltweit mit einer Lebenszeitprävalenz von 1% auf, und zwar gehäuft mit einem Ersterkrankungsalter zwischen dem 15. und dem 25. Lebensjahr, und können beide in Schüben verlaufen. Männer und Frauen sind in gleichem Maße betroffen (Tsuang 2002). Es können auch psychotische Symptome wie Halluzinationen, Wahnvorstellungen oder Denkstörungen vorhanden sein, wenn auch diese keine bei den bipolaren Störungen zentralen Krankheitsmerkmale darstellen. Bei beiden Erkrankungen besteht ein erhöhtes Suizidrisiko. Auch in der Therapie bestehen Gemeinsamkeiten. So werden z.B. Stimmungsstabilisatoren, die Therapie der ersten Wahl bei bipolaren Störungen sind, z. T. auch bei Schizophrenien eingesetzt. Umgekehrt besitzen die Medikamente der Wahl bei schizophrenen Störungen, nämlich atypische Antipsychotika, auch stimmungsstabilisierende und antimanische Wirkungen. Familienstudien zeigten, dass erstgradig Verwandte von Schizophreniepatienten und von Patienten mit bipolarer Erkrankung ein erhöhtes Risiko haben, sowohl an einer schizoaffektiven Psychose als auch an einer unipolaren Störung zu erkranken (Kendler 1997, Somnath 2002). Bei der Summe an Gemeinsamkeiten liegt es also nahe, nach Genen zu suchen, die als Kandidatengen für beide Erkrankungen fungieren. In der Tat wurden bislang bereits mehrere gemeinsame Kandidatengene für beide Erkrankungen entdeckt: Das auf dem Chromosom 13q32 befindliche Gen G72 scheint mit beiden Erkrankungen assoziiert zu sein (Chumakov et al. 2002, Hattori 2003). Dies ist besonders wichtig, da G72 der Aktivator für das in der vorliegenden Arbeit untersuchte Gen D-Aminosäure-Oxidase (DAAO) auf 12q24-11 ist, das ebenfalls sowohl mit Schizophrenien als auch bipolaren Psychosen assoziiert ist (Sklar 2002). Ein weiterer Hotspot ist 12q24-2, das u.a. Locus des NOS1-Gens ist (Ewald 1998, Detera-Wadleigh 1999, Degn 2001, Curtis 2003, Shink 2005).

1.3 D-Aminosäure-Oxidase (DAAO, D-amino-acid-oxidase)

Ein Ansatz, Kandidatengene zu identifizieren, ist es, Genregionen feiner zu kartieren, die für eine Kopplung mit der Erkrankung bekannt sind. Von mehreren Arbeitsgruppen konnten in jüngster Vergangenheit erstmals Vulnerabilitätsgene für Schizophrenie identifiziert und repliziert werden. Die meisten dieser Kandidatengene wurde mit einem zweistufigen Verfahren identifiziert: zunächst wurde die grobe chromosomale Region mittels Kopplungsanalysen dargestellt, woran sich dann eine weitere Einschränkung des Bereiches („fine mapping“) anschloss. Wenn die Region dann nur noch wenige Gene umfasste, wurden Assoziationsuntersuchungen der darin enthaltenen Gene durchgeführt; letztere Methode kam dann auch zum Einsatz, um gefundene Gene zu replizieren.

Zu den Regionen von besonderem Interesse für die Schizophrenien gehören die Chromosomen 12q, sowie 13q (Lin et al. 1995, Shaw et al 1998., Levinson 2000). Durch Linkage-Analysen konnten Blouin et al. (Blouin et al. 1998) und Brzustowicz et al. (Brzustowicz et al. 1999) die letztere Region auf 13q32-34 einschränken (Christian 2002). Zunächst konnten in dieser Region jedoch keine Kandidatengene gefunden werden, bis Chumakov et al. (Chumakov et al. 2002) zwei sich überlappende Gene fanden, G72 und G35, die eine signifikante Assoziation zu schizophrenen Psychosen zeigten. Auf 13q liegt das Gen G72, welches als D-Aminosäure-Oxidase-Aktivator (DAOA) gilt. Angesichts dieser Ergebnisse lag es nahe, auch DAAO selbst genauer zu untersuchen (Schumacher et al. 2004, Liu 2004, Lyons-Warren 2005, Liu 2006).

12q22-24 wurde in den letzten Jahren konstant als ein mit Schizophrenie gekoppelter Locus mit LOD-Scores von 2 bis 3 publiziert (Abbildung 2). Diese weisen auf eine starke Assoziation mit Schizophrenien oder affektive Psychosen hin. Das Gen für die D-Aminosäure-Oxidase befindet sich auf 12q24, so dass dieses Gen gleichermaßen ein positionales und funktionelles Kandidatengen ist.

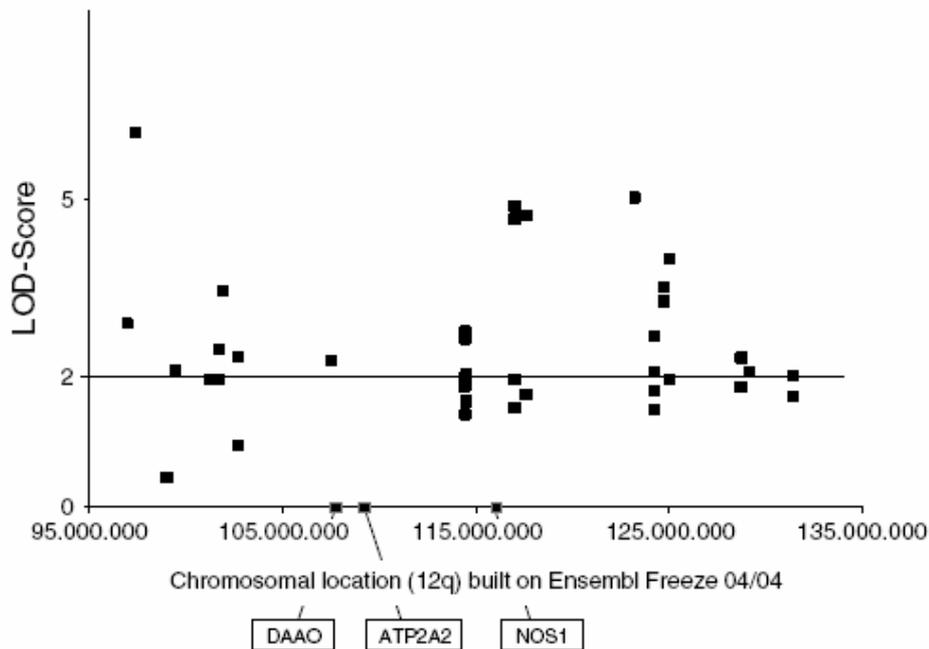


Abbildung 2: LOD-Scores von Makern am Locus 12q24 (Reif 2006)

1.3.1 Vorkommen und Funktion von DAAO

DAAO wurde erstmals 1935 in der Niere und der Leber von Säugetieren gefunden (Krebs 1935, Krebs 1951). Das DAAO-Gen kodiert ein aus 356 Aminosäuren bestehendes Protein mit einem errechneten Molekulargewicht von 39,3 kDa (Fisher 1991). Es besteht aus 11 Exons, verteilt auf eine Region von ungefähr 25 kb auf dem menschlichen Chromosom 12q24-11. Im menschlichen Gehirn findet man eine Expression des Gens vor allem in der Glia des Cerebellums, aber auch im Hirnstamm und im Rückenmark.

DAAO katalysiert die oxidative Desaminierung von D-Aminosäuren, mit Ausnahme von D-Aspartat und D-Glutamat, die von der D-Aspartat-Oxidase (DASPO) oxidiert werden (Bloulin et al. 1998, Sacchi 2002). Unter physiologischen Bedingungen oxidiert DAAO auch D-Serin, welches ein allosterischer Aktivator des NMDA-Rezeptors ist. D-Aminosäuren sind Enantiomere ihrer Gegenstücke, der L-Aminosäuren. D-Aminosäuren, wie D-Serin, spielen offenbar eine wichtige Rolle in der Neurotransmission (Schell

1. Einleitung

1995). D-Serin ist ein Co-Agonist des Glutamat-Rezeptors, der wiederum als wichtiger Faktor in der Pathogenese der Schizophrenie vermutet wird. Es gibt zwei verschiedene Gruppen von Glutamat-Rezeptoren, die liganden-gesteuerten und die G-Protein-gekoppelten Rezeptoren. Die liganden-gesteuerten Glutamat-Rezeptoren lassen sich unterteilen in alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionische Säure (AMPA-), Kainat- und N-methyl-D-Aspartat (NMDA)-Rezeptoren (Schiffer 2002). Diese liganden-gesteuerten Glutamat-Rezeptoren fungieren als Ionen-Kanäle, sie öffnen sich durch Glutamat-Bindung und erzeugen ein exzitatorisches Aktionspotential. Der NMDA-Rezeptor spielt eine wichtige Rolle in der neuronalen Plastizität, neuronalen Entwicklung, aber auch der Exotoxizität. Der NMDA-Rezeptor besteht aus zwei verschiedenen Untereinheiten, NR1 und NR2, von denen jeweils zwei den Ionenkanal bilden. NR2 ist die Stelle, an der Glutamat bindet. An NR1 binden die Ko-Agonisten Glycin und D-Serin, er wird deshalb auch „Glycin Modulator Stelle“ (*glycine modulatory site* (GMS)) genannt (Johnson 1987). Die Bindungsstelle für die Aminosäure Glycin bzw. D-Serin muss durch einen dieser Liganden besetzt sein, damit Glutamat in der Lage ist, den NMDA-Rezeptor zu aktivieren.

Aus der Interaktion zwischen G72, dem Aktivator der D-Aminosäure-Oxidase (DAOA), und DAAO resultiert eine Aktivierung von DAAO und somit eine vermehrte Oxidation von D-Serin (zusammen mit Flavin-Adenin-Dinucleotid, (FAD) baut DAAO D-Serin zu Hydroxypyruvat um), was zu einer verminderten Aktivität des NMDA-Rezeptors führt. Eine Assoziation zwischen Veränderungen im D-Serin Metabolismus und Schizophrenie konnte in Studien gezeigt werden, die ergaben, dass der D-Serin-Gehalt in Liquor und Serum von an Schizophrenie Erkrankten vermindert ist (Hashimoto 2003, Hashimoto 2005).

1.3.2 DAAO und Schizophrenie

In einer Studie an einer französisch-kanadischen Bevölkerung mit 213 Patienten und 241 Kontrollpersonen (Chumakov et al. 2002) konnten Chumakov und Mitarbeiter zeigen, dass G72 und DAAO mit schizophrenen Psychosen assoziiert sind. Repliziert wurden diese Befunde in einer deutschen Population (Schumacher et al. 2004). Auch in einer chinesischen Population konnten diese Befunde an 547 Patienten und 536 Kontrollpersonen repliziert werden (Liu 2004). Die Arbeitsgruppe um Lyons-Warren konnte in Studien zum 12q24 Locus ebenfalls positive Befunde nachweisen (Lyons-Warren 2005). In einer Gruppe von 218 Taiwanesischen Familien, die 864 schizophrene Probanden umfasste, konnten Yu-Li Liu et al. jedoch keine Assoziation finden (Liu 2006).

Auch im Hinblick auf bipolare Störungen gibt es vielversprechende Befunde. Hattori et al. fanden eine positive Assoziation von G72, dem Aktivator der D-Aminosäure-Oxidase (DAOA) mit bipolaren Psychosen (Hattori 2003). Diese Befunde konnten in einer kleineren Probandengruppe mit 139 Patienten und 113 Kontrollpersonen von Chen et al. repliziert werden (Chen 2004), ebenso von Schulze et al. (Schulze 2005).

2 Fragestellung

Gegenstand dieser Arbeit war die Untersuchung von 9 SNPs und den entsprechenden Haplotypen im DAAO-Gen bei 246 an chronischer Schizophrenie leidenden Patienten, sowie 90 an bipolaren Störungen erkrankten Patienten im Vergleich zu 362 gesunden Probanden. Es wurden die im DAAO-Gen lokalisierten SNPs rs12579920, rs2070586, rs6539458, rs11830725, rs2070588, rs2111902, rs3741775, rs3825251, und rs3918347 untersucht, da in früheren Studien eine Assoziation zwischen diesen Markern und den Krankheitsbildern Schizophrenie und bipolare Störung gefunden werden konnte. Ziel der vorliegenden Arbeit war, anhand einer Fall-Kontroll-Studie zu untersuchen, ob sich die Befunde in unserem Patientenkollektiv replizieren lassen.

3 Materialien und Methoden

3.1 Materialien

3.1.1 Patientenkollektiv

Die Untersuchung wurde an 246 nicht-verwandten Personen aus dem unterfränkischen Raum durchgeführt, die in der Klinik für Psychiatrie und Psychotherapie der Universität Würzburg rekrutiert wurden. Die Diagnosestellung erfolgte im Rahmen eines ausgedehnten semi-strukturierten Interviews ausschließlich durch erfahrene Fachärzte für Psychiatrie, und soweit vorhanden, in Kombination mit in auswärtigen Krankenhäusern erhobener Diagnostik sowie Fremdanamnese aus dem familiären Umfeld. Die Diagnoseeinteilung erfolgte nach ICD-10 (Tabelle 3).

In der Einteilung nach ICD-10 findet sich folgende Verteilung hinsichtlich der Subgruppen:

| <u>Anzahl</u> <u>der</u> <u>Patienten</u> | <u>Art der Erkrankung nach ICD-10</u> |
|---|---|
| 56 | Paranoide Schizophrenie |
| 39 | Hebephrene Schizophrenie |
| 6 | Katatone Schizophrenie |
| 9 | Undifferenzierte Schizophrenie |
| 25 | Schizophrenes Residuum |
| 7 | Schizophrenia simplex |
| 3 | Schizophrenie, nicht näher spezifiziert |
| 13 | Wahnhafte Störung |
| 37 | Schizoaffektive Störung |

3. Material und Methoden

Das Patientenkollektiv besteht zum einen aus chronisch an Schizophrenie Erkrankten; bei diesen Patienten fand seit Erkrankungsbeginn keine Remission statt. Daneben wurden 90 Patienten mit einer Bipolar-I Störung rekrutiert. Keiner der Patienten leidet an signifikanten neurologischen Begleiterkrankungen, Epilepsie, geistiger Retardierung oder anderen körperlichen Erkrankungen, die eine organische Psychose zur Folge haben könnten. Die Kontrollgruppe umfasst 362 gesunde Blutspender und freiwillige Probanden, ebenfalls aus dem Raum Unterfranken.

Es wurden nur Personen in die Studie miteinbezogen, die nach mündlicher und schriftlicher Aufklärung ihr schriftliches Einverständnis dafür gaben. Die Untersuchung wurde nach Zustimmung der Ethikkommission der Universität Würzburg und nach den Richtlinien der Deklaration von Helsinki durchgeführt.

3.1.2 Material für PCR und Gelelektrophorese

3.1.2.1 Geräte

| | |
|--|--|
| Autoklav | Wolf SANOclav, Bad Überkingen-Hausen |
| Glaskolben | Schott AG Mainz |
| Biosphere Filter Tips 10 µl | Eppendorf/ Gilson, Hamburg |
| Chemiedoc Geldokumentation | Bio-Rad, München |
| Eppendorf-Röhrchen 1,5 ml | Eppendorf, Hamburg |
| Gelkammern, Käbme, Spacer, Spatel Kammern | Peqlab, Erlangen |
| Haushaltsfolie | Wentus Kunststoffe GmbH, Höxter |
| Heizrührplatte | Gesellschaft für Laborbedarf GmbH, Würzburg |
| Multiply-µl Strip Pro Biosphere | Sarstedt, Nümbrecht |
| PCR-Softtubes 0,2 ml | Biozym Diagnostik GmbH, Oldendorf |
| Personal Spin-Vortex Microspin FV- 2400 | Lab-4-you GmbH Berlin |
| Pipetten | Eppendorf/ Gilson, Hamburg |
| Pipettenspitzen 10 µl, 100µl, 200µl, 1000µl | Sarstedt, Nümbrecht |
| Power-Supply Elektrophoresis 400V- 400mA | Sigma Aldrich Chemie GmbH Wien |
| Printer und Printerpapier | Sony |
| T-Gradient Thermoblock | Biometra, Göttingen |
| T-Gradient Thermocycler | Biometra, Göttingen |
| UV-Tisch, Fluo-Link | MWG Biotech |
| Waage Toledo | Mettler, Gießen |
| Zentrifuge Mikroliter | Hettich, Tuttlingen |

3. Material und Methoden

3.1.2.2 Chemikalien

| | |
|-----------------------|---|
| Agarose, Biozym LE | Biozym, Biotech Trading GmbH, Wien |
| 100bp DNA Leiter | Peqlab, Erlangen |
| Ethidiumbromid | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim |
| MgCl ₂ | Applichem, Darmstadt |
| Tris-Acetat, Tris-HCl | Merck, Darmstadt |
| Tween 20 | Applichem, Darmstadt |

3.1.2.3 Puffer

| | |
|---------------------|---|
| 1x TAE-Puffer | 40 mM Tris Acetat 1mM EDTA (pH 8,0) |
| PCR-Puffer | 500 mM KCl 100 mM Tris-HCl(pH 8,3) 0,25% (v/v) Tween 20 0,25 mg/ml BSA 10 mM oder 15 mM MgCl ₂ |
| PCR Goldstar-Puffer | 750 mM Tris-HCl 200 mM (NH ₄) ₂ SO ₄ 0,1% Tween 20 |
| Hotstar-Puffer | Quiagen |
| Lysis-Puffer | 155 mM NH ₄ Cl 10 mM KHCO ₃ 0,1 mM EDTA (pH evtl. Mit 15% HCl auf 7,4 einstellen) |
| Kernlysis-Puffer | 10 mM Tris-HCl 400 mM NaCl 2 mM Na ₂ EDTA-Puffer (pH ca. 8,2) |

3. Material und Methoden

3.1.2.4 cDNA-Herstellung

| | |
|------------------------------|----------------------------------|
| iScript™ cDNA Synthesis-Kit | Bio-Rad, Hercules CA, USA |
| Gene Ruler™ 100bp DNA Ladder | MBI Fermentas GmbH ,St. Leon-Rot |
| · 8 x Loading Dye Solution | Fermentas GmbH ,St.Leon-Rot |

3.1.2.5 Nukleotide

| | |
|--|------------------------|
| DNTP (100 mM; dGTP, dATP, dTTP, d CTP) | Promega GmbH, Mannheim |
|--|------------------------|

3.1.2.6 Enzyme

| | |
|---------------------|------------------|
| Taq-Polymerase | Bio-Rad, München |
| TERMlpol-Polymerase | Solis BioDyne |

3.1.2.7 Wasser

H₂O-Merck

3.1.2.8 Oligonukleotidprimer

| | |
|-------------------|---------------------|
| 5'- und 3'-Primer | BioTeZ GmbH, Berlin |
|-------------------|---------------------|

3. Material und Methoden

Sequenzen:

| SNP | Forward-Primer (F) | Reverse-Primer (R) | Produkt-Größe | Annealing-Temperatur |
|----------------------------|--|---|----------------------|-----------------------------|
| SNP-1 rs3741775 | 5'-GGG TGA GGA GAA GAC CAG AG- 3' | 5'-CAG ATC TCA AGC CCA GAA GC-3' | 194 Bp | 60,4°C |
| SNP-2 rs3918347 | 5'-AAT GCC CTC TTC CAC TCC TC-3' | 5'-CCT TGA GCA GGT CCT TAA CC-3' | 168 Bp | 58,5°C |
| SNP-3 rs2111902 | 5'-TCG GTC ACT TCT CCA TAC CTC- 3' | 5'-ACT CCT GCT CCA ATC ACC AC-3' | 245 Bp | 60,0°C |
| SNP-4 rs2070588 | 5'-ACT GGC TGT GTG ACT TCA GG- 3' | 5'-GTG GAG CAC CTA CTG TGA GC-3' | 177 Bp | 62,0°C |
| SNP-5 rs3825251 | 5'-TGG TAG CAA CCA ACA GGG TAG-3' | 5'-TCA GGG AGT AGA CAG ATT GAG G-3' | 104 Bp | 59,0°C |

Tabelle 4: Sequenzen der verwendeten Primer

3.1.3 Material für Allel-spezifische Primerextension und die MALDI-TOF Massenspektrometrie

3.1.3.1 Geräte

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

3.1.3.2 Chemikalien

| | |
|---|-----------------------------------|
| 10x Reaction Buffer C (500 mM Tris-HCl, pH 9,5) SOLIS | SOLIS BIODYNE, Tartu, Estonia |
| 3-Hydroxypicolinic (3-HPA) | Bruker Daltonik, Bremen |
| Amonium Acetat (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) 20 mM | MBI Fermentas, St. Leon-Rot |
| Di-amoniumhydrogencitrat DAC), 98% | SIGMA-ALDRICH, Steinheim |
| DNA-Polymerase, Thermipol | SOLIS BIODYNE, Tartu, Estonia |
| H ₂ O | Nanopure |
| iPlex-buffer 10x | SEQUENOM, San Diego, USA |
| iPlex terminating mix | SEQUENOM, San Diego, USA |
| iPlex Enzym | SEQUENOM, San Diego, USA |
| MgCl ₂ , 25 mM | SOLIS BIODYNE, Tartu, Estonia |
| Shrimp Alkalische Phosphatase (SAP) | USB, Cleveland, Ohio, USA |
| SAP-Reaktionspuffer | USB, Cleveland, Ohio, USA |

3.1.4 Software

Microsoft® Office Word 2003 (Microsoft, Unterschleißheim)

Typer 3.4 (Sequenom, San Diego, CA, USA)

SPSS für Windows 9,0 (SPSS Inc., Cicago, USA)

GPOWER

Haploview 4.2

3.2 Methoden

3.2.1 Polymerasekettenreaktion

Zur Genotypisierung unserer Stichproben wurden PCR-basierte Verfahren angewandt. Die DNA-Gewinnung erfolgte hierzu aus EDTA-Blut nach einer Salzfällungsmethode (Miller 1999).

Die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR), 1983 entwickelt von dem Biochemiker Kary B. Mullis, dient der in-vitro-Amplifizierung von spezifischen DNA-Abschnitten. Ein einzelnes DNA-Molekül reicht theoretisch bereits aus, um den gewünschten DNA-Bereich beliebig oft zu amplifizieren. Die Ausgangssubstanz ist die zu untersuchende DNA, die die zu amplifizierenden Genbereiche enthält. Die Reagenzien bestehen aus den Forward- und Reverse-Primern, die den gewünschten DNA-Bereich „erkennen“. Es handelt sich hierbei um sogenannte Oligonukleotid-Startermoleküle. Des Weiteren benötigt man die vier Desoxynukleotide Adenin, Thymin, Guanin und Cytosin, $MgCl_2$ -Reaktionspuffer, sowie DNA-Polymerase. Hier verwendet man die hitzeunempfindliche Taq-Polymerase aus thermophilen Bakterien.

Die Durchführung basiert auf mehreren Teilschritten (Abbildung 3) mit jeweils unterschiedlichen Temperaturen, die in sequentiellen Zyklen wiederholt werden. Die DNA (*template*) wird im ersten Schritt durch eine Temperatursteigerung auf 95°C denaturiert, d.h. ihre Doppelstränge werden in zwei Einzelstränge aufgetrennt. Danach erfolgt nach Abkühlung auf die jeweilige Annealing-Temperatur (im Falle unserer Untersuchung 58,5°C–62,0°C) die Hybridisierung der Einzelstränge mit den Primern. Der Forward-Primer ist komplementär zum Anfang, der Reverse-Primer zum Ende der Wunschsequenz. Es ist somit also die Startsequenz für den nun folgenden Schritt der Elongation entstanden. Hierbei verlängert die DNA-Polymerase unter Verwendung der Desoxynukleotide die Primer in 5'-3'-Richtung.

Die Zahl der Zyklen ist allerdings begrenzt. Dies ergibt sich zum einen aus der Thermolabilität der Nukleotide, die bei hohen Temperaturen zerfallen und zum anderen nimmt die Primerkonzentration mit jedem Zyklus ab. Dadurch kommt es bei hoher Zyklenzahl zur Reassoziations der Matrizen-Einzelstränge, was zu

3. Material und Methoden

einer Behinderung der Polymerase führt. Ganz essentiell ist eine gute Anpassung der Hybridisierungs-Temperatur. Ist sie zu hoch, wird schlecht oder gar nicht hybridisiert, ist sie zu niedrig, wird an der falschen Stelle hybridisiert. Die optimale Temperatur wird, wie auch bei uns geschehen, experimentell ermittelt.

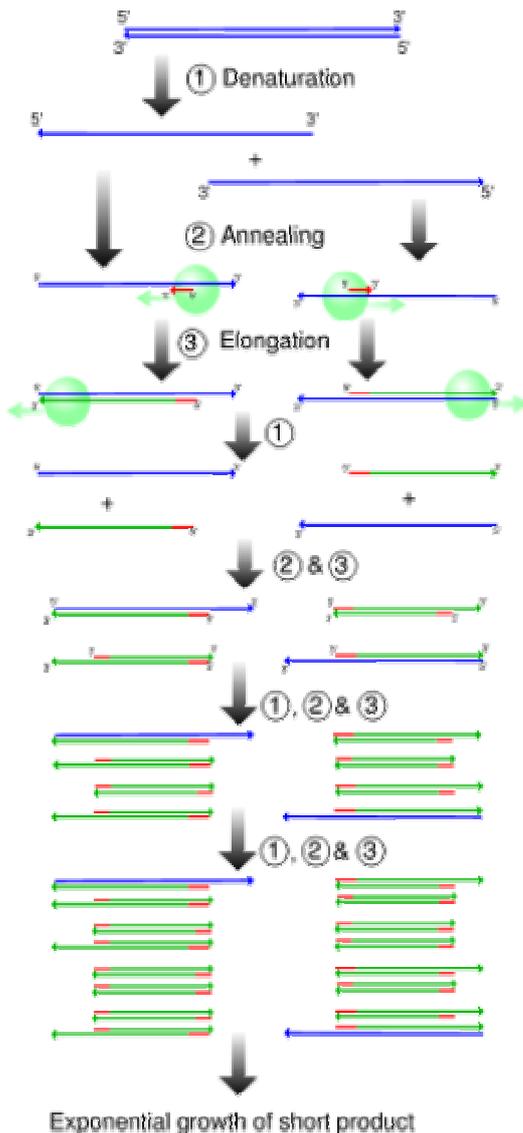


Abbildung 3: Schematische Darstellung des PCR-Zyklus (Ball 2007)

(1) Schmelzen (*Denaturierung*) bei ca. 96 °C.

(2) Anlagerung (*Primerhybridisierung*) bei ca. 68 °C.

(3) Verlängerung (*Elongation*) bei ca. 72 °C (P=Polymerase).

Exponentielles Anwachsen des kurzen Produktes (von Primern eingeschlossener Bereich)

3.2.1.1 Reaktionsansätze

| Reagenz | SNP-1 | SNP-2 | SNP-3 | SNP-4 | SNP-5 |
|--------------------------|----------|----------|----------|----------|----------|
| MgCl₂- | 3,75 µl | 37,5 µl | 3,75 µl | 3,75 µl | 3,75 µl |
| Puffer | 15 mM | 7,5 mM | 15 mM | 7,5 mM | 15 mM |
| 2,5 mM | 1,5 µl |
| Nuk. jew. | | | | | |
| DAAO- | 0,7 µl | 1,05 µl | 1,05 µl | 1,05 µl | 1,05 µl |
| Forward- | 1 F | 2 F | 3 F | 4 F | 5 F |
| Primer | | | | | |
| DAAO- | 0,7 µl | 1,05 µl | 1,05 µl | 1,05 µl | 1,05 µl |
| Reverse- | 1 R | 2 R | 3 R | 4 R | 5 R |
| Primer | | | | | |
| House-Taq | 0,6 µl |
| Template | 2 µl | 2,5 µl | 2 µl | 2 µl | 1,5 µl |
| H₂O | 28,25 µl | 27,05 µl | 27,55 µl | 27,55 µl | 28,05 µl |

Tabelle 5: PCR-Reaktionsansätze

3.2.1.2 Programmierung des Thermocyclers

- 1.Schritt: 95°C für 3 Minuten (Denaturierung)
- 2.Schritt: 95°C für 45 Sekunden
- 3.Schritt: Annealing-Temperatur für 45 Sekunden
- 4.Schritt: 72°C für 45 Sekunden (Elongation)
- 5.Schritt: 72°C für 3 Minuten (terminale Elongation)

Die Schritte 2.-4. wurden bei den SNPs 1, 3, 4 und 5 jeweils 35-mal, bei SNP-2 jeweils 40-mal wiederholt.

3.2.2 Agarose-Gelelektrophorese

DNA-Moleküle tragen negative Ladungen, wodurch eine Bewegung der Moleküle im elektrischen Feld ermöglicht wird. Erfolgt diese Bewegung innerhalb einer geeigneten Matrix (Polyacrylamid oder Agarose), so wandern DNA-Moleküle ihrem Molekulargewicht entsprechend und können der Größe nach aufgetrennt werden.

Es wurden 2%ige Agarosegele verwendet. Zu deren Herstellung wurden 2 g Agarose mit 100ml 1x TAE-Puffer versetzt und ca. 2 Minuten in der Mikrowelle erhitzt, bis sich die Agarose als polymerisiertes Gel absetzt. Nachdem das Gel anschließend auf ca. 50°C abgekühlt war, wurden 3 µl Ethidiumbromid dazugegeben, um die DNA unter kurzweiligem Licht sichtbar machen zu können. Das flüssige Gel wurde dann in einen Gelträger gegossen und mit Kämme versetzt, die beim Aushärten die gewünschten Geltaschen erzeugten. Von den DNA-Proben wurden 5 µl entnommen und mit 7 µl Blaupuffer vermischt. Diese Mischung wurde dann in die Geltaschen gebracht (Abbildung 4) und zusammen mit der 100 Bp-Leiter bei 120 V ca. eine Stunde lang aufgetrennt. Unter den Proben jedes PCR-Ansatzes befand sich auch immer eine Negativkontrolle, die eine Kontamination der Proben angezeigt hätte. Nach der Auftrennung konnten die Banden unter UV-Licht sichtbar gemacht werden. Um eine noch bessere Kontrolle der Banden, insbesondere der Laufspur der Negativ-Probe zu gewährleisten, wurde jedes Gel nochmals separat auf dem UV-Tisch begutachtet (Abbildung 5-9).

3. Material und Methoden

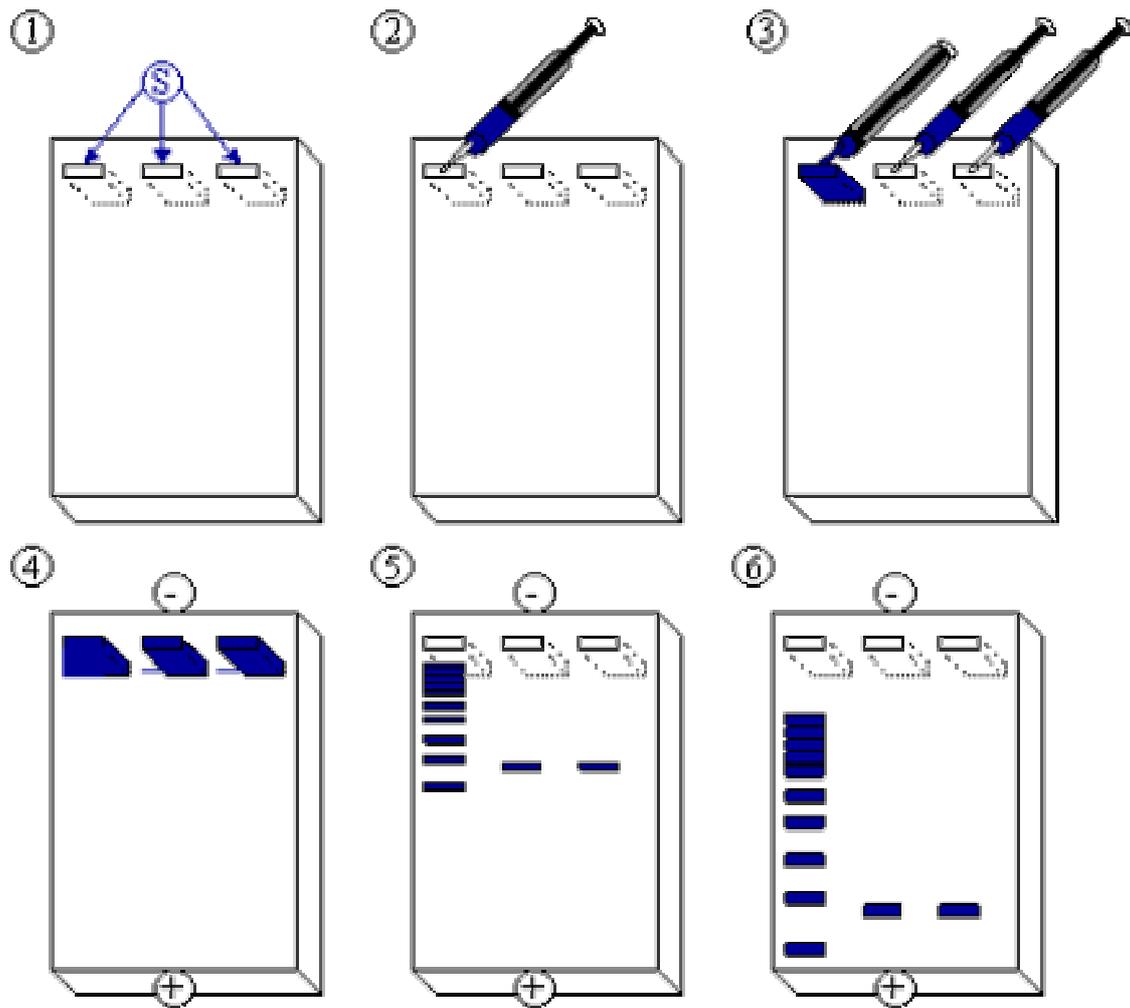
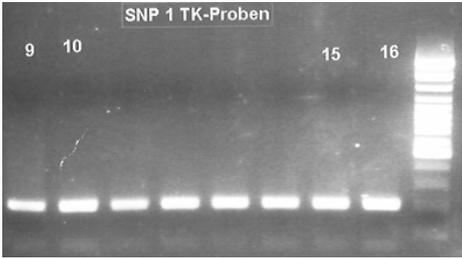


Abbildung 4: Schematische Darstellung der Agarose-Gelelektrophorese (Manske 2006):

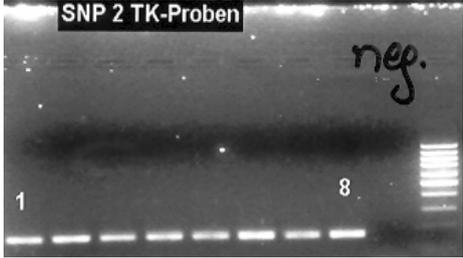
1. Das Agarosegel mit 3 Taschen (S).
2. Einspritzen von DNA-Leiter in die erste Tasche.
3. DNA-Leiter ist aufgetragen. Proben 2 und 3 werden aufgetragen.
4. Eine Spannung wird angelegt. Die DNA wandert zur positiv geladenen Anode, weil sie negativ geladen ist (Phosphatreste im "Rückgrat" der DNA).
5. Kleine DNA-Fragmente wandern schnell, große langsam durch das Gel. Die DNA ist währenddessen normalerweise nicht sichtbar. Daher wird der Fortschritt an der Farbfront abgelesen, die sich mit einem DNA-Fragmente bestimmter Länge auf gleicher Höhe durch das Gel bewegt (je nach Farbstoff und Agarose-Konzentration unterschiedlich).
6. Anhand der Farbfront wird abgeschätzt, wann die Elektrophorese beendet und ausgewertet wird.

3. Material und Methoden

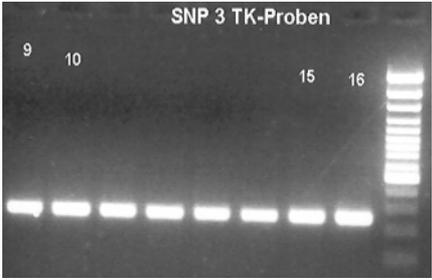
Abbildung 5: a)-e) Gelelektrophorese-Bilder



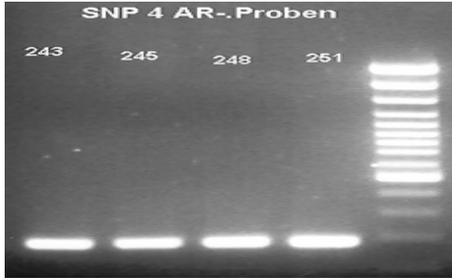
a) Gelelektrophorese SNP 1



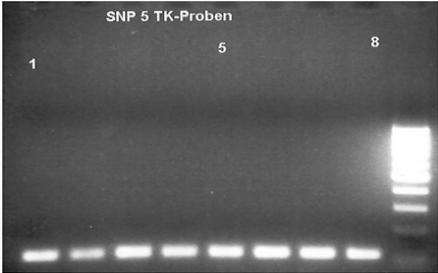
b) Gelelektrophorese SNP 2



c) Gelelektrophorese SNP 3



d) Gelelektrophorese SNP 4



e) Gelelektrophorese SNP 5

3.2.3 Sequenom MassArray-Technologie

3.2.3.1 Verdau mit alkalischer Phosphatase für die iPLEX Reaktion

Die Reaktionsprodukte wurden mittels Shrimp Alkalischer Phosphatase (SAP) verdaut, um Reste von desoxy-Nukleotidtriphosphaten (dNTPs) zu entfernen. SAP ist in der Lage, dNTPs zu dephosphorylieren. Jeder Probe wurden 10x 0,17 µl SAP-Buffer, 1,53 µl H₂O und 0,30 µl SAP (1U/µl) zugefügt. Bei 37°C für 40 Minuten erfolgte in 384 well Platten die Reaktion im Thermocycler. Die SAP wurde anschließend bei 5-minütiger Reaktion bei 85°C inaktiviert.

3.2.3.2 iPLEX Reaktion, Single Base Extension Reaktion

Ein iPLEX-Reaktionsmix wurde für die anschließende Single Base Extension Reaktion erstellt. Hierzu wurden 412 µl Nanopure H₂O mit jeweils 109 µl iPLEX Buffer Plus (10x) und iPLEX Termination Mix, sowie 438 µl Extension Primer Mix (mit steigender Konzentration und Masse) und 21,8 µl iPLEX Enzym gemischt. 2 µl dieser Mischung wurden den gereinigten PCR-Produkten zugefügt. Im Thermocycler erfolgten folgende Schritte der Primer-Extensionsreaktion:

- Initiale Denaturierung für 30 Sekunden bei 94°C
- 40 Zyklen mit jeweils 5 Sekunden bei 94°C
- Annealing für 5 Sekunden bei 52°C
- Elongation bei 80°C

Die beiden letzten Schritte wurden bei jedem der 40 Zyklen 5 Mal wiederholt.

Danach erfolgte der letzte Schritt.: 3 Minuten bei 72°C.

3.2.3.3 Reinigung durch das Ionenaustauschharz

Salze, welche die MALDI-Analyse stören würden, mussten aus dem Reaktionsansatz entfernt werden. Hierfür wurden zunächst jedem Ansatz 16 μ l H_2O und 6 mg Ionenaustauschharz zugesetzt. Anschließend wurden die Platten verschlossen und 20 Minuten gewendet. Es folgte eine 5-minütige Zentrifugation bei 3000 rpm. 25 nl des gereinigten iPlex-Ansatzes wurden auf fertige Chips gespottet. Es folgte die MALDI-ToF-Analyse.

3.2.4 MALDI-ToF

Der Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization (MALDI)-Prozess ist eine Methode, um Biomoleküle ohne starke Fragmentation zu ionisieren. Karas und Hillenkamp entwickelten ihn 1987 in Münster (Hannover 2005). 3-Hydroxypikolinsäure ist eine von Becker et al. 1993 entdeckte organische Matrix, die sich besonders gut für die Messung von DNA und RNA eignet (Tost 2002). Sie wird in einer 10^3 - 10^4 -fach höheren molaren Konzentration als die des Analyten auf das Target aufgetragen. Die Kokristallisation von Biomolekül und Matrix ist Voraussetzung für den MALDI-Prozess. Der Kristall wird im Hochvakuum einem kurzen Laserpuls ausgesetzt. Die Matrix kann die Laserenergie kurzfristig absorbieren und überträgt sie dann auf den Analyten, wodurch dieser ionisiert wird und in die Gasphase übergeht. Die Matrix hat außerdem die Funktion, die Probe vor photolytischer Zersetzung zu schützen und Wechselwirkungen der Probenmoleküle untereinander zu verhindern (Sauer 2000).

Zur Massenanalyse wird der MALDI-Prozess mit einem ToF (Time of Flight)-Analytator kombiniert. Das ionisierte Molekül wird, nachdem es in die Gasphase gebracht wurde, in einem Hochspannungsfeld beschleunigt. Die Zeit, die das Molekül für eine festgelegte Strecke zwischen Elektrode und einem Detektor benötigt, wird gemessen. Daraus kann die Masse des Moleküls bestimmt werden (Althoff 2005).



Abbildung 6: Aufbau eines ToF Massenspektrometers

3.2.5 Haplotypanalyse und statistische Analyse

Die Einzelassoziationstests wurden in Form von χ^2 -Tests mit SPSS für Windows 9,0 (SPSS Inc., Chicago, USA) durchgeführt.

Ob sich die Frequenz der spezifischen Haplotypen signifikant von der der Kontrollen unterscheidet, kann mittels des Haploview Programmes bestimmt werden. (Zhang 2004) Durch Zuweisen der Fall-Kontroll-Markierungen führt Haploview zudem Permutationstests auf eine globale Assoziation der Haplotypen durch. Es wurden in dieser Arbeit 10.000 Permutationen durchgeführt.

Mittels des GPOWER Programmes wurden darüber hinaus Power-Kalkulationen durchgeführt (Erdfelder 1996)

4 Ergebnisse

Alle Genotypen befanden sich im Hardy-Weinberg-Equilibrium (nicht gezeigt). Eine Powerkalkulation mittels GPOWER zeigte, dass das Schizophrenie-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.

Es sei vorweggenommen, dass für keinen der untersuchten SNPs eine signifikante Assoziation zu Schizophrenien und bipolaren Psychosen gezeigt werden konnte, d.h. die ermittelten P-Werte lagen alle deutlich über 0,05.

4.1 Assoziation von DAAO mit schizophrenen Psychosen

Fünf SNPs und deren entsprechende Haplotypen wurden in einer Fall-Kontroll-Studie bei 362 gesunden Probanden und bei 246 an einer Schizophrenie erkrankten Patienten untersucht. Zunächst wurde nach einer potentiellen Einzelmarker-Assoziation der SNPs mit Schizophrenie gesucht.

| # | Name | Assoz. Allele | Fall-Kontroll-Verhältnis | Fall-Kontroll-Frequenz | χ^2 | P-Wert |
|---|------------|---------------|--------------------------|------------------------|----------|--------|
| 1 | rs2111902 | T | 238:200, 268:244 | 0.543, 0.523 | 0.377 | 0.5392 |
| 2 | rs12579920 | G | 415:13, 615:23 | 0.970, 0.964 | 0.253 | 0.615 |
| 3 | rs2070586 | A | 79:377, 96:552 | 0.173, 0.148 | 1.264 | 0.2609 |
| 4 | rs2070588 | G | 119:357, 162:510 | 0.250, 0.241 | 0.12 | 0.7289 |
| 5 | rs6539458 | T | 22:444, 29:629 | 0.047, 0.044 | 0.062 | 0.8034 |
| 6 | rs3741775 | T | 268:206, 375:297 | 0.565, 0.558 | 0.061 | 0.8046 |
| 7 | rs11830725 | C | 43:433, 53:621 | 0.090, 0.079 | 0.499 | 0.4798 |
| 8 | rs3825251 | C | 72:398, 101:569 | 0.153, 0.151 | 0.013 | 0.9098 |
| 9 | rs3918347 | G | 131:325, 179:489 | 0.287, 0.268 | 0.506 | 0.4768 |

Tabelle 6: Einzelmarkerdaten Schizophrenie

4. Ergebnisse

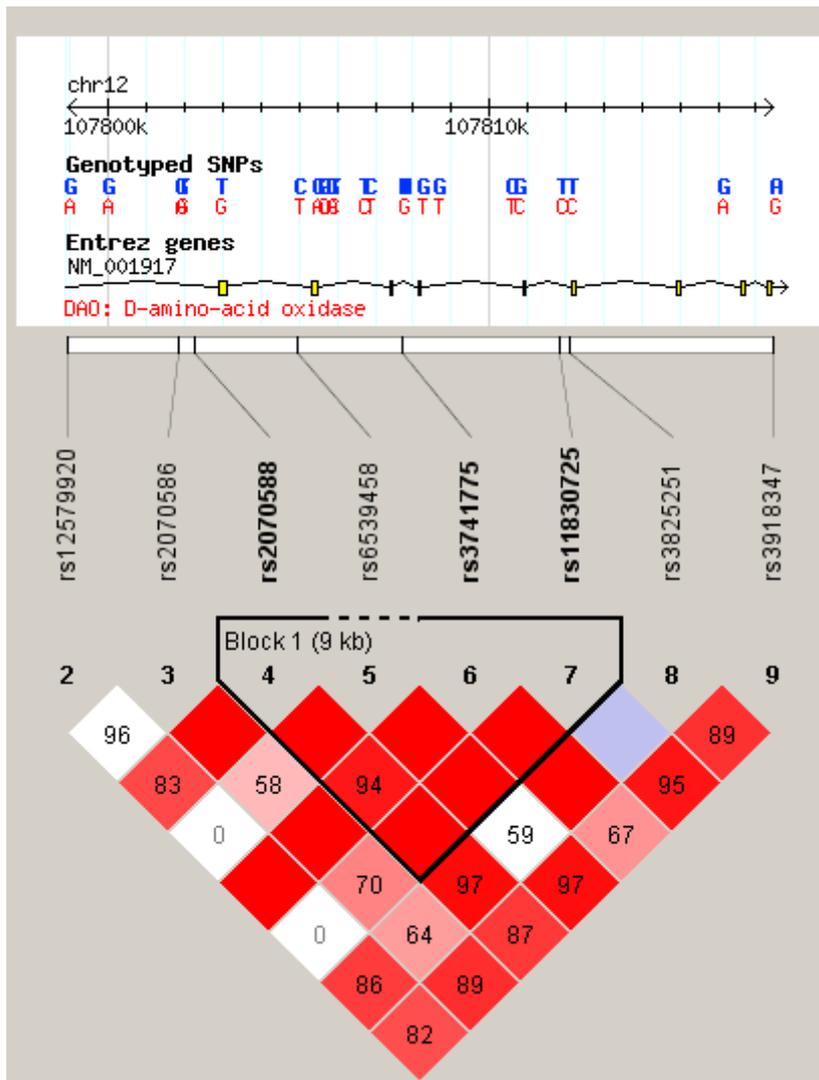


Abbildung 7: LD Plot Schizophrenie (Solid Spine)

Im LD-Plot bedeutet eine rote Feldermarkierung, dass die SNPs in einem hohen Kopplungsungleichgewicht zueinander stehen. Unter Kopplungsungleichgewicht versteht man ein abhängiges Auftreten der Allele von Genen, wenn diese auf dem Chromosom nahe beieinander liegen.

Nachfolgend werden für Schizophrenie tabellarisch die Frequenzen der Haplotypen, das Fall- Kontrollverhältnis, das jeweilige X^2 und der errechnete p-Wert aufgezeigt (Tabelle 7 und 8).

4. Ergebnisse

| Haplotyp | Frequenz | Fall-Kontroll-Verhältnis | Fall-Kontroll-Frequenz | X ² | p-Wert |
|----------|----------|------------------------------|------------------------|----------------|--------|
| Block 1 | | | | | |
| CGT | 0.438 | 205.7 : 270.3, 292.8 : 381.2 | 0.432, 0.434 | 0.0060 | 0.9399 |
| CTT | 0.321 | 151.3 : 324.7, 219.2 : 454.8 | 0.318, 0.325 | 0.069 | 0.7922 |
| GTT | 0.151 | 75.1 : 400.9, 103.6 : 570.4 | 0.158, 0.154 | 0.034 | 0.8547 |
| GTC | 0.084 | 43.0 : 433.0, 53.0 : 621.0 | 0.090, 0.079 | 0.499 | 0.4798 |

Tabelle 7: Haploblock Schizophrenie (Gabriel)

| Haplotyp | Frequenz | Fall-Kontroll-Verhältnis | Fall-Kontroll-Frequenz | X ² | p-Wert |
|----------|----------|------------------------------|------------------------|----------------|--------|
| Block 1 | | | | | |
| GGCCG | 0.438 | 204.4 : 267.6, 292.3 : 381.7 | 0.433, 0.434 | 0.0010 | 0.9789 |
| GGCCT | 0.319 | 150.4 : 321.6, 215.4 : 458.6 | 0.319, 0.320 | 0.0010 | 0.9737 |
| GAGCT | 0.139 | 72.1 : 399.9, 91.5 : 582.5 | 0.153, 0.136 | 0.645 | 0.4218 |
| AGGCT | 0.031 | 14.2 : 457.8, 21.6 : 652.4 | 0.030, 0.032 | 0.038 | 0.8463 |
| GAGTT | 0.029 | 12.7 : 459.3, 17.7 : 656.3 | 0.027, 0.026 | 0.0040 | 0.9471 |
| GGGTT | 0.021 | 10.0 : 462.0, 14.3 : 659.7 | 0.021, 0.021 | 0.0 | 0.9924 |
| GGGCT | 0.014 | 7.4 : 464.6, 11.1 : 662.9 | 0.016, 0.016 | 0.012 | 0.9144 |
| Block 2 | | | | | |
| TTA | 0.715 | 330.8 : 145.2, 484.1 : 189.9 | 0.695, 0.718 | 0.743 | 0.3887 |
| TCG | 0.138 | 68.9 : 407.1, 95.1 : 578.9 | 0.145, 0.141 | 0.032 | 0.8589 |
| CTG | 0.082 | 41.6 : 434.4, 50.9 : 623.1 | 0.087, 0.075 | 0.528 | 0.4675 |
| TTG | 0.052 | 28.0 : 448.0, 34.4 : 639.6 | 0.059, 0.051 | 0.336 | 0.562 |
| TCA | 0.011 | 5.3 : 470.7, 7.4 : 666.6 | 0.011, 0.011 | 0.0010 | 0.9793 |

Tabelle 8: Haploblock Schizophrenie (Solid Spine)

Aufgrund insgesamt fehlender Signifikanz wurde auf eine statistische Analyse der Einzelgruppen verzichtet.

4. Ergebnisse

4.2 Assoziation von DAAO mit Bipolaren Psychosen

Auch für das Krankheitsbild der bipolaren Psychosen wurden bei 90 Patienten Einzelmarker- als auch Haplotyp-Assoziationen für die untersuchten SNPs durchgeführt.

| # | Name | Assoz. Allele | Fall-Kontroll-Verhältnis | Fall-Kontroll-Frequenz | χ^2 | p-Wert |
|---|------------|---------------|--------------------------|------------------------|----------|--------|
| 1 | rs2111902 | C | 87:79, 244:268 | 0.524, 0.477 | 1.134 | 0.287 |
| 2 | rs12579920 | G | 169:5, 615:23 | 0.971, 0.964 | 0.22 | 0.6393 |
| 3 | rs2070586 | A | 27:147, 96:552 | 0.155, 0.148 | 0.053 | 0.8176 |
| 4 | rs2070588 | C | 139:39, 510:162 | 0.781, 0.759 | 0.376 | 0.5396 |
| 5 | rs6539458 | T | 11:165, 29:629 | 0.062, 0.044 | 1.033 | 0.3095 |
| 6 | rs3741775 | G | 84:94, 297:375 | 0.472, 0.442 | 0.51 | 0.475 |
| 7 | rs11830725 | C | 16:162, 53:621 | 0.090, 0.079 | 0.24 | 0.6245 |
| 8 | rs3825251 | T | 155:21, 569:101 | 0.881, 0.849 | 1.116 | 0.2909 |
| 9 | rs3918347 | A | 132:40, 489:179 | 0.767, 0.732 | 0.89 | 0.3456 |

Tabelle 9: Einzelmarkerdaten bipolare Psychosen

4. Ergebnisse

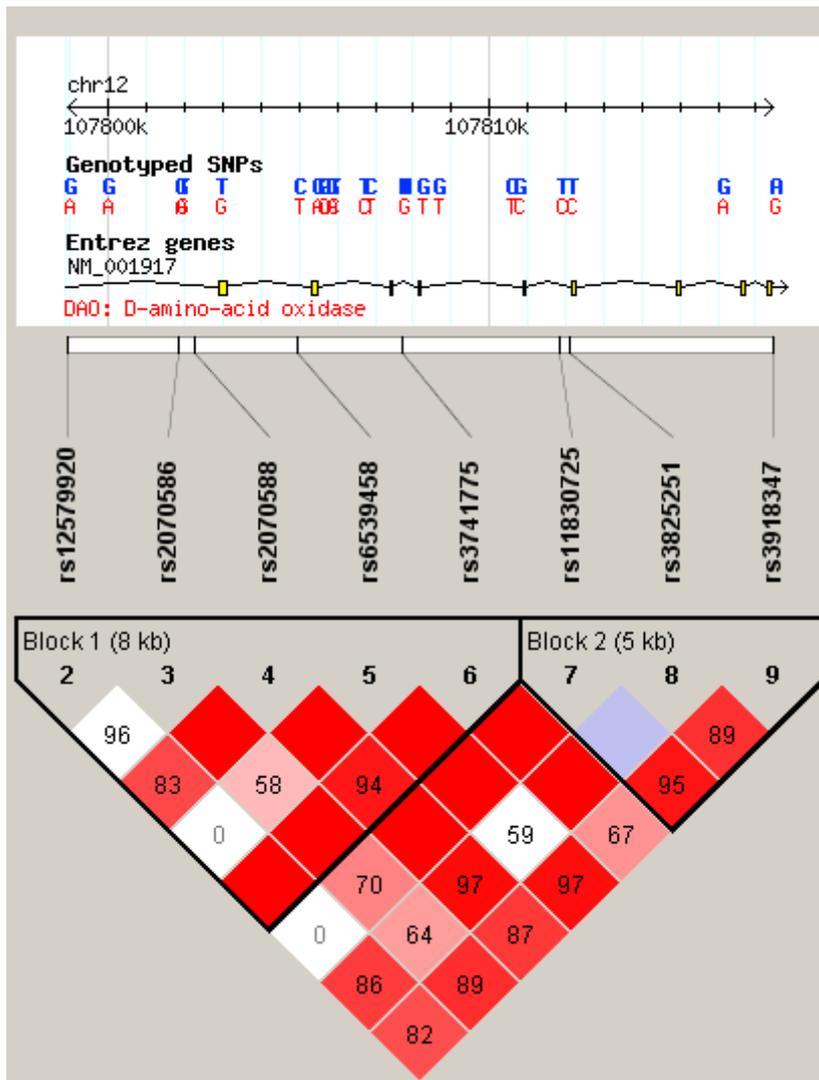


Abbildung 8: LD Plot bipolare Psychosen (Gabriel)

Auch für bipolare Psychosen folgt die tabellarische Aufstellung der Frequenzen der Haplotypen, das Fall- Kontrollverhältnis, das jeweilige X^2 und der errechnete p- Wert (Tabelle 10 und 11).

4. Ergebnisse

| Haplotyp | Frequenz | Fall-Kontroll-Verhältnis | Fall-Kontroll-Frequenz | χ^2 | p-Wert |
|----------|----------|-----------------------------|------------------------|----------|--------|
| Block 1 | | | | | |
| CGT | 0.438 | 82.8 : 95.2, 292.8 : 381.2 | 0.465, 0.434 | 0.534 | 0.4649 |
| CTT | 0.321 | 56.2 : 121.8, 219.2 : 454.8 | 0.316, 0.325 | 0.055 | 0.8138 |
| GTT | 0.151 | 21.8 : 156.2, 103.6 : 570.4 | 0.122, 0.154 | 1.114 | 0.2912 |
| GTC | 0.084 | 16.0 : 162.0, 53.0 : 621.0 | 0.090, 0.079 | 0.24 | 0.6245 |

Tabelle 10: Haploblock Bipolare Psychosen (Gabriel)

| Haplotyp | Frequenz | Fall-Kontroll-Verhältnis | Fall-Kontroll-Frequenz | χ^2 | p-Wert |
|----------|----------|-----------------------------|------------------------|----------|--------|
| Block 1 | | | | | |
| GGCCG | 0.438 | 82.9 : 95.1, 292.3 : 381.7 | 0.466, 0.434 | 0.578 | 0.4471 |
| GGCCT | 0.319 | 56.1 : 121.9, 215.4 : 458.6 | 0.315, 0.320 | 0.013 | 0.9103 |
| GAGCT | 0.139 | 20.3 : 157.7, 91.5 : 582.5 | 0.114, 0.136 | 0.582 | 0.4455 |
| AGGCT | 0.031 | 5.6 : 172.4, 21.6 : 652.4 | 0.031, 0.032 | 0.0020 | 0.9635 |
| GAGTT | 0.029 | 8.4 : 169.6, 17.7 : 656.3 | 0.047, 0.026 | 2.083 | 0.1489 |
| GGGTT | 0.021 | 2.8 : 175.2, 14.3 : 659.7 | 0.016, 0.021 | 0.196 | 0.6584 |
| GGGCT | 0.014 | 0.7 : 177.3, 11.1 : 662.9 | 0.004, 0.016 | 1.577 | 0.2092 |
| Block 2 | | | | | |
| TTA | 0.715 | 134.5 : 43.5, 484.1 : 189.9 | 0.756, 0.718 | 1.0 | 0.3173 |
| TCG | 0.138 | 18.9 : 159.1, 95.1 : 578.9 | 0.106, 0.141 | 1.459 | 0.2271 |
| CTG | 0.082 | 15.9 : 162.1, 50.9 : 623.1 | 0.090, 0.075 | 0.388 | 0.5331 |
| TTG | 0.052 | 6.4 : 171.6, 34.4 : 639.6 | 0.036, 0.051 | 0.689 | 0.4067 |
| TCA | 0.011 | 2.1 : 175.9, 7.4 : 666.6 | 0.012, 0.011 | 0.0070 | 0.9326 |

Tabelle 11: Haploblock bipolare Psychosen (Solid Spine)

4. Ergebnisse

Da auch hier keine Signifikanz der Werte beobachtet werden konnte, wurde auf eine Einzelgruppenanalyse verzichte

5 Diskussion

5.1 Gegenstand und Ziel der Arbeit

Da die genetische Komponente der Schizophrenien und der bipolaren Psychosen mit einer Heritabilität von bis zu 80% sehr hoch ist (Sullivan 2003), ist sie in den letzten Jahren in den Mittelpunkt psychiatrisch-biologischer Forschung getreten, besonders auch im Hinblick auf die Möglichkeit, dadurch neuere, nebenwirkungsärmere und effektivere Medikamente zu entwickeln.

Aufgrund seiner Funktion und Interaktion mit dem NMDA-Rezeptor sowie seiner Lage auf dem Chromosom 12q, einem Hotspot für Schizophrenien und bipolare Psychosen (Ewald 1998, Shaw 1998), ist DAAO als potentieller Kandidatengene für Schizophrenien und bipolare Psychosen zu einem Gen von besonderem Interesse für die psychiatrische Forschung geworden.

DAAO katalysiert die oxidative Desaminierung von D-Aminosäuren, wie D-Serin, welche eine wichtige Rolle in der Neurotransmission spielen (Schell 1995). D-Serin ist ein Co-Agonist des Glutamat-Rezeptors, der wiederum als wichtiger Faktor in der Pathogenese der Schizophrenie vermutet wird (Kim 1980, Gattaz 1982, Tuominen 2005). Der NMDA-Rezeptor, ein liganden-gesteuerter Glutamat-Rezeptor (Schiffer 2002), fungiert als Ionen-Kanal. Bei Aktivierung erzeugt er ein exzitatorisches Aktionspotential. Hierzu müssen sowohl Glutamat, als auch ein Co-Agonist, D-Serin oder Glycin, den NMDA-Rezeptor besetzen. Neuere Studien haben gezeigt, dass D-Serin in verschiedenen Hirnregionen wohl als hauptsächlicher Co-Agonist des NMDA-Rezeptors fungiert (Mothet 2000, Shleper 2005, Panatier 2006, Gustafson 2007). Wenn D-Serin von DAAO oxidiert wird, ist dieses nicht mehr in der Lage, als Co-Agonist des NMDA-Rezeptors zu agieren. Es herrscht dann eine Unterfunktion des NMDA-Rezeptors.

Die Glutamat-Hypothese der Schizophrenie nimmt eine ebensolche Hypofunktionalität des NMDA-Rezeptors an. Diese Hypothese entstand auf

dem Boden von Studien, die zeigten, dass NMDA-Rezeptorantagonisten, wie Phencyclidin, positive, negative und kognitive schizophrenie-ähnliche Symptome in gesunden Personen und Denkstörungen und Illusionen in Schizophrenie-Patienten auslösen konnten (Goff 2001).

Basierend auf dieser Hypothese konnte erst kürzlich in einer post-mortem Studie gezeigt werden, dass die Aktivität von DAAO in Hirngewebe schizophrener, nicht aber bipolarer Patienten gesteigert war (Madeira 2008). Auch Burnet et al. konnten ähnliche Befunde nachweisen, nämlich eine erhöhte Aktivität von DAAO im Cerebellum Schizophrener, jedoch nicht an bipolaren Psychosen erkrankter Patienten (Burnet 2008).

In der vorliegenden Studie wurde versucht, die positiven Befunde zu DAAO für Schizophrenien und bipolare Psychosen vorangegangener Studien in einer deutschen Probandengruppe, bestehend aus 246 Patienten, die an Schizophrenie leiden, 90 Patienten, die an einer bipolaren Psychose erkrankt sind und 362 gesunden Kontrollpersonen, mittels einer Fall-Kontroll-Studie zu replizieren. Untersucht wurden die SNPs rs12579920, rs2070586, rs6539458, rs11830725, rs2070588, rs2111902, rs3741775, rs3825251 und rs3918347.

Aufgrund der Heterogenität der Erkrankung war es uns wichtig, ein relativ einheitliches Patientenkollektiv zu untersuchen, Es wurde daher eine ethnisch homogene Stichprobe rekrutiert, die engen Einschlusskriterien unterlag, und außerdem nur chronisch kranke Patienten eingeschlossen, um die Stichprobe noch enger zu definieren. Während das Schizophrenie-Sample eine ausreichende Power zur Detektion kleiner bis mittlerer Effekte aufwies, ist das bipolar-Sample aufgrund der geringeren Größe allenfalls als präliminär zu betrachten. Diese Befunde müssen also noch an einem größeren Sample repliziert werden.

5.2 DAAO in bisherigen Untersuchungen

Frühere Studien, unter anderem aus Kanada und Asien, zeigten eine Assoziation des DAAO-Gens und schizophrenen Psychosen. Jedoch konnte bei keinem der in der vorliegenden Arbeit untersuchten Marker (**SNPs rs12579920, rs2070586, rs6539458, rs11830725, rs2070588, rs2111902, rs3741775, rs3825251 und rs3918347**) als auch den entsprechenden Haplotypen eine positive Assoziation gefunden werden. Nachfolgend sind diejenigen SNPs, die auch von uns untersucht wurden zur genaueren Übersicht fett hervorgehoben.

Chumakov et al. führten 2002 in der französisch-kanadischen und in der russischen Bevölkerung eine Fall-Kontroll-Studie Studie mit 213 Patienten und 241 Kontrollpersonen in der französisch-kanadischen und je 183 Patienten und Kontrollpersonen in der russischen Bevölkerung durch und fanden bei den SNPs **rs2111902**, rs3918346, **rs3741775** und **rs3918347** eine Assoziation mit Schizophrenie (Chumakov et al. 2002). Sie betonten vor allem den Zusammenhang von G72 und DAAO.

Schumacher et al. untersuchten 2004 die SNPs **rs2111902**, rs3918346 und **rs3741775** und fanden eine signifikante Assoziation aller drei einzelnen SNPs und des 3-SNP-Haplotyps mit Schizophrenien, nicht aber mit bipolaren Psychosen (Schumacher et al. 2004).

Xinmin Liu et al. fanden 2004 eine Assoziation zwischen DAAO und Schizophrenien in der chinesischen Bevölkerung. Sie untersuchten sechs SNPs im DAAO-Locus und in unmittelbarer Nachbarschaft: rs2070587, **rs2070588**, **rs2111902**, rs3918346, **rs3741775** und **rs3825251**, wobei die Untersuchung von **rs3741775** besonders signifikante Werte ergab ($p=0.000001$, $OR=1,59$). Ihre Probandengruppe umfasste 547 an Schizophrenien Erkrankte und 536 Kontrollpersonen (Liu 2004).

Yamada et al. untersuchten 2005 570 nicht miteinander verwandte Schizophreniepatienten (285 Männer, 285 Frauen, Durchschnittsalter $47,0 \pm 11,4$ Jahre) und 570 gesunde Patienten der gleichen Alters- und Geschlechtsgruppe. Außerdem untersuchten sie 80 Trios (schizophrene Patienten und deren Eltern). Alle untersuchten Personen waren Mitglieder der Bevölkerung Zentral-Japans. Die Untersuchung beinhaltete die SNPs **rs2111902**, rs3918346 und **rs3741775**, sowie zusätzlich an 30 randomisiert ausgesuchten Proben die SNPs rs4623951, **rs3825251**, rs3918305. Hier konnte keine Assoziation von Schizophrenien mit DAAO gefunden werden (Yamada 2005).

Yu-Li Liu et al. untersuchten 2005 in der Taiwanesischen Bevölkerung drei DAAO-SNPs (**rs2111902**, rs3918346 und **rs3741775**) und elf SNPs für G72 (rs3916965, rs3916966, rs3916967, rs3916968, rs2391191, rs947267, rs778294, rs3916970, rs3916971, rs778293 und rs3918342). Sie genotypisierten mittels der MALDI-ToF-Massenspektrometer-Methode 218 Familien (864 Personen) in denen mindestens zwei Geschwister an einer Schizophrenie erkrankt sind. In SNP-basierten Einzelmarkerassoziationstests konnte weder für DAAO noch für G72 eine signifikante Assoziation mit Schizophrenien nachgewiesen werden.

2006 führten Wood et al. (Wood 2006) eine Studie mit 345 an einer Schizophrenie, sowie 150 an einer schizoaffektiven Störung Erkrankten und 352 Kontrollpersonen durch. Alle Personen waren weiße Bürger verschiedener Regionen der USA. Es wurden sieben DAAO-SNPs untersucht. Vier der SNPs (**rs2070586**, **rs2111902**, rs3918346, **rs3825251**) zeigten sowohl für Schizophrenien, als auch schizoaffektive Störungen eine deutliche statistische Assoziation. rs3918346 zeigte sogar eine hochsignifikante Assoziation, auch nach Bonferroni-Korrektur.

Prata et al. führten 2007 in der schottischen Bevölkerung eine Studie mit 213 bipolaren Patienten und 197 Gesunden durch. Sie untersuchten acht SNPs: **rs2111902**, rs3918346, **rs3741775**, **rs3918347**, rs746187, rs3916966, rs2391191, rs3916972. Keiner der einzelnen SNPs zeigte eine statistische Signifikanz, jedoch wurde eine signifikante Assoziation mit dem 3-SNP-Haplotyp (A-T-T) als auch eine stärkere Assoziation mit dem 2-SNP **rs2111902**-rs3918346 Haplotyp (A-T) gefunden (Prata 2007).

In einer Untersuchung mit 373 Patienten und 812 Kontrollen in der irischen Bevölkerung untersuchten Corvin et al. 2007 die SNPs **rs2111902**, rs3918346, **rs3741775** und rs888531 hinsichtlich einer Assoziation mit depressiven Symptomen bei Psychosen. Eine signifikante Assoziation konnte für rs3918346 erbracht werden, wobei das C-Allel in der Patientengruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe häufiger vertreten war. Grenzwertig signifikant war **rs2111902**, bei dem das T-Allel in der Patientengruppe vermehrt auftrat. Allerdings konnte die Haplotypanalyse, die für alle vier SNPs durchgeführt wurde, keine signifikante Assoziation zeigen (Corvin 2007). In einer anschließenden Studie untersuchten Corvin et al. rs3918346 erneut im Hinblick auf bipolare Psychosen. Die Untersuchung wurde an Patienten durchgeführt, die zwei Kopien (n=159), eine Kopie (n=79) oder keine Kopie (n=13) der Risikovariante rs3918346 trugen. Die Fragestellung hierbei war, ob die DAAO-Variation auch zu Stimmungsauffälligkeiten bei Schizophrenen führt und es konnte gezeigt werden, dass in erhöhtem Maße depressive Symptome vorlagen, besonders Schuldgefühle und Angst (Corvin 2007).

5.3 Der 12q22-24-Locus als Hotspot für Schizophrenien und bipolare Psychosen

In dieser Arbeit konnte keine signifikante Korrelation zwischen DAO und Schizophrenien oder bipolaren Psychosen gefunden werden. Die Analyse dieses Gens erfolgte nicht zuletzt aufgrund seiner Lage auf 12q24, das aufgrund von zahlreichen Untersuchungen als Hotspot für Schizophrenien und bipolare Psychosen gilt. Auch bei anderen Arbeitsgruppen stand diese Region in der Vergangenheit in besonderem Interesse. In diversen Studien konnten in den letzten Jahren konstant LOD-Scores von 2 bis 3 aufgezeigt werden (Ewald 1998, Morissette 1999, Detera-Wadleigh 1999, Bailer 2000, Degn 2001, Bailer 2002, Curtis 2003, Maziade 2005, Shink 2005) Hohe LOD-Scores weisen auf eine starke Krankheitsassoziation hin, im vorliegenden Fall zu Schizophrenien oder bipolaren Psychosen.

5.4 DAAO und seine Interaktion mit DAOA

Der D-Aminosäure-Oxidase-Aktivator (DAOA, G72) spielt eine wichtige Rolle in der Funktion der DAAO. Es liegt auf dem Chromosom 13q33 und befindet sich bei Primaten im endoplasmatischen Retikulum und in Golgi Zellen. Es ist in der Lage, Multimere zu bilden und bindet bevorzugt an Kohlenhydrate. Als Aktivator der DAAO ist DAOA ebenso bedeutend im Zusammenhang mit Schizophrenien und bipolaren Psychosen. Funktionelle Experimente haben gezeigt, dass nur das DAOA-Gen aktiv übersetzt wird und das Produkt daraus aktiviert DAAO.

Studien haben bei Schizophrenie-Patienten in vivo einen reduzierten D-Serin-Gehalt und eine verminderte Ratio in der D-Serin/DAAO-Expression, sowie erhöhte DAOA-Expression in Hirnproben gezeigt (Chumakov 2002, Tsai 2002, Hashimoto 2003, Korostishevsky 2004, Toro 2004).

Chumakov et al. (Chumakov 2002) fanden ebenso Hinweise auf eine Interaktion zwischen Varianten von DAOA- und DAAO-Loci in der Vulnerabilität für Schizophrenien. Basierend auf der Tatsache, dass die Oxidation von D-Serin durch DAAO die NMDA-Rezeptorfunktion durch die Glycin-Modulator-Stelle abschwächt, nahmen die Autoren an, dass Variationen sowohl der DAOA-, als auch DAAO-Loci die Effektivität des Glutamat-Stroms durch den NMDA-Ionenkanal zu einem erhöhten Risiko der Krankheitsentwicklung einer Schizophrenie führen.

5.5 Vergleich bisheriger Befunde mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit

Schizophrenien sind sehr komplexe Erkrankungen. Es ist noch immer unklar, wie viele Gene involviert sind und inwieweit jedes einzelne davon den Phänotyp beeinflusst. Die effektive Größe der Risikohaplotypen, die bisher beschrieben wurde ist relativ klein (OR <2,5) (O'Donovan 2003) im Vergleich zu dem relativen Risiko anderer Gene für andere Erkrankungen, wie z.B. Apolipoprotein E für die Alzheimer Erkrankung, (Kukull 1996) oder Komplement Faktor H für die altersbedingte Makuladegeneration. (Hageman 2005).

In dieser Arbeit wurden in einer Fall-Kontroll-Studie 9 SNPs des DAAO-Gens (rs12579920, rs2070586, rs6539458, rs11830725, rs2070588, rs2111902, rs3741775, rs3825251 und rs3918347) untersucht, für die in früheren Untersuchungen eine Assoziation zu Schizophrenien oder bipolaren Psychosen gezeigt werden konnte. Für keinen der SNPs ließ sich jedoch, sowohl in der Einzelmarker- als auch der Haplotypuntersuchung, eine Assoziation mit den genannten Erkrankungen finden.

Mögliche Gründe hierfür könnten sein, dass Schizophrenien und bipolare Psychosen eine hohe genetische Heterogenität besitzen.

Die untersuchten Patienten positiver Studien sind eventuell Umweltfaktoren ausgesetzt, die in der unterfränkischen Gegend nicht vorliegen.

Auch ethnische Unterschiede sind eine mögliche Erklärung für differierende Befunde.

Eine weitere Erklärung könnte sein, dass unser Patientenkollektiv ausschließlich aus chronisch Erkrankten bestand.

Abgesehen davon ist es nicht auszuschließen, dass auch falsch-positive Werte für die signifikante Assoziation in einigen Studien verantwortlich sein könnten.

6 Zusammenfassung

Schizophrenien und bipolare Psychosen besitzen eine hohe Lebenszeitprävalenz von einem Prozent und mit bis zu 80% eine hohe Heritabilität (Sullivan 2003). Die Erstmanifestation ist meist im frühen Erwachsenenalter zu beobachten. In der Altersgruppe vom 15. bis zum 44. Lebensjahr liegen Schizophrenien in Bezug auf die durch Behinderung beeinträchtigten Lebensjahre (years of life lived with disability) auf Platz drei. Die Patienten sind sowohl bei der Schizophrenie, als auch bei der bipolaren Psychose ihr gesamtes Leben von der Krankheit betroffen.

Aufgrund der starken genetischen Komponente wird derzeit intensiv nach potentiellen Kandidatengen gesucht, auch im Hinblick auf eine dadurch mögliche Verbesserung in der pharmakotherapeutischen Behandlung.

Die Heritabilität scheint sehr viel bedeutender in der Krankheitsentwicklung zu sein als Umweltfaktoren. Möglicherweise spielen aber auch bisher kaum untersuchte Gen-Umwelt-Interaktionen, sowie auch Gen-Gen-Interaktionen, deren einzelne Varianten jeweils nur geringe bis mittlere individuelle Beiträge liefern, eine Rolle. Sind diese Gene Teil bestimmter Signal-Transduktionskaskaden bzw. morphoregulatorischer Netzwerke so können sich Effekte genetischer Variationen summieren bzw. potenzieren (Epistasie) (Fanous 2005). So liegt es nahe, bestimmte Kandidatengene und deren Varianten genauer zu untersuchen.

Das DAAO-Gen befindet sich auf dem Chromosom 12q24 und somit auf einem Hotspot für Schizophrenien und bipolare Psychosen. In einer Fall-Kontroll-Studie wurden in der vorliegenden Arbeit neun DAAO-SNPs bei 246 Patienten, die an einer Schizophrenie erkrankt sind und 90 Patienten, die unter einer bipolaren Störung leiden, sowie bei 362 Kontrollpersonen untersucht. Ziel war es, eine Assoziation mit den genannten Phänotypen zu überprüfen.

In der vorliegenden Studie konnte jedoch, im Gegensatz zu vorangegangenen Studien, mit keinem der untersuchten SNPs oder deren Haplotypen eine positive Assoziation gefunden werden. Mögliche Erklärungen für die differierenden Befunde können eine hohe genetische Heterogenität, ethnische Unterschiede, Umweltfaktoren, eine unterschiedliche Zusammensetzung des

6. Zusammenfassung

Patientenkollektivs (in der vorliegenden Arbeit wurden ausschließlich chronische Patienten untersucht), oder auch falsch positive Befunde in anderen Arbeitsgruppen sein.

Bei Erkrankungen mit einer solchen Komplexität ist allerdings auch bereits identifizierten Genvarianten keine kausale, sondern nur eine dispositionelle, das Erkrankungsrisiko modulierende, Bedeutung zuzuschreiben.

7 Literatur

Akbarian, S. e. a. (1996). Selective alterations in gene expression for NMDA receptor subunits in prefrontal cortex of schizophrenics. *J Neurosci* 16: 19-30.

Althoff, V. (2005). Genotypisierung von SNPs im humanen FZD3-Gen in einem Kollektiv von Schizophrenie-Patienten. Biomedizin. Würzburg, Julius-Maximilians-Universität.

Bailer, U. e. a. (2000). Genome scan for susceptibility loci for schizophrenia. *Neuropsychobiology* 42: 175-182

Bailer, U. e. a. (2002). Genome scan for susceptibility loci for schizophrenia and bipolar disorder. *Biol Psychiatry* 52: 40-52.

Ball, M. P. (2007). "Illustration of four PCR cycles." 2007.

Becker, A. e. a. (2004). Ketamine-induced changes in rat behaviour: a possible animal model of schizophrenia. Test of predictive validity. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 28: 1267-1277.

Berretini, W. (2002). *Neuropsychopharmacology, The Fifth Generation of Progress*. Philadelphia.

Bleuler, E. (1911). *Dementia praecox oder Gruppe der Schizophrenien*. In Aschaffenburg, G. (Hrsg.) *Handbuch der Psychiatrie. Spezieller Teil. 4. Abteilung. 1. Hälfte*. Deuticke, Leipzig, Wien.

Blouin, J.L., Dombroski, B.A., Nath, S.K., Lasseter, V.K., Wolynec, P.S., Nestadt, G., Thornquist, M., Ullrich, G., McGrath, J., Kasch, L., Lamacz, M. e. al (1998). Schizophrenia susceptibility loci chromosomes 13q32 and 8p21. *Nat Genet*. 70-73.

Brzustowicz, L. M. e.a. (1999). Linkage of familial schizophrenia to chromosome 13q32. *Am J Hum. Genet*. 65: 1096-1103.

Burnet, P. e. a. (2008). D-amino acid oxidase activity and expression are increased in schizophrenia. *Mol Psychiatry* 13: 658-660.

Carlsson, A. (1967). Neurohumoral transmission and neuropsychiatric disorders. *Int.J.Psychiatry*: 218- 219.

Carlsson, M. and C. A. (1990). Schizophrenia: a subcortical neurotransmitter imbalance syndrome? *Schizophr.Bull*: 425- 432.

- Chen, Y.S., e. a. (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.
- Christian, S. L. e. a. (2002). An evaluation of the assembly of an approximately 15-Mb region on human chromosome 13q32-q33 linked to bipolar disorder and schizophrenia. *Genomics* 79: 635-656.
- Chumakov, I., Blumenfeld, M., Guerassimenko, O., Cavarec, L., Palicio, M. B. L., Abderrahim, H., Barry, C., Tanaka, H. e. a. (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 USA*: 13675-13680.
- Corvin, A., e. a. (2007). Evidence for Association and Epistasis at the DAOA/G30 and D-Amino Acid Oxidase Loci in an Irish Schizophrenia Sample. *Am J Med Genet Part B* 144B: 949-953.
- Corvin, A. e. a. (2007). D-amino acid oxidase (DAO) genotype and mood symptomatology in schizophrenia. *Neuroscience Letters* 426: 97-100.
- Craddock, N. e. a. (2006). Genetics of affective (mood) disorders. *Eur J Hum Genet* 14: 660-668.

Curtis, D. e. a. (2003). Genome scan of pedigree 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.

Degn, B. e. a. (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.

Detera-Wadleigh, S. D. (1999). Chromosomes 12 and 16 workshop. *Am J Med Genet* 88: 255-259.

Ebert, D. (2005). *Psychiatrie systematisch*. Bremen.

Erdfelder, E. S. e. a. (1996). GPOWER, a general power analysis program. *Instruments and Computers* 28: 1-11.

Ewald, H. e. a. (1998). Significant linkage between bipolar affective disorder and chromosome 12q24. *Psychiatr Genet* 8: 131-140.

Fanous, A.H. e. a. (2005). Genetic heterogeneity, modifier genes, and quantitative phenotypes in psychiatric illness: searching for a framework. *Mol Psychiatry* 10: 6-13.

Fisher, G.H., Vetere, A., Padula, L., Cusano, G.P., Man, E.H. (1991). Free D-aspartate and D-alanine in normal and Alzheimer brain. *Brain Res. Bull.* 26: 983-985.

Freudenberg, J. e. a. (2002). Blockstruktur des menschlichen Genoms - Ein Organisationsprinzip der genetischen Variabilität. *Deutsches Ärzteblatt.* A3190-A3193.

Gattaz, W. F. e. a. (1982). Glutamate in schizophrenics and healthy controls. *Arch Psychiatr Nervenkr* 231: 221-225.

Goff, D.C. e. a. (2001). The emerging role of glutamate in the pathophysiology an treatment of schizophrenia. *AmJPsychiatry* 158: 1367-1377.

Gottesman, I.I. and E.-K. L (2001). Family and twin strategies as a head start in defining prodromes and endophenotypes for hypothetical early-interventions in schiziphrenia. *Schizophr Res*: 93- 102.

Gustafson, E.C. e. a. (2007). Endogenous D-serine contributes to NMDA-receptor-mediated light-evoked responses in the vertebrate retina. *J Neurophysiol* 57.

Hageman, G.S. e. a. (2005). A common haplotype in the complement regulatory gene factor H (EF1/CFH) predisposes individuals to age-related macular degeneration. *Proc Natl Acad Sci USA* 102: 7227-7232.

- Hannover, U. (2005). "MALDI-TOF." from <http://www.unics.uni-hannover.de/analytik/GrundlagenAnalytik/Analytik%202/Makromo/Maldi%20TOF.html>.
- Harrison, P. e. a. (2003). Genes for schizophrenia? Recent findings and their pathophysiological implications. *Lancet* 361: 417-419.
- Harrison, P.J., McLaughlin, D. e. a. (1991). Decreased hippocampal expression of a glutamate receptor gene in schizophrenia. *Lancet*. 450- 452.
- Hashimoto, e. a. (2003). Decreased serum levels of D-serine in patients with schizophrenia: evidence in support of the N-methyl-D-aspartate receptor hypofunction hypothesis of schizophrenia. *Arch. Gen. Psychiatry*: 572-576.
- Hashimoto, e. a. (2005). Reduced D-serine to total serine ratio in the cerebrospinal fluid of drug naive schizophrenic patients. *Prog. Neuro-Psychopharmacol. Biol. Psychiatry*: 767-769.
- Hattori, E., e. a. (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.
- Javitt, D. C. e. a. (1991). Recent advances in the phencyclidine model of schizophrenia. *Am J Psychiatry* 148: 1301-1308.

7. Literatur

Johnson, J.W. e. a. (1987). Glycine potentiates the NMDA response in cultured mouse brain neurons. *Nature*: 529-531.

Kapur, S., Remington, G., Jones, C. e. a. (1996). High levels of dopamin D2 receptor occupancy with low-dose haloperidol treatment: a PET study. *AM J Psychiatry*: 948- 950.

Kendler, K.S. e. a. (1997). The risk of psychiatric disorders in relatives of schizophrenic and control probands: a comparison of three independent studies. *Psychol Med* 27: 411-419.

Kendler, K.S. e. a. (2001). Twin studies of psychiatric illness: an update. *Arch. Gen. Psychiatry* 58: 1005-1014.

Kety, S.S., Wender, P.H., Jacobsen, B. e. a. (1994). Mental illness in the biological and adoptive relatives of schizophrenic adoptees - replication of the copenhagen study in the rest of denmark. *Arch.Gen.Psychiatry* 1994. Jun: 442- 455.

Kiesseppä, T., e. a. (2004). High Concordance of Bipolar I Disorder in a Nationwide Sample of Twins. *AM J Psychiatry* 161: 1814-1821.

Kim, J.S. e. a. (1980). Low cerebrospinal fluid glutamate in schizophrenic patients and a new hypothesis on schizophrenia. *Neuroscience Letters* 20: 379-382.

7. Literatur

Korostishevsky, M. e. a. (2004). Is the G72/G30 locus associated with schizophrenia? Single nucleotide polymorphisms, haplotypes, and gene expression analysis. *Biol psychiatry* 56: 169-176.

Krebs, H. A. (1935). Metabolism of amino-acids. *Biochem J.*: 1620 - 1644.

Krebs, H. A. (1951). Oxidation of D-amino acids. New York, Academic Press.

Kukull, W.A. e. a. (1996). Apolipoprotein E in Alzheimer's disease risk and case detection: a case-control study. *J Clin Epidemiol* 49: 1143-1148.

Levinson, D. F. e. a. (2000). Multicenter linkage study of schizophrenia candidate regions on chromosomes 5q, 6q, 10q, and 13q: Schizophrenia linkage collaborative group III. *Am J Hum. Genet.* 67: 652-663.

Lieberman, J.A. e. a. (1993). Neurochemistry and neuroendocrinology of schizophrenia: a selective review. *Schizophr.Bull.* 371- 429.

Lin, L.L. e. a. (2000). Expression of trigonopsis variabilis D-amino acid oxidase gene in Eschrichia coli and characterization of it's inactive mutants. *Enzyme Microb. Technol.* 27: 482-491.

Lin, M.W., Curtis, D. e. a. (1995). Suggestive evidence for linkage of schizophrenia to markers on chromosome 13q14.1-q32. *Psychiatr Genet.* 117-126.

7. Literatur

Liu, X. e. a. (2004). Association of DAAO with schizophrenia in the Chinese population. *Neuroscience Letters*: 228-233.

Liu, Y.-L. e. a. (2006). No association of G72 and D-amino acid oxidase genes with schizophrenia. *Schizophr Res* 87: 15-20.

Lyons-Warren A, e. a. (2005). Evidence of association between bipolar disorder and Citron on chromosome 12q24. *Mol Psychiatry* 10: 807-809.

Madeira, C. e. a, (2008). Increased brain D-amino acid oxidase (DAAO) activity in schizophrenia. *Schizophr Res* 3483.

Manske, M. (2006).

Maziade, M. e. a. (2005). Shared and specific susceptibility loci in schizophrenia and bipolar disorder: a dense genome scan in Eastern Quebec families. *Mol Psychiatry* 10: 486-499.

McGue, M. e. a. (1991). The genetic epidemiology of schizophrenia and the design of linkage studies. *Eur.Arch.Psychiatry Clin Neuroscience*: 174 - 181.

McGuffin, P. e. a. (2003). The Heritability of Bipolar Affective Disorder and the Genetic Relationship to Unipoar Depression. *Arch. Gen. Psychiatry* 60: 497-502.

- Meador-Woodruff, J. H. e. a. (2003). Molecular abnormalities of the glutamate synapse in the thalamus in schizophrenia. *Ann N Y Acad Sci* 1003: 75-93.
- Miller, D. N. e. a. (1999). Evaluation and optimization of DNA extraction and purification procedures for soil and sediment samples. *Appl Environ Microbiol* 65: 4715-4724.
- Morissette, J. e. a. (1999). Genome-wide search for linkage of bipolar affective disorders in a very large pedigree derived from a homogenous population in Quebec points to a locus of major effect on chromosome 12q23-q24. *Am J Med Genet* 88: 567-587.
- Mothet, J.P. e. a. (2000). D-serine is an endogenous ligand for the glycine site of the N-methyl-D-aspartate receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 4926-4931.
- O'Donovan, M.C. e .a. (2003). Recent advances in the genetics of schiziphrenia. *Hum mol Genet* 12: R125-133.
- Panatier, A. e. a. (2006). Glia-derived D-serine controls NMDA receptor activity an synaptic memory. *Cell* 125: 775-784.
- Prata, D. e. a. (2007). Association of DAO and G72(DAOA)/G30 genes with Bipolar affective disorder. *American Journal of Medical Genetics Part B: Neuropsychiatric Genetics* published online in advance of print.

- Reif, A. e. a. (2006). A neuronal nitric oxide synthase (NOS-1) haplotype associated with schizophrenia modifies prefrontal cortex function. *Mol Psychiatry* 11: 286-300.
- Sacchi, S. e. a. (2002). Engineering the substrate specificity of D-amino-acid oxidase. *J. Biol. Chem.:* 27510-27516.
- Sauer, S. e. a. (2000). A novel procedure for efficient Genotyping of Single Nucleotide Polymorphisms. *Nucleic Acids Research* 28: e13.
- Schell, e. a. (1995). D-Serine, an endogenous synaptic modulator: localization to astrocytes and glutamate-stimulated release. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.:* 3948-3952.
- Schiffer, H. (2002). Glutamate receptor genes: susceptibility factors in schizophrenia and depressive disorders? *Mol. Neurobiol.:* 191-212.
- Schosser and Aschauer (2004). Auf der Suche nach Vulnerabilitätsgenen der Schizophrenie. *Wiener klinische Wochenschrift.* 827-833.
- Schulze, T.G. e. a. (2005). Genotype-phenotype studies in bipolar disorder showing association between the DAOA/G30 locus and persecutory delusions: A first step toward a molecular genetic classification of psychiatric phenotypes. *AM J Psychiatry* 162: 2101-2108.

- Schumacher, J., Otte, A.C.J., Tullius, M., Kovalenko, S., Van Den Bogaert, A., Maier, W., Rietschel, M., Propping, P., Nöthen, M.M. (2004). Examination of G72 and D-amino-acid oxidase as genetic risk factors for schizophrenia and bipolar affective disorder. *Mol Psychiatry*: 203-207.
- Shaw, S.H., Kelly, M. e. a. (1998). A genome-wide search for schizophrenia susceptibility genes. *Am J Med Genet*: 364-376.
- Shink, E. e. a. (2005). A genome-wide scan points to a susceptibility locus for bipolar disorder on chromosome 12. *Mol Psychiatry* 10: 545-552.
- Shleper, M. e. a. (2005). D-serine is the dominant endogenous coagonist for NMDA receptor neurotoxicity in organotypic hippocampal slices. *J Neurosci* 25: 9413-9417.
- Sklar, P. (2002). Linkage analysis in psychiatric disorders: The emerging picture. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 3: 371-413.
- Somnath, C. P. e. a. (2002). Is there a familial overlap between schizophrenia and bipolar disorder? *J Affect Disord* 72: 243-247.
- Sullivan, P.F. e. a. (2003). Schizophrenia as a complex trait: evidence from a meta-analysis of twin studies. *Arch Gen Psychiatry* 60: 1187-1192.

- Toro, C.T. e. a. (2004) Altered D-serine metabolism in schizophrenia? A post-mortem study using the Stanley Consortium brains. *Schizophr Res* 67:125-126.
- Tost, J. e. a. (2002). Genotyping Single Nucleotide Polymorphisms by Mass Spectrometry. *Mass Spectrometry Reviews* 21: 388-418.
- Toyooka, K. S. e. a. (2002). Selective reduction of a PDZ protein, SAP-97 in the prefrontal cortex of patients with chronic schizophrenia. *J Neurochem* 83: 979-806.
- Tsai, G. e. a. (2002). Glutamatergic mechanisms in schizophrenia. *Annu. Rev. Pharmacol.Toxicol.* 42: 165-179.
- Tsuang, M. T. e. a. (2002). Understanding predisposition to schizophrenia: toward intervention and prevention. *Can J Psychiatry* 47: 518-526.
- Tuominen, H.J. e. a. (2005). Glutamatergic drugs for schizophrenia: a systematic review and meta-analysis. *Schizophr Res*: 225-234.
- Wood, L.S. e. a. (2006). Significant support for DAO as a schizophrenia susceptibility locus: Examination of five genes putatively associated with schizophrenia. *Biol Psychiatry*. in press

7. Literatur

Yamada, K. e. a. (2005). Identification of Multiple Serine Racemase (SRR) mRNA Isoforms and Genetic Analyses of SRR and DAO in Schizophrenia and D-Serine Levels. *Biol Psychiatry* 57: 1493-1503.

Zhang, Y. e. a. (2004). Positive association of the human frizzled 3 (FZD3) gene haplotype with schizophrenia in Chinese Han population. *AM J Med B Neuropsychiatr Genet* 129: 16 ff.

Danksagung

Danksagung

Danken möchte ich Herrn Prof. Dr. K. P. Lesch und Prof. Dr. A. Reif für die Vergabe der Arbeit und die Möglichkeit zur Durchführung molekulargenetischer Experimente in ihrem Labor .

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

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

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

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

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

Herrn Priv-Doz. Dr. Th. Bohrer möchte ich für die Übernahme des Koreferates danken.

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

Nicht zuletzt möchte ich Chris danken für seine Geduld und stete Ermutigung.